

УДК 577.218

**КОЛОКАЛИЗАЦИЯ S/MAR И TRE  
В РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКАХ ХРОМОСОМ  
ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ  
*Drosophila melanogaster***

© 2007 г. А. А. Ряховский, С. В. Тиллиб

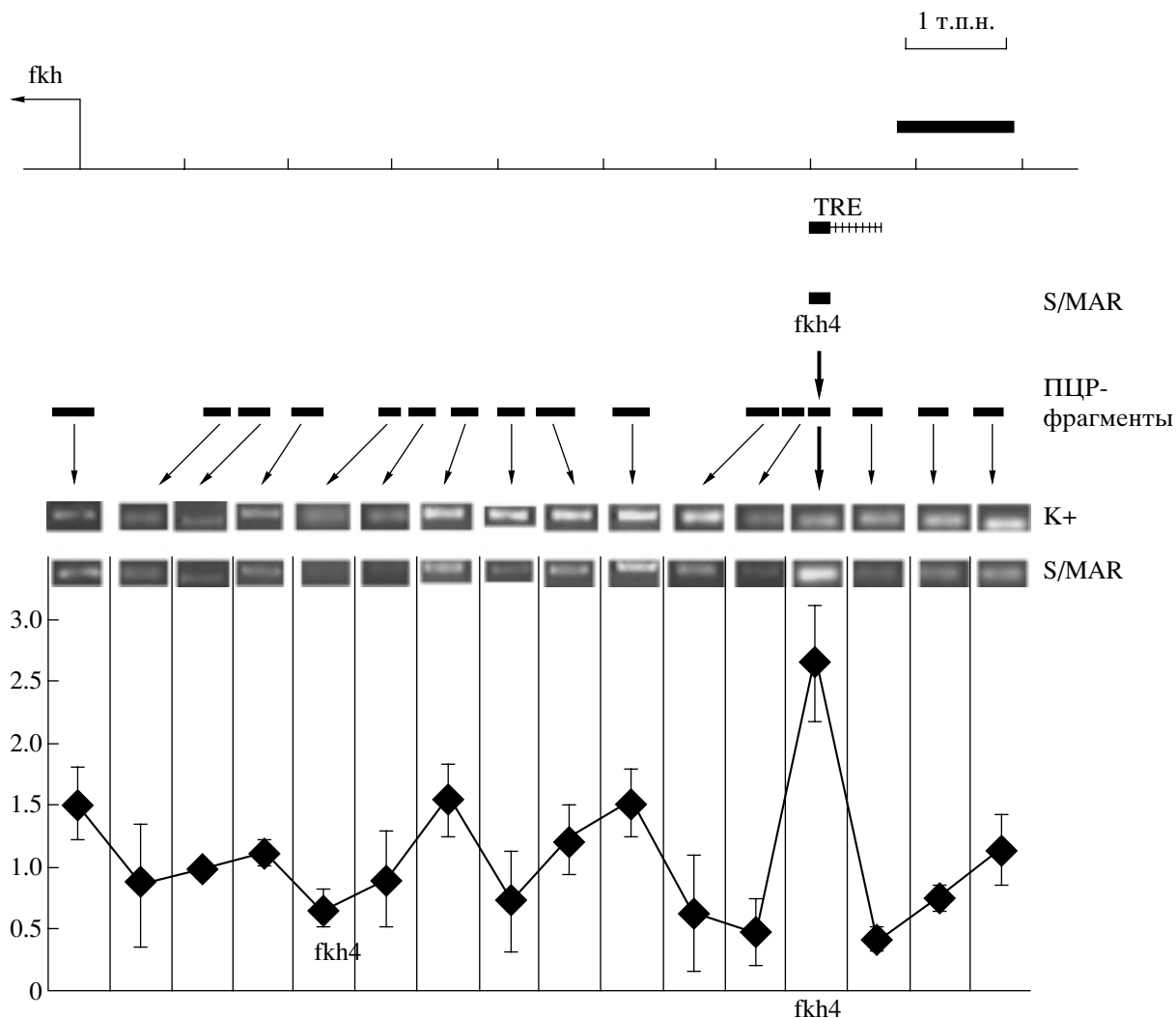
Представлено академиком Г.П. Георгиевым 19.04.2007 г.

Поступило 20.04.2007 г.

Недавно мы показали, что белок триторакс (TRX), один из наиболее значимых элементов консервативной в эволюции системы поддержания клеточной дифференцировки, является компонентом “ядерного матрикса” [1]. Известно, что TRX, как и другие подобные регуляторные белки, осуществляет свою функцию через взаимодействие со специфическими регуляторными цис-элементами (TRE/PRE) генов-мишеней [2]. При использовании формальдегидной фиксации *in vivo* непосредственно контактирующих белков и нуклеиновых кислот TRX выявляется связанным с определенными участками хромосом, по-видимому, TRE [3, 4]. Мы предполагаем, что, подобно самому TRX, также и ассоциированные с ним участки хромосомной ДНК могут быть ассоциированы с “ядерным матриксом”, т.е. могут являться матрикс/скаффолд-ассоциированными регионами (S/MAR). S/MAR-элементы пока плохо изучены. Однако многие данные указывают на их важную роль в организации и функционировании генома [5]. Нами была поставлена задача сравнить локализацию S/MAR-подобных участков с участками ранее нами определенных TRX-ассоциированных элементов. В результате проделанной работы на двух модельных системах удалось впервые продемонстрировать, что эти два типа регуляторных хромосомных элементов, S/MAR и TRE, колокализуются. Основной фокус работы был связан с анализом расширенной промоторной области (8.7 т п.н.) гена fork head (fkh) в клетках слюнных желез личинки дрозофилы. Мы совсем недавно локализовали в этой области один мажорный и два менее выраженных TRE (в печати). В качестве второго исследуемого района был взят район наиболее детально изученного ранее TRE из дальней

промоторной области гена Ubx (rbx/bxd) [4] клеток эмбрионов дрозофилы. Для тонкого картирования S / MAR-элементов мы использовали традиционную процедуру экстракции хроматина в низкосолеовом буфере с сильным детергентом (LIS) [6, 7] с некоторыми модификациями. В качестве исходного материала брали клетки *D.melanogaster*: а) для исследования промоторной области гена fkh – клетки слюнных желез личинки или S2 культуральные клетки; б) в случае регуляторного района гена Ubx – клетки эмбрионов. Слюнные железы выделяли из личинок третьей стадии, очищали и накапливали в течение 1 ч. Выделение ядер проводили параллельно как в указанной методике [6], так и согласно первому этапу экстракции (удалению цитоскелетной фракции), описанному в работе [8]. В конце процедуры хромосомную ДНК расщепляли с помощью часто щелящей эндонуклеазы MspI. Анализ относительного обогащения перекрывающихся исследуемый район MspI–MspI фрагментов проводили путем ПЦР с использованием специально подобранных пар праймеров как для промоторной области гена fkh, так и для района rbx/bxd гена Ubx (данные о последовательностях праймеров предоставляются по запросу).

В результате нескольких проведенных экспериментов нам удалось выявить в промоторной области гена fkh только один мажорный, воспроизводимо обогащающийся во фракции S/MAR участок ДНК размером 210 п.н. (fkh4), а также ряд менее выражено обогащающихся участков (рис. 1). Интересно, что этот же участок (fkh4) был ранее выявлен нами как основной TRX-ассоциированный элемент гена fkh в клетках слюнных желез (в печати). Таким образом, с высокой степенью разрешения можно предполагать колокализацию этих двух типов регуляторных элементов. Похожее исследование проведено и на другой модельной системе,

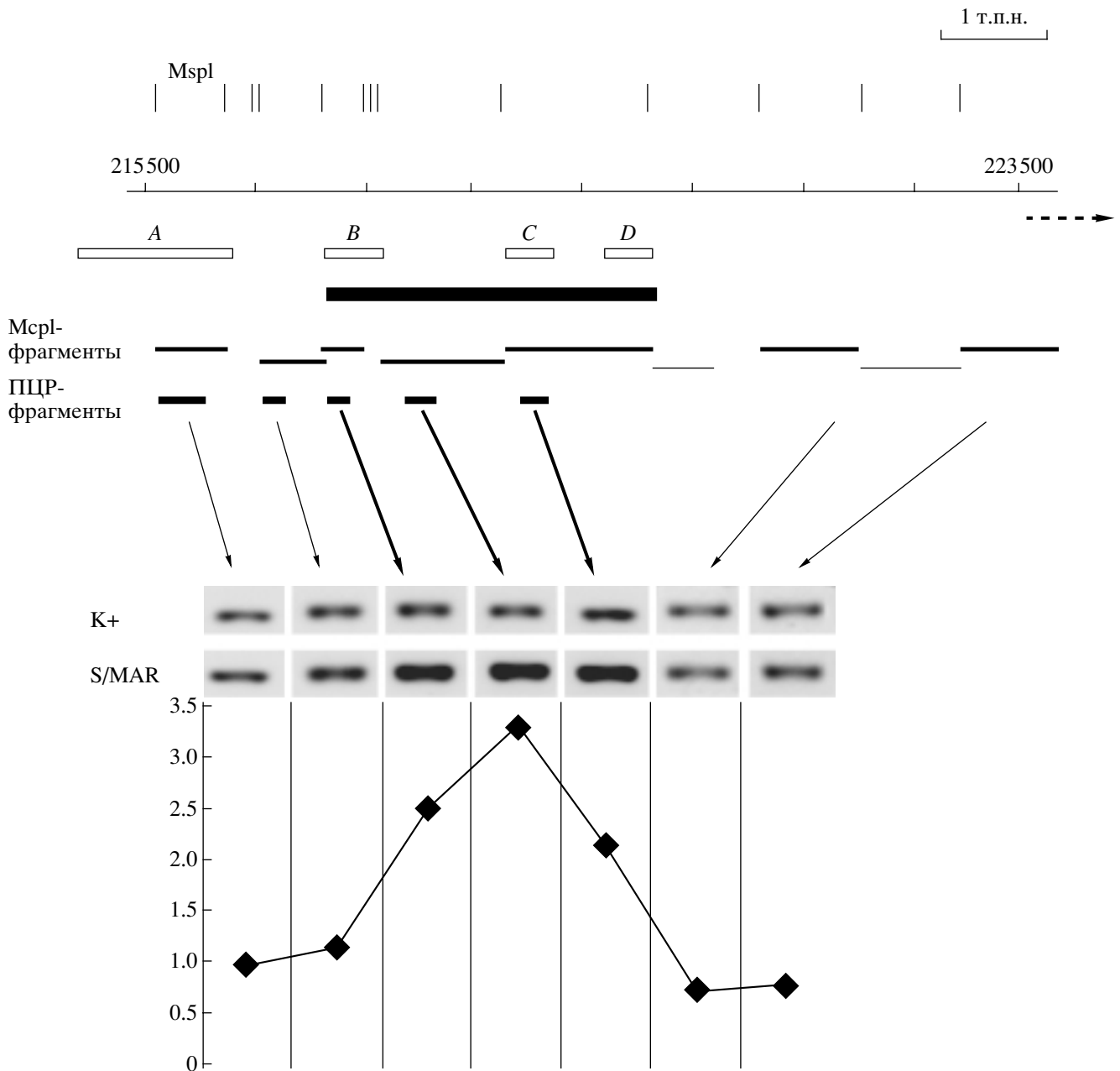


**Рис. 1.** Выявление S/MAR-элемента (fkh4), колокализирующегося с TRE, в промоторной области гена fkh. Сверху приведена схема промоторной области гена fkh с указанием положения начала транскрипции (стрелка влево), энхансерного элемента (sgE), определяющего специфическую экспрессию гена fkh в клетках слюнных желез, а также TRE. Ниже показано положение ПЦР-фрагментов, которые соответствуют MspI-фрагментам исследуемой области, и их относительное обогащение в получаемой S/MAR-фракции (приведены фотографии фрагментов геля с соответствующими электрофоретически разделенными ПЦР-продуктами) по сравнению с уровнями амплификации этих же фрагментов в тотальной хромосомной ДНК до экстракции (K+). Внизу приведен график нормализованных данных относительного обогащения MspI-фрагментов в нескольких независимо проведенных экспериментах.

районе сильного TRE/PRE гена *Ubx* в клетках эмбрионов дрозофилы. Полученные результаты (рис. 2) указывают на существование выраженного S/MAR-элемента, перекрывающегося с районом локализации ранее выявленных B-, C- и D-TRE/PRE.

Многие исследователи полагают, что, помимо постоянно формирующихся (стабильных, структурных), существует и другой тип S/MAR: динамичных, факультативных, тканеспецифических [5]. Этот второй тип S/MAR весьма напоминает TRE, а возможно, что следует из результатов данной работы, эти два типа элемен-

тов являются лишь условно разделимыми, но по существу они или очень близко располагаются, или являются одним и тем же регуляторным элементом. В связи с этим следует упомянуть наши данные (не приведены) о подобном указанному выше S/MAR-анализе расширенной промоторной области гена fkh в культуральных S2 клетках дрозофилы, в которых ген fkh неактивен. В этом случае в отличие от ситуации в клетках слюнных желез, где этот ген активен, мы не наблюдали обогащения участка fkh4, что указывает на зависимую от активности гена тканеспецифическую динамичную природу подобных S/MAR(TRE)-элементов.



**Рис. 2.** Выявление S/MAR-элемента, колокализующегося с *bxd/pbx* PRE/TRE, в промоторной области гена *Ubx*. Сверху – приведена схема дальней промоторной области гена *Ubx* (координаты указаны согласно последовательности U31961) с указанием локализации исследованных ранее [4] элементов А, В, С и D, а также суммарного PRE/TRE. Ниже показана локализация *MspI*-фрагментов данного района, а также пар праймеров для ПЦР, используемых для анализа относительного обогащения этих фрагментов. Еще ниже, как и на предыдущем рисунке, приведены данные обогащения как в виде фотографий соответствующих электрофоретически разделенных продуктов, так и в виде графика нормализованных количественных данных.

Данная работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ-а № 05–04–48970 С.В. Тиллибу) и грантом С.В. Тиллибу по Программе фундаментальных исследований РАН “Молекулярная и кле-

точная биология” (проект № 10002-251/П-10/147-142/120503-051).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедева Л.А., Тиллиб С.В. // Генетика. 2003. Т. 39. № 2. С. 250–258.

2. Ringrose L., Paro R. // *Development*. 2007. V. 134. P. 223–232.
3. Kuzin B., Tillib S., Sedkov I., Mizrokhi L., Mazo A. // *Genes and Develop.* 1994. V. 8. P. 2478–2490.
4. Tillib S., Petruk S., Sedkov Y., Kuzin A. *et al.* // *Mol. and Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 5289–5202.
5. Чернов И.П., Акопов С.Б., Николаев Л.Г. // *Биоорганич. химия*. 2004. Т. 30. № 1. С. 3–14.
6. Craig J.M., Boyle S., Perry P., Bickmore W.A. // *J. Cell Sci.* 1997. V. 110. P. 2673–2682.
7. Mirkovitch J., Mirault M.-E., Laemmli U.K. // *Cell*. 1984. V. 39. P. 223–232.
8. He D., Nickerson J.A., Penman S. // *J. Cell Biol.* 1990. V. 110. P. 569–580.