



УДК 577.21

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МАТРИКССВЯЗЫВАЕМЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В 5'-ОБЛАСТИ ГЕНА ЭСТРОГЕНСУЛЬФОТРАНСФЕРАЗЫ КРЫСЫ

© 2004 г. И. А. Морозов*, И. И. Астапова*, А. Н. Смирнов**, П. М. Рубцов**

*Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, Вавилова, 32;**Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва
Поступила в редакцию 15.04.2003 г. Принята к печати 03.07.2003 г.

Проведен поиск и дана характеристика потенциальных матрикссвязываемых элементов в 5'-области гена эстрогенсульфотрансферазы крысы (*Stel*). Установлено, что фрагменты ДНК, соответствующие участкам –800/+1048 и +1049/+2038 по отношению к основной точке инициации транскрипции, связываются с ядерным матриксом *in vitro*. Выявлена перманентная ассоциация 5'-области гена *Stel* с ядерным матриксом в клетках печени крысы, причем наиболее вероятной областью прикрепления является участок –352/–152. Не обнаружено различий в прикреплении 5'-области гена *Stel* к ядерному матриксу в печени самцов, где ген активно транскрибируется, и самок, где ген неактивен.

Ключевые слова: MAR-элементы; ген эстрогенсульфотрансферазы; половая дифференцировка; печень крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что эукариотическая ДНК в интерфазном ядре структурно организована в большие (20–100 т. п. о.) петли. Эти петли закреплены ДНК-белковыми связями на ядерном матриксе – трехмерной сети нерастворимых ядерных белков. Основания этих петель представляют собой особые участки в молекуле ДНК, которые обладают высоким сродством и специфичностью к ядерному матриксу. Предполагают, что эти участки ДНК, так называемые MAR-элементы или, что равнозначно, SAR-элементы, играют важную роль в процессах регуляции активности генов, репликации ДНК и могут служить естественными границами генов. MAR-элементы обнаружены в 5'- и 3'-фланкирующих областях, интронах и даже в экзонах ряда генов [1–4]. Считается, что часть MAR-элементов постоянно связана с ядерным матриксом, а другая часть обладает лишь потенциальной возможностью связываться с ним, которая реализуется при наличии каких-либо дополнительных факторов [1]. MAR-элементы представляют собой достаточно протяженные участки молекулы ДНК (минимальная длина 200–300 п. о.) с различной нуклеотидной последовательностью. Они содержат ряд структурных мотивов, позволяющих на основе некоего алгорит-

ма предсказывать их наличие в последовательностях ДНК [5] (MarFinder: <http://www.futuresoft.org/MAR-WIZ>). Однако для окончательного вывода о наличии или отсутствии MAR в исследуемой последовательности необходимо показать связывание таких участков ДНК с ядерным матриксом в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В настоящей работе мы локализовали MAR-элементы в 5'-области гена эстрогенсульфотрансферазы крысы (ген *Stel*). Экспрессия этого гена активируется в печени самцов крысы в период полового созревания, а в печени самок ген малоактивен в течение всей жизни. В связи с этим казалось интересным сравнить локализацию MAR-элементов гена *Stel* *in vivo* в ядрах клеток печени самцов и самок [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При скрининге геномной библиотеки крысы был изолирован –3050/+2038-фрагмент гена *Stel*, содержащий альтернативные 5'-нетранслируемые экзоны 1a и 1b, 5'-фланкирующую и предполагаемые промоторные области гена [7, 8]. Используя компьютерную программу поиска MAR-элементов MarFinder, мы обнаружили, что в этом фрагменте участок –352/–152 по отношению к основной точке инициации транскрипции потенциально имеет высокое сродство к ядерному матриксу (рис. 1a).

Для того чтобы установить, действительно ли этот участок является MAR-элементом, а также идентифицировать MAR-элементы, возможно, не

Сокращения: MAR (matrix attachment regions), SAR (scaffold associated regions) – последовательности ДНК, связывающиеся с ядерным матриксом; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

*Автор для переписки (тел.: (095) 135-9974; эл. почта: rubtsov@eimb.ru).



Рис. 1. Схемы исследования фрагментов гена *Ste1*. *a* – результаты компьютерного поиска MAR-элементов во фрагменте $-3051/+2038$ гена *Ste1*. Фрагмент с потенциалом больше 0.6 рассматривается как возможный MAR-элемент. На рисунке отмечено положение экзонов 1a, 1b и 2 этого гена. *б* – схема расщепления фрагмента $-3051/+2038$ гена *Ste1* в опыте по связыванию *in vitro* с ядерным матриксом. Связывающиеся фрагменты отмечены штриховкой. *в* – схема расщепления фрагмента $-2093/+2038$ гена *Ste1* в опыте по гибридизации с ДНК, *in vivo* связанной с ядерным матриксом. Гибридуемый фрагмент отмечен штриховкой. Римскими цифрами указаны места расщепления рестриктазами (в скобках приведено положение): I – *SmaI* (-2093); II – *HaeII* ($-2036, -1542$); III – *HindIII* ($-1218, -1141$); IV – *PstI* (-1015); V – *BglII* (-801); VI – *SspI* ($+45, +139, +1231, +1479, +1616$); VII – *NheI* ($+500$); VIII – *EcoRI* ($+2038$).

обнаруженные при компьютерном поиске, были проведены опыты по связыванию *in vitro* с ядерным матриксом четырех фрагментов: $-3050/-2314$,

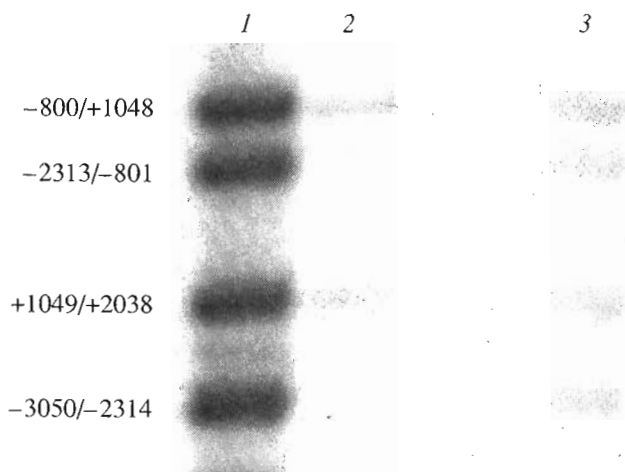


Рис. 2. Выявление фрагментов гена *Ste1* крысы, взаимодействующих с ядерным матриксом *in vitro*. Радиоавтограф 1% агарозного геля после разделения фрагментов гена *Ste1*: 1 – исходная смесь фрагментов, взятых для связывания с матриксом; 2 – фрагменты, связавшиеся с матриксом; 3 – 5% от количества исходной смеси фрагментов, взятых для связывания с матриксом.

$-2313/-801, -800/+1048, +1049/+2038$ (рис. 1б). Меченные ^{32}P фрагменты инкубировали с ядерным матриксом в присутствии избытка ДНК *E. coli* в качестве неспецифического конкурента. Связавшиеся с матриксом фрагменты отделяли от матрикса и разделяли в агарозном геле. В результате было установлено, что с ядерным матриксом связываются преимущественно фрагменты $-800/+1048$ и $+1049/+2038$ (рис. 2). Интересно отметить, что в участке $+1049/+2038$, в отличие от участка $-800/+1048$, с помощью программы MarFinder не было обнаружено потенциальных MAR-элементов.

Для выяснения, связан ли ген *Ste1 in vivo* с ядерным матриксом в клетках печени крысы, мы выделили из клеточных ядер фракцию ДНК, содержащую преимущественно участки прикрепления к ядерному матриксу. ДНК метили ^{32}P и использовали в качестве зонда для гибридизации с фрагментами гена *Ste1*, иммобилизованными на нитроцеллюлозном фильтре. Мы установили, что из всех используемых фрагментов, перекрывающих область $-2093/+2038$ гена *Ste1* (рис. 1в), лишь фрагмент $-800/+45$ гибридизовался с таким зондом. При этом не было отмечено существенной разницы в результатах, полученных с ДНК самцов или самок крысы (рис. 3а и б).

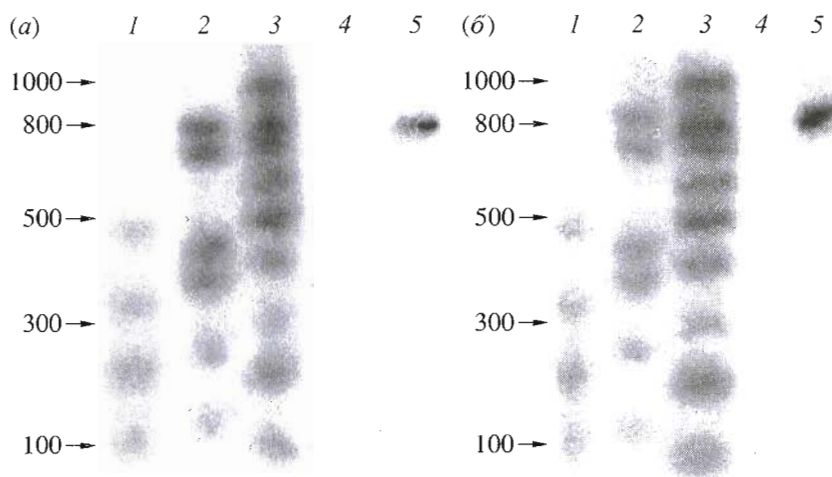


Рис. 3. Локализация области прикрепления гена *Ste1* к ядерному матриксу в клетках печени самок (а) и самцов (б) крысы *in vivo*. Радиоавтограф блота 2% агарозного геля.

^{32}P -меченые (дорожки 1 и 2) и немеченые (дорожки 4 и 5) фрагменты гена *Ste1* и ^{32}P -меченые маркеры (дорожка 3) разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле и переносили на мембрану. Мембрану с дорожками 4 и 5 гибридизовали с мечеными ^{32}P фрагментами ДНК, связанными *in vivo* с ядерным матриксом. Дорожки: 1, 4 – фрагменты –2035/–1542 (494), –1541/–1218 (324), –1014/–801 (214), –1140/–1015 (126), –1217/–1141 (77) и –2093/–2036 (58); два последних фрагмента не метятся в данных условиях. В скобках – длина, п. о. 2, 5 – фрагменты –800/+45 (845), +501/+1231 (731), +1617/+2038 (422), +140/+500 (361), +1232/+1479 (248), +1480/+1616 (137) и +46/+139 (94); последний фрагмент не метится в данных условиях.

Таким образом, мы показали, что ген эстрогенсульфотрансферазы (*Ste1*) в клетках печени крысы перманентно ассоциирован с ядерным матриксом. Наиболее вероятная область прикрепления – район –352/–152. Этот район расположен непосредственно перед промотором 1b и, возможно, такая ассоциация способствует преимущественному синтезу мРНК, содержащей альтернативный 5'-нетранслируемый экзон 1b. Вероятно, наличие этого MAR-элемента не связано с половой дифференцировкой экспрессии *Ste1*, что, однако, не исключает такой связи для пока еще не выявленных MAR-элементов в других участках этого гена. MAR-элемент, обнаруженный нами в районе +1049/+2038, по-видимому, не является местом постоянного прикрепления гена *Ste1* к ядерному матриксу, но допускает возможность обратимого связывания в этом месте при наличии каких-либо дополнительных факторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ядерный матрикс выделяли из ядер клеток печени зеленой мартышки по описанной методике [9]. Полученный из 40 г печени осадок ядерного матрикса суспендировали в 1 мл буфера RSB (10 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 0.5 мМ PMSF), содержащего 0.25 М сахарозу и 0.25 мг/мл BSA, добавляли равный объем глицерина и хранили при –20°C.

Связывание фрагментов гена *Ste1* с ядерным матриксом *in vitro*. Фрагменты гена *Ste1* –3050/–2314, –2313/–801, –800/+1048, +1049/+2038 были получены в результате обработки рестриктазами *Bgl*III и *Hpa*I фрагмента –3050/+2038, выщепленного рестриктазой *Eco*RI из плазмиды pRIEST, описанной в работе [7]. Фрагменты метили, используя [α - ^{32}P]dATP и T4-ДНК-полимеразу (MBI Fermentas, Литва). Эксперименты по связыванию фрагментов с ядерным матриксом проводили по описанной методике [9]: 5 мкл суспензии ядерного матрикса дважды промывали 1 мл буфера pH 7.4 (50 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ MgCl₂, 0.25 М сахароза, 0.25 мг/мл BSA) и суспендировали в 10 мкл того же буфера MWB. К полученной суспензии добавляли 90 мкл смеси меченных ^{32}P фрагментов гена *Ste1* (конечная концентрация 20 нг/мл) в буфере для связывания MAB (50 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 2 мМ EDTA, 0.25 М сахароза, 0.25 мг/мл BSA) и 200 мкг/мл ДНК *E. coli* в качестве неспецифического конкурента. Реакционную смесь инкубировали 3 ч при 23–25°C и постоянном перемешивании. После инкубации ядерный матрикс дважды промывали охлажденным буфером MAB, растворяли в 20 мкл 0.5% SDS с протеиназой К (0.4 мг/мл) (Promega, США), добавляли 3 мкг ДНК *E. coli* и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. ДНК из пробы выделяли, используя стандартную обработку смесью фенол-хлороформ (1:1), осаждали этанолом и разделяли полученные фрагменты в 1% агарозном геле.

Введение метки во фрагменты ДНК с помощью Т4-ДНК-полимеразы. 10 мкл смеси, содержащей буфер для Т4-ДНК-полимеразы (33 мМ Трис-ацетат, рН 7.9, 66 мМ натрийацетат, 10 мМ магнийацетат, 0.5 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл BSA, 0.1–0.2 мкг фрагментов ДНК и 4 ед. акт. Т4-ДНК-полимеразы), инкубировали 1–2 мин при 37°C. Затем при 0°C добавляли 15 мкл смеси, содержащей буфер для Т4-ДНК-полимеразы, dCTP, dGTP, dTTP, каждый в конечной концентрации 0.2 мМ и 0.4 МБк [α - 32 P]dATP. Инкубировали 2 мин при 37°C, добавляли dATP до конечной концентрации 0.2 мМ и инкубировали еще 2 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 25 мМ. Меченые фрагменты выделяли, используя стандартную обработку смесью фенол–хлороформ и осаждение этанолом.

Выделение фракции ДНК, ассоциированной *in vivo* с ядерным матриком в клетках печени крысы. Для получения такой фракции мы инкубировали нативные клеточные ядра с ДНКазой I в тех же условиях, что и при выделении ядерного матрикса [9], но без последующей высокосолевого экстракции гистоновых белков. Предполагают, что такая экстракция может привести к изменению предсуществующего в ядре состояния ядерного матрикса и, возможно, нарушить его специфические взаимодействия с ДНК [1]. Аналогичный способ получения такой фракции описан в работе [10].

Ядра клеток печени самцов и самок крыс (0.4 мг нуклеиновой кислоты), полученные как описано в работе [11], промывали буфером RSB с 0.25 М сахарозой, центрифугировали 10 мин при 750 g, 4°C, осадок суспендировали в 400 мкл этого же буфера с 1 мМ CaCl₂, добавляли раствор ДНКазы I (10 мг/мл) (Worthington, США) до конечной концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали 1 ч при 23°C. После инкубации центрифугировали 1 мин при 10000 g, осадок промывали буфером RSB с 0.25 М сахарозой, растворяли в 100 мкл 0.5% SDS, добавляли раствор протеиназы К (20 мг/мл) до концентрации 0.4 мг/мл и инкубировали ночь при 37°C, затем обрабатывали смесью фенол–хлороформ (1 : 1), хлороформом, осаждали этанолом, и осадок растворяли в 20 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-HCl, рН 8.0, 1 мМ EDTA). Полученный препарат ДНК содержал около 5% от ее исходного количества в ядре и представлял собой преимущественно участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Эту ДНК метили [α - 32 P]dATP методом рассеянной заправки с использованием фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (МВ1 Fermentas, Латвия), как описано в работах [12, 13], и применяли в качестве зонда для гибридизации с набором фрагментов гена *Stel*.

Для получения такого набора фрагмент –2093/+2038, выделенный из плазмиды pRIEST расщеплением рестриктазами *Sma*I и *Eco*RI, гидролизировали *Bgl*II. Полученные два субфрагмента, после их разделения в агарозном геле, расщепляли смесью рестриктаз: фрагмент –2093/–801 рестриктазами *Hae*II, *Hind*III и *Pst*I, а фрагмент –800/+2037 рестриктазами *Ssp*I и *Nhe*I. Полученные таким образом наборы фрагментов (в скобках – длина, п. о.) –2093/–2036 (58), –2035/–1542 (494), –1541/–1218 (324), –1217/–1141 (77), –1140/–1015 (126), –1014/–801 (214) и –800/+45 (845), +46/+139 (94), +140/+500 (361), +501/+1231 (731), +1232/+1479 (248), +1480/+1616 (137), +1617/+2038 (422) –разделяли на две части. Одну часть метили [α - 32 P]dATP с помощью Т4-ДНК-полимеразы. Затем наборы меченых и немеченых фрагментов разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле, переносили на мембрану Hybond N (Amersham, Англия) и фиксировали УФ-светом. Для идентификации фрагментов по длине использовали 32 P-меченые маркеры (100 bp DNA ladder GeneCraft). Часть мембраны с пришитыми к ней немечеными фрагментами гена *Stel* отрезали и гибридизовали с радиоактивно меченными зондами, полученными, как описано выше, из связанной с матриком ДНК. Перенос, гибридизацию и отмывки проводили в условиях, рекомендованных производителем мембран. После отмывки несвязавшегося зонда эту часть мембраны заворачивали в пленку SaranWrap, прикладывали по линии разреза к части, содержащей иммобилизованные меченые фрагменты гена *Stel*, и экспонировали с рентгеновской пленкой и усиливающими экранами 36 ч при –50°C.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-48050).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яровая О.В., Разин С.В. // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. С. 43–53.
2. Bode J., Schlake T., Rios-Ramirez M., Mielke C., Stengert M., Kay V., Klehr-Wirth D. // Inter. Rev. of Cytology. 1995. V. 162A. P. 389–454.
3. Boulikas T. // Inter. Rev. of Cytology. 1995. V. 162A. P. 279–387.
4. Сьяксте Н.И., Сьяксте Т.Г. // Молекуляр. биология. 2001. Т. 35. С. 739–749.
5. Singh G.B., Kramer J.A., Krawetz S.A. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 1419–1425.
6. Розен В.Б., Матарадзе Г.Д., Смирнова О.В., Смирнов А.Н. Половая дифференцировка функций печени. М.: Медицина, 1991. 334 с.
7. Астапова И.И., Яковенко А.Р., Шелкунова Т.А., Чернов Б.К., Свердлова П.С., Смирнов А.Н., Рубцов П.М. // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. С. 447–453.

8. Астапова И.И., Смирнов А.Н., Рубцов П.М. // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. С. 635–642.
9. Cockerill P.N., Garrard W.T. // Cell. 1986. V. 44. P. 273–282.
10. Fischer D.F., van Drunen C.M., Winkler G.S., van de Putte P., Backendorf C. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 5288–5294.
11. Gorski K., Carneiro M., Schibler U. // Cell. 1986. V. 47. P. 767–776.
12. Feinberg A.P., Vogelstein B. // Anal. Biochem. 1983. V. 132. P. 6–13.
13. Feinberg A.P., Vogelstein B. // Anal. Biochem. 1984. V. 137. P. 266–267.

Localization of Matrix-Associated Elements in the 5'-Region of the Rat Estrogen Sulfotransferase Gene

I. A. Morozov*, I. I. Astapova*, A. N. Smirnov**, and P. M. Rubtsov**

#Phone: +7 (095) 135-9974; e-mail: rubtsov@eimb.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, GSP Moscow, 119991 Russia

**Faculty of Biology, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Potential matrix-associated elements in the 5'-region of the rat estrogen sulfotransferase gene (*Stel*) were searched for and characterized. The DNA fragments corresponding to the regions –800/+1048 and +1049/+2038 relative to the main point of transcription initiation were found to be bound to the nuclear matrix *in vitro*. A permanent association of the 5'-region of the *Stel* gene with the nuclear matrix in rat hepatocytes was found, the most probable site of attachment being the region –352/–152. No differences were found in the attachment of the 5'-region of the *Stel* gene to the nuclear matrix in the liver of males where the gene is actively transcribed and in that of females where it is inactive. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: estrogen sulfotransferase gene, MAR elements, sex differentiation, rat liver