

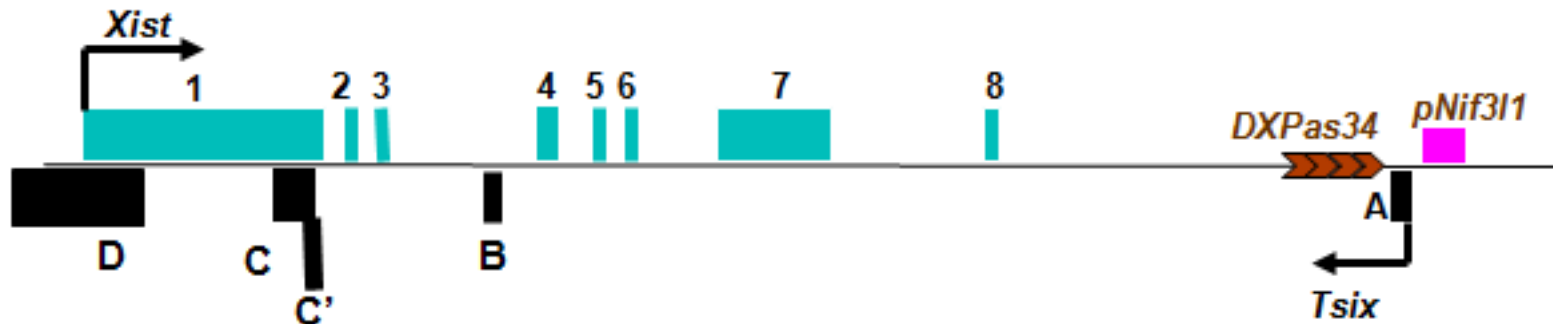
Определение и анализ регуляторных  
районов гена *Xist* полевки *Microtus  
rossiaemeridionalis*

Орищенко К.Е.

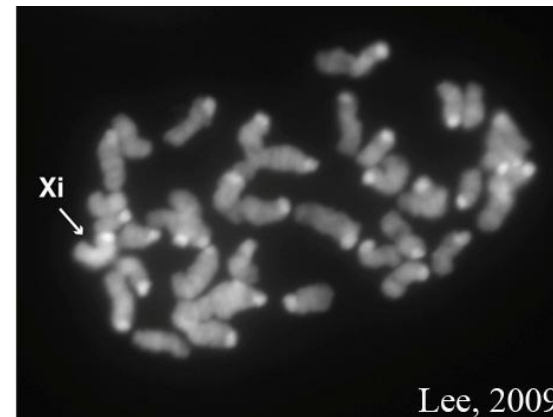
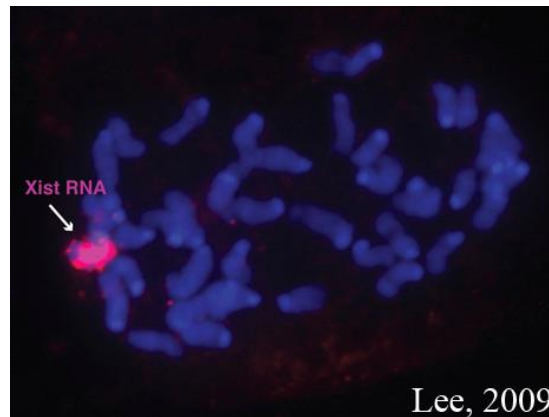
Научный руководитель: д.б.н., проф.  
Закиян С.М.

Институт цитологии и генетики СО РАН  
Лаборатория эпигенетики развития

# Структура локуса *Xist/Tsix* полёвки



1-8 – экзоны гена *Xist*; A-D – экзоны гена *Tsix*  
C' – вариант сплайсинга гена *Tsix* полёвки



Локализация *Xist* РНК на неактивной X-хромосоме (Lee, 2009). Xi-неактивная X-хромосома.

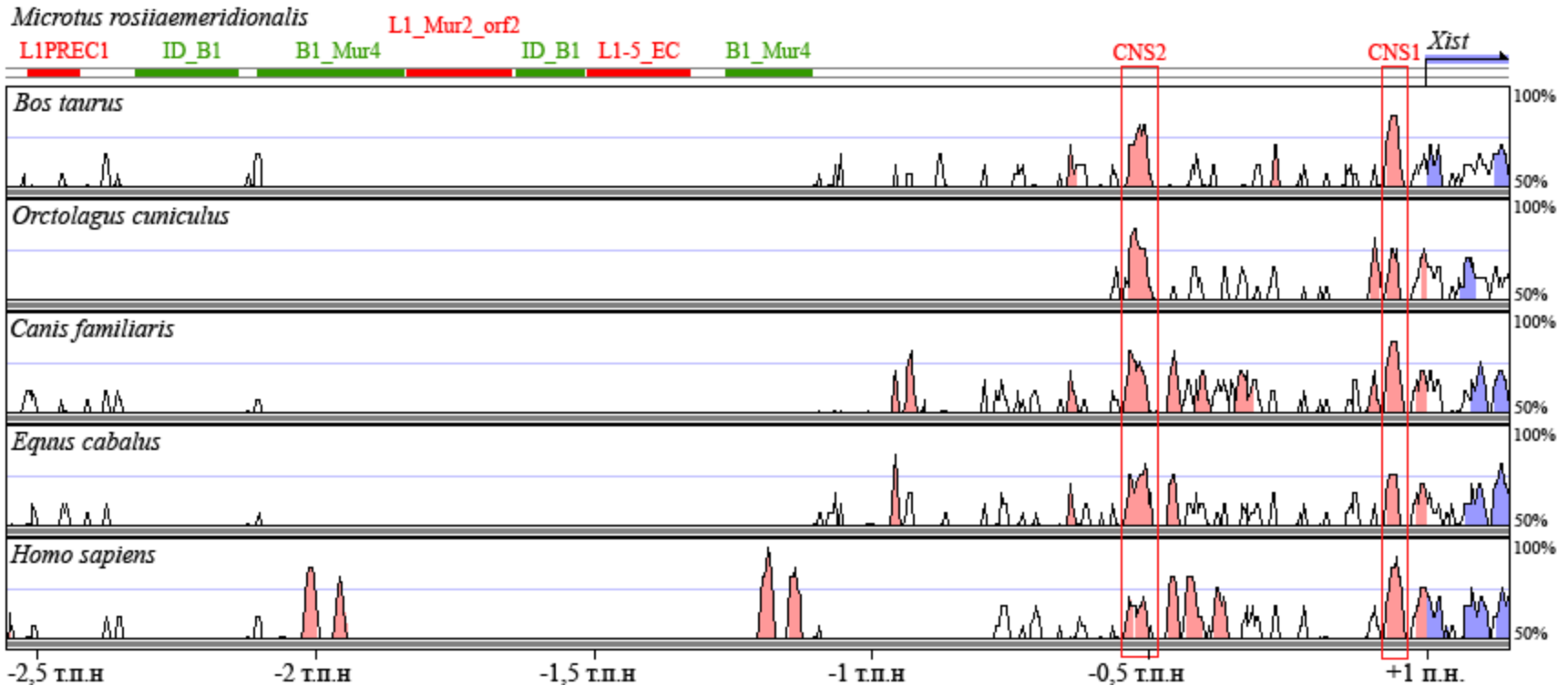
## Цель данной работы:

Исследовать структурно-функциональную организацию 5`-регуляторной области гена *Xist* у полевки *Microtus rossiaemeridionalis*

## Задачи:

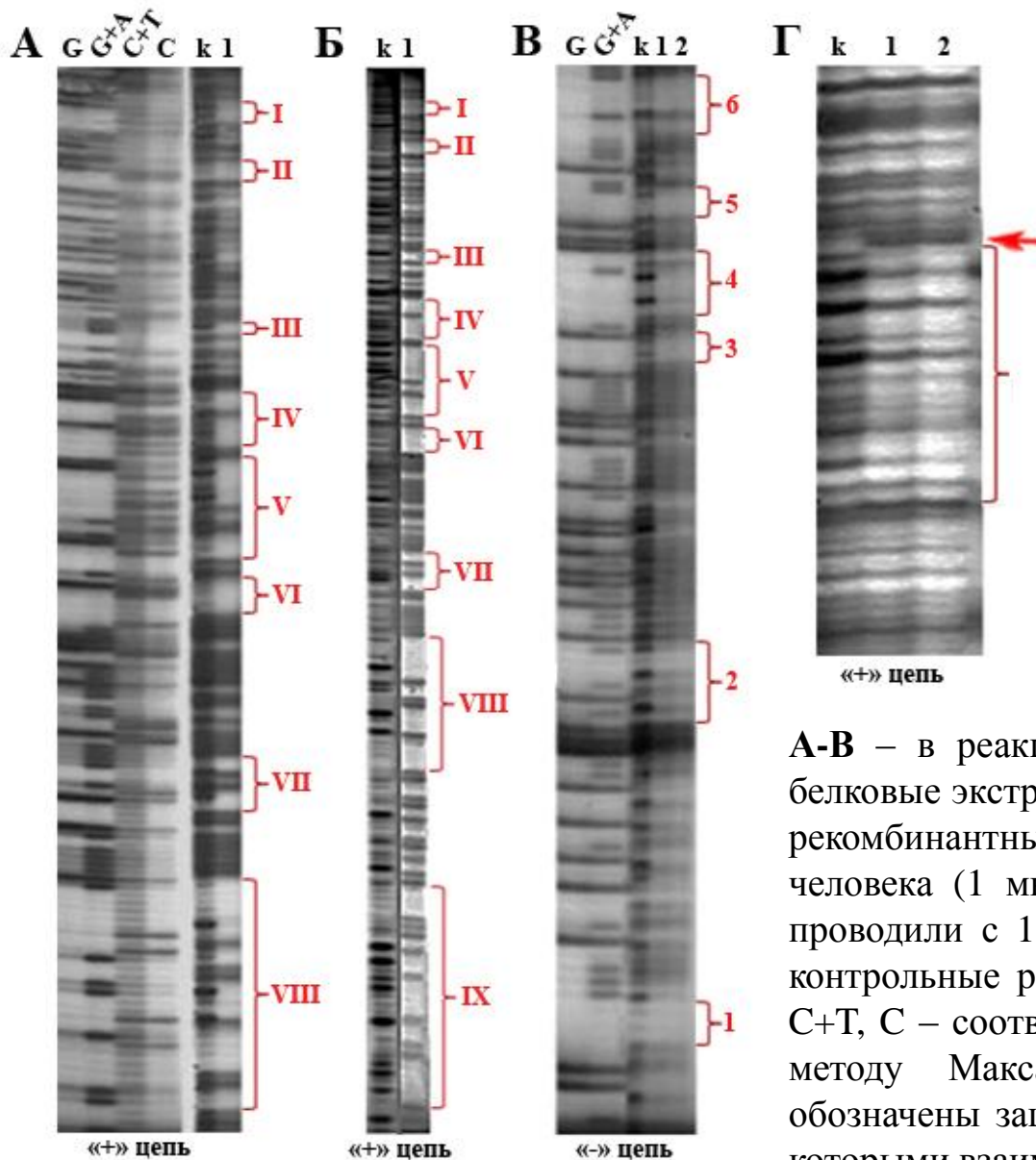
- 1) Идентифицировать районы связывания транскрипционных факторов в регуляторной области гена *Xist* при помощи метода *in vitro* футпринтинга с ДНКазой I;
- 2) Провести компьютерный анализ полученных районов и определить транскрипционные факторы, которые потенциально могут взаимодействовать с этими районами;
- 3) Определить регуляторный потенциал различных частей 5` области гена *Xist* в составе репортерных конструкций;
- 4) Изучить влияние замены G-A в позиции -43 п.н. в минимальном промоторе гена *Xist* на процесс неслучайной инактивации X-хромосомы у межвидовых гибридов обыкновенных полевок.

# Гомология 5'-регуляторной области и части первого экзона гена *Xist*



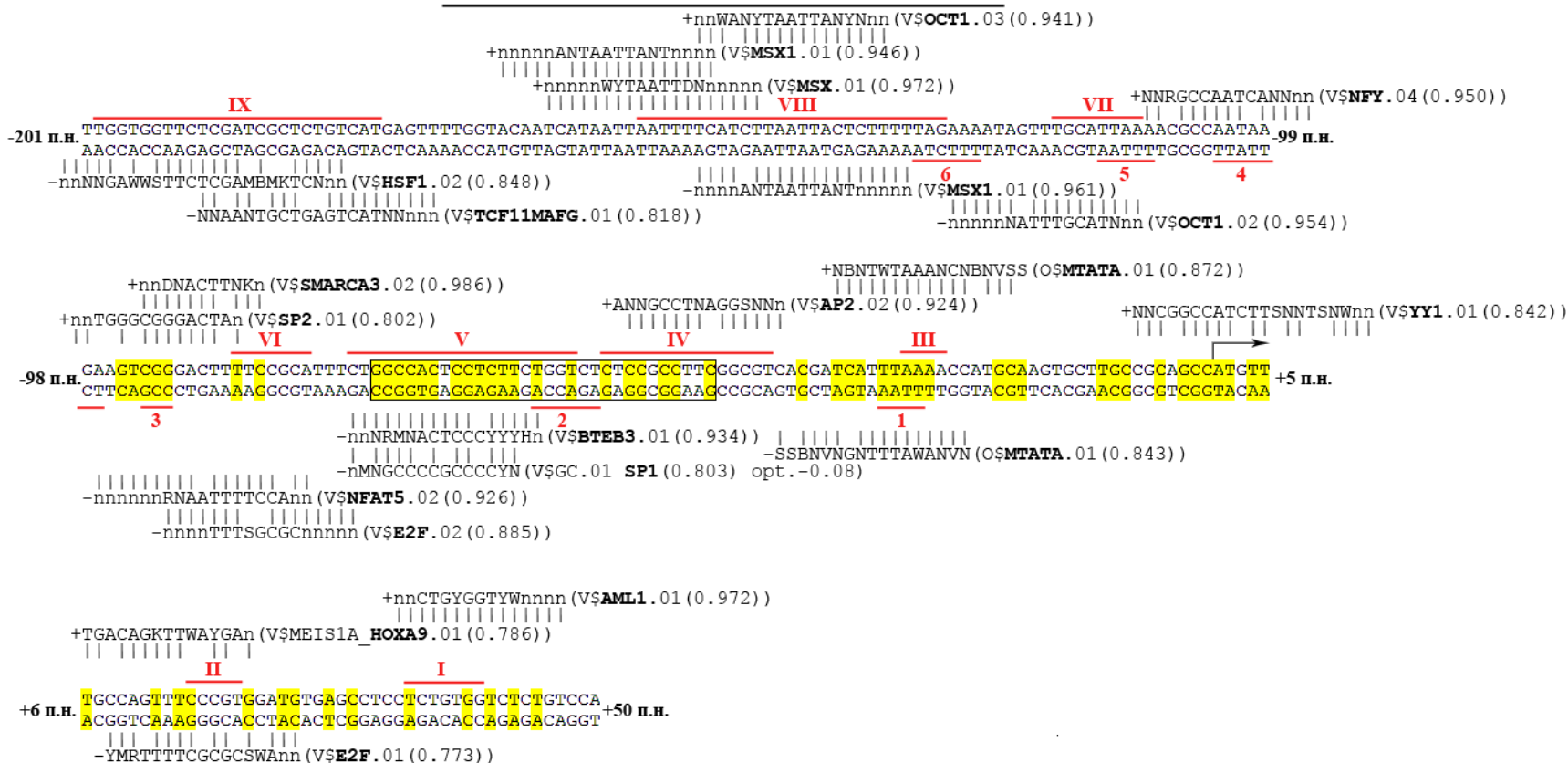
Гомология 5'-регуляторной области и части первого экзона гена *Xist* между полевкой и пятью видами млекопитающих (корова, кролик, собака, лошадь и человек). Районы гомологичные на 70% и более обозначены красным цветом в 5' области и синим в первом экзоне. Красными и зелеными прямоугольниками обозначены LINE и SINE элементы соответственно.

# *In vitro* футпринтинг промоторного района гена *Xist* полевки.



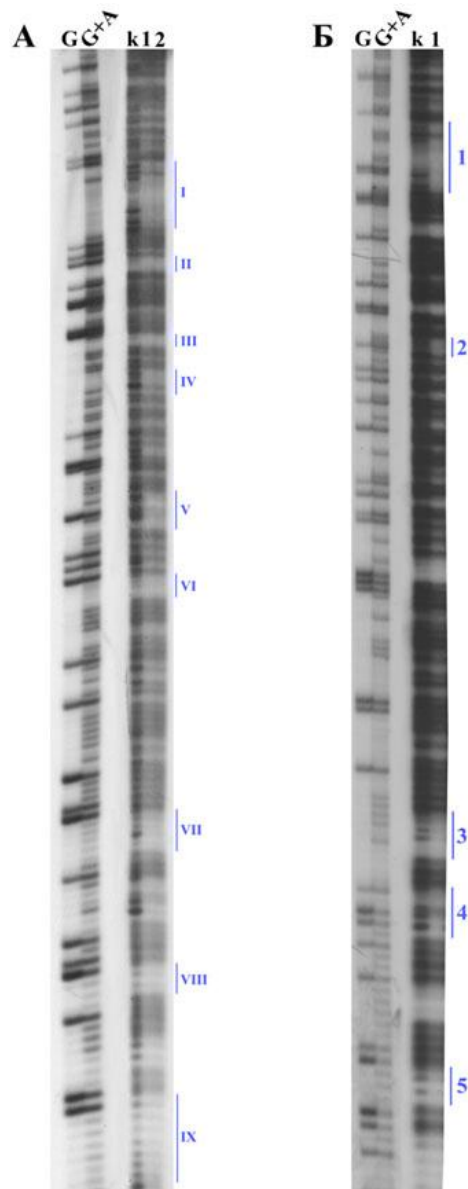
**А-В** – в реакциях связывания использовали ядерные белковые экстракты: 1 – 5 мкг, 2 – 10 мкг. **Г** – реакции с рекомбинантным транскрипционным фактором SP1 человека (1 мкг белка): 1 и 2 – реакции связывания проводили с 1 и 2 мкл матрицы, соответственно. k – контрольные реакции без добавления белков. G, G+A, C+T, C – соответствующие реакции секвенирования по методу Максама-Гилберта. Линиями и цифрами обозначены защищенные от ДНКазы I участки ДНК, с которыми взаимодействуют белки.

Район содержащий 91 потенциальный сайт связывания  
гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов

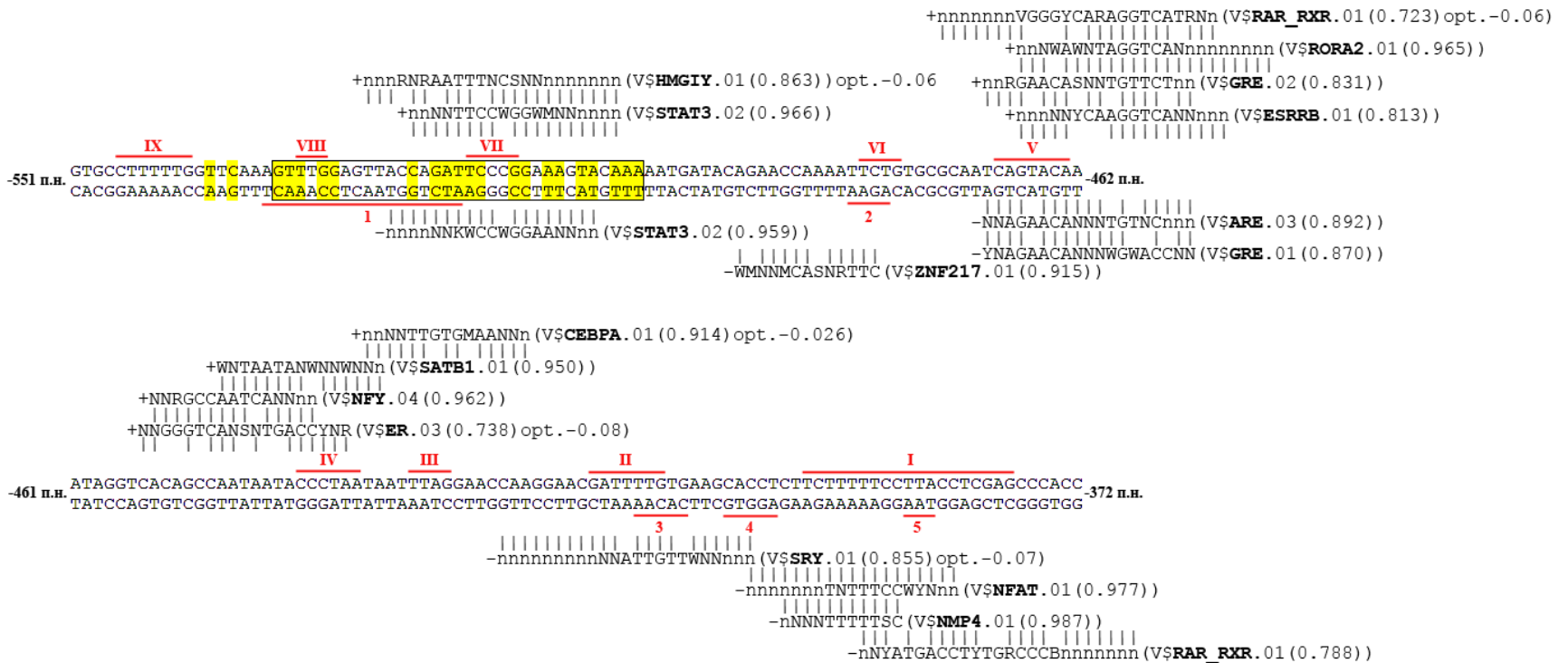


Компьютерный анализ промоторного района гена *Xist* полевки *Microtus rossiaemeridionalis*. Выше и ниже нуклеотидной последовательности представлены консенсусы некоторых идентифицированных ПССТФ. Последовательность соответствующая первому консервативному району CNS1 выделена прямоугольником. Линиями и цифрами красного цвета обозначены, выявленные в экспериментах по футпринтингу ДНК-мотивы, защищенные от ДНКазы I. Римскими цифрами обозначены защищенные ДНК-мотивы, идентифицированные на «+» цепи, а арабскими на «-» цепи ДНК. Стрелкой – точка старта транскрипции. Консервативные между полевкой, человеком, коровой, собакой, лошастью и кроликом нуклеотиды выделены желтым цветом.

*In vitro* футпринтинг второго консервативного района (CNS2) и прилегающих к нему нуклеотидных последовательностей.

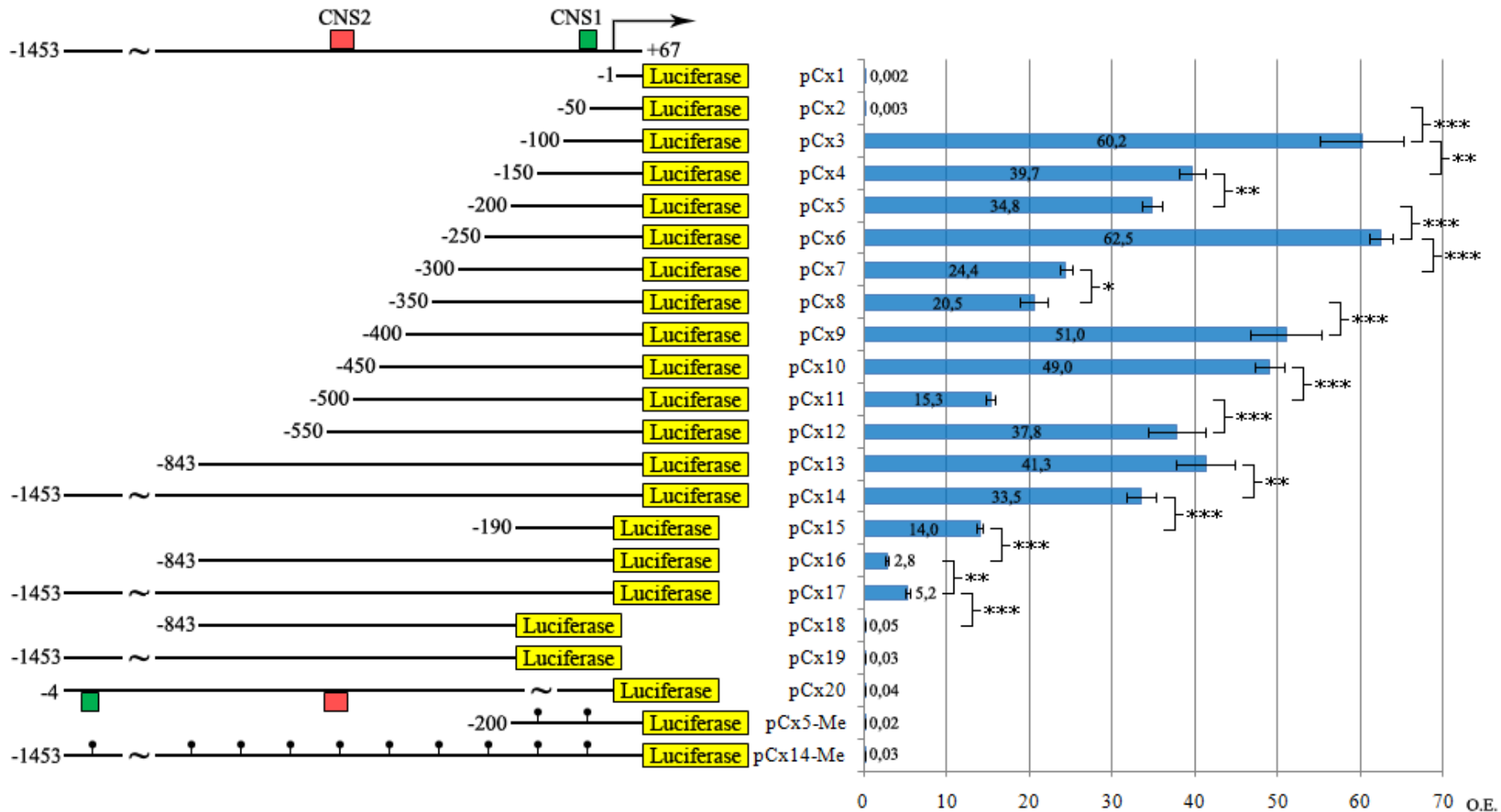


А – «+» цепь, Б – «-» цепь ДНК. В реакциях связывания использовали ядерные белковые экстракты. 1 и 2 – реакции связывания проводили с 1 и 2 мкл матрицы, соответственно. к – контрольные реакции без добавления белков. G, G+A – соответствующие реакции секвенирования по методу Максама-Гилберта. Линиями и цифрами обозначены защищенные от ДНКазы I участки ДНК, с которыми взаимодействуют белки.



Компьютерный анализ второго консервативного района (CNS2) и прилегающих к нему нуклеотидных последовательностей в 5' области гена *Xist* полевки *Microtus rossiaemeridionalis*. Выше и ниже нуклеотидной последовательности представлены консенсусы некоторых идентифицированных ПССТФ. Последовательность соответствующая CNS2, выделена прямоугольником. Линиями и цифрами красного цвета обозначены, выявленные в экспериментах по футпринтингу ДНК-мотивы, защищенные от ДНКазы I. Римскими цифрами обозначены защищенные ДНК-мотивы, идентифицированные на «+» цепи, а арабскими на «-» цепи ДНК. Желтым цветом – консервативные нуклеотиды между полевкой, человеком, коровой, собакой, лошадью и кроликом.





Анализ активности репортерных конструкций. Сверху представлена схема 5' области гена *Xist*, зеленым и красным прямоугольниками обозначены CNS1 и CNS2, соответственно. pCx1-pCx14Me – варианты репортерных конструкций в векторе pGL4.10[luc2], слева обозначены нуклеотидные позиции относительно точки старта транскрипции гена *Xist*. На диаграмме отражена относительная люциферазная активность конструкций в перевиваемой культуре фибробластов линии SD10. Стрелкой обозначена точка старта транскрипции *Xist*, черными точками – метилированные конструкции, О.Е. – относительные единицы активности люциферазы. Достоверность различий: \*\*\* -  $P \geq 0.999$ , \*\* -  $P \geq 0.99$ , \* -  $P \geq 0.95$ .

# Участие фактора CTCF в процессе неслучайной инактивации X-хромосомы у межвидовых гибридов обыкновенных полевков

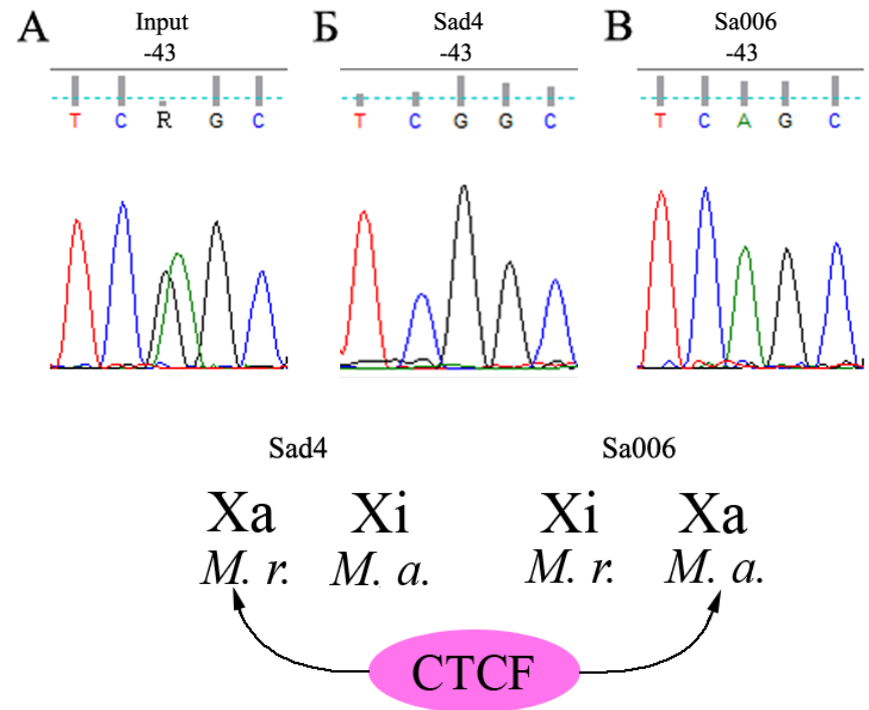
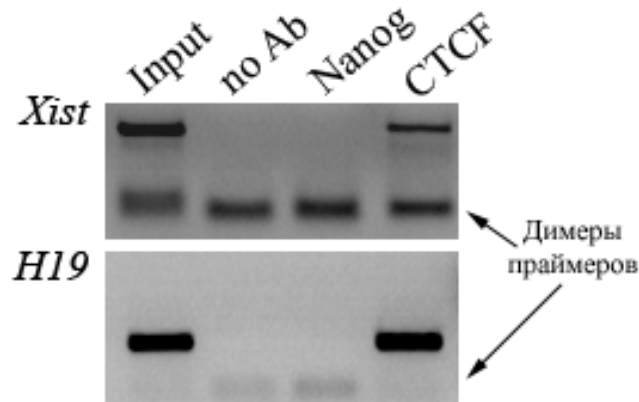
-43

*Xist* →

```

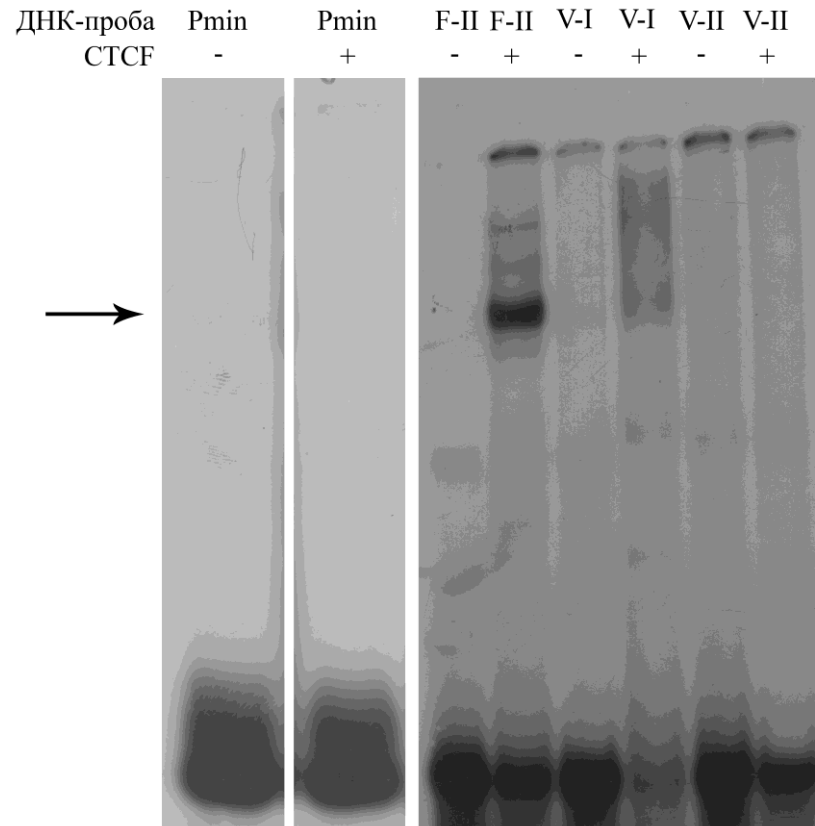
*****
M. rossiaemeridionalis TCTTCTGGTCTCTCCGCCTTCGGCGTCACGATCATTTAAAACCATGCAAGTGCTTGCCGCAGCCATGTTT
M. transcaspicus TCTTCTGGTCTCTCCGCCTTCGGCGTCACGATCATTTAAAACCATGCAAGTGCTTGCCGCAGCCATGTTT
M. kirgisorum TCTTCTGGTCTCTCCGCCTTCGGCGTCACGATCATTTAAAACCATGCAAGTGCTTGCCGCAGCCATGTTT
M. arvalis TCTTCTGGTCTCTCCGCCTTCAGCGTCACGATCATTTAAAACCATGCAAGTGCTTGCCGCAGCCATGTTT
    
```

## ChIP-анализ промоторного района гена *Xist* полевки



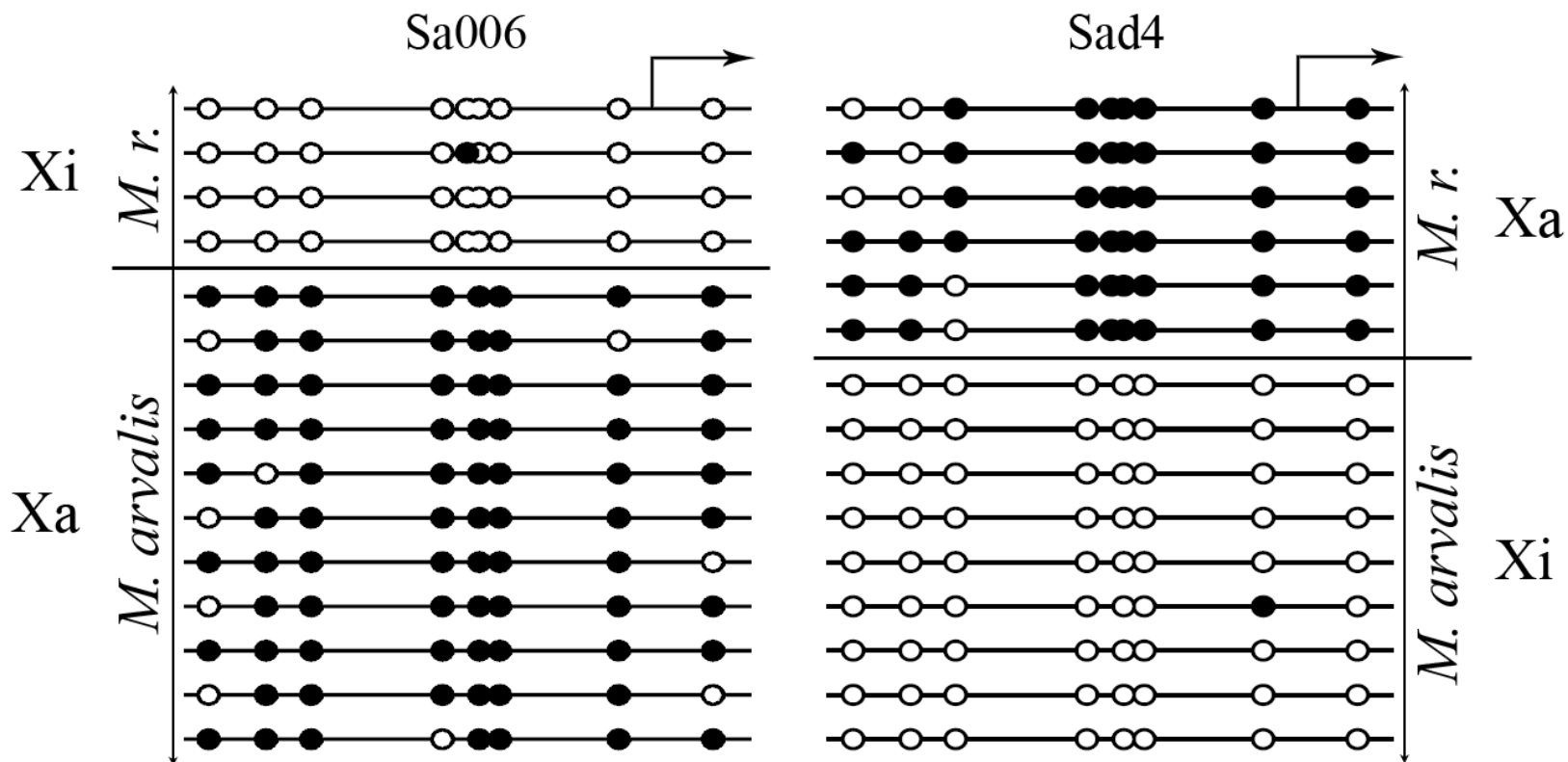
Xi – неактивная X-хромосома, Xa – активная X-хромосома, *M. r.* – *Microtus rossiaemeridionalis*, *M. a.* – *Microtus arvalis*.

# Анализ связывания фактора CTCF с районом минимального промотора *Xist* методом гель-ретардации



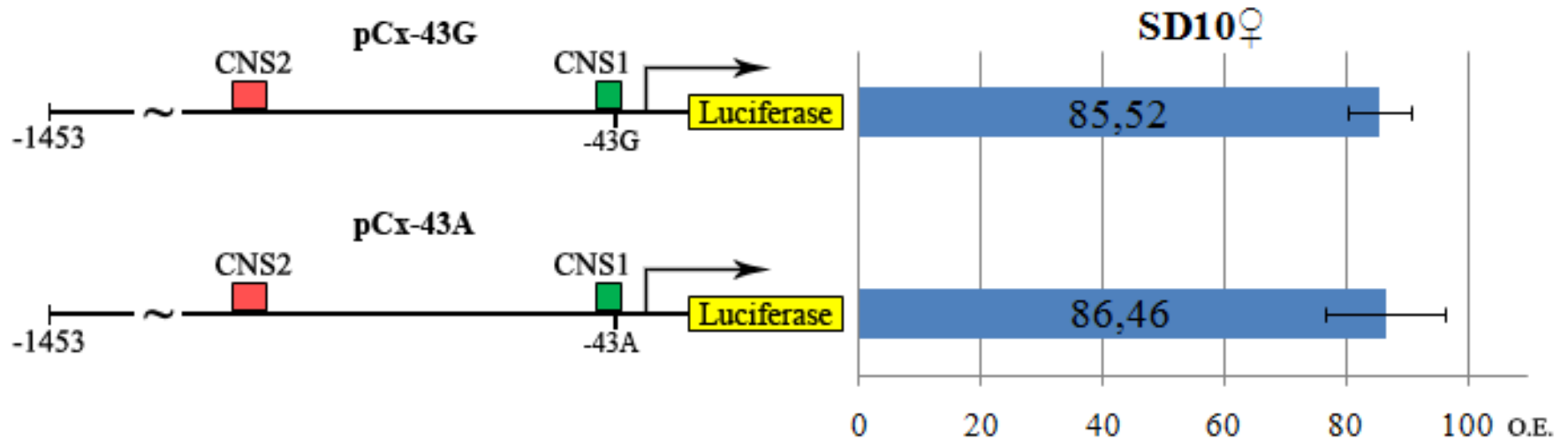
Pmin – ПЦР продукт, охватывающий район -111/+27 п.н., F-II – ДНК-проба, содержащая консенсусный сайт связывания CTCF. V-I и V-II – радиоактивно меченные двуцепочечные олигонуклеотиды, содержащие последовательности в промоторе *Xist* полевки -61/-17 п.н. и -49/-5 п.н., соответственно.

# Метилирование промоторного района гена *Xist*



Xi – неактивная X-хромосома, Xa – активная X-хромосома, *M. r.* – *Microtus rossiaemeridionalis*.

# Анализ влияния замены -43G/A на активность репортерных конструкций в фибробластах полевки и мыши



SD10 – перевиваемая линия фибробластов самки полевки *M. rossiaemeridionalis*. Аналогичный результат получен на линиях фибробластов MsEf3, Maf, Maf2 и ЭФМ2. MsEf3 – эмбриональные фибробласты самца полевки *M. rossiaemeridionalis*, Maf и Maf2 – культуры фибробластов легкого самца и самки полевки *M. arvalis*, соответственно. ЭФМ2 – эмбриональные фибробласты самки мыши *M. musculus*.

## Выводы:

- 1) В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 5`-регуляторной области гена *Xist* шести видов млекопитающих идентифицировано два наиболее консервативных района: первый район (CNS1) располагается в минимальном промоторе гена *Xist*, второй район (CNS2) локализуется в позиции -540/-498 п.н. относительно точки старта транскрипции. Методом *in vitro* футпринтинга с ДНКазой I в промоторном районе гена *Xist* у полевки *Microtus rossiaemeridionalis* идентифицировано девять сайтов связывания регуляторных белков на (+) цепи и шесть на (-) цепи ДНК. Во втором консервативном районе и, прилегающих к нему нуклеотидных последовательностях, выявлено девять и пять сайтов связывания регуляторных белков на (+) и (-) цепях ДНК, соответственно. Определены транскрипционные факторы, которые потенциально могут взаимодействовать с этими сайтами.
- 2) Показано связывание рекомбинантного транскрипционного фактора SP1 с районом -73/-56 п.н. в минимальном промоторе гена *Xist* полевки в условиях *in vitro*.

- 3) При помощи делеционного анализа установлено, что минимальный промотор гена *Xist* полевки локализован в области -100/+67 п.н. и район -4/+67 п.н. оказывает существенное влияние на его активность. Показано, что в районах -100/-150 п.н., -250/-300 п.н. и -450/-500 п.н., могут располагаться негативные регуляторные элементы, а в районах -200/-250 п.н., -350/-400 п.н. и -500/-550 п.н., могут находиться позитивные элементы, регулирующие транскрипцию гена *Xist* полевки.
- 4) Методом иммунопреципитации хроматина продемонстрировано взаимодействие фактора CTCF с промоторным районом гена *Xist* на активной X-хромосоме *in vivo*. Показано, что CTCF связывается не напрямую с ДНК в промоторе *Xist*, а опосредованно за счет белок-белковых взаимодействий.
- 5) Установлено, что в фибробластах полевки замена -43G/A в минимальном промоторе гена *Xist* не влияет на уровень экспрессии репортерного гена в конструкциях, содержащих район -1453/+67 п.н.

## Публикации:

- 1) **Орищенко К.Е.**, Елисафенко Е.А., Кель А.Э., Закиян С.М. Молекулярно-генетическая характеристика регуляторного района гена *Xist* полевки *Microtus rossiaemeridionalis* // Генетика. 2009. Т. 45. № 7. С. 1-11.
- 2) **Орищенко К.Е.**, Елисафенко Е.А., Закиян С.М. Роль замены G(-43)A в промоторном районе гена *Xist* при неслучайной инактивации X-хромосомы у межвидовых гибридов обыкновенных полевков // Генетика. 2010. Т. 46. № 10. С. 1-4.

## Конференции:

- 1) **Орищенко К.Е.**, Елисафенко Е.А. Исследование регуляторной области гена *Xist* полевки *Microtus rossiaemeridionalis*. // Международная молодежная научно-методическая конференция «Проблемы молекулярной и клеточной биологии», посвященная 50-летию СО РАН. Томск. 2007. С. 133.
- 2) **Орищенко К.Е.** Определение и анализ регуляторных районов гена *Xist* у полевки *Microtus rossiaemeridionalis* // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых ЛОМОНОСОВ – 2009. Москва. 2009. С. 98.
- 3) **Орищенко К.Е.**, Елисафенко Е.А. Структурно-функциональная организация регуляторных районов гена *Xist* полевки *Microtus rossiaemeridionalis* // Международная конференция «Хромосома 2009». Новосибирск. 2009. С. 93.