

УДК 577.214.6

Связывание белкового фактора CTCF в альфа-глобиновом локусе генома кур

Е. С. Котова¹, С. Б. Акопов¹, Д. А. Дидыч¹, Н. В. Петрова², О. В. Яровая², С. В. Разин², Л. Г. Николаев^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: lev@ibch.ru

Поступила в редакцию 16.10.2015

Принята к печати 22.01.2016

РЕФЕРАТ В альфа-глобиновом локусе генома кур и окружающих областях с использованием метода двумерного сдвига электрофоретической подвижности проведен систематический поиск фрагментов ДНК, содержащих потенциальные сайты связывания фактора транскрипции CTCF. При помощи иммунопреципитации хроматина проверена занятость белком CTCF таких сайтов в отобранных фрагментах в эритроидных и лимфоидных клетках. Лишь один из 13 фрагментов ДНК, связывающихся с CTCF *in vitro*, с высокой эффективностью взаимодействует с этим белком *in vivo* в эритроидных клетках и менее эффективно в лимфоидных. Таким образом, связывание CTCF с участком ДНК *in vitro* по большей части не означает, что этот участок будет занят CTCF в ядре клетки. Связывание же CTCF *in vivo*, как правило, сопровождается связыванием белка с данным участком *in vitro*. При эритроидной дифференцировке не происходит существенных изменений в связывании CTCF с исследованными фрагментами ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гены глобинов, фактор транскрипции CTCF, эритроидная дифференцировка.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EMSA – сдвиг электрофоретической подвижности (Electrophoretic Mobility Shift Assay); PBS – фосфатно-солевой буфер; AEBSF – 4-(2-аминоэтил)бензилсульфонилфторид (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride); ChIP – иммунопреципитация хроматина (Chromatin Immunoprecipitation); ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим массированным секвенированием.

ВВЕДЕНИЕ

Гены *HBZ*, *HBAD* и *HBAA*, кодирующие альфа-глобины, располагаются в альфа-глобиновом домене генома кур на хромосоме 14. Домен альфа-глобиновых генов кур относят к доменам открытого типа с присутствующими им особенностями: он располагается в богатой генами области, чувствителен к нуклеазам во всех типах клеток и реплицируется в начале S-фазы клеточного цикла. Кластер альфа-глобиновых генов фланкирован генами «домашнего хозяйства», которые активно транскрибируются во всех изученных типах клеток [1]. Примерно в 20 т.п.н. с 5'-стороны от глобиновых генов находится главный регуляторный элемент (MRE, major regulatory element) домена [2], включающий в себя эритроид-специфичный промотор полнодоменного транскрипта [3]. Энхансер и сайленсер, активные в эритроблестах кур, обнаружены вблизи 3'-конца гена *HBAA*. При эритроидной дифференцировке во всем домене меняется статус ацетилирования гистона H4 [4].

Фактор транскрипции CTCF считается одним из основных организаторов различных сетей регуляции генов, включая активацию и репрессию транскрипции, образование независимо функционирующих доменов хроматина, регуляцию импринтинга и т.д. Фундаментальные свойства CTCF позволяют ему действовать как фактору транскрипции, инсуляторному белку, а также как компоненту распределенных по геному пограничных элементов, способному привлекать различные факторы, появляющиеся в ответ на разнообразные внешние и внутренние сигналы [5, 6]. Ранее в альфа-глобиновом локусе кур были идентифицированы несколько сайтов связывания CTCF. Во-первых, это сайты M9 и C10-C14, связанные с CTCF в эритроидных и неэритроидных клетках и принадлежащие последовательностям с функциями инсуляторов [7], и CTCF-зависимый сайленсер (CDS, CTCF-Dependent Silencer [8]), связанный с CTCF в эритроидных клетках HD3 и 6C2. Кроме того, методом ChIP-seq выявлены несколь-

ко сайтов, связанных с СТСФ в эритроцитах пяти- и десятидневных эмбрионов кур (обозначены здесь 5d1–5d3, 10d1–10d3, см. [9]). Один из этих сайтов, 5d1/10d2, по-видимому, принимает участие в переключении активности глобиновых генов в процессе развития [10].

В настоящей работе предпринят систематический поиск потенциальных сайтов связывания СТСФ в альфа-глобиновом домене кур и окружающих областях при помощи разработанного нами ранее метода двумерного сдвига электрофоретической подвижности (2D-EMSA, [11, 12]). Дальнейшее выявление среди отобранных фрагментов тех, которые связаны с СТСФ в клетках эритроидного и неэритроидного типа, проводили путем иммунопреципитации хроматина с анализом ПЦР в реальном времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток

Линию куриных эритробластов HD3, трансформированных вирусом эритробластопа птиц (клон А6 линии LSCC, см. [13]), и линию В-клеток кур DT40 (CRL-2111) выращивали в среде DMEM/F12 (1 : 1) (Invitrogen) с добавлением 2% куриной и 8% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO₂. При выращивании DT40 к среде дополнительно добавляли 2-меркаптоэтанол до концентрации 50 мкМ. Терминальную эритроидную дифференцировку клеток HD3 индуцировали инкубацией клеток в течение 12 ч в присутствии 20 мкМ ингибитора протеинкиназы iso-H-7 (1-(5-изохинолинсульфонил)-3-метилпиперазиндигидрохлорид, Sigma-Aldrich) при pH 8.0 и 42°C в 100% воздушной атмосфере как описано ранее [14]. Для контроля дифференцировки использовали окрашивание клеток бензидином [15]. К 25 мкл 0.4% (w/v) раствора бензидина (Sigma) в 4% уксусной кислоте добавляли 1 мкл 30% раствора H₂O₂, смешивали с 25 мкл суспензии клеток, выдерживали в течение 10 мин и с помощью светового микроскопа выявляли бензидин-положительные клетки, окрашенные в темно-синий цвет. Доля гемоглобинсодержащих (бензидин-положительных) клеток составляла 21% после 12 ч инкубации. При этих условиях уровень транскрипции гена альфа-глобина близок к максимальному, но продолжает возрастать [16].

Белок СТСФ и антитела к нему

Полноразмерный куриный белок СТСФ, содержащий полигистидиновую (6 × His) последовательность, был синтезирован в клетках COS-1 и частично очищен по описанному ранее методу [17]. Кроличьи поликлональные антитела к фрагменту куриного СТСФ (ами-

нокислотные остатки 86–233) приготовлены согласно [17, 18].

Получение библиотеки коротких фрагментов альфа-глобинового локуса

ДНК клона CH261-75C12 искусственной бактериальной хромосомы (BAC, получена из CHORI BACPAC Resource Center, <https://bacpac.chori.org>), содержащую вставку альфа-глобинового локуса кур длиной 227366 п.н., очищали при помощи набора Plasmid Midi Kit (Qiagen) и обрабатывали нуклеазой Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase (Epicentre) в соответствии с рекомендациями производителей.

Библиотеку коротких фрагментов получали в основном согласно [19]. Два образца ДНК BAC расщепляли либо Sau3AI, либо Csp6I (Fermentas), к липким концам присоединяли библиотечный праймер ACTGAGGTCGACATCCATGAACA. Полученные суббиблиотеки амплифицировали при помощи ПЦР (21–24 цикла) с использованием того же праймера и набора Encyclo PCR kit («Евроген») в присутствии 1.5 М бетаина и 5% диметилсульфоксида по следующей схеме: 95°C, 30 с; 55°C, 30 с; 72°C, 90 с. Суббиблиотеки объединяли и очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

ПЦР-амплификацию фрагментов M9, CDS и HBAD на матрице полученных библиотек проводили с помощью набора Encyclo PCR kit («Евроген») в присутствии 1.5 М бетаина и 5% диметилсульфоксида. Использовали следующие пары праймеров: TCAGGAAGAAAGAATGGGAAA и CCTGCGTTTTAGCTGATTTGG для M9; TCCCAGCACSTCGCAGTGCA и GCACAAGGCTCAAAGGTGAGACA для CDS; CCCAGACCAAGACSTACTTCC и GCTGAGGTTGTCCACGTTCTT для HBAD. Начиная с 24 цикла ПЦР, из реакционной смеси через каждые три цикла отбирали аликвоты по 2.5 мкл и анализировали их в 1% агарозном геле.

Сдвиг электрофоретической подвижности (EMSA)

Отобранные фрагменты 1–13 амплифицировали на матрице плазмидной ДНК, выделенной из соответствующих клонов ранжированной библиотеки, с помощью ПЦР (10 циклов – 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 90 с) с использованием библиотечного праймера. Далее аликвоту реакционной смеси использовали для радиоактивного мечения в ходе ПЦР согласно [12]. Для сдвига электрофоретической подвижности ~5 нг (30000–50000 имп/мин) меченого фрагмента ДНК смешивали с 1 мкг поли(dI-dC), 1–2 мкг (по белку) ядерного или цитоплазматического экстракта или 2 мкл раствора очищенного белка СТСФ в 20 мкл конечного объема 12 мМ HEPES-КОН pH 7.9, 12%

глицерин, 60 мМ KCl, 0.3 мМ EDTA, 0.6 мМ DTT. Для дополнительного сдвига электрофоретической подвижности добавляли 4.5 мкг антител против СТСФ или 3 мкг моноклональных антител к полигистидину (Sigma, H1029). Смесь инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, разделяли в 5–7.5% полиакриламидном геле, приготовленном на 50 мМ трис-боратном буфере pH 8.3, 0.5 мМ EDTA, и радиоавтографировали в течение 16–40 ч.

Двумерный сдвиг электрофоретической подвижности (2D-EMSA) проводили так, как описано нами ранее [12] с небольшими модификациями. ПЦР-амплификацию проводили в присутствии 1.5 М бетаина и 5% диметилсульфоксида с использованием набора Encyclo PCR kit («Евроген»). Для первого раунда двумерного EMSA использовали 10 мкл белковой фракции, содержащей около 0.5 пмоль СТСФ, для второго раунда – 1 мкл той же фракции. Полученную библиотеку СТСФ-связывающих фрагментов ДНК клонировали в плазмиду pGEM-T (Promega) и ранжировали в 96-луночных планшетах. Секвенировали 230 клонов и картировали их на геноме кур (сборка galGal4).

Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

Иммунопреципитацию хроматина проводили в соответствии с описанной ранее методикой [20]. Примерно 3×10^7 клеток на стадии экспоненциального роста (для DT40 и HD3) либо собранных через 12 ч после начала индукции (для индуцированных HD3) фиксировали 1% по объему формальдегидом в 60 мл среды DMEM/F12 (1 : 1) в течение 8 мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 4 мин при 700 *g* и 4°C, промывали PBS, содержащим 1 мМ AEBSF и 1 мкл/мл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, P8340), повторно осаждали, ресуспендировали в 200 мкл 50 мМ трис-HCl pH 8.0, 1% SDS, 10 мМ EDTA и инкубировали в течение 10 мин на льду для лизиса. Далее клетки обрабатывали ультразвуком при помощи процессора Cole-Parmer CP750 (амплитуда 30%, 30 циклов по 3 с с интервалом 10 с). Обломки клеток удаляли в микроцентрифуге (10 мин, 13000 об/мин, 4°C), супернатант разводили в 10 раз 16.7 мМ трис-HCl pH 8.0, 16.7 мМ NaCl, 1.2 мМ EDTA, 1% Triton X-100, 0.01% SDS, 1 мМ PMSF и 1 мкл/мл коктейля ингибиторов протеаз. На этой стадии отбирали аликвоту для входного контроля (input). Клеточный лизат очищали от неспецифически связавшихся белков преинкубацией с белок-А-агарозой (Invitrogen), а затем инкубировали с 2 мкг поликлональных антител к СТСФ или контрольных кроличьих поликлональных антител к тауматину (предоставлены Е.А. Стукачевой) в течение ночи при 4°C и перемешивании. ДНК-белковые комплек-

сы собирали на белок-А-агарозе, промывали и элюировали с носителя буфером для элюции (1% SDS, 0.1 М NaHCO₃, 2 раза по 15 мин) при комнатной температуре. Затем к раствору добавляли NaCl до 0.2 М, последовательно РНК-азу А и протеиназу К, и инкубировали при 65°C в течение 4 ч для обращения шшивки. ДНК экстрагировали дважды смесью фенол-хлороформ и осаждали этанолом в течение ночи при 4°C в присутствии 20 мкг гликогена в качестве носителя. Фрагменты ДНК собирали центрифугированием, растворяли в воде и анализировали с использованием количественной ПЦР в реальном времени при помощи амплификатора MX3000P (Stratagene) и реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген») в объеме 25 мкл в течение 40 циклов – 95°C, 30 с; 61–65°C (для разных праймеров), 30 с; 72°C, 60 с. Эффективность ПЦР рассчитывали при помощи программы LinRegPCR [21].

При проведении количественной ПЦР в качестве положительного контроля использовали фрагмент F1 сайленсера гена лизоцима кур [22] и фрагмент промоторной области гена MYC курицы [23]. Не связывающиеся с СТСФ фрагмент энхансера из бета-глобинового локуса кур [8] и участок экзона гена альфа-D-глобина (HBAD) использовали в качестве отрицательного контроля. Фрагменты ДНК амплифицировали на матрице геномной ДНК кур со следующими праймерами: CAGCACAGTTCTGGCTATGAAA и CCTCAGCTGGGGTCAATAAGT (сайленсер гена лизоцима); AAGCAGCGAGGAGCGCCSTTT и TACTACAAGGAGAGGTTCGGAAGT (промотор гена MYC); GGGCAGGTTGCAGATAAACA и TAACCCCTCTCTCCCTCA (энхансер из бета-глобинового локуса); CCCAGACCAAGACCTACTTCC и GCTGAGGTTGTCCACGTTCTT (экзон гена HBAD); TGTGGTCAATCCATGTCSTCAATC и GGAAGCTTTTGGSSAAGGAGAA для 10d1; GCTCTTCTCACCCAGGTTTCT и CATCCAGCCCTCTCCAAACA (10d2, 8 и 5d1); TGACCCATCTTGCAATGGATACT и GTTTGGGAACSTCTCTCTCCATCC (10d3); ATAGGACTTCCCTGCTTCCATCT и GTTGGAGTGTGTGGTCTTCTCC (5d2); GTGAGGAGAGGGCGAAGTTTATT и GCTCCCTGAGCTCCTCACCT (5d3); ATAACSTTGGCASCASAATAAGCA и TTTGGAAAGTGCTGTGGGTAAG (фрагмент 1); TTCTACACTTGTCCCTCSTTTTCA и CSTATTTTGTGGCTGCATTCTTC (фрагмент 2); GGAGCTCAGCAGGCAGAAATA и GCTAAGGCAAAGGCTCTGTTGT (фрагмент 3); CTCTGCATTGCTGTGTGTGTTTT и ATGGTGGTTATCTCAGGGGTTTT (фраг-

мент 4); GGTACGTTCTCAGTGCCCAAC и CCACCTGCAGACСТААCCTGTC (фрагмент 5); CAGCTCTTCTGGCTCATTGTCT и ATCTCCSTTTCAGTCCCCTTCTC (фрагмент 6); TTTCACCCAGAAAGTTCATGCT и CCCAGTGTGGAAGCCATTTATC (фрагмент 7); CATGGGCAGCAAACACACAG и TCCATTTCCAGCGGTTCTTATC (фрагмент 9); AGGTAGGACTCAGCAGGGACAG и GGGACAAGTAGCTGGGACAAAA (фрагмент 10); CTGGAGATACCCATGGCAGAAC и TTTGTGGCCAACGTCAAACТАC (фрагмент 11); GGTTTGCSTTTCTTGCTCTG и ATGCCATCTCACTTGCTCT (фрагмент 12); CGTACCAGCACCAGACAAACAG и TCGACTGTTGAAGGAGGCATAA (фрагмент 13).

Данные анализировали при помощи ресурсов геномного браузера (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>) [24] и NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор CTCF-связывающих последовательностей при помощи 2D-EMSA

Для получения библиотеки CTCF-связывающих последовательностей методом двумерного EMSA (2D-EMSA, см. [12]) искусственную бактериальную хромосому (BAC), содержащую вставку длиной 227366 п.н., полностью перекрывающую альфа-глобиновый локус кур и включающую обширные фланкирующие участки, исчерпывающе гидролизовали рестриктазой *Sau3AI* либо *Csp6I*. К полученным липким концам присоединяли синтетические адапторы, амплифицировали с помощью ПЦР, и оба гидролизата смешивали в равных количествах. Полученную библиотеку коротких фрагментов (около 1000 фрагментов со средней длиной ~500 п.н.) метили ³²P и смешивали с белковой фракцией, обогащенной полно-размерным CTCF, экспрессированным в клетках COS-1 [17]. Реакционную смесь далее разделяли электрофоретически в неденатурирующем полиакриламидном геле (в первом направлении). Полосу с образцом вырезали, инкубировали в содержащем SDS буфере для разрушения ДНК-белковых комплексов, и фрагменты ДНК разделяли в содержащем SDS геле (во втором направлении). Область, содержащую большинство фрагментов, исходно связанных с CTCF (обведена на *рис. 1A*), вырезали из геля, фрагменты ДНК элюировали и амплифицировали. Для повышения эффективности отбора процедуру повторяли.

Специфичность отбора проверяли при помощи амплификации полученной и исходной библиотек

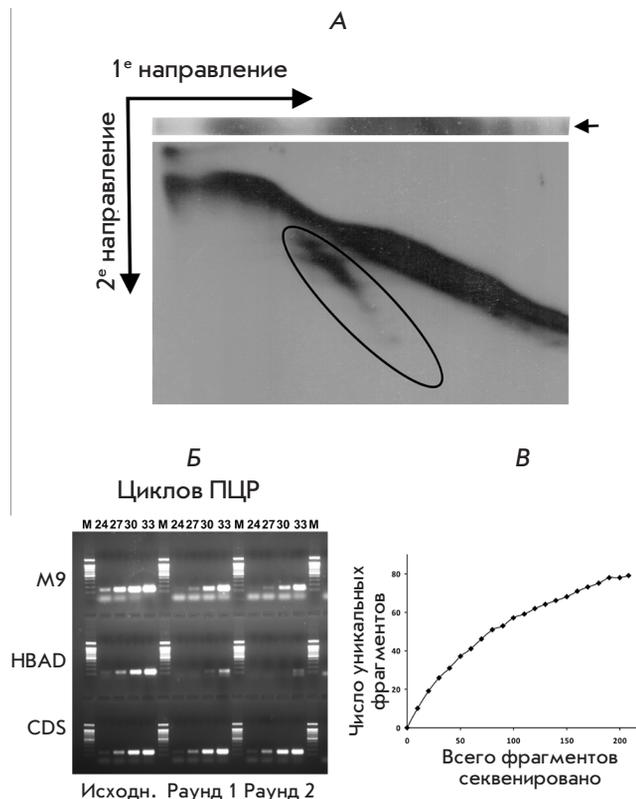


Рис. 1. Приготовление и характеристики библиотеки CTCF-связывающих фрагментов ДНК. А – отбор CTCF-связывающих фрагментов методом двумерного сдвига электрофоретической подвижности (2D-EMSA). Показаны результаты двумерного электрофореза для второго раунда отбора. Овалом обведена область, содержащая отобранные CTCF-связывающие фрагменты. Детальное описание см. в тексте. Б – оценка степени обогащения библиотеки фрагментами, связывающими CTCF. Исходную ДНК и ДНК библиотеки после первого и второго раундов отбора при помощи 2D-EMSA использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами к CTCF-связывающим сайтам альфа-глобинового локуса кур: CDS (CTCF-зависимый сайленсер) и последовательности M9. Не способную связывать CTCF последовательность экзона гена *HBAD* использовали как отрицательный контроль. В – кривая разрежения, полученная в ходе секвенирования библиотеки CTCF-связывающих фрагментов

с праймерами к последовательностям альфа-глобинового локуса кур, связывающим CTCF согласно опубликованным данным: CDS (CTCF-зависимый сайленсер) [8] и M9 [7]. Последовательность экзона гена *HBAD*, не связывающую CTCF, использовали в качестве отрицательного контроля. Результаты амплификации представлены на *рис. 1Б*.

Как видно из *рис. 1*, после двух раундов отбора продукты ПЦР областей CDS и M9 становятся видимыми после 24 и 27 циклов амплификации соответственно, тогда как продукт контрольного, не связывающего CTCF участка гена *HBAD*, становится видимым лишь после 33 циклов. С учетом того, что все три фрагмента амплифицируются из исходной библиотеки с примерно равной эффективностью (см. исходную дорожку на *рис. 1Б*), можно грубо оценить, что обогащение конечной библиотеки CTCF-связывающими фрагментами составляет ~64–512 раз.

Фрагменты ДНК, полученные после второго раунда отбора, клонировали в вектор pGEM-T, белые колонии (230) распределяли по 96-луночным планшетам и секвенировали их вставки. Из этих последовательностей 22 соответствовали фрагментам ВАС, геномной ДНК *Escherichia coli* или химерным фрагментам, 208 принадлежали альфа-глобиновому локусу. Среди них выявлено 79 уникальных последовательностей. Построенная кривая разрежения (*рис. 1В*) указывает, что секвенирование произведено с глубиной, достаточной для идентификации большинства потенциальных CTCF-связывающих фрагментов локуса.

Десять отобранных фрагментов ДНК (1–4, 6–10, 13) использовали в качестве зондов для проверки методом сдвига и дополнительного сдвига электрофоретической подвижности (EMSA, supershift) их способности связываться с CTCF. Два фрагмента (10 и 13) представлены на *рис. 2*. Все 10 фрагментов были способны связывать CTCF, что свидетельствует о высокой эффективности отбора.

Распределение потенциальных участков связывания CTCF

Все 208 секвенированных фрагментов были картированы на геноме кур (сборка galGal4, 2011 г.). Таблица с координатами всех картированных фрагментов ДНК в формате bed доступна по запросу. Полная карта распределения фрагментов приведена в верхней части *рис. 3*. Видно, что в локусе имеется ряд участков с повышенной эффективностью отбора (обозначены вертикальными стрелками), т.е. с повышенным сродством к CTCF в условиях EMSA. В нижней части *рис. 3* приведена подробная часть карты, непосредственно включающая гены глобинов, указаны положения генов (RefSeq), а также некоторых идентифицированных ранее регуляторных элементов, в частности энхансера/сайленсера [25] и MRE (Major Regulatory Element, [2]). Показаны также идентифицированные ранее в различных типах клеток и тканей участки ДНК, способные связывать CTCF: M9, C10–C14 [7] и участок CTCF-зависимого

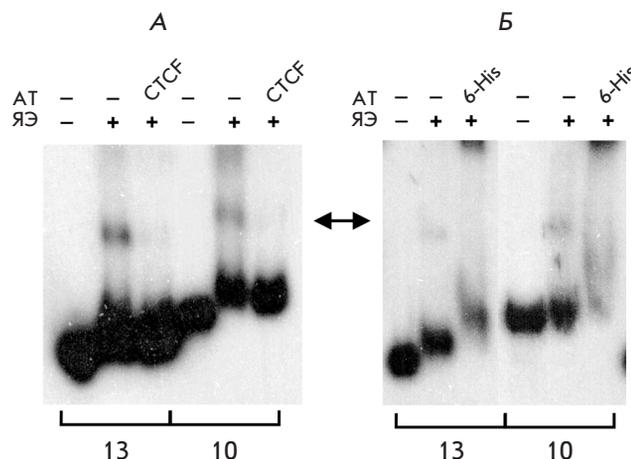


Рис. 2. Связывание CTCF с отобранными фрагментами ДНК 10 и 13. Использовали антитела к CTCF (А) и полигистидиновой последовательности (Б). АТ – антитела, ЯЭ – ядерный экстракт

сайленсера [8]. Участки связывания CTCF 5d1–5d3 и 10d1–10d3 выявлены ранее методом ChIP-seq в пяти- и десятидневных эмбрионах кур соответственно [9].

Как видно из *рис. 3*, подавляющее большинство найденных ранее сайтов связывания CTCF совпадает либо находится на очень небольшом расстоянии от участков с высокой эффективностью отбора, т.е. хорошо связывающихся с CTCF в условиях EMSA. Сайт связывания 10d1, расположенный за границей увеличенного участка карты, также совпадает по положению с участком повышенного сродства к CTCF. Отметим, что сайт связывания и место сшивки при иммунопреципитации хроматина могут не полностью совпадать из-за изгиба ДНК [26, 27], т.е. фрагменты, идентифицируемые по EMSA и ChIP, не обязательно перекрываются, хотя и должны находиться на небольшом расстоянии друг от друга.

Связывание CTCF в области альфа-глобиновых генов *in vitro* и *in vivo*

Чтобы сравнить связывание CTCF с участками ДНК, обнаруживаемыми методом EMSA и выявляемыми в живой клетке методом ChIP, мы провели опыты по иммунопреципитации хроматина в 13 участках ДНК из области глобиновых генов, а также в участках 5d1–5d3 и 10d1–10d3 [9] в трех типах клеток – линии эритробластов HD3, той же линии, индуцированной к терминальной эритроидной дифференцировке (HD3-ind), и неэритроидной линии DT40 В-клеток кур. Положение амплифицированных

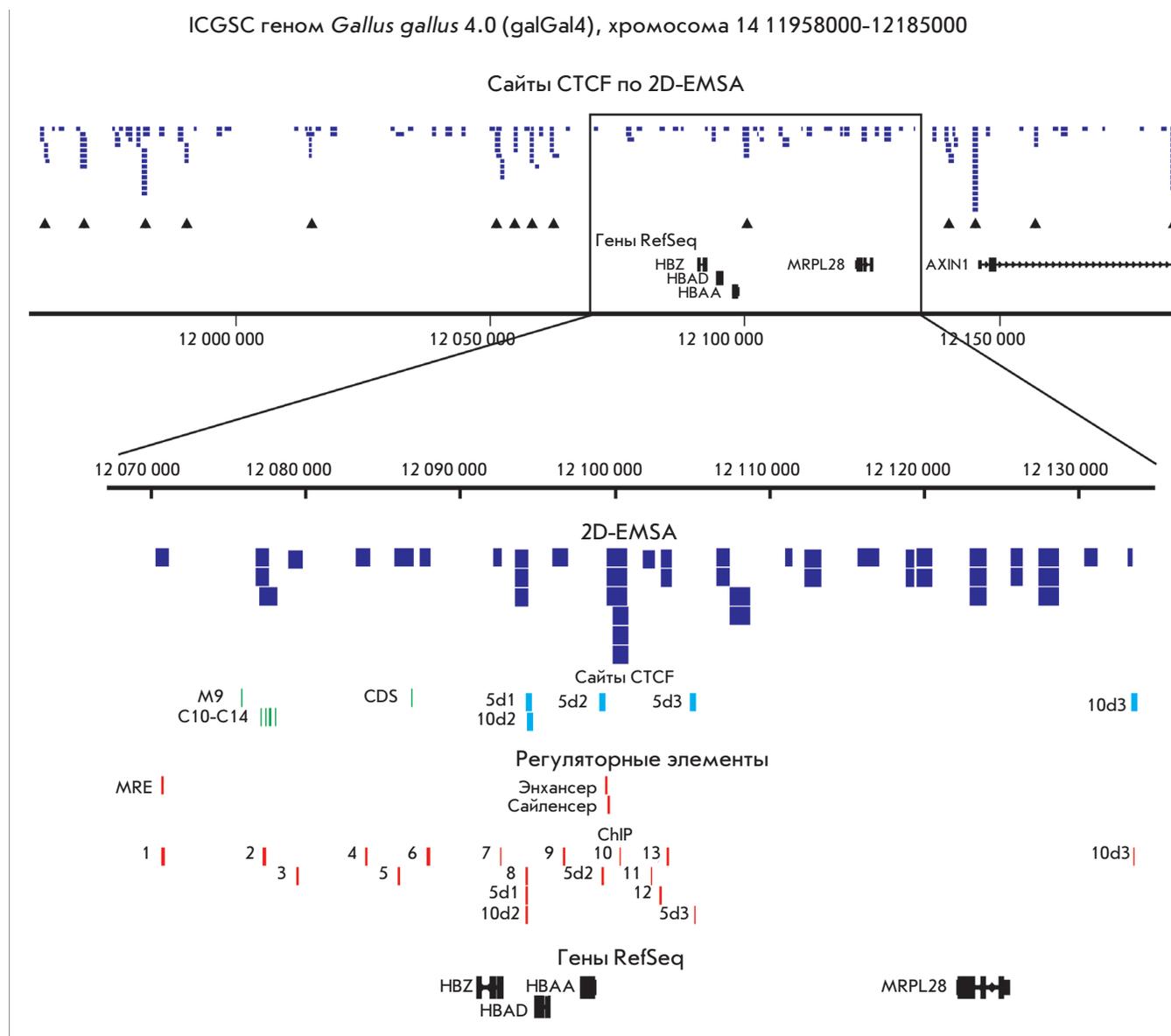


Рис. 3. Расположение сайтов связывания CTCF и других регуляторных элементов в области, окружающей альфа-глобиновый локус генома кур. На верхней карте показано расположение всех полученных при отборе фрагментов ДНК. Стрелки указывают участки ДНК с повышенным сродством к CTCF. Ниже приведена увеличенная часть карты, представляющая непосредственное окружение глобиновых генов. В области «Сайты CTCF» показаны идентифицированные ранее сайты связывания CTCF M9, C10-C14 [7], CDS [8] и 5d1–5d3, 10d1–10d3 [9], в области «Регуляторные элементы» приведено расположение элементов MRE [2], энхансера и сайленсера [25]. В области ChIP указано расположение фрагментов ДНК, амплифицировавшихся в эксперименте по иммунопреципитации хроматина (см. текст)

при иммунопреципитации хроматина фрагментов ДНК приведено на рис. 3 (панель ChIP), а результаты иммунопреципитации на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что высокая степень занятости сайтов белком CTCF, близкая к занятости в положительном контроле (F1, МУС), характерна только для фрагмента 10, расположенного вблизи 3'-конца

гена *HBAA*. Высокий уровень связывания CTCF наблюдается в клетках HD3 и индуцированных HD3, в клетках DT40 уровень связывания CTCF этим сайтом значительно ниже. Показательно, что фрагмент 10 по положению совпадает с фрагментом этой области генома с наиболее сильным связыванием CTCF *in vitro* (рис. 3).

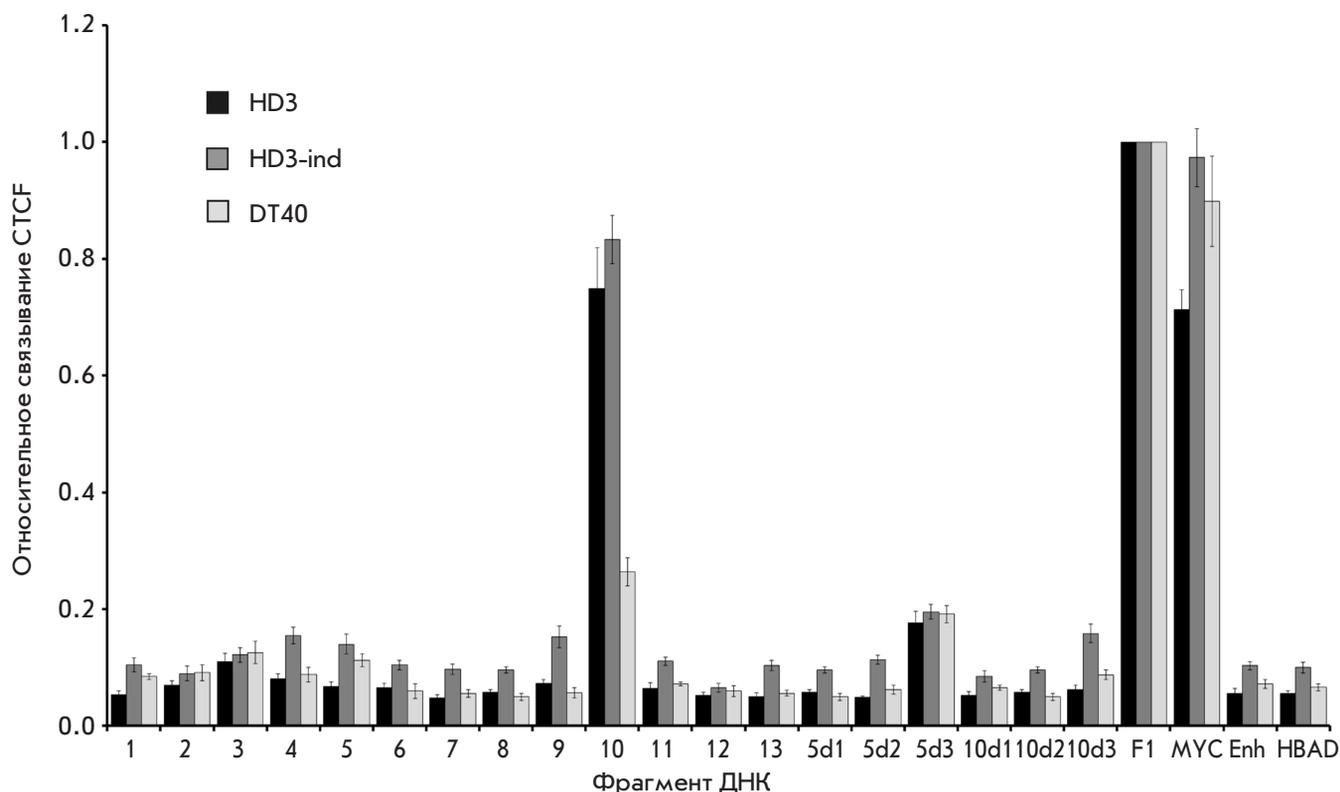


Рис. 4. Связывание CTCF с участками ДНК *in vivo* по результатам иммунопреципитации хроматина с анализом при помощи ПЦР в реальном времени. Приведены результаты для клеток HD3, HD3, индуцированных к эритроидной дифференцировке, и лимфоидных клеток DT40. Использовали праймеры к отобранным в данной работе фрагментам ДНК (1–13), а также к шести фрагментам из работы [9] (5d1–5d3, 10d1–10d3). F1, MYC – положительный контроль; Enh, NBAD – отрицательный контроль. Данные нормированы относительно связывания CTCF фрагментом F1. Планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего

Кроме фрагмента 10, выделяется 5d3, степень связывания CTCF с которым уверенно выше значений отрицательного контроля для всех трех типов клеток, но существенно ниже, чем у фрагмента 10 в клетках HD3 и HD3-ind. Некоторое превышение над отрицательным контролем наблюдается у фрагментов 4, 5, 9 и 10d3 только в клетках HD3-ind, но степень этого превышения невелика и не позволяет с уверенностью утверждать, что эти фрагменты связывают CTCF.

Таким образом, большинство фрагментов ДНК (17 из 18), связывающихся с очищенным белком CTCF в условиях EMSA, не связывают CTCF в клеточном ядре использованных типов клеток. Этот факт может объясняться следующими причинами.

1. Метилирование цитозина в составе динуклеотида CpG в сайте нарушает связывание с ним CTCF [28, 29]. Однако лишь около 30% сайтов связывания CTCF содержат последовательность CpG [30], так что метилированием ДНК в сайте CTCF полученные результаты можно объяснить лишь частично.

2. Связывание CTCF ограничено сайтами с подходящей структурой хроматина/модификациями гистонов и/или наличием вблизи сайтов других факторов транскрипции, облегчающих связывание CTCF [31].

Скорее всего, в ограничении связывания CTCF определенную роль играют обе причины [32].

Очевидно, что некоторые из сайтов, связывания CTCF с которыми не обнаружено в наших экспериментах по иммунопреципитации хроматина (рис. 4), могут связывать этот белок в других типах клеток и тканей. Так, фрагменты ДНК 5d1, 5d2, 10d1–10d3, не связывающие CTCF в клетках HD3 и DT40 (рис. 4), делают это в эритробластах эмбрионов кур [9].

Особняком стоит фрагмент 5d3, связывающийся с CTCF согласно результатам иммунопреципитации хроматина (рис. 4) и данным работы [9], но не совпадающий ни с одним из отобранных участков. Аналогично проявляет себя CTCF-связывающий фрагмент M9 [7], однако его присутствие в библиотеке подтверждается ПЦР (рис. 1Б). Возможно, оба эти фрагмента ДНК не попали в число секвенированных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных экспериментов можно заключить, что эффективность связывания последовательности с СТСФ в условиях EMSA (*in vitro*) и степень ее занятости белком СТСФ связаны, по данным ChIP, односторонне – взаимодействие СТСФ с участком ДНК *in vitro* по большей части не означает, что этот участок будет занят СТСФ в ядре клетки. Связывание же СТСФ *in vivo*, наоборот, чаще всего сопровождается непосредственным взаимодействием белка с данным участком ДНК *in vitro*.

Кроме того, из полученных результатов видно, что при эритроидной дифференцировке не происходит существенных изменений в связывании СТСФ с исследованными фрагментами ДНК.

Единственный обнаруженный нами сайт, в высокой степени связанный с СТСФ в эритроидных клетках HD3 и HD3-ind, существенно (в 2–3 раза) слабее

связан с белком в лимфоидных клетках DT40, т.е. связывание СТСФ с этим участком обнаруживает заметную тканевую специфичность. В то же время не выявлено значительных различий в связывании СТСФ в линии клеток эритробластов HD3 и в клетках той же линии, стимулированных к эритроидной дифференцировке. ●

Авторы благодарны Е.А. Стукачевой за антитела к тауматину.

Работа финансировалась программой поддержки ведущих научных школ России (проект НШ_1674.2012.4), программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (проекты № 10-04-01365, 10-04-01472, 14-04-00010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Разин С.В., Ульянов С.В., Юдинкова Е.С., Гушанская Е.С., Гаврилов А.А., Яровая О.В. // Успехи биол. хим. 2012. V. 52. P. 3–36.
2. Flint J., Tufarelli C., Peden J., Clark K., Daniels R.J., Hardison R., Miller W., Philipson S., Tan-Un K.C., McMorrow T., et al. // Hum. Mol. Genet. 2001. V. 10. P. 371–382.
3. Razin S.V., Rynditch A., Borunova V., Ioudinkova E., Smalko V., Scherrer K. // J. Cell Biochem. 2004. V. 92. P. 445–457.
4. Anguita E., Johnson C.A., Wood W.G., Turner B.M., Higgs D.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 12114–12119.
5. Holwerda S.J., de Laat W. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2013. V. 368. P. 20120369.
6. Nikolaev L.G., Akopov S.B., Didych D.A., Sverdlov E.D. // Curr. Genomics. 2009. V. 10. P. 294–302.
7. Valadez-Graham V., Razin S.V., Recillas-Targa F. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 1354–1362.
8. Klochkov D., Rincon-Arango H., Ioudinkova E.S., Valadez-Graham V., Gavrilov A., Recillas-Targa F., Razin S.V. // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. P. 1589–1597.
9. Martin D., Pantoja C., Fernandez Minan A., Valdes-Quezada C., Molto E., Matesanz F., Bogdanovic O., de la Calle-Mustienes E., Dominguez O., Taher L., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. V. 18. P. 708–714.
10. Valdes-Quezada C., Arriaga-Canon C., Fonseca-Guzman Y., Guerrero G., Recillas-Targa F. // Epigenetics. 2013. V. 8. P. 827–838.
11. Chernov I.P., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // Biotechniques. 2006. V. 41. P. 91–96.
12. Vetchinova A.S., Akopov S.B., Chernov I.P., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // Anal. Biochem. 2006. V. 354. P. 85–93.
13. Beug H., von Kirchbach A., Doderlein G., Conscience J.F., Graf T. // Cell. 1979. V. 18. P. 375–390.
14. Nicolas R.H., Partington G., Major G.N., Smith B., Carne A.F., Huskisson N., Goodwin G. // Cell Growth Differ. 1991. V. 2. P. 129–135.
15. Orkin S.H., Harosi F.I., Leder P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 98–102.
16. Gavrilov A.A., Razin S.V. // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. P. 4629–4640.
17. Котова Е.С., Сорокина И.В., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Сverdlov E.D. // Биохимия. 2013. Т. 78. С. 1122–1127.
18. Gushchanskaya E.S., Artemov A.V., Ulyanov S.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Kotova E.S., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Iarovaia O.V., Sverdlov E.D., et al. // Epigenetics. 2014. V. 9. P. 951–963.
19. Nikolaev L.G., Tsevegiyn T., Akopov S.B., Ashworth L.K., Sverdlov E.D. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 1330–1336.
20. Orlando V. // Trends Biochem. Sci. 2000. V. 25. P. 99–104.
21. Ruijter J.M., Ramackers C., Hoogaars W.M., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J., Moorman A.F. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. e45.
22. Kohne A.C., Baniahmad A., Renkawitz R. // J. Mol. Biol. 1993. V. 232. P. 747–755.
23. Filippova G.N., Fagerlie S., Klenova E.M., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P.E., Collins S.J., Lobanenkov V.V. // Mol. Cell Biol. 1996. V. 16. P. 2802–2813.
24. Meyer L.R., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kuhn R.M., Wong M., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Roe G., Rhead B., et al. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. P. D64–D69.
25. Targa F.R., de Moura Gallo C.V., Huesca M., Scherrer K., Marcaud L. // Gene. 1993. V. 129. P. 229–237.
26. Arnold R., Burcin M., Kaiser B., Muller M., Renkawitz R. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2640–2647.
27. MacPherson M.J., Sadowski P.D. // BMC Mol. Biol. 2010. V. 11. P. 101.
28. Bell A.C., Felsenfeld G. // Nature. 2000. V. 405. P. 482–485.
29. Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. // Nature. 2000. V. 405. P. 486–489.
30. Nakahashi H., Kwon K.R., Resch W., Vian L., Dose M., Stavreva D., Hakim O., Pruett N., Nelson S., Yamane A., et al. // Cell Rep. 2013. V. 3. P. 1678–1689.
31. The ENCODE Project Consortium. // Nature. 2012. V. 489. P. 57–74.
32. Teif V.B., Beshnova D.A., Vainshtein Y., Marth C., Mallm J.P., Hofer T., Rippe K. // Genome Res. 2014. V. 24. P. 1285–1295.