

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНА *OCT4* (*POU5F1*) ЧЕРЕЗ ЕГО ДИСТАЛЬНЫЙ ЭНХАНСЕР

© И. Б. Назаров, В. А. Красноборова, А. Г. Миттенберг,
Е. В. Чихиржина, А. П. Давыдов-Синицын, М. А. Лисковых, А. Н. Томили

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: *i_naz@mail.ru*, *antom@mail.cytspb.rssi.ru*

Исследования регуляции экспрессии гена *Oct4* в эмбриональных стволовых клетках мыши выявили ключевой элемент — дистальный энхансер (ДЭ). ДЭ состоит из двух функциональных элементов — ДЭа и ДЭб. Оба элемента ДЭ необходимы для полноценной экспрессии *Oct4* в плюрипотентных клетках. Наиболее вероятным кандидатом на связывание с участком ДЭб является сам белок *Oct4*, гетеромеризованный с Sox2. К настоящему времени остается невыясненным, какие транскрипционные белки связываются с участком ДЭа и каким образом осуществляется кооперация между ДЭа и ДЭб. Благодаря использованию биотинилированных олигонуклеотидов нами был налажен чувствительный метод гель-ретардации ДНК-белковых комплексов. С помощью этого метода и методов хроматографического фракционирования белков в экстрактах эмбриональных стволовых клеток и тканей мыши были определены белки, специфически взаимодействующие с последовательностью ДЭа гена *Oct4*.

Ключевые слова: *Oct4*, дистальный энхансер, регуляция транскрипции.

Принятые сокращения: ДЭ — дистальный энхансер, ЭС — эмбриональные стволовые, ПЭ — проксимальный энхансер, ПП — проксимальный промотор.

Oct4 является одним из основных транскрипционных факторов, необходимых для поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых (ЭС) клеток. Среди группы транскрипционных факторов, используемых для создания индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, *Oct4* оказался единственным из всех необходимых фактором (Takahashi, Yamanaka, 2006; Maherali, Hochedlinger, 2008).

Экспрессия гена *Oct4* подвергается довольно сложной регуляции. Понижение концентрации *Oct4* на 50 % ведет к запуску дифференцировки стволовых клеток в трофобласты. Повышение его концентрации в 2 раза также приводит к дифференцировке, но уже в примитивную эндодерму и мезодерму (Niwa et al., 2000).

Сайт инициации транскрипции гена *Oct4* содержит 3 регуляторных элемента — ДЭ, проксимальный энхансер (ПЭ) и проксимальный промотор (ПП) (Okazawa et al., 1991; Minucci et al., 1996; Yeom et al., 1996). Активность энхансеров зависит от стадии развития мышечного эмбриона. ДЭ управляет экспрессией *Oct4* во внутренней клеточной массе, в ЭС клетках и у предшественников половых клеток, а ПЭ активирует экспрессию в клетках эпибласта (Pesce, Scholer, 2001; Chambers, Smith, 2004; Voiani, Scholer, 2005). Эти три элемента служат мишенями для связывания регуляторных белков, а на более поздних стадиях развития эмбриона — метилирования ДНК. Метилирование ДНК этих элементов отражает транскрипционный статус *Oct4*. В ЭС-клетках они не метилированы, но метилированы в соматических клетках, где

Oct4 не экспрессируется. В течение дифференцировки в ЭС клетках за метилирование ДНК ответственны *de novo* ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b (Li et al., 2007), которые в свою очередь находятся под контролем микроРНК (miR-290—miR-295), а также репрессора транскрипции Rbl2 (Sikkonen et al., 2008). Во время дедифференцировки соматических клеток и достижения ими плюрипотентности *Oct4* становится активно одновременно с деметилированием ДНК (Byrne et al., 2003; Kimura et al., 2004; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007).

При дифференцировке ЭС клеток мыши в области ПП гена *Oct4* происходит изменение посттрансляционных модификаций некоторых гистонов. Маркеры активных генов (H3K9ac, H3K14ac и H3K4me) заменяются на маркеры неактивных (H3K9me2 и H3K9me3) (Feldman et al., 2006). Метилирование лизинов в свою очередь привлекает белок гетерохроматина 1 (HP1), формирование гетерохроматина и полный сайленсинг *Oct4*. Из ферментов, необходимых в процессе метилирования гистонов, наиболее известна метилтрансфераза G9a (Tachibana et al., 2002; Feldman et al., 2006; Kellner, Kikyo, 2010).

Комплекс Paf1 связывается с ПП локуса гена *Oct4*, но исчезает во время дифференцировки ЭС клеток. Нокдаун каждой из 5 субъединиц комплекса угнетает мРНК *Oct4* и индуцирует дифференцировку ЭС клеток. Наоборот, усиленная экспрессия субъединиц комплекса Paf1 поддерживает экспрессию *Oct4* и блокирует дифференцировку ЭС клеток (Ding et al., 2009; Kellner, Kikyo, 2010).

Первые данные об активации генов последовательностями, удаленными от промоторов, появились около 30 лет назад (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981). Вопреки определенным успехам в понимании разнообразия и сложности функционирования дистальных регуляторных элементов сейчас становится ясно, что большинство основных вопросов далеко от своего разрешения. По некоторым оценкам, в регуляции нескольких десятков тысяч генов в геноме млекопитающих может участвовать до 1 млн энхансеров (Bulger, Croudine, 2010). Энхансеры составляют первичную основу не только при дифференциации клеток, но и имеют ключевое значение в поддержании плюрипотентности стволовых клеток, механизмах многих заболеваний и эволюции. Энхансеры участвуют во взаимосвязи транскрипции, структурных и эпигенетических изменений хроматина, некодирующих РНК и ядерных органелл (Bulger, Croudine 2011; Palstra, Grosfeld, 2012).

ДЭ гена *Oct4* мыши состоит из двух функциональных элементов — ДЭа и ДЭб (Site 2A и Site 2B), и оба необходимы для полноценной экспрессии гена *Oct4* в плюрипотентных клетках. Наиболее вероятными кандидатами на связывание с участком ДЭб является сам белок Oct4, гетеромеризованный с Sox2 (Okumura-Nakanishi et al., 2005). Последовательность CCCCTCCCCC (рис. 1) сайта ДЭа была впервые идентифицирована по специфической устойчивости к химическим модификациям *in vivo* в ЭС клетках, экспрессирующих Oct4 (Minucci et al., 1996). Позднее было продемонстрировано, что делеции в области ДЭа на 50—70 % сокращают активность энхансера, если они локализованы именно в сайте ДЭа, и не влияют на активность, если расположены за пределами сайта ДЭа (Okumura-Nakanishi et al., 2005). Однако серии мутаций в последовательности ДЭа не выявили влияния на активность ДЭ (Okumura-Nakanishi et al., 2005). На важную роль ДЭа указывает также высокий консерватизм этой последовательности, обнаруженный в генах *Oct4* человека, мыши и быка (Nordoff et al., 2001).

В настоящее время остается невыясненным, какие транскрипционные белки связываются с участком ДЭа и каким образом осуществляется кооперация между ДЭа и ДЭб. Задача настоящей работы — выделение и определение специфичности белков, взаимодействующих с ДЭа.

Материал и методика

Получение экстрактов. Исследуемые клетки и ткани промывали с помощью PBS на льду. Для получения экстрактов клетки или ткани гомогенизировали с помощью гомогенизатора Даунса в 2 объемах буфера следующего состава: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 % глицерина, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 5 mM ДТТ, содержащего 1-кратный коктейль ингибиторов протеаз (Complete Roche, Германия). Гомогенаты центрифугировали при 14 000 g в течение 10 мин. Супернатанты собирали и хранили при -70°C .

Гель-ретардация. 90 фемтомолей (2 нг) биотинилированной ДНК-пробы смешивали с 3 мкл белкового образца в 15 мкл 10 mM Tris-HCl-буфера, pH 7.6, содержащего 10 % глицерина, 0.14 M NaCl, 0.5 mM ЭДТА, 0.05 % Тритона X-100, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BCA), 0.1 мг/мл poly(dI-dC) (Amersham, Германия), 5 mM ДТТ, 1-кратный коктейль ингибиторов протеаз (Complete Roche, Германия), и инкубировали 20 мин

при комнатной температуре. Затем образцы разделяли электрофоретически в 6%-ном полиакриламидном геле, приготовленном на 0.5-кратном TBE, и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали в 2.5%-ном растворе БСА, приготовленном на PBS, в течение 30 мин, инкубировали 1 ч при комнатной температуре в присутствии конъюгата Streptavidin-HRP (Sigma, США) при разведении 1 : 20 000 буфером для блокирования. После этого мембрану отмывали 30 мин в буфере для блокирования, дважды по 30 мин в PBST (PBS, содержащий 0.2%-ный Tween 20) и 10 мин в PBS. Визуализацию хемилюминесцентных сигналов на мембране осуществляли с помощью SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США) на приборе ChemiDoc XRC (Bio Rad, США). Интенсивность сигналов определяли при помощи денситометрирования, используя программу Quantity One.

Распределительная хроматография экстракта мозга мыши на колонке фенол-сефарозы. Колонка 8×0.8 см Phenyl Sepharose CL 4B (Pharmacia, Швеция) была уравновешена с помощью 50 mM Tris-HCl-буфера, pH 8.0, содержащего 0.5 M NaCl, 1 mM ЭДТА и 5 mM ДТТ. Элюцию вели в 70 мл буфера с линейным градиентом концентраций NaCl (от 0.5 до 0.1 M) и этиленгликоля (от 0 до 50 %). Скорость элюции составляла 3 мл/ч, объем фракций — 2 мл.

Результаты и обсуждение

Благодаря использованию нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов нами был налажен чувствительный метод гель-ретардации комплексов ДНК—белок. Для этого были получены 5'-биотинилированные олигонуклеотиды. После отжига, элонгации и очистки двухцепочечных фрагментов были отработаны условия реакции связывания, переноса и визуализации сигналов. Последовательности ДНК, используемые в работе, представлены на рис. 1. На рисунке показаны немеченные фрагменты ДНК дикого типа (ДЭа) и трех мутантных фрагментов ДНК — ДЭа м1, ДЭа м2 и ДЭа м3. Мутантные фрагменты применяли для установления специфичности взаимодействия с белком.

На рис. 2 показано образование устойчивого комплекса белков экстракта ЭС клеток мыши с биотин-ДЭа. В левой части рисунка представлена оценка минимально-

ДЭа :	GATCTAGCCCGACCCCTGcccctccccAGGATC CTAGATCGGGCTGGGACggggagggggTCCTAG
ДЭа м1 :	GATCTAGCCCGACCCCTGcaaagaaaaccAGGATC CTAGATCGGGCTGGGACgtttcttttggTCCTAG
ДЭа м2 :	GATCTAGCCCGAAAAAGaccctccccAGGATC CTAGATCGGGCTTTTCTggggagggggTCCTAG
ДЭа м3 :	GATCTAGCCCGACCCCTGcccctaaaaaAGGATC CTAGATCGGGCTGGGACggggatTTTTTCCTAG

Рис. 1. Последовательности ДНК, используемые в работе.

ДЭа — последовательность дикого типа. Дистальный энхансер гена *Oct4* выделен *строчными буквами*. ДЭа м1, ДЭа м2 и ДЭа м3 — последовательности с внесенными мутациями. Мутации выделены *подчеркиванием*.

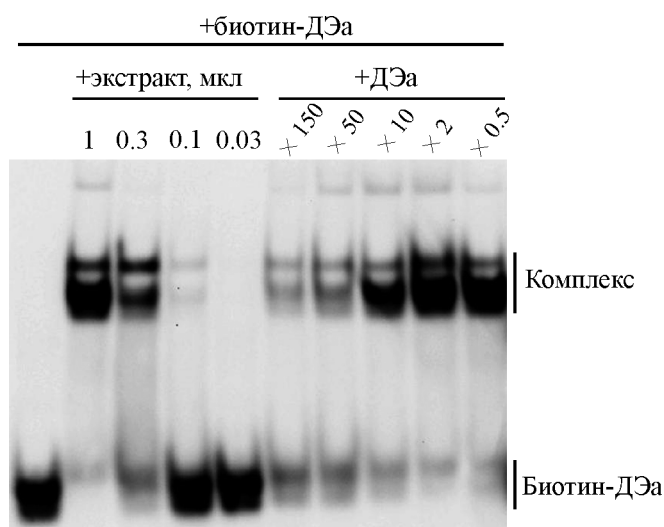


Рис. 2. Результаты титрования для выявления минимального количества экстракта ЭС клеток мыши, необходимого для визуализации комплекса между биотинилированным олигонуклеотидом ДЭа (+ биотин-ДЭа) и белками экстракта (слева), и результаты гель-ретардации, показывающие снижение образования комплекса при добавлении в реакцию немеченого ДЭа (+ ДЭа) от 0.5- до 150-кратного молярного избытка (справа).

го количества белкового экстракта, необходимого для образования хорошо видимого комплекса. Как видно на рис. 2, чтобы связать в комплекс всю ДНК (биотин-ДЭа), внесенную в реакционную смесь (2 нг), достаточно около 0.3 мкл (или 1 мкг тотального белка) экстракта ЭС клеток. Это говорит о высоком содержании белков, взаимодействующих с ДЭа. Кроме этого, можно отметить образование не менее двух комплексов, различающихся по электрофоретической подвижности. Правая часть рисунка иллюстрирует конкурентное вытеснение из комплекса меченой ДНК-пробы. Было достаточно 50-кратного избытка холодного ДЭа, чтобы почти полностью вытеснить биотин-ДЭа. Это подтверждает специфичность взаимодействия последовательности ДЭа и белков.

При исследовании белков, участвующих в работе ДЭ гена *Oct4*, методом гель-ретардации ранее было показано, что сайт ДЭа взаимодействует с белком, присутствующим как в ЭС клетках D3, так и в клетках NIH 3T3 (Okumura-Nakanishi et al., 2005). Таким образом, специфичности взаимодействия с белками только из экстрактов ЭС клеток, характерной для сайта ДЭб, в случае взаимодействия с сайтом ДЭа не было. На основе этих данных нами было сделано предположение о том, что белки, взаимодействующие с ДЭа, экспрессируются как в ЭС клетках, так и в дифференцированных клетках тканей взрослого организма. Для проверки этого предположения были получены и протестированы экстракты некоторых тканей взрослых мышей на взаимодействие с ДЭа методом гель-ретардации. На рис. 3 представлены результаты этого тестирования. Как видно из рисунка, во всех случаях наблюдалось образование комплексов, связывающих ДЭа, характерных для ЭС клеток. Исходя из этого можно полагать, что сайт ДЭа взаимодействует с одинаковым белком (белками), экспрессирующимся как в ЭС, так и в дифференцированных клетках. По-видимому, это необходимо для осуществления функции, характерной для всех типов клеток. Этой функцией, например, может

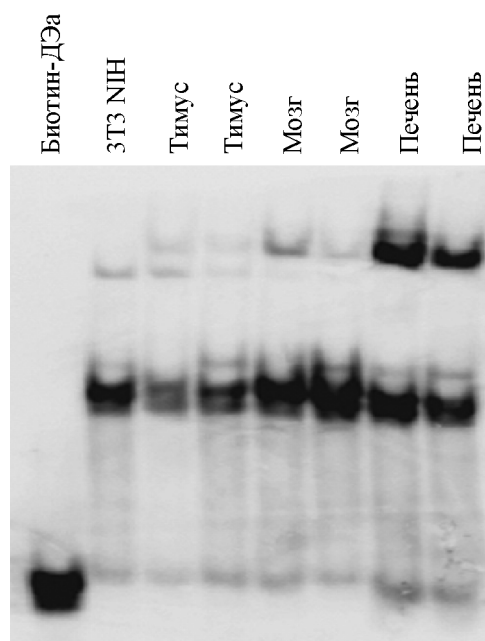


Рис. 3. Присутствие белков, взаимодействующих с ДЭа, в экстрактах дифференцированных клеток (клетки 3T3 NIH) и тканей мыши: тимусе, мозге и печени (по два образца экстрактов тканей, полученных от разных животных).

быть взаимодействие с конститутивными структурами хроматина, необходимыми для регуляции транскрипции данного гена.

Для последующего исследования свойств и идентификации белков комплекса была проведена хроматографическая очистка белков, взаимодействующих с ДЭа. Из ряда хроматографических процедур метод распределительной хроматографии позволил получить высокую эффективность очистки и давал значительно более высокий количественный выход исследуемых белков по сравнению с другими методами. В результате распределительной хроматографии экстракта мозга мыши были получены две белковые фракции, способные к образованию комплексов с ДЭа (f27 и f33, рис. 4). Элюция f27 происходила при 0.22 M NaCl и 35%-ной концентрации этиленгликоля, а f33 — при 0.13 M NaCl и 43%-ной концентрации этиленгликоля. В процессе поиска эффективных методов очистки белков, связывающихся с ДЭа, нами были апробированы два других метода колоночной хроматографии — гель-фильтрация на колонке биогеля Р-200 (Bio Rad, США) и ионообменная хроматография на колонке DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Швеция). Гель-фильтрация не была достаточно эффективной для очистки исследуемых белков, однако этот метод позволял судить о размере белков (или их комплексов). Мол. масса белков составляла от 40 до 85 кДа. Ионообменная хроматография на колонке DEAE-сефарозы значительно уступала распределительной хроматографии в эффективности, и разделения на фракции, различающиеся по электрофоретической подвижности, не наблюдали.

С целью подтверждения специфичности взаимодействия исследовали взаимодействие биотин-ДЭа и выделенных фракций белков в присутствии 200-кратного избытка немеченых фрагментов ДЭ с внесенными мутациями (рис. 1, 5). При взаимодействии фракции f33 с биотин-ДЭа в присутствии избытка ДЭа ml наблюдали

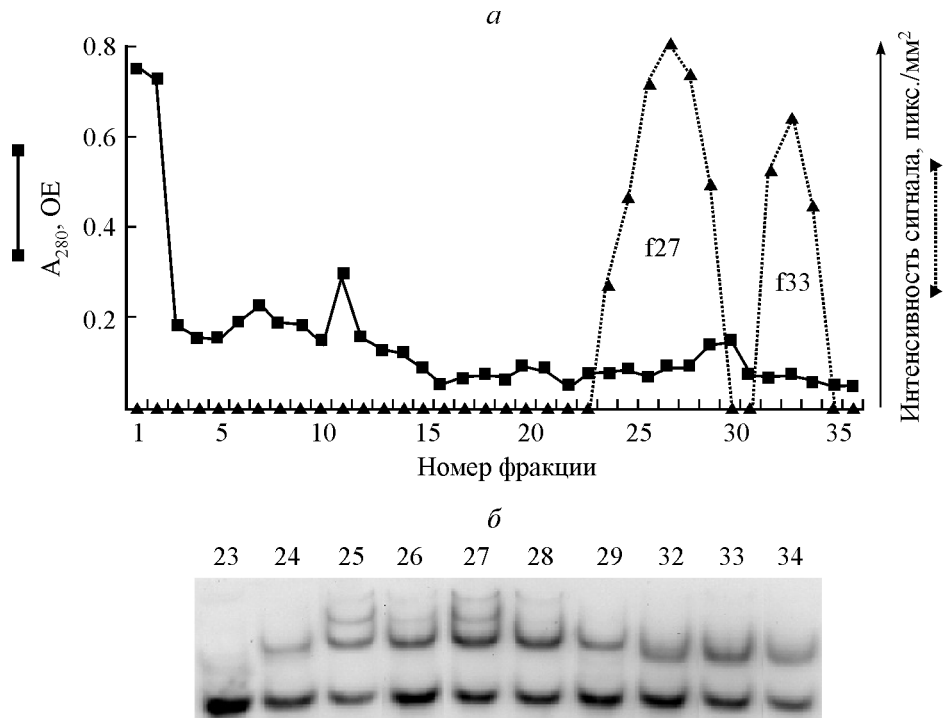


Рис. 4. Распределительная хроматография экстракта мозга мыши на колонке фенол-сефарозы CL-4В (Pharmacia, Швеция). *a* — хроматограмма; элюцию проводили в 70 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера, pH 8.0, содержащего 1 мМ EDTA и 5 мМ DTT, с линейным градиентом концентраций NaCl (от 0.5 до 0.1 М) и этиленгликоля (от 0 до 50 %); f27 и f33 — названия пиков, содержащих белки, специфически взаимодействующих с ДЭа. *б* — гель-ретардация соответствующих фракций.

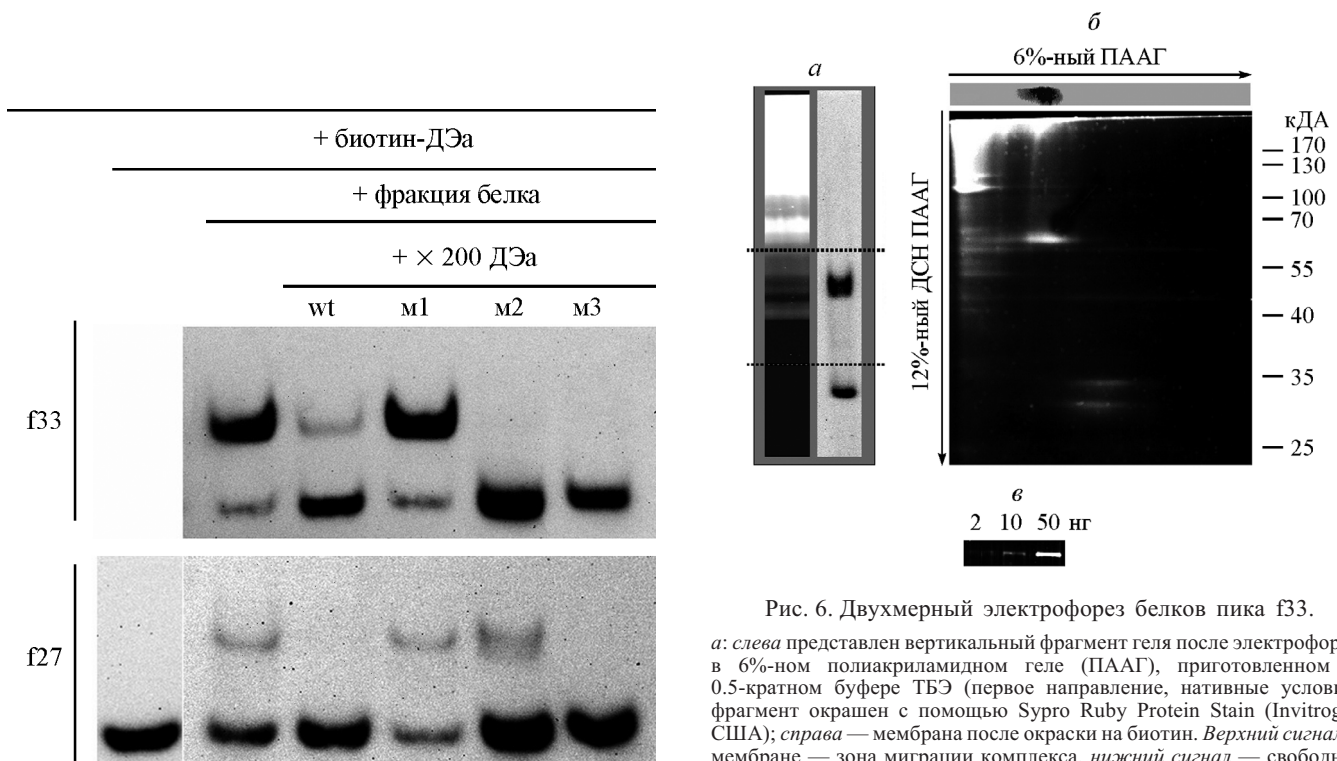


Рис. 5. Гель-ретардация комплекса с биотинилированным ДЭа в присутствии 200-кратного избытка немеченых олигонуклеотидов с последовательностью дикого типа (wt) и измененными (m1, m2 и m3) последовательностями ДЭа.

Видно, что мутация m1 приводит к элиминации ингибирования образования комплекса с биотинилированным ДЭа в присутствии f33 и f27, а мутация m2 — только в присутствии f27.

Рис. 6. Двухмерный электрофорез белков пика f33. *a*: слева представлен вертикальный фрагмент геля после электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), приготовленном на 0.5-кратном буфере ТБЭ (первое направление, нативные условия); фрагмент окрашен с помощью Sypro Ruby Protein Stain (Invitrogen, США); справа — мембрана после окраски на биотин. Верхний сигнал на мембране — зона миграции комплекса, нижний сигнал — свободный ДЭа. Пунктирными линиями обозначены места отреза геля, содержащего комплекс. Вырезанный фрагмент геля использовали в электрофорезе второго направления. *б*: сверху — мембрана, демонстрирующая сигнал на биотин, указывающий локализацию комплекса; ниже представлен гель после электрофореза во втором направлении в 12%-ном ПААГ в присутствии ДСН; окраска с помощью Sypro Ruby Protein Stain; стрелкой указан сигнал от белка-кандидата, образующего комплекс с ДЭа. *в* — количественная оценка, показан фрагмент геля второго направления с сигналами от 2, 10 и 50 нг БСА.

полное ингибирование конкурентного влияния на комплекс, тогда как все другие варианты мутаций в конкурирующей ДНК подавляли взаимодействие. В случае взаимодействия фракции f27 с биотин-ДЭа ингибирование конкурентных свойств проявлялось уже в двух случаях — при внесении ДЭа m1 и ДЭа m2. По этим результатам можно заключить, что для взаимодействия с белком фракции f27 важны левая и центральная части сайта ДЭа и около пяти пар оснований слева от ДЭа, тогда как для белка фракции f33 важны левая и центральная части ДЭа.

Из фракции белков f33 в результате двухмерного электрофореза, проведенного в нативных условиях в первом направлении, и в денатурирующих условиях во втором направлении, удалось выделить и окрасить белок, по гомогенности и количеству удовлетворяющий проведение его идентификации с помощью масс-спектрометрии (рис. 6). Белок-кандидат, взаимодействующий с ДЭа, указан на рисунке стрелкой. Этот белок удовлетворял всем предъявленным требованиям. Во-первых, по результатам электрофореза, его мол. масса составила 60—70 кДа, что соответствовало диапазону мол. масс по результатам гель-фильтрации — от 40 до 85 кДа. Во-вторых, зона миграции комплекса и данного белка в первом направлении практически совпадала. В-третьих, количество белка, рассчитанное на основе количества ДНК, мигрирующей в комплексе, составляло не менее 200 нг. Ввиду того что никаких других белков в таких количествах не наблюдали в зоне миграции комплекса, этот белок был единственным, удовлетворяющим данному требованию.

Список литературы

- Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. 1981. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*. 27 : 299—308.
- Boiani M., Scholer H. R. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 : 872—884.
- Bulger M., Groudine M. 2010. Enhancers: the abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Dev. Biol.* 339 : 250—257.
- Bulger M., Groudine M. 2011. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. 144 : 327—339.
- Byrne J. A., Simonsson S., Western P. S., Gurdon J. B. 2003. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr. Biol.* 13 : 1206—1213.
- Chambers I., Smith A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 23 : 7150—7160.
- Ding L., Paszkowski-Rogacz M., Nitzsche A., Slabicki M. M., Heninger A. K., de Vries I., Kittler R., Junqueira M., Shevchenko A., Schulz H., Hubner N., Doss M. X., Sachinidis A., Heschler J., Iacone R., Anastassiadis K., Stewart A. F., Pisabarro M. T., Caldarelli A., Poser I., Theis M., Buchholz F. 2009. A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. *Cell Stem Cell*. 4 : 403—415.
- Feldman N., Gerson A., Fang J., Li E., Zhang Y., Shinkai Y., Cedar H., Bergman Y. 2006. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 8 : 188—194.
- Kellner S., Kikyo N. 2010. Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol. Histopathol.* 25 : 405—412.
- Kimura H., Tada M., Nakatsuji N., Tada T. 2004. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 5710—5720.
- Li J. Y., Pu M. T., Hirasawa R., Li B. Z., Huang Y. N., Zeng R., Jing N. H., Chen T., Li E., Sasaki H., Xu G. L. 2007. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol. Cell. Biol.* 27 : 8748—8759.
- Maherali N., Hochedlinger K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 3 : 595—605.
- Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchiew J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 1 : 55—70.
- Minucci S., Botquin V., Yeom Y. I., Dey A., Sylvester I., Zand D. J., Ohbo K., Ozato K., Scholer H. R. 1996. Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy *in vivo*. *EMBO J.* 15 : 888—899.
- Moreau P., Hen R., Wasyluk B., Everett R., Gaub M. P., Chambon P. 1981. The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acids Res.* 9 : 6047—6068.
- Niwa H., Miyazaki J., Smith A. G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24 : 372—376.
- Nordhoff V., Hubner K., Bauer A., Orlova I., Malapetsa A., Scholer H. R. 2001. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm. Genome*. 12 : 309—317.
- Okazawa H., Okamoto K., Ishino F., Ishino-Kaneko T., Takeda S., Toyoda Y., Muramatsu M., Hamada H. 1991. The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J.* 10 : 2997—3005.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448 : 313—317.
- Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280 : 5307—5317.
- Palstra R. J., Grosveld F. 2012. Transcription factor binding at enhancers: shaping a genomic regulatory landscape in flux. *Front. Genet.* 3 : 195.
- Pesce M., Scholer H. R. 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 19 : 271—278.
- Sinkkonen L., Hugenschmidt T., Berninger P., Gaidatzis D., Mohn F., Artus-Revel C. G., Zavolan M., Svoboda P., Filipowicz W. 2008. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 : 259—267.
- Tachibana M., Sugimoto K., Nozaki M., Ueda J., Ohta T., Ohki M., Fukuda M., Takeda N., Niida H., Kato H., Shinkai Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Develop.* 16 : 1779—1791.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 : 663—676.
- Yeom Y. I., Fuhrmann G., Ovitt C. E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hubner K., Scholer H. R. 1996. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*. 122 : 881—894.

INVESTIGATION OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF *OCT4* (*POU5F1*) GENE
WITH DISTAL ENHANCER

*I. B. Nazarov, V. A. Krasnoborova, A. G. Mittenberg, E. V. Chikhirzhina,
A. P. Davidov-Sinitzin, M. A. Liskovykh, A. N. Tomilin*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: i_naz@mail.ru, antom@mail.cytspb.rssi.ru

Investigations of transcriptional regulation of *Oct4* gene in mouse embryonic stem cells have revealed an important cis-element — the distal enhancer (DE). DE consists of two functionally significant elements — DEa and DEb. Both elements are necessary to complete the DE-mediated expression of *Oct4* gene in pluripotent cells. The most likely candidates for the binding site DEb are Oct4 itself in complex with Sox2 protein. It remains unclear which transcriptional proteins bind to the DEa site and what is the mechanism of the co-operation between the DEa and the DEb. Through the use of using the EMSA and chromatographic fractionation of proteins from extracts of mouse embryonic stem cells and mouse tissues, were isolated proteins specifically interacting with the sequence DEa *Oct4* gene.

Key words: Oct4, a distal enhancer, the regulation of transcription.
