

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ZF5 И CGGBP-20 В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *FMRI*, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА СИНДРОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© П. В. Гулый,¹ С. В. Орлов,^{1,2} Э. Б. Дижэ,² К. Б. Кутейкин-Тепляков,^{2,3} И. А. Игнатович,²
С. В. Жук,¹ А. П. Перевозчиков^{1,2,*}

¹ Кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета,

² НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург,

³ Отдел нейробиохимии Рурского университета, Бохум, Германия;

*электронный адрес: app@iem.sp.ru

Ген *FMRI* человека кодирует РНК-связывающий белок, принимающий участие в регуляции транскрипции. 5'-регуляторная область *FMRI* содержит большое количество tandemных тринуклеотидных GCC-повторов (5—50), увеличение числа которых (более 200) ответственно за синдром ломкой X-хромосомы (врожденной аномалии развития человека). Как предполагается, по меньшей мере два фактора транскрипции способны специфически взаимодействовать с триплетными повторами (GCC)_n — CGGBP-20 и ZF5. В настоящей работе изучена роль этих факторов в регуляции экспрессии гена *FMRI*. Избирательное связывание рекомбинантного белка ZF5 с последовательностью (GCC)₉ показано методом гель-ретардации. Тканеспецифическое распределение белка ZF5 в клетках млекопитающих перекрывается с известными районами экспрессии гена *FMRI*. С помощью специфической интерферирующей РНК (иРНК-ZF5) показано, что угнетение активности экспрессии гена ZF5 в клетках гепатомы человека HepG2 вызывает стимуляцию экспрессии гена *FMRI* в этих клетках по меньшей мере в 1.5 раза. Это обстоятельство указывает на негативный характер регуляции экспрессии гена *FMRI* фактором транскрипции ZF5. 5'-регуляторная область *FMRI* содержит помимо GCC-повторов классические («канонические») сайты связывания ZF5, локализованные вблизи точек инициации транскрипции. С целью выяснения вклада триплетных повторов GCC в регуляцию экспрессии гена *FMRI* факторами транскрипции ZF5 и CGGBP-20 созданы две генетические конструкции, содержащие репортерный ген люциферазы под контролем клонированного делеционного варианта 5'-регуляторной области гена *FMRI* человека и отличающиеся наличием в этой области триплетных повторов (GCC)₉. В экспериментах по котрансфекции клеток гепатомы человека HepG2 данными генетическими конструкциями совместно с векторами экспрессии генов ZF5 и (или) CGGBP-20 установлено, что ZF5 подавляет активность 5'-регуляторной области *FMRI* через классические сайты связывания. Более того, присутствие GCC-повторов ослабляет подавляющий эффект ZF5 на активность 5'-регуляторной области *FMRI*. CGGBP-20 подавляет активность 5'-регуляторной области *FMRI* только в присутствии триплетных повторов GCC. Полученные данные свидетельствуют о разнонаправленном действии фактора транскрипции ZF5 на ген *FMRI*, что может объяснять показанное ранее повышение уровня иРНК *FMRI* у носителей премутантных аллелей.

Ключевые слова: GCC-триплетные повторы, синдром ломкой X-хромосомы, регуляция транскрипции гена *FMRI*, факторы транскрипции ZF5, CGGBP-20.

Автономная экспансия тринуклеотидных tandemных повторов в геноме человека является причиной ряда тяжелых наследственных заболеваний человека (Caskey et al., 1992; Ashley, Warren, 1995). Участки экспансии триплетных повторов (GCC)_n выявлены в X-хромосоме человека — FRAXA, FRAXE и FRAXF (Parrish et al., 1994), в хромосомах 11 — FRA11B (Jones et al., 1995) и 16 — FRA16A (Nancarrow et al., 1994). В локусе FRAXA нестабильные повторы (GCC)_n расположены в 5'-нетранслируемом районе гена *FMRI* (Fragile Mental Retardation-1), увеличение их числа (до $n > 200$) вызывают врожденное заболевание, сопровождающееся задержкой умственного развития (синдром ломкой X-хромосомы, или синдром Мартина—Белл), связанное с инактивацией гена *FMRI* (Fu et al., 1991; Verkerk et al., 1991). Инактивация гена

FMRI происходит, по-видимому, в результате гиперметилирования увеличенного числа триплетных повторов (GCC)_n (Pieretti et al., 1991; Sutcliffe et al., 1992). Описаны случаи активного гена *FMRI* с мутантными ($n \sim 400$), но не метилированными GCC-повторами у лиц, не имеющих клинических проявлений заболевания (Smeets et al., 1995). Помимо нормального и мутантного числа повторов (соответственно $n < 50$ и $n > 200$) описаны промежуточные аллели гена ($n = 50—200$), получившие название премутантных. Носители таких аллелей не страдают синдромом ломкой X-хромосомы, но вероятность дальнейшей экспансии повторов у их потомков значительно выше (Verkerk et al., 1991). Относительно недавно появились данные о развитии у носителей премутантных аллелей *FMRI* комплекса аномалий, получившего название

синдрома тремора/атаксии, ассоциированного с X-хромосомой, или FXTAX: X-associated tremor/ataxia syndrome (Hagerman, Hagerman, 2004). У таких пациентов наблюдается умеренное снижение уровня белка FMR1, при этом количество соответствующей иРНК увеличено в несколько раз. Показано, что это увеличение обусловлено именно стимуляцией активности промотора *FMR1*, а не повышением стабильности иРНК (Tassone et al., 2000; Beilina et al., 2004). Таким образом, эти данные прямо указывают на регуляторные функции последовательностей (GCC)_n.

В 1996—1997 гг. группа немецких исследователей выделила из клеток HeLa ядерный белок мол. массой 20 кДа (CGGBP-20), специфически взаимодействующий с CGG/GCC-повторами гена *FMR1*, и клонировала последовательность кДНК, кодирующую этот белок (Deissler et al., 1996, 1997). Описанные физико-химические свойства этого белка полностью подтверждают наши более ранние данные по определению молекулярной массы так называемого CGG/GCC-фактора в клетках HeLa, способного взаимодействовать с CGG/GCC-триплетными повторами в регуляторных районах ряда генов (Перевозчиков и др., 1994). Позже была охарактеризована способность белка CGGBP-20 действовать в качестве транскрипционного фактора — репрессора транскрипции гена *FMR1* (Müller-Hartmann et al., 2000). Вместе с тем поиски мутаций в гене *CGGBP-20* у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы не привели к доказательству связи между наличием такой мутации и развитием синдрома, что, возможно, свидетельствует о существовании других функционально активных ДНК-связывающих белков, способных стабилизировать протяженные повторы (GCC)_n гена *FMR1*. Интересно, что помимо белка CGGBP-20 с GCC-повторами могут взаимодействовать Ku-антиген (Uziel et al., 2000), геликаза WRN (Fry, Loeb, 1999) и теломерсвязывающие белки (Weisman-Shomer et al., 2000). Вместе с тем необходимо учитывать, что перечисленные факторы узнают необычные структуры квадриплексной ДНК, образуемые протяженными GCC-повторами, и не могут рассматриваться как сайт-специфические ДНК-связывающие белки. Напротив, данные, полученные в наших исследованиях, свидетельствуют в пользу существования дополнительных сайт-специфических транскрипционных факторов, способных взаимодействовать с триплетными повторами типа (GCC)_n (Орлов и др., 1999а, 1999б; Кутейкин-Тепляков и др., 2003). Одним из таких белков является цинк-фингерный фактор транскрипции ZF5 (Орлов и др., 2006; Orlov et al., 2007). Существенным отличием наших исследований от работ других авторов является использование для поиска GCC-факторов коротких (GCC)_n-последовательностей (n = 3—4), что исключает возможное влияние необычных структур, образуемых протяженными повторами. Таким образом, на настоящий момент известны два ДНК-связывающих белка, способных специфически взаимодействовать с триплетными повторами (GCC)_n: CGGBP-20 и ZF5.

Ранее было показано, что фактор транскрипции ZF5 способен связываться с GC-богатыми сайт-специфическими последовательностями ДНК; так, для него описана консенсусная последовательность ДНК 5'-GCGCGC-3' (Kaplan, Calame, 1997; Obata et al., 1999). В настоящей работе приводятся данные о способности ZF5 и GCCBP-20 принимать участие в регуляции экспрессии гена *FMR1* в культивируемых клетках человека за счет взаимодействия с GCC-триплетными повторами.

Материал и методика

Реактивы. В работе использованы реактивы фирм Amersham Bioscience, Gibco, Invitrogen, Promega, Roche Applied Science, Sigma (США), а также отечественного производства квалификаций х. ч. и ч. д. а.; ферменты для генно-инженерных работ производства Fermentas (Литва) и НПО СибЭнзим (Новосибирск). [γ -³²P]АТФ-15—30 Ci/mmol — фирмы Amersham Bioscience (Англия). Рентгеновская пленка X-ОМАТ-фирмы Kodak (Германия).

Животные. В исследованиях были использованы мыши линии C57Bl/6 и крысы линии Wistar, все самцы в возрасте 8 нед (питомник РАМН «Рапполово»).

Клеточные культуры. В работе использовали клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы (гепатомы) человека HepG2, полученную из отдела клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки (Life Technologies Inc., США), при 37 °C в CO₂-инкубаторе с содержанием CO₂ 5 %.

Гены, генетические конструкции и нуклеотидные последовательности. Эукариотические векторы экспрессии человеческих генов *ZF5*, *GCCBP-20* и гена-репортера люциферазы светляка (*luc*), а также бактериального гена-репортера β-галактозидазы (*lacZ*) были получены, как описано нами ранее (Орлов и др., 2006). Выполнявшиеся в исследовании генно-инженерные работы проводили в соответствии с общеизвестными руководствами и протоколами (Маниатис и др., 1984).

Получение рекомбинантного сплавленного белка GST-ZF5 (содержащего ДНК-связывающий домен ZF5). GST-ZF5 (ДНК-связывающий домен ZF5, сплавленный с глутатион-S-трансферазой), являющийся продуктом экспрессии бактериального вектора pGEXZF5, получали в соответствии с методикой, описанной нами ранее (Орлов и др., 2006). Бактериальный вектор экспрессии pGEXZF5 любезно предоставлен д-ром S. Yamamoto (Университет Хиросимы, Япония). Рекомбинантный белок получали хроматографической очисткой на агарозном носителе, содержащем иммобилизованный глутатион.

Гель-ретардация ДНК-белковых комплексов в агарозном геле при электрофорезе. Ядерные экстракты приготавливали из культивируемых клеток, как описано ранее (Andrews, Faller, 1991). Синтетические олигонуклеотиды (указанные в подписях к соответствующим рисункам) метили по 5'-положению с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и меченого [γ -³²P]АТФ, а затем отжигали для получения двухцепочечной формы. Гель-ретардацию выполняли в соответствии с рекомендациями (Schreiber et al., 1989). Реакционная смесь содержала 100 мМ NaCl, 10.5 мМ HEPES, pH 7.9, 0.8 мМ Na₂-EDTA, 0.15 мМ Na₂-EGTA, 0.8 мМ DTT, 0.15 мМ PMSF, 6 мМ MgCl₂, 0.25 мМ ZnCl₂, 150 мкг/мл фрагментированной ультразвуком ДНК спермы лосося, 8(10³—10⁴) имп/мин меченого синтетического двухцепочечного олигонуклеотида, смысловую нить 5'-(GCC)₃-3' (1—10 нг), 2—20 мкг ядерного экстракта. В экспериментах по конкуренции немеченые олигонуклеотиды добавляли в реакционную смесь совместно с мечеными в избытках, указанных в подписях к рисунку.

Трансфекция клеток. Для трансфекции клеток HepG2 плазмидными векторами экспрессии эти клетки с плотностью 10⁴ кл./см² высевали на чашку Петри (диаметр 30 мм) и выращивали до субконфлюентного монослоя в

среде DMEM, содержащей 10 % фетальной сыворотки теленка, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Процедуру Са-фосфатной трансфекции выполняли по методике Горман (1988). Для трансфекции использовали 10 мкг плазмидной ДНК на чашку. Для нормализации данных, полученных на клетках разных экспериментов, все клеточные культуры дополнительно котрансфецировали вектором экспрессии гена *LacZ*. Измерение активности β-галактозидазы проводили по стандартной методике, используя *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид как субстрат. Активность люциферазы определяли в соответствии с протоколом для Luciferase Assay System (Promega, США), пользуясь сцинтилляционным счетчиком (Beckman). Активность представлена в условных единицах, соответствующих числу имп/мин на 1 мг тотального клеточного белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

РНК-интерференция. Интерферирующая РНК ZF5 (РНК-и ZF5) была сконструирована на основании общих правил селекции РНК-и (Dykxhoorn et al., 2003). Нуклеотидная последовательность 5'-GAGUUUCUCAUGCU-UCCUCUU-3', комплементарная нуклеотидной последовательности 945-963 иРНК ZF5 (accession number D89859) (вторая нить: 5'-GAGUUUCUCAUGCUUCCUCUU-3'), была взята за основу при химическом синтезе дуплексной РНК-и ZF5. В качестве контрольной использована РНК-и, содержащая в дуплексе последовательность: 5'-UAGUCCCAUUAGCAAAGGUUU-3', комплементарную иРНК белка эндоплазматического ретикулума GRP58 (вторая нить: 5'-ACCUUUGCUAAUGGGACUAUU-3'); структура РНК-и GRP58 была опубликована ранее (Hetz et al., 2005). Все указанные (и им комплементарные) РНК-нуклеотидные последовательности в виде отдельных нитей были химически синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва) и для получения соответствующих дуплексов были отождены в растворе 30 мМ NaCl прогреванием до 85 °С в течение 15 мин с последующим постепенным охлаждением до комнатной температуры.

Трансфекцию клеток HepG2 различными РНК-и проводили 48 ч с использованием РНК-и-фекта (RNAiFect; Qiagen, Hilden, Германия) или реагента олигофектамина (Oligofectamine reagent; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, США). Для одного эксперимента использовали 30 нМ РНК-и. Из собранных по окончании трансфекции клеток выделяли тотальную РНК и проводили полуквантитативную процедуру ОТ-ПЦР для сравнения уровня экспрессии генов ZF5 и FMR1 в клетках в условиях контроля и опыта.

ОТ-ПЦР. Эту процедуру выполняли, как было описано ранее (Акифьев и др., 2004). В качестве внутреннего стандарта использовали иРНК глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), праймеры 5'-TCACCATCTTTCCAGGAGCGA-3' и 5'-TACTCCTTGGAGGCCTTAACAT-3', 18 циклов ПЦР (амплификатор Терцик, ДНК-технология). Для анализа уровня иРНК ZF5 использовали праймеры 5'-CCCCTCAAGCCTTAACAT-3' и 5'-TCTCCACTTTCAGGCAA-3', проводили 27 циклов. Для анализа уровня иРНК FMR1 использовали праймеры: 5'-GGGTGAGGATTGAGGCTGA-3' и 5'-GCCGTGCCCCCTATTTCT-3', проводили 34 цикла. Для анализа уровня иРНК GRP58 использовали праймеры 5'-ATCTCCGACACGGGCTCT-3' и 5'-TGCTGGCTGCTTTTAGGAA-3', число циклов 27. Все пробы нормализовали по отношению к пробе GAPDH.

Иммуноблотинг. Крысиные антитела получали к варибельному домену человеческого белка. ДНК-нукле-

отидная последовательность, кодирующая варибельный домен ZF5 человека (видоспецифичный участок белка), была амплифицирована в ПЦР и субклонирована в pBluescript. С помощью генно-инженерных процедур был создан бактериальный вектор экспрессии pGEXZF5-1, кодирующий белок GST (глутатион-S-трансфераза), сплавленный с варибельным доменом ZF5 человека (varZF5). Сплавленный белок очищали из бактериальных клеток аффинной хроматографией на глутатион-агарозе. Для получения крысиных ZF5-специфических антител крыс иммунизировали очищенным рекомбинантным белком в соответствии с общепринятыми процедурами иммунизации (с использованием адьюванта Фрейнда). С помощью полученной иммунной сыворотки крыс тестировали белок ZF5 в водорастворимом экстракте клеток HepG2 методом иммуноблотинга (вестерн-блотинга) в соответствии с рекомендацией Santa Cruz Biotechnology (США). Молекулярную массу белка ZF5 определяли с помощью маркерных белков PageRule (#SMO671) фирмы Fermentas (Литва). Электрофорез в денатурирующих условиях (12%-ной полиакриламидный гель) для осуществления процедуры вестерн-блотинга проводили в соответствии с общеизвестным методом (Laemmli, 1970). В дальнейшем с использованием полученной антисыворотки методом вестерн-блотинга определяли содержание белка ZF5 в водорастворимых фракциях тканей мышей, как указано выше.

Статистический анализ. Для вычисления стандартной ошибки среднего достоверность различий средних оценивали методом непарного *t*-теста. Различия считали статистически достоверными при $P < 0.05$. Все расчеты выполняли с использованием пакета программ Statistica 5.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, США).

Результаты и обсуждение

Получение делеционных вариантов 5'-регуляторного района гена FMR1, несущих триплетные GCC-повторы. С помощью указанных в разделе «Материал и методика» праймеров методом ПЦР клонировали 5'-регуляторную область гена FMR1 человека, лишённую триплетных повторов (GCC)_n (-542...+48 н. п. относительно точки инициации транскрипции). Прямая амплификация фрагмента 5'-регуляторной области гена FMR1 человека, содержащего триплетные повторы (GCC)_n, оказалась невозможной, по-видимому вследствие сложной вторичной структуры этих триплетных повторов. Для решения поставленной задачи был применен подход, описанный в литературе (Grabzyk, Usdin, 1999). Триплетные повторы вида 5'-(GCC)₉-3', которые далее именуется как (GCC)₉, соответствующие одному из нормальных вариантов гена FMR1 человека, были синтезированы химически в виде фрагмента ДНК, содержащего помимо собственно повторов сайт рестрикции фермента Eco57 на 5'-конце. Параллельно была синтезирована последовательность (+48...+133) гена FMR1, соответствующая участку между GCC-повторами и амплифицированным ранее фрагментом 5'-регуляторной области гена FMR1. С помощью генно-инженерных манипуляций все три фрагмента были соединены и клонированы в векторе pBluescript. В результате был получен (делеционный) фрагмент 5'-регуляторной области гена FMR1 человека, содержащий девять повторов GCC (-542...+160 относительно точки инициации транскрипции). Затем были созданы генетические конструкции, содержащие

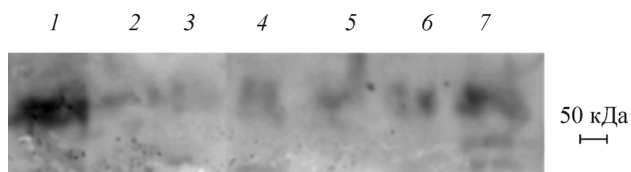


Рис. 1. Выявление транскрипционного фактора ZF5 в ядерных экстрактах клеток различных тканей взрослой мыши (востерн-блоттинг).

1 — легкое, 2 — печень, 3 — большие полушария коры головного мозга, 4 — мозжечок, 5 — семенник, 6 — почка, 7 — сердце. Справа указана масса идентифицированного белка.

ген-репортер, кодирующий люциферазу, под контролем двух указанных вариантов 5'-регуляторной области гена *FMR1* (pFMRluc и pFMRGCCluc). В результате данной работы появилась возможность оценивать вклад триплетных повторов (GCC)₉ в регуляцию транскрипции гена *FMR1* факторами ZF5 и CGGBP-20.

Тканевой спектр экспрессии гена *ZF5* у мыши. Известно, что биологические функции и свойства факторов транскрипции ZF5 млекопитающих весьма сходны, что подкрепляется также высоким уровнем гомологии генов млекопитающих, кодирующих этот белок (Sobek-Klocke et al., 1997; Sugiura et al., 1997). Несмотря

на то что описанная в разделе «Материал и методика» антисыворотка была получена на наиболее видоспецифичный домен белка ZF5 человека, высокий консерватизм белковых молекул дает возможность использовать эту (в итоге кроссреактивную) антисыворотку для тестирования соответствующего белка мыши. На рис. 1 продемонстрированы результаты анализа тканеспецифичного распределения белка ZF5 мыши, полученные с помощью востерн-блоттинга. Как следует из представленных результатов, транскрипционный фактор ZF5 (с мол. массой около 50 кДа), несмотря на количественные различия, идентифицируется практически во всех проанализированных тканях взрослой мыши, что в основном перекрывается с данными о присутствии в тех же тканях млекопитающих (мыши и человека) белка FMR1 (O'Donnel, Warren, 2002). Мы проводили эксперименты (представленные ниже) по исследованию взаимодействия ZF5 с регуляторным районом гена *FMR1* в клетках гепатомы HepG2 человека, в которых оба этих гена были активны (для генов *FMR1* и *ZF5* положительные результаты их активности в этих клетках получены с помощью полуколичественной ПЦР — не показано).

Возможность формирования комплексов между рекомбинантным белком ZF5 и GCC-триплетными повторами. Известно, что транскрипционный фактор ZF5 способен взаимодействовать с GC-богатыми районами регуляторных районов ряда генов через канонический сайт 5'-GCGCGC-3' (Bhathal, Stumph, 1996; Sobek-Klocke et al., 1997). Ранее мы показали, что белок, идентифицированный нами как ZF5, способен взаимодействовать также и с GCC-триплетными повторами ряда генов млекопитающих (Orlov et al., 2007). На рис. 2 приведены данные по образованию *in vitro* специфических комплексов между ДНК-связывающим доменом рекомбинантного ZF5 с олигонуклеотидом (GCC)₉. Видно, что связывание ZF5 с GCC-триплетными повторами происходит даже с большей эффективностью, чем с описанной ранее канонической нуклеотидной последовательностью для ZF5 — 5'-GCGCGC-3' (Kaplan, Calame, 1997; Obata et al., 1999). В связи с тем что олигонуклеотид (GCC)₉ *in vitro* эффективно взаимодействует с ДНК-связывающим доменом ZF5, его можно рассматривать как один из вариантов ZF5-ДНК-связывающей последовательности.

Влияние интерферирующей РНК, специфичной для ZF5, на экспрессию гена *FMR1*. Для того чтобы выявить корреляцию между активностью ZF5 и экспрессией *FMR1*, использовали метод РНК-интерференции, подавляющей экспрессию гена *ZF5*. С помощью полуколичественной ОТ-ПЦР показано, что введение в клетки HepG2 малой интерферирующей (двухцепочечной) РНК — РНК-и *ZF5* (21 н. п.), специфичной к 3'-нетранслируемой области гена *ZF5*, приводит к снижению уровня иРНК *ZF5* до 50 % в клетках HepG2. Данный эффект был специфичным, поскольку использование в качестве контроля случайной РНК-и, не гомологичной ни одному из генов человека и эквивалентной по нуклеотидному составу иРНК *ZF5*, не оказывало влияния на содержание иРНК *ZF5* в трансфицированных клетках. С помощью метода ОТ-ПЦР установлено также, что подавление экспрессии эндогенного гена *ZF5* в клетках HepG2 приводит к стимуляции экспрессии гена *FMR1* (рис. 3, а, б). Анализ экспрессии гена, не содержащего в своей структуре протяженных GCC-повторов (взятого в качестве отрицательного контроля полноразмерного гена аполи-

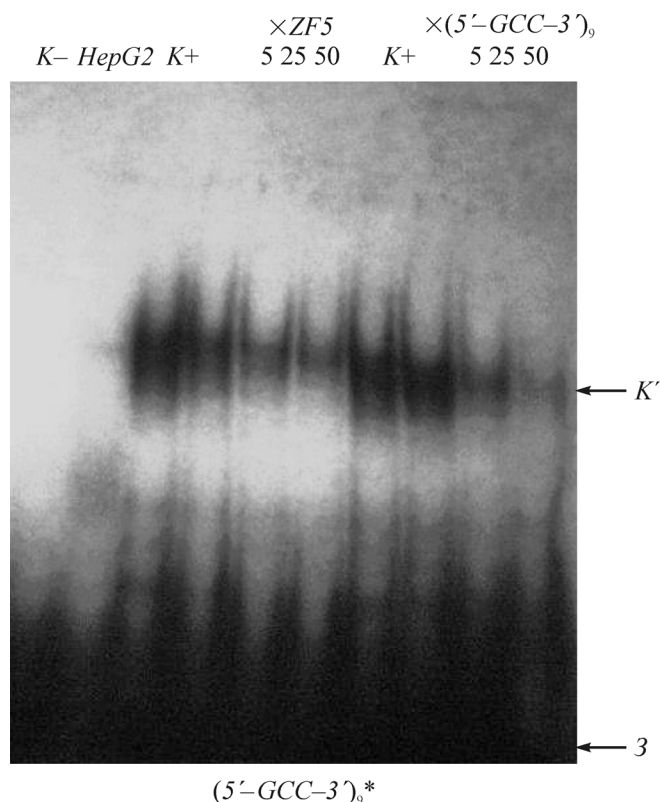


Рис. 2. Взаимодействие ДНК-связывающего домена ZF5 человека с (5'-GCC-3')₉, идентифицированное методом гель-ретардации.

K — зонд в отсутствие белка, HepG2 — связавшиеся с зондом белки экстрактов ядер гепатомных клеток. K+ — ДНК-белковый комплекс, формирующийся только с указанным зондом, ×ZF5 и ×(5'-GCC-3')₉ — избытки немеченых олигонуклеотидов, молярная кратность 5, 25 и 50, (5'-GCC-3')₉* — радиоактивный зонд, K' — сформированный специфический ДНК-белковый комплекс, 3 — несвязавшийся зонд (5'-GCC-3')₉*.

попротеина А-1 человека), не выявил существенных изменений уровня иРНК этого гена в клетках НерG2, трансфицированных иРНК ZF5 или другой неспецифичной иРНК (не показано). Полученные результаты указывают на возможную роль фактора транскрипции ZF5 в качестве эндогенного репрессора гена FMR1 человека. Вместе с тем приведенные данные не являются достаточным аргументом в пользу специфического влияния ZF5 на экспрессию гена FMR1, поскольку белок FMR1, как было показано ранее, сам принимает участие в процессах РНК-интерференции, являясь одним из компонентов молекулярных комплексов, взаимодействующих с РНК-и (Caudy et al., 2002). Наблюдаемое повышение уровня иРНК FMR1 при введении в клетки РНК-и, специфичной к ZF5, можно было бы объяснить индукцией экспрессии гена FMR1 при активации в клетке процесса неспецифической РНК-интерференции. Использование в качестве отрицательного контроля неспецифической РНК-и не позволяет исключить вероятность такой ситуации, так как эта «неспецифическая иРНК» не имеет в клетке какой-либо специфичной мишени. В связи с этим в качестве отрицательного контроля мы использовали также РНК-и, специфичную к иРНК глюкозорегулируемого белка GRP58 (рис. 3, в). При этом было установлено, что трансфекция клеток НерG2 РНК-и GRP58 приводит к существенному (примерно в 4 раза) снижению уровня иРНК GRP58, но содержание в клетках РНК-и FMR1, как и при воздействии «неспецифической РНК-и», не меняется. Полученные результаты позволяют исключить предположение об индукции экспрессии гена FMR1 в ответ на активацию в клетке процесса неспецифической РНК-интерференции и совместно с ранее полученными данными подтверждают роль фактора транскрипции ZF5 как специфичного репрессора гена FMR1.

Взаимодействие факторов транскрипции ZF5 и CGGBP-20 с 5'-регуляторной последовательностью гена FMR1 в клетках НерG2. В экспериментах по котрансфекции клеток НерG2 генетическими конструкциями, содержащими люциферазный ген под контролем делеционных вариантов 5'-регуляторного участка гена FMR1, и векторами экспрессии генов ZF5 и CGGBP-20 было установлено, что ZF5 угнетает активность 5'-регуляторной области FMR1 (pFMRluc) даже при отсутствии в ней триплетных повторов GCC (рис. 4, а). Эти данные хорошо согласуются с наличием в промоторной области гена FMR1 множественных канонических сайтов связывания ZF5, отличных от GCC-триплетов (5'-GCGCGC-3'), идентифицированных in silico в нуклеотидной последовательности промотора. В тех же условиях эксперимента вектор экспрессии CGGBP-20 не оказывает существенного влияния на активность конструкции pFMRluc, лишенной триплетных повторов GCC, поскольку транскрипционный фактор CGGBP-20 способен взаимодействовать только с ними. Интересно, что репрессирующее действие ZF5 на промотор FMR1 существенно снижается при добавлении к промотору девяти GCC-триплетных повторов (рис. 4, б). Более того, при анализе люциферазным тестом регуляторной области pFMRGCCluc, содержащей указанные выше триплетные повторы GCC в трансфицированных клетках НерG2, оказалось, что котрансфекция этих клеток одновременно векторами экспрессии CGGBP-20 и ZF5 и вовсе приводит к нивелированию репрессирующего действия ZF5. Нельзя исключить ситуации и со сменой знака (с репрессии на активацию) совместного влияния двух этих факторов на

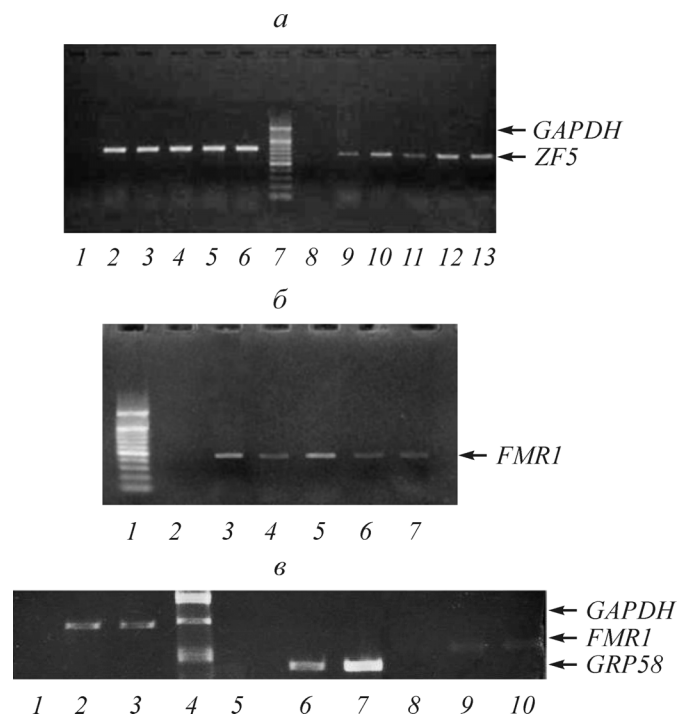


Рис. 3. Подавление экспрессии эндогенного ZF5 в клетках НерG2 методом РНК-интерференции (полуколичественная ОТ-ПЦР).

а — влияние ZF5 и РНК на экспрессию генов ZF5 и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, GAPDH (отрицательный контроль): 1—6 — ОТ-ПЦР иРНК GAPDH (18 циклов); 7 — маркер; 8—13 — ОТ-ПЦР иРНК ZF5 (27 циклов); 1, 8 — отрицательный контроль; 2, 9 — трансфекция клеток иРНК ZF5 с помощью олигофектамина; 3, 10 — трансфекция клеток контрольной иРНК с помощью олигофектамина; 4, 11 — трансфекция клеток иРНК ZF5 с помощью иРНК-фекта; 5, 12 — трансфекция клеток контрольной иРНК с помощью иРНК-фекта; 6, 13 — нетрансфицированные клетки. б — влияние иРНК ZF5 на экспрессию эндогенного гена FMR1 человека (34 цикла): 1 — маркер, 2 — отрицательный контроль, 3 — трансфекция клеток иРНК ZF5 с помощью олигофектамина, 4 — трансфекция клеток контрольной иРНК с помощью олигофектамина, 5 — трансфекция клеток иРНК ZF5 с помощью иРНК-фекта, 6 — трансфекция клеток контрольной иРНК с помощью иРНК-фекта, 7 — нетрансфицированные клетки. в — влияние иРНК GRP58 на экспрессию эндогенного гена FMR1 человека: 1—3 — ОТ-ПЦР иРНК GAPDH (18 циклов); 4 — маркер; 5—7 — ОТ-ПЦР иРНК GRP58 (27 циклов); 8—10 — ОТ-ПЦР иРНК FMR1 (34 цикла); 1, 5, 8 — отрицательный контроль; 3, 7, 10 — нетрансфицированные клетки; 2, 6, 9 — трансфекция клеток GRP58 иРНК с помощью иРНК-фекта.

транскрипцию FMR1 по мере возрастания числа GCC-повторов в регуляторном районе гена. Полученные нами данные поддерживают данные других исследователей о стимуляции экспрессии гена FMR1 в премутационном состоянии (об изменении характера экспрессии гена в зависимости от возрастания числа триплетных GCC-повторов) (Beilina et al., 2004). По данным этих исследователей, транскрипция гена FMR1 может происходить с трех альтернативных сайтов и сдвигается с I сайта (нормальное состояние гена) в пользу двух дистальных сайтов — II и III (состояние премутации гена). Полученные нами результаты говорят о сложном характере регуляции гена FMR1 факторами транскрипции ZF5 и CGGBP-20. Угнетающее действие ZF5 обеспечивается, вероятно, его взаимодействием с упомянутыми выше каноническими для ZF5 GC-богатыми цис-элементами (5'-GCGCGC-3'), локализованными вблизи точек инициации транскрипции гена FMR1. Взаимодействие же факторов транскрипции (ZF5 и

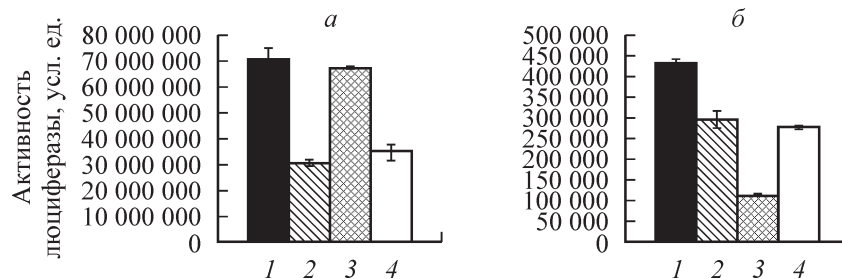


Рис. 4. Анализ векторов экспрессии *ZF5* и *CGGBP0-20* на активность вариантов 5'-регуляторной области гена *FMR1* человека (люциферазный тест).

а — клетки НерG2 трансфицировали плазмидой *pFMRluc* и котрансфицировали вариантами плазмид. *б* — клетки НерG2 трансфицировали плазмидой *pFMRGCCluc* и котрансфицировали вариантами плазмид. 1 — контроль (без котрансфекции), 2 — клетки котрансфицировали *pCMVZF5*, 3 — клетки котрансфицировали *pCMVCGG-BP20*, 4 — клетки котрансфицировали обоими векторами.

CGGBP-20) с GCC-повторами, с другой стороны, способно ослаблять эту репрессию.

В этой связи особый интерес представляет изучение мутантных аллелей гена *FMR1* и аллелей в состоянии премутации, которое предполагается провести в дальнейшем. Увеличение числа повторов может усилить их вклад в *ZF5*-опосредованную регуляцию гена *FMR1* и даже привести к инверсии результирующего влияния *ZF5* на активность промотора гена *FMR1*. Также представляют интерес полученные нами данные о кооперативном характере взаимодействий *ZF5* и *CGGBP-20*. Ранее мы показали, что для *ZF5* характерно участие в формировании функционально активных комплексов с композитными цис-элементами синергичного типа (включающими в себя несколько GCC-триплетов) на примере промотора гена рибосомного белка мыши *L32* (Орлов и др., 2006; Orlov et al., 2007). В случае 5'-регуляторной области гена *FMR1* человека наблюдается, по-видимому, аналогичная картина.

Представленные результаты свидетельствуют, таким образом, о способности описанного ранее в клетках млекопитающих транскрипционного фактора *ZF5* взаимодействовать с тандемными повторами триплетов GCC (образование соответствующих ДНК-белковых комплексов *in vitro* подтверждено методом гель-ретардации). Поскольку белок *ZF5* выявляется в клетках многих тканей млекопитающего (данные вестерн-блоттинга), имеются все основания анализировать его воздействие на триплетные GCC-повторы, содержащиеся в регуляторном районе гена *FMR1*, являющегося активно транскрибируемым в широком диапазоне различных типов клеток (O'Donnel, Wargen, 2002), включая клетки человеческой гепатомы НерG2. С помощью специфической интерферирующей РНК (РНК-и *ZF5*) мы показали, что угнетение активности экспрессии *ZF5* в клетках гепатомы вызывает стимуляцию экспрессии гена *FMR1* по меньшей мере в 1.5 раза. Это обстоятельство хотя и указывает на негативный характер регуляции экспрессии гена *FMR1* фактором транскрипции *ZF5*, не позволяет оценить вклад GC-богатых участков 5'-регуляторного района гена *FMR1* для связывания с *ZF5* (5'-GCGCGC-3' и GCC-триплеты) в регуляцию экспрессии этого гена. Ответ на этот вопрос был получен в экспериментах по котрансфекции клеток НерG2 конструкциями, содержащими ген люциферазы под контролем двух альтернативных делеционных вариантов 5'-регуляторного района гена *FMR1*, и векторами экспрессии генов двух факторов транскрипции — *ZF5* и *CGGBP-20* (*pCMVZF5* и *pCMVCGGBP-20*). Показано, что GCC-триплетные повторы (в виде GCC₃) в составе ре-

гуляторного района гена *FMR1* способны взаимодействовать как с *ZF5*, так и с *CGGBP-20*. Причем добавление GCC-триплетов в состав регуляторного района меняет характер воздействия транскрипционного фактора *ZF5* на ген *FMR1*. Уровень его репрессирующего влияния на регуляторный район гена *FMR1* снижается (возможно, в зависимости от дозы GCC-триплетов), а совместное репрессирующее воздействие *ZF5* и *CGGBP-20* в присутствии GCC-триплетов еще более нивелируется вплоть до возможности изменения вида влияния этих факторов (с репрессирующего на активирующий). Неясно, будет ли эта тенденция сохраняться при дальнейшем увеличении дозы триплетных GCC-повторов в гене *FMR1* либо меняться в зависимости от их числа.

По-видимому, целый ряд обстоятельств, включая степень повторения GCC-триплетов (возрастающая в ходе экспансии триплетов и приводящая к эффекту ломкой X-хромосомы), обуславливает характер регуляции экспрессии гена *FMR1* факторами транскрипции, связывающимися с GC-богатыми участками регуляторного района гена.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01622).

Список литературы

- Акифьев Б. Н., Диге Э. Б., Ефремов А. М., Могиленко Д. А., Олейникова Г. Н., Лапиков И. А., Жданова О. Ю., Кидготко О. В., Орлов С. В., Перевозчиков А. П. 2004. Перенос гена человеческого аполипопротеина А-I мышам методом гидродинамических инъекций: факторы, влияющие на эффективность и продолжительность экспрессии гена в печени животного. Молекуляр. биол. 38 (6) : 1076—1084.
- Горман К. 1988. Высокоэффективный перенос генов в клетки млекопитающих. В кн.: Клонирование ДНК. Методы. М.: Мир. 409—463.
- Кутейкин-Тепляков К. Б., Орлов С. В., Диге Э. Б., Перевозчиков А. П. 2003. Цис-элемент регуляции транскрипции (GCC)₈ в 5'-нетранслируемой области гена рецептора ЛПОНИ человека. Бюл. эксперим. биол. мед. 135 (5) : 552—557.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 479 с.
- Орлов С. В., Диге Э. Б., Кутейкин К. Б., Курьшиев В. Ю., Перевозчиков А. П. 1999а. Функциональная активность GCC-элемента, входящего в состав регуляторных районов ряда генов млекопитающих. Докл. РАН. 366(2) : 262—265.
- Орлов С. В., Кутейкин К. Б., Диге Э. Б., Шпакович В. М., Перевозчиков А. П. 1999б. Изучение взаимодействий ядерных

белков клеток млекопитающих с GCC-элементом, входящим в состав композитного цис-элемента промотора гена рибосомного белка мыши L32. Биохимия. 64 (2) : 255—261.

Орлов С. В., Кутейкин-Тепляков К. Б., Гришин А. В., Дижее Э. Б., Прохорчук Е. Б., Перевозчиков А. П. 2006. Транскрипционный фактор ZF5 регулирует в клетках гепатомы человека НерG2 экспрессию гена, содержащего в 5'-регуляторном районе (GCC)n-триплетные повторы. Цитология. 48 (3) : 246—252.

Перевозчиков А. П., Орлов С. В., Кутейкин К. Б. 1994. Идентификация нового GC-элемента в промоторе гена рибосомного белка мыши L32 и в 3'-концевом районе гена аполипопротеина А-I человека, способного *in vitro* к связыванию с белками клеток мыши и человека. Докл. РАН. 338 (3) : 411—415.

Andrews N. C., Faller D. V. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucl. Acids Res. 19 : 2499.

Ashley C. T. J., Warren S. T. 1995. Trinucleotide repeat expansion and human disease. Annu. Rev. Genet. 29 : 703—728.

Beilina A., Tassone F., Schwartz P. H., Sahota P., Hagerman P. J. 2004. Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. Hum. Mol. Genet. 13 : 543—549.

Bhathal H. S., Stumph W. E. 1996. Genomic and cDNA structures of the gene encoding the chicken ZF5 DNA binding protein. Biochim. biophys. acta. 1308 : 114—118.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.

Caskey C. T., Pizzuti A., Fu Y. H., Fenwick R. C., Jr., Nelson D. L. 1992. Triplet repeat mutations in human disease. Science. 256 : 784—789.

Caudy A. A., Myers M., Hannon G. J., Hammond S. M. 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. Genes Develop. 16 : 2491—2496.

Deissler H., Behn-Krappa A., Doerfler W. 1996. Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that bind specifically to the unstable tandem repeat (CGG)n in the human FMR1 gene. J. Biol. Chem. 271 : 4327—4334.

Deissler H., Wilms M., Genc B., Schmitz B., Ternes T., Naumann F., Mann M., Doerfler W. 1997. Rapid protein sequencing by tandem mass spectrometry and cDNA cloning of p20-CGGBP. A novel protein that binds to the unstable triplet repeat 5'-d(CGG)n-3' in the human FMR1 gene. J. Biol. Chem. 272 : 16 761—16 768.

Dykxhoorn D. M., Novina C. D., Sharp P. A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4 : 457—467.

Fry M., Loeb L. A. 1999. Human werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)n. J. Biol. Chem. 274 : 12 797—12 802.

Fu Y. H., Kuhl D. P., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J. S., Richards S., Verkerk A. J., Holden J. J., Fenwick R. G., Jr., Warren S. T. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell. 67 : 1047—1058.

Grabczyk E., Usdin K. 1999. Generation of microgram quantities of trinucleotide repeat tracts of defined length, interspersed pattern, and orientation. Anal. Biochem. 267 : 241—243.

Hagerman P. J., Hagerman R. J. 2004. The fragile-X premutation: a maturing perspective. Amer. J. Hum. Genet. 74 : 805—816.

Hetz C., Russelakis-Carneiro M., Walchli S., Carboni S., Vital-Knecht E., Maundrell K., Castilla J., Soto C. 2005. The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. J. Neurosci. 25 : 2793—2802.

Jones C., Penny L., Mattina T., Yu. S., Baker E., Voullaire L., Langdon W. Y., Sutherland G. R., Richards R. I., Tunnacliffe A. 1995. Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. Nature. 376 : 145—149.

Kaplan J., Calame K. 1997. The ZIN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. Nucl. Acids Res. 25 : 1108—1116.

Laemli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.

Müller-Hartmann H., Deissler H., Naumann F., Schmitz B., Schroer J., Doerfler W. 2000. The human 20-kDa 5'-(CGG)n-3'-binding protein is targeted to the nucleus and affects the activity of the FMR1 promoter. J. Biol. Chem. 275 : 6447—6452.

Nancarrow J. K., Kremer E., Holman K., Eyre H., Duggett N. A., Le Paslier D., Callen D. F., Sutherland G. R., Richards R. I. 1994. Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis. Science. 264 : 1938—1941.

Obata T., Yanagidani A., Yokoro K., Numoto M., Yamamoto S. 1999. Analysis of the consensus binding sequence and the DNA-binding domain of ZF5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 : 528—534.

O'Donnel W. T., Warren S. T. 2002. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. Annu. Rev. Neurosci. 25 : 315—338.

Orlov S. V., Kuteykin-Teplyakov K. B., Ignatovich I. A., Dizhe E. B., Mirgorodskaya O. A., Grishin A. V., Guzhova O. B., Prokhortchouk E. B., Guliy P. V., Perevozchikov A. P. 2007. Novel repressor of the human FMR1 gene — identification of p56 human (GCC)n — binding protein as a Krüppel-like transcription factor ZF5. FEBS J. 274 : 4848—4862.

Parrish J. E., Oostra B. A., Verkerk A. J., Richards C. S., Reynolds J., Spikes A. S., Shaffer G. L., Nelson D. L. 1994. Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. Nat. Genet. 8 : 229—235.

Pieretti M., Zhang F. P., Fu Y. H., Warren S. T., Oostra B. A., Caskey C. T., Nelson D. L. 1991. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. Cell. 66 : 817—822.

Schreiber E., Matthias P., Müller M. M., Schaffner W. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with «mini-extracts», prepared from a small number of cells. Nucl. Acids Res. 17 : 6419.

Smeets H. J., Smits A. P., Verheij C. E., Theelen J. P., Willemssen R., van de Burgt I., Hoogeveen A. T., Oosterwijk J. C., Oostra B. A. 1995. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. Hum. Mol. Genet. 4 : 2103—2108.

Sobek-Klocke I., Disque-Kochem C., Ronsiek M., Klocke R., Jockusch H., Breuning A., Pongstingl H., Rojas K., Overhauser J., Eichenlaub-Ritter U. 1997. The human gene ZFP161 on 18p11.21-pter encodes a putative c-myc repressor and is homologous to murine Zfp161 (Chr 17) and Zfp161-rs1 (X Chr). Genomics. 43 : 156—164.

Sugiura K., Muro Y., Nagai Y., Kamimoto T., Wakabayashi T., Ohashi M., Hagiwara M. 1997. Expression cloning and intracellular localization of a human ZF5 homologue. Biochim. biophys. acta. 1352 : 23—26.

Sutcliffe J. S., Nelson D. L., Zhang F., Pieretti M., Caskey C. T., Saxe D., Warren S. T. 1992. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. Hum. Mol. Genet. 1 : 397—400.

Tassone F., Hagerman R. J., Loesch D. Z., Lachiewicz A., Taylor A. K., Hagerman P. J. 2000. Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. Amer. J. Med. Genet. 94 : 232—236.

Uliel L., Weisman-Shomer P., Oren-Jazan H., Newcomb T., Loeb L. A., Fry M. 2000. Human Ku antigen tightly binds and stabilizes a tetrahelical form of the Fragile X syndrome d(CGG)n expanded sequence. J. Biol. Chem. 275 : 33 134—33 141.

Verkerk A. J., Pieretti M., Sutcliffe J. S., Fu Y. H., Kuhl D. P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M. F., Zhang F. P. 1991. Identification of a gene (FMR—1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell. 65 : 905—914.

Weisman-Shomer P., Naot Y., Fry M. 2000. Tetrahelical forms of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)(n) are destabilized by two heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-related telomeric DNA-binding proteins. J. Biol. Chem. 275 : 2231—2238.

THE ROLE OF ZF5 AND CGGBP-20 TRANSCRIPTION FACTORS IN EXPRESSION REGULATION OF HUMAN *FMR1* GENE RESPONSIBLE FOR X-FRAGILE SYNDROME

P. V. Gulyy,¹ S. V. Orlov,^{1,2} E. B. Dizhe,² K. B. Kuteikin-Teplyakov,^{2,3} I. A. Ignatovich,²
S. V. Zhuk,¹ A. P. Perevozchikov^{1,2,*}

¹ St. Petersburg State University, Embryology Department, ² Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, and ³ Ruhr University, Department of Neurobiochemistry, Bohum, Germany;

* e-mail: app@iem.sp.ru

The human *FMR1* gene encodes an RNA-binding protein taking part in translation regulation. The 5'-untranslated region of *FMR1* gene contains a large number of tandem repeats of GCC triplets (5—50) which increasing (more than 200) is responsible for X-fragile syndrome (human congenital anomaly). As it has been shown earlier, at least two transcription factors (ZF5 and CGGBP-20) are capable of interacting specifically with GCC-repeats in regulatory regions of some genes. In this work, their roles in *FMR1* gene expression regulation were studied. It was demonstrated by electrophoretic mobility shift assay that ZF5 recombinant protein specifically bound with GCC-triplet repeats (GCC₉). Tissue-specific distributions of ZF5 and *FMR1* proteins are very overlapped in mammalian. Inhibition of ZF5 expression in HepG2 cells (by RNA interference) leads to at least 1.5 times stimulations of *FMR1* gene expression in these cells. To estimate the contribution of GCC-triplet repeats in *FMR1* gene expression regulation we used two alternative variants of genetic construction: containing luciferase reporter gene under 5'-regulatory region fragment devoid of GCC-triplet repeats or including the GCC₉ nucleotide sequence. HepG2 cells were co-transfected by these constructions and expressions vectors of ZF5 or (and) CGGBP-20 respectively. It was found that ZF5 downregulated the activity of 5'-regulatory region of *FMR1* gene in both cases (acting probably through canonic 5'-GCGCGC3' sites). The presence of GCC-triplet repeats in the construction weakens this ZF5 effect. CGGBP-20 downregulates the activity of 5'-region of *FMR1* gene in the presence of GCC-triplets only. The data obtained evidently indicate differently directed ZF5 effects on *FMR1* gene expression and suggest the mechanism to explain the earlier demonstrated phenomenon about increasing of mRNA level in permutation *FMR1* allele carriers.

Key words: GCC-triplet repeats, X-fragile syndrome, human *FMR1* gene expression regulation, ZF5 and CGGBP-20 transcription factors.