

На правах рукописи  
УДК 575.22:595.773.4

ДАВЫДОВА АННА ИГОРЕВНА

**Изучение механизмов ограничения активности  
энхансеров *D.melanogaster***

Специальность 03.01.07 - молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2011

Работа выполнена в лаборатории регуляции генетических процессов

Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН (ИБГ РАН)

Научные руководители:

Академик РАН, доктор биологических наук, профессор Георгиев П.Г.

Кандидат биологических наук Четверина Д.А.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук Любомирская Н.В.

Кандидат биологических наук Тиллиб С.В.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится 23 ноября 2011 года в часов на заседании

Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук

Институте биологии гена РАН по адресу:

119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу:

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан октября 2011 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.** Уровень транскрипции генов высших эукариот зависит от статуса ДНК-регуляторных элементов: промотора гена, на котором собираются белки основного транскрипционного комплекса, и энхансеров, которые, посредством регуляторных белков, усиливают транскрипцию.

Проведенный полногеномный анализ модификаций нуклеосом и связывания регуляторных белков с ДНК, совмещенный с функциональными экспериментами на активность регуляторных элементов, предполагает, что энхансеры являются типичным и фундаментально важным классом ДНК-элементов, необходимым для создания клеточного разнообразия, дифференцировки и развития организма в целом. Энхансеры способны активировать гены на больших расстояниях, достигающих нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. В некоторых случаях они могут активировать транскрипцию генов, расположенных на других хромосомах. Эти регуляторные элементы действуют вне зависимости от положения и ориентации относительно направления транскрипции гена. Существует несколько моделей функционирования энхансеров; большинство из них предполагает, что белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с белками, собранными на промоторе, а ДНК между ними выпетливается. Энхансеры практически не обладают специфичностью действия, следовательно, у высших эукариот должны были выработаться механизмы, контролирующие и ограничивающие способность энхансеров к активации генов, направляющие энхансер на стимуляцию только определенного промотора, и, таким образом, определяющие специфичность его действия.

Результаты последних работ свидетельствуют, что большая часть генома транскрибируется, и что лишь небольшой процент этих транскриптов приходится на белок-кодирующие последовательности. В настоящее время считается, что многие белок-некодирующие транскрипты могут выполнять функциональную роль, влияя на активность регуляторных элементов. В частности, было продемонстрировано, что некодирующая транскрипция способна регулировать функционирование репрессорных участков генома - сайленсеров. При этом для некоторых репрессорных белков была показана способность непосредственно взаимодействовать с молекулами некодирующих РНК.

Также довольно давно известно о существовании некодирующих РНК в регуляторных районах генома, содержащих энхансеры. Вполне вероятно, что один из механизмов ограничения активности энхансеров может быть основан на участии некодирующей транскрипции.

Второй, более изученный механизм ограничения активности энхансеров, основан на свойствах регуляторных элементов другого класса - инсуляторов. Считается, что главная роль инсуляторов заключается в модулировании взаимодействий между энхансерами и промоторами. Основным свойством всех инсуляторов является способность блокировать энхансеры только в том

случае, если инсулятор находится между энхансером и промотором гена. Существует две наиболее согласующихся с экспериментальными данными модели действия инсуляторов. Данные модели не являются взаимно исключаящими и могут дополнять друг друга.

Первая модель объясняет механизм действия инсуляторов наличием стабильных взаимодействий между разными инсуляторами, что играет определяющую роль в контроле коммуникации между энхансерами и промоторами. Показано, что взаимодействия между инсуляторами могут приводить как к изоляции энхансера от промотора, так и к их сближению, что зависит как от типа инсулятора и его ориентации, так и от расстояния между всеми регуляторными элементами (энхансерами, инсуляторами и промоторами) в модельной системе.

Вторая модель, «ловушка», предполагает, что инсуляторы способны непосредственно взаимодействовать с энхансерами, что приводит к изоляции энхансера от промотора. Постулируется, что инсуляторы являются структурно сходными с промоторами элементами. Аргументом модели является то, что некоторые инсуляторы (*scs*, *scs'*, *IdefixU3*, *Faswb*) включают предпромоторные и промоторные последовательности. Показано также, что некоторые промоторы генов *Bithorax*-комплекса обладают инсуляторной активностью в эмбрионах *Drosophila*.

Альтернативно, в нашей лаборатории было предположено, что свойства инсуляторов могут объясняться их способностью напрямую взаимодействовать с промоторами генов. Данная способность была подтверждена для двух инсуляторов дрозофилы: 1A2 и Wari. Было продемонстрировано, что 1A2- и Wari-инсуляторы взаимодействуют с промоторами генов *yellow* и *white*, соответственно.

Данная работа посвящена изучению механизмов ограничения активности энхансеров. Исследован эффект некодирующей транскрипции на способность энхансеров тела и крыльев гена *yellow* и энхансера глаз гена *white* стимулировать транскрипцию генов-мишеней. Изучена способность 1A2- и Wari-инсуляторов взаимодействовать с промоторами разных генов.

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Основной целью работы явилось изучение механизмов ограничения активности энхансеров *D.melanogaster*.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) Выяснить возможность влияния некодирующей транскрипции на активность энхансеров генов *yellow* и *white*.
- 2) Проверить возможность стабилизации активности энхансеров в составе трансгена терминаторами транскрипции.
- 3) Протестировать способность инсуляторов взаимодействовать с разными промоторами.
- 4) Определить зависимость обогащения инсуляторных белков на промоторе от присутствия инсулятора в трансгене.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ.** В работе впервые показано, что некодирующая транскрипция, проходящая через энхансеры генов *yellow* и *white*, инактивирует их способность стимулировать транскрипцию гена-мишени. Продемонстрировано, что данный эффект не зависит от расстояния между регуляторным элементом и геном-мишенью. Кроме того, в данной работе продемонстрировано, что 1A2- и Wagi-инсуляторы функционально взаимодействуют с разными промоторами. Методом иммунопреципитации хроматина подтверждено взаимодействие 1A2-инсулятора с промотором гена *even-skipped* в трансгенной системе. Результаты данной работы имеют также практический интерес. В частности, было показано, что фланкирование трансгенной конструкции терминаторами транскрипции стабилизирует активность регуляторных элементов внутри системы. Данный результат может быть использован при создании конструкций для экспрессии различных рекомбинантных белков.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Результаты диссертационной работы были представлены на 13-ой (Пушино, 28 сентября-2 октября, 2009), 14-ой (Пушино, 19-23 апреля, 2010) и 15-ой (Пушино, 18-22 апреля, 2011) Международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых; на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011» (Москва, 11-15 апреля, 2011); на международных конференциях 35th FEBS Congress "Molecules of Life" (Gothenburg, Sweden, 26 June-1 July, 2010) и 36th FEBS Congress «Biochemistry for tomorrow's medicine» (Torino, Italy, 25-30 June, 2011); на международном симпозиуме "Control of gene expression and cancer" (Moscow, 21-25 June, 2010).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ. Из них статей – 2, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях – 9.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.** Диссертация изложена на 100 страницах, содержит 20 рисунков и 3 таблицы, состоит из Введения, Обзора литературных данных, Материалов и методов, Результаты исследования, Обсуждения, Выводов и Списка литературы, включающего 104 источника.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**ГЛАВА I. Изучение влияния транскрипции на активность энхансеров генов *yellow* и *white*.**

**1) Некодирующая транскрипция влияет на активность энхансеров гена *yellow*, расположенных на дальнем расстоянии от промотора.**

Исследование влияния транскрипции на активность энхансеров проводилось на модельных системах в трансгенных линиях *D.melanogaster*. Для этого генетические конструкции, содержащие необходимый набор регуляторных элементов, были фланкированы 5'- и 3'-концами Р-элемента,

включающими концевые инвертированные повторы, необходимые для интеграции конструкций в геном путем микроинъекции плазмидной ДНК в эмбрионы *D.melanogaster*.

На первом этапе было проверено влияние некодирующей транскрипции на активность тканеспецифичных энхансеров гена *yellow*. Ген *yellow* отвечает за пигментацию кутикулярных структур личинки и имаго. В работе использовались тканеспецифичные энхансеры гена *yellow*, отвечающие за высокий уровень экспрессии данного гена в кутикуле тела и в крыловых пластинах (далее энхансеры тела (B) и крыльев (W)). Изменения в экспрессии гена *yellow* легко оценивать фенотипически: уровень пигментации кутикулярных структур оценивается по пятибалльной шкале, где 5 соответствует уровню пигментации дикого типа (энхансер-зависимая экспрессия гена *yellow*), 2 соответствует базовому уровню пигментации (экспрессия гена *yellow* в отсутствие энхансера), 1 соответствует отсутствию пигментации ( $y^1$  аллель – полная инактивация гена *yellow*), 3 и 4 – частичная активация энхансерами базовой транскрипции.

В первой конструкции, GEWY (рис. 1A), энхансеры тела и крыльев располагались на расстоянии 4,7 т.п.н. от промотора гена *yellow*. В качестве линкера в данной конструкции использовался ген *white*, который был встроен между энхансерами и геном *yellow*. Для направленной транскрипции через энхансеры использовался минимальный промотор гена теплового шока *hsp70*, перед которым находились пять сайтов связывания для дрожжевого белка-активатора GAL4 (UAS-промотор). Данный промотор был встроен с 5'-стороны от энхансеров. Минимальный промотор гена теплового шока 70 лишен сайтов связывания для фактора теплового шока и обуславливает слабый уровень транскрипции. Для индукции высокого уровня транскрипции через исследуемые энхансеры, трансгенные линии скрещивались с линией, несущей ген GAL4-активатора под контролем сильного тубулинового промотора. Таким образом, данная система позволяет оценить влияние как слабой, так и сильной транскрипции на активность изучаемого регуляторного элемента. Энхансеры тела и крыльев были фланкированы FRT-сайтами для сайт-специфической рекомбиназы Flp, UAS-промотор - LOX-сайтами для сайт-специфической рекомбиназы Cre. Данный подход позволяет *in vivo* удалять выбранные фрагменты ДНК и сравнивать экспрессию генов в присутствии и в отсутствие ключевых элементов в модельной системе в одном и том же месте генома, что необходимо для оценки их влияния на наблюдаемый уровень транскрипции маркерных генов.

В результате трансформации конструкции в эмбрионы дрозофилы было получено 9 независимых трансгенных линий. Во всех трансгенных линиях мухи имели желтую пигментацию тела и крыловых пластин, соответствующую базовому уровню экспрессии гена, что свидетельствует о неспособности энхансеров стимулировать транскрипцию гена *yellow*. При активации транскрипции с UAS-промотора, проходящей через энхансеры, уровень экспрессии гена *yellow* не изменялся. Отсутствие активации гена *yellow* энхансерами в исходных линиях, возможно, связано с тем, что даже низкого уровня транскрипции с минимального промотора гена

теплового шока 70 (без дополнительной стимуляции GAL4-активатором) достаточно для того, чтобы полностью блокировать работу энхансеров. Однако делеция UAS-промотора из трансгенной системы не привела к изменению пигментации, что свидетельствует о неспособности энхансеров стимулировать транскрипцию гена *yellow* и в отсутствие проходящей транскрипции. Отсутствие активации гена *yellow* энхансерами, было также подтверждено их делецией из трансгенной системы.

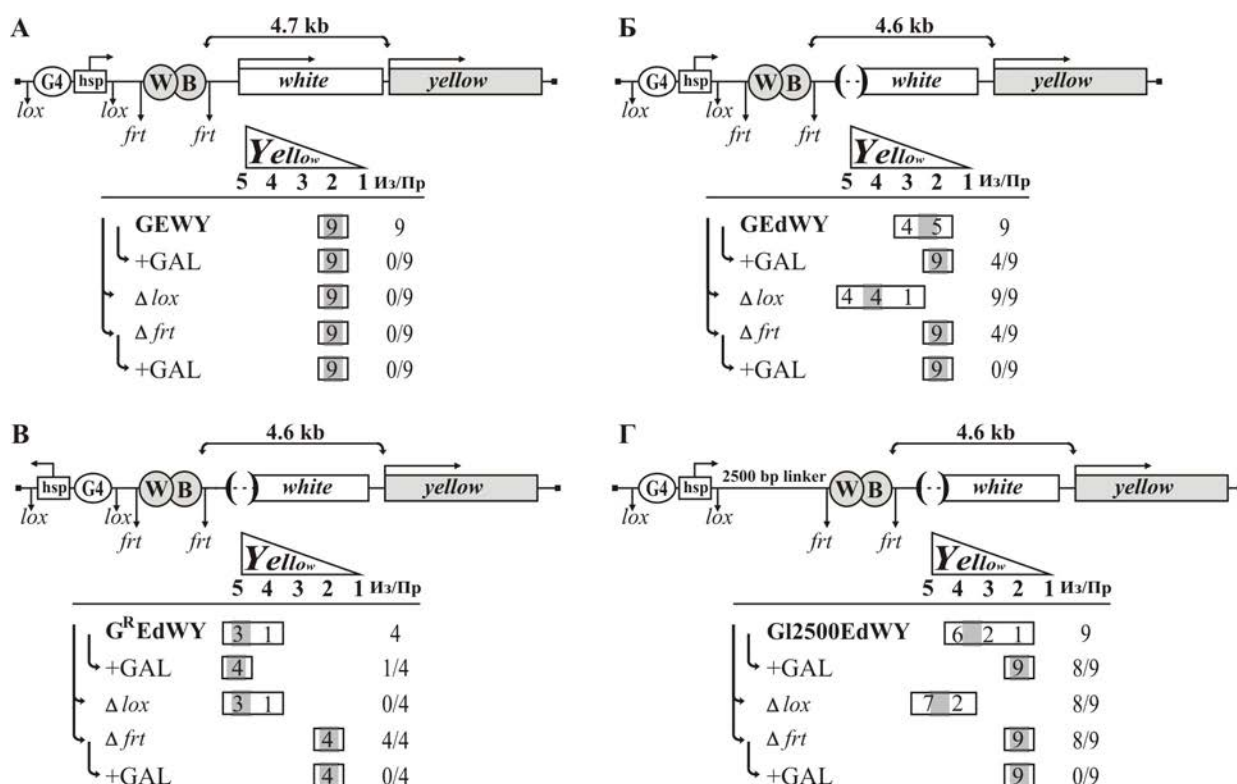
Из литературных данных известно, что некоторые промоторы генов *Bithorax*-комплекса обладают инсуляторной активностью в эмбрионах *Drosophila*, таким образом, мы предположили, что в конструкции GEWY промотор гена *white* функционирует как инсулятор по отношению к энхансерам гена *yellow*, конкурируя с промотором гена *yellow* за сигнал энхансера.

Для проверки данной гипотезы, а также для адаптации модельной системы для изучения влияния некодирующей транскрипции на энхансеры, была сделана конструкция GEdWY (рис. 1B). В этой конструкции энхансеры тела и крыльев были отдалены от гена *yellow* также при помощи гена *white*, но в данном случае промоторная область гена *white* была делетирована. Индукция транскрипции, как и в предыдущей конструкции, запускалась с UAS-промотора.

В результате трансформации конструкции GEdWY было получено 9 независимых трансгенных линий. Пигментация тела и крыловых пластин в 4-х трансгенных линиях соответствовала частичной активации энхансерами промотора гена *yellow*, в 5-ти – базовому уровню экспрессии гена *yellow*. Однако удаление UAS-промотора из системы привело к усилению пигментации тела и крыловых пластин во всех линиях (фенотипы мух соответствовали энхансер-зависимой экспрессии гена *yellow*). Данный результат свидетельствует о том, что в отсутствие промотора гена *white* энхансеры гена *yellow* функционально активны, а также, что минимальный промотор гена теплового шока *hsp70* в отсутствие индукции влияет на активность энхансеров гена *yellow*. Индукция сильной транскрипции в исходных линиях привела к полному ингибированию способности энхансеров активировать транскрипцию, что было подтверждено делецией энхансеров.

В конструкции GEWY с полноценным геном *white*, отделяющим энхансеры от промотора гена *yellow*, наблюдали эффект конкуренции промоторов за взаимодействие с энхансерами. В GEdWY, кроме промотора гена *yellow* присутствует промотор UAS, с которого через энхансеры запускается транскрипция. Таким образом, полученный результат, возможно, объясняется конкуренцией более близкого к энхансеру UAS-промотора. Чтобы исключить данную возможность, была сделана конструкция G<sup>R</sup>EdWY (рис. 1B), в которой UAS-промотор располагался с 5'-стороны от энхансеров, но был направлен в противоположную сторону, чтобы транскрипция шла от энхансеров, а не через них. При такой ориентации транскрипция с UAS-промотора не должна влиять на активность энхансеров, если важна проходящая транскрипция, а

не наличие в системе активного промотора. Эхансеры тела и крыльев, как и в предыдущей конструкции, были отдалены от гена *yellow* геном *white* с делетированным промотором.



**Рис.1. Некодирующая транскрипция инактивирует способность эхансеров гена *yellow* активировать транскрипцию на дальнем расстоянии.** Конструкции: А - GEWY, Б - GEdWY, В - G<sup>R</sup>EdWY, Г - Gl2500EdWY. (А-Г) Сверху представлена схема конструкции, под схемой суммированы результаты по анализу фенотипов трансгенных линий мух в теле и в крыловых пластинках, несущих данную конструкцию и ее производные. Обозначения: серые круги – тканеспецифичные эхансеры гена *yellow*, обеспечивающие высокий уровень экспрессии в крыльях (W), теле (B); G4 – пять сайтов связывания дрожжевого белка-активатора GAL4; серый и белый прямоугольники с длинными горизонтальными стрелками сверху – гены *yellow* и *white*, соответственно; белый прямоугольник с короткой горизонтальной стрелкой – минимальный промотор гена теплового шока 70; горизонтальные стрелки указывают направление транскрипции. Вертикальными стрелками отмечены сайты *frt* и *lox* для сайт-специфических рекомбиназ F1r и Cre, соответственно. “+ GAL” – результат скрещивания трансгенных линий мух с линией, экспрессирующей белок-активатор дрожжей GAL4. При скрещивании трансгенных линий мух с делецией UAS-промотора с линией, экспрессирующей GAL4, изменений не наблюдалось ни в одной из линий (во всех протестированных конструкциях в данной работе).

Пигментация тела и крыльев, зависящая от уровня экспрессии гена *yellow*: 1 – отсутствие пигментации; 5 – уровень пигментации, соответствующий эхансер-зависимой экспрессии гена; 2-4 – промежуточные уровни. Цифры в строках – число линий с соответствующей пигментацией. Из/Пр - отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение (Из) пигментации при скрещивании с линией мух, экспрессирующей GAL4-активатор, или при удалении исследуемого элемента, к общему числу проанализированных (Пр) линий. Серым курсором на цифровой панели указано среднее значение фенотипов в проанализированных линиях мух.

В результате трансформации были получены 4 независимые трансгенные линии. Пигментация тела и крыловых пластинок трансгенных линий соответствовала эхансер-зависимой экспрессии гена *yellow*. Стимуляция транскрипции с UAS-промотора не привела к снижению уровня экспрессии гена *yellow*. Отсутствие влияния транскрипции с минимального промотора гена теплового шока было подтверждено делецией UAS-промотора.



**Таким образом, некодирующая транскрипция с близко расположенного промотора влияет на способность энхансеров тела и крыльев активировать транскрипцию на дальнем расстоянии от промотора гена *yellow*.**

Известно, что активные гены характеризуются специфическим гистоновым кодом, т.е. наличием характерных посттрансляционных модификаций нуклеосом. При этом существуют разные модификации гистонов вблизи промоторных участков и в транскрибируемых областях, удаленных от промотора. Энхансеры, в свою очередь, также обладают особым гистоновым кодом, важным для их активности. В описанных выше конструкциях энхансеры располагаются в непосредственной близости к UAS-промотору, с которого через них запускается транскрипция. Таким образом, чтобы проверить, что в предлагаемых конструкциях важна проходящая транскрипция, а не специфические модификации гистонов вблизи промотора, была создана генетическая конструкция G12500EdWY (рис. 1Г). Расположение основных элементов в системе соответствовало конструкции GEdWY, но расстояние между индуцибельным промотором и энхансерами было увеличено до 2500 п.н. линкером из кодирующей области гена *LacZ*.

В результате трансформации данной конструкции было получено 9 независимых трансгенных линий. Пигментация тела и крыловых пластин в 8 из 9 трансгенных линиях соответствовала экспрессии гена *yellow* выше базового уровня. Индукция сильной транскрипции в исходных линиях привела к полному ингибированию способности энхансера активировать транскрипцию. Делеция UAS-промотора из системы привела к усилению экспрессии гена *yellow* в большинстве линий, свидетельствуя о том, что слабый уровень транскрипции с минимального промотора гена теплового шока также частично ингибирует активность энхансеров. Делеция энхансеров подтвердила их функциональную активность в системе.

**Таким образом, некодирующая транскрипция с удаленного на 2,5 т.п.н. промотора влияет на способность энхансеров тела и крыльев активировать транскрипцию на дальнем расстоянии от промотора гена *yellow*.**

**2) Некодирующая транскрипция влияет на активность энхансера гена *white*, расположенного на дальнем расстоянии от промотора.**

Механизм регуляции активности разных энхансеров не обязательно должен быть одинаковым. Следовательно, эффект некодирующей транскрипции на их активность также может отличаться. Чтобы проверить, насколько общим является ингибирование активности энхансеров посредством некодирующей транскрипции, было решено протестировать влияние некодирующей транскрипции на активность энхансера другого гена. В качестве модели был выбран тканеспецифичный энхансер гена *white*. Уровень экспрессии гена *white*, так же как и гена *yellow*, легко оценивать фенотипически по пигментации глаз: красная окраска является пигментацией глаз мух дикого типа (энхансер-зависимая экспрессия гена *white*); желтая и темно-желтая окраски

представляют собой средне-статистическое проявление базовой пигментации (экспрессия гена *white* в отсутствие энхансера), белая окраска глаз наблюдается в отсутствии пигментации (у мух с инактивированным геном *white*).

Для изучения влияния транскрипции, проходящей через энхансер гена *white* на дальнем расстоянии, была создана конструкция GEYW (рис. 2А), содержащая расположенные друг за другом гены *yellow* и *white*. Энхансер гена *white*, фланкированный FRT-сайтами, был встроен между энхансерами гена *yellow* перед промотором гена *yellow*. При этом энхансер глаз гена *white* располагался на расстоянии 7,1 т.п.н. от промотора гена *white*. Для направленной транскрипции через энхансеры, как и в предыдущих конструкциях, использовался UAS-промотор. Данный промотор, фланкированный LOX-сайтами, был встроен с 5'-стороны от энхансеров.

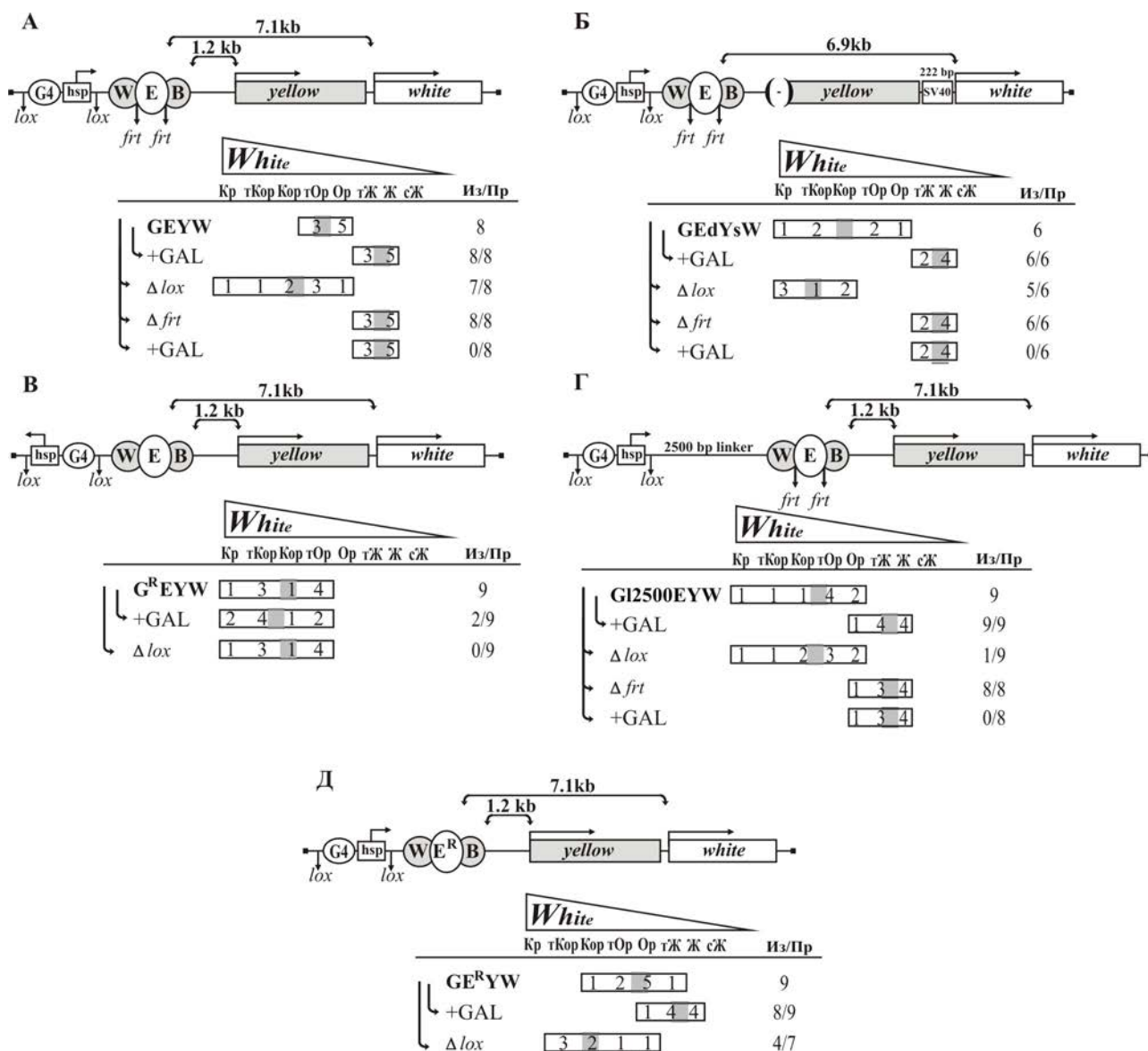
В результате трансформации данной конструкции было получено 8 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих конструкцию, была выше уровня базовой экспрессии гена *white* и соответствовала пигментации при неполной активации гена тканеспецифичным энхансером. Индукция сильной транскрипции привела к полному ингибированию способности энхансера активировать транскрипцию, что было подтверждено делецией энхансера. Делеция UAS-промотора из системы привела к значительному усилению пигментации глаз практически во всех линиях, что свидетельствовало о том, что, как и в случае с геном *yellow*, транскрипция с неиндуцированного промотора частично ингибирует активность энхансера гена *white*.

Анализ конструкции GEYW, также как и результат использования данной системы в других работах, свидетельствуют, что энхансер гена *white* эффективно стимулирует промотор гена *white* на расстоянии гена *yellow*. Тем не менее, чтобы проверить возможность потенциального влияния промотора гена *yellow* на интенсивность взаимодействия между энхансером и промотором гена *white* и на наблюдаемый эффект по влиянию транскрипции, была сделана контрольная конструкция GEdYsW (рис. 2Б), в которой промотор гена *yellow* был удален. Ген *white* содержит IRES-подобный элемент (IRES - Internal Ribosome Entry Site, внутренний сайт инициации трансляции), который позволяет экспрессировать функциональный белок с независимых промоторов, расположенных выше гена *white*. Для того чтобы полностью исключить данный эффект, в дополнении к внутреннему терминатору гена *yellow*, в положение -327 относительно старта транскрипции гена *white* был встроены коровый фрагмент терминатора SV40.

В результате трансформации данной конструкции было получено 6 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз большинства трансгенных линий мух, несущих конструкцию GEdYsW, была выше, чем в конструкции GEYW, однако также соответствовала неполной активации гена тканеспецифичным энхансером. Индукция сильной транскрипции привела к полному ингибированию способности энхансера активировать транскрипцию, что было подтверждено делецией энхансера. Делеция UAS-промотора из системы привела к существенному

усилению пигментации глаз практически во всех линиях, что свидетельствовало о том, что, как и в случае гена *yellow*, транскрипция с неиндуцированного промотора частично ингибирует активность энхансера гена *white*.

Таким образом, присутствие промотора гена *yellow* в конструкции GEYW не влияет на эффект проходящей через энхансер гена *white* транскрипции.



**Рис.2. Некодирующая транскрипция инактивирует способность энхансера гена *white* активировать транскрипцию на дальнем расстоянии.** Конструкции: А - GEYW, Б - GE $\Delta$ YsW, В - G<sup>R</sup>EYW, Г - GI2500EYW, Д - GE<sup>R</sup>YW. (А-Д) Сверху представлена схема конструкции, под схемой суммированы результаты по анализу фенотипов трансгенных линий мух в глазах, несущих данную конструкцию и ее производные. Обозначения: E – энхансер глаз гена *white*; SV40 – терминатор транскрипции SV40. Пигментация глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *white*: Кр – красный; тКор – темно-коричневый; Кор – коричневый; тОр – темно-оранжевый; Ор – оранжевый; тЖ – темно-желтый; Ж – желтый; сЖ – светло-желтый, Б – белый. Остальные обозначения как на рис.1.

Дополнительно было проверено, что наблюдаемый в предыдущих конструкциях эффект не связан с конкуренцией UAS-промотора с промотором гена *white* за сигнал энхансера.

В конструкции  $G^R EYW$  (рис. 2B) расположение энхансеров и генов соответствовало конструкции  $GEYW$ , но UAS-промотор был направлен в противоположную сторону, чтобы транскрипция шла от энхансера гена *white*.

В результате трансформации было получено 9 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз трансгенных линий соответствовала энхансер-зависимой экспрессии гена *white*. Более того, индукция транскрипции не повлияла на способность энхансера глаз активировать промотор гена *white*. Отсутствие влияния транскрипции с минимального промотора гена теплового шока *hsp70* было подтверждено делецией UAS-промотора. Таким образом, присутствие UAS-промотора в системе, транскрипция с которого идет от энхансера глаз, не влияет на активность энхансера.

В следующей конструкции,  $G12500 EYW$  (рис. 2Г), было проверено, влияет ли инсерция линкера длиной 2500 п.н. между промотором и энхансером на ингибирование энхансера посредством транскрипции. В результате трансформации было получено 9 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих конструкцию, была выше базового уровня экспрессии гена *white*. Индукция транскрипции снижала пигментацию глаз до уровня, соответствующего базовой экспрессии, что было подтверждено делецией энхансера. Следовательно, инсерция линкера не влияет на негативный эффект проходящей через энхансер транскрипции.

Дополнительно было проверено влияние ориентации энхансера внутри системы на его ингибирование транскрипцией. Анализ трансгенных линий мух с конструкцией  $GE^R YW$  (рис. 2Д) показал, что некодирующая транскрипция ингибирует активность энхансера вне зависимости от ориентации последнего.

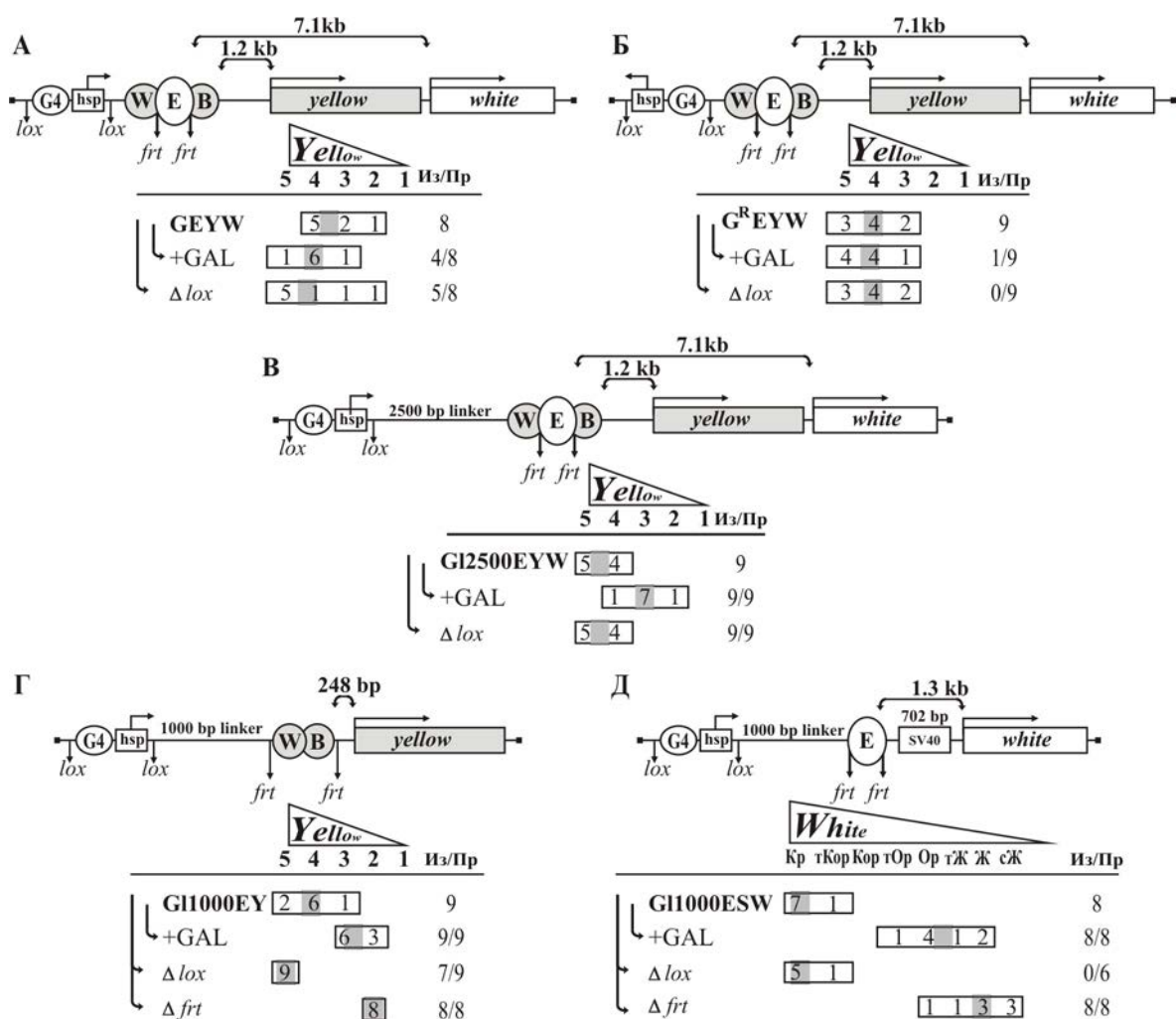
**Таким образом, некодирующая транскрипция ингибирует способность энхансера гена *white* стимулировать транскрипцию на дальнем расстоянии.**

**3) Некодирующая транскрипция влияет на активность энхансеров генов *yellow* и *white*, расположенных на близком расстоянии от промотора гена-мишени.**

На следующем этапе было проанализировано влияние транскрипции, проходящей через энхансерный элемент, в случае небольшого расстояния между энхансерами и промотором гена-мишени.

В конструкциях  $GEYW$  (рис. 3А),  $G^R EYW$  (рис. 3Б), описанных выше (рис. 2А и 2В), энхансеры тела и крыльев расположены на близком расстоянии (1,2 т.п.н.) от промотора гена *yellow*. Пигментация тела и крыловых пластин в трансгенных линиях, несущих конструкцию  $GEYW$ , соответствовала уровню экспрессии гена *yellow* при неполной активации гена энхансерами. Пигментация тела и крыловых пластин в трансгенных линиях, несущих конструкцию  $G^R EYW$ , соответствовала частичной (3, 4) или полной (5) активации гена *yellow*

энхансерами. Делеция UAS-промотора из трансгенных линий GEYW привела к усилению экспрессии гена *yellow* в большинстве линий, свидетельствуя о том, что транскрипция с минимального промотора гена теплового шока частично ингибирует активность энхансеров. Данный эффект отсутствовал при делеции UAS-промотора из трансгенных линий G<sup>R</sup>EYW, в которых UAS-промотор встроен в противоположном направлении. В то же время индукция сильной транскрипции в исходных линиях конструкции GEYW не приводила к снижению активации. Данный эффект может быть объяснен тем, что GAL4-активатор способен стимулировать транскрипцию гена *yellow*, если его сайты связывания расположены на относительно близком расстоянии от промотора. Действительно, в конструкции G12500EYW (рис. 2B), где GAL4-активатор отодвинут на 2,5 т.п.н., при индукции транскрипции происходило ингибирование активности энхансеров гена *yellow*.



**Рис.3. Некодирующая транскрипция инактивирует способность энхансеров генов *yellow* и *white*, расположенных на близком расстоянии от промотора.** Конструкции: А - GEYW, Б - G<sup>R</sup>EYW, В - G12500EYW, Г - G11000EY, Д - G11000ESW. (А-Д) Сверху представлена схема конструкции, под схемой суммированы результаты по анализу фенотипов трансгенных линий мух в теле, в крыловых пластинках и в глазах. Обозначения как на рис.2.

Дополнительно была сделана контрольная конструкция G11000EY (рис. 3Г), в которой UAS-промотор был отодвинут от энхансеров гена *yellow* за счет линкера из кодирующей области гена *LacZ* на расстояние 1 т.п.н. Энхансеры тела и крыльев были встроены в непосредственной близости от промотора гена *yellow* (248 п.н.). В результате трансформации конструкции в эмбрионы дрозофилы было получено 9 трансгенных линий. Пигментация тела и крыловых пластин всех линиях мух, несущих конструкцию, была выше уровня базовой экспрессии гена *yellow* и соответствовала частичной (3, 4) или полной (5) активации гена *yellow* энхансерами. Индукция сильной транскрипции в исходных линиях привела к снижению уровня экспрессии гена *yellow* практически до базового, что свидетельствует об ингибировании активности энхансеров. Делеция UAS-промотора из системы привела к полному восстановлению энхансер-зависимой экспрессии гена *yellow* во всех линиях. Делеция энхансеров подтвердила их функциональную активность в системе.

Для тестирования влияния некодирующей транскрипции на способность энхансера гена *white* стимулировать транскрипцию на близком расстоянии была сделана конструкция G11000ESW (рис. 3Д). UAS-промотор также был расположен перед энхансерами на расстоянии линкера длиной 1 т.п.н. Перед промотором гена *white* дополнительно был встроены полноразмерный терминатор транскрипции SV40. В результате трансформации данной конструкции было получено 8 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих конструкцию, была выше уровня базовой экспрессии гена *white* и в большинстве линий соответствовала полной энхансер-зависимой экспрессии гена *white*. Однако при индукции транскрипции с UAS-промотора пигментация трансгенных линий мух снизилась практически до базового уровня, что было подтверждено делецией энхансеров.

**Таким образом, некодирующая транскрипция влияет на способность энхансеров генов *yellow* и *white* стимулировать транскрипцию на близком расстоянии.**

**4) Терминаторы транскрипции стабилизируют активность энхансеров генов *white* и *yellow* в составе трансгенных конструкций.**

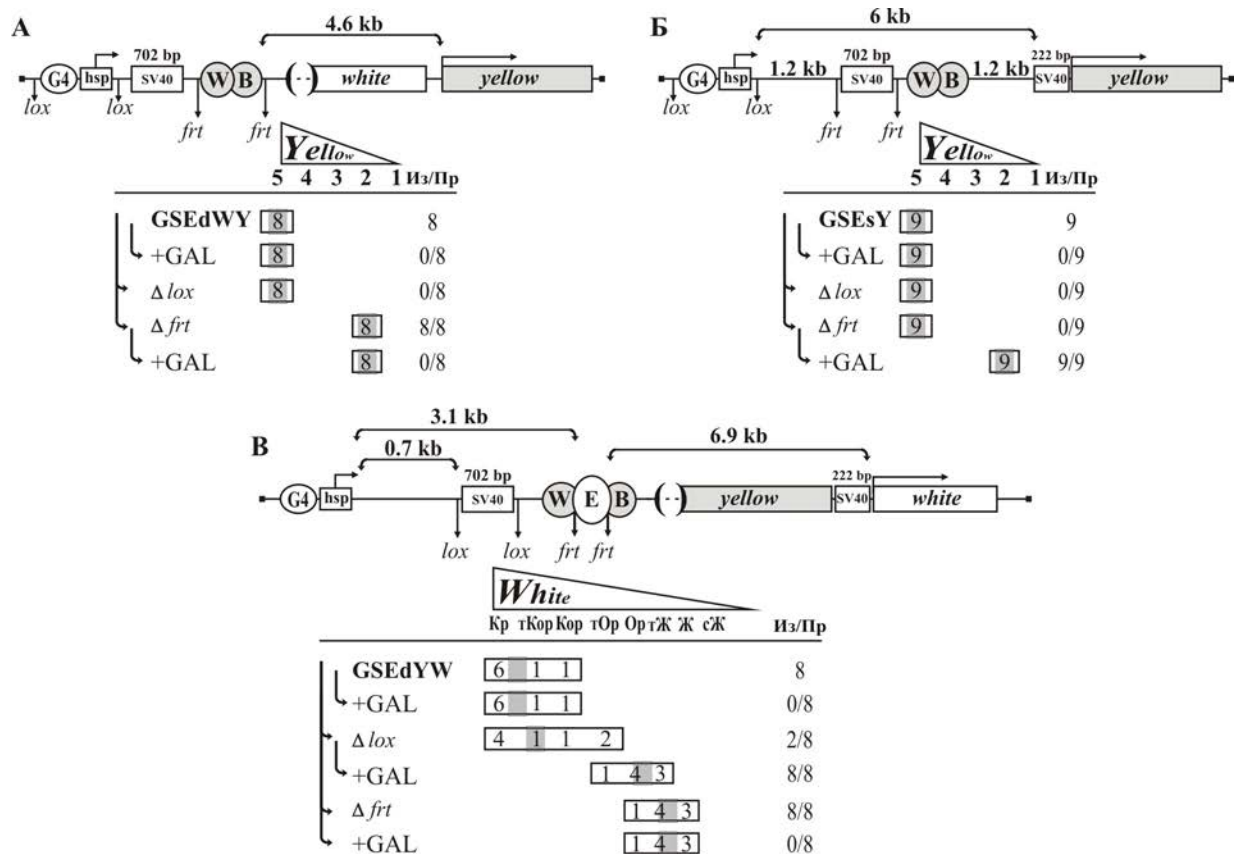
Полученные данные свидетельствуют, что в трансгенных линиях взаимодействия между энхансерами и промоторами генов могут нарушаться за счет проходящей через трансген транскрипции. Это в свою очередь предполагает, что терминаторы транскрипции должны стабилизировать активность энхансеров в составе трансгенов. Чтобы подтвердить данное предположение были сделаны следующие конструкции GSEdWY (рис. 4А) и GSEsY (рис. 4Б), в которых между UAS-промотором и энхансерами гена *yellow* был встроены терминатор транскрипции вируса SV40.

В конструкции GSEdWY энхансеры гена *yellow* располагались на расстоянии 4,6 т.п.н. от промотора, в качестве линкера выступала кодирующая область гена *white*. В результате

трансформации было получено 8 независимых трансгенных линий. Пигментация тела и крыльев трансгенных линий соответствовала энхансер-зависимой экспрессии гена *yellow*. Индукция сильной транскрипции не повлияла на способность энхансеров активировать транскрипцию. Отсутствие влияния транскрипции с минимального промотора гена теплового шока *hsp70* в присутствии терминатора в системе была подтверждена делецией UAS-промотора. После делеции энхансера пигментация тела и крыльев трансгенных мух снизилась до базового уровня, что подтвердило их функциональную активность. Таким образом, присутствие SV40-терминатора в системе стабилизирует способность энхансеров гена *yellow* активировать промотор гена, находящийся на большом расстоянии.

Во второй конструкции, GSEsY, энхансеры тела и крыльев были встроены на расстоянии 1,4 т.п.н. от промотора гена *yellow*. В данной конструкции сайтами для сайт-специфической рекомбиназы Flp был фланкирован SV40 терминатор, встроенный с 5'-стороны от энхансеров. На расстоянии 1,2 т.п.н. от терминатора располагался UAS-промотор. В результате трансформации было получено 9 независимых трансгенных линий. Пигментация тела и крыльев трансгенных линий соответствовала энхансер-зависимой экспрессии гена *yellow*. Индукция сильной транскрипции, как и в конструкции GSEdWY, не повлияла на способность энхансеров активировать транскрипцию. В то же время, индукция транскрипции с UAS-промотора в линиях мух с удаленным SV40-терминатором ( $\Delta$  flt), привела к резкому падению экспрессии гена-мишени до базового уровня. Это свидетельствует о том, что SV40-терминатор эффективно блокировал транскрипцию, приводя к стабилизации активности энхансеров в трансгене.

Дополнительно стабилизация активности энхансера терминатором транскрипции была проверена для энхансера глаз гена *white*. В конструкции GSEdYW (рис. 4B) расстояние между энхансером глаз и геном *white* составляло 6,9 т.п.н. В качестве линкера был использован ген *yellow* с делетированной промоторной областью. SV40-терминатор был встроен с 5'-стороны от энхансеров. Промотор UAS находился перед терминатором на расстоянии линкера из кодирующей области гена *GFP*. В данной конструкции энхансер глаз гена *white* был фланкирован FRT-сайтами, терминатор транскрипции – LOX-сайтами. В результате трансформации было получено 8 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз трансгенных линий соответствовала энхансер-зависимой экспрессии гена *white*. Индукция транскрипции с UAS-промотора в присутствии терминатора в системе не привела к снижению пигментации. В отличие от этого, при индукции транскрипции после удаления терминатора, пигментация во всех линиях снизилась практически до базового уровня, что свидетельствует о том, что в исходных линиях терминатор транскрипции эффективно стабилизировал активность энхансера. Функциональная активность энхансера была подтверждена его делецией.



**Рис.4.** Исследование влияния терминаторов в системе на стабилизацию активности энхансеров генов *yellow* и *white*. Конструкции: А - GSEdWY, Б - GSEsY, В – GSEdYW. Остальные обозначения как на рис.2 и 3.

Таким образом, терминатор транскрипции эффективно предотвращает негативное влияние некодирующей транскрипции на активность энхансеров.

## ГЛАВА II. Изучение специфичности взаимодействия инсуляторов с промоторами генов.

### 1) 1A2- и Wari-инсуляторы взаимодействуют с промоторами разных классов.

В геноме 1A2-инсулятор находится в непосредственной близости от 3'-кодирующей области гена *yellow*. Wari-инсулятор был обнаружен с 3'-конца гена *white*. Ранее было показано, что 1A2- и Wari-инсуляторы функционально взаимодействуют с промоторами генов *yellow* и *white*, соответственно. Несомненно, что способность инсуляторов взаимодействовать с промоторами генов может играть важную роль в энхансер-блокирующей активности регуляторных элементов данного класса. Для дальнейшего изучения роли инсуляторов в модулировании активности энхансеров посредством их взаимодействия с промоторами является важным исследование специфичности данных взаимодействий и способности инсуляторов взаимодействовать с промоторами разных классов.

Поэтому следующей задачей было протестировать способность 1A2-инсулятора взаимодействовать с промотором гена *white*, а Wari-инсулятора - с промотором гена *yellow*. Промоторы генов *yellow* и *white* относятся к разным типам. Так, промотор гена *yellow* относится к



группе ТАТА-содержащих промоторов, в то время как промотор гена *white* содержит только коровые последовательности Inr и DPE.

Для тестирования были созданы конструкции YG4(Wari) (рис. 5А) и WG4(1A2) (рис. 5Б), основанные на разработанной ранее модельной системе. Данная модельная система базируется на неспособности белка-активатора дрожжей GAL4 стимулировать промотор гена-мишени в случае, если его сайты связывания находятся на большом расстоянии от промотора. С 3'- стороны от генов были встроены 10 сайтов связывания белка-активатора GAL4. 1A2- (или Wari-)инсулятор, фланкированный LOX-сайтами, был расположен за геном *white* (или *yellow*) и сайтами для белка-активатора дрожжей. В данной системе в случае наличия функционального взаимодействия между тестируемыми парами регуляторных элементов, GAL4-активатор будет приближаться к промотору гена и активировать транскрипцию.

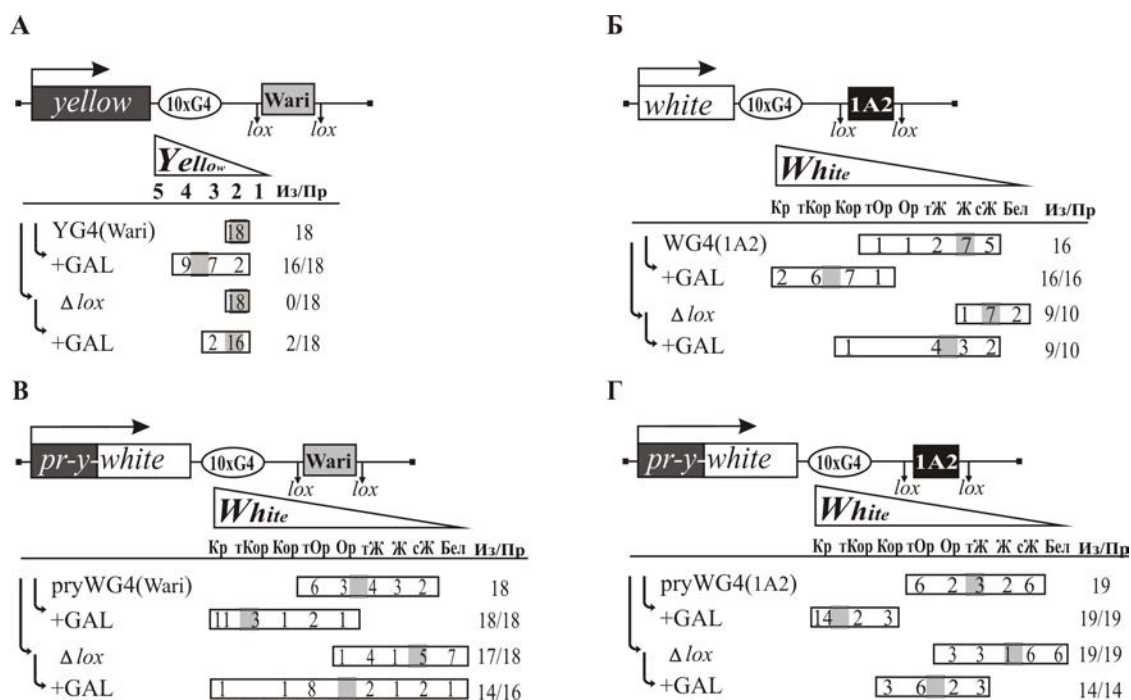
В результате трансформации конструкции YG4(Wari) было получено 18 независимых трансгенных линий. Пигментация тела и крыльев трансгенных линий была на уровне базовой экспрессии гена *yellow*. Введение GAL4-активатора привело к усилению пигментации практически во всех трансгенных линиях, т.е. GAL4-активатор эффективно стимулировал транскрипцию гена *yellow*. Делеция Wari-инсулятора показала, что наблюдаемая активация зависит от присутствия инсулятора в системе.

В результате трансформации конструкции WG4(1A2) было получено 16 независимых трансгенных линий. Пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих конструкцию, была на уровне базовой экспрессии гена *white*. Введение GAL4-активатора привело к значительному усилению пигментации глаз во всех протестированных линиях. В отсутствие 1A2-инсулятора эффективной активации не наблюдалось.

Таким образом, инсулятор 1A2 может функционально взаимодействовать с промотором гена *white*, а Wari - с промотором гена *yellow*. Интересно, что делеция 1A2 инсулятора в трансгенных линиях мух, несущих конструкцию WG4(1A2), привела к значительному снижению пигментации глаз в большинстве трансгенных линий, что свидетельствует о том, что 1A2-инсулятор поддерживает базовую активность промотора гена *white*.

Дополнительно была проверена способность данных инсуляторов взаимодействовать с промотором гена *yellow* в глазах. Для этого были сделаны конструкции ргуWG4(Wari) (рис. 5В) и ргуWG4(1A2) (рис. 5Г), в которых 1A2- и Wari-инсуляторы располагались с 3'-стороны от гена *white* и сайтов GAL4-активатора, при этом ген *white* находился под контролем промотора гена *yellow*. Результат фенотипического анализа показал, что GAL4 активировал экспрессию гена *white* с промотора гена *yellow*. Делеция инсуляторов привела к значительному снижению активации транскрипции в присутствии GAL4-активатора. Таким образом, оба инсулятора способны взаимодействовать с промотором гена *yellow* в глазах. Важно отметить, что, как и в конструкции WG4(1A2), делеция любого из инсуляторов приводила к снижению транскрипции, что

свидетельствует о том, что оба инсулятора поддерживают базовый уровень активности промотора гена *yellow* в глазах.



**Рис.5.** 1A2- и Wari-инсуляторы функционально взаимодействуют с промоторами генов *white* и *yellow*, соответственно. Конструкции: А - YG4(Wari), Б - WG4(1A2), В - pryWG4(Wari), Г - pryWG4(1A2). Обозначения: 10xG4 – десять сайтов связывания дрожжевого белка-активатора GAL4; серым и черным прямоугольниками обозначены инсуляторы Wari и 1A2, соответственно; pry-y-white – ген *white*, находящийся под контролем промотора гена *yellow*. Остальные обозначения как на рис.2.

Таким образом, 1A2- и Wari-инсуляторы взаимодействуют с промоторами разных классов.

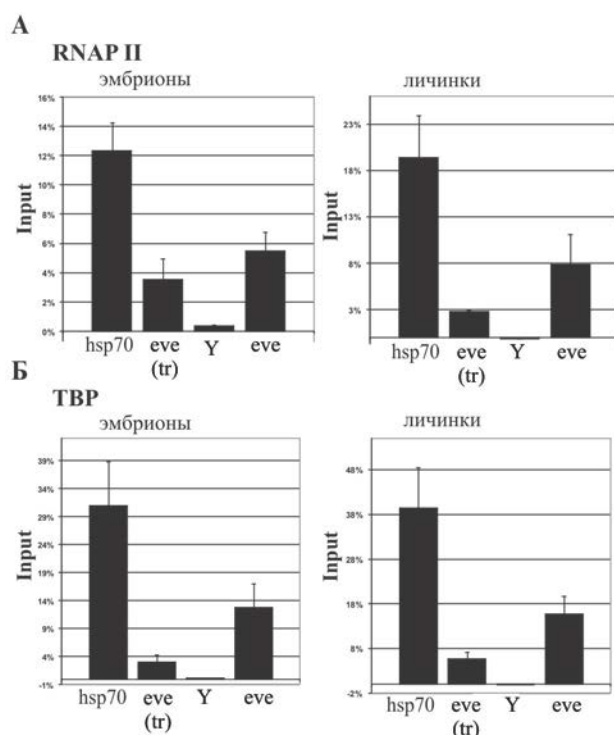
## 2) Белки инсуляторного комплекса, CP190 и Mod(mdg4)-67.2, детектируются на промоторе гена *even-skipped* только в присутствии 1A2-инсулятора в трансгене.

Белки Su(Hw), CP190 и Mod(mdg4)-67.2 ответственны за активность 1A2 инсулятора. В случае физического взаимодействия инсулятора с промотором можно ожидать, что инсуляторные белки будут детектироваться на промоторе методом иммунопреципитации хроматина (X-ChIP). Однако ранее было показано, что белки Su(Hw), CP190 и Mod(mdg4)-67.2 связываются с 1A2 инсулятором, но не обнаруживаются на промоторе гена *yellow* в эмбрионах *Drosophila*. Также недавно в нашей лаборатории было показано отсутствие белков Mod(mdg4)-67.2 и CP190 на промоторе гена *yellow* на стадиях личинки и куколки *Drosophila* дикого типа. Отсутствие обогащения компонентами инсуляторного комплекса было показано и для промотора гена *yellow* в составе трансгена, содержащего 1A2 с 3'-стороны от гена *yellow*.

Наиболее вероятным объяснением отрицательного результата является тканеспецифичная экспрессия гена *yellow* только в клетках эктодермы, которые составляют незначительную часть от общего числа клеток, взятых в анализ. Можно предположить, что взаимодействие между инсулятором и промотором в клетках с неактивным геном *yellow* отсутствует и чувствительности метода X-ChIP не хватает для идентификации статистически значимого повышения связывания инсуляторных белков с промоторной областью гена *yellow*.

Мы протестировали обогащение разных промоторов белками основного транскрипционного комплекса: RNAPII и TBP. Хроматин был иммунопреципитирован с использованием антител против данных белков, либо против неспецифических антител. Результаты экспериментов X-ChIP детектировались с помощью метода ПЦР в реальном времени (рис. 6). Во всех приведенных данных сигнал преципитации с неспецифическими антителами вычтен из представленных результатов. Действительно, иммунопреципитация с использованием антител против RNAPII и TBP показала только слабое или полное отсутствие обогащения этих факторов на промоторе гена *yellow*. В то же время, промотор гена *even-skipped* был достаточно активен для детекции RNAPII и TBP на промоторе методом X-ChIP.

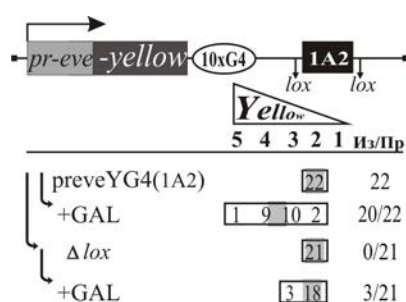
Следовательно, в случае, если промотор гена *even-skipped* взаимодействует с 1A2-инсулятором, то он является подходящим для тестирования взаимодействий инсуляторов с промоторами данным методом.



**Рис.6.** Связывание RNAPII и TBP с промоторами генов *yellow* и *even-skipped* на эмбриональной стадии развития и стадии личинки *Drosophila*. Результаты X-ChIP анализа с антителами к (А) RNAPII и (Б) TBP. На диаграммах представлены результаты ПЦР в реальном времени после X-ChIP анализа (среднее значение четырех экспериментов; вертикальной линией обозначается стандартное отклонение). Обозначения: hsp70 - эндогенный промотор гена теплового шока 70; eve (tr) - промотор гена *even-skipped* в конструкции preveYG4(1A2); Y - эндогенный промотор гена *yellow*; eve - эндогенный промотор гена *even-skipped*.

Для проверки способности промотора гена *even-skipped* взаимодействовать с 1A2-инсулятором была сделана конструкция *preveYG4(1A2)* (рис. 7), в которой 1A2-инсулятор был встроен с 3'-стороны от гена *yellow*, находящегося под контролем промотора гена *even-skipped*. Сайты связывания GAL4-активатора находились между геном *yellow* и инсулятором. В результате трансформации конструкции *preveYG4(1A2)* было получено 22 независимых трансгенных линии. Пигментация тела и крыльев трансгенных линий была на уровне базовой экспрессии гена *yellow*. Введение GAL4-активатора привело к усилению пигментации в 20 линиях. Данная активация зависела от присутствия 1A2-инсулятора в системе, что было подтверждено его делецией.

**Таким образом, промотор гена *even-skipped* функционально взаимодействует с 1A2-инсулятором.**



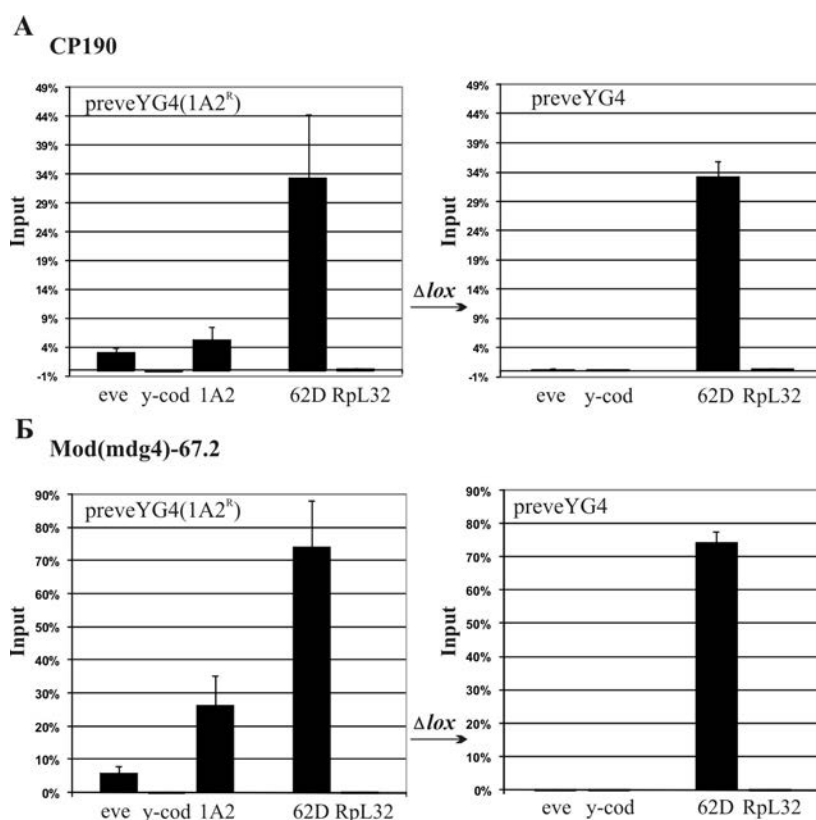
**Рис.7. 1A2-инсулятор функционально взаимодействует с промотором гена *even-skipped*.** Конструкция *preveYG4(1A2)*. Обозначения: *preve-yellow* – ген *yellow*, находящийся под контролем промотора гена *even-skipped*. Остальные обозначения как на рис.5.

На следующем этапе методом X-ChIP было подтверждено наличие белков RNAPII и TBP на промоторе гена *even-skipped* в составе трансгенной конструкции *preveYG4(1A2)* (рис. 6).

Далее мы проанализировали связывание белков CP190 и Mod(*mdg4*)-67.2 на промоторе гена *even-skipped* в двух трансгенных линиях, несущих конструкцию *preveYG4(1A2)*. В качестве положительного контроля была выбрана описанная в других работах область 62D, содержащая три сильных сайта связывания для белка Su(Hw), в качестве отрицательного – кодирующая область гена *Rpl32* (рис. 8).

Как и ожидалось, CP190 и Mod(*mdg4*)-67.2 взаимодействовали с промотором гена *even-skipped* на стадии личинки (рис. 8). Кроме того, при делеции 1A2-инсулятора обогащение белков CP190 и Mod(*mdg4*)-67.2 на промоторе гена *even-skipped* исчезало, что свидетельствует о том, что данный сигнал опосредован присутствием 1A2-инсулятора в составе трансгена. Сходный результат был получен и в двух трансгенных линиях на эмбриональной (0-16 часов) стадии развития. Эти результаты подтверждают наличие физического взаимодействия инсуляторов с промоторами генов. Кроме того, корреляция присутствия инсуляторных белков и основных

факторов транскрипции предполагает, что инсулятор-промоторные взаимодействия являются транскрипционно-зависимыми.



**Рис.8. Взаимодействие CP190 и Mod(mdg4)-67.2 с промотором гена *even-skipped* в трансгенных линиях в присутствии и в отсутствие 1A2-инсулятора в системе.** Представлен результат X-ChIP анализа с использованием антител к (А) CP190 и (Б) Mod(mdg4)-67.2 в одной из двух протестированных гомозиготных трансгенных линий на стадии личинки. Для X-ChIP анализа использовался материал из трансгенной линии *yacw<sup>1118</sup>*, несущих конструкцию preveYG4(1A2) в отсутствие эндогенного 1A2-инсулятора и гена *yellow*. На диаграммах представлены результаты ПЦР в реальном времени после X-ChIP анализа (среднее значение четырех экспериментов; вертикальной линией обозначается стандартное отклонение) в одной из двух протестированных линий на стадии личинки. Обозначения: eve – промотор гена *even-skipped*; y-cod – кодирующая область гена *yellow*; 1A2 – 1A2 инсулятор; 62D - область, содержащая три сильных сайта связывания для белка Su(Hw), положительный контроль; Rpl32 - кодирующая область гена *Rpl32*, отрицательный контроль; Δlox – материал был получен из трансгенной линии с делецией 1A2-инсулятора.

Таким образом, методом X-ChIP продемонстрировано, что с промотором гена *even-skipped* при наличии инсулятора в конструкции связываются инсуляторные белки CP190 и Mod(mdg4)-67.2.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### I. Влияние некодирующей транскрипции на активность энхансеров.

В данной работе впервые был проведен анализ влияния транскрипции, проходящей через энхансеры, на их активность. Была создана модельная система, в которой через хорошо известные

тканеспецифичные энхансеры генов *yellow* и *white* запускалась транскрипция разной степени интенсивности. В результате было установлено, что проходящая транскрипция может нейтрализовать активирующее действие энхансеров. При этом сильная транскрипция приводила к полной или почти полной нейтрализации энхансера, тогда как минимальная транскрипция влияла менее выражено. Было продемонстрировано, что расстояние между промотором, с которого иницируется некодирующая транскрипция (UAS-промотор), и энхансером не влияет на инактивацию последнего. Вместе с тем при изменении направления транскрипции, идущей с UAS-промотора, энхансер продолжал нормально функционировать. Это подтверждает, что именно некодирующая транскрипция, а не конкуренция промоторов за сигнал энхансера, нейтрализует его активность.

В активности энхансеров выделяют две составляющие: способность активировать транскрипцию и взаимодействовать с промотором гена-мишени на больших расстояниях. В данной работе было показано, что некодирующая транскрипция может нейтрализовать активность энхансеров, находящихся как на близком, так и на дальнем расстоянии от промотора гена-мишени. Следовательно, можно предположить, что проходящая через энхансер транскрипция нарушает активирующее действие энхансера.

Установлено, что присутствие терминатора транскрипции стабилизирует работу энхансеров в составе трансгена. Этот факт может быть использован при создании трансгенных животных или клеточных линий, создаваемых для экспрессии рекомбинантных белков. Так, фланкирование трансгенной конструкции терминаторами транскрипции позволит нормализовать активность используемых регуляторных элементов.

Исходя из полученных данных, можно предложить несколько объяснений влияния некодирующей транскрипции на работу энхансеров. Наиболее очевидная, на первый взгляд, возможность состоит в том, что в процессе транскрипции через регуляторный элемент «проходит» огромный транскрипционный комплекс. Этот комплекс может физически «сбрасывать» регуляторные белки, связанные с энхансером. Однако с этой версией не согласуется тот факт, что множество энхансеров находятся в интронах активируемых ими генов. Через ДНК-последовательности таких энхансеров идет сильная транскрипция, но при этом они продолжают нормально функционировать. Одним из объяснений способности энхансера функционировать в интроне является наличие сайтов связывания для не идентифицированных пока белков, нейтрализующих негативное влияние проходящей транскрипции. Другим возможным объяснением может быть быстрая деградация интронной РНК. Необходимо упомянуть, что в последнее время появляется все больше данных о наличии РНК-связывающих доменов в белках, контролирующих транскрипцию. В частности, такие домены обнаружены у ряда репрессорных белков. Возможно, некоторые белковые факторы способны узнавать некодирующие РНК, проходящие через энхансерные элементы, связываться с такими участками генома и

нейтрализовать активность энхансеров. Также нельзя исключать, что на активность энхансеров могут влиять модификации нуклеосом, вносимые транскрипционным комплексом при проходящей транскрипции.

## II. Специфичность инсулятор-промоторных взаимодействий

В данном исследовании на разработанной ранее модельной системе был проведен анализ специфичности инсулятор-промоторных взаимодействий. В результате было показано, что инсуляторы Wari и 1A2 способны взаимодействовать с разными промоторами в различных тканях *Drosophila*.

Методом иммунопреципитации хроматина было установлено, что инсуляторные белки, также как и РНК-полимераза II и ТВР, детектируются на промоторе гена *even-skipped*, но не на промоторе гена *yellow*. Это дает возможность предположить, что инсулятор-промоторные взаимодействия носят транскрипционно-зависимый характер.

В геноме 1A2-инсулятор находится за геном *yellow*, Wari-инсулятор за геном *white*. Таким образом, взаимодействие данных инсуляторов с промоторами генов-мишеней может приводить к образованию «генной» петли, сближая терминатор с промотором гена. В настоящее время образование транскрипционно-зависимой «генной» петли (сближение 5' и 3' некодирующих областей генов) было продемонстрировано у дрожжей, человека, и HIV провируса. В дрожжах было показано, что для формирования «генной» петли нужен основной фактор транскрипции TFIIВ и белки Ssu72 и Pta1, участвующие в 3'-процессинге. Вполне вероятно, что данный механизм является консервативным для эукариот и что взаимодействие между инсуляторами и промоторами необходимо для формирования «генной» петли и/или ее стабилизации.

Предполагается, что формирование «генной» петли необходимо для реинициации транскрипции, способствуя эффективному переносу РНК-полимеразы II от терминатора к промотору, а также в сопряжении транскрипции с экспортом мРНК и терминации транскрипции.

Также в данной работе было продемонстрировано, что взаимодействие инсуляторов с промоторами необходимо для базовой активности, в отсутствие энхансера, промоторов генов *yellow* и *white* в глазах мух. Таким образом, возможно, что кроме потенциальной роли «генной» петли в сопряжении транскрипции с экспортом мРНК и в терминации транскрипции, инсуляторы могут рекрутировать белки комплексов ремоделинга хроматина, стабилизируя связывание TFIIID комплекса.

## ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что некодирующая транскрипция негативно влияет на активность энхансеров генов *white* и *yellow*.

- 2) Продемонстрировано, что терминаторы транскрипции стабилизируют функционирование энхансеров генов *white* и *yellow* в составе трансгенов.
- 3) Установлено, что 1A2- и Wari-инсуляторы функционально взаимодействуют с промоторами разных классов.
- 4) Выяснено, что обогащение белков CP190 и Mod(mdg4)-67.2 на промоторе гена *even-skipped* зависит от присутствия 1A2-инсулятора в трансгене.

## СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах:

1. Давыдова А.И., Ерохин М.М., Георгиев П.Г., Четверина Д.А. Дистанционные взаимодействия между энхансерами и промоторами *D.melanogaster* опосредуются фланкирующими трансген Su(Hw)-инсуляторами. Генетика. 2011. 47(8):1037-1043.
2. M. Erokhin, A. Davydova, O. Kurchanova, A. Parshikov, P. Georgiev, D. Chetverina. Insulators form gene loops by interacting with promoters in *Drosophila*. Development. 2011. 138(18):4097-4106.

### Тезисы конференций:

1. D. Chetverina, A. Davydova, M. Erokhin, P. Georgiev. Transcription affects enhancer activity in *D.melanogaster*. 36th FEBS Congress «Biochemistry for tomorrow's medicine». Torino, Italy. 25 - 30 June, 2011.
2. M. Erokhin, A. Davydova, P. Georgiev, D. Chetverina. Insulators form gene loops by interacting with promoters in *Drosophila*. 36th FEBS Congress «Biochemistry for tomorrow's medicine». Torino, Italy. 25 - 30 June, 2011.
3. Давыдова А.И., Четверина Д.А., Ерохин М.М., Георгиев П.Г. Анализ влияния некодирующей транскрипции на активность энхансеров *D.melanogaster*. 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, Россия. 18 - 22 апреля, 2011.
4. Четверина Д.А., Ерохин М.М., Давыдова А.И., Георгиев П.Г. Анализ взаимодействия 1A2- и Wari-инсуляторов с промоторами генов *yellow* и *white D. melanogaster*. 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, Россия. 18 - 22 апреля, 2011.
5. Давыдова А.И. Некодирующая транскрипция влияет на коммуникативную активность энхансеров генов *white* и *yellow D. melanogaster*. Материалы международного научного форума «Ломоносов 2011». Москва, Россия. 11-15 апреля, 2011.
6. M. Erokhin, A. Davydova, P. Georgiev and D. Chetverina. Interaction of Insulators with Promoters results in gene looping in *Drosophila melanogaster*. 35th FEBS Congress "Molecules of Life". Gothenburg, Sweden. 26 June-1 July, 2010.
7. A. Davydova, D. Chetverina, P. Georgiev. Transcription affects communicative activity of enhancers in *D.melanogaster*. The international symposium "Control of gene expression and cancer". Moscow, Russia. 21 - 25 June, 2010.
8. Давыдова А.И., Четверина Д.А., Георгиев П.Г. Транскрипция, проходящая через энхансеры генов *white* и *yellow D. melanogaster*, влияет на их коммуникативную активность. 14-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, Россия. 19 - 23 апреля, 2010.
9. Давыдова А.И., Четверина Д.А., Георгиев П.Г. Транскрипция через энхансер гена *white D. melanogaster* влияет на его активность. 13-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, Россия. 28 сентября – 2 октября, 2009.