

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОСОМ В РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГОРМОНЗАВИСИМОГО ГЕНА ТРИПТОФАНДИОКСИГЕНАЗЫ (*tdo*) КРЫСЫ ПРИ ТРАНСКРИПЦИИ IN VIVO

© Г. И. Чихиржина,^{1,*} Н. Ю. Назарова,¹ Е. В. Чихиржина,² Е. В. Романовская¹

¹ Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета

и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: chikhirzhina@mail.ru

В регуляторной области гена тканеспецифичного фермента триптофандиоксигеназы (*tdo*) в транскрипционно активном состоянии идентифицированы два гиперчувствительных к ДНКазе I участка. Один находится в положении –470, а другой — вверх по течению гена в непосредственной близости от первого. При фрагментации этой области гена микрококковой нуклеазой наблюдается нарушение периодичности разрывов ДНК и в ходе ферментативного расщепления накапливается фрагмент ДНК с большей, чем нуклеосомная, электрофоретической подвижностью. В контрольных опытах по реконструкции нуклеосомных коровых частиц *in vitro* показано, что ДНК этой области вовлекается в образование классических коровых частиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что *in vivo* в регуляторной области гена *tdo* в состоянии активной транскрипции наблюдается ремоделирование нуклеосомной структуры хроматина, сопровождающееся разрушением канонических нуклеосом. Вероятно, эти изменения в структуре хроматина отражают компетенцию гена к транскрипции и процесс транскрипции.

Ключевые слова: ген триптофандиоксигеназы (*tdo*), регуляторная область, гиперчувствительность к ДНКазе I, фрагментация микрококковой нуклеазой, ремоделирование нуклеосом *in vivo*, крыса.

Принятые сокращения: ГЧУ — гиперчувствительные к ДНКазе I участки, GR — глюкокортикоидный рецептор, MMTV LTR — длинный концевой повтор вируса опухоли молочной железы мыши, NF1 — ядерный фактор 1, связывающий консенсусную последовательность TTGGCNNNN(N)GCCAA, Oct1 — транскрипционный фактор, связывающий октамер консенсусной последовательности ATGCAAAT.

Структурные изменения (ремоделирование) хроматина регуляторной области эукариотических генов, контролируемых глюкокортикоидными гормонами, сопровождающие переход гена к активному состоянию, не изучены, а полученные результаты противоречивы. Излюбленным объектом исследователей при изучении структурных переходов хроматина этих генов служит хроматин длинного концевого повтора ретровируса опухоли молочной железы мыши (MMTV LTR), в области которого имеется промотор, контролируемый глюкокортикоидными гормонами (Hager, 1988; Hebbar, Archer, 2003a). Накоплены многочисленные данные (Чихиржина, Максимов, 2004; Чихиржина и др., 2008), которые показывают различие в организации хроматина вирусного промотора в зависимости от линий клеточных культур, в которые трансфицируется вирус или от свойств хроматиновой матрицы (транзитная или стабильная). Описаны два типа структуры хроматина вирусного промотора. В одном случае хроматин организован в виде луча позиционированных нуклеосом и ремоделирование хроматина происходит только после присоединения рецептора гормонов (Fragoso et al., 1995; Truss et al., 1995; Fletcher et al., 2000; Hebbar, Archer, 2003b, 2007; Vicent et al., 2003). В другом случае хрома-

тин конститутивно находится в открытой конформации, область регуляторных нуклеосом семейства В ремоделирована, а транскрипционные факторы NF1 (ядерный фактор 1) и Oct1 (октамерный фактор 1) связаны с регуляторными элементами в отсутствие гормона и его рецепторов (Archer et al., 1992; Mymryk et al., 1995; Kinyamu et al., 2000; Hebbar, Archer, 2007). Наряду с этим существуют многочисленные факты, демонстрирующие сохранение нуклеосом в реорганизованном виде в ходе структурных изменений хроматина регуляторных областей глюкокортикоидзависимых генов при их переходе из репрессированного в активное состояние (Truss et al., 1995; Chavez, Beato, 1997; Vicent et al., 2003). Эти противоречивые данные поднимают вопрос об адекватности выбранных модельных систем для изучения ремоделирования хроматина регуляторной области глюкокортикоидзависимых генов при их активации и соответствии молекулярных механизмов структурных переходов хроматина в модельных системах тем, которые существуют в «естественной» среде (клеточном ядре).

На основании вышеизложенного задача настоящей работы заключалась в том, чтобы определить изменения в нуклеосомной организации хроматина в области гор-

мон-чувствительного участка и соседних с ним регуляторных элементов гена триптофандиоксигеназы (*tdo*) печени (ткани-мишени глюкокортикоидов) крысы (Danesch et al., 1983) в состоянии активной транскрипции. В качестве критериев использовали гиперчувствительность к ДНКазе I и изменение нуклеосомной организации в области связывания рецептора гормонов (GR) (Danesch et al., 1987), транскрипционных факторов семейства ядерных факторов 1 (NF1) (Chikhirzhina, Chesnokov, 1990; Чихиржина и др., 1993, 1999) и фактора, узнающего консенсусную последовательность САССС (Schule et al., 1988) (рис. 1).

Материал и методика

Ткани. В работе использовали печень белых беспородных крыс-самцов массой 100—150 г, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Раполово».

Плазмиды и бактериальные клетки. ДНК-зонды выделяли из плазмиды рТО (Е-3,7), представляющей собой фрагмент гена триптофандиоксигеназы от -466-го до +3700-го нуклеотида, клонированный в вектор рUC 19 (Chikhirzhina, Chesnokov, 1990). Для получения плазмидной ДНК использовали клетки *E. coli* штамма DH5 α (генотип F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r $^-$, m $^+$) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ).

Реактивы. ДНКаза I и микрококковая нуклеаза (Sigma, США), набор для мечения ДНК дигоксигенином (Boehringer mannheim, Германия), α P 32 dATP (Amersham, Великобритания), нейлоновая мембрана для анализа уникальных геномных последовательностей Zeta-probe GT (Bio-Rad, США), набор для люминесцентной детекции (Boehringer mannheim, Германия), рестриктазы (Serva, Германия), пленка для детекции хемилюминесценции. Hyperfilm ECL (Amersham, Великобритания), химические реактивы (Serva, Германия, и Sigma, США).

Выделение ядер. Все процедуры по получению ядер (Чихиржина и др., 1999), включая центрифугирование, проводили при температуре -1—0 °С. Ядра выделяли в изотоническом растворе, содержащем 0.25 М сахарозы, 5 мМ MgCl $_2$, 25 мМ KCl и 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5 (буфер А). Для очистки ядер от цитоплазматических примесей применяли 1%-ный тритон X-100.

Реконструкция коровых нуклеосомных частиц (Чихиржина, Романовская, 1993). Реконструкцию проводили на ДНК плазмиды рТО (Е-3,7) в присутствии коровых гистонов печени крысы и полиглутамата Na как фактора сборки нуклеосом. Коровые гистоны и полиглутамат Na (в соотношении 1 : 2) инкубировали в буфере R, содержащем 150 мМ NaCl, 1 мМ дититрейтола, 20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, и 0.01%-ный Тритон X-100, в течение 1 ч при 25 °С, затем в инкубационную смесь добавляли глицерин до конечной концентрации 10 % и плазмидную ДНК (соотношение коровые гистоны:ДНК составляло 1.5 : 1) и продолжали инкубацию при той же температуре еще 3 ч.

Фрагментация хроматина и реконструированных комплексов. Исчерпывающую фрагментацию хроматина эндогенными Са $^{2+}$ -, Mg $^{2+}$ -зависимыми эндонуклеазами с образованием 80—90 % нуклеосом (Чихиржина, 1982) проводили в ядерной суспензии, содержащей 2 мМ СаCl $_2$, 5 мМ MgCl $_2$, 0.25 М сахарозы, 25 мМ KCl и 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, при 14—15 °С в

течение 8 ч. Фрагментацию хроматина микрококковой нуклеазой (Bellard et al., 1989) проводили в буфере, содержащем 1 мМ СаCl $_2$, 15 мМ NaCl, 60 мМ KCl, 15 мМ дититрейтола, 0.34 мМ сахарозы, 0.1 мМ PMSF и 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, при 37 °С в течение 10 мин из расчета 2 ед. на 1 мг ДНК. Фрагментацию реконструированных комплексов микрококковой нуклеазой проводили в буфере R с добавлением 5 мМ СаCl $_2$ при 37 °С 10 мин, из расчета 2 ед. на 1 мг ДНК в интервале времени от 45 с до 5 мин. Фрагментацию хроматина ДНКазой I проводили в буфере А при 0 °С в течение 10 мин; фрагментацию реконструированных комплексов ДНКазой I проводили в буфере R при 0 °С в течение 2 мин с варьирующей концентрацией фермента. Активность ДНКазы I проверяли на свободной суперспирализованной ДНК в тех же условиях с активностью фермента, уменьшенной примерно в 1000 раз.

Выделение ДНК из ядер печени крыс (Маниатис и др., 1984). К суспензии, содержащей ядра с фрагментированным хроматином добавляли протеиназу К до конечной концентрации 50 мкг/мл и проводили ферментативную обработку в течение ночи при 37 °С. Далее выделяли ДНК фенольно-детергентным методом с использованием РНКазы А и протеиназы К. ДНК осаждали этанолом, осадок высушивали и растворяли в буфере TE, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, и 1 мМ ЭДТА, рН 8.0.

Выделение плазмидной ДНК. Рекombинантную ДНК выделяли из клеток *E. coli*, трансформированных с применением теплового шока в присутствии ионов Са $^{2+}$, методом щелочного лизиса и очищали центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия (Маниатис и др., 1984).

Рестриктию ДНК проводили рестриктазами фирмы Serva в буферных растворах, поставляемых фирмой-изготовителем (Serva, Германия). На 1 мкг очищенной хромосомной эукариотической ДНК брали 10—20 ед. активности фермента; реакцию проводили при 37 °С в течение ночи. На 1 мкг очищенной плазмидной ДНК брали 2—5 ед. активности фермента; реакцию проводили при 37 °С в течение 3—5 ч.

Электрофорез фрагментов ДНК (Маниатис и др., 1984). Фрагменты ДНК после обработки хроматина и реконструированных комплексов нуклеазами разделяли в 2%-ном агарозном геле в буфере, содержащем 40 мМ Трис-ацетата, рН 7.6 и 2 мМ ЭДТА, при напряженности электрического поля 3—4 В/см в течение 2—3 ч.

Получение и мечение ДНК-зондов. Рестрицированную плазмидную ДНК разделяли электрофорезом в 5%-ном полиакриламидном геле в том же буфере при напряженности электрического поля 9 В/см в течение 2—3 ч. После разделения фрагменты ДНК выявляли окрашиванием в бромистом этидии. Требуемый фрагмент ДНК вырезали и элюировали из геля буфером, содержащим 0.5 М ацетата аммония, 10 мМ ацетата магния, 1 мМ ЭДТА и 0.1 % додецил-сульфата натрия, рН 8.0, в течение ночи при 37 °С. Выделенный ДНК-зонд метили с использованием наборов для мечения фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I в присутствии статистического гексануклеотидного праймера двумя способами. Для радиоактивного мечения брали α - 32 P-dATP и проводили реакцию согласно рекомендациям фирмы-производителя (Amersham, Великобритания), для нерадиоактивного — меченый дигоксигенином dUTP и проводили реакцию согласно рекомендациям фирмы-производителя (Boehringer mannheim, Германия).

Блот-гибридизация ДНК по Саузерну (Маниатис и др., 1984; рекомендации фирмы «Boehringer mannheim»). Осуществляли капиллярный перенос фрагментов ДНК после электрофореза с геля на нейлоновую мембрану Zeta-probe GT. После переноса фрагменты ДНК дополнительно фиксировали на мембране прогреванием при 120 °С в течение 30 мин. Гибридизацию меченых ДНК-зондов с ДНК, иммобилизованной на мембране, проводили в пластиковом пакете в буфере, содержащем 5-кратный SSC, 0.1%-ный додецилсульфат натрия и 1-кратный блокирующий реагент (из набора для нерадиоактивного мечения), при 68 °С в течение ночи с предварительной предгибридизацией в отсутствие ДНК-зонда в течение часа в тех же условиях. Буфер добавляли из расчета 125 мкл на 1 см², концентрация ДНК-зонда составляла около 10 нг/мл.

Детекция блотов после гибридизации. При использовании ДНК-зонда, меченного α -³²P, проводили радиоавтографию блота с использованием рентгеновской пленки. Хемилюминесцентную детекцию меченного дигоксигенином фрагмента ДНК проводили с использованием конъюгата антител к дигоксигенину (Fab-фрагменты) со щелочной фосфатазой, которые затем визуализировали связыванием с люминесцентной меткой (CSPD; Boehringer mannheim, Германия).

Результаты и обсуждение

Одним из основных критериев ремоделированного состояния хроматина эукариотических генов является присутствие гиперчувствительных к ДНКазе I участков (ГЧУ) в исследуемых областях хроматина (Reinke, Horz, 2004). Первой задачей наших исследований было изучение гиперчувствительности к ДНКазе I в регуляторной области гена триптофаноксигеназы, экспрессия которого происходит преимущественно в печени под контролем глюкокортикоидных гормонов (Danesch et al., 1983). В качестве тестируемого фрагмента выбрали фрагмент PstI-PstI размером в 3.7 т. п. н. (рис. 1). Этот фрагмент включает в себя 317 нуклеотидов кодирующей области и примерно 3400 нуклеотидов регуляторной области гена, прилегающей с 5'-стороны старта транскрипции. Наибольший интерес представляет регуляторная зона, содержащая примерно 500 нуклеотидов от стартовой точки транскрипции со стороны 5'-конца, поскольку в ней содержатся сайты связывания регуляторных белков. В качестве зонда выбран HincII-PstI-фрагмент (зонд А), с использованием которого можно определить наличие ги-

перчувствительных участков со стороны 5'-конца сайта рестрикции PstI в положении +317.

После обработки хроматина ДНКазой I в условиях увеличивающегося содержания фермента (от 25 до 100 ед. на 1 мг ДНК) и рестрикции выделенной ДНК ферментом PstI выявляются два дополнительных фрагмента меньшего размера по сравнению с тестируемым фрагментом PstI-PstI (рис. 2). Выщепление этих фрагментов ДНК свидетельствует о наличии локальной чувствительности к ДНКазе I в двух участках исследуемой области гена. Чтобы локализовать эти разрывы, использовали в качестве маркеров фрагменты гена *tdo* HincII-PstI (143 п. н.) и EcoRI-PstI (783 п. н.), выщепляемые из плазмиды pTO (E-3.7) при ее рестрикции соответствующими ферментами. Фрагменты-маркеры идентифицировали, так же как и опытные, путем гибридизации с зондом HincII-PstI. Положение одного выщепленного фрагмента совпадает с контрольным фрагментом EcoRI-PstI (783 п. н.), а второй имеет более низкую электрофоретическую подвижность. На основании этих данных можно заключить, что первый разрыв происходит в положении примерно -470, а второй находится вблизи него со стороны 5'-конца.

По данным литературы, в 5'-фланкирующей области гена *tdo* в печени крысы ранее были выявлены три ГЧУ: от -470 до -420, от -250 до -210 и от -180 до -130 нуклеотидов (Becker et al., 1984). В наших условиях эксперимента выявлялся только один участок в регуляторной области гена, соответствующий описанному в литературе. Характер разрывов ДНК отличен от приведенного в вышеупомянутой работе, в частности зона чувствительности к ферменту очень ограничена. Возможно, это связано с условиями обработки ферментом, так как Фриттон и соавторы (Fritton et al., 1983), по методу которых проводилась обработка ДНКазой I, также во многих случаях наблюдали образование локальных разрывов ДНК в хроматине регуляторной области гена лизоцима цыпленка. Не исключено, что в ходе дальнейшей обработки ферментом можно получить и дополнительные ГЧУ, и расширение зоны чувствительности к ферменту. Мы также не можем исключить вклад эндогенных ДНКаз в обнаруженные разрывы ДНК регуляторной области гена (Fritton et al., 1983).

Эти результаты свидетельствуют о том, что хроматин в области локализации последовательностей для связывания регуляторных факторов, в том числе и рецептора глюкокортикоидных гормонов, имеет достаточно «открытую» структуру в состоянии активной транскрипции. Ремоделированная структура хроматина в этой области, вероятно, отражает как изменения, связанные с компетенцией гена к транскрипции, так и изменения,

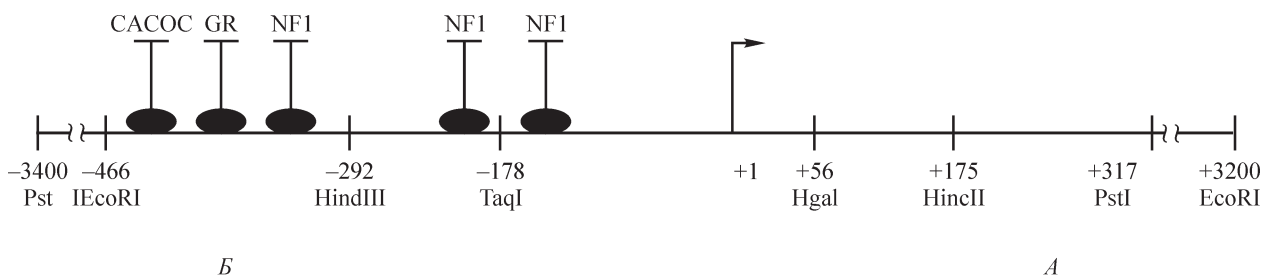
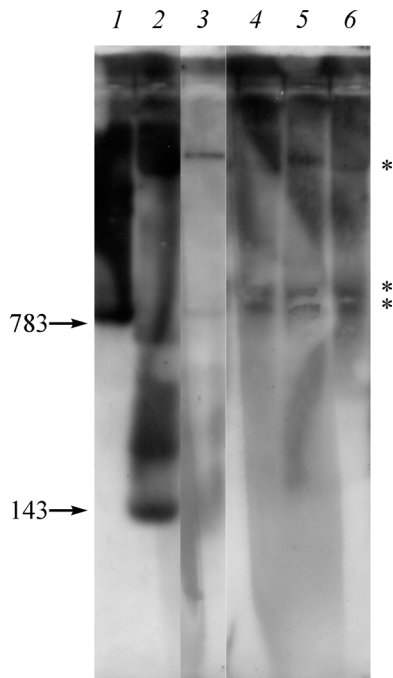


Рис. 1. Рестрикционная карта геномного фрагмента гена *tdo* крысы.

CACCC, GR и NF1 — сайты взаимодействия соответствующих белков (Danesch et al., 1987; Schule et al., 1988; Чихиржина и др., 1999). А, Б — фрагменты ДНК, используемые в качестве зондов.



сопровождающие активацию транскрипции (Becker et al., 1984). Показано также, что в ткани почек, в которых не определяется синтез мРНК триптофандиоксигеназы, не выявляется гиперчувствительное состояние хроматина в исследуемой области гена (Becker et al., 1984).

Рис. 2. Автограф ДНК, выделенной из ядер, инкубированных с ДНКазой I и рестрицированной PstI, после гибридизации с зондом HincII-PstI гена *tdo*. Ядра выделены из печени крысы.

Дорожки: 1, 2 — плазида рТО (Е-3,7), рестрицированная EcoRI-PstI и HincII-PstI соответственно; 3 — ДНК ядер, рестрицированная PstI; 4—6 — ДНК ядер, обработанных ДНКазой I (25, 50; 100 ед. на 1 мг ДНК соответственно), с последующей рестрикцией PstI. Зонд метили дигоксигенином, звездочкой отмечены тестируемый фрагмент PstI-PstI и продукты его фрагментации. Фрагменты на дорожках 1 и 2, идентифицированные после гибридизации с зондом HincII-PstI, использовали как маркеры молекулярных масс; цифры слева указаны размеры фрагментов, п. н.

Считается, что гиперчувствительное состояние в области гена, содержащей многочисленные регуляторные элементы, свидетельствует о локальной реорганизации хроматина на этом участке. Однако эти данные не дают ответа на вопрос о том, что же происходит с нуклеосомами в ходе реорганизации хроматина. Поэтому следующая часть работы посвящена выяснению судьбы нуклеосом в регуляторной области гена *tdo*. В качестве зонда использовали фрагмент EcoRI-HindIII (зонд Б). В контрольных опытах изучали распределение нуклеосом в кодирующей области гена в почках, так как в этой ткани ген *tdo* не экспрессируется (Becker et al., 1984). В этом случае использовали зонд А (HincII-PstI) из кодирующей области тестируемого гена. Оказалось, что в ткани-мишени гормонов наблюдается резкое нарушение периодичности разрывов ДНК в хроматине при фрагментации его микрококковой нуклеазой, так как распределение образующихся фрагментов ДНК носит диффузный характер (рис. 3, а). Особый интерес представляют данные о накоплении фракции

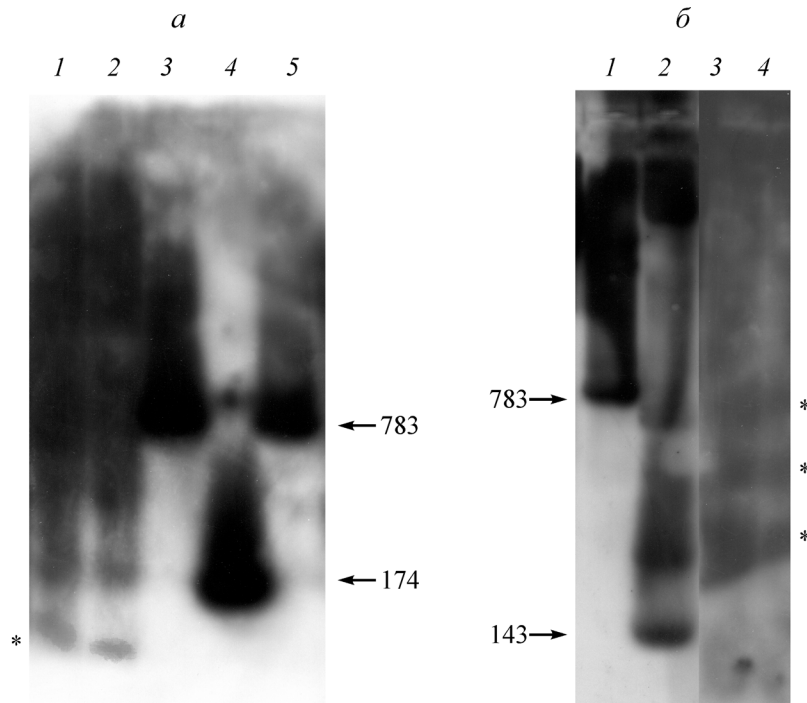


Рис. 3. Радиоавтограф ДНК ядер печени (а) и почек (б) крысы, фрагментированных микрококковой нуклеазой, после гибридизации с зондом EcoRI-HindIII и зондом HincII-PstI гена *tdo* соответственно.

а: дорожки: 1, 2 — ДНК ядер печени; 3, 5 — фрагменты HincII PstI; 4 — HincII-PstI гена *tdo*, предварительно выделенные и меченные α - 32 PdATP. Фрагменты на дорожках 3—5 использовали как маркеры молекулярных масс; цифры справа указаны размеры фрагментов, п. н.; звездочкой отмечено положение низкомолекулярного фрагмента. б: дорожки: 1, 2 — ДНК рТО (Е-3,7), рестрицированная EcoRI-PstI и HincII-PstI соответственно; 3, 4 — ДНК ядер почек. Звездочкой отмечено положение фрагментов ДНК, соответствующих ДНК моно-, ди- и тринуклеосом. Фрагменты на дорожках 1 и 2, идентифицированные после гибридизации с зондом HincII-PstI, использовали как маркеры молекулярных масс; цифры слева указаны размеры фрагментов, п. н.

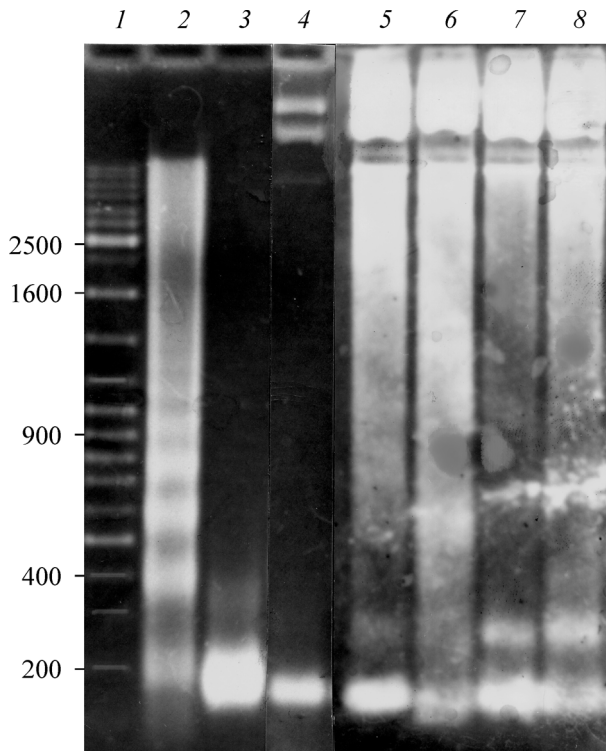


Рис. 4. Автограф ДНК после реконструкции на ней коровых частиц и последующей фрагментации микрококковой нуклеазой.

Дорожки: 1 — стандартные фрагменты ДНК, п. н.; 2 — ДНК хроматина печени крыс, фрагментированного микрококковой нуклеазой; 3 — ДНК хроматосом, полученных после исчерпывающей фрагментации хроматина печени Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимыми ДНКазами; 4 — ДНК реконструированных комплексов, фрагментированных микрококковой нуклеазой в течение 2 мин; 5—8 — ДНК реконструированных комплексов, фрагментированных микрококковой нуклеазой в течение 2, 5 и 1 мин и 45 с соответственно, после гибридизации с зондом EcoRI-HincII из регуляторной области гена *tdo*, меченным дигоксигенином; 1—4 — окрашивание бромистым этидием.

фрагментов, размеры ДНК в которой меньше, чем нуклеосомный. При ферментативном расщеплении ДНК кодирующей области гена в ткани почек, в которой этот ген не экспрессируется, выявляется спектр фрагментов ДНК, характерный для ДНК моно-, ди-, тринуклеосом (рис. 3, б). Не исключено, что образование фракции фрагментов с меньшим размером по сравнению с нуклеосомным отражает формирование энхансеосом — стереоспецифических комплексов, формирующихся на регуляторных элементах при активации гена.

Накопление низкомолекулярного фрагмента ДНК размером 130—135 п. н. из области, содержащей регуляторные элементы, при активации вирусного промотора глюкокортикоидными гормонами наблюдали также и другие исследователи в ходе ферментативного расщепления микрококковой нуклеазой хроматина, реконструированного на промоторе MMTV в ооцитах *Xenopus* (Belikov et al., 2004a, 2004b). В этом случае происходит накопление дискретного устойчивого к деградации фрагмента, происходящего из области, содержащей сайты связывания транскрипционных факторов семейства NF1 и GR. Наши результаты также согласуются с данными, полученными для другого глюкокортикоид-зависимого гена тирозинаминотрансферазы (*tat*), для которого была показана обратимая потеря двух нуклеосом в области индуцибельного гиперчувствительного к ДНКазе I участка при-

мерно в положении –2500 (Becker et al., 1987; Reik et al., 1991).

Известно, что в ряде случаев ДНК не организуется в нуклеосомы из-за особенностей ее последовательностей (Stein, 1996). Поэтому были поставлены контрольные опыты, в которых намеревались выяснить, вовлекается ли ДНК из области хроматина, чувствительной к ДНКазе I *in vivo*, в нуклеосомную организацию *in vitro*. Реконструкция *in vitro* нуклеосомных коровых частиц была проведена на EcoRI-фрагменте от –466-го до +3200-го нуклеотида гена *tdo*, содержащем регуляторную и кодирующую области (рис. 1), в составе плазмиды pTO (E-3,7). При реконструкции рекомбинантная ДНК организуется в нуклеосомы, и фрагмент гена *tdo* также вовлекается в этот процесс (рис. 4). Повторяющийся структурный элемент, образующийся при реконструкции, содержал 150 ± 10 п. н. Эти результаты полностью согласуются с данными, полученными для реконструированных частиц на фрагментах других генов с использованием системы реконструкции, аналогичной нашей или другой (Stein, 1996; Langst et al., 1999).

Фрагменты ДНК, образующиеся после расщепления реконструированных комплексов микрококковой нуклеа-

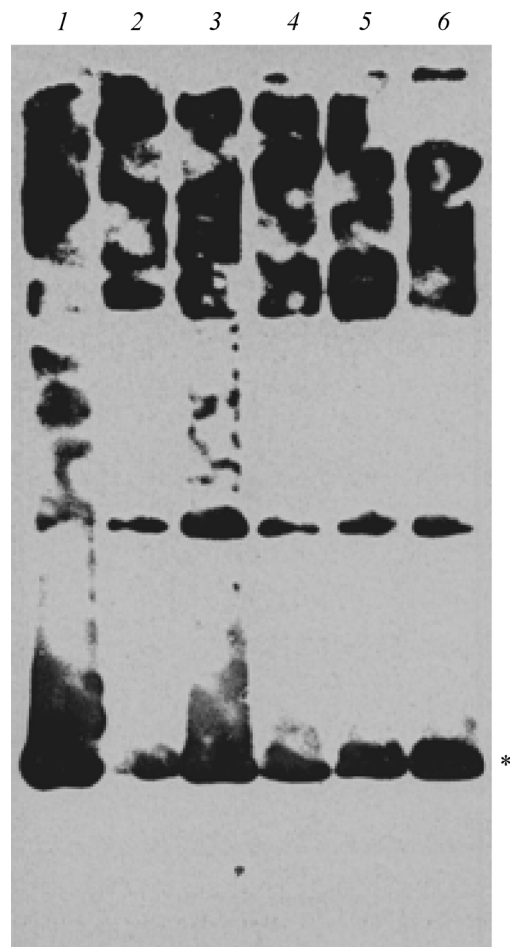


Рис. 5. Радиоавтограф ДНК реконструированных коровых частиц после обработки ДНКазой I и рестрикции EcoRI-PstI.

Дорожки: 1—6 — ДНК в отсутствие ДНКазы I и в ее присутствии в количестве 14, 28, 42, 60 и 100 ед. на 1 мкг ДНК соответственно. Гибридизация проведена с зондом А (фрагмент PstI-HincII, меченный α - ^{32}P dATP); звездочкой отмечен фрагмент EcoRI-PstI гена *tdo*, тестируемый на наличие гиперчувствительных участков.

зой, тестировали по гибридизации, так же как и в опытных пробах, с зондом Б (EcoRI-HindIII) из области, содержащей участки с высокой чувствительностью к ДНКазе I в хроматине *in vivo*. Из результатов, представленных на рис. 4, очевидно, что фрагменты ДНК, гибридизующиеся с зондом, распределялись в виде фракций, соответствующих по величине нуклеосомным и динуклеосомным фрагментам. Эти результаты позволяют сделать заключение о том, что ДНК этой области *in vitro* организуется в виде классических нуклеосомных коровых частиц. При изучении *in vitro* гиперчувствительности к ДНКазе I в области от -466-го до +317-го нуклеотида с использованием зонда А (HincII-PstI) было показано, что гиперчувствительные к ДНКазе I участки в этой области гена не выявляются после реконструкции на ней нуклеосомных коровых частиц (рис. 5).

Исходя из этого мы считаем, что гиперчувствительность к ДНКазе I и нарушение периодичности разрывов микрооккковой нуклеазой в хроматине изучаемой области гена связаны с ее функциональным состоянием, отражающим как состояние компетенции гена к транскрипции, так и процесса инициации транскрипции.

На основании анализа полученных результатов можно заключить, что регуляторная область гена *tdo*, включающая в себя сайт рестрикции EcoRI в положении -466 и прилегающие к нему участки вверх и вниз по течению гена, содержащие сайты связывания САССС-фактора, GR и NF1 (рис. 1), находится в гиперчувствительном к ДНКазе I состоянии и имеет разрушенную нуклеосомную структуру в период активной транскрипции гена в ткани-мишени глюкокортикоидных гормонов. Это согласуется с данными работ, в которых было показано, что в ходе активации глюкокортикоидными гормонами вирусного промотора MMTV LTR происходят перераспределение гистонов (Nagaich et al., 2004), удаление димеров гистонов H2A-H2B (Vicent et al., 2004) и разрушение регуляторной нуклеосомы семейства В с образованием энхансеосомы, содержащей 130—135 п. н. (Belikov et al., 2004a, 2004b).

Список литературы

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Молекулярное клонирование. М., Мир. 480 с.
- Чихиржина Г. И. 1982. Независимость нуклеолиза структурного элемента хроматина от гистона H1. Биохимия. 47 (8) : 1409—1418.
- Чихиржина Г. И., Аль-Шехадат Р. И., Чихиржина Е. В. 2008. Транскрипционные факторы семейства ядерных факторов 1 (NF1). Роль в ремоделировании хроматина. Молекул. биол. 42 (3) : 388—404.
- Чихиржина Г. И., Максимов В. Е. 2004. Структурно-функциональная организация хроматина регуляторной области генов, контролируемых глюкокортикоидными гормонами. В кн.: Нервная система. Биохимические и молекулярно-биологические основы физиологических функций. СПб.: СПбГУ. 37 : 141—161.
- Чихиржина Г. И., Романовская Е. В. 1993. Гиперчувствительность к ДНКазе I 5'-фланкирующей области гена триптофаноксигеназы в рекомбинантной ДНК и реконструированном на ней хроматине. Молекул. биол. 27 (1) : 132—142.
- Чихиржина Г. И., Романовская Е. В., Назарова Н. Ю., Федорова С. А. 1999. Взаимодействие регуляторной области гена триптофаноксигеназы с транскрипционными факторами семейства ядерных факторов 1 (NF1). Цитология. 41 (11) : 939—945.
- Чихиржина Г. И., Федорова С. А., Чесноков И. Н., Романовская Е. В. 1993. Ядерные белки, специфически связывающиеся с регуляторной областью гена триптофаноксигеназы крысы. Биохимия. 58 (3) : 392—398.
- Archer T. K., Lefevre P., Wolford R. G., Hager G. L. 1992. Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. Science. 255 : 1573—1576.
- Becker P. B., Renkawitz R., Schutz G. 1984. Tissue-specific DNase I hypersensitive sites in the 5'-flanking sequences of the tryptophan oxygenase and the tyrosine aminotransferase genes. EMBO J. 3 (9) : 2015—2020.
- Becker P. B., Ruppert S., Schutz G. 1987. Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. Cell. 51 (3) : 435—443.
- Belikov S., Astrand C., Holmqvist P., Wrangle O. 2004a. Chromatin-mediated restriction of nuclear factor 1/CTF binding in a repressed and hormone-activated promoter *in vivo*. Mol. Cell. Biol. 24 : 3036—3047.
- Belikov S., Holmqvist P., Astrand C., Wrangle O. 2004b. Nuclear factor 1 and octamer transcription factor 1 binding preset the chromatin structure of the mouse mammary tumor virus promoter for hormone induction. J. Biol. Chem. 279 : 49 857—49 867.
- Bellard M., Dretzen G., Giangrande A., Ramian P. 1989. Nuclease digestion of transcriptionally active chromatin. Methods in enzymology. — USA, Academic Press. 170 : 317—346.
- Chavez S., Beato M. 1997. Nucleosome-mediated synergism between transcription factors on the mouse mammary tumor virus promoter. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94 : 2885—2890.
- Chikhirzhina G. I., Chesnokov I. N. 1990. Nuclear liver protein interaction with the rat tryptophan oxygenase gene fragments including the DNase I hypersensitive sites «poised» for transcriptional induction. In: Nuclear structure and function. New York: Plenum Press: 421—424.
- Danesch U., Gloss B., Schmid W., Schutz G., Schule R., Renkawitz R. 1987. Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements. EMBO J. 6 : 625—630.
- Danesch U., Hashimoto S., Renkawitz R., Schutz G. 1983. Transcriptional regulation of the tryptophan oxygenase gene in rat liver by glucocorticoids. J. Biol. Chem. 258 : 4750—4753.
- Fletcher T. M., Ryu B., Baumann C. T., Warren B. S., Fragoso G., John S., Hager G. L. 2000. Structure and dynamic properties of a glucocorticoid receptor-induced chromatin transition. Mol. Cell. Biol. 20 : 6466—6475.
- Fragoso G., John S., Roberts M. S., Hager G. L. 1995. Nucleosome positioning on the MMTV LTR results from the frequency-biased occupancy of multiple frames. Genes Develop. 9 : 1933—1947.
- Fritton H. P., Sippel A. E., Igo-Kemenes T. 1983. Nuclease-hypersensitive sites in the chromatin domain of the chicken lysozyme gene. Nucl. Acids Res. 11 : 3467—3485.
- Hager G. L. 1988. MMTV as a model for gene expression in mammary tissue. Cancer Treat. Res. 40 : 267—281.
- Hebbar P. B., Archer T. K. 2003a. Nuclear factor 1 is required for both hormone-dependent chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter. Mol. Cell. Biol. 23 : 887—898.
- Hebbar P. B., Archer T. K. 2003b. Chromatin remodeling by nuclear receptors. Chromosoma. 111 : 495—504.
- Hebbar P. B., Archer T. K. 2007. Chromatin-dependent cooperativity between site-specific transcription factors *in vivo*. J. Biol. Chem. 282 : 8284—8291.
- Kinyamu H. K., Fryer C. J., Horwitz K. B., Archer T. K. 2000. The mouse mammary tumor virus promoter adopts distinct chromatin structures in human breast cancer cells with and without glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 275 : 20 061—20 068.
- Langst G., Bonte E. J., Corone D. F. V., Becker P. B. 1999. Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. Cell. 97 : 843—852.
- Мымрык J. S., Berard D., Hager G. L., Archer T. K. 1995. Mouse mammary tumor virus chromatin in human breast cancer cells is constitutively hypersensitive and exhibits steroid hormone-independent loading of transcription factors *in vivo*. Mol. Cell. Biol. 15 : 26—34.

Nagaich A. K., Walker D. A., Wolford R., Hager G. L. 2004. Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol. Cell.* 14 : 163—174.

Reik A., Schutz G., Stewart A. F. 1991. Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. *EMBO J.* 10 (9) : 2569—2576.

Reinke H., Horz W. 2004. Anatomy of a hypersensitive site. *Biochim biophys Acta.* 1677 : 24—29.

Schule R., Muller M., Otsuka-Murakami H., Renkawitz R. 1988. Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. *Nature.* 332 : 87—90.

Stein A. 1996. Signals in eukaryotic DNA promote and influence formation of nucleosome arrays. *Progress in nucleic acid research and molecular biology.* 54 : 333—381.

Truss M., Bartsch J., Schelbert A., Hache R. J., Beato M. 1995. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J.* 14 : 1737—1751.

Vicent G. P., Koop R., Beato M. 2003. Complex role of histone H1 in transactivation of MMTV promoter chromatin by progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83 : 15—23.

Vicent G. P., Nacht A. S., Smith C. L., Peterson C. L., Dimitrov S., Beato M. 2004. DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol. Cell.* 16 : 439—452.

Поступила 5 XII 2009

NUCLEOSOME REMODELING ON THE REGULATORY REGION OF THE RAT TRYPTOPHAN DIOXYGENASE (*tdo*) GENE DURING TRANSCRIPTION *IN VIVO*

G. I. Chikhirzhina,¹ * N. U. Nazarova,¹ E. V. Chikhirzhina,² E. V. Romanovskaya¹

¹ St. Petersburg State University, Department of Biochemistry,
and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
* e-mail: chikhirzhina@mail.ru

Two DNase I-hypersensitive regions are identified on the regulatory region of the rat tryptophan dioxygenase (*tdo*) gene which is expressed tissue-specifically under control of glucocorticoid hormones. DNase I-hypersensitive regions are identified in position –470 and in the vicinity of the first upstream gene. Micrococcal nuclease digestion pattern of this region shows disturbances in the regular cleavage and appearance of shorter DNA molecules than nucleosomal DNA. However the control experiments demonstrate that the same DNA region could be involved in the regular nucleosome core particles under *in vitro* reconstitution. Taken together, these data show that the nucleosome array in the regulatory region of the actively transcribed *tdo* gene *in vivo* is disturbed.

Key words: the regulatory region of the rat tryptophan dioxygenase (*tdo*), DNase I-hypersensitive regions, micrococcal nuclease digestion pattern, nucleosome remodeling *in vivo*.