

На правах рукописи



ОРЛОВСКИЙ Игорь Вячеславович

**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ И ПОСТТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной эндокринологии (до 2004г. – лаборатория гормонов и рецепторов) Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор

Рубцов Петр Михайлович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Лебедев Юрий Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, руководитель лаборатории сравнительной и функциональной геномики

Эльдаров Михаил Анатольевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр "Биоинженерия" Российской академии наук, руководитель группы гетерологичной экспрессии

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

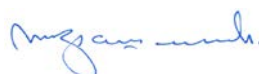
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук.

Защита состоится «28» февраля 2013 года в 11.00 часов на заседании Совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций).

Автореферат разослан «28» января 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы.

Значительные достижения геномики на рубеже XX-XXI веков, особенно результаты секвенирования геномов различных организмов, составляют основной потенциал для развития новых областей молекулярной биологии — «транскриптомики» и «протеомики». Результатом сравнения геномов разных биологических видов стал вывод об усложнении регуляции экспрессии генома при переходе от «низших» видов к «высшим», а не увеличение числа генов, как предполагали ранее. Экспрессия эукариотического генома — сложный многоуровневый процесс, одним из наиболее важных этапов которого является транскрипция. В настоящее время на смену представлениям о процессинге, транспорте, редактировании и запрограммированной деградации мРНК как посттранскрипционных процессах выдвинута «гипотеза сопряжения» о тесной взаимосвязи всех этапов метаболизма РНК между собой и их котранскрипционном протекании. Предполагается, что процессинг, модификация, транспорт и деградация РНК происходят одновременно с процессом элонгации, то есть существует разветвлённая «сеть» «молекулярных машин», работающих согласованно. Стержнем этой системы, как полагают, является С-концевой домен (CTD) РНК-полимеразы II, однако до настоящего времени не идентифицирован «регуляторный каркас», управляющий столь сложной структурой. Исследования именно этого аспекта, по-видимому, могут обеспечить достаточные доказательства правоты «гипотезы сопряжения».

Изучение регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и сопряженных процессов метаболизма РНК может иметь и прикладное значение, например, для более глубокого понимания природы РНК-доминантных заболеваний (RNA-dominant diseases), связанных с транскрипцией «токсических» некодирующих РНК. Попытки применения препаратов микроРНК (microRNA), киРНК (siRNA), PIWI-ассоциированных РНК (piRNA) и антисмысловых РНК для коррекции aberrантных продуктов транскрипции и метаболизма РНК, как в отдельных клетках, так и в живых организмах, позволяют говорить о развитии «антисмысловых» технологий для фундаментальных и прикладных исследований и закладке основ «антисмысловой» терапии и «микрореномной» медицины.

Цель и задачи работы.

Цель работы состоит в изучении регуляции экспрессии сложной единицы транскрипции – гена рецептора гормона роста человека (hGHR). Основное следствие «гипотезы сопряжения» – вывод о существовании единой согласованной системы регуляции экспрессии генов, включающей транскрипционный и «посттранскрипционный» аппараты клеточного ядра, поэтому логично говорить о «котранскрипционной» регуляции экспрессии.

Для достижения поставленной цели необходимо решить общую задачу – исследовать «профиль» транскрипции гена hGHR в РНК из человеческих тканей, фактически, необходимо решить ряд конкретных задач:

1. построить физическую карту гена hGHR;
2. картировать функциональные элементы гена: потенциальные промоторы, 5'-нетранслируемые экзоны, кодирующие экзоны;
3. исследовать функции потенциальных промоторов *in vitro*;
4. охарактеризовать 5'-нетранслируемую область (5'-НТО) гена: картировать сайты старта транскрипции, оценить представленность основных 5'-нетранслируемых экзонов (вариантов первого некодирующего экзона гена hGHR) в РНК из человеческих тканей;
5. охарактеризовать 3'-НТО гена;
6. изучить экспрессию кодирующей части гена hGHR в человеческих тканях.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Построена карта кодирующей и проксимальной части 5'-НТО (район промотора P1, специфического для взрослой печени) гена hGHR общей протяженностью около 200 т.п.н..

Впервые установлена нуклеотидная структура GC-богатого участка, содержащего дистальный кластер 5'-нетранслируемых экзонов (V2(1B)-V9-V3(1C)).

Экспериментально *in vitro* и *in silico* показана потенциальная возможность ассоциации с ядерным матриксом транскрипционно значимых участков 5'- и 3'-НТО гена hGHR.

Исследовано влияние короткой открытой рамки считывания (кОРС) в «обшкетканевом» промоторе P2 (дистальная 5'-НТО) на экспрессию репортерного гена люциферазы *in vitro*. Установлено различное влияние элементов основного «обшкетканевого» экзона 1B на экспрессию кОРС, расположенной ниже (в 3'-направлении).

Идентифицированы четыре новые изоформы мРНК гена hGHR, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга 5'-НТО, экспрессирующиеся ткане- и стадийспецифически.

Идентифицирована укороченная форма мРНК, не содержащая трансмембранного и внутриклеточного доменов рецептора гормона роста, предложен гипотетический механизм ее образования за счет использования альтернативного сайта полиаденилирования в интроне 7/8 гена hGHR.

Установлено соответствие одного из потенциальных нетранслируемых вариантов 1 экзона (V6) хромосоме 11 человека, а не хромосоме 5, как полагали ранее. Экспериментально показана транскрипция некодирующей цепи ДНК в локусе гена моноацилглицерат О-ацилтрансферазы 2

человека (hMOGAT2). Предложен гипотетический механизм образования химерной РНК в результате *транс*-сплайсинга двух дискретных транскриптов.

Исследована частота геномного полиморфизма области экзона 3 гена hGHR. Установлено достоверное различие частот генотипа делеция/делеция (d/d) в группе пациентов с идиопатической низкорослостью (ИН) по сравнению с контрольной группой.

У пациента с задержкой роста обнаружена мутация R43X в экзоне 4 гена hGHR, подтверждающая диагноз «синдром Ларона».

Апробация работы.

Основные результаты работы представлены на II съезде Биохимического общества РАН (Москва, 1997), III съезде Биохимического общества РАН (С-Петербург, 2002), ежегодных итоговых конференциях Федеральной целевой научно-технической подпрограммы «Геном человека» (Черноголовка, 1998, 1999), международном симпозиуме «Current problems of molecular genetics and cell biology» (Москва, 2000), III съезде Всероссийского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (Москва, 2004), на международных семинарах “Coupling between transcription and RNA processing” (Baeza, Spain, 2004) и “RNA-protein interactions in development and cancer” (Baeza, Spain, 2009), лабораторных коллоквиумах лаборатории молекулярной эндокринологии Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Структура и объём работы.

Диссертация изложена на 117 страницах, содержит 27 рисунков, 5 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключения, выводов, благодарностей и списка цитированной литературы (131 наименование).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.

1. Структура гена hGHR. Функциональная карта кодирующей области и проксимальной 5'-НТО. Картирование основных элементов гена hGHR.

Для построения карты гена использовали рекомбинантные ВАС-клоны ВАС25F11А, ВАС64А9М, ВАС170В4М (СЕРН, Франция), выбранные по наличию STS в области 2 экзона гена hGHR, клон из библиотеки в фаге λ (λ ghr41), содержащий нетранслируемый экзон 1В и фрагменты, полученные на геномной ДНК человека, связывающие известные последовательности гена. Рекомбинантные плазмиды ВАС-клонов гидролизовали эндонуклеазой рестрикции BamHI, смесь фрагментов лигировали с плазмидными векторами pUC19 и pGEM-3zf и трансформировали в клетки *E.coli*. Реконструированная последовательность BamHI-фрагментов и результаты картирования кодирующих экзонов и проксимальной 5'-НТО гена hGHR представлены на Рис. 1. Alu- и LINE-элементы идентифицированы в процессе секвенирования рекомбинантных плазмид, содержащих BamHI-фрагменты ВАС-клонов.

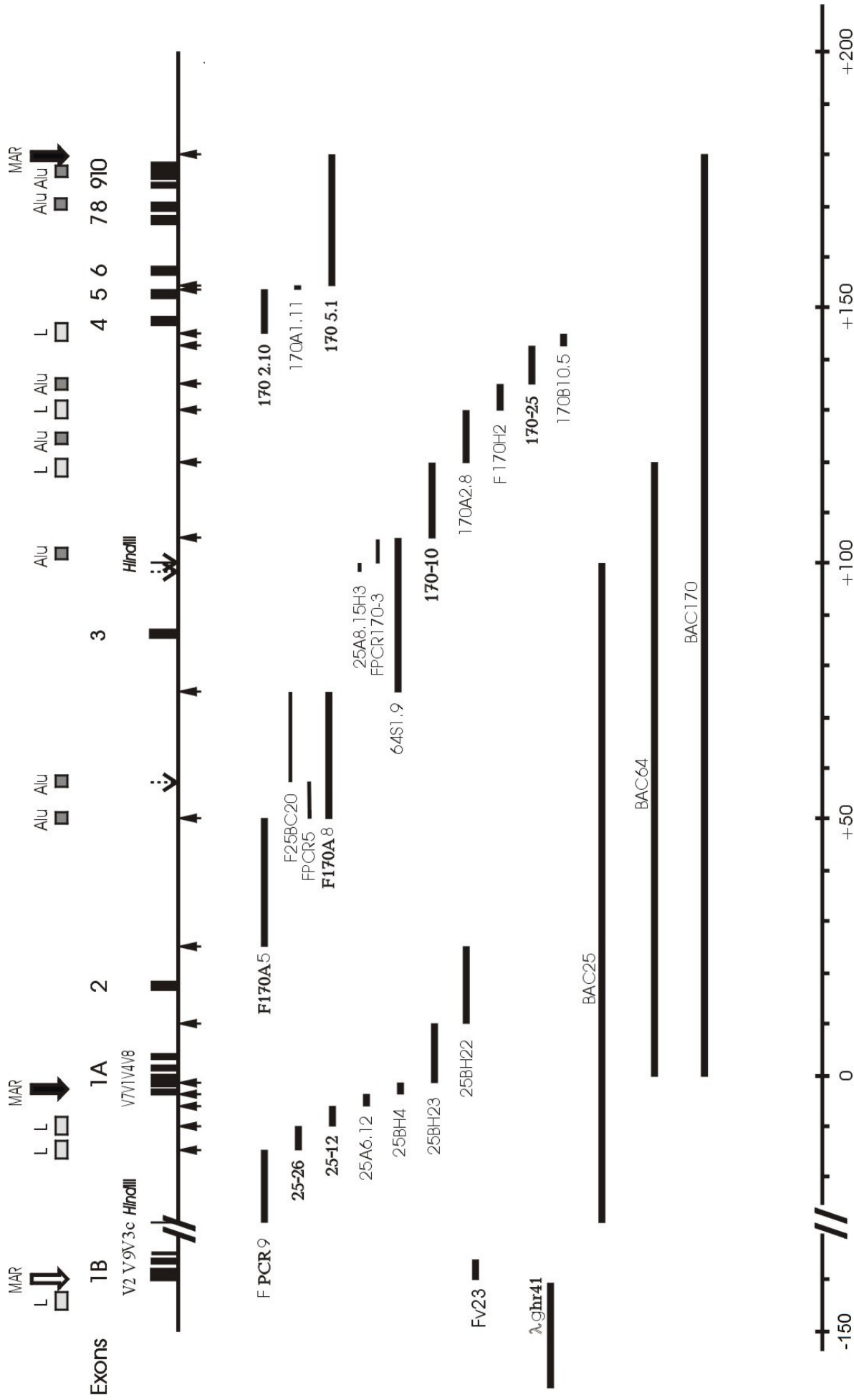
При картировании экзонов гена hGHR в ДНК ВАС-клонов установлено отсутствие экзона 3 в клоне ВАС64А9М. Ранее подобную делецию в некоторых человеческих РНК связывали с альтернативным сплайсингом, позднее – с геномным полиморфизмом неизвестной природы. Причиной данного геномного полиморфизма является ДНК-рекомбинация области, содержащей 3 экзон, расположенной между двумя гомологичными на 99% копиями повтора, состоящего из LTR семейства эндогенного ретровируса HERV-P (171 п.н.) и следующего за ним фрагмента транспозона MER4 (80 п.н.) (Pantel J. et al., 2000).

Рабочая версия нуклеотидной последовательности генома человека (UCSC Genome Bioinformatics <http://genome.ucsc.edu/>) позволила уточнить полученные данные о структуре гена hGHR и провести анализ *in silico* структуры хроматина в данном локусе. Ген hGHR находится в участке с координатами 42423000 – 42723000, занимая примерно 300 т.п.н. Точное положение кодирующих и нетранслируемых экзонов гена относительно точки инициации трансляции (в экзоне 2) представлено в Табл. 1. Функциональная карта гена hGHR полностью подтверждается нуклеотидной последовательностью соответствующего локуса хромосомы 5 человека.

2. Характеристика нетранслируемых областей гена hGHR.

2.1. Характеристика 5'-НТО. Картирование 5'-нетранслируемых экзонов гена hGHR.

Результаты, полученные при картировании экзонов гена hGHR, показывают, что более чем 140 т.п.н. из 300 т.п.н., занимаемых геном, приходится на 5'-НТО, в которой картированы



5

Рис.1. Схема кодирующей, проксимальной и дистальной части 5'-НТО гена hGHR. Отмечены кодирующие и некодирующие экзоны (черные прямоугольники), повторяющиеся элементы LINE-1 (L) и Alu (светлые прямоугольники), потенциальные участки связывания ДНК с ядерным матриксом (большие стрелки, MAR) и сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII (маленькие стрелки).

Таблица 1. Схема организации гена GHR человека.

Эзоны	Положение экзонов относительно участка инициации трансляции (п.н.) ¹	Номер депонированной нуклеотидной последовательности
Альтернативные 5'-нетранслируемые эзоны (эксон 1)		
V2(1B)	-142364 -- -141920	Z11801, S97393
V9b	-141423 -- -141277	AF230801
V9a	-141398 -- -141277/-51795 -- -51511	AF230800
V3	-140883 -- -140837/-82638 -- -82546	Z11851
V10	-80168 -- -80042	AY216680
V7	-17832 -- -17724	Z11853
V1(1A)	-17762 -- -17346	Z11802
V4	-16319 -- -16178	Z11849
V8	-15795 -- -15759	Z11848
V5 ²	-414 -- -12	Z11850
Кодирующие эзоны		
эксон 2	-11 -- +80	X06562
эксон 3	+63163 -- +63228	X06562
эксон 4	+123015 -- +123144	X06562
эксон 5	+129042 -- +129914	X06562
эксон 6	+133949 -- +134127	X06562
эксон 7	+145332 -- +145497	X06562
эксон 8	+147554 -- +147644	X06562
эксон 9	+152177 -- +152246	X06562
эксон 10	+152578 -- +156002	X06562

Примечания.

¹ 5'-границы альтернативных нетранслируемых экзонов соответствуют 5'-концам наиболее длинных продуктов 5'-RACE и, как правило, не совпадают с истинными точками инициации транскрипции (смещены в 3'-направлении).

² Экзон V5 расположен непосредственно перед экзоном 2, раньше рассматривался как часть не удаленного интрона (retained intron), в настоящее время – как альтернативный экзон, 5'-концевая часть которого до положения -11 удаляется при сплайсинге некоторых первичных транскриптов.

7 из 8 5'-нетранслируемых экзонов, идентифицированных ранее методом 5'-RACE (V1, V2, V3, V4, V5, V7 и V8) (Pekhletsky R. et al., 1992), а также экзоны V9a, V9b и V10, открытые позднее. Один из потенциальных нетранслируемых экзонов – V6, как выяснилось в процессе выполнения работы, соответствует участку хромосомы 11 человека. Большая часть 5'-нетранслируемых экзонов образует два основных кластера – дистальный, содержащий экзоны V2, V9, V3 и проксимальный, включающий экзоны V7, V1, V4 и V8 (Рис. 1, Рис. 11). Проксимальный кластер 5'-нетранслируемых экзонов, картированный в процессе работы с рекомбинантными ВАС-клонами, расположен на расстоянии от -17.8 до -15.8 т.п.н. перед экзоном 2. В этом участке находится экзон V1 (1A) – основной 5'-нетранслируемый экзон изоформ мРНК, специфичный для взрослой печени. Особый интерес вызывает дистальный кластер (V2, V3 и V9), удаленный более, чем на 140 т.п.н. от 1-го кодирующего экзона мРНК. Как минимум два из 5'-нетранслируемых экзонов (V2 и V3) проявляют широкий спектр тканевой экспрессии, как в фетальных, так и во взрослых тканях, а также в

опухолях. Следует отметить высокую степень взаимной гомологии первичной структуры экзона 1В для всех изученных генов GHR млекопитающих. Длительное время ни для одного биологического вида данную область не удавалось связать с проксимальным кластером нетранслируемых экзонов, специфичным для взрослой печени. Область экзона 1В чрезвычайно GC-богата, что затрудняет ее исследование. Фрагмент, связывающий экзоны 1В (V2) и V3 (1C), амплифицировали на геномной ДНК человека, клонировали и установили его первичную структуру. Оказалось, что экзон 1С (V3) отстоит от экзона 1В всего на 1100 п.н. в 3'-направлении (Рис. 2).

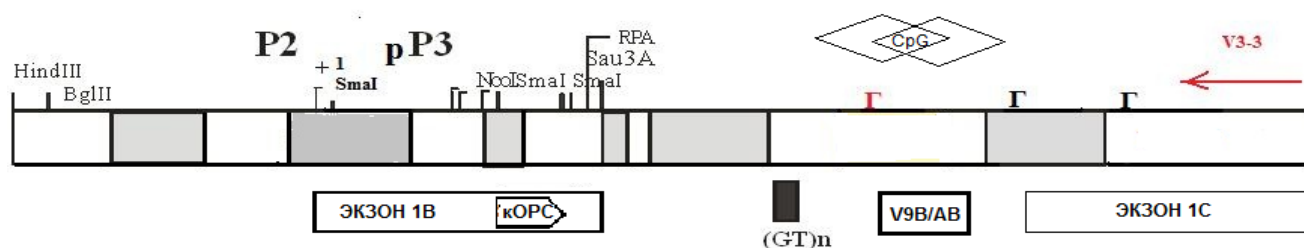


Рис.2. Схема геномной области дистального кластера нетранслируемых экзонов: экзон 1В (V2) и кОПС в нем (параграф 3.2.2.), экзон V9В и гомологичная ему часть экзона V9А (указано как V9В/АВ), лежащие в области двух перекрывающихся CpG-островков (указаны ромбами над схемой) и экзон 1С (V3), границы экзонов указаны под схемой. Указаны сайты расщепления эндонуклеазами рестрикции, сайты старта транскрипции (Г), установленные *in vitro* методом достройки олигонуклеотида V3-3, красным цветом выделен сайт старта транскрипции в «предсказанном» экзоне V9В/V9АВ (Г); сайт старта транскрипции внутри экзона 1В, установленный с помощью защиты РНК-РНК дуплекса от РНКаз (Г^{RPA}); микросателлит (GT)_n. Отмечены области промоторов P2 и предполагаемого P3 (p-putative). Участки дистальной 5'-НТО гена hGHR, высоко гомологичные 5'-НТО генов GHR других млекопитающих, выделены на схеме серыми прямоугольниками.

Рассматриваемая область содержит два CpG-островка, единственные в локусе гена hGHR, микросателлит (GT)_n (n=23 в клонированном фрагменте) и новый нетранслируемый экзон V9, существование которого предсказано при картировании стартов транскрипции в экзоне 1С (V3) (Рис. 2). Структура дистального кластера гена hGHR сходна с организацией кластера гомологичного гена *Bos taurus*, но транскрипционный профиль данной области у *Bos taurus* сложнее. Высоко гомологичны между собой лишь экзоны 1В, как уже указывалось выше, последовательности экзонов 1С (V3) и V9 человека – уникальны (Рис. 2).

2.2. Характеристика 3'-НТО гена hGHR.

Секвенирование концевых последовательностей вставок позволило установить, что клон ВАС170 содержит экзон 10 и 3'-НТО гена hGHR, соответствующую ранее опубликованной последовательности кДНК GHR человека (Leung D.W. et al., 1987). Используя в качестве зонда 3'-концевой фрагмент ВАС170, из библиотеки BamHI-фрагментов выделен клон, содержащий вставку длиной около 30 т.п.н., включающую 5 экзонов (экзоны 6-10) и собственно 3'-НТО гена hGHR. Установлена нуклеотидная последовательность 3'-фланкирующей области, показано, что данный район обогащен АТ-нуклеотидами, содержит множество потенциальных сайтов узнавания ДНК

топоизомеразы II и участки, гомологичные S/MAR-элементам, а также последовательности, гомологичные ARS-элементам дрожжей.

В 3'-НТО гена hGHR *in silico* идентифицированы сайты связывания микроРНК: miR-129/129-5p, miR-142-3p, miR-202/202-3p:1, miR-15/16/195/424/497, miR-503, miR-202/202-3p:2, let-7/98, miR-135. Для гомологичных генов GHR показано влияние некоторых микроРНК на подавление экспрессии: miR-15a – в эпителиальных клетках молочной железы коровы (Li H.M. et al., 2012) и let-7b – в скелетных мышцах карликовой породы кур (Lin S et al., 2012). Взаимодействие let-7/98 – GHR рассматривается как потенциальный маркер остеосаркомы человека (Di Fiore R. et al., 2012).

2.3. Изучение взаимодействия участков нетранслируемых областей с ядерным матриксом *in vitro*.

Экспериментально проверена способность клонированных фрагментов из 5'- и 3'-нетранслируемых областей гена связываться с ядерным матриксом *in vitro*. Результаты, представленные на Рис. 3 (для 5'-НТО) и Рис. 4 (для 3'-НТО), свидетельствуют в пользу гипотезы доменной организации гена hGHR. На Рис. 1 области связывания с ядерным матриксом отмечены сверху стрелками (MAR).

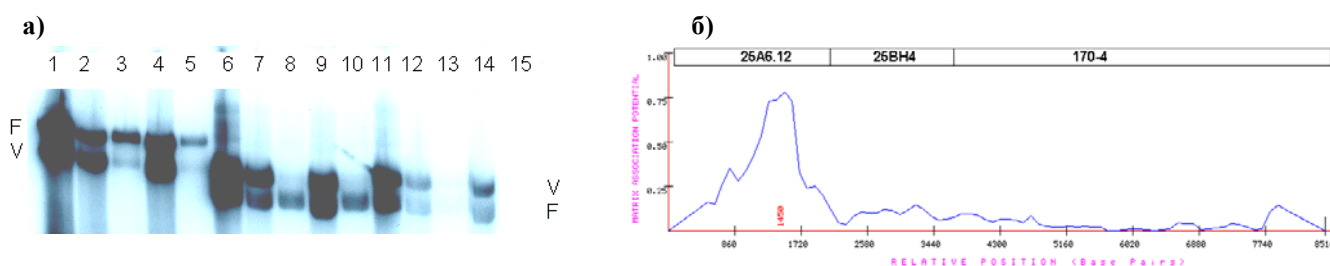


Рис. 3. **а)** Авторадиограмма агарозного геля с фрагментами 5'-НТО после связывания с ядерным матриксом *in vitro*. №№ 1-5: фрагмент 170-4; №№ 6-10: фрагмент 25A6.12, №№ 11-15: фрагмент 25BH4. №№ 1,6,11: контроли – продукты гидролиза плазмид с клонированными фрагментами (V-плазмидный вектор, F-соответствующий фрагмент); №№ 2,4,7,9,12,14 - супернатант и №№ 3,5,8,10,13,15 - осадок в экспериментах по связыванию с ядерным матриксом. №№ 2,3,7,8,12,13: 150 мкг и №№ 4,5,9,10,14,15: 200 мкг геномной ДНК *E. coli* (компетитор). **б)** Графическое представление результатов поиска *in silico* S/MAR-элементов в нуклеотидной последовательности 5'-НТО гена hGHR. Указано относительное положение фрагментов в геноме.

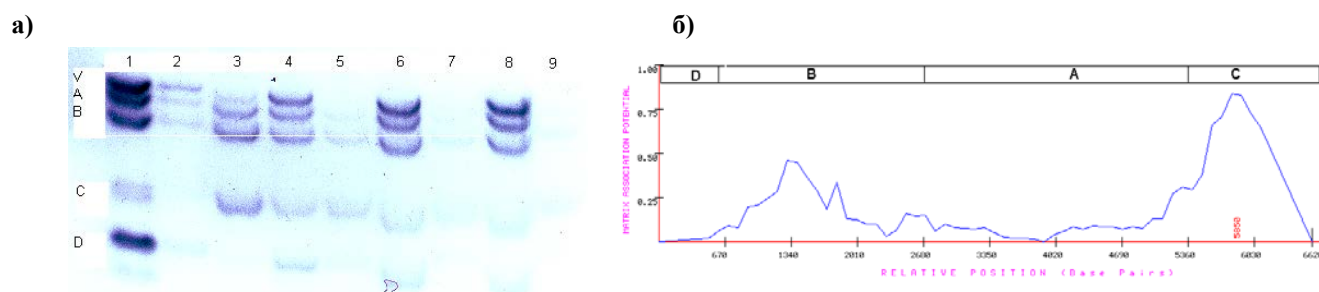


Рис. 4. **а)** Авторадиограмма агарозного геля с фрагментами 3'-НТО после связывания с ядерным матриксом *in vitro*. №1: контроль - продукты гидролиза плазмиды с клонированным фрагментом 3'-НТО (V-плазмидный вектор, A-D-соответствующие фрагменты); №№2,4,6,8-супернатант и №№3,5,7,9-осадок в экспериментах по связыванию с ядерным матриксом в присутствии геномной ДНК *E. coli* (компетитор): №№2,3-50 мкг; №№4,5-100 мкг; №№6,7-150 мкг; №№8,9-200 мкг компетитора. **б)** Графическое представление результатов *in silico* поиска S/MAR-элементов в нуклеотидной последовательности 3'-НТО гена hGHR. Указано относительное положение фрагментов в геноме.

3. Картирование и изучение активности *in vitro* основных промоторов гена hGHR.

3.1. Промотор P1, специфический для взрослой печени.

Из результатов анализа изоформ мРНК и картирования сайтов старта транскрипции в экзоне 1A следует, что промотор, специфический для взрослой печени, должен располагаться перед указанным экзоном. Для проверки этого предположения определили эффективность временной экспрессии репортерного гена люциферазы светлячка под контролем различных фрагментов предполагаемой промоторной области (Рис. 5).

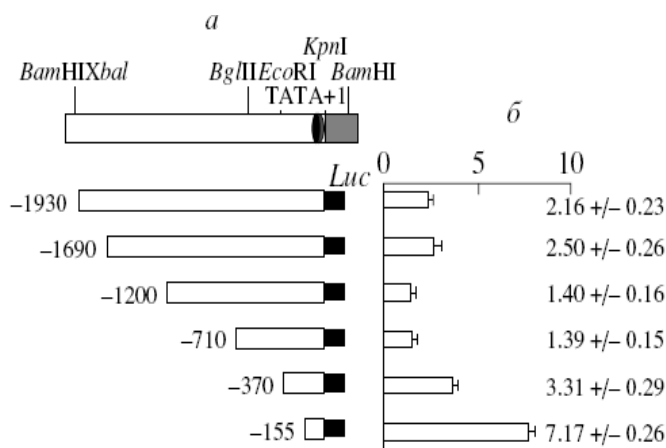


Рис. 5. Анализ активности промотора P1 гена hGHR в клетках линии HepG2. а) Рестрикционная карта фрагмента промоторной области P1 и схема конструкций, содержащих ген люциферазы (Luc) под контролем делеционных фрагментов промоторной области. Отмечено положение ТАТА-бокса (черный овал) и основного участка инициации транскрипции (+1); б) Относительная активность люциферазы в лизатах трансфицированных клеток (за единицу принята активность, обеспечиваемая контрольной плазмидой pGL3-Basic).

Последовательное удаление от 5'-конца исследуемого фрагмента поначалу мало влияет на промоторную активность (варианты -1930, -1200, -710), а затем приводит к ее усилению (варианты -370, -155). Таким образом, фрагмент размером 155 п.н. перед точкой инициации транскрипции (начало экзона V1) обеспечивает эффективную экспрессию репортерного гена люциферазы. Данная область содержит ТАТА-подобные элементы, которые, вероятно, вносят основной вклад в транскрипцию гена hGHR. Из полученных результатов можно также заключить, что нуклеотидные последовательности, находящиеся перед положением -155 по отношению к точке инициации транскрипции, содержат потенциальные негативные регуляторные элементы, так как их присутствие в репортерных конструкциях подавляет экспрессию гена люциферазы. Результаты исследования промоторной области P1 согласуются с данными, независимо полученными в других лабораториях (Zou L. et al., 1997; Rivers C.A., Norman M.R. 2000).

3.2. Общеканевой промотор P2.

3.2.1. Характеристика промоторной области.

Методом анализа временной экспрессии репортерного гена в клетках HepG2 подтверждена активность промотора P2, расположенного перед экзоном V2 (1B). Из Рис. 6 следует, что фрагменты -707 – +70, -365 – +70 и -165 – +70 по отношению к основной точке инициации транскрипции обеспечивают экспрессию репортерного гена люциферазы, причем так же, как и в случае с

промотором P1, максимальную активность проявляет наиболее короткий фрагмент -165 – +70. Удаление области -165 – -19 приводит к полному подавлению промоторной активности. Данная область, как уже отмечалось, весьма GC-богата. Она не содержит ТАТА-боксов, но включает несколько потенциальных сайтов связывания факторов транскрипции Sp1/Sp3, что согласуется с отсутствием выраженной тканевой специфичности экспрессии транскриптов, содержащих 5'-нетранслируемый экзон V2. Таким образом, один из промоторов, расположенных перед экзоном V2 (промотор P2), по своей структуре подобен промоторам генов домашнего хозяйства. Участие факторов транскрипции Sp1/3 в функционировании промоторов P2 гомологичных генов других видов млекопитающих установлено в работах Т. Adams (*Ovis aries*) (Adams Т.Е., 1995), лабораторий М. Lucy (*Bos taurus*) (Jiang Н. et al., 1999; 2000), R. Menon (*Mus musculus*) (Yu J.Н. et al., 1999).

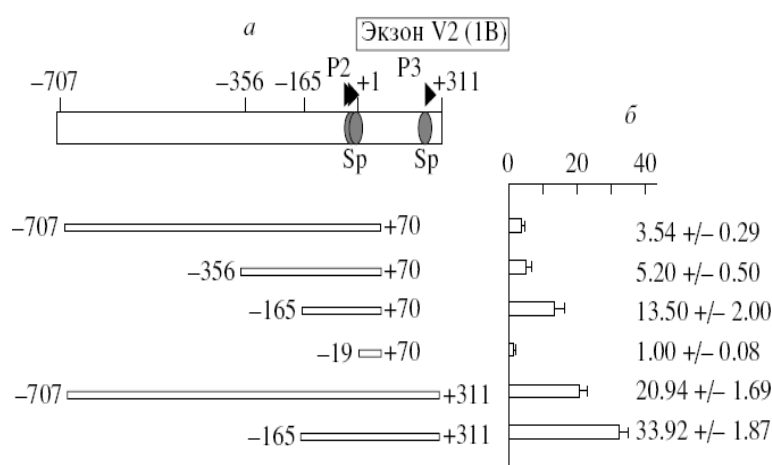


Рис. 6. Анализ активности промоторов GC-богатой области гена hGHR в клетках линии HepG2: а. Схема промоторной области и экзона V2 гена GHR человека и фрагментов, встроенных в репортерные плазмиды перед геном люциферазы. Стрелками показаны основные точки инициации транскрипции, овалами показано положение потенциальных сайтов связывания факторов Sp1/Sp3; б. Относительная активность люциферазы в лизатах трансфицированных клеток (за единицу принята активность, обеспечиваемая контрольной плазмидой pGL3-Basic)

3.2.2. Изучение влияния короткой открытой рамки считывания (кОРС), расположенной в 5'-нетранслируемом экзоне V2 (1B) гена GHR, на экспрессию репортерного гена люциферазы.

Экзон V2 (1B), транскрибируемый с промотора P2, содержит короткую открытую рамку считывания (кОРС), которая в зрелой мРНК расположена перед АТG-кодоном основной рамки трансляции GHR, представляет собой сильный вырожденный тринуклеотидный повтор GGC и кодирует короткий обогащенный глицином пептид. кОРС высоко консервативна и сохраняется в генах GHR разных видов млекопитающих (Яковенко А.Р. и др., 1997). Наличие кОРС в 5'-нетранслируемой области мРНК может существенным образом влиять на эффективность трансляции основной ОРС (Kozak М., 1999). Более детально изучено влияние различных элементов 5'-нетранслируемого экзона V2 на экспрессию репортерного гена люциферазы в трансфицированных клетках HepG2. В 5'-нетранслируемой области изоформ мРНК GHR человека, содержащих экзон V2, можно условно выделить три элемента: дистальную область (+1 – +311), кОРС (+311 – +405) и следующий за ней спейсерный участок (+405 – +524), разделяющий кОРС и основную ОРС hGHR. Получена серия конструкций, содержащая разные участки экзона V2 и

встроенный после них репортерный ген люциферазы (Рис. 6). Результаты определения активности люциферазы после трансфекции конструкциями клеток HepG2 показали, что дистальная область экзона V2 благоприятно влияет на экспрессию следующей за ней ОРС, а кОРС (область +311 – +405), встроенная непосредственно перед основной ОРС, подавляет ее экспрессию (Рис. 7). Для того чтобы проверить, связано ли подавление экспрессии люциферазы с подавлением трансляции, сконструированы плазмиды, содержащие точечные мутации, нарушающие кОРС. В одном случае иницирующий ATG-кодон кОРС заменен на АТА-кодон, в другом случае кодон GGA, следующий за ATG, превращен в стоп-кодон TGA.

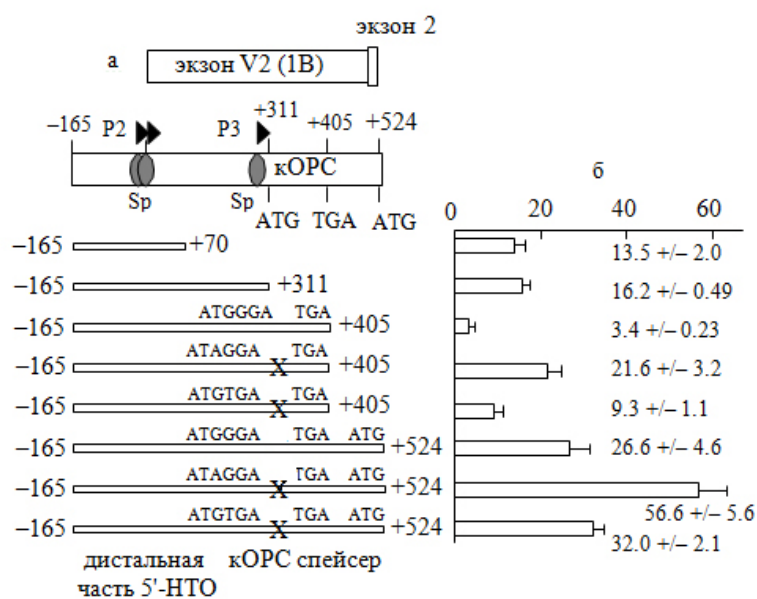


Рис. 7. Влияние элементов экзона V2 (1B) гена GHR человека на эффективность экспрессии люциферазы в клетках HepG2. а. Схема фрагмента промоторной области и экзона V2 гена GHR человека и фрагментов, встроенных в репортерные плазмиды перед геном люциферазы. Стрелками показаны основные точки инициации транскрипции, овалами показано положение потенциальных сайтов связывания факторов Sp1/Sp3. Указано положение иницирующих кодонов кОРС и основной ОРС и терминирующего кодона кОРС. Нарушение кОРС в результате введения точечных мутаций отмечено перечеркиванием. б. Относительная активность люциферазы в лизатах трансфицированных клеток (за единицу принята активность, обеспечиваемая контрольной плазмидой pGL3-Basic).

Введение таких мутаций сопровождалось увеличением эффективности экспрессии гена люциферазы примерно в 7 и 3 раза, соответственно. Действие введенных точечных замен на эффективность транскрипции представляется маловероятным. В то же время нарушение кОРС может снимать ингибирование трансляции ОРС люциферазы.

В следующей серии конструкций между кОРС и ОРС люциферазы встроен спейсерный участок (+405 – +524), полностью имитирующий нуклеотидную последовательность, присутствующую в мРНК hGHR, содержащих экзон V2. Как видно из Рис. 7, введение спейсера сильно ослабляет ингибирующее действие кОРС на экспрессию гена люциферазы, однако и в этом случае замена ATG в кОРС на АТА приводит к повышению люциферазной активности в трансфицированных клетках. Таким образом, можно заключить, что элементы 5'-нетранслируемого экзона V2 вносят разный вклад в эффективность экспрессии расположенной за ним ОРС репортерного гена. Полученные результаты не исключают возможного модулирующего действия кОРС экзона V2 на экспрессию гена GHR на уровне трансляции.

3.3. Другие промоторы генов GHR

3.3.1. Картирование предполагаемого промотора P3.

Анализ временной экспрессии люциферазы после трансфекции в клетки HepG2 репортерных конструкций, содержащих фрагменты предполагаемого промотора P3 (Рис. 2), не выявил промоторной активности. В то же время при картировании сайтов старта транскрипции выявлены альтернативные точки инициации транскрипции в самом экзоне V2 (Рис. 2). Одна из них расположена в положении +290, и непосредственно перед ней находится еще один сильный сайт связывания Sp. В связи с этим проверено влияние встраивания в репортерные конструкции части экзона V2 (+1 – +311) на уровень экспрессии люциферазы. Как видно из Рис. 6, плазмиды, содержащие фрагменты -707 – +311 и -165 – +311, обеспечивают более высокий уровень люциферазной активности, чем сходные конструкции, ограниченные с 3'-конца положением +70. Таким образом, введение в репортерные плазмиды фрагмента +70 – +311 значительно усиливает экспрессию гена люциферазы, что может указывать на аддитивное действие сайтов связывания факторов транскрипции Sp, расположенных перед экзоном V2 и в самом экзоне. Из результатов, представленных на Рис. 6, можно заключить, что GC-богатая область, в которой находится экзон V2, содержит по меньшей мере два промотора – P2 и P3, которые направляют транскрипцию гена hGHR в разных типах тканей (Рис. 2).

3.3.2. Изучение предполагаемых промоторных областей экзонов V5 и V9.

Методом достройки праймера в препаратах полиаденилированных и суммарных (контрольных) РНК из печени, плаценты и клеточной линии Huh7 картированы точки стартов транскрипции для экзона V5. Наличие стартов транскрипции в данной области позволяет предположить существование регуляторных элементов в районе экзона V5 гена GHR человека и сделать предварительный вывод об отсутствии тканеспецифичности для данного промотора, что согласуется с опубликованными данными о промоторной активности области экзона L5 мыши (Menon R. et al., 2001). Данные экспериментов по картированию сайтов старта транскрипции для экзонов V9 и V3 (параграф 2.1., Рис. 2) позволяют сделать заключение об отсутствии тканеспецифичности и для этих промоторов. Промоторную активность области экзона V9 можно объяснить наличием сайтов связывания факторов транскрипции Sp-семейства, так же как и для предполагаемого промотора P3 (параграф 2.1.). Промотор, лишенный ТАТА-бокса, картирован перед экзоном V9, показано, что промотор работает в ткани сердечной мышцы *in vivo* и его активность определяется связыванием фактора транскрипции NF-Y (Goodyer C.G. et al., 2001).

4. Нетранслируемый «экзон» V6.

4.1. Картирование V6 в хромосоме 11 человека.

Предполагаемый вариант V6 первого нетранслируемого экзона гена hGHR обнаружен в продуктах 5'-RACE мРНК hGHR. Попытки картировать V6 в последовательностях ВАС-клонов и связать последовательность V6 с другими экзонами в геномной ДНК оказались безуспешными. Картирование V6 в 5'-НТО гена hGHR между дистальным и проксимальным кластерами нетранслируемых экзонов в геномной области длиной около 35 т.п.н. (Goodyer C.G. et al., 2001) оказалось ошибочным, что позднее признано авторами (Wei Y. et al., 2006; Goodyer C.G. et al., 2008).

С помощью ПЦР на ДНК из панели хромосомных гибридов «человек-грызун», любезно предоставленной Е.П. Копанцевым (ИБХ РАН), нами экспериментально доказана локализация нуклеотидной последовательности, соответствующей V6, в хромосоме 11 человека.

4.2. Клонирование хромосомного фрагмента гена hMOGAT2, содержащего V6.

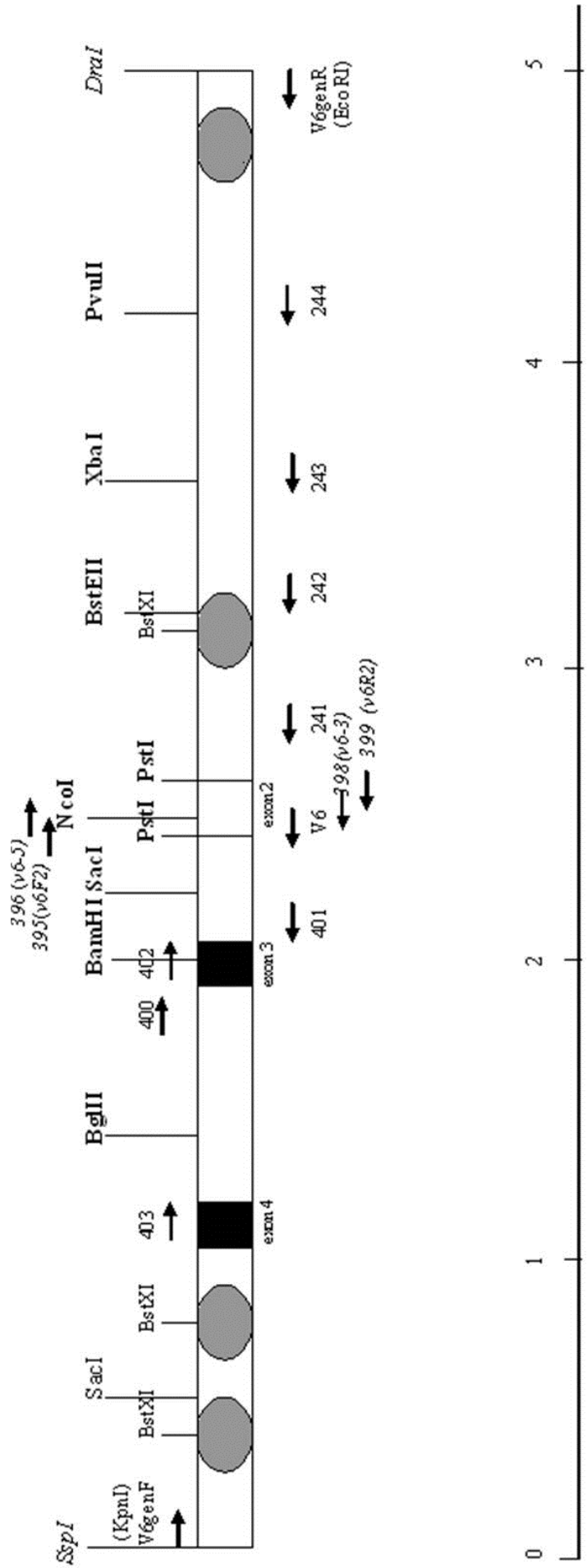
Схематическое изображение структуры фрагмента, содержащего V6, представлено на Рис. 8. 5'- и 3'-концевые последовательности хромосомного фрагмента длиной 4.9 т.п.н. установлены в системе однонаправленной ПЦР, любезно предоставленной Г.Ф. Юдиной (ИБХ РАН). Анализ последовательностей в геномном браузере UCSC позволил однозначно локализовать геномный фрагмент в хромосоме 11 человека.

4.3. Идентификация «антисмыслового» транскрипта в локусе гена hMOGAT2.

В данном параграфе и далее «антисмысловыми», некодирующими, комплементарными (антипараллельными) названы транскрипты, кДНК, РНК, цепь ДНК – по отношению к направлению транскрипции гена hMOGAT2.

Исследована экспрессия гена hMOGAT2 в некоторых человеческих тканях и клеточных линиях. Впервые установлена экспрессия мРНК hMOGAT2 в ткани молочной железы, ОМЖ и клеточных линиях, происходящих из ОМЖ. Анализ «транскрипционного профиля» исследуемой области в РНК из человеческих тканей и клеточных линий позволил идентифицировать присутствие некоторых интронных последовательности гена hMOGAT2 в пуле зрелых мРНК. Помимо альтернативно сплайсирующегося интрона 3/4, в РНК из взрослой печени детектируется фрагмент интрона 1/2, прилежащий к экзону 2 (V6) (пара праймеров 395/241, Рис. 8, Рис. 9).

С другой стороны, амплификация с парой праймеров 398/402 на препаратах антисмысловых кДНК дает фрагмент, включающий сплайсированные экзоны 2 и 3 гена hMOGAT2. Из серии экспериментов ОТ-ПЦР, в которых селективно амплифицируются участки только смыслового или



Т.П.Н.

Рис. 8. Схема геномной области нетранслируемого «экзона» V6 (в антипараллельной ориентации по отношению к гену hMOGAT2). Жирным шрифтом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции, использованных для клонирования фрагментов и создания конструкций, в скобках – сайты KpnI и EcoRI, введенные в олигонуклеотиды для двунаправленной ПЦР на геномной ДНК и последующего клонирования полученного продукта; стрелками соответствующего направления показаны олигонуклеотиды для однонаправленной ПЦР и сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции для наиболее протяженных фрагментов, полученных в однонаправленной ПЦР (названия набраны курсивом); праймеры для двунаправленных специфических ПЦР (названия набраны прямым шрифтом). Черными квадратами обозначены экзоны 3 и 4 гена hMOGAT2, белый квадрат – V6, комплементарный экзону 2 гена hMOGAT2 (между сайтами эндонуклеазы рестрикции PstI). Серыми овалами обозначены участки, гомологичные A1u-повторам семейства Sq.

только антисмыслового транскрипта в локусе гена hMOGAT2, можно сделать предварительный вывод о транскрибировании некодирующей цепи ДНК в локусе гена hMOGAT2 и включении последовательности V6 в антисмысловый транскрипт. Результаты сравнительного анализа экспрессии мРНК гена hMOGAT2 и предполагаемого антисмыслового транскрипта, транскрибирующегося с некодирующей цепи ДНК в локусе того же гена, представлены на Рис. 9. В некодирующей цепи ДНК локуса гена hMOGAT2 *in silico* предсказано существование нескольких 5'- и 3'- сайтов сплайсинга. На расстоянии около 6,5 т.п.н. от V6 идентифицирован сигнал полиаденилирования. Из анализа промоторной активности (параграф 6.4.) и экспериментов по изучению экспрессии гена hMOGAT2 (Рис. 9) можно предполагать, что 5'-конец предполагаемого антисмыслового транскрипта лежит в альтернативно сплайсирующемся интроне 3/4 (параграф 6.4.) или в интроне 4/5 гена hMOGAT2 (несколько сильных «предсказанных» *in silico* потенциальных «промоторов»).

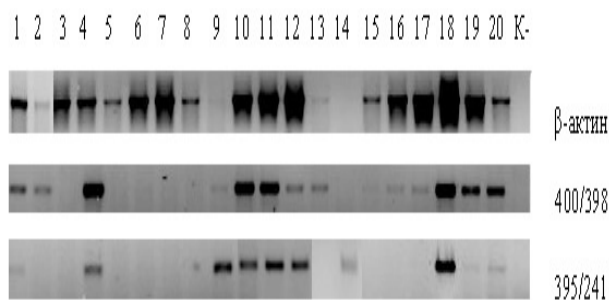


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов амплификации специфических последовательностей гена hMOGAT2 (400/398) и предполагаемого антисмыслового транскрипта (395/241) на кДНК : 1-взрослая печень, 2-фетальная печень, 3-HeLa, 4-HepG2, 5-Huh7, 6-HEK293, 7-TE671, 8-MCF-7, 9-MCF-7 HTB-22, 10-MDA-MB436, 11-BT474, 12-молочная железа, 13-ОМЖ№1, 14-ОМЖ№2, 15-ОМЖ№3, 16-ОМЖ№4, 17-аденома простаты, 18-ободочная (толстая) кишка , 19-ободочная (толстая) кишка («нормальная» ткань), 20-опухоль ободочной (толстой) кишки, К-: отрицательный контроль амплификации (вода).

Возможно, 5'-область антисмыслового транскрипта имеет несколько альтернативных промоторов и/или сплайсируется альтернативно. Установить точную длину (предполагаемая длина 6-7 т.н.о.) и нуклеотидную последовательность антисмыслового транскрипта не удалось, опубликованных сведений в литературе и в геномном браузере UCSC не найдено.

4.4. Картирование промотора V6.

Методом достройки праймера в РНК некоторых человеческих тканей и клеточных линий картированы сайты стартов транскрипции в области V6. Для изучения промоторной активности получен набор конструкций, содержащих фрагменты изучаемой области и встроенный под их контроль ген люциферазы. Результаты анализа люциферазной активности в клетках, несущих полученные конструкции, представлены на Рис. 10.

Методом временной экспрессии репортерного гена в клетках HeLa установлены границы минимального промотора, непосредственно прилегающего к V6 (фрагмент длиной 143 п.н. между сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции PstI и NcoI) и нескольких «промоторных элементов» в 5'-области изучаемого фрагмента, как позитивных, так и негативных.

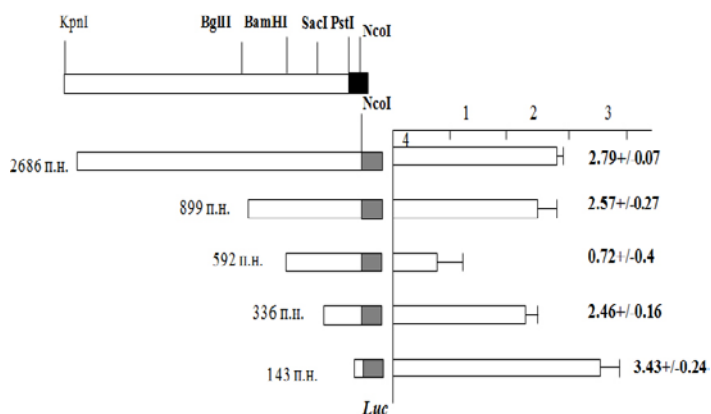


Рис. 10. Анализ люциферазной активности конструкций, содержащих ген люциферазы (*Luc*) под контролем фрагментов 5'-фланкирующей области «экзона» V6 в клетках HeLa. Сверху представлена схема относительного расположения сайтов эндонуклеаз рестрикции в исследуемой области, чёрный прямоугольник – «экзон» V6, слева указаны длины фрагментов, встроенные над геном люциферазы (серые прямоугольники). Показана относительная активность люциферазы в лизатах трансфицированных клеток (за единицу принята активность, обеспечиваемая контрольной плазмидой pGL3-Basic).

4.5. Гипотетический механизм образования химерного транскрипта V6-экзон 2 hGHR.

В качестве одного из возможных механизмов образования химерной мРНК hGHR, содержащей V6, может рассматриваться *транс-сплайсинг*. Антисмысловой транскрипт, содержащий V6, несет 5'-донорный сайт сплайсинга. *Транс-сплайсинг* предполагает существование парного транскрипта, содержащего 3'-акцепторный сайт и сайт ветвления сплайсинга. В качестве кандидатов на роль «акцепторного партнера» могут быть рассмотрены изоформы мРНК hGHR, содержащие экзоны V3 или V5, поскольку показано, что указанные некодирующие экзоны происходят из интронов и содержат соответствующие сигнальные последовательности.

5. Изучение экспрессии гена hGHR в РНК из некоторых человеческих тканей, культивируемых клеточных линий и образцов опухолей.

Рецептор гормона роста относится к суперсемейству рецепторов цитокинов/гематопоетина. Экспрессия GHR обнаружена практически во всех исследованных тканях (мышцы, почка, сердце, мозг, молочная железа, матка, простата, жировая ткань и других), но наиболее высокий уровень экспрессии GHR характерен для печени. Именно в печени GHR является медиатором сигнала гормона роста (GH), запускающим синтез и секрецию инсулиноподобного фактора роста-I (IGF-I), необходимого для роста и протекания ряда метаболических процессов в организме. В остальных тканях GHR может быть медиатором локального действия GH на дифференцировку и пролиферацию клеток. Экспрессия GHR возрастает в постнатальный период, но обнаружена также в раннем эмбриогенезе и в процессе развития зародыша. Следует отметить, что hGHR детектируется в большом числе опухолей различной этиологии, однако его роль в канцерогенезе остается неясной.

Полноразмерная форма мембранного рецептора гормона роста человека содержит 620 аминокислотных остатков. Экзон 2 (первый транслируемый экзон) кодирует сигнальный пептид длиной 18 аминокислот, экзоны 3-7 – внеклеточный домен рецептора из 246 аминокислот, экзон 8 – трансмембранный домен из 24 аминокислот, экзоны 9 и 10 – цитоплазматический домен рецептора длиной 350 аминокислот, отвечающий за внутриклеточное проведение сигнала.

Наряду с мембранной формой hGHR выявлены укороченные с С-конца формы, образующиеся как в результате ограниченного протеолиза полноразмерного рецептора (растворимый белок, связывающий гормон роста, growth hormone binding protein – GHBP), так и в результате альтернативного сплайсинга экзона 9. Такие изоформы рецептора, как полагают, расщепляются до GHBP лучше, нежели полноразмерный рецептор (Amit T. et al., 1997).

5.1. 5'-нетранслируемая область гена hGHR.

5.1.1. Идентификация новых 5'-нетранслируемых экзонов гена hGHR.

Методом ОТ-ПЦР на РНК из взрослой печени идентифицированы 4 новые изоформы мРНК hGHR, содержащие на 5'-конце как уже известные последовательности (V3, V7, V1, V9A и V10) в новых комбинациях (V7a, V7b, V10a), так и одну новую последовательность (координаты в геномном браузере UCSC: 42468879 – 42469098, по отношению к иницирующему AUG-кодону экзона 2: -97098 – -96879, длина – 219 п.н.) (Рис. 11). Установлено, что экзон V7a состоит из непрерывной последовательности экзонов V7-V1 и интрона между ними. В экзоне V1 идентифицирован проксимальный 3'-акцепторный сайт сплайсинга (Рис. 11), за счет использования которого образуется новый экзон V7b, экспрессирующийся во взрослой печени в незначительном, по сравнению с V7a, количестве.

5.1.2. Экспрессия 5'-нетранслируемых экзонов гена hGHR в клеточных линиях.

Исследован профиль экспрессии нетранслируемых экзонов гена hGHR в РНК взрослой печени (контроль) и клеточных линий HeLa, HepG2, Huh7, HEK293, TE671, MCF-7. Полученные результаты о ткане- и стадиейспецифической экспрессии большинства нетранслируемых экзонов согласуются с опубликованными данными независимых исследований (рис. 11).

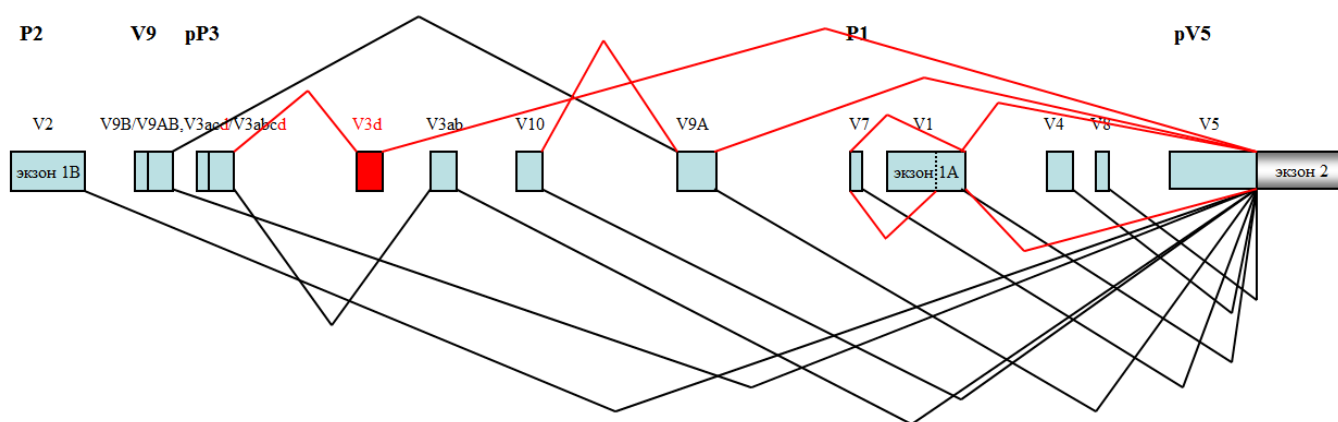


Рис. 11. Схема альтернативного сплайсинга 5'-нетранслируемых экзонов гена hGHR. Линиями показаны комбинации последовательностей (прямоугольники), образующих собственно экзоны. Красные линии – новые комбинации, установленные в работе; красный прямоугольник – новая последовательность, входящая в состав экзона V3d. Указаны промоторы гена, предполагаемые промоторы отмечены строчной буквой «р» (putative).

Следует отметить, что экспрессии экзонов, специфичных для взрослой печени (V7, V1, V4, V8), в HeLa, HepG2, Nuh7, HEK293 и TE671 не наблюдается, но в трех последних из указанных экспрессируется новый экзон V7a (возможно и V7b), а в линии MCF-7 детектируется экзон V1 (1A).

5.2. Транслируемая область гена hGHR.

5.2.1. Экспрессия мРНК hGHR в некоторых тканях и клеточных линиях.

Методом ОТ-ПЦР (амплификация фрагмента внеклеточного домена hGHR – экзоны 4-6, на суммарных РНК из некоторых человеческих тканей: взрослой и фетальной печени, плаценты, коры надпочечника, ободочной (толстой) кишки, молочной железы, яичника, почки, поджелудочной железы, тимуса, скелетных мышц, сердца, тестикул, легкого, спинного мозга, из периферических клеток крови, из первичной культуры хондроцитов, из культивируемых клеточных линий HepG2, Nuh7, HeLa, MCF-7, MDA-MB436, BT474, HEK293, TE671) установлен относительный уровень мРНК hGHR. Наиболее высокий уровень экспрессии hGHR наблюдается во взрослой печени и в молочной железе.

5.2.2. Исследование экспрессии мРНК гена hGHR в некоторых клеточных линиях.

Для более детальной качественной оценки экспрессии гена hGHR на транскрипционном уровне в клеточных линиях методом ОТ-ПЦР амплифицировали фрагменты «экзоны 4-6» (внеклеточный домен) и «экзоны 8-10» (трансмембранный/внутриклеточный домены). В линии Nuh7 детектируется только внеклеточный домен, а в клеточных линиях HEK293 и TE671 детектируются участки как внеклеточного, так и трансмембранного/внутриклеточного доменов, но результаты не соответствуют ожидаемому соотношению 1:1.

Полученные данные позволяют предположить, что в клеточных линиях Nuh7, HEK293 и TE671 экспрессируется укороченная форма мРНК hGHR, не содержащая участков, соответствующих трансмембранному (экзон 8) и внутриклеточному доменам (экзоны 9-10).

5.2.3. Анализ экспрессии форм мРНК hGHR в образцах опухолей и в клеточных линиях опухолевого происхождения.

Сравнительный анализ экспрессии мРНК гена hGHR методом ОТ-ПЦР в образцах тканей молочной железы, опухолей молочной железы (ОМЖ) и культивируемых клеточных линий ОМЖ (MCF7, MDA-MB436, BT474) позволил установить корреляцию между экспрессией укороченной формы мРНК hGHR и альфа-эстрогенового рецептора (ER α): в гормонозависимых (по наличию экспрессии ER α) образцах детектируются участки всех доменов hGHR, в гормононезависимых – только участок внеклеточного домена. Установленная корреляция может свидетельствовать о прямом (на уровне инициации транскрипции/выбора промотора) и/или опосредованном (через

молекулы сигнального каскада) влиянии ER α на экспрессию укороченной мРНК hGHR.

Изучена экспрессия предполагаемой укороченной мРНК в 5 попарных (опухоль/«нормальная» ткань, прилежащая к опухоли) образцах опухолей печени, 15 попарных образцах опухолей ободочной (толстой) кишки, 4 опухолях молочной железы, образцах аденомы простаты, ткани молочной железы при гигантомастии, клеточных линиях, происходящих из опухолей печени (2), ободочной (толстой) кишки (4), молочной железы (4), простаты (3), нейробластомы (14) и в соответствующих нормальных тканях человека. В ряде опухолей и клеточных линий экспрессируется только укороченная форма (гормоннезависимые ОМЖ и соответствующие клеточные линии ОМЖ, 7 опухолей толстой кишки, линия нейробластомы СНР212), в некоторых образцах hGHR не экспрессируется (13 клеточных линий нейробластомы, 2 опухоли печени и линия НерG2, 2 опухоли и 3 клеточные линии из опухолей толстой кишки). В остальных образцах детектируется полная форма мРНК hGHR. Следует отметить, что в нормальной ткани простаты экспрессии hGHR не наблюдается, в то время как в аденоме простаты детектируется мРНК полной формы hGHR, при гигантомастии наблюдается экспрессия укороченной мРНК. Гетерогенность экспрессии мРНК hGHR можно объяснить невозможностью в стандартных ОТ-ПЦР дифференцировать укороченную форму мРНК от полной, при их одновременном присутствии в образце.

Несмотря на то, что регуляция экспрессии укороченной мРНК в разных опухолях, судя по полученным результатам, не является «универсальной», можно предполагать, что данная форма мРНК hGHR, возможно соответствующая GHRP, является потенциальным онкомаркером.

5.2.4. Гипотетический механизм образования укороченной формы мРНК гена hGHR.

Механизмы образования GHRP у разных видов существенно различаются. У грызунов GHRP образуется в результате альтернативного сплайсинга мРНК. В интроне 7/8 гена GHR мыши и крысы присутствует альтернативный экзон 8A, сплайсинг которого с экзонами 2 -7 внеклеточного домена GHR приводит к образованию мРНК GHRP длиной около 1.2-1.4 т.н.о.. У человека и кролика GHRP образуется в результате ограниченного протеолиза полноразмерного рецептора гормона роста. У макаки-резус в образовании GHRP участвуют оба механизма (Martini J. et al., 1997). В результате использования альтернативного сайта полиаденилирования в интроне 7/8, образуется мРНК длиной 1.7 т.н.о., кодирующая белок, в котором трансмембранный и цитоплазматический домены замещены октапептидным «хвостом» GKRNKRLK.

Можно предполагать, что обсуждаемая укороченная мРНК hGHR образуется по механизму, сходному с механизмом образования мРНК GHRP у макаки-резус. Интрон 7/8 гена hGHR человека примерно на 95% гомологичен интрону макаки-резус и содержит консенсусный сигнал полиаденилирования, что свидетельствует в пользу гипотезы.

6. Полиморфизм и мутации в гене hGHR

6.1. Полиморфизм области 3 экзона гена hGHR.

Анализ делеционного полиморфизма экзона 3 гена hGHR проведен в выборке, включающей 111 здоровых неродственных индивидуумов (контрольная группа), принадлежащих к условно русской популяции. Результаты представлены в Табл. 2 и Табл. 3.

Таблица 2.

Распределение аллелей d и fl экзона 3 гена GHR в группе исследования

Аллель	Число аллелей в группе исследования, 111 образцов	Частота встречаемости, 222 хромосомы
d	54	0.243
fl	168	0.757

Таблица 3.

Распределение генотипов fl/fl, d/fl, d/d экзона 3 гена GHR в группе исследования

Генотип	Число генотипов в группе исследования, 111 образцов	Частота встречаемости, 111 образцов
fl/fl	64	0.577
d/fl	40	0.36 (гетерозиготность)
d/d	7	0.063

Распределение аллелей и генотипов соответствуют данным для других европейских популяций (Pantel J. et al., 2000). Функциональное значение этого полиморфизма до сих пор окончательно не выяснено.

Проведен анализ полиморфизма области экзона 3 гена hGHR в выборке лиц с идиопатической низкорослостью: всего – 77 образцов, из них с семейной низкорослостью (СН) – 53, с конституциональной задержкой роста (КЗР) – 24. В группе с СН частота генотипа d/d экзона 3 гена hGHR составила 0.1, что достоверно выше, чем в контрольной группе (111 образцов ДНК от неродственных индивидуумов) – 0.043 ($\chi^2=33,18937$; $p<0.01$).

6.2. Синдром Ларона

Дефекты в гене рецептора гормона роста и, как следствие – нечувствительность к гормону роста, являются основной причиной редкой формы карликовости – синдрома Ларона. Проведен анализ нуклеотидной последовательности кодирующих экзонов гена hGHR у девочки с классической формой синдрома Ларона и идентифицирована нонсенс-мутация в 4 экзоне: гомозиготная замена С→Т в 43 кодоне аргинина (R43X). Замена С → Т происходит в динуклеотиде

CpG, потенциальном сайте метилирования, последующее дезаминирование 5-метилцитозина приводит к транзиции. Указанный сайт является «горячей точкой» мутаций, замена R43X выявлена, по меньшей мере, еще в 7 неродственных семьях из разных популяций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Результаты изучения транскрипционного профиля гена hGHR, полученные в работе, предварительные данные о влиянии суперэкспрессии *Brm*-субъединицы ремоделирующего комплекса SWI/SNF на транскрипцию и сплайсинг некоторых нетранслируемых экзонов гена hGHR и анализ структуры хроматина в локусе гена hGHR позволяют предположить существование функциональной связи между сопряженными механизмами транскрипционной/котранскрипционной регуляции тканеспецифической экспрессии гена и структурой хроматина. Результаты исследований транскрипции ДНК в хроматине, как на моделях (мононуклеосомы, полинуклеосомы), так и, собственно, на хроматине разной степени компактизации (конденсированный хроматин, активированный хроматин – 30 нм-фибриллы, транскрибируемый хроматин), результаты изучения ремоделирования хроматина разными видами РНК-полимераз и хроматин-ремоделирующими комплексами, данные о регуляторных функциях «гистоновом коде», все вышесказанное в совокупности позволяет рассматривать хроматин не просто как форму «упаковки ДНК», а как функциональную часть «экспрессионного аппарата». Хроматин может быть коннектором или «регуляторным каркасом», который координирует механизмы регуляции экспрессии генома и благодаря которому «посттранскрипционные» процессы метаболизма РНК протекают контранскрипционно. Можно полагать, что детальное изучение влияния структуры хроматина на сопряженные процессы транскрипции и котранскрипционного процессинга РНК в локусе сложной единицы транскрипции – гена рецептора гормона роста человека, будет представлять интерес не только для области фундаментальных знаний, но и для прикладных исследований.

ВЫВОДЫ.

1. Построена функциональная карта гена рецептора гормона роста человека (hGHR), занимающего около 300 т.п.н. в коротком плече хромосомы 5 (5p13.1-p12) и имеющего протяженную 5'-регуляторную область размером более 140 т.п.н..
2. Картированы и охарактеризованы основные промоторы гена hGHR: проксимальный промотор P1, специфический для взрослой печени – основной «мишени» гормона роста, расположенный в области -17 т.п.н. от старта инициации трансляции, и дистальный промотор P2, имеющий широкую тканевую специфичность и расположенный в области -140 т.п.н. от старта инициации трансляции.
3. Экспериментально показано влияние консервативной короткой открытой рамки считывания одного из альтернативных 5'-нетранслируемых экзонов дистальной области гена hGHR на экспрессию встроенного за ней репортерного гена в системе временной экспрессии, что указывает на возможность регуляции экспрессии гена hGHR на уровне трансляции.
4. Установлено, что один из предполагаемых 5'-нетранслируемых экзонов гена hGHR (V6), выявленный ранее методом 5'-RACE, является артефактным продуктом и соответствует антисмысловой цепи ДНК в локусе гена моноацилглицерат О-ацилтрансферазы 2 человека (hMOGAT2), расположенного в длинном плече хромосомы 11 (11q13.5). Экспериментально доказана транскрипция антисмысловой цепи гена hMOGAT2.
5. Экспериментально установлена и подтверждена *in silico* локализация всех известных 5'-нетранслируемых экзонов гена hGHR. Идентифицированы 4 изоформы, содержащие как новые комбинации известных 5'-нетранслируемых последовательностей (3 изоформы), так и один новый 5'-нетранслируемый экзон (1 изоформа).
6. В некоторых опухолях и клеточных линиях опухолевого и эмбрионального происхождения выявлена экспрессия укороченной формы мРНК hGHR, не содержащей участков, кодирующих трансмембранный и внутриклеточный домены рецептора.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи

1. Tiulpakov A.N., Orlovsky I.V., Kalintchenko N.U., Lonina D.A., Kalesnikova G.S., Peterkova V.A., Bjarnason R., Baumbach L., Rubtsov P.M. A case of growth hormone insensitivity (Laron syndrome) in a Russian girl caused by a common mutation of the growth hormone receptor gene. // *The Journal of Endocrine Genetics*. 1999. V. 1. N 2. P. 95-100.
2. Орловский И.В., Свердлова П.С., Рубцов П.М. Тонкая структура, экспрессия и полиморфизм гена рецептора гормона роста человека. // *Молекулярная биология*. 2004. Т. 38. № 1. С. 29-39.
3. Студитский В.М., Орловский И.В., Чертков О.В., Ефимова Н.С., Логинова М.А., Кулаева О.И. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой 3. Часть 1. // *Вестник Московского Университета, Серия 16: Биология*. 2012. № 3. С. 6-11.
4. Студитский В.М., Орловский И.В., Чертков О.В., Ефимова Н.С., Логинова М.А., Кулаева О.И. Молекулярные механизмы транскрипции хроматина РНК-полимеразой 3. Часть 2. // *Вестник Московского Университета, Серия 16: Биология*. 2012. № 4. С. 10-16.

Тезисы устных и стендовых докладов, материалы конференций

1. Рубцов П.М., Яковенко А.Р., Лони́на Д.А., Астапова И.И., Орловский И.В., Свердлова П.С. Гены рецепторов гормона роста и пролактина как примеры сложных единиц транскрипции эукариотического генома. // II съезд Биохимического общества РАН. 1997. Пущино. С. 36-37.
2. Астапова И.И., Орловский И.В., Яковенко А.Р., Свердлова П.С., Чернов Б.К., Рубцов П.М. Клонирование и характеристика промоторных участков гена рецептора гормона роста человека. // Восьмая итоговая конференция «Геном человека-98». 1998. Москва. С. 51-52.
3. Орловский И.В., Свердлова П.С., Астапова И.И., Морозов И.А., Бабасян С.А., Лони́на Д.А., Голова Ю.Б., Чернов Б.К., Рубцов П.М. Структурно-функциональный анализ гена рецептора гормона роста человека. // Девятая итоговая конференция «Геном человека-99». 1999. Москва. С. 71.
4. Тюльпаков А.Н., Орловский И.В., Калинин Н.Ю., Лони́на Д.А., Колесникова Г.С., Петеркова В.А., Бьярнасон Р., Баумбах Л., Рубцов П.М. Характеристика мутации в гене рецептора гормона роста человека при синдроме Ларона. // Девятая итоговая конференция «Геном человека-99». 1999. Москва. С. 93.
5. Орловский И.В. Клонирование и характеристика предполагаемого промотора P3 гена рецептора гормона роста человека. // Школа-конференция «Горизонты физико-химической биологии». Пущино. 2000. Т. 2. С. 131.
6. Orlovski I.V., Sverdlova P.S., Ivanov D.S., Prassolov V.S., Rubtsov P.M. Characterisation of the multiple promoters of the human growth hormone receptor gene. // *Proceedings of The Symposium "Current problems of Molecular Genetics and Cell Biology"* (Eds. G.P. Georgiev, S. Olsnes, Yu.V. Kozlov). 2001. MaxPress. Moscow. P. 227-232.

7. Орловский И.В., Свердлова П.С., Рубцов П.М. Изучение полиморфизма гена рецептора гормона роста человека. // III съезд Биохимического общества РАН. 2002. С.-Петербург. С. 306.
8. Орловский И.В., Витебская А.В., Петеркова В.А., Рубцов П.М. Анализ полиморфизма гена рецептора гормона роста человека у пациентов с идиопатической низкорослостью. // III съезд Всероссийского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. 2004. Москва. Т. II. С. 15.
9. Orlovski I. *Trans*-splicing as a possible mechanism of the human growth hormone receptor mRNA isoform formation. // Workshop “*Coupling between transcription and RNA processing*”. 2004. Baeza (Spain).
10. Orlovski I., Rubtsov P. Identification and analysis of the noncoding antisense transcript in the human acyl-CoA:monoacylglycerol O-acyltransferase (hMOGAT2) gene locus. // Workshop “*RNA-protein interactions in development and cancer*”. 2009. Baeza (Spain).