



УДК 575.313

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ УЧАСТКОВ ПРИКРЕПЛЕНИЯ ДНК К ЯДЕРНОМУ МАТРИКСУ (S/MARs)

© 2004 г. И. П. Чернов, С. Б. Акопов, Л. Г. Николаев[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 22.03.2002 г. Принята к печати 15.07.2002 г.

Суммированы современные представления о петельно-доменной организации хроматина и роли в ее образовании, поддержании и регуляции участков ДНК, способных специфически связываться с ядерным матриксом или ядерным скаффолдом (S/MARs). Рассмотрены структурные особенности S/MARs, пути их связывания с ядерным матриксом, а также возможные механизмы их участия в регуляции генетической активности.

Ключевые слова: хроматин; ядерный матрикс, ядерный скаффолд, SAR; MAR, петельные домены.

УПАКОВКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ

Основные принципы организации ДНК в составе хроматина были сформулированы еще в конце 1970-х годов и с тех пор не претерпели существенных изменений [1–3].

Принято выделять три уровня компактизации ДНК в интерфазном ядре.

1. На *нуклеосомном* уровне ДНК находится в комплексе с гистонами H2A, H2B, H3 и H4, образующими белковую сердцевину нуклеосомы (имеющую в своем составе по две молекулы каждого белка) и гистоном H1, имеющим сродство к линкерным участкам. ДНК располагается на поверхности нуклеосомы, образуя 1.75 сверхспиральных витка вокруг ее сердцевины, что соответствует фрагменту ДНК длиной 140–145 п.о. Индивидуальные нуклеосомы соединены линкерными участками, длины которых варьируют, поэтому длина полного нуклеосомного повтора может варьировать от 155 до 210 п.о. [4].

2. Следующий уровень образован *фибриллами* диаметром около 30 нм, формируемыми с участием гистона H1 [5]. Предложены три модели укладки 30-нм фибриллы – соленоидальная [6], нуклеомерная [7] и модель в виде зигзагообразно расположенных слоев [8, 9]. Детальная структура 30-нм фибриллы до сих пор остается неясной, хотя большинство исследователей склоняется к соленоидальной модели.

3. *Петельно-доменный* уровень организации хроматина. Электронно-микроскопические исследования дают основания полагать, что фибриллы хроматина диаметром 30 нм организованы в серии сверхскрученных петель (доменов), прикрепленных в своем основании к белковому компоненту ядерной оболочки [1, 10–12]. Более подробно этот уровень организации хроматина рассмотрен ниже.

ЯДЕРНЫЙ МАТРИКС И ЯДЕРНЫЙ СКАФФОЛД

Скелетная структура, которая сохраняет общую форму клеточного ядра после удаления основной массы ДНК и связанных с ней белков, была названа ядерным матриксом [13]. Ядерный матрикс состоит в основном из белков, но содержит также небольшие количества ДНК (см. ниже), РНК и других компонентов [14]. Появилось предположение, что именно ядерный матрикс является тем структурным компонентом интерфазного ядра, который и организует фибриллу хроматина диаметром 30 нм в петельные домены.

В настоящее время широко используют два метода получения ядерного матрикса.

Сокращения: ARBP – attachment region binding protein (белок, связывающий участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу); LAS – loop attachment site (участок прикрепления петель ДНК); LIS – 3,5-дигидрохлорид лития; LTR – long terminal repeat (длинный концевой повтор); MAR, SAR, S/MAR – matrix (scaffold) associated region (фрагменты ДНК, специфически связывающиеся с ядерным матриксом или скаффолдом); ямДНК – ДНК ядерного матрикса; MRS – MAR/SAR recognition signature (консенсусная последовательность ДНК, характерная для S/MARs); SAF-A, SAF-B – scaffold attachment factors A or B (белки А или В, специфически связывающиеся с S/MARs); SATB – special AT-rich sequence-binding protein (белок, специфически связывающий AT-богатые последовательности ДНК).

[#] Автор для переписки (эл. почта: lev@humgen.siocb.ras.ru; тел.: (095) 330-70-29; факс: (095) 330-65-38).

Первый метод [13, 15] основан на обработке изолированных клеточных ядер ДНК-азой I, с последующим удалением основной массы внутриядерных белков и ДНК с помощью промывки буфером, содержащим 2 М NaCl.

Альтернативный метод получения ядерного матрикса (названного авторами метода ядерным скаффолдом) основан на действии 3,5-дийодсалицилата лития [16]. В этом случае удаление основной массы ядерных белков осуществляется более мягко, путем промывок изолированных клеточных ядер низкосолевым буфером, содержащим LIS, а для удаления ДНК из дегистонизированных ядер применяют рестриктазы.

По данным электронной микроскопии, для ядерного матрикса характерно наличие трех структурных компонентов: остаточной ядерной ламины (nuclear lamina) с поровыми комплексами, остаточного ядрышка и фибриллярно-гранулярной структуры, заполняющей пространство внутри ядра и называемой внутренним матриксом [14, 15].

Позднее был предложен еще один подход к идентификации в условиях, близких к физиологическим, структур, из которых происходит ядерный матрикс [17, 18]. Метод основан на электрофоретическом удалении основной массы компонентов ядра из клеток, помещенных в 0.5% агарозу. Лизис инкапсулированных клеток проводят в условиях, близких к физиологическим, клеточный лизат, иммобилизованный в агарозном геле, обрабатывают ДНК-азой I или рестриктазами, после чего подвергают его электрофорезу. Относительно низкомолекулярные компоненты (белки, фрагменты хроматина) свободно проходят через слой агарозы, а остаточные ядра (и другие крупные клеточные структуры) остаются фиксированными в толще геля. Ультроструктура полученных таким образом остаточных ядер близка к структуре ядерного матрикса из изолированных ядер.

В метафазной хромосоме структурой, аналогичной по составу и возможным функциям интерфазному ядерному матриксу (скаффолду), является метафазный скаффолд [19].

ДНК В СОСТАВЕ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА И ЕЕ СВОЙСТВА

Определение и способы получения ДНК ядерного матрикса

В составе ядерного матрикса остаются фрагменты ДНК, прочно связанные с белковым скелетом и устойчивые к действию высоких концентраций солей и нуклеаз. Содержание прочно связанной ДНК в составе ядерного матрикса может варьировать в зависимости от метода его получения. При длительном воздействии нуклеаз в совокупности с жесткой обработкой изолированных

ядер в ядерном матриксе сохраняется небольшое (1–3%) количество прочно связанной ДНК (ямДНК) [13]. Имеются данные, что ямДНК входит в состав ядерного матрикса в виде моно- и олигонуклеосом [20].

Появление петельно-доменной гипотезы строения интерфазного хроматина [1, 10] вызвало интерес к изучению ямДНК как фракции, содержащей потенциальные участки прикрепления оснований петельных доменов к ядерному матриксу. Были предприняты попытки клонирования и анализа этой ДНК непосредственно из ядерного матрикса, полученного либо методом солевой экстракции [21], либо при помощи LIS [22]. Основным недостатком этого подхода заключается в том, что в процессе выделения ядерного матрикса возможно перераспределение и захват ядерным матриксом тех фрагментов ДНК, которые не входили в его состав *in vivo*. При дальнейшем анализе такие фрагменты нельзя отличить от настоящей ямДНК.

Подход, использующий инкапсуляцию клеток в легкоплавкой агарозе (см. выше), лишен части перечисленных недостатков. Предполагаемые участки прикрепления петельных доменов, идентифицированные этим методом, были названы участками прикрепления петель (LAS, loop attachment sites) [18]. Метод, однако, не получил широкого распространения, по-видимому, ввиду сложности и невысокой воспроизводимости.

S/MAR-элементы

Значительно более распространенным стал другой метод идентификации последовательностей ДНК, предположительно ответственных за прикрепление оснований петельных доменов хроматина к ядерному матриксу. Метод основан на специфическом связывании некоторой фракции экзогенных фрагментов ДНК с выделенным ядерным матриксом (скаффолдом) *in vitro* в присутствии большого избытка прокариотической ДНК. Такие фрагменты для матрикса, полученного методом с использованием 2 М NaCl, были названы матрикс-ассоциированными областями (MARs, matrix attachment or associated regions) [23]. В дальнейшем было показано, что ядерный скаффолд, полученный методом LIS-экстракции, также способен специфически связываться с некоторыми фрагментами ДНК *in vitro*, и соответствующие фрагменты геномной ДНК были названы скаффолд-ассоциированными областями (SARs, scaffold associated regions) [24]. Большое число работ, посвященных этим элементам, не выявили принципиальных различий между SARs и MARs. В настоящее время многие авторы объединяют эти последовательности под общим названием S/MAR-элементов или S/MARs [25]. Этой терми-

нологии мы будем придерживаться далее. Основной недостаток метода связывания *in vitro* заключается в том, что часто бывает затруднительно доказать, что фрагменты ДНК (S/MARs), даже обладающие высоким сродством к ядерному матриксу, действительно входят в его состав *in vivo*. Несмотря на указанные недостатки, этот метод используется наиболее широко, и большая часть имеющейся информации о потенциальных участках прикрепления ДНК к ядерному матриксу получена именно для S/MAR-элементов.

Структурные особенности ДНК ядерного матрикса

Анализ нуклеотидной последовательности S/MAR-элементов, ям ДНК и LAS многих генов человека, млекопитающих и растений не выявил протяженных участков гомологии между ними, однако в ряде случаев удалось проследить характерные особенности некоторых групп S/MARs и предпринять попытки их классификации [25–28]. Одной из характеристик S/MARs, как отмечают многие авторы, является обогащенность этих последовательностей АТ-парами [15, 27, 29, 30]. К числу распространенных типов АТ-богатых последовательностей S/MAR-элементов принадлежат мотивы А-бокса (ААТAAAT_cAAA), Т-бокса (TT^A/TT^T/A^TTT^T/A^TTT), а также последовательность АТАТТТ (вместе с ее вариантами АТАТТТТТ и ААТАТТ) [31–33] и последовательности ТААТ и ТАААТ [27]. Склонность последовательностей, обогащенных АТ-парами оснований, к конформационным переходам под действием торсионного напряжения привела к концепции стресс-индуцированной дестабилизации двойной спирали (SIDD, stress-induced duplex destabilization) [34, 35]. Согласно этой концепции, S/MAR-элементы содержат участки, легко подверженные плавлению (BUR, base unpairing regions). Под действием стресса дестабилизация двойной спирали начинается в области, называемой базовым участком расплетания (CUE, core unwinding element), и постепенно распространяется на весь S/MAR-элемент, что повышает его сродство к ядерному матриксу [36].

Многие S/MAR-элементы обогащены последовательностями, потенциально способными образовывать неканонические вторичные структуры ДНК. Так, наличие инвертированных повторов предполагает возможность образования крестообразных структур [35, 37], с которыми связываются специфические белки [38]. В составе S/MARs наблюдались и потенциальные участки образования тройной спирали [27], а также прямые повторы [39]. Ряд авторов отмечают изгибы ДНК в области взаимодействия с ядерным матриксом [40, 41].

Во многих случаях внутри АТ-богатых районов S/MAR-элементов были найдены сайты рас-

щепления топоизомеразой II GTN^A/_TA^G/_TATTNAT-NN^A/_G [23, 31] и показано, что топоизомераза II действительно связывается с ними [42, 43]. Топоизомераза I, сайт разрезания которой также относится к числу АТ-богатых (AAAAAGACTT↓A-GAAAAATT) [44], связывается с матриксом опосредованно, через активно транскрибируемые последовательности, к которым имеют повышенное сродство как ядерный матрикс, так и топоизомераза I [27].

Попытки поиска консенсусных последовательностей для S/MAR-элементов привели к обнаружению мотива MRS, который представляет собой две вырожденные последовательности (ААТAA_YAA и АWWRTAANNWGN_{NNC}), расположенные в непосредственной близости друг от друга. Во всех случаях обнаружения мотива MRS в последовательности ДНК оказывалось, что данный фрагмент специфически связывается с ядерным матриксом. Анализ более 300 т.п.о. геномной ДНК из различных эукариотических организмов показал, что мотив MRS точно предсказывает до 80% S/MAR-элементов [45]. Тем не менее далеко не все известные S/MAR-элементы имеют в своем составе последовательности MRS. Предполагается, что свойства S/MARs определяются скорее общностью структурных особенностей их ДНК, таких, как наличие АТ-богатых областей и/или участков, склонных к изгибанию, чем сходством самих последовательностей S/MARs [46].

На основании общих свойств S/MARs было предложено несколько компьютерных программ для поиска S/MAR-элементов, учитывающих характерные для них мотивы [47–49]. Применимость этих программ к поиску S/MARs в составе геномной ДНК млекопитающих и растений остается пока под вопросом в связи с отсутствием достаточного числа идентифицированных и картированных S/MAR-элементов, необходимых для такой проверки. Имеющаяся на сегодняшний день база данных S/MAR-элементов (S/MARt DB) [50] содержит менее 400 S/MAR-элементов, для большей части которых не имеется информации об их положении в геноме.

Таким образом, наиболее характерными структурными чертами S/MAR-элементов животных и растений, которые влияют на специфичность и силу их взаимодействия с ядерным матриксом, являются:

1. Число и размер потенциальных участков дестабилизации двойной спирали ДНК;
2. Наличие инвертированных повторов;
3. Присутствие участков, способных образовывать неканонические вторичные структуры (изгибы ДНК, тройную спираль, Z-форму ДНК и др.);
4. Присутствие сайтов расщепления топоизомеразой II.

В то же время следует отметить, что значительная часть идентифицированных S/MARs, обладающих высоким сродством к ядерному матриксу, не укладывается в эти правила, что указывает на существование и других классов этих элементов [21, 51–54].

ФУНКЦИИ S/MARs

Образование петельных доменов

Основной функцией, приписываемой S/MARs и сходным последовательностям, является образование, поддержание и регуляция функционирования петельных доменов интерфазного хроматина, а также образование и поддержание компактной структуры метафазных хромосом. Исходя из среднего размера петельных доменов млекопитающих в 100 т.п.о. [17, 27, 55, 56] и полной длины генома, можно оценить, что число S/MARs в геноме человека составляет приблизительно 30000. Несколько иная картина наблюдается у растений. Средний размер петель у табака – 17, у риса и сорго – 9, у кукурузы – 45, у арабидопсиса – 25 т.п.о [57, 58]. Предложена гипотеза [36], связывающая размер петельного домена с тем, насколько высока транскрипционная активность находящихся в нем генов (например, кластер гистоновых генов имеет размер домена около 5 т.п.о.), или с тем, насколько быстро должна клетка активировать транскрипцию данного домена в ответ на соответствующее воздействие (локусы генов интерферонов типа I имеют размеры от 3 до 14 т.п.о.) [59]. В отличие от таких коротких петель, более протяженные домены содержат гены, которые транскрибируются только на определенных стадиях развития или же обладают строгой тканеспецифичностью.

Число участков прикрепления и, следовательно, длина петельных доменов зависят от типа и состояния клетки. В частности, некоторые участки ДНК, связанные с матриксом в интерфазе, теряют эту связь при образовании скаффолда метафазных хромосом и восстанавливают ее через 2 ч после митоза [60]. Исследование зависимости между количеством репликационных и хроматиновых петель в процессе развития *Xenopus* показало, что на стадии бластулы и гаструлы ядерный матрикс связывает большее количество S/MAR-элементов, чем ядерный матрикс поздних стадий развития и взрослой особи. Таким образом, часть S/MAR-элементов перестает быть таковыми в процессе дифференцировки клеток и развития организма [61]. Трансформация фибробластов вирусом SV40 также приводит к изменению в длине доменов и распределении связанных с матриксом фрагментов ДНК [62]. Ярким примером тканеспецифичности служит S/MAR-элемент,

связывающийся с ядерным матриксом только после активации Т-клеток [63].

Было показано, что после теплового шока возникает новый S/MAR-элемент в районе промотора гена белка теплового шока (heat shock protein) *hsp70* мыши, который изменяет организацию домена и приводит к экспрессии данного гена, играющего ключевую роль в ликвидации последствий температурного воздействия на клетку [64]. После теплового шока происходит увеличение общего числа сайтов связывания ДНК с ядерным матриксом, в частности, стабилизируется 5' S/MAR-элемент и образуется дополнительный S/MAR на 3'-конце гена аденозиндезаминазы [65].

Тканеспецифичные S/MARs были обнаружены и в других генах. Одним из наиболее хорошо изученных в этом отношении является домен длиной 47.5 т.п.о., содержащий ген аполипопротеина В (*apoB*) человека, преимущественно экспрессирующийся в клетках печени и кишечника. Домен ограничен с 5'- и 3'-концов двумя S/MAR-элементами. В составе домена был обнаружен третий (проксимальный) S/MAR-элемент, который связан с матриксом только в клетках печени (HepG2), где ген *apoB* активно транскрибируется и не связан в клетках линии HeLa [66]. Дальнейшие эксперименты по транзientной (временной) экспрессии и стабильной интеграции в геном подтвердили, что S/MAR-элементы гена *apoB* обладают инсультаторной функцией и не проявляют энхансерной активности [67, 68]. Кроме того, S/MAR гена “яблочного” фермента (malic enzyme) птиц прочно связан с ядерным матриксом в тимocyтах, где он активен, но не в ретикулоцитах [69].

Такого рода данные привели к предположению, что S/MARs могут быть подразделены на два типа [70, 71]. S/MAR-элементы первого типа, называемые разными авторами *стабильными, конститутивными, структурными*, обеспечивают присоединение оснований петель к ядерному матриксу и образование доменов независимо от типа тканей, клеток и стадий клеточного цикла. S/MARs второго типа (*динамические, факультативные, функциональные, тканеспецифичные*) осуществляют регуляторную функцию, образуя временные петельные домены, необходимые на определенной стадии жизни клетки либо в клетках определенного типа [25, 72]. Эта привлекательная гипотеза широко обсуждается, но пока не доказана. В ее пользу, кроме доводов, приведенных выше, свидетельствуют и данные о тканеспецифичном характере экспрессии белков, узнающих S/MARs (см. ниже).

Нейтрализация эффекта положения

Как обсуждалось выше, участки ДНК, имеющие сродство к ядерному матриксу, часто локали-

зуются в некодирующих областях генома, обозначая предполагаемые края хроматиновых доменов. Идея независимых доменов получила новый импульс после того, как было обнаружено, что S/MARs способны нейтрализовать эффект положения и усиливать транскрипцию генов, ненаправленно интегрированных в геном.

Уровень транскрипции генов, стабильно интегрированных в геном клеток в культуре, а также трансгенных организмов, в общем случае непредсказуем и зависит от участка интеграции. Было продемонстрировано, что наличие S/MARs на краях интегрируемого гена усиливает его транскрипцию и делает ее мало зависимой от сайта интеграции [73–76]. Интеграция полного домена, содержащего ген β -интерферона человека вместе с окружающими его S/MARs, повышало уровень его транскрипции в 20–30 раз по сравнению с конструкцией, не содержащей S/MARs [77]. В большинстве случаев подобные эффекты наблюдаются только при стабильной интеграции конструкции в геном клетки-хозяина и отсутствуют или сильно ослабевают в случае транзиторной экспрессии [35, 75, 78–80].

Сходной биологической активностью, нейтрализующей эффект положения и определяющей границы функциональных доменов хроматина, обладают последовательности, названные инсуляторами (insulators) [81, 82]. Имеются указания на то, что механизм действия инсуляторов предполагает их взаимодействие с ядерным матриксом. Действительно, по крайней мере в некоторых случаях активности S/MARs и инсуляторов локализуются в одном фрагменте ДНК [83–85], однако имеются также данные о том, что эти активности можно разделить [86] или что такого рода активности наблюдаются не для любых генных конструкций [87]. Таким образом, вопрос о возможной связи S/MARs и инсуляторов окончательно не решен и требует идентификации и сравнительного анализа большего числа этих элементов.

Другой возможный механизм влияния S/MARs на транскрипцию использует эффекты метилирования. Если в составе ретровирусного вектора на основе вируса лейкоза мышей Молони (Mo-MuLV, Moloney murine leukemia virus) непосредственно перед 3'-концевым LTR находится S/MAR из гена β -интерферона человека, то экспрессия репортерного гена остается стабильной в течение длительного времени (более 4 месяцев) и наблюдается полное отсутствие метилирования LTR. В аналогичной конструкции, не содержащей S/MAR-элемента, происходит значительное метилирование LTR и отсутствует экспрессия репортерного гена. Это прямое подтверждение того, что S/MAR-элементы способны препятствовать метилированию

в транскрипционно активных локусах, тем самым поддерживая их экспрессию [88].

Нейтрализация эффекта положения и активация транскрипции трансгенов с участием S/MARs открывает перспективы для использования их в трансгенозе и генной терапии [89].

S/MARs как участки интеграции ретровирусных векторов

При внедрении репортерных генов в геном культивируемых клеток при помощи ретровирусного вектора, произведенном методом, гарантирующим внедрение индивидуальных копий, было обнаружено, что во всех проверенных трансформантах встраивание произошло в области, способные связываться с ядерным матриксом *in vitro* (S/MARs) и окруженные ДНК, потенциально склонной к изгибанию [36, 51]. Эти S/MARs обладали нестандартной последовательностью, не содержали протяженных АТ-обогащенных участков и, напротив, были обогащены парами нуклеотидов СА/ТГ и АГ/СТ.

S/MARs в составе ретроэлементов

Участки потенциального связывания с ядерным матриксом были обнаружены в составе повторяющихся элементов генома, способных к ретроинверсии, в частности в длинных рассеянных элементах (LINE, long interspersed element) [53, 90–92] и RTVL-1a (Николаев Л.Г. и соавт., неопубликованные данные). Кроме того, одна из последовательностей, обнаруженных в клонотеке участков прикрепления петель хроматина (LAS) [18], имеет также очень высокую степень идентичности с LINE-1. Последовательности небольших инвертированных повторов, способных к транспозиции (MITE, miniature inverted repeat transposable element) растений также, по-видимому, содержат S/MAR [57, 93]. Возможно, что наличие S/MAR-элемента может являться характерной особенностью и других ретропозонов. Перемещение S/MARs в составе ретроэлементов в процессе эволюции геномов может приводить к крупномасштабным изменениям структуры хроматина и изменениям в регуляции генов, находящихся в образуемых ими доменах.

БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С S/MARs

Связывание S/MARs с ядерным матриксом осуществляется, по всей видимости, через белки матрикса, способные узнавать и прочно связываться с последовательностями S/MARs. Несколько таких белков было идентифицировано и охарактеризовано за последние годы.

Был обнаружен специфический для тимоцитов белок, специфически связывающийся с АТ-богатыми последовательностями (SATB1, special AT-rich binding protein) [94], способный высокоэффективно связываться с малой бороздкой ДНК S/MAR-элементов, которые содержат в одной из нуклеотидных цепей участки, обогащенные А, Т и С, и обладают потенциально легкоплавкими участками BUR. Было показано, что в его составе имеется участок, состоящий из 150 а.о., обладающий всеми S/MAR-связывающими свойствами целого белка и содержащий новый ДНК-связывающий мотив и атипичский гомеодомен [95, 96]. Позднее было показано, что SATB1 является сильным транскрипционным супрессором генов, окруженных S/MAR-элементами, и не влияет заметным образом на уровень транскрипции генов, окруженных АТ-богатыми элементами, не обладающими свойствами S/MARs [97]. Экспериментальный ген SATB1, выявивший множественные дефекты в развитии Т-клеток и существенные изменения уровня экспрессии различных генов [98]. Подобные свойства обнаруживает и белок p114 из линии клеток карциномы молочной железы (SK-BR-30). Интересно, что S/MAR-связывающая активность p114 не обнаруживается в культуре нормальных клеток молочной железы [99].

Белок, связывающийся с участками прикрепления ДНК к ядерному матриксу (ARBP, attachment region binding protein), кооперативно и специфически связывается с S/MARs из локуса гена куриного лизоцима, а также с S/MARs дрозофилы, мыши и человека. Он предпочитает связываться с мотивом (5')GGTGT, окруженным АТ-обогащенными последовательностями [100–102]. ARBP, к ДНК которого была клонирована, обнаруживает высокую степень гомологии с белком крыс, связывающимся с метил-СрG (MeCp2, methyl-CpG-binding protein). Оба белка содержат высококонсервативный домен, связывающий S/MAR-элементы. Было показано, что ARBP/MeCp2 является многофункциональным белком, принимающим участие в организации хроматина, образовании петельно-доменной структуры и узнавании метилированной ДНК [103]. Позднее было показано, что этот белок взаимодействует с белком mSin3A как корепрессор и, связываясь с S/MAR-элементами, образует комплекс, содержащий гистондеацетилазы. Предполагается, что в результате действия деацетилаз вокруг S/MAR-элемента образуется локальная область неактивного хроматина [104].

SP120 с молекулярной массой 120 кДа был выявлен первоначально как белок, кооперативно взаимодействующий с определенными фрагментами ДНК гена к-иммуноглобулина мыши и гена *fushi-tarazu* дрозофилы. Отмечалось, что многие свойства, в том числе способность связываться с

ДНК кооперативно, сходны у данного белка и белка ARBP. В настоящее время считается, что, несмотря на некоторое сходство, белки SP120 и ARBP все же различны [105].

Фактор связывания со скаффолдом А (SAF-A, scaffold attachment factor A) присутствует в препаратах комплекса гяРНП, участвует в упаковке РНК в РНП-частицы и может образовывать глобулярные и филаментные комплексы с ДНК и РНК [106–108]. Возможно, одна из функций SAF-A заключается в том, что он принимает участие в формировании структуры хроматина и способствует ее сохранению на протяжении всей интерфазы. *In vitro* SAF-A имеет склонность к образованию гомополимеров. Было показано, что одна молекула белка слабо связывает S/MARs и только одновременное взаимодействие нескольких молекул дает их сильное и строго специфическое связывание. Первичная структура белка SAF-A отражает его двойную функцию. С-Концевой домен связывает РНК и однонитевую ДНК, а 45 а.о. на N-конце, называемые SAF-боксом (SAF-box), ответственны за связывание S/MARs [109]. SAF-боксы присутствуют во многих эукариотических белках, причем по крайней мере некоторые из этих белков также способны связываться с S/MARs. Содержит SAF-боксы, например, связывающийся с S/MAR-элементами белок SAF-B [110]. В процессе апоптоза SAF-боксы отщепляются каспазой 3, в результате чего SAF-A теряет способность связывать S/MAR-элементы и отделяется от ядерного матрикса [111]. Сходный с SAF-A белок SAF-B, или HET (Hsp27-ERE-TATA-binding protein), обнаруживает четко выраженную способность избирательно связываться с регуляторными участками генов некоторых белков теплового шока и с областью ДНК, содержащей участок связывания эстрогенового рецептора [112].

Специфичный для В-клеток белок, регулирующий транскрипцию гена иммуноглобулина Н (Bright, В cell regulator of IgH transcription), связывается с регуляторными S/MARs, фланкирующими интронный энхансер гена тяжелых цепей иммуноглобулинов, и активировать транскрипцию этого гена, но только в его природном окружении и в клетках В-типа. Белок содержит домен, необходимый для его тетрамеризации и последующего связывания S/MARs [113, 114].

Способность связывать S/MAR-элементы обнаруживает также гомеодоменный белок Cux/CDP (CAAT displacement protein), преимущественно экспрессирующийся в ранних В-клетках и никогда – в зрелых В-клетках [115]. Предполагается, что этот белок является специфичным для типа клеток и стадии их дифференцировки негативным регулятором интронного энхансера генов тяжелых цепей иммуноглобулина, причем действие Cux/CDP опосредовано окружающими энхансер

S/MARs. Активность белка Cux/CDP позволяет считать его антагонистом белка Bright [116]. Другим примером, подтверждающим, что CDP является транскрипционным репрессором, непосредственно взаимодействующим с интронными S/MARs, послужили исследования регуляции транскрипции гена *CYP7A1* (холестерин-7- α гидроксисилазы) человека [117].

Недавно идентифицирован еще один связывающий S/MARs белок, SMAR1, имеющий общие участки связывания и некоторые общие структурные свойства с белками SATB1, Cux/CDP и Bright [118].

Специфически связываются с S/MARs и некоторые белки растений. Из томатов выделен белок MFP1 (MAR binding filament-like protein 1), содержащий ДНК-связывающий домен нового типа [119, 120]. В клетках табака недавно был обнаружен и охарактеризован мультидоменный белок AHM1 (AT hook-containing MAR binding protein 1) [121].

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА ХРОМАТИНА В ГЕНОМНОМ КОНТЕКСТЕ

S/MARs и петельные домены

Как отмечалось выше, в соответствии с петельно-доменной моделью, S/MARs должны фланкировать определенные гены или группы генов, образуя независимо регулируемую структурно-функциональную единицу [66, 122]. Для доказательства этого положения было предпринято несколько попыток расположить S/MARs на геномных последовательностях. Точность таких попыток, однако, была ограничена достаточно большими размерами фрагментов, содержащих S/MARs, получавшихся после гидролиза крупнощепящими рестриктазами (до 10 т.п.о.), существенно превышающими оценочную длину S/MAR [27]. Таким образом, в большинстве случаев можно было утверждать лишь то, что идентифицированный S/MAR находится в пределах рестриктового фрагмента, а точное его положение оставалось неизвестным. Кроме того, отсутствие перекрывающихся клонов для достаточно протяженных областей генома позволяло картировать S/MARs только в отдельных охарактеризованных локусах, как правило, содержащих единичные гены или семейства генов одного класса [123]. Так, четыре S/MAR-элемента были картированы в локусе длиной 200 т.п.о., содержащем гены константных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши [124], и восемь – в локусе β -глобиновых генов человека длиной 90 т.п.о. [125].

Тем не менее несколько S/MARs были картированы на содержащем ряд неродственных генов участке генома дрозофилы длиной 320 т.п.о. Размер предполагаемых доменов в этом случае составил 26–112 т.п.о. Домены содержали до восьми

генов, часть из которых транскрибировалась. Корреляции между активностью генов и нахождением их в пределах выявленных доменов, однако установить не удалось [126].

Построение протяженных контигов клонированной ДНК позволило картировать S/MARs (ямДНК) в локусе генома дрозофилы длиной более 800 т.п.о. [127, 128]. Было идентифицировано 85 рестриктных фрагментов, выделяющихся совместно с ядерным матриксом, полученным LIS-экстракцией; 12 из этих фрагментов присутствовали в большинстве клеток (“сильные” S/MARs), 44 – только в части клеток, а остальные – лишь в отдельных клетках. “Сильные” S/MARs располагались между транскрипционными единицами и подразделяли локус на петли размером 15–115 т.п.о.

Заслуживает внимания метод идентификации петельных доменов, разработанный Разиным и соавт. [129, 130]. Метод основан на том, что после солевой экстракции ядер клеток в составе скелетных структур ядра остается только непосредственно с ними связанная топоизомераза II, которая сохраняет свою активность и находится в прямом контакте с ДНК, ответственной за прикрепление оснований петель к ядерному матриксу. Клетки заключали в агарозные блоки, проницаемость их мембран повышали обработкой неионным детергентом и экстрагировали 2 М NaCl, после чего инкубировали в буфере для топоизомеразы II в присутствии эпподофилотоксина VM-26, ингибитора лигазной активности топоизомеразы. При этих условиях в ходе катализируемой топоизомеразой реакции в молекулу ДНК вносится двухцепочечный разрыв, что позволяет получить набор фрагментов ДНК, концы которых определяются участками расщепления топоизомеразой и сближены с основаниями петель. Этим методом в локусе генома дрозофилы длиной ~800 т.п.о. было идентифицировано 11 участков расщепления, 10 из которых совпали с ранее выявленными S/MARs, однако только один – с “сильным” S/MAR-элементом [56, 130, 131].

Позднее была предпринята попытка реконструировать доменную структуру локуса 9p21–22 человека, содержащего кластер генов интерферонов типа I. Было обнаружено 36 S/MAR-элементов, 29 из которых обладали высокой, а 7 – слабой способностью связывать ядерный матрикс. Интерфероновый локус оказался состоящим из серии небольших доменов (от 2 до 10 т.п.о.), в которых кодирующие последовательности генов фланкируются S/MAR-элементами [59].

В результате анализа участка хромосомы 1 кукурузы было выявлено девять потенциальных петельных доменов длиной от 6 до 75 т.п.о. [132].

Недавно была предпринята попытка картирования S/MARs по связыванию с матриксом *in vitro* для фрагмента хромосомы 14 человека длиной в

150 т.п.о., содержащего кластер серпиновых генов. Было обнаружено пять независимых S/MAR-элементов. Один из них расположен в 16 т.п.о. от начала гена α -1-антитрипсина, три находятся между антитрипсинподобным геном (ATR, anti-trypsin-like gene) и геном кортикостероидсвязывающего глобулина (CBG, corticosteroid binding globulin) и один – в интроне гена CBG. Положение первых трех S/MAR-элементов указывает на то, что гены α -1-антитрипсина и ATR находятся в одном хроматиновом домене длиной 50 т.п.о., отделенном от CBG двумя S/MAR-элементами. Два других S/MAR-элемента располагаются в промоторной области и в первом интроне гена CBG [133].

Установление первичной структуры протяженных геномных последовательностей эукариотических организмов, в частности первого варианта полной нуклеотидной последовательности генома человека [134], открывает возможности для определения точного положения большого числа S/MARs относительно близлежащих генов. Как упоминалось выше, число S/MARs в геноме человека оценивается примерно в 30000, а в геномах растений это число, по-видимому, существенно больше. Наверное, для картирования S/MARs на протяженных участках генома, не говоря уже о полных геномах, имеющиеся методы фрагментации и определения матрикссвязывающей активности отдельных фрагментов ДНК в большинстве случаев окажутся непригодны. Для решения таких задач необходимо создание функциональных клонотек, содержащих большое число потенциальных S/MARs. Для точной локализации S/MARs средний размер фрагментов в таких клонотеках должен соответствовать средней длине S/MAR, то есть около 500 п.о. В настоящее время предложено два способа создания таких клонотек. Первый из них основан на клонировании фрагментов ДНК, выделяющихся вместе с ядерным матриксом (ямДНК), полученным при использовании разных методик [18, 21, 22]. Клонотека из культуры клеток человека, сконструированная таким образом [21], содержала почти половину клонов, соответствующих только одному S/MAR-элементу длиной 542 п.о. В клонотеке LAS, полученной в работе [18], был обнаружен лишь 41% уникальных последовательностей, обладающих сродством к ядерному матриксу. Библиотека S/MARs табака [22] была получена методом, аналогичным использованному в работе [21]. Проверка 34 случайно выбранных клонов показала, что только 30% из них предпочтительно связываются с ядерным матриксом *in vitro*, то есть являются S/MARs согласно их определению. Понятно, что качество полученных клонотек не позволяет картировать содержащиеся в них последовательности напрямую и требует предварительного анализа клонов на их способность связываться с ядерным

матриком. Картирование последовательностей из полученных библиотек не проводилось.

Другой подход был использован в работах [52, 53]. Он основан на получении клонотеки коротких (в среднем 500 п.о.) геномных фрагментов, представляющих последовательность хромосомы 19 человека, с последующим отбором субпопуляции фрагментов, которые способны связываться с ядерным матриксом *in vitro*, то есть содержащих S/MARs. Из полученной мини-библиотеки было проанализировано 55 клонов, 50 из них предпочтительно связывались с ядерным матриксом. Более 30 последовательностей были картированы на хромосоме 19 человека в соответствии с их первичной структурой. Развитием данного подхода явилась работа [54], где была получена клонотека S/MARs полностью секвенированного локуса генома человека длиной 1 млн.п.о., и точно картировано 16 S/MAR-элементов. Локус находится между маркерами *D19S208* и *COX7A1* и содержит 22 идентифицированных гена. 11 межгенных S/MARs подразделяют локус на 10 доменов длиной от 6 до 272 т.п.о. со средней длиной 88 т.п.о. Еще пять S/MARs были найдены в интронах известных генов (см. ниже). Имеется некоторая корреляция между тканеспецифичностью экспрессии генов, входящих в один и тот же домен.

Интронные S/MARs

Для образования петельных доменов S/MARs должны фланкировать один или несколько генов. Тем не менее последовательности, обладающие свойствами S/MARs, нередко обнаруживаются в интронах различных генов и, следовательно, входят в состав транскрибируемой РНК. Такие S/MARs обнаружены, например, в генах легкой и тяжелой цепи иммуноглобулинов мыши [23, 29], гене α 2-макроглобулина крыс [135], топоизомеразы I человека [136] и в ряде других генов [54].

Было обнаружено, что S/MARs тесно ассоциированы с интронными энхансерами генов тяжелых и к-легких цепей [23] иммуноглобулинов и гена β -Т-клеточного рецептора [118, 137] и δ -Т-клеточного рецептора [138]. Интронный энхансер тяжелых цепей иммуноглобулинов фланкирован S/MAR-элементами с обеих сторон. Эти S/MARs вовлечены в репрессию транскрипции локуса в клетках не В-типа [139]. В В-клетках эти элементы действуют синергически с энхансером и активируют транскрипцию [140–143]. S/MAR-элементы, фланкирующие энхансер тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, активируют концевой промотор варибельного участка (V(H)-промотор), увеличивая в 10 раз ацетилирование гистонов в прилегающих к нему областях [144]. Интронные S/MARs необходимы также и для деметилирования регуляторных участков и активации гена к-цепей иммуноглобулинов в В-клетках [145].

Кроме того, интронные S/MARs совместно с энхансером могут увеличивать частоту V(D)J-рекомбинации [138, 146]. Уровень соматической гипермутации V-области также зависит от интронных S/MARs [147, 148]. Делеция интронных S/MARs приводит к гиперрекомбинации областей Vκ-Jκ, коррелирующей с их немодифицированием, но не с уровнем их транскрипции. Авторы предполагают, что S/MARs могут ингибировать рекомбинацию V-J на стадии предшественников В-клеток [149, 150]. Другим известным к настоящему времени примером вовлечения в регуляцию экспрессии S/MAR-элемента, лежащего в интроне недалеко от энхансера, является ген маркера терминальной дифференцировки кератиноцитов (SPRR2A, keratinocyte terminal differentiation marker) [151].

S/MARs и другие регуляторные элементы генома

S/MARs могут быть структурно сближены и функционально ассоциированы не только с интронными энхансерами, но и с другими регуляторными элементами генов. S/MAR-элементы входят в состав нового класса *cis*-регуляторных элементов – локус-контролирующих областей (LCRs, Locus Control Regions), которые представляют собой фрагменты ДНК, способные усиливать и поддерживать экспрессию подконтрольного гена при интеграции в другой геном [152]. Было отмечено, что S/MARs необходимы для тканеспецифичной активности LCRs в генах тирозиназы мыши [153] и аполипопротеина E/C-I человека [154].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из суммированных выше данных можно заключить, что S/MAR-элементы играют важную, хотя и не до конца еще выясненную роль в образовании и поддержании структуры и регуляции функционирования генетического аппарата клетки. В большом числе работ, посвященных механизмам функционирования S/MARs на уровне отдельных генов и небольших генных локусов, данных по анализу расположения S/MARs на протяженных участках геномов совершенно недостаточно. Практически отсутствуют сведения о тканеспецифичности связывания S/MARs с ядерным матриксом, которые могли бы пролить свет на механизмы крупномасштабной регуляции структуры и активности хроматина. Структурные основы связывания S/MARs с ядерным матриксом также слабо изучены. В большой мере эти недостатки вызваны отсутствием адекватных подходов к такому рода анализу, что делает необходимым разработку новых методов исследования структуры и регуляции активности генетического материала, в частности, с учетом результатов проекта “Геном человека”.

Работа лаборатории поддерживается грантом для поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-2006.2003.4, грантами РФФИ № 01-04-48933, 01-04-48980, 02-04-48601 и грантом INTAS-2001-0279.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marsden M.P., Laemmli U.K. // *Cell*. 1979. V. 17. P. 849–858.
2. Pienta K.J., Partin A.W., Coffey D.S. // *Cancer Res*. 1989. V. 49. P. 2525–2532.
3. Bednar J., Horowitz R.A., Grigoryev S.A., Carruthers L.M., Hansen J.C., Koster A.J., Woodcock C.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 14173–14178.
4. Igo-Kemenes T., Horz W., Zachau H.G. // *Annu. Rev. Biochem.* 1982. V. 51. P. 89–121.
5. Thomas J.O. // *J. Cell Sci. Suppl.* 1984. V. 1. P. 1–20.
6. Finch J.T., Klug A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. P. 1897–1901.
7. Kiryanov G.I., Smirnova T.A., Polyakov V. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 124. P. 331–338.
8. Subirana J.A., Munoz-Guerra S., Aymami J., Radermacher M., Frank J. // *Chromosoma*. 1985. V. 91. P. 377–390.
9. Woodcock C.L., Grigoryev S.A., Horowitz R.A., Whitaker N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 9021–9025.
10. Cook P.R., Brazell I.A. // *Nucl. Acids Res.* 1980. V. 8. P. 2895–2906.
11. Hancock R., Boulikas T. // *Int. Rev. Cytol.* 1982. V. 79. P. 165–214.
12. Pienta K.J., Coffey D.S. // *J. Cell Sci. Suppl.* 1984. V. 1. P. 123–135.
13. Berezney R., Coffey D.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974. V. 60. P. 1410–1417.
14. Berezney R., Mortillaro M.J., Ma H., Wei X., Samaranandu J. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 1–65.
15. Berezney R., Coffey D.S. // *J. Cell Biol.* 1977. V. 73. P. 616–637.
16. Mirkovitch J., Mirault M.E., Laemmli U.K. // *Cell*. 1984. V. 39. P. 223–232.
17. Jackson D.A., Dickinson P., Cook P.R. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 4385–4393.
18. Jackson D.A., Bartlett J., Cook P.R. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1212–1219.
19. Mirkovitch J., Gasser S.M., Laemmli U.K. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200. P. 101–109.
20. Barbashov S.F., Glotov B.O., Nikolaev L.G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 782. P. 177–186.
21. Boulikas T., Kong C.F. // *J. Cell. Biochem.* 1993. V. 53. P. 1–12.
22. Michalowski S.M., Allen G.C., Hall G.E., Jr., Thompson W.F., Spiker S. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 12795–12804.
23. Cockerill P.N., Garrard W.T. // *Cell*. 1986. V. 44. P. 273–282.
24. Izaurralde E., Mirkovitch J., Laemmli U.K. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200. P. 111–125.

25. Bode J., Schlake T., Rios-Ramirez M., Mielke C., Stengert M., Kay V., Klehr-Wirth D. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 389–454.
26. Boulikas T. // *J. Cell. Biochem.* 1993. V. 52. P. 23–36.
27. Boulikas T. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 279–388.
28. Bode J., Stengert-Iber M., Kay V., Schlake T., Dietz-Pfeilstetter A. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1996. V. 6. P. 115–138.
29. Cockerill P.N., Yuen M.H., Garrard W.T. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 5394–5397.
30. Bode J., Kohwi Y., Dickinson L., Joh T., Klehr D., Mielke C., Kohwi-Shigematsu T. // *Science.* 1992. V. 255. P. 195–197.
31. Gasser S.M., Laemmli U.K. // *Cell.* 1986. V. 46. P. 521–530.
32. Mielke C., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T., Bode J. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 7475–7485.
33. Pommier Y., Cockerill P.N., Kohn K.W., Garrard W.T. // *J. Virol.* 1990. V. 64. P. 419–423.
34. Benham C., Kohwi-Shigematsu T., Bode J. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 274. P. 181–196.
35. Bode J., Bartsch J., Boulikas T., Iber M., Mielke C., Schubeler D., Seibler J., Benham C. // *Gene Therapy Mol. Biol.* 1998. V. 1. P. 551–580.
36. Bode J., Benham C., Knopp A., Mielke C. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2000. V. 10. P. 73–90.
37. Boulikas T. // *J. Cell. Biochem.* 1993. V. 52. P. 14–22.
38. Broecker P.L., Harden A., Rowley J.D., Zeleznik-Le N. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996. V. 211. P. 259–268.
39. Opstelten R.J., Clement J.M., Wanka F. // *Chromosoma.* 1989. V. 98. P. 422–427.
40. Homberger H.P. // *Chromosoma.* 1989. V. 98. P. 99–104.
41. von Kries J.P., Phi-Van L., Diekmann S., Stratling W.H. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3881–3885.
42. Adachi Y., Kas E., Laemmli U.K. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 3997–4006.
43. Blasquez V.C., Sperry A.O., Cockerill P.N., Garrard W.T. // *Genome.* 1989. V. 31. P. 503–509.
44. Krogh S., Mortensen U.H., Westergaard O., Bonven B.J. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 1235–1241.
45. van Drunen C.M., Sewalt R.G., Oosterling R.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C., van Driel R. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 2924–2930.
46. Yamamura J., Nomura K. // *FEBS Lett.* 2001. V. 489. P. 166–170.
47. Singh G.B., Kramer J.A., Krawetz S.A. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 1419–1425.
48. Glazko G.V., Rogozin I.B., Glazkov M.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1517. P. 351–364.
49. Frisch M., Frech K., Klingenhoff A., Cartharius K., Liebich I., Werner T. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 349–354.
50. Liebich I., Bode J., Frisch M., Wingender E. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 372–374.
51. Mielke C., Maass K., Tummeler M., Bode J. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 2239–2252.
52. Nikolaev L.G., Tsevegijn T., Akopov S.B., Ashworth L.K., Sverdlov E.D. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1330–1336.
53. Николаев Л.Г., Акопов С.Б., Чернов И.П., Глоатов Б.О., Эшворт Л.К., Сverdlov E.D. // *Докл. РАН.* 1998. Т. 361. С. 409–411.
54. Chernov I.P., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // *J. Cell. Biochem.* 2002. V. 84. P. 590–600.
55. Jack R.S., Eggert H. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 209. P. 503–509.
56. Iarovaia O., Hancock R., Lagarkova M., Miassod R., Razin S.V. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 302–308.
57. Avramova Z., Tikhonov A., Chen M., Bennetzen J.L. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 761–767.
58. Paul A.L., Ferl R.J. // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1349–1359.
59. Strissel P.L., Dann H.A., Pomykala H.M., Diaz M.O., Rowley J.D., Olopade O.I. // *Genomics.* 1998. V. 47. P. 217–229.
60. Kas E., Chasin L.A. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 198. P. 677–692.
61. Maric C., Hyrien O. // *Chromosoma.* 1998. V. 107. P. 155–165.
62. Tsongalis G.J., Coleman W.B., Smith G.J., Kaufman D.G. // *Cancer Res.* 1992. V. 52. P. 3807–3810.
63. Cai S., Kohwi-Shigematsu T. // *Methods.* 1999. V. 19. P. 394–402.
64. Roti Roti J.L., Wright W.D., VanderWaal R. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1997. V. 7. P. 343–360.
65. Sackers R.J., Brunsting J.F., Filon A.R., Kampinga H.H., Konings A.W., Mullenders L.H. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1999. V. 75. P. 875–883.
66. Levy-Wilson B., Fortier C. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 21196–21204.
67. Wang D.M., Taylor S., Levy-Wilson B. // *J. Lipid Res.* 1996. V. 37. P. 2117–2124.
68. Antes T.J., Namciu S.J., Fournier R.E., Levy-Wilson B. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 6731–6742.
69. Brotherton T., Zenk D., Kahanic S., Reneker J. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 5845–5850.
70. Phi-Van L., Stratling W.H. // *Progr. Mol. Subcell. Biol.* 1990. V. 11. P. 1–11.
71. Jackson D.A., Dolle A., Robertson G., Cook P.R. // *Cell. Biol. Int. Rep.* 1992. V. 16. P. 687–696.
72. Razin S.V., Vassetzky Y.S. // *Cell. Biol. Int. Rep.* 1992. V. 16. P. 697–708.
73. Stief A., Winter D.M., Stratling W.H., Sippel A.E. // *Nature.* 1989. V. 341. P. 343–345.
74. Phi-Van L., von Kries J.P., Ostertag W., Stratling W.H. // *Mol. Cell. Biol.* 1990. V. 10. P. 2302–2307.
75. Allen G.C., Hall G.E., Jr., Childs L.C., Weissinger A.K., Spiker S., Thompson W.F. // *Plant Cell.* 1993. V. 5. P. 603–613.
76. Charron G., Julien J.P., Bibor-Hardy V. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25739–25745.
77. Klehr D., Maass K., Bode J. // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 1264–1270.
78. Allen G.C., Hall G., Jr., Michalowski S., Newman W., Spiker S., Weissinger A.K., Thompson W.F. // *Plant Cell.* 1996. V. 8. P. 899–913.
79. Poljak L., Seum C., Mattioni T., Laemmli U.K. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4386–4394.

80. Allen G.C., Spiker S., Thompson W.F. // *Plant Mol. Biol.* 2000. V. 43. P. 361–376.
81. Geyer P.K. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997. V. 7. P. 242–248.
82. Bell A.C., Felsenfeld G. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999. V. 9. P. 191–198.
83. Kalos M., Fournier R.E. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 198–207.
84. Nabirochkin S., Ossokina M., Heidmann T. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 2473–2479.
85. Namciu S.J., Blochlinger K.B., Fournier R.E. // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 2382–2391.
86. Scott K.C., Taubman A.D., Geyer P.K. // *Genetics.* 1999. V. 153. P. 787–798.
87. Attal J., Cajero-Juarez M., Petitclerc D., Theron M.C., Stinnakre M.G., Bearzotti M., Kann G., Houdebine L.M. // *Mol. Biol. Rep.* 1995. V. 22. P. 37–46.
88. Dang Q., Auten J., Plavec I. // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 2671–2678.
89. Bode J., Schlake T., Iber M., Schubeler D., Seibler J., Snezhkov E., Nikolaev L. // *Biol. Chem.* 2000. V. 381. P. 801–813.
90. Chimera J.A., Musich P.R. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 9373–9379.
91. Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Тырсин О., Рызов А.С., Свердлов Е.Д. // *Биоорганич. химия.* 1997. Т. 23. С. 727–731.
92. de Belle I., Cai S., Kohwi-Shigematsu T. // *J. Cell Biol.* 1998. V. 141. P. 335–348.
93. Tikhonov A.P., Bennetzen J.L., Avramova Z.V. // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 249–264.
94. Dickinson L.A., Joh T., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T. // *Cell.* 1992. V. 70. P. 631–645.
95. Nakagomi K., Kohwi Y., Dickinson L.A., Kohwi-Shigematsu T. // *Mol. Cell. Biol.* 1994. V. 14. P. 1852–1860.
96. Dickinson L.A., Dickinson C.D., Kohwi-Shigematsu T. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 11463–11470.
97. Kohwi-Shigematsu T., Maass K., Bode J. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 12005–12010.
98. Alvarez J.D., Yasui D.H., Niida H., Joh T., Loh D.Y., Kohwi-Shigematsu T. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 521–535.
99. Yanagisawa J., Ando J., Nakayama J., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 457–462.
100. von Kries J.P., Buhrmester H., Stratling W.H. // *Cell.* 1991. V. 64. P. 123–135.
101. von Kries J.P., Rosorius O., Buhrmester H., Stratling W.H. // *FEBS Lett.* 1994. V. 342. P. 185–188.
102. Buhrmester H., von Kries J.P., Stratling W.H. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 4108–4117.
103. Weitzel J.M., Buhrmester H., Stratling W.H. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 5656–5666.
104. Stratling W.H., Yu F. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1999. V. 9. P. 311–318.
105. Tsutsui K., Tsutsui K., Okada S., Watarai S., Seki S., Yasuda T., Shohmori T. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 12886–12894.
106. Romig H., Fackelmayer F.O., Renz A., Ramsperger U., Richter A. // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 3431–3440.
107. Fackelmayer F.O., Dahm K., Renz A., Ramsperger U., Richter A. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 221. P. 749–757.
108. Fackelmayer F.O., Richter A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1217. P. 232–234.
109. Kipp M., Gohring F., Ostendorp T., van Druenen C.M., van Driel R., Przybylski M., Fackelmayer F.O. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 7480–7489.
110. Renz A., Fackelmayer F.O. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 843–849.
111. Kipp M., Schwab B.L., Przybylski M., Nicotera P., Fackelmayer F.O. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 5031–5036.
112. Oesterreich S., Lee A.V., Sullivan T.M., Samuel S.K., Davie J.R., Fuqua S.A. // *J. Cell. Biochem.* 1997. V. 67. P. 275–286.
113. Herrscher R.F., Kaplan M.H., Lelsz D.L., Das C., Scheuermann R., Tucker P.W. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. P. 3067–3082.
114. Zong R.T., Das C., Tucker P.W. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 4123–4133.
115. Banan M., Rojas I.C., Lee W.H., King H.L., Harris J.V., Kobayashi R., Webb C.F., Gottlieb P.D. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 18440–18452.
116. Wang Z., Goldstein A., Zong R.T., Lin D., Neufeld E.J., Scheuermann R.H., Tucker P.W. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 284–295.
117. Antes T.J., Chen J., Cooper A.D., Levy-Wilson B. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 26649–26660.
118. Chattopadhyay S., Kaul R., Charest A., Housman D., Chen J. // *Genomics.* 2000. V. 68. P. 93–96.
119. Meier I., Phelan T., Gruissem W., Spiker S., Schneider D. // *Plant Cell.* 1996. V. 8. P. 2105–2115.
120. Gindullis F., Meier I. // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1117–1128.
121. Morisawa G., Han-Yama A., Moda I., Tamai A., Iwabuchi M., Meshi T. // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 1903–1916.
122. Bode J., Maass K. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 4706–4711.
123. Dijkwel P.A., Hamlin J.L. // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 5398–5409.
124. Cockerill P.N. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 2643–2648.
125. Jarman A.P., Higgs D.R. // *EMBO J.* 1988. V. 7. P. 3337–3344.
126. Mirkovitch J., Spierer P., Laemmli U.K. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 190. P. 255–258.
127. Surdej P., Got C., Rosset R., Miassod R. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3713–3722.
128. Surdej P., Brandli D., Miassod R. // *Biol. Cell.* 1991. V. 73. P. 111–120.
129. Razin S.V., Petrov P., Hancock R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 8515–8519.
130. Gromova I.I., Thomsen B., Razin S.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 102–106.
131. Miassod R., Razin S.V., Hancock R. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2041–2046.
132. Avramova Z., SanMiguel P., Georgieva E., Bennetzen J.L. // *Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1667–1680.
133. Rollini P., Namciu S.J., Marsden M.D., Fournier R.E. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 3779–3791.

134. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., et al. // *Nature*. 2001. V. 409. P. 860–921.
135. Ito T., Sakaki Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 149. P. 449–454.
136. Romig H., Ruff J., Fackelmayer F.O., Patil M.S., Richter A. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 221. P. 411–419.
137. Chattopadhyay S., Whitehurst C.E., Chen J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 29838–29846.
138. Zhong X.P., Carabana J., Krangel M.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 11970–11975.
139. Scheuermann R.H., Chen U. // *Genes Dev.* 1989. V. 3. P. 1255–1266.
140. Forrester W.C., van Genderen C., Jenuwein T., Grosschedl R. // *Science*. 1994. V. 265. P. 1221–1225.
141. Jenuwein T., Forrester W.C., Fernandez-Herrero L.A., Laible G., Dull M., Grosschedl R. // *Nature*. 1997. V. 385. P. 269–272.
142. Forrester W.C., Fernandez L.A., Grosschedl R. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 3003–3014.
143. Oancea A.E., Berru M., Shulman M.J. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 2658–2668.
144. Fernandez L.A., Winkler M., Grosschedl R. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 196–208.
145. Lichtenstein M., Keini G., Cedar H., Bergman Y. // *Cell*. 1994. V. 76. P. 913–923.
146. Roch F.A., Hobi R., Berchtold M.W., Kuenzle C.C. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2303–2310.
147. Betz A.G., Milstein C., Gonzalez-Fernandez A., Pannell R., Larson T., Neuberger M.S. // *Cell*. 1994. V. 77. P. 239–248.
148. Goyenechea B., Klix N., Yelamos J., Williams G.T., Riddell A., Neuberger M.S., Milstein C. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 3987–3994.
149. Hale M.A., Garrard W.T. // *Mol. Immunol.* 1998. V. 35. P. 609–620.
150. Yi M., Wu P., Trevorrow K.W., Clafin L., Garrard W.T. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. P. 6029–6039.
151. Fischer D.F., van Drunen C.M., Winkler G.S., van de Putte P., Backendorf C. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 5288–5294.
152. Li Q., Peterson K.R. // *Trends Genet.* 1999. V. 15. P. 403–408.
153. Porter S.D., Hu J., Gilks C.B. // *Dev. Genet.* 1999. V. 25. P. 40–48.
154. Dang Q., Walker D., Taylor S., Allan C., Chin P., Fan J., Taylor J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 22577–22585.

Structure and Functions of Nuclear Matrix Associated Regions (S/MARs)

I. P. Chernov, S. B. Akopov, and L. G. Nikolaev[#]

[#] Phone: +7 (095) 330-7029; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: lev@humgen.siobc.ras.ru
 Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Modern concepts on the chromatin loop–domain organization and the role of the DNA regions specifically binding the nuclear matrix (nuclear scaffold, or S/MARs) in its formation, maintenance, and regulation are discussed. Some S/MAR structural features, properties of binding the nuclear matrix, and probable mechanisms of their involvement in regulation of gene activity are considered. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: chromatin, loop domains, MAR, nuclear matrix, nuclear scaffold, SAR