

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
имени В.А.ЭНГЕЛЬГАРДА**

На правах рукописи

СЫТИНА Елена Вячеславовна

**Структурно-функциональный анализ промоторных областей
гена *ost-1* мышцы**

Специальность 03 00 03 - молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2005

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-генетической иммунологии Института
молекулярной биологии им В А Энгельгардта РАН

Научный руководитель: к б н Панкратова Елизавета Владимировна

Научный консультант: д б н , профессор Поляновский Олег Леонидович

Официальные оппоненты: д б н , профессор Георгиева Софья Георгиевна
к б н Николаев Лев Григорьевич

Ведущая организация: Институт биологии гена РАН

Защита диссертации состоится 28 июня 2005г в 12⁰⁰ на заседании Диссертационного совета
Д 002 235 01 при Институте молекулярной биологии им В А Энгельгардта РАН по адресу
119991, Москва, ул Вавилова, 32

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им
В А Энгельгардта РАН

Автореферат разослан 26 мая 2005 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



А М Крицын

2006-4
9489

2155822

Общая характеристика работы.

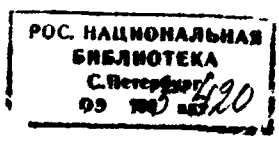
Актуальность проблемы. Белок Oct-1 – фактор транскрипции, принадлежащий к POU-семейству. Описанный в конце 80^х годов, Oct-1 долгое время считался исключительно «вездесущим» фактором транскрипции, регулирующим работу генов «домашнего хозяйства» клетки. Позднее было показано, что Oct-1 принимает участие в регуляции экспрессии ряда тканеспецифических генов, в том числе генов интерлейкинов, легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, генов пролактина, гонадолиберина, тиреотропина и др.

Ранее в нашей лаборатории была клонирована кДНК гена *oct-1* человека - Oct-1R, которая отличалась на 5'-конце от известной в то время человеческой кДНК *oct-1*. Было обнаружено, что разные субформы *oct-1* мРНК имеют альтернативный 5'-концевой экзон. Oct-1R кодирует 10 аминокислот, Oct-1A,B,C - 21 аминокислоту. Сотрудниками нашей лаборатории было показано существование альтернативного сплайсинга для гена *oct-1* мыши и наличие тканеспецифической регуляции экспрессии гена *oct-1*. Сходная картина наблюдается при образовании субформ человеческого белка Oct-1. Кроме того были описаны вездесущие и тканеспецифические изоформы Oct-1, показано существование двух первых экзонов гена *oct-1* - 1U (обнаружен в «вездесущих» изоформах), присутствует в мРНК *oct-1* только в лимфоидных клетках, тимусе, селезенке, лимфатических узлах и в костном мозге) и 1L (присутствует в тканеспецифических изоформах). Были определены точки инициации транскрипции для обоих промоторов. Для экзона 5'-области перед эксоном 1U это позиции -160 и -384 от кодона ATG, перед 1L - проксимальный старт -159 и дистальный -307.

К настоящему моменту описано более полутора десятков генов-мишеней Oct-1, несколько взаимодействующих с ним кофакторов, показано его участие в прикреплении хроматина к ядерной мембране. При этом ничего не известно о регуляции экспрессии самого гена *oct-1*. Данная работа посвящена анализу промоторных областей гена *oct-1* мыши, поиску возможных механизмов регуляции экспрессии гена этого полифункционального фактора.

Цели и задачи исследования. Основной целью данной работы было клонирование промоторных областей гена *oct-1* мыши и изучение механизмов его экспрессии на уровне транскрипции. В ходе исследования предполагалось решить следующие задачи:

- 1 Составить экзон-интронную карту генов *oct-1* мыши и человека и локализовать положение экзона 1L, определить расстояние между экзонами 1U и 1L в геномах мыши и человека.
- 2 Клонировать 5'-области гена *oct-1* перед экзонами 1U и 1L, которые альтернативно включаются в *oct-1* мРНК.



- 3 Провести поиск возможных регуляторных элементов в 5'-областях перед экзонами 1U и 1L. Методами задержки подвижности в геле и футпринтинга провести поиск потенциальных регуляторных элементов, отвечающих за ауторегуляцию гена *oct-1*
- 4 Охарактеризовать промоторную активность 5'-областей гена *oct-1* с помощью временной экспрессии в лимфоидных и нелимфоидных клетках

Научная новизна и практическое значение работы. Белок Oct-1 - фактор транскрипции, принимающий участие в регуляции экспрессии как генов "домашнего хозяйства", так и многих тканеспецифических генов. Вместе с тем о регуляции экспрессии самого гена *oct-1* ничего не известно. Нами впервые была клонирована 5'-нетранслируемая область гена *oct-1* и проанализировано ее строение и функциональная активность, показано наличие двух альтернативных промоторов 1U и 1L - универсального и тканеспецифического, показана возможность существования ауторегуляции гена *oct-1* через изменение активности промотора 1L.

Результаты проведенной работы способствуют лучшему пониманию механизмов регуляции экспрессии генов эукариот, образования различных изоформ одного белка, в том числе за счет использования альтернативных промоторов. Подобные данные не только углубляют представление о таких фундаментальных биологических процессах, как пролиферация и дифференцировка клеток, но и могут быть использованы при разработке новых терапевтических подходов к лечению рака и вирусных инфекций, при изучении механизмов возникновения наследственных заболеваний.

Апробация работы и публикации. Материалы работы были представлены на 7^{ой} Пушкинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (2003), годичных конференциях федеральной подпрограммы «Геном человека» в 1998, 1999, 2002 г., по материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на страницах машинописного текста, содержит 15 рисунков и одну таблицу, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы (всего 109 наименований).



Результаты исследования.

1. Экзон-интронная структура гена *ost-1* мыши и человека.

Перед нами стояла задача определить, какой из двух экзонов, 1U или 1L, является 5'-концевым в гене *ost-1* и локализовать промоторную область гена *ost-1*. Для решения этих задач нами была составлена экзон-интронная карта гена *ost-1*, определено положение экзонов 1U и 1L и клонированы 5'-области перед этими экзонами.

Локализовать на геномной ДНК положение экзонов 1U и 1L нам удалось только после того, как стала известна последовательность геномов человека и мыши в области гена *ost-1*. Анализ нуклеотидной последовательности из банка генов (Gene Bank acc по AC093371.6) показывает, что ген *ost-1* (локус *off-1*) мыши имеет протяженность более 128 т.п.н. и содержит по крайней мере 17 экзонов, а соответствующий человеческий локус *OTF-1* имеет протяженность более 195 т.п.н. (Gene Bank acc по AL45050 и AL136984) и имеет 18 экзонов.

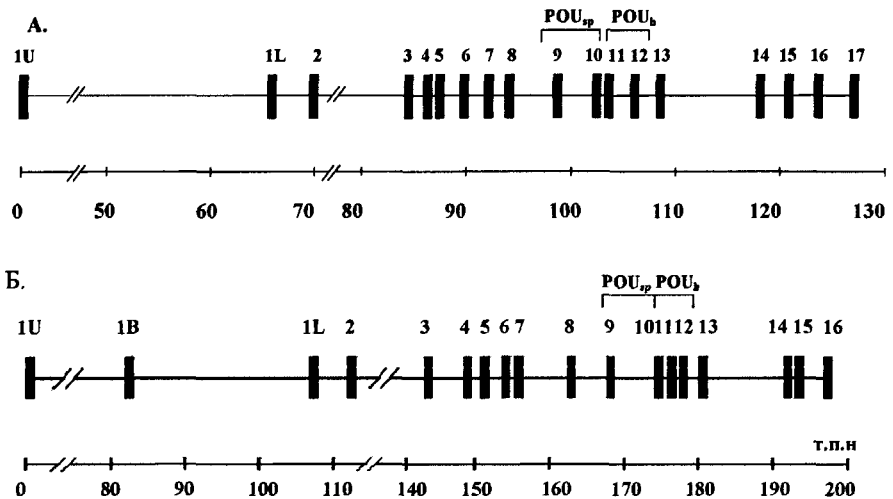


Рис 1. Строение локусов *OTF-1* и *off-1*, где соответственно расположены гены *ost-1* (А) и *hst-1* (Б). Черными прямоугольниками обозначены экзоны, отмечено положение POU-домена.

Анализ нуклеотидной последовательности показал, что в локусе *off-1* экзоны 1U и 1L разделяет около 67 т.п.н., а экзон 1L в свою очередь находится на 4 т.п.н. «выше» второго

экзона. Похожая картина получена и для локуса *OTF-1* человека: экзоны 1U и 1L разделяет 108 п.н., что составляет около половины длины всего гена (Рис 1).

2 Клонирование и анализ 5'-областей перед экзонами 1U и 1L

В результате скрининга обогащенной геномной библиотеки был получен фрагмент 5'-области гена *ost-1* длиной 1,3 к.п.н. Установление нуклеотидной последовательности 5'-области гена (Рис 2) позволило локализовать первый экзон (27 п.н.) и часть первого интрона. Девять кодонов первого экзона полностью соответствуют аминокислотной последовательности N-концевой области гена *ost-1*, установленной ранее и соответствуют экзону 1L. В 5'-области перед экзонами 1L были найдены цис-элементы, которые могут участвовать в регуляции экспрессии гена *ost-1* (Рис 2). В частности, обнаружены две канонические октамерные последовательности в разной ориентации: ATTTGCAT (-370/-377 п.н. от начала трансляции) и ATGCAAAT (-493/-500 п.н.), к которым имеют высокое сродство все Ost-белки (и могут взаимодействовать белки семейства POU). Эта область содержит также три вырожденные *ost*-последовательности – две с заменой одного нуклеотида – ATTTGCAA (-758) и ATTTGGAT (-781), и третью со вставкой одного нуклеотида между участками, узнаваемыми POU- и POUh-доменами ATTTgGCAT (-1126), и перекрывающийся с ней октамер ATTTCCGT (-1120) с двумя заменами. В L-промоторной области гена *ost-1* также как и в промоторах генов факторов транскрипции Oct-3 и Bm-4, отсутствует канонический ТАТА-бокс. Наличие двух канонических *ost*-последовательностей говорит о возможности ауторегуляции экспрессии гена *ost-1*.

В этой же области (положения -330/-1261) расположены пять кластеров, обогащенных А/Т-парами (Рис 2). Содержание А/Т-пар внутри кластеров более чем вдвое превышает содержание Г/С-пар. В промежутках между кластерами это соотношение лишь немногим больше единицы. В кластерах имеются 23 гомеоспецифических мотива, каждый из которых содержит неизменную последовательность ТААТ. Всего лишь один гомеоспецифический участок находится между кластерами. Местоположение всех идентифицированных цис-элементов указано в нуклеотидной последовательности, приведенной на рисунке 2. Первый кластер содержит три гомеоспецифических участка и каноническую *ost*-последовательность в обратной ориентации ATTTGCAT. Второй – семь гомеоспецифических ТААТ-участков и канонический октамер ATGCAAAT. Здесь обнаружены также два участка, содержащие коровую CCAAT-последовательность в разной ориентации, которая может служить мишенью для ядерных белков NF-Y. В этом кластере дважды встречаются тандемы перекрывающихся регуляторных элементов. Один тандем из четырех перекрывающихся

С ТААТ-сайтами могут взаимодействовать как регуляторные белки гомеосемейства, так и РОУ-белки. Встречаемость этих нуклеотидных последовательностей в 5'-области перед экзоном 1L гена *oct-1* в семь раз превышает среднестатистическую. Ранее было показано, что Ост-белки взаимодействуют *in vitro* не только с канонической *oct*-последовательностью и

родственными ост-мотивами, но и с гомеоспецифическими участками. Эффективность этого взаимодействия очень сильно зависит от двух 3'-концевых нуклеотидов ТААТНН. Такая же картина наблюдается и в случае белков гомеосемейства. 3'-фланкирующие нуклеотиды определяют родство и специфичность взаимодействия гомеобелков с олигонуклеотидами, содержащими ТААТ-участки.

Таким образом, 5'-область перед экзоном 1L гена *ost-1* содержит большое число участков, узнаваемых Ост-белками, т.е. контроль экспрессии этого гена может включать механизм ауторегуляции.

Кроме того, в 5'- 1L нетранслируемой области обнаружены 2 сайта связывания вездесущего фактора Sp1 (-69, -28), NF1 (-37) и Ap-2 (-70) сайты.

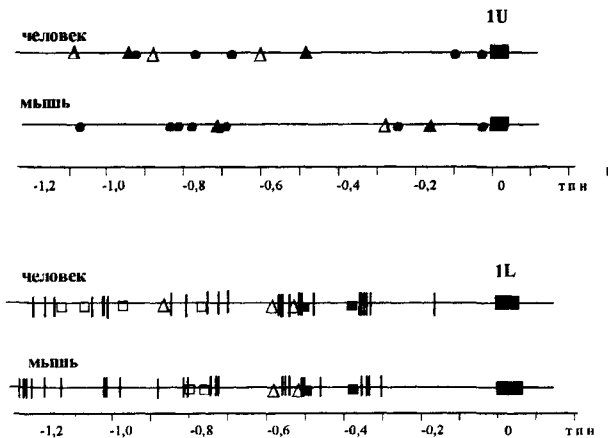


Рис 3. Схема строения промоторных областей 1U и 1L гена *ost-1* человека и мыши. Цветом выделены области наибольшей гомологии, показаны сайты: ● - Sp1, ▲ - Ap-2, △ - CCAAT, ■ - OSTA, □ - вырощенные OSTA, | - TAAT.

Для анализа 5'-UTR 1U экзона гена *ost-1* мыши был проклонирован фрагмент длиной 820 п.н. Анализ его нуклеотидной последовательности и последовательности из Gene Bank (асс по AC093371.6) показал, что данный фрагмент содержит GC-богатые участки протяженностью более 100 п.н., где содержание G/C пар превышает 80%, 2 сайта Ap2 и множество сайтов Sp1, но совсем не содержит ни ост-сайтов, ни каких-либо других сайтов, позволяющих говорить о возможности ауторегуляции.

Анализ 5'-нетранслируемой области перед экзоном 1U человека (Gene Bank асс по AL45050) также выявил 5 сайтов Sp1, 2 сайта Ap-2 и 2 CCAAT-сайта, но при этом не обнаружены ни ост-, ни ТААТ-сайты. Перед экзоном 1U и мыши, и человека не обнаружено четкого группирования цис-элементов в кластеры.

Анализ нуклеотидной последовательности показал, что 5'-UTR перед экзоном 1U мыши не содержит ТАТА-бокса, а 5'-UTR человеческого экзона 1U содержит канонический ТАТА-бокс.

3. Поиск сайтов связывания, потенциально способных участвовать в ауторегуляции гена Oct-1 методом задержки подвижности в геле.

3.1 Анализ ДНК-белковых комплексов.

Белки, взаимодействующие с гомеоспецифическими участками, выявляли по их способности образовывать комплекс с ТААТ-пробами, имеющими различные 3'-фланкирующие нуклеотиды в положениях 5 и 6: ТААТГА, ТААТСА, ТААТТТ и ТААТТГ. Опыт проводили в одинаковых условиях для всех испытуемых проб. Одновременно идентифицировали ядерные белки, образующие комплекс с ост-содержащей пробой ДНК. С помощью метода задержки подвижности в геле установлено, что в лизате клеток миеломы NS/O гомеоспецифические участки образуют комплексы с белками Oct-1 и Oct-2, но с разным сродством. Те же пробы взаимодействуют и с неидентифицированными белками (Рис 4). Так последовательности ТААТТТ и ТААТГА преимущественно узнают белки Oct-1 и Oct-2. Они образуют также комплекс с низкомолекулярным белком (молекулярная масса ниже, чем у Oct-2). Образование указанных комплексов конкурентно ингибируется "холодной" пробой ДНК, содержащей ост-последовательность. К пробе, содержащей ТААТСА, Oct-белки имеют слабое сродство, но зато с этой пробой связываются два других белка – низкомолекулярный (образование комплекса ингибируется "холодной" ост-пробой) и высокомолекулярный (слабо ингибируется "холодной" ост-пробой). С последовательностью ТААТТГ образуют комплекс оба Oct-белка и низкомолекулярный белок (конкурентно ингибируется "холодной" ост-пробой), и еще один белок с молекулярной массой, промежуточной между Oct-1 и Oct-2, взаимодействие с которым слабо ингибируется "холодной" пробой ДНК.

Таким образом, последовательности ТААТТТ и ТААТГА имеют большее сродство к Oct-белкам по сравнению с другими гомеоспецифическими участками (ТААТСА, ТААТТГ). С последними, как это видно из рис 4, образуют комплексы ядерные белки, которые слабо

ингибируются “холодной” ост-пробой. Вероятно, это гомеобелки, не принадлежащие к семейству POU

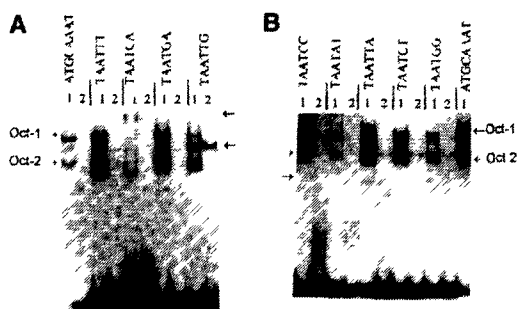


Рис 4 Анализ задержки подвижности в геле (EMSA) комплексов белков ядерных экстрактов клеток NS/0 с ДНК-зондами - элементами промотора 1L мышиного гена *oct-1*. Дорожки 1 - 0,3 μ g зонда, меченого 32 P, 2 - реакция в присутствии 20-кратного избытка "холодного" ост-зонда. Стрелками без подписей обозначены комплексы, не ингибируемые или не полностью ингибируемые добавлением "холодного" ост-зонда.

3.2 Поиск методом футпринтинга сайтов связывания, потенциально способных участвовать в ауторегуляции гена *oct-1*

Методом ПЦР были получены фрагменты ДНК, соответствующие первому и второму АТ-богатым кластерам. Методом футпринтинга были локализованы участки связывания ядерных белков из экстракта миеломных клеток NS/0 и очищенного POU-домена белка Oct-1 с соответствующими участками промоторной области.

При взаимодействии белков экстрактов NS/0 с зондом 2*-1 (Рис 5А) (соответствующим области -469/-261 п.н.) обнаружено несколько участков, защищенных от расщепления. А именно, *oct*-сайт с прилежащими к нему 13 проксимальными и 3 дистальными п.н., и три менее протяженных участка, соответствующих мотивам АТТА и двум ТААТ, расположенных дистальнее области, включающей октамер. Для всех указанных областей прослеживается зависимость степени защиты от концентрации белков в реакционной смеси. При связывании очищенного POU-домена белка Oct-1 с этим же зондом видно, что защищенными оказываются те же участки, что и в опыте с экстрактами NS/0: октамер с прилежащими участками и три ТААТ-сайта (с четко прослеживаемой зависимостью от разведения белка). Защищены еще два сайта AGCCA (-436/-443 п.н.) и АСТТТГААГТ

(- 446/-455 п.н.), причем белки экстракта клеток NS/0 в данном случае обеспечивают более эффективную защиту по сравнению с очищенным POU-доменом Oct-1

При проведении аналогичного эксперимента с зондом 3*-4 (Рис 5Б) показано, что другой канонический oct-сайт (-535/-541) IL промоторной области тоже оказывался защищенным

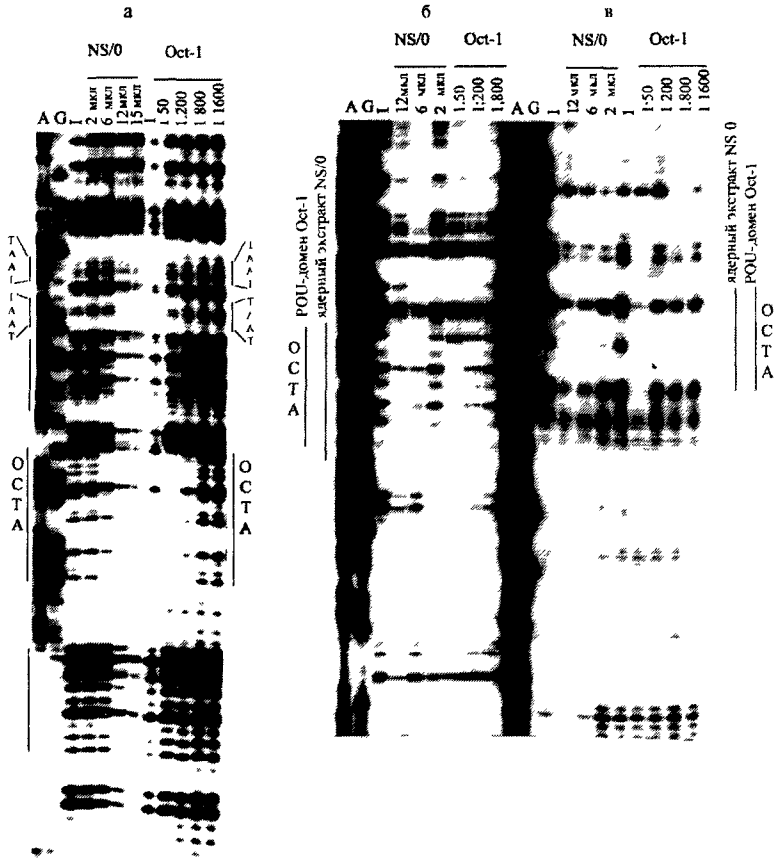
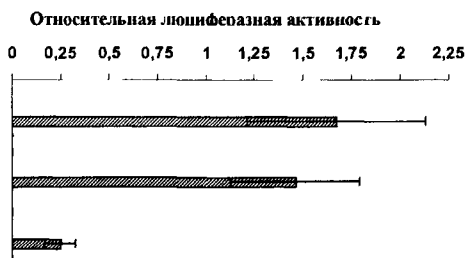


Рис 5 Локализация участков связывания ядерных белков экстракта клеток линии NS/0 и чистого POU-домена белка Oct-1 методом футпринтинга а Связывание с зондом 2*-1, б и в - связывание с зондами 3*-4 и 4*-3 соответственно Сверху указано количество клеточного экстракта (μl) или разведение белка, «—» - контроль в отсутствие белков, A, G - положение соответствующих нуклеотидов на нуклеотидной последовательности зонда Сбоку указано положение октамера и гомеоспецифических сайтов TAAT

как чистым POU-доменом, так и белками клеточного экстракта. Этот же *oct*-сайт выявляется при взаимодействии с зондом 4*-3 (Рис 5В)

Результаты экспериментов по футпринтингу подтвердили предположение о возможности ауторегуляции экспрессии гена *oct-1*, т.к. *oct*-related и ТААТ-сайты оказываются защищенными, как в случае использования экстрактов NS/0, так и в случае очищенного POU-домена белка Oct-1 (Рис 5)

А.



Б.

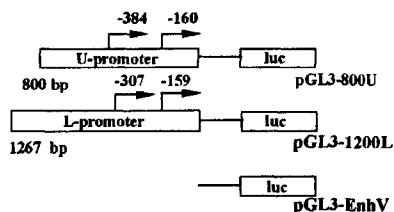


Рис 6 Промоторная активность 5'-фланкирующих областей экзонов 1U и 1L. А Относительная активность люциферазы в фибробластах 10(1), трансфицированных конструкциями, показанными на рис 6Б. Плазмиды, несущие ген *firefly Luc* под промоторами 1U или 1L, были котрансфицированы с контрольной плазмидой pRL-CMV (несет ген *Renilla Luc*). Активность *firefly Luc* была нормализована к активности *Renilla Luc*. Показаны средние значения величин и стандартное отклонение. Б Схема конструкций, использованных для трансфекции. Старты транскрипции обозначены стрелками.

4 Изучение промоторной активности 5'-областей перед экзонами 1U и 1L в клетках линии фибробластов 10(1).

4.1 Определение активности промоторов 1U и 1L.

Временная трансфекция L-промоторной области гена *oct-1*, клонированной в векторе pCAT-Enhancer Vector (Promega), показала, что промоторная активность этой области примерно в 20 раз слабее, чем у промотора вируса SV40 (последний использовался в качестве контроля в составе вектора pCAT-control vector (Promega)).

Для выявления участков, необходимых для экспрессии гена *ost-1*, 5'-фланкирующие области экзонов 1U (820 п н) и 1L (1267 п н) были проклонированы в векторе Luc reporter pGL3-Enhancer vector (Promega) и проведена транзientная трансфекция в клетки линии фибробластов 10(1). Значительная люциферазная активность наблюдалась в этих линиях для обеих 5'-областей 1L и 1U, свидетельствуя о наличии в каждой из них функционально активного промотора (Рис 6). Полученный результат позволяет предположить, что *in vivo* транскрипция гена *ost-1* мыши находится под контролем двух промоторов, расположенных на расстоянии 67 т п н друг от друга.

4.2 Функциональный анализ 5'-фланкирующей области экзона 1L

Для более точной локализации области, отвечающей за промоторную активность, были получены делеции 1L промоторной области гена *ost-1* и клонированы в репортерный вектор pGL3-Enhancer (Рис 7). Делеция фрагмента -1267/-337 (активность pGL3-1200L по сравнению с pGL3-330L) приводит практически к полной потере промоторной активности. Эта область -1267/-337 содержит, по-видимому, регуляторные цис-элементы, необходимые для базальной транскрипционной активности промотора 1L.

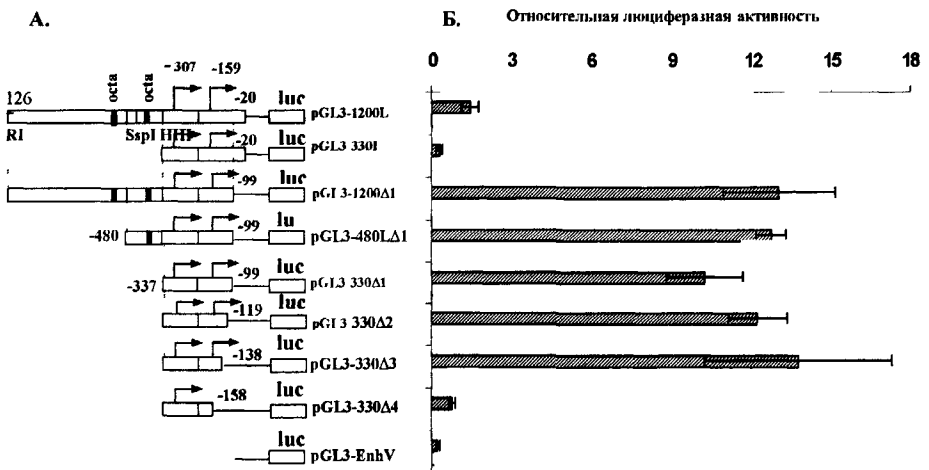


Рис 7 Определение промоторной активности различных участков промотора 1L гена *ost-1* мыши. А Схемы конструкций, использованных для трансфекции. Б Относительная активность люциферазы в фибробластах 10(1), трансфицированных плазмидами, изображенными на рис 6А.

Ингибиторный элемент находится на позиции -99/-20 промотора 1L (Рис 7) делеция фрагмента -99/-20 приводит к почти девятикратному увеличению активности промотора (ср конструкций pGL3-1260L и pGL3-1200Δ1)

Делеция фрагмента -1267/-337 также вызывает практически полное выключение промотора (ср активность pGL3-1260L и pGL3-330L) Удаление области промотора -20/-99 приводит не только к восстановлению промоторной активности, но и ее восьмикратному увеличению по сравнению с исходной (pGL3-1200Δ1, pGL3-480Δ1, pGL3-330Δ1) Компьютерный анализ показал, что этот ингибиторный участок содержит два Sp-1 сайта, и сайты связывания NF-1 и Ap-2 Дальнейшее делетирование фрагмента -99/-138 повышает уровень экспрессии еще почти на 30% (pGL3-330Δ1, pGL3-1260Δ2, pGL3-1260Δ3) Дальнейшее делетирование фрагмента 20 п н, содержащего проксимальный сайт старта транскрипции, разрушает промотор, лишая его активности (pGL3-330Δ4)

Вместе взятые эти данные позволяют предположить, что во-первых, «минимальный промотор» локализован между -337 и -137 п н, и, во-вторых, участок между -20 и -99 п н содержит ингибиторный цис-регуляторный элемент

5 Изучение активности промоторов 1U и 1L в тимфоидных и нетимфоидных клетках

Ряд полученных конструкций с делециями с 5'- и 3'-концов были проклонированы в pGL3-Enhancer (содержит энхансер вируса SV40) и pGL3-Basic векторах, несущих репортерный ген люциферазы *firefly luc* Промоторную активность определяли в трансфицированных клетках линий миеломы NS/0 и фибробластов 10(1) Основная цель эксперимента, изображенного на рис 8, состояла в сопоставлении активности 1U и 1L промоторных областей в лимфоидных NS/0 и нелимфоидных 10(1) линиях клеток В качестве контроля использовался вектор pRL-CMV, несущий ген люциферазы *Renilla luc* Из рис 8 видно, что промоторная активность, локализованная в области 1L, в несколько раз ниже соответствующей активности 1U области Это различие особенно заметно в отношении конструкции L1(pGL3-1200L), которая содержит дистальный ост-сайт В то же время в клетках NS/0 активность транскрипции с 1L промотора даже в отсутствие энхансера многократно возрастала Включение энхансера в конструкцию усиливало промоторную активность L1 в несколько раз и практически не оказывало влияния на активность промотора U (Рис 8) Удивительно сильно эффект энхансера проявлялся в конструкции L2 (pGL3-1200Δ1), как в нелимфоидных, так и, в особенности, лимфоидных клетках

В отсутствие энхансера промотор 1L не активен, однако, делеция участка -99/-20 приводит к тому, что в лимфоидных клетках промотора 1L становится сравнима с активностью промотора 1U. В присутствии энхансера (pGL3 Enhancer Vector) в клетках миеломы NS/0 активность 1L промотора возрастает многократно и превышает активность промотора 1U, а в фибробластах становится сравнима с активностью 1U промотора. В присутствии энхансера делеция -99/-20 вызывает увеличение активности промотора 1L по сравнению с активностью промотора 1U в миеломе NS/0 в 14 раз, а в фибробластах 10(1) примерно в 7 раз.

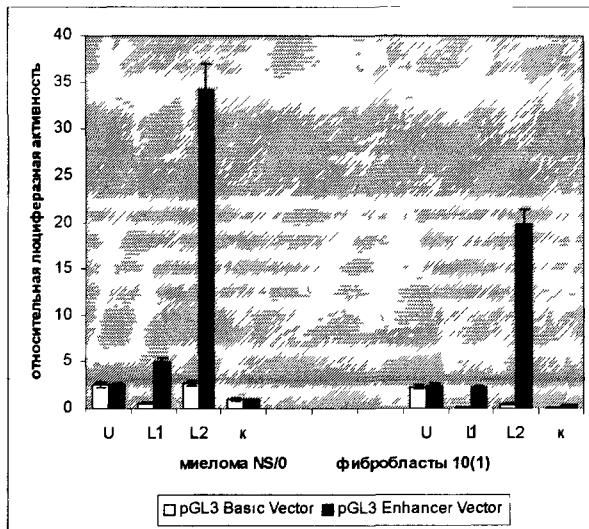


Рис 8 Относительная люциферазная активность промоторов 1U (U) и 1L (конструкции L1 и L2) в лимфоидной клеточной линии NS/0 и линии фибробластов 10(1) в присутствии и в отсутствии энхансера. При определении относительной активности за единицу была принята активность 1U-промотора.

Обсуждение результатов

Экспрессия многих генов, вовлеченных в сложные клеточные процессы, регулируется на разных уровнях. Альтернативный сплайсинг - наиболее изученный механизм тонкой регуляции экспрессии генов, приводящий к образованию нескольких белковых изоформ с одного гена. По последним оценкам альтернативному сплайсингу подвергаются РНК 35-50%

генов человека. В последнее время накапливается все больше сведений, касающихся регуляции транскрипции с помощью альтернативных промоторов - еще одного источника как белкового, так и регуляторного разнообразия. Альтернативные промоторы обеспечивают тонкую временную либо тканеспецифическую регуляцию экспрессии гена. Во многих случаях один из промоторов является конститутивным и отвечает за экспрессию гена во многих тканях и типах клеток, обеспечивая синтез белков «домашнего хозяйства» или вездесущих белков. Другой промотор обладает определенной тканеспецифичностью и отвечает за синтез белков, экспрессируемых лишь в некоторых тканях и/или на определенных стадиях дифференцировки и развития. По данным Landry и соавт. экспрессия от 9% до 18% генов млекопитающих регулируется более чем с одного промотора. Этот механизм, наряду с механизмами альтернативного сплайсинга, обеспечивает тонкую пространственную и временную регуляцию экспрессии генов, необходимую для развития и жизнедеятельности сложных многоклеточных организмов. По данным Landry и соавт. альтернативные промоторы можно подразделить на несколько типов (Рис 9). Простейший и наиболее распространенный случай, когда при использовании любого из альтернативных промоторов получается белковый продукт с идентичной открытой рамкой считывания (Рис 9а). К этой группе, видимо, относятся 60-80% генов, имеющих альтернативные промоторы. Поскольку белок остается неизменным, различие состоит только в месте (тканеспецифичность) или времени его появления (специфичен для какой-либо стадии развития или дифференцировки). В остальных случаях к возможным различиям в транскрипции добавляется появление двух или более белковых изоформ с различными N-концами (Рис 9b) или и вовсе другой ORF (Рис 9c), хотя последний случай является, по-видимому, большой редкостью. Существование трех белковых изоформ, отличающихся N-концевой последовательностью и появляющихся за счет активации транскрипции с одного из трех альтернативных промоторов, описано в частности для фактора Skn-1/Oct-11 человека, экспрессирующегося в коже и принимающего участие в регуляции пролиферации и дифференцировки кератиноцитов.

В данной работе охарактеризованы две области гена Oct-1 мыши, одна из которых (длиной 820 п.н.) граничит с экзоном 1U данного гена, а вторая (1300 п.н.) - с экзоном 1L. Эти области содержат соответственно U и L промоторы гена Oct-1, различающиеся по нуклеотидному составу и содержанию функциональных элементов, которые могут связываться с ядерными белками и участвовать в регуляции экспрессии гена. Последовательность перед 1U экзоном обогащена G/C парами. В некоторых участках,

превышающих по длине 100 п.н., содержание G/C пар превышает 80%. Анализ цис-элементов обнаружил здесь большое число сайтов связывания белка Sp1

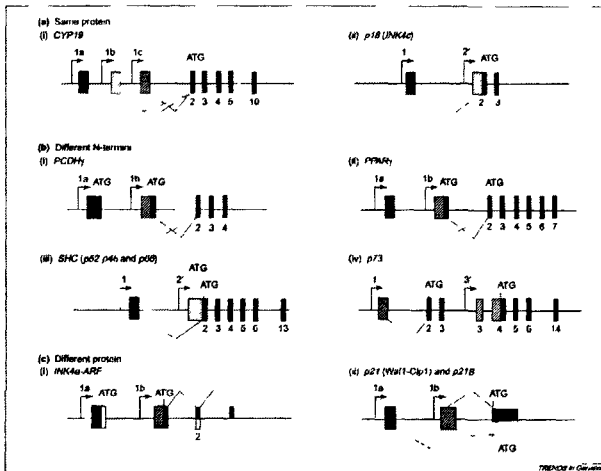


Рис 9 Типы альтернативных промоторов [по Landry и соавт. *TRENDS in genetics* 19, 640-648] (a) Использование альтернативных промоторов (обозначены стрелками) не приводит к появлению белковых изоформ, т.к. сайт инициации трансляции расположен в начале второго второго экзона. Транслируемые экзоны обозначены черным, 3'-UTR не показан (b) С альтернативных промоторов кодируются изоформы с разными N-концевыми последовательностями (c) Использование альтернативных промоторов приводит к образованию белков, транслирующихся в разных ORF (представлены белыми и черными прямоугольниками). Для всех приведенных примеров указаны названия соответствующих генов человека и мыши (кроме случая c(ii), который описан только для человека). В некоторых случаях не все промоторы показаны на рисунке

Анализ 5'-области перед экзоном 1L выявил здесь наличие пяти A/T-богатых кластеров, содержащих регуляторные цис-последовательности. В двух первых, проксимальных по отношению к ATG-кодону, содержатся канонические ост-последовательности в прямой (ATGCAAAT) и обратной (ATTTGCAT) ориентации, с которыми взаимодействуют белки семейства POU. В 1L промоторной области гена Oct-1 так же, как и в промоторах генов факторов транскрипции Oct-3 и Brn-4, отсутствует канонический TATA-бокс. Наличие двух канонических ост-последовательностей и сайтов TAAT говорит о возможности ауторегуляции гена Oct-1. Ауторегуляция свойственна, видимо, факторам семейства POU. Этот механизм, в частности, реализуется при экспрессии гена Pit-1, и вероятно Brn-4.

В области -1261/-330 п н выявлены также 24 гомеоспецифических ТААТ-содержащих участка, с которыми могут взаимодействовать как регуляторные белки гомеосемейства, так и POU-белки. Встречаемость этих нуклеотидных последовательностей в области L-промотора в семь раз превышает среднестатистическую.

Показано, что Oct-белки способны связываться с сайтами, содержащими ТААТ, за счет своего POU-гомеодомена (как гомеобоксные факторы транскрипции), так что ТААТ-сайты являются функциональными для Oct-белков *in vivo*. Большое количество этих последовательностей в L-промоторе и их упорядоченность говорят о том, что гомео-участки могут играть роль в регуляции экспрессии гена Oct-1. В 1L промоторной области гена Oct-1 из 16 возможных вариантов последовательностей ТААТNN представлены 10. Нами были изучены те из них, которые встречаются чаще других и находятся в первом и втором кластерах (ТААТСА, ТААТТТ, ТААТГА), особенно по соседству с oct-последовательностью (ТААТТГ, ТААТСА). Гомеоспецифические участки, обнаруженные в промоторной области 1L, могут функционировать несколькими способами: во-первых, одни из них взаимодействуют преимущественно с Oct-белками (ТААТГА, ТААТТТ), во-вторых, другие мотивы имеют повышенное сродство к гомеобелкам (ТААТСА, ТААТТГ), в-третьих, не все последовательности, содержащие ТААТ, могут быть функционально активны (участвуют непосредственно в инициации транскрипции), однако имея достаточно высокое сродство к Oct-белкам, они могут их связывать и, таким образом, играть роль накопителей и увеличивать локальную концентрацию Oct-белков на данном участке хромосомы. Мы предполагаем, что регуляция экспрессии гена Oct-1 может осуществляться как при участии неизвестных нам гомеобелков, так и посредством ауторегуляции через octa- и гомеоспецифические последовательности, с которыми POU-гомеодомен Oct-белков устанавливает специфические контакты.

В регуляции экспрессии гена Oct-1 участвуют, вероятно, и другие факторы транскрипции, в частности белки семейства NF-Y (ССААТ-белки). Ранее было показано, что белок C/EBP, связывающийся с энхансером, содержащим последовательность ССААТ, и белок Oct-1 являются антагонистами в регуляции гена интерлейкина 8. В этом случае белок Oct-1 сильно подавляет транскрипцию с промотора гена интерлейкина 8, связываясь с oct-последовательностью, перекрывающейся с участком ССААТ, узнаваемым C/EBP. Во втором А/Т-богатом кластере промоторной области 1L присутствуют две последовательности, содержащие ССААТ в разной ориентации (Рис 2). Одна из них находится на расстоянии 4 п н от oct-последовательности и перекрывается с сайтом ТАТТГ, с которым в клетках NS/0 взаимодействует неизвестный белок (вероятно, гомеобелок) (Рис 3). Эта область (-493/-509

п н) состоит из четырех перекрывающихся цис-элементов ост-последовательности, двух гомеоспецифических участков и ССААТ (Рис 2), что может свидетельствовать о тесном взаимодействии в регуляции экспрессии гена Oct-1 гомеобелков, Oct-белков и белков, связывающихся с ССААТ. Распределение сайтов связывания по кластерам тоже может свидетельствовать о кооперативности и о сложной картине взаимодействия белков, участвующих в регуляции экспрессии гена Oct-1.

Как показано в настоящей работе, тканеспецифическая регуляция транскрипции гена Oct-1 мыши может осуществляться на стадии инициации транскрипции. В этот процесс вовлечены два промотора, энхансер и ингибирующие регуляторные элементы. Из рис 8 видно, что в лимфоидных клетках NS/0 экспрессия с промотора L в несколько раз возрастает по сравнению с экспрессией в линии фибробластов 10/1. Это проявляется особенно отчетливо при трансфекции в клетки конструкций, содержащих внешний энхансер SV40. Сходный результат наблюдался ранее при исследовании регуляции экспрессии гена Oct-1 человека. Следует отметить, что энхансер оказывал незначительное влияние на транскрипцию с промотора U.

Oct-1 является вездесущим фактором транскрипции, который в виде нескольких субформ обнаружен во всех тканях, однако содержание отдельных субформ и их набор сильно варьируют в разных тканях.

Тканеспецифическая экспрессия генов может быть опосредована несколькими механизмами. Во-первых, на уровне экспрессии гена Oct-1 происходит альтернативная инициация транскрипции с двух промоторов и альтернативный сплайсинг про-мРНК, в результате чего в клетках иммунной системы и в мозге образуются субформы, которые не обнаружены в других тканях. А именно, Oct-1L и Oct-1R, которые экспрессируются в лимфоцитах. Эти субформы генерируются в незрелых В-лимфоцитах, в клетках селезенки и лимфатических узлов. Клетки миеломы NS/0, соответствующие терминальной стадии дифференцировки В-лимфоцитов, содержат много Oct-1L РНК. В небольших количествах эта РНК содержится в клетках тимуса и Т-клеточной лимфомы EL-4. Во-вторых, белок Oct-1 способен образовывать комплексы с тканеспецифическим ко-регулятором OCA-B/OBF-1/Bob-1, что является обязательным условием активации промоторов генов иммуноглобулинов в зрелых В-клетках. Другой коактиватор – OCA-S, синтезирующийся во всех клетках, образует комплекс с Oct-1, необходимый для активации промотора гистона H2B и системы клеточной пролиферации.

Транскрипция в большей мере зависит, как правило, от относительной концентрации регуляторного фактора, чем от его только наличия или отсутствия. Как было показано ранее,

достаточно 2х-3х кратного изменения этой величины, чтобы достичь изменений в регуляции (обеспечить дифференциальную регуляцию) транскрипции Oct-1 - вездесущий фактор транскрипции, тем не менее уровень его экспрессии в разных типах клеток неодинаков и подлежит регуляции. Как показали Veenstra и соавт., по крайней мере шестикратное различие в концентрации Oct-1 наблюдается в эмбриональных клетках. Относительно высокий уровень экспрессии Oct-1 при этом не коррелирует с высоким уровнем клеточной пролиферации. Показано, что в процессе развития происходит дифференциальная регуляция экспрессии Oct-1: первоначально высокий уровень экспрессии Oct-1 затем сохраняется во все более ограниченной области, т.е. подвергается прогрессирующей пространственной рестрикции. Oct-1, вероятно, участвует в дифференцировке клеток иммунной системы и в специализации и дифференцировке нейронов и клеток нервного гребня.

Регуляция уровня Oct-1 в клетках, по-видимому, происходит с использованием двух различных промоторов, требующих разных условий для активации и репрессии. Несмотря на разницу в структурной организации, оба промотора 1U- и 1L- имеют черты, общие для промоторов генов «домашнего хозяйства». Кроме того, один из них может быть конститутивным, а другой - индуцибельным. Нами был обнаружен ингибиторный участок (-99/-20) в промоторе 1L. Делетирование этого участка вызывает почти 9-кратное увеличение люциферазной активности. Этот район содержит сайты связывания белков Sp-1, Ap-2 и NF-1. Ранее было показано, что в области, содержащей дистальный oct-сайт, имеется сайленсерный участок, что находится в соответствии с результатом, полученным в данном исследовании. В данной работе обнаружен мощный ингибирующий элемент в области между стартами инициации транскрипции и трансляции (-20/-99). Удаление этого участка увеличивает экспрессию репортерного гена Luc в присутствии энхансера в 7 раз в клетках линии 10/1 и в 14 раз в клетках линии NS/O. Эта область содержит сайты связывания белков Sp1, Ap-2 и NF-1. Известно, что уровень Sp1 и Ap-2 регулируется при развитии организма. Sp1 и NF-1 являются вездесущими факторами транскрипции, в то время как уровень Ap-2 наиболее высок в клетках нервного гребня и их производных. Экспрессия некоторых факторов транскрипции, относящихся к POU-семейству, регулируется тканеспецифически с преобладанием их содержания в клетках нервной и иммунной систем.

Некоторые факторы семейства POU, в том числе принимающие участие в развитии головного мозга и нейрогенезе или в развитии иммунной системы, экспрессируются тканеспецифически, в то время как Oct-1 экспрессируется повсеместно. Однако экспрессия Oct-1 также может подвергаться тканеспецифической регуляции с использованием по крайней мере трех механизмов. Во-первых, тканеспецифические изоформы Oct-1

экспрессируются в лимфоидных клетках и в мозге. Во-вторых, Oct-1 может формировать комплексы с тканеспецифическими корегуляторами, например с OCA-B/OBF-1/BoB 1 чтобы активировать иммуноглобулиновые промоторы в зрелых В-клетках. И в-третьих, тканеспецифическая экспрессия, вероятно, может зависеть от активности промотора L в том или ином клеточном типе.

Выводы.

- 1 Составлена экзон-интронная карта гена oct1-1 мыши и человека, локализовано положение экзона 1L. экзоны 1U и 1L разделяют 67 т.п.н. и 108 т.п.н. в генах мыши и человека соответственно.
- 2 Проклонированы 5'-нетранслируемые области экзонов 1U и 1L гена Oct-1 мыши.
- 3 Составлена карта потенциальных регуляторных сайтов этих областей, проведен анализ строения промоторов 1U и 1L гена Oct-1 человека и мыши. Перед экзоном 1L обнаружены сайты, потенциально способные обеспечить ауторегуляцию гена Oct-1.
- 4 С помощью временной трансфекции функционально охарактеризованы промоторные области 1U и 1L. Для промотора 1L мыши локализован "минимальный промотор" в области -337/-137. Обнаружен ингибиторный элемент в области -99/-20, удаление которого приводит к многократному увеличению промоторной активности.
- 5 Проведен анализ активности 1U и 1L промоторов в лимфоидных и нелимфоидных клетках, показана тканеспецифическая экспрессия промотора 1L в лимфоидных клетках.

Список публикаций по теме.

- 1 Сытина ЕВ, Панкратова ЕВ 2003 Фактор транскрипции Oct-1 – пластичность и полифункциональность Молекулярная Биология, т 37 (5) 755-67
- 2 Pankratova EV, Sytina EV, Luchina NN, Krivega IV 2003 The regulation of the oct-1 gene transcription is mediated by two promoters Immunol Lett ,v 88(1) 15-20
- 3 Панкратова ЕВ, Сытина ЕВ, Степченко АГ, Поляновский ОЛ Oct-гены и Oct-факторы транскрипции 1998 Тезисы отчетной конференции по программе "Геном человека", с 54
- 4 Панкратова ЕВ, Сытина ЕВ, Юдина ГФ, Степченко АГ, Поляновский ОЛ Регуляция экспрессии генов Oct-1 и Oct-2 1999 Тезисы отчетной конференции по программе "Геном человека", с 72
- 5 Панкратова ЕВ, Деев ИЕ, Женило СВ, Лучина НН, Сытина ЕВ, Поляновский ОЛ Регуляция экспрессии фактора транскрипции Oct-1 и образование его тканеспецифических субформ в клетках иммунной системы 2002 Тезисы отчетной конференции по программе "Геном человека", с 74
- 6 Pankratova E, Sytina E, Luchina N, Krivega I, Manuylova E 2003 Oct-1 gene alternative splicing and transcription regulation Advances in molecular cell biology Conference devoted to the 10th anniversary of the Center for Medical Studies (1993-2003) 149-158
- 7 Сытина ЕВ, Лучина НН, Кривега ИВ, Панкратова ЕВ Регуляция экспрессии всездущего фактора транскрипции Oct-1 опосредована двумя промоторами 2003 Тезисы доклада Сборник тезисов 7^{ой} Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века", с 380

Заказ № 904 Подписано в печать 18 05 05 Тираж 100 экз Уст пл 0,84

ООО "Цифровичок", тел. (095) 797-75-76
www.cfr.ru

1 0 4 9 2

РНБ Русский фонд

2006-4

9489