

УДК 576.315.42

В эритроидных клетках кур протяженный фрагмент хромосомы 14, включающий кластер альфа-глобиновых генов, организован в микропетли

Е. С. Филоненко[#], А. А. Гаврилов, С. В. Разин, О. В. Яровая
Институт биологии гена РАН
[#] e-mail: len_soap@mail.ru

РЕФЕРАТ Ранее было продемонстрировано, что активация транскрипции тканеспецифичных генов при клеточной дифференцировке коррелирует с пространственной реорганизацией геномных доменов, в границах которых расположены эти гены. Эта реорганизация заключается в перемещении всего домена, содержащего один или несколько активно транскрибирующихся генов, к ядерному матриксу. Однако оставалось неясным, действительно ли в такой ситуации протяженные геномные области равномерно прикрепляются к ядерному матриксу. Мы исследовали характер прикрепления к ядерному матриксу в эритроидных и лимфоидных клетках 220 т.п.н. геномного фрагмента, содержащего кластер α -глобиновых генов и окружающие его гены «домашнего хозяйства». Полученные результаты позволяют утверждать, что в эритроидных клетках часть этого фрагмента, включающая в себя домен α -глобиновых генов, организована в микропетли, которые при картировании участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с низким разрешением не детектируются.

В хромосомах эукариот ДНК организована в петли, основания которых фиксированы на ядерном матриксе [1, 2]. Участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу неоднородны по своей природе. Выделяют конститутивные (стабильные, структурные) участки прикрепления, которые существуют во всех тканях организма, и факультативные (динамические, функциональные, тканеспецифичные) участки прикрепления, характерные для клеток определенного типа, либо стадии дифференцировки [2-5]. Целью настоящей работы было изучение пространственной организации 220 т.п.н. района куриной хромосомы 14, который включает кластер тканеспецифичных α -глобиновых генов и ряд «генов домашнего хозяйства» (рис. 1) [6]. С целью дискриминации различных типов взаимодействий ДНК с ядерным матриксом проводилось параллельное изучение пространственной организации домена

в эритроидных и неэритроидных клетках. В качестве объекта были выбраны куриные эритробласты линии HD3 (клон А6 линии LSCC) [7] и куриные лимфоидные клетки линии DT40 (CRL-2111, ATCC). Ранее методом гибридизации *in situ* с флуоресцентными ВАС-пробами к исследуемой области генома нами было продемонстрировано, что в лимфоидных клетках эта область генома организована в несколько петель, закрепленных на ядерном матриксе [8]. В эритроидных клетках пространственная организация той же геномной области оказалась принципиально иной. Большая часть локуса была коллапсирована на структурах ядерного матрикса и выявлялась в виде точечного сигнала при гибридизации протяженной пробы с препаратом экстрагированных 2M NaCl ядер (т.е. с ядерными «гало») [8]. Результаты, полученные рядом авторов, позволяют полагать, что активно транскрибирующиеся тканеспецифичные

гены ассоциированы с ядерным матриксом [9-11]. В связи с этим логично было предположить, что наблюдаемый нами коллапс петли хроматина в куриных эритроблестах является следствием активации тканеспецифичных генов в ходе эритроидной дифференцировки. Для уточнения топографии взаимодействий ДНК с ядерным матриксом в изучаемой геномной области нами использовался следующий подход: в исследуемой области были выбраны короткие тест-фрагменты, отстоящие друг от друга на 5 т.п.н., и методом полуколичественного ПЦР-анализа оценивалась представленность этих фрагментов в препаратах прикрепленной к матриксу ДНК (рис. 1). Последовательности праймеров, использованных для ПЦР-анализа, представлены в табл. 1. Препараты ДНК ядерного матрикса получали, как описано в [11-12]. Количество эндонуклеазы подбирали таким образом, чтобы средний размер фрагментов прикрепленной к ядерному матриксу ДНК составлял 5 т.п.н. В качестве

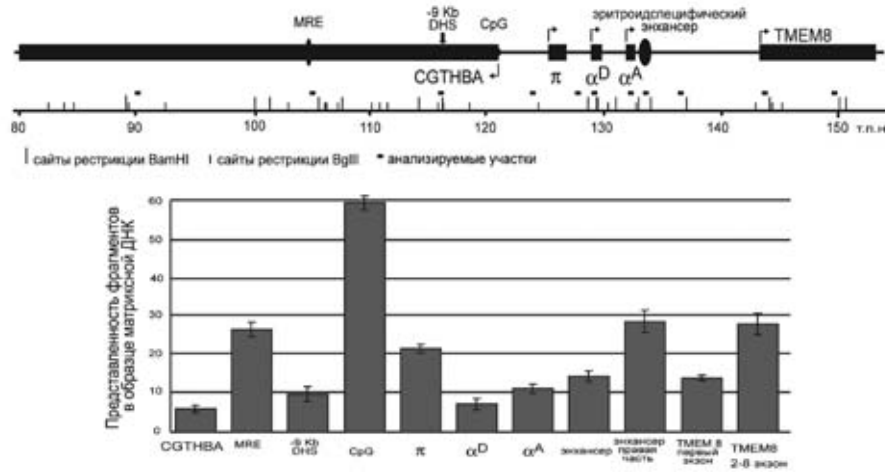


Рис. 1. Картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу в границах 220 т.п.н. локуса хромосомы 14 кур, включающего кластер альфа-глобиновых генов. В верхней части рисунка показана схема изучаемой геномной области. На схеме: RHBDF – ген, кодирующий эпидермальный фактор роста; MPG – 3- ген, кодирующий метиладенин-ДНК-гликозилазу; CGTHBA – ген домашнего хозяйства с неизвестной функцией; CpG – CpG островок, содержащий участок начала репликации ДНК; pi – эмбриональный α -глобиновый ген; α^A и α^D «взрослые» α -глобиновые гены; TMEM8 – ген, кодирующий транс-мембранный белок 8; P15 – ген, кодирующий белок L 28 митохондриальных хромосом; Axin1 – ген, кодирующий аксин. Т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов. В нижней части рисунка показаны результаты картирования участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Черный прямоугольник показывает протяженную область, которая представляется целиком прикрепленной к ядерному матриксу в клетках HD3

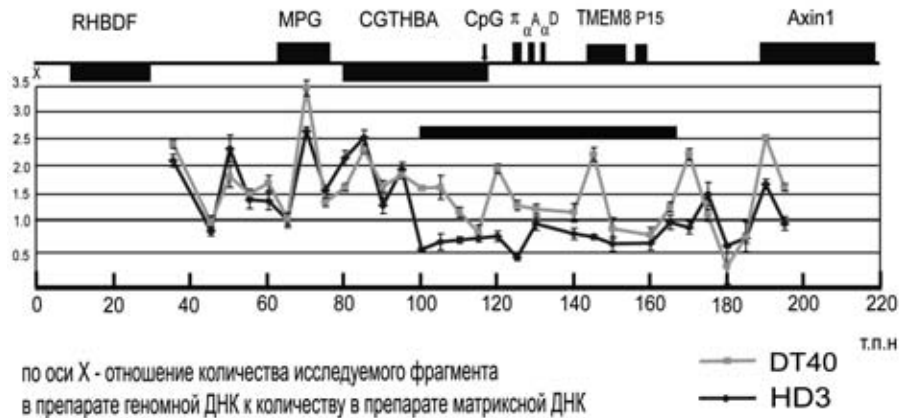


Рис. 2. Анализ представленности в ядерном матриксе из клеток HD3 фрагментов ДНК, картирующихся в границах тканеспецифичных генов и различных регуляторных элементов. Положения тест-фрагментов показаны черными линиями под картой изучаемой области. Участки расщепления ДНК рестриктазами Bam HI и Bgl II показаны соответственно длинными и короткими вертикальными черточками над шкалой расстояний. Столбцы на диаграмме в нижней части рисунка отражают относительную представленность тест-фрагментов в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК

Табл. 1. Праймеры для картирования участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с использованием техники полуколичественной ПЦР

название праймера	последовательность ДНК
01 dir	5' CTCATTTGCCAGCGAGATAT 3'
01 rev	5' GCSTCGATGGTGCAGTAAGC 3'
02 dir	5' CCCTGTAGGCTGCAACCCG 3'
02 rev	5' ACAGTCCSTTTTCCATCACC 3'
03 dir	5' CATCTGTGCATCCGTTCTAC 3'
03 rev	5' TCTTCTAAAGTGCCACCATC 3'
04 dir	5' CCSTATTTTCAGGGTTATTA 3'
04 rev	5' AAATGTAAGCGATTGGTAG 3'
05 dir	5' GCGTGGAGTAGTTCAGGTAA 3'
05 rev	5' GACACTGAGTCCCACCAAAG 3'
06 dir	5' CACTTGTGAATGCAGGTAA 3'
06 rev	5' TCTTCTAAGATTGCCGTGTT 3'
07 dir	5' GGCTGCATAGCATTACTTTC 3'
07 rev	5' GTAGGACTTAACACCAACGT 3'
08 dir	5' TCCATGTAAGGAGCAGATT 3'
08 rev	5' GTGTTTGGGAGCAGTGAGT 3'
09 dir	5' TCATTCTGCCTGACCCTTT 3'
09 rev	5' CCTCCTCAGAGCCAACCAAA 3'
10 dir	5' GGAAACTCAGGCTCACAAT 3'
10 rev	5' GCAAGGCCAAGAAGCAATAT 3'
11 dir	5' AAGCACTCAGAAGCACAACA 3'
11 rev	5' GCCAGACTTACGAAAATCAAA 3'
12 dir	5' CACAGGACTATCCAGGTATG 3'
12 rev	5' AGGGCTGTCTCCTCAGTA 3'
13 dir	5' GCTGCTCTACCTGTCTCA 3'
13 rev	5' GCCTGTCTCTCTCCCTACC 3'
14 dir	5' CTGCCTCATGTTTGTAAAG 3'
14 rev	5' CAAAGTCCAAAAGTATAAA 3'
15 dir	5' ATTACCAAGCCTACTTCATT 3'
15 rev	5' GTTGAGACTTTGATCTGTGG 3'
16 dir	5' CAGAGCTCAATTCATAGG 3'
16 rev	5' TTATCTGGGGTACCTGCAT 3'
17 dir	5' TGTTCCTGGTACTCGTCAG 3'
17 rev	5' TCACCGCATATCGACTCCGT 3'
18 dir	5' GCAGACTCTTAGATTGGCAT 3'
18 rev	5' CTCAGTCAGAACAGAGGAAA 3'
19 dir	5' GTGAAAAAATCCACTGTAAA 3'
19 rev	5' ATCTAAAGCCAATGAAGAAAA 3'
20 dir	5' TATCCCTCCCTGCCTTACC 3'
20 rev	5' AGGCAGCCACTCTCTTTG 3'
21 dir	5' GCCCTCGTGTCTTGATTT 3'
21 rev	5' ATTCCAGCAGCCTTCTTCC 3'
22 dir	5' ACCTCATCACCTTCCACAT 3'
22 rev	5' TGCCACAACCATCGTCTCA 3'
23 dir	5' TCAGGAGCACCACCTTTAGA 3'
23 rev	5' TGTGTCAGCAGCTCCGGTAA 3'
24 dir	5' GGAGTGCTACTTCTTTGAT 3'
24 rev	5' TGGTAATGTTCTACTGGGT 3'
25 dir	5' AAGCGTGTGCATGTGAAA 3'
25 rev	5' TGAGTCTGCTGATGGTCTG 3'
26 dir	5' TCCSTAACAATGTGAGTTCC 3'
26 rev	5' CTGCTGCATACAGCTTTGGA 3'
27 dir	5' GTGCTTATCTGAGCCCTTCC 3'
27 rev	5' CAGTATCACCCAGCTCCACA 3'
28 dir	5' TTCAAATCACTTACGCTACA 3'
28 rev	5' CTGGTTATCTGCTCTCTG 3'
29 dir	5' TGGATGCTGACAGTCTTGA 3'
29 rev	5' TGCGGTGAAAGAGTTGGAGT 3'
30 dir	5' CAGTCTATCTCCCGTTGCTA 3'
30 rev	5' AAACCTTACGGCTGGTCTCA 3'

контроля использовали геномную ДНК, где все исследуемые фрагменты представлены в одинаковой степени. Полученные результаты представлены на *рис. 1* в виде отношения содержания исследуемых фрагментов в препаратах геномной ДНК к содержанию этих фрагментов в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. При таком способе представления результатов прикрепленные к ядерному матриксу фрагменты ДНК располагаются близко к оси абсцисс, тогда как петли ДНК имеют вид пиков. В качестве положительного контроля был использован фрагмент кластера α -глобиновых генов, содержащий CpG островок, который, как было продемонстрировано ранее, перманентно прикреплен к ядерному матриксу [5]. Результаты показали, что в лимфоидных клетках DT40 участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу распределены относительно регулярно в пределах всей исследуемой области и разделяются не связанными с ядерным матриксом фрагментами ДНК (*рис. 1*). Среднее расстояние между участками прикрепления или, иными словами, размер петля ДНК, составляет 20-30 т.п.н. Это хорошо согласуется с предшествующими наблюдениями, где с использованием принципиально иного методического подхода было показано, что в клетках DT40 данная геномная область организована в короткие петли [8]. В эритроидных клетках большая часть исследуемой геномной области оказалась предпочтительно представлена в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. Анализ полученных результатов (*рис. 1*) позволяет заключить, что протяженный фрагмент генома с координатами от 100 до 170 т.п.н. на карте, показанной на *рис. 1*, целиком прикреплен к ядерному матриксу. Действительно, в границах этого фрагмента отсутствует чередование прикрепленных и не прикрепленных к ядерному матриксу фрагментов ДНК, которое хорошо просматривается во фланкирующих областях. В пределах прикрепленного к ядерному матриксу протяженного геномного фрагмента локализируются домен α -глобиновых генов, а также гены P15, TМЕМ8 и часть гена CGTHBA. Участок с координатами 35-100 т.п.н. (*рис. 1*) организован сходным образом в клетках HD3 и DT40. Эта область содержит гены домашнего хозяйства, которые экспрессируются на относительно низком уровне как в эритроидных, так и в лимфоидных клетках [13]. Обсуждавшиеся выше результаты коррелируют с результатами предшествующей работы, в которой пространственная организация домена α -глобиновых генов кур и фланкирующих его геномных областей изучалась с использованием гало-FISH [8]. Неясным, однако, остается вопрос, действительно ли область с координатами 100-170 т.п.н. (*рис. 1*) прикреплена к ядерному матриксу на всем своем протяжении. Альтернативная модель заключается в том, что эта область организована в микропетли, которые не могли быть обнаружены при нашем анализе в силу того, что тест-фрагменты располагались на расстояниях 5 т.п.н. друг от друга. Для проверки данной модели было проведено подробное картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу в ряде функционально значимых сегментов изучаемой геномной области. Эксперименты проводили на клетках HD3. Препараты прилежащей к ядерному матриксу ДНК получали посредством отщепления дистальных частей петель ДНК рестриктазами Bam HI и Bgl II. Далее методом ПЦР в реальном времени проводили ана-

лиз прикрепления к ядерному матриксу фрагментов ДНК, включающих эритроид-специфичные гены и регуляторные элементы (*рис. 2*, схема в верхней части рисунка). Последовательности праймеров и TaqMan проб приведены в *табл. 2*. Полученные данные (диаграмма на *рис. 2*) продемонстрировали, что в прилежащей к ядерному матриксу ДНК представленность исследуемых фрагментов ДНК различна. Лучше всех представлены фрагменты ДНК, содержащие расположенный перед кластером альфа-глобиновых генов CpG островок, ORF TМЕМ8, эмбриональный

Табл. 2. Праймеры и TaqMan пробы для картирования участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с использованием техники ПЦР в реальном времени

название праймера	последовательность
TМЕМ8 2-8 экзон probe	5' FAM CACTGTAАCT(ВНQ1)TTGTGTTTTGTGCCTGTAGC 3'
TМЕМ8 2-8 экзон dir	5' AGGCTCCAGCAGTGAGATCC 3'
TМЕМ8 2-8 экзон rev	5' GACCTGGGCATACAAGATAAGC 3'
TМЕМ 1-й экзон probe	5' FAM CTACAACAGCCTCACT(ВНQ1)GTGAAGCTCTCTC 3'
TМЕМ 1-й экзон dir	5' AGGAGCTATCAАATGCAGTGTCT 3'
TМЕМ 1-й экзон rev	5' AGGTACAGAAAGGTCCAGAAACA 3'
DHS -9 probe	5' FAM ATTTGATCCTAGATT(ВНQ1)GCCAGTGAATTGAA 3'
DHS -9 dir	5' GCGATATTGAATGTCTCTAGGA 3'
DHS -9 rev	5' GCTTTGACTGGATGACTGCC 3'
MRE probe	5' FAM AAGTGTGACT(ВНQ1)CATGGTTGTAGTTTGC 3'
MRE dir	5' GCTGCCTCATGTTGTTAAGATA 3'
MRE rev	5' GTGACTCAGCAAGAACAGCAGA 3'
CGTHBA probe	5' FAM TGAACACAGCAGAACT(ВНQ1)GGAAGGCAA 3'
CGTHBA dir	5' CACCAGCATGACTAGGTCTTTG 3'
CGTHBA rev	5' ATCAGGACACATGGTTGGACA 3'
CpG probe	5' FAM CCACAAAT(ВНQ1)CAAAGCGATGCGGTAT 3'
CpG dir	5' TTCACAGCACAAGGATAACT 3'
CpG rev	5' GATCTGAGCTGCATCACTAAATG 3'
alphaD probe	5' FAM AACGCCGT(ВНQ1)GAAGAAGCTGGACAAC 3'
alphaD dir	5' TGTTCACCACCTATCCCCA 3'
alphaD rev	5' GTTGCTCAGCTCAGCCATG 3'
alphaA probe	5' FAM AGGTAGGTGT(ВНQ1)CCTTCTCTGTCTCCG 3'
alphaA dir	5' AGGGCATCTTCAACAAAATC 3'
alphaA rev	5' GTGGAGCACAGTGAGTCAGG 3'
enh probe	5' FAM AAGTGCTGATGGTTCTT(ВНQ1)GTTGGAGTGT 3'
enh dir	5' GCAGACAGGCTGGAGAAGAC 3'
enh rev	5' GGTCATAGCCCAAAGAGCAG 3'
enh right probe	5' FAM TTCAGAGAGTAAGTTCTT(ВНQ1)ATGCGTTGCTC 3'
enh right dir	5' TTAGGCTGTGCTCCTCCAAC 3'
enh right rev	5' AACAGGTGCGATAAACAGATGCT 3'
Pi probe	5' FAM ACGCAT(ВНQ1)GATCCGCACCTTGAААТАСА 3'
Pi dir	5' GCTCACAGCAGTTTGAAGACCT 3'
Pi rev	5' CAAAAGCCTGGAGGAGAAC 3'

α -глобиновый ген λ , удаленный регуляторный элемент домена альфа-глобиновых генов (MRE) и участок, расположенный после (в направлении центромеры) эритроид-специфического энхансера. В то же время сам энхансер, а также глобиновые гены α^D и α^A , представлены в прилегающей к ядерному матриксу ДНК на относительно низком уровне. Выявлен и ряд других участков, недопредставленных в прилегающей к ядерному матриксу ДНК: это первый экзон открытой рамки считывания ТМЕМ8, эритроид-специфичный регуляторный элемент, локализованный в участке гиперчувствительности к ДНКазе I на расстоянии 9 т.п.н. перед геном λ и часть гена домашнего хозяйства CGTNBA. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что в эритроидных клетках в границах геномной области с координатами 100–170 т.п.н. (рис. 1) существуют участки, которые не прикреплены к ядерному матриксу. Различный уровень представленности в прилегающей к ядерному матриксу ДНК отдельных фрагментов данной области позволяет полагать, что она организована в микропетли. В связи с малым размером этих петель они не могут

быть выявлены при анализе результатов гибридизации протяженных клонированных фрагментов генома с препаратами ядерных «гало». Ранее пространственная организация домена α -глобиновых генов кур была изучена с использованием метода фиксации конформации хромосомы (3C) [14, 15]. В этих экспериментах было показано, что в пролиферирующих клетках HD3 (в которых глобиновые гены транскрибируются на очень низком уровне) происходит сборка преинициаторного блока регуляторных элементов, который включает MRE, расположенный перед кластером альфа-глобиновых генов CpG островков и промотор гена α^D . Два из элементов этого регуляторного блока ассоциированы с ядерным матриксом, что может способствовать их взаимодействию. ●

Данная работа была выполнена при поддержке Президиума РАН (Программа «Молекулярная и клеточная биология») и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 09-04-00059, 08-04-91970-ННИОМ_а, 08-04-0048а).

Список литературы:

1. Cook P.R., Brazel I.A., Jost E. // J Cell Sci. 1976. V. 22(2). P. 303–324.
2. Razin S. V. // Bioessays. 1987. V. 6(1). P. 19–23.
3. Jackson D.A., Dolle A., Robertson G. et al. // Cell Biol Int Rep. 1992. V. 16(8). P. 687–696.
4. Razin S., Gromova I. // Bioessays. 1995. V. 17. P. 443–450.
5. Razin S.V., Kekelidze M.G., Lukanidin E.M. et al. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14(20). P. 8189–8207.
6. Borunova V.V., Razin S.V., Iarovaia O.V. // Dokl Biochem Biophys. 2008. V. 421. P. 224–226.
7. Beug H., Von Kirchbach A., Doderlin J. et al. // Cell. 1979. V. 18. P. 375–390.
8. Iarovaia O.V., Borunova V.V., Philonenko E.S. et al. // J Cell Biochem. 2009. V. 106(1). P. 170–178.
9. Jackson D.A., Cook P.R. // EMBO J. 1985. V. 4. P. 919–925.
10. Heng H.H., Goetze S., Ye C.J. // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 999–1008.
11. Iarovaia O.V., Akopov S.B., Nikolaev L.G. et al. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33(13). P. 4157–4163.
12. Iarovaia O.V., Bystritskiy A., Ravcheev D. et al. // Nucl Acids Res. 2004. V. 32. P. 2079–2086.
13. Flint J., Tufarelli C., Peden J et al. // Hum Mol Genet. 2001. V. 10(4). P. 371–382.
14. Gavrilov A.A., Razin S.V. // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36(14). P. 4629–4640.
15. Gavrilov A.A., Razin S.V. // Biochemistry. 2008. V. 73(11). P. 1192–1199.