

Project Code: RSA4680002

Project Title: Functional analysis of pancreatic-specific promoter of pyruvate carboxylase gene

Investigator: Dr. Sarawut Jitrapakdee, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok Email address: scsji@mahidol.ac.th

Project Period: 3 yrs

We have localized the control region of the distal promoter of pyruvate carboxylase gene by generating a series of 5'-truncated constructs, and both 25- and 9-bp internal deletion constructs, as well as by performing site-directed mutagenesis. Transfections of these constructs into INS-1 cells identified a CCAAT box and a GC box that are located at -65/-61 and -48/-41, respectively, as the important determinants. Disruption of the GC box resulted in a 4-fold reduction of the reporter activity, while disruption of the proximal CCAAT box (-65/-61) but not the distal CCAAT box (-95/-91) increased the reporter activity by 3-fold. Simultaneous disruptions of both the GC box and the CCAAT box reduced the reporter activity to a level that was close to that of the single GC box mutation. Gel retardation assay using nuclear extract from INS-1 cells demonstrated that Sp1 and Sp3 bind a GC box while the nuclear factor Y was shown to bind the proximal but not the distal CCAAT box. Furthermore we identified two tissue-specific regions, the -803/-795 site and the -408/-403 E-box, as the important elements for transcriptional activation of the luciferase reporter gene. Site-directed mutagenesis of either one of these sites in the context of this 1.2 kb promoter fragment, followed by transient transfections in INS-1, abolished luciferase reporter activity by 50% while mutation of a -48/-41 GC box abolished reporter activity by 70% suggesting a predominant role of the GC box over the tissue-specific *cis*-elements. However, disruption of either -803/-795 or -408/-403 site did not affect reporter gene activity in NIH 3T3 cells suggesting this promoter fragment is subjected to cell-specific regulation. The nuclear proteins bound to these -803/-795 and -408/-403 sites were identified as a hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β /Foxa2) and upstream stimulatory factor, USF1 and 2, respectively. Chromatin immunoprecipitation assay using antiserum against Foxa2, USF1 and 2 demonstrated that endogenous Foxa2 and USF1 and 2 bind to the -803/-795 Foxa2 site and the -408/-403 E-box, respectively *in vivo*. The data presented here show that general transcription factors Sp1/Sp3, together with USF and Foxa2 regulate the distal promoter of the rat PC gene in a cell-specific manner.

บทคัดย่อ

183239

รหัสโครงการ: RSA4680002

ชื่อโครงการ: การศึกษาหน้าที่ของโปรโมเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนไฟรูเวทคาร์บอกซิเลสในเซลล์ตับอ่อน

ชื่อนักวิจัย: ดร. ศรารุณี จิตรภักดี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Email Address: scsji@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

เอ็นไซม์ไฟรูเวทคาร์บอกซิเลสมีไบโอตินเป็นองค์ประกอบและทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหลากหลายรวมทั้งการหลังอินซูลินในเซลล์ตับอ่อน ยีนของเอ็นไซม์ไฟรูเวทคาร์บอกซิเลสในหนูอยู่ภายใต้การควบคุมของ โปรโมเตอร์ 2 ตัวคือโปรโมเตอร์ด้านไกล (P1) และโปรโมเตอร์ด้านใกล้ (P2) ในเซลล์ตับอ่อนมีเพียง P2 โปรโมเตอร์ทำงานในการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมของเอ็นไซม์ไฟรูเวทคาร์บอกซิเลส ชิ้นส่วนขนาดต่างๆกันของ P2 โปรโมเตอร์ของยีนไฟรูเวทคาร์บอกซิเลสถูกเชื่อมต่อกับยีน luciferase ใน พลาสมิด pGL-3Basic จากนั้นถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ตับอ่อน INS1 เพื่อการศึกษาว่าบริเวณใดบนโปรโมเตอร์มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมขั้นพื้นฐาน จากการทดลองพบว่านิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -187/-35 ของ P2 โปรโมเตอร์เป็นตำแหน่งหลักในการทำงาน จากนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ในรายละเอียดในบริเวณดังกล่าวโดยการตัดบริเวณดังกล่าวที่ละ 25 และที่ละ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้พบว่าตำแหน่งระหว่าง -48 และ -41 ซึ่งมีลักษณะเป็น GC box มีความสำคัญอย่างมากต่อการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรมเพราะการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -48/-41 GC box ทำให้ P2 โปรโมเตอร์สูญเสียความสามารถในการถอดรหัสพันธุกรรมขั้นพื้นฐานลดลง 4.5 เท่า นอกจากนี้ตำแหน่งระหว่าง -65 และ -61 ซึ่งมีลักษณะเป็น CCAAT box ทำหน้าที่เป็น negative element ทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -48/-41 GC box ในเซลล์ INS1 เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel retardation assay โดยใช้สารสกัดจากนิวเคลียสของเซลล์ INS1 และ 293T พบว่า Sp1 และ Sp3 เกาะกับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -48/-41 GC box และ NF-Y เกาะกับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -65/-61 CCAAT box การศึกษาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนไฟรูเวทคาร์บอกซิเลสจำเพาะในเซลล์ตับอ่อนโดยวิธี EMSA ใช้สารสกัดจากนิวเคลียสของเซลล์ INS1 และ RAT-2 พบว่ามีหลายตำแหน่งที่สามารถเกาะกับโปรตีนในสารสกัดจากนิวเคลียสของเซลล์ INS1 ได้ดีกว่าสารสกัดจากนิวเคลียสของเซลล์ RAT-2 ตำแหน่งที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาคือ ตำแหน่ง -408/-403 กับ -436/-431 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น E-box และตำแหน่ง -803/-795 กับ -903/-895 ซึ่งมีลักษณะเป็นที่เกาะของ Foxa2 และตำแหน่ง -539/-530 กับ -902/-893 ซึ่งมีลักษณะเป็นที่เกาะของ PDX-1 การศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวพบว่า ตำแหน่ง -408/-403 E-box และตำแหน่ง -803/-795 Foxa2 มีผลให้ระดับการทำงานของ P2 โปรโมเตอร์ลดลงไป 50% ขณะที่การเปลี่ยนแปลงลำดับ PDX1 ทั้งสองบริเวณไม่มีผลต่อการทำงานของโปรโมเตอร์และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี EMSA และวิธี chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) พบว่า USF-1 และ USF-2 เกาะกับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -408/-403 E-box และ Foxa2 เกาะกับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -803/-795 Foxa2 และควบคุมการทำงานของยีน