

На правах рукописи

УДК 577.214.4:575.22

ЕРОХИН МАКСИМ МАКСИМОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АКТИВНОСТЕЙ ИНСУЛЯТОРОВ
ИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ *YELLOW* И *WHITE* У
*D. MELANOGASTER***

Специальность 03.00.26 - молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2009

Работа выполнена в лаборатории регуляции генетических процессов

Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН

Научный руководитель: академик РАН, доктор биологических наук,
профессор П.Г. Георгиев

Официальные оппоненты: доктор биологических наук Е. Н. Набирочкина
доктор биологических наук, профессор М. В. Глазков

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной
генетики РАН

Защита диссертации состоится 27 октября 2009 года в 11 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 24 сентября 2009 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Л.С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. Транскрипция является ключевым этапом, на котором контролируется уровень экспрессии генов. Инициация и регуляция транскрипции ДНК у высших эукариот с участием РНК-полимеразы II зависит от множества факторов: от cis-действующих регуляторных ДНК-последовательностей и транс-действующих белков. Cis-действующие регуляторные ДНК-последовательности включают энхансеры, сайленсеры, базальный промотор, инсуляторы. Энхансеры – ДНК-последовательности, представляющие собой сайты связывания белков-активаторов транскрипции. Энхансеры высших эукариот могут располагаться на разном расстоянии от промотора контролируемого ими гена. Так, некоторые энхансеры способны активировать гены на больших расстояниях, достигающих нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. Энхансеры действуют вне зависимости от положения относительно направления транскрипции гена. Сайленсеры – элементы, оказывающие негативное влияние на транскрипцию генов; на них собираются белковые комплексы, подавляющие экспрессию генов. К сайленсерам относятся ДНК-элементы для сборки комплекса белков группы Polycomb (PRE – Polycomb Response Element). Так же как и энхансеры, сайленсеры действуют вне зависимости от их положения относительно направления транскрипции гена и не обладают специфичностью действия. Предполагается, что важная роль в контроле специфичности действия энхансеров и сайленсеров принадлежит инсуляторам. В настоящее время сформулированы два независимых критерия, по которым регуляторный элемент может быть отнесен к инсуляторам: способность блокировать энхансеры и служить барьером между транскрипционно активным хроматином и гетерохроматином. Инсуляторы блокируют активность энхансера, но это происходит только в том случае, если инсулятор находится между энхансером и промотором гена. При этом инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера и промотора, то есть энхансер сохраняет способность влиять на незаблокированный инсулятором промотор, а промотор может быть активирован другим энхансером. Для некоторых инсуляторов показана способность блокировать репрессию, опосредованную сайленсерами.

В настоящее время существует две группы моделей функционирования инсуляторов. Модели первой группы предполагают физическое прикрепление белков, взаимодействующих с ДНК-последовательностью инсулятора либо к ядерному матриксу, либо к ядерной оболочке и/или стабильные взаимодействия между белковыми компонентами инсуляторов, что приводит к образованию петель, являющихся независимыми доменами транскрипции генов. Модели второй группы постулируют, что инсуляторы блокируют передачу (прием) сигнала от энхансера к промотору. Предполагается существование нестабильных взаимодействий между белками, взаимодействующими с инсуляторами и белками других регуляторных элементов (энхансеров или промоторов).

Несмотря на большое количество накопленной информации, ни одна из этих моделей не может объяснить все свойства инсуляторов. Становится очевидным, что как дальнейшее изучение многообразия инсуляторов, так и изучение их функциональных свойств необходимо для понимания механизма их действия и роли в регуляции транскрипции.

Данная работа посвящена изучению свойств Wari- и 1A2-инсуляторов *D. melanogaster*. В геноме Wari-инсулятор находится между расположенными друг за другом генами *white* и *CG32795*, в непосредственной близости от 3'-конца гена *white*. 1A2-инсулятор был обнаружен между геном *yellow* и *achaete-scute* генным комплексом, в непосредственной близости от 3'-конца гена *yellow*. В данной работе показано, что Wari-инсулятор обладает сайленсер-блокирующей активностью. Продемонстрировано, что Wari- и 1A2-инсуляторы взаимодействуют с промоторами генов *white* и *yellow*, соответственно. Разработана новая модельная система для тестирования ДНК-последовательностей на инсуляторную активность.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Основной целью работы явилось изучение свойств Wari- и 1A2-инсуляторов.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) Выяснить способность Wari-инсулятора блокировать сайленсер из регуляторной области гена *Ubx*.
- 2) Определить входят ли инсуляторные белки CP190 и E(y)2 в состав белкового комплекса Wari-инсулятора.
- 3) Выяснить возможность взаимодействия Wari- и 1A2-инсуляторов с промоторами генов *white* и *yellow*, соответственно.
- 4) Разработать модельную систему для тестирования ДНК-последовательностей на инсуляторную активность в клеточных культурах *D. melanogaster*.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ. В работе впервые показано наличие у Wari-инсулятора сайленсер-блокирующей активности. Показано, что инсуляторные белки CP190 и E(y)2 являются белковыми компонентами Wari-инсулятора. Продемонстрировано прямое участие E(y)2 в сайленсер-блокирующей, но не в энхансер-блокирующей активности Wari-инсулятора. В данной работе показано, что инсуляторы Wari и 1A2 взаимодействуют с промоторами генов *white* и *yellow*, соответственно. Разработана новая модельная система для быстрого анализа ДНК-последовательностей на наличие инсуляторной активности. Результаты данной работы позволяют объяснить механизм действия инсуляторов через их способность непосредственно взаимодействовать с промоторами генов.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Результаты диссертационной работы были представлены на международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2008» (7-11 апреля 2008 года) и «Ломоносов-2009» (13-18 апреля 2009 года); на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 11-15 мая 2008 года); на 13-ой международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009); на международных конференциях 9th Young Scientist Forum Labyrinth of cells and molecules (YSF, Prague) July 2-4 2009 and 34rd FEBS Congress "Life's Molecular Interactions", Prague, Czech Republic, 4-9 July, 2009; EMBO conference Nuclear Structure and Dynamics, France, Isle sur la Sorgue, 30 Sept - 4 Oct, 2009.

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Из них статей – 1, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях – 7.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ. Диссертация изложена на 136 страницах, содержит 33 рисунка и 2 таблицы, состоит из введения, обзора литературных данных, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 144 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА I. Изучение сайленсер-блокирующей активности Wari-инсулятора *D. melanogaster*.

1) Wari-инсулятор обладает сайленсер-блокирующей активностью

Исследование способности Wari-инсулятора блокировать Pc-G-зависимые сайленсеры проводилось на ранее разработанной модельной системе в трансгенных линиях *D. melanogaster*. Для этого конструкции, содержащие необходимый набор регуляторных элементов, были фланкированы 5'- и 3'-концами Р-элемента, включающими концевые

инвертированные повторы, необходимые для интеграции конструкций в геном *D. melanogaster*.

Для изучения сайленсер-блокирующей активности Wari-инсулятора был использован известный сайленсер размером 660 п. н. из регуляторной области гена *Ultrabithorax* (PRE *Ubx*). Известно, что с этим участком *in vivo* связываются белки группы Polycomb. Распространение гетерохроматина, обусловленное присутствием PRE *Ubx*, приводит к репрессии промоторов генов в составе трансгена. В качестве репортерных генов использовались гены *yellow* и *white*. Ген *white* отвечает за пигментацию глаз, ген *yellow* – за пигментацию кутикулярных структур личинки и имаго.

В модельной системе присутствовали энхансеры, определяющие экспрессию гена *yellow* в кутикуле тела, в крыловых пластинках и в щетинках (далее энхансеры тела (B), крыльев (W) и энхансер щетинок (Br)). Энхансеры тела и крыльев гена находились с 5'-стороны от гена *yellow*, энхансер щетинок – в интроне гена *yellow*. Сайленсер был встроен между энхансерами тела и крыльев в положение –1870 по отношению к старту транскрипции гена *yellow*. Wari-инсулятор длиной 825 п.н. был встроен в положение –893 по отношению к старту транскрипции гена *yellow* между сайленсером и промоторами расположенных друг за другом генов *yellow* и *white* [(PRE)(Wari)YW] (рис.1А). Известно, что взаимодействие между двумя копиями Wari-инсулятора усиливает энхансер-блокирующую активность данного элемента. Для того чтобы оценить влияние взаимодействия Wari-инсуляторов на блокирование PRE, была сконструирована вторая конструкция, в которой Wari-инсулятор, находящийся за геном *white*, был делетирован [(PRE)(Wari)YWΔ] (рис.1Б).

В данной системе сайленсер был фланкирован FRT-сайтами для сайт-специфической рекомбиназы Flp, тестируемый Wari-инсулятор LOX-сайтами для сайт-специфической рекомбиназы Cre. Индукция сайт-специфической рекомбинации между FRT-сайтами (LOX-сайтами) позволяет удалить фланкированный этими сайтами участок *in vivo*, в результате чего можно сравнить экспрессию генов в присутствии и в отсутствие тестируемого элемента в одном и том же месте генома.

При таком расположении элементов в модельной системе, в случае присутствия у тестируемого фрагмента ДНК сайленсер-блокирующей активности, он будет защищать экспрессию гена *yellow* в щетинках и экспрессию гена *white* в глазах мух, в то время как экспрессия гена *yellow* в теле и крыльях будет подвержена репрессии, так как данные энхансеры не защищены инсулятором.

Уровень экспрессии гена *yellow* в щетинках оценивался путем визуального анализа пигментации щетинок по шкале, в которой 5 соответствует уровню пигментации дикого типа, 1 соответствует отсутствию пигментации (инактивация гена *yellow*), var – переменная пигментация (пигментирована только часть щетинок). Экспрессия гена *white* оценивалась путем визуальной оценки пигментации глаз по стандартной шкале: красная окраска является пигментацией глаз мух дикого типа (экспрессия гена *white* при стимуляции тканеспецифичным энхансером); желтая и темно-желтая окраска – среднестатистическое проявление базовой пигментации (экспрессия гена *white* в отсутствие тканеспецифичного энхансера), белая окраска глаз наблюдается в отсутствие пигментации (полная инактивация гена *white*).

Так как используемый сайленсер функционально активен только в ≈50% трансгенных линий, для анализа были выбраны линии, в которых экспрессия гена *yellow* в теле и в крыльях исчезала после делеции сайленсера. Фенотипический анализ проводился на трансгенных самцах в линиях гетерозиготных по конструкции в присутствии и в отсутствие сайленсера или Wari-инсулятора (рис.1А, Б).

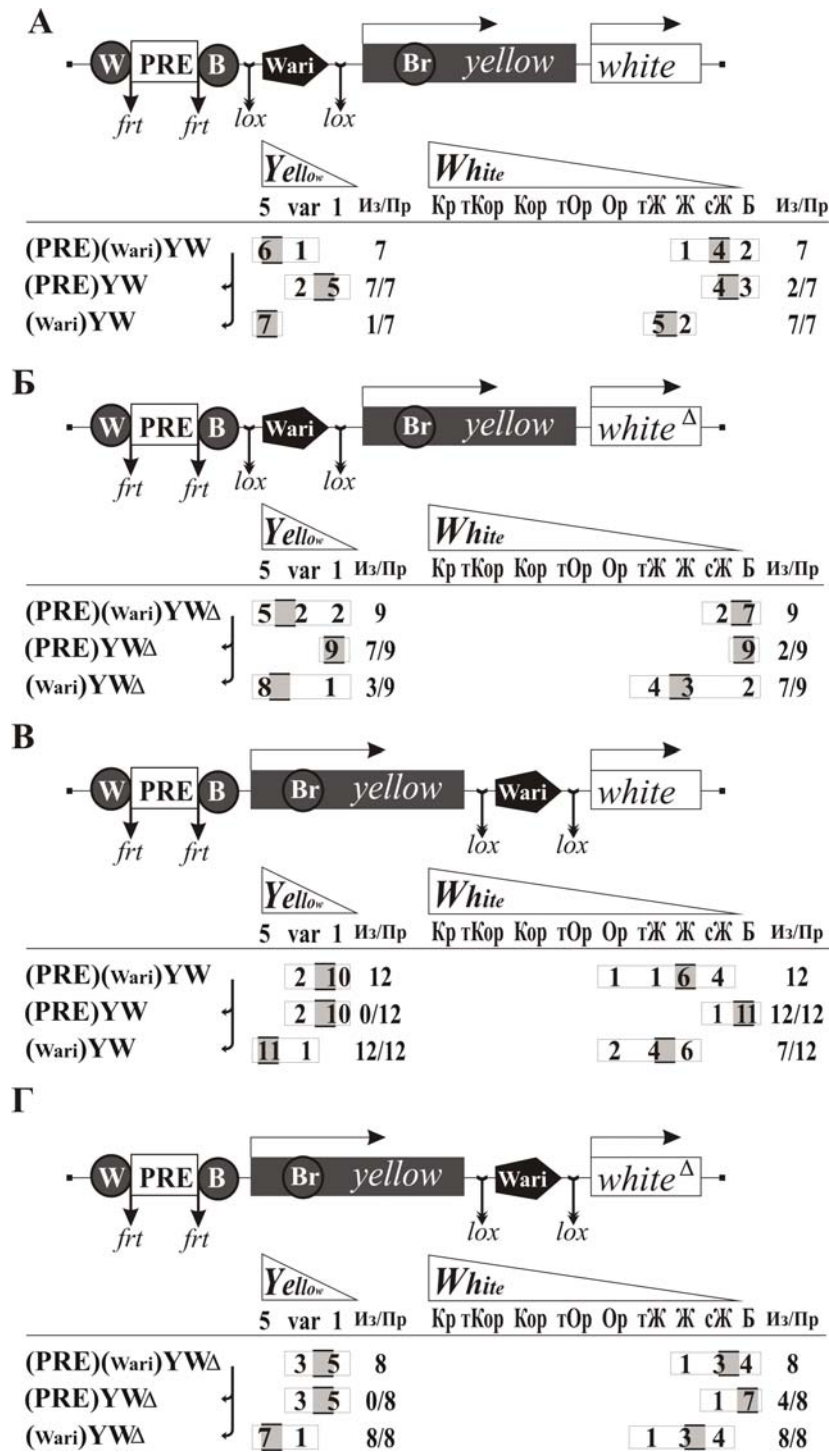


Рис. 1. Сайленсер-блокирующая активность Wari-инсулятора. Конструкции: А - (PRE)(Wari)YW, Б - (PRE)(Wari)YW Δ , В - (PRE)Y(Wari)W, Г - (PRE)Y(Wari)W Δ . (А-Г) Сверху представлена схема конструкции, под схемой суммированы результаты по анализу фенотипов трансгенных линий мух в щетинках (*yellow*) и глазах (*white*), несущих данную конструкцию и ее производных. Обозначения: серые и белые прямоугольники – гены *yellow* и *white*, соответственно, горизонтальные стрелки указывают направление транскрипции генов. *White* Δ – Wari-инсулятор делегирован за геном *white*. PRE – сайленсер из регуляторной области гена *Ubx*. Серые круги – тканеспецифичные энхансеры гена *yellow*, обеспечивающие высокий уровень экспрессии в крыльях (W), теле (B) и щетинках (Br). Черный пятиугольник – Wari-инсулятор; острый угол указывает его ориентацию в трансгенной конструкции относительно его ориентации в геноме за геном *white*. Вертикальными стрелками отмечены сайты FRT и LOX для сайт-специфических рекомбиназ Flp и Cre, соответственно. 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. Пигментация щетинок, зависящая от уровня экспрессии

гена *yellow*: 1 – отсутствие пигментации, var – варибельная окраска, окрашена только часть щетинок; 5 – уровень пигментации, соответствующий энхансер-зависимой экспрессии гена. Цифры в строках – число линий с соответствующей пигментацией. Из/Пр – отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение (Из) пигментации при удалении исследуемого элемента, к общему числу проанализированных линий (Пр). Серым курсором на цифровой панели указано среднее значение фенотипов в проанализированных линиях мух.

Анализ трансгенных линий мух, несущих конструкцию [(PRE)(Wari)YW] (рис.1А) показал, что Wari-инсулятор эффективно защищает транскрипцию гена *yellow*. Так, пигментация щетинок большинства линий мух в присутствии Wari-инсулятора соответствовала энхансер-зависимой экспрессии гена *yellow*, при делеции Wari-инсулятора во всех линиях происходила репрессия гена *yellow* в щетинках (рис.1А). Отсутствие второй копии Wari-инсулятора [(PRE)(Wari)YWΔ] незначительно повлияло на сайленсер-блокирующую активность тестируемого Wari-инсулятора в отношении гена *yellow* (рис.1Б).

В отличие от гена *yellow*, Wari-инсулятор в обеих конструкциях, [(PRE)(Wari)YW] и [(PRE)(Wari)YWΔ], практически не защищал ген *white* от репрессии сайленсером. Делеция Wari-инсулятора показала, что он был активен только в двух из семи линий мух, несущих конструкцию [(PRE)(Wari)YW] и в двух из девяти линий с конструкцией [(PRE)(Wari)YWΔ].

В проанализированных конструкциях ген *yellow* находился на расстоянии 893 п.н. от Wari-инсулятора; ген *white* был удален от тестируемого Wari-инсулятора на расстояние около 5 т.п.н. (длина гена *yellow*). Для того чтобы проверить, влияет ли расстояние между Wari-инсулятором и промотором репортерного гена на способность защищать данный промотор от репрессии были сделаны две конструкции, в которых тестируемый Wari-инсулятор был встроен между генами *yellow* и *white* [конструкции (PRE)Y(Wari)W (рис.1В) и (PRE)Y(Wari)WΔ (рис.1Г)]. Расположение остальных элементов соответствовало первым двум конструкциям. В конструкции [(PRE)Y(Wari)WΔ] Wari-инсулятор за геном *white* был удален (рис.1Г).

В трансгенных линиях, несущих конструкцию [(PRE)Y(Wari)W] экспрессия гена *white* была защищена от репрессии сайленсером во всех линиях, что было подтверждено делецией Wari-инсулятора (рис. 1В). В конструкции [(PRE)Y(Wari)WΔ] Wari-инсулятор защищал экспрессию гена *white* только в 50% линий, что свидетельствует о том, что Wari-инсулятор, расположенный за геном *white*, необходим для эффективного блокирования сайленсера PRE (рис.1Г). В обеих конструкциях ген *yellow* был зарепрессирован, так как не был защищен инсулятором (рис.1В, Г). Таким образом, сайленсер-блокирующая активность Wari-инсулятора зависит от расстояния между ним и защищаемым промотором. При этом, в случае, когда два Wari-инсулятора фланкировали ген *white*, для сайленсер-блокирующей активности была важна вторая копия инсулятора.

2) Фрагмент Wari-инсулятора длиной 368 п.н. достаточен для энхансер-блокирующей и сайленсер-блокирующей активностей инсулятора.

Ранее была установлена функциональная область Wari-инсулятора длиной 368 п.н., необходимая для энхансер-блокирующей активности. Для того чтобы проверить, является ли данная область достаточной для сайленсер-блокирующей активности Wari-инсулятора, были протестированы разные ДНК-фрагменты Wari-инсулятора на способность защищать экспрессию гена *yellow* от сайленсер-опосредованной репрессии. Фрагменты инсулятора исследовались в конструкциях, которые были аналогичны конструкции (PRE)(Wari)YW (рис.2А). Тестируемые фрагменты были фланкированы LOX-сайтами и вставлены в положение -893 относительно начала транскрипции гена *yellow* между сайленсером и промотором гена *yellow*. Способность фрагментов Wari-инсулятора блокировать сайленсер-опосредованную репрессию во всех конструкциях была подтверждена их делецией в трансгенных линиях. Всего было протестировано три фрагмента Wari-инсулятора: функциональная область Wari-инсулятора длиной 368 п.н., необходимая для энхансер-

блокирующей активности; 3'-область полноразмерного Wari-инсулятора длиной 191 п.н.; фрагмент длиной 215 п.н., являющийся частью 368 п.н. фрагмента (рис.2Б).

В 10 из 11 линий, несущих трансгенную конструкцию с 368 п.н. Wari-инсулятором (PRE)(W³⁶⁸)YW, экспрессия гена *yellow* в щетинках была эффективно защищена от репрессии сайленсером (рис.2Б). В то же время, ни укороченный фрагмент 215 п.н., обладающий слабой способностью блокировать энхансеры, ни 191 п.н. 3'-область Wari-инсулятора анти-сайленсерной активностью не обладали. Таким образом, функциональный участок Wari-инсулятора длиной 368 п.н. достаточен не только для энхансер-блокирующей, но и для сайленсер-блокирующей активности инсулятора.

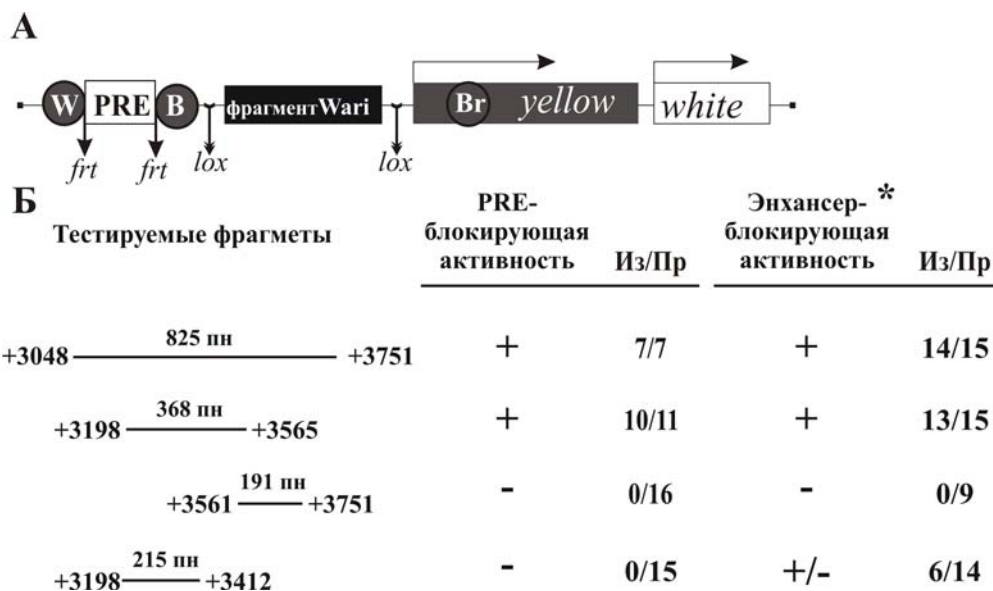


Рис. 2. Функциональная область Wari-инсулятора, отвечающая за сайленсер-блокирующую активность. А) Модельная система для тестирования ДНК-фрагментов Wari-инсулятора на способность блокировать сайленсер PRE *Ubx*. Б) Тестирование различных областей Wari-инсулятора на сайленсер-блокирующую активность. Цифрами обозначено положение анализируемых ДНК-фрагментов относительно старта транскрипции гена *mini-white* в плазмидном векторе pCaSpeR. Сверху схематически изображенных фрагментов обозначена их длина. «+» – фрагменты, обладающие энхансер- или сайленсер-блокирующей активностью; «-» – фрагменты, не обладающие соответствующей активностью. Из/Пр – отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение (Из) пигментации при удалении исследуемого элемента, к общему числу проанализированных линий (Пр). * - данные по энхансер-блокирующей активности Wari-инсулятора, полученные ранее в нашей лаборатории.

3) Инсуляторные белки E(y)2 и CP190 взаимодействуют с Wari-инсулятором *in vivo*.

Ранее было показано, что известные ДНК-связывающие инсуляторные белки, Su(Hw), dCTCF, Zw5 и GAF не взаимодействуют с последовательностью ДНК Wari-инсулятора. В то же время, Wari-инсулятор способен функционально взаимодействовать с Su(Hw)-зависимыми инсуляторами *gurзу* и 1A2. Возможным объяснением этих результатов является наличие общих белковых компонентов у данных инсуляторов. Одним из кандидатов является белок CP190, который не связывается с ДНК напрямую. В настоящее время показано, что он взаимодействует с Su(Hw)-, CTCF- и BEAF-зависимыми инсуляторами. Вторым потенциальным компонентом белкового комплекса Wari-инсулятора является белок E(y)2/Sus1, необходимый для сайленсер-блокирующей активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов. Белок E(y)2/Sus1 может рекрутироваться на инсуляторах путем взаимодействия с ДНК-связывающим белком инсуляторного комплекса.

Поэтому следующей задачей данного исследования стала проверка взаимодействия инсуляторных белков E(y)2 и CP190 с последовательностью Wari-инсулятора с помощью метода иммунопреципитации хроматина (X-ChIP).

Прежде всего, было проверено, взаимодействуют ли данные белки с Wari-инсулятором на эмбриональной клеточной линии *D. melanogaster* S2. Хроматин был иммунопреципитирован с использованием антител против E(y)2 и CP190, либо против неспецифических антител (рис.3). Результаты экспериментов X-ChIP детектировались с помощью метода ПЦР в реальном времени. Во всех приведенных данных сигнал преципитации с неспецифическими антителами вычтен из представленных результатов. В качестве положительного контроля был выбран известный инсулятор *gypsy*, взаимодействующий с данными белками, в качестве отрицательного – кодирующая область гена *ras*. В результате анализа экспериментов по иммунопреципитации хроматина с помощью данных антител было выявлено обогащение ДНК-последовательности Wari-инсулятора (рис.3). Таким образом, белки E(y)2 и CP190 связываются с последовательностью Wari-инсулятора в культуре клеток S2 *in vivo*.

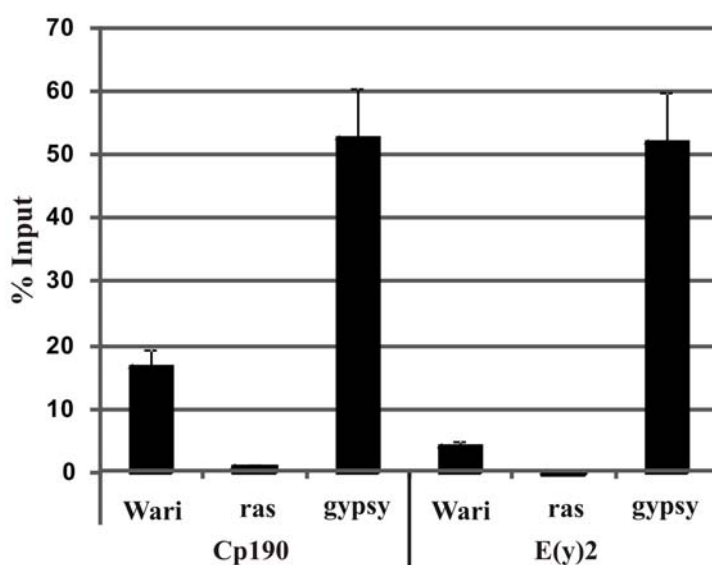


Рис.3. Иммунопреципитация хроматина, выделенного из культуры клеток S2 *D. melanogaster*. По оси X – анализ экспериментов X-ChIP с разных геномных областей. По оси Y – процент обогащения различных последовательностей относительно Input. Здесь и далее в рисунках с данными по иммунопреципитации хроматина показаны усредненные результаты трех экспериментов с учетом среднеквадратичных отклонений. Используются антитела против белков E(y)2 и CP190. *ras* – отрицательный контроль, *gypsy* – положительный.

На следующем этапе было проверено связывание белков E(y)2 и CP190 с Wari-инсулятором на разных стадиях развития *D. melanogaster* (рис.4). В качестве материала для экспериментов X-ChIP были выбраны 4 стадии: эмбриона (0-16 часов после откладки яиц), поздней личинки, средней куколки и имаго. Для всех стадий использовались мухи дикого типа. В качестве положительного контроля были выбраны инсулятор *gypsy* и 1A2, в качестве отрицательного – кодирующие области генов *ras* и *RpL32* (рис.4). Оказалось, что обогащение ДНК-последовательности Wari-инсулятора при иммунопреципитации хроматина с использованием антител против E(y)2 и CP190 наблюдалось только на эмбриональной и взрослой стадиях (рис.4). Таким образом, взаимодействие белков E(y)2 и CP190 с Wari-инсулятором может быть стадио-специфичным.

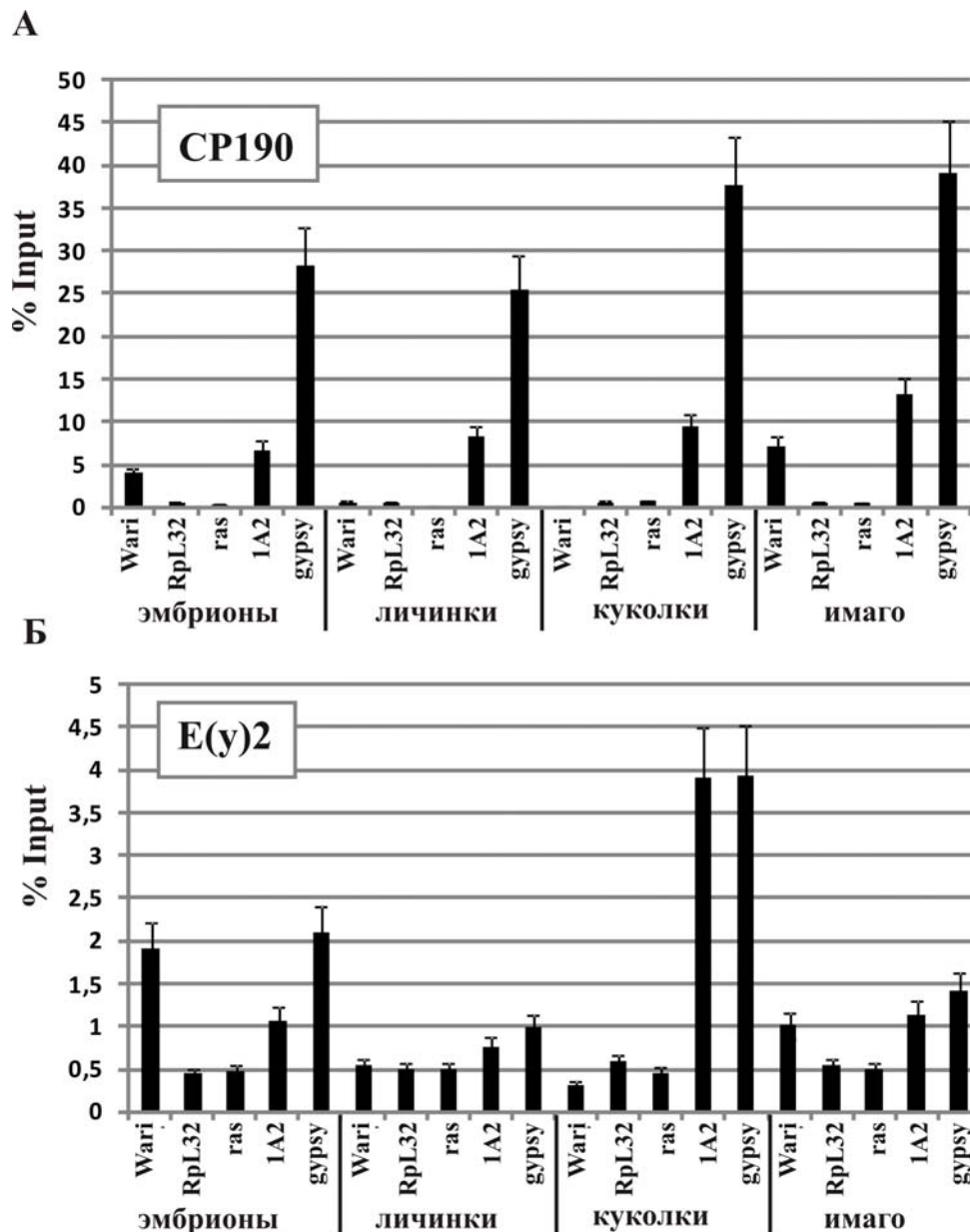


Рис.4. Связывание белков E(y)2 и CP190 с Wari-инсулятором на разных стадиях развития *D. melanogaster*. По оси Y – процент обогащения различных последовательностей относительно Input. По оси X – анализ экспериментов X-ChIP с разных геномных областей на разных стадиях. *ras* и *RpL32* – отрицательные контроли, *gypsy* и *1A2* – положительные. Иммунопреципитация с использованием антител против CP190 (А) и E(y)2 (Б).

Чтобы продемонстрировать, что белки E(y)2 и CP190 взаимодействуют с 368 п.н. функциональным участком Wari-инсулятора была выбрана трансгенная линия мух (PRE)(W³⁶⁸)YW, несущая 368 п.н. Wari-инсулятор между PRE и промотором гена *yellow*. В качестве положительного контроля был выбран инсулятор 1A2, в качестве отрицательного контроля были выбраны кодирующие области генов *RpL32* и *yellow* (*mid-y*) (рис.5). Эффективное обогащение наблюдалось только для области 368 п.н. Wari-инсулятора в составе трансгена, но не для кодирующих областей протестированных генов (рис.5). Таким образом, белки E(y)2 и CP190 взаимодействуют с 368 п.н. функциональным участком Wari-инсулятора.

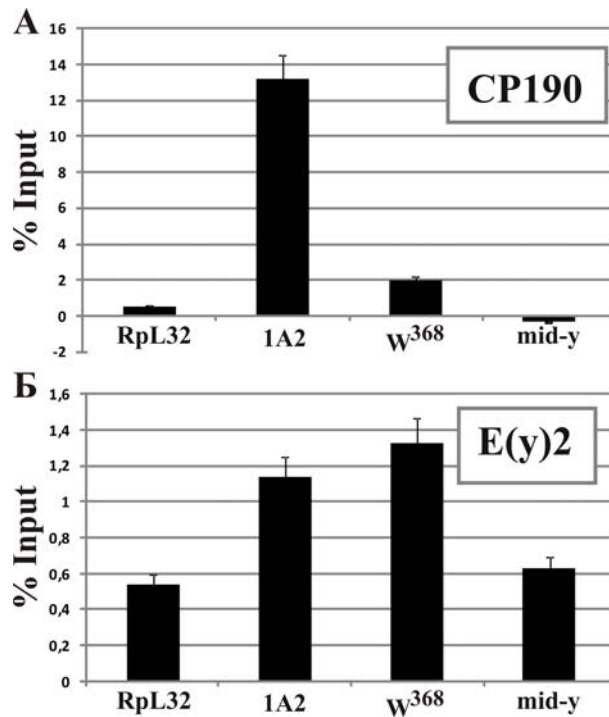


Рис.5. Связывание белков E(y)2 и CP190 с 368 п.н. функциональной областью Wari-инсулятора в составе трансгенной конструкции. Иммунопреципитация с использованием антител против CP190 (А) и E(y)2 (Б). Хроматин был выделен из гомозиготной линии мух *D. melanogaster* на стадии имаго, несущей конструкцию PRE(W³⁶⁸)YW. По оси Y – процент обогащения различных последовательностей относительно Input. По оси X – анализ экспериментов X-ChIP с разных геномных областей на разных стадиях. W³⁶⁸ – 368 п.н. функциональная область Wari-инсулятора в составе трансгена; mid-y - кодирующая область гена *yellow*, входящего в состав трансгена; RpL32 – отрицательный контроль; 1A2 – положительный контроль.

5) Снижение уровня экспрессии гена *e(y)2* влияет на PRE-блокирующую, но не на энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора *in vivo*.

Чтобы выяснить роль белка E(y)2 в активности Wari-инсулятора, влияние мутации гена *e(y)2* было проверено генетически. Для этого использовалась мутация *e(y)2^{ul}*, полученная инсерцией мобильного элемента *Stalker* в предпромоторную область гена *e(y)2* и приводящая к трехкратному снижению экспрессии данного гена.

Влияние мутации *e(y)2^{ul}* было проанализировано на трансгенных линиях, содержащих конструкцию (PRE)(Wari)YW или конструкцию (PRE)(W³⁶⁸)YW (рис.6). Оказалось, что в четырех из семи проанализированных линий с конструкцией (PRE)(Wari)YW и в шести из 11 проанализированных линий с конструкцией (PRE)(W³⁶⁸)YW, мутация *e(y)2^{ul}* ослабляла способность Wari-инсулятора блокировать сайленсер (рис.6). В то же время, данная мутация не влияла на пигментацию щетинок в производных линиях с делецией либо Wari-инсулятора, либо сайленсера, что свидетельствует о прямом влиянии мутации *e(y)2^{ul}* на функционирование Wari-инсулятора (рис.6). Дополнительно было протестировано влияние данной мутации на энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора. Были протестированы линии, полученные ранее в нашей лаборатории и содержащие Wari-инсулятор или функциональную область Wari-инсулятора между тканеспецифичными энхансерами и промоторами генов *yellow* и *white*. Однако данная мутация не влияла на энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора.

Таким образом, мутация гена *e(y)2* влияет только на PRE-блокирующую, но не на энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора.

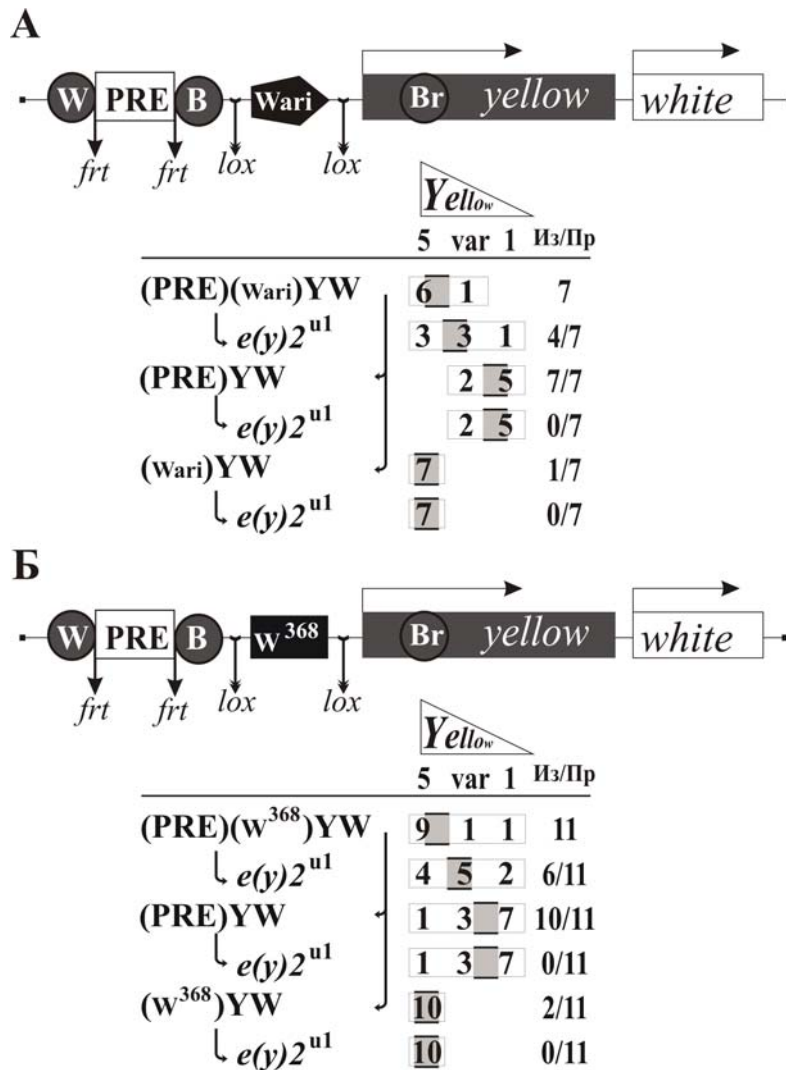


Рис. 6. Влияние мутации гена $e(y)2$ на сайленсер-блокирующую активность Wari-инсулятора. Все обозначения как на рис.1. и рис.5., кроме того, что под фенотипами исходных линий мух и их производных указаны фенотипы данных линий, несущих мутацию $e(y)2^{u1}$. Мутация $e(y)2^{u1}$ вызвана инсерцией мобильного элемента *Stalker* в предпромоторную область гена $e(y)2$ и приводит к трехкратному снижению экспрессии гена $e(y)2$.

ГЛАВА II. Изучение взаимодействия между инсуляторами и промоторами у *D. melanogaster*.

1) Wari- и 1A2-инсуляторы функционально взаимодействуют с промоторами генов *white* и *yellow*, соответственно.

Несмотря на большое количество данных о функционировании инсуляторов до сих пор остается не ясным вопрос о механизме действия регуляторных элементов этого класса. Одно из возможных объяснений явления инсуляции заключается в том, что инсуляторы напрямую взаимодействуют с промоторами генов.

Для проверки возможности физического сближения инсуляторов с промоторными областями генов нами была разработана модельная система, основанная на неспособности белка-активатора дрожжей GAL4 стимулировать промотор гена-мишени в случае, если его сайты связывания находятся на большом расстоянии от промотора. В качестве тестируемых пар промотор-инсулятор нами были выбраны: промотор гена *yellow* и 1A2-инсулятор; промотор гена *white* и Wari-инсулятор. Были созданы конструкции двух типов: с геном *yellow* и инсулятором 1A2, с геном *white* и инсулятором Wari (рис.7). С 3'- стороны от генов были встроены 10 сайтов связывания белка-активатора GAL4. В этих конструкциях 1A2- и Wari-инсуляторы, фланкированные LOX-сайтами, были расположены за генами и сайтами

для белка-активатора дрожжей в ориентации, соответствующей их расположению в геноме [конструкции $W^{\Delta}G4(Wari)$, $YG4(1A2)$] (рис.7 А, 7В). В данной системе в случае наличия функционального взаимодействия между тестируемыми парами регуляторных элементов предполагалось, что GAL4-активатор будет приближаться к промотору гена и активировать транскрипцию. Для того чтобы проверить влияние ориентации инсулятора в системе были дополнительно сделаны 2 конструкции [конструкции $W^{\Delta}G4(Wari-R)$, $YG4(1A2-R)$; здесь и далее сокращение «R» означает обратную ориентацию инсулятора относительно внутригеномной (рис.7Б, 7Г). Для экспрессии белка-активатора GAL4, трансгенные линии мух скрещивались с линией мух, несущей ген GAL4-активатора под постоянно и повсеместно функционирующим тубулиновым промотором.

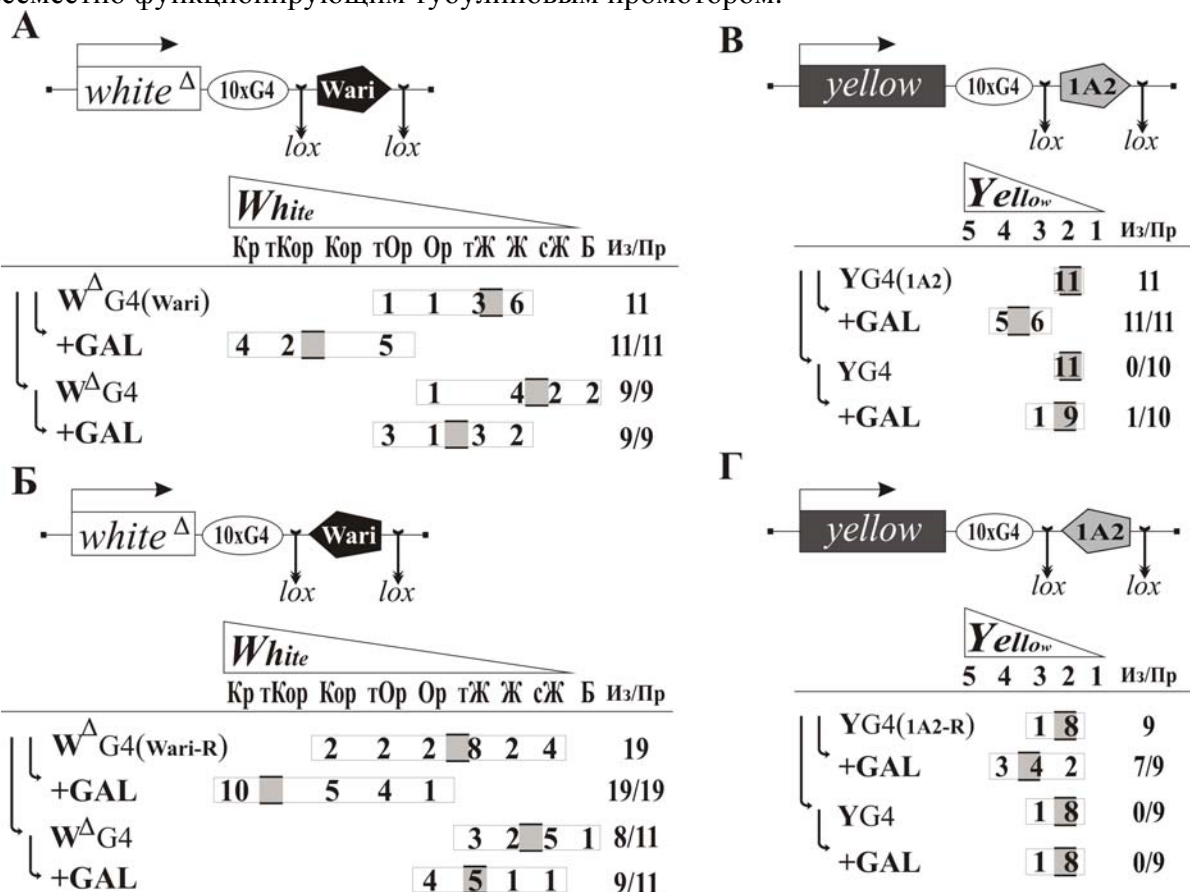


Рис.7. Исследование инсулятор-промоторных взаимодействий с использованием разработанной модельной системы. Серым и черным пятиугольниками обозначены инсуляторы 1A2 и Wari, соответственно; острый угол указывает направление элемента относительно его внутригеномной ориентации по отношению к генам *yellow* и *white*, соответственно. Белым овалом обозначены 10 сайтов связывания для активатора дрожжей GAL4. “+ GAL” – результат скрещивания трансгенных линий мух с линией, экспрессирующей белок-активатор дрожжей GAL4. Пигментация тела и крыльев, зависящая от уровня экспрессии гена *yellow*: 1 – отсутствие пигментации; 5 – уровень пигментации, соответствующий энхансер-зависимой экспрессии гена; 2-4 – промежуточные уровни. Цифры в строках – число линий с соответствующей пигментацией. Остальные обозначения как на рис.1.

Пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих конструкцию $W^{\Delta}G4(Wari)$, была на уровне базовой экспрессии гена *white* (рис.7А). Введение GAL4-активатора в трансгенные линии мух привело к значительному усилению пигментации глаз во всех протестированных линиях, т.е. GAL4-активатор эффективно стимулировал транскрипцию гена *white* (рис.7А). В отсутствие Wari-инсулятора эффективной активации не наблюдалось (рис.7А). Анализ трансгенных линий мух с конструкцией $W^{\Delta}G4(Wari-R)$ показал, что функциональное взаимодействие инсулятора с промотором не зависит от ориентации инсулятора (рис.7Б).

Функциональное взаимодействие инсулятора с промотором было также показано и при анализе конструкций с геном *yellow* и 1A2-инсулятором [YG4(1A2), YG4(1A2-R)] (рис.7В, Г). В данных конструкциях уровень экспрессии гена *yellow* оценивался визуально по пигментации тела и крыльев мух по пятибалльной шкале: 5 – соответствует уровню пигментации дикого типа (экспрессия гена *yellow* при стимуляции гена энхансерами тела и крыльев), 2 соответствует базовому уровню пигментации (экспрессия гена *yellow* в отсутствие энхансеров), 1 соответствует отсутствию пигментации (y^1 аллель – полная инактивация гена *yellow*), 3 и 4 – частичная активация энхансерами базовой транскрипции.

Введение GAL4-активатора в трансгенные линии мух привело к значительному усилению пигментации тела и крыльев почти во всех протестированных линиях, т.е. GAL4-активатор эффективно стимулировал транскрипцию гена *yellow* (рис.7В). В отсутствие 1A2-инсулятора остаточная активации наблюдалась только в одной из линий (рис.7В). Анализ трансгенных линий мух с конструкцией YG4(1A2-R) показал, что функциональное взаимодействия инсулятора с промотором, как и в случае инсулятор-промоторной пары гена *white*, не зависит от ориентации инсулятора (рис.7Г).

Таким образом, с использованием разработанной нами системы было показано, что инсулятор Wari способен функционально взаимодействовать с промотором гена *white*, а 1A2-инсулятор – с промотором гена *yellow*.

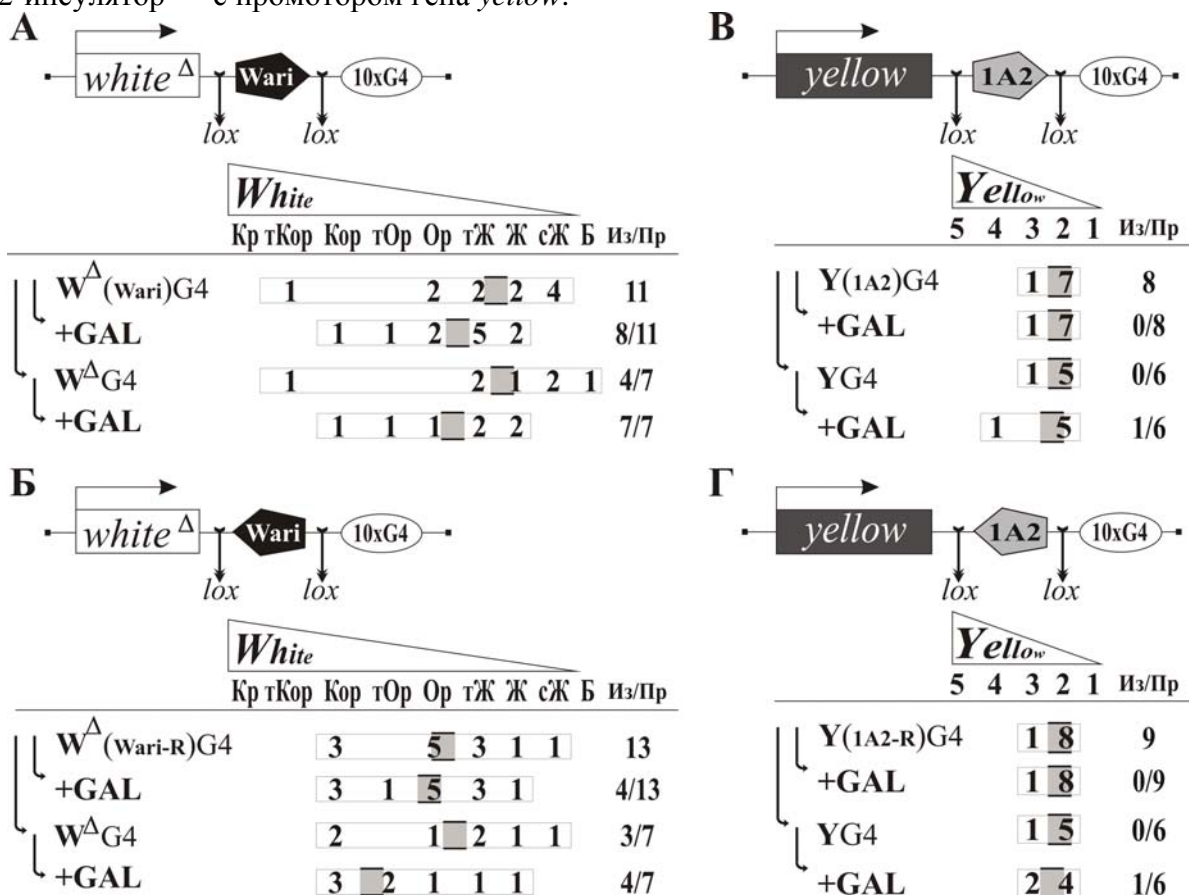


Рис.8. Зависимость стимуляции транскрипции GAL4-активатором от порядка расположения элементов в конструкции. Все обозначения как на рис.7.

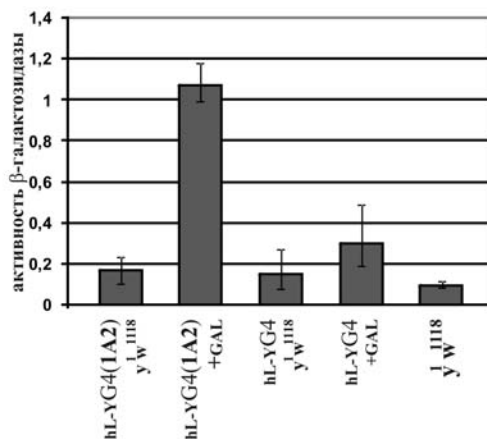
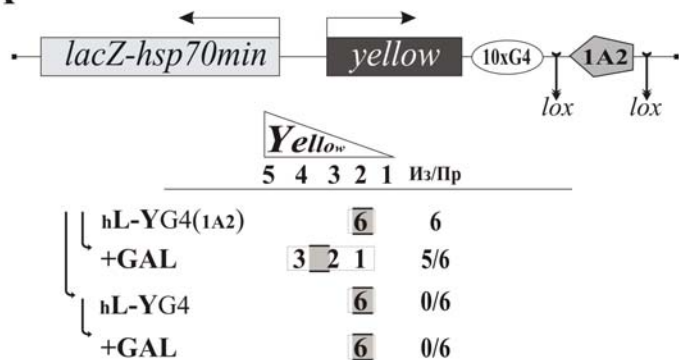
Можно предположить, что при взаимодействии инсулятора с промотором гена, ДНК между ними выпетливается, как это происходит в случае взаимодействий инсулятор-инсулятор или промотор-энхансер. В случае проанализированных конструкций GAL4-активатор расположен внутри петли, образуемой взаимодействующими инсулятором и промотором. Если GAL4-активатор будет расположен с 3'-стороны от инсулятора, то при взаимодействии инсулятора с промотором гена, GAL4-активатор будет находиться вне образуемой петли. Для того чтобы подтвердить важность расположения регуляторных

элементов в системе было сделано 4 конструкции, аналогичные описанным выше, в которых сайты связывания GAL4-активатора находились с 3'-стороны от инсулятора [конструкции $W^{\Delta}(Wari)G4$, $W^{\Delta}(Wari-R)G4$, $Y(1A2)G4$, $Y(1A2-R)G4$] (рис.8). Результат анализа трансгенных линий мух показал, что при таком расположении элементов в системе, GAL4-активатор не способен эффективно стимулировать транскрипцию генов *white* и *yellow* ни в одной из конструкций.

3) 1A2-инсулятор способен взаимодействовать с двумя промоторами в одной системе.

Известно, что несколько инсуляторов способны взаимодействовать друг с другом одновременно. Было решено проверить, может ли инсулятор одновременно взаимодействовать с двумя промоторами в одной системе. Для этого была создана конструкция с геном *yellow* и 1A2-инсулятором (рис. 9А). В положении «голова-к-голове» относительно промотора гена *yellow* находился ген β -галактозидазы под контролем минимального промотора гена теплового шока 70, для которого характерен низкий, но постоянный уровень транскрипции. При этом GAL4-активатор способен сильно стимулировать транскрипцию, идущую с минимального промотора гена теплового шока 70. Сайты связывания белка активатора GAL4 находились между 1A2-инсулятором и промотором гена *yellow* (конструкция hL-YG4(1A2)) (рис.9А). В качестве контроля была сделана аналогичная конструкция, в которой GAL4-сайты располагались позади 1A2-инсулятора (конструкция hL-Y(1A2)G4) (рис. 9Б).

А



Б

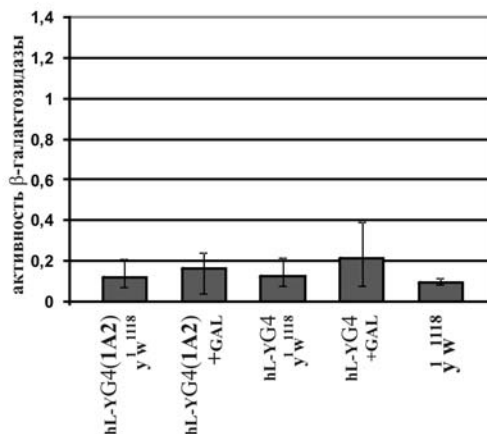
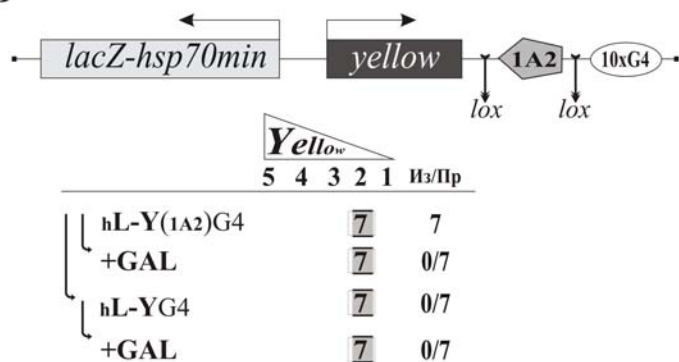


Рис.9. Анализ взаимодействия инсулятора 1A2 с двумя промоторами в одной системе. Светло-серым прямоугольником обозначен ген β -галактозидазы под контролем минимального промотора гена теплового шока 70 (*hsp70min-lacZ*), горизонтальной стрелкой указано направление транскрипции. Справа от схематического изображения конструкций и данных по экспрессии гена *yellow* приведены усредненные результаты измерения активности β -галактозидазы, нормированные на общее количество белка в пробе. Для всех независимых линий, несущих трансгенную

конструкцию (шесть линий для конструкции hL-YG4(1A2) и семь линий для конструкции hL-Y(1A2)G4, и их производных были проанализированы гомогенаты из 15 взрослых мух. На диаграмме представлены усредненные данные для проанализированных линий, указан разброс полученных значений. Остальные обозначения как на рис. 7.

Оказалось, что в конструкции hL-YG4(1A2) GAL4-активатор сильно стимулировал экспрессию как гена *yellow*, так и гена β-галактозидазы (рис.9А). Вероятно, 1A2-инсулятор в этом случае непосредственно взаимодействовал с минимальным промотором гена теплового шока 70. Напротив, в контрольной конструкции hL-Y(1A2)G4 не наблюдалось эффективной активации ни гена *yellow*, ни гена β-галактозидазы (рис. 9Б). Таким образом, 1A2-инсулятор способен одновременно взаимодействовать с двумя промоторами в одной системе. Как и в случае взаимодействия инсулятора с одним промотором, ключевую роль играет порядок расположения элементов в системе.

2) Четырех сайтов связывания для белка Su(Hw) достаточно для обеспечения активации промотора гена *yellow* GAL4-активатором.

В составе последовательностей ДНК инсуляторов 1A2 и Wari длиной 454 п.н. и 825 п.н., соответственно, могут находиться сайты связывания не только для инсуляторных белков. Поэтому нельзя исключать возможности того, что за взаимодействие с промотором ответственны не инсуляторные белки. Ранее было показано, что белок Su(Hw) является ДНК-связывающим компонентом 1A2-инсулятора. Всего 1A2-инсулятор содержит 2 сайта связывания белка Su(Hw). В настоящее время известно, что основными белковыми компонентами 1A2-инсулятора являются белки Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2, необходимые для энхансер-блокирующей активности 1A2-инсулятора, и белок E(y)2, который, наравне с белком Su(Hw), участвует в барьерной активности 1A2-инсулятора. Поэтому следующей задачей было подтвердить, что именно инсуляторный белковый комплекс, собирающийся на сайтах связывания для белка Su(Hw), независимо от остальных последовательностей инсулятора, способен взаимодействовать с 5'-регуляторной областью гена *yellow*. Для этого вместо 1A2-инсулятора был взят четырехкратный повтор третьего сайта связывания белка Su(Hw) из инсулятора *gypsy*. Чтобы подтвердить, что именно четырехкратный повтор сайтов связывания белка Su(Hw) отвечает за способность GAL4-активатора стимулировать экспрессию гена *yellow*, он был фланкирован LOX-сайтами, позволяющими делетировать его *in vivo* [конструкция YG4(4xSu)] (рис.10).

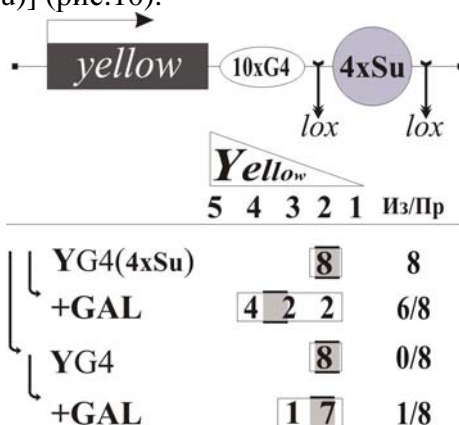


Рис.10. Участок ДНК, содержащий четыре сайта связывания для белка Su(Hw), способен взаимодействовать с промотором гена *yellow*. Серым кругом показаны четыре сайта связывания для белка Su(Hw). Остальные обозначения как на рис.7.

Анализ трансгенных линий мух, несущих конструкцию YG4(4xSu), показал, что при наличии белка-активатора GAL4, экспрессия гена *yellow* усиливалась примерно так же, как и в случае присутствия 1A2-инсулятора (рис.10). Таким образом, инсуляторный белковый комплекс, собирающийся на участке ДНК с сайтами связывания для белка Su(Hw), самостоятельно способен взаимодействовать с промотором гена *yellow*.

4) Белок CP190 присутствует на минимальном промоторе гена теплового шока при взаимодействии промотора с 1A2-инсулятором.

Полученные данные предполагают, что инсулятор и промотор физически взаимодействуют друг с другом. Для получения дополнительного экспериментального подтверждения прямого взаимодействия между инсулятором и промотором был поставлен эксперимент с использованием метода иммунопреципитации хроматина (X-ChIP), в ходе которого проводилась оценка уровня обогащения инсуляторных белков на промоторе гена *yellow*. Так, если инсулятор 1A2 и промотор гена *yellow* взаимодействуют *in vivo*, то по результатам экспериментов X-ChIP на промоторе можно увидеть обогащение инсуляторных белков, которые «пришиваются» формальдегидом к ДНК-последовательности промотора. Эксперименты проводились на двух стадиях развития *D. melanogaster* – личинках и куколках. Однако значимого обогащения инсуляторных белков на промоторе гена *yellow* обнаружено не было. 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 в составе личинки или куколки. Так как в клетках с неактивным геном *yellow* взаимодействие между инсулятором и промотором, скорее всего, отсутствует, то можно предположить, что чувствительности метода X-ChIP не хватает для идентификации статистически значимого повышения связывания инсуляторных белков с промоторной областью гена *yellow*.

Как известно, ген теплового шока экспрессируется повсеместно, то есть транскрипция с этого промотора идет во всех клетках. В случае, если наше предположение верно, то взаимодействие 1A2-инсулятора с минимальным промотором гена теплового шока в конструкции hL-YG4(1A2) будет реализовываться в большом числе клеток организма *D. melanogaster*. Поэтому была проведена оценка связывания инсуляторных белков на минимальном промоторе гена теплового шока в конструкции hL-YG4(1A2) в присутствии и в отсутствие инсулятора 1A2 в трансгенной конструкции в одном и том же месте генома (рис.11). Для экспериментов были выбраны две независимые трансгенные линии, в одной из которых для получения хроматина использовались поздние личинки, в другой – средние куколки.

Результаты X-ChIP-экспериментов были проанализированы с помощью ПЦР в реальном времени. Праймеры для анализа результатов экспериментов были подобраны к минимальному промотору гена теплового шока в составе трансгена (pr-h). Кроме того, были проанализированы и другие участки ДНК в составе трансгена: промотор (pr-y) и кодирующая область (mid-y) гена *yellow*, находящаяся на удалении как от обоих промоторов, так и от инсулятора 1A2. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались праймеры к описанной в других работах области 62D, содержащей три сильных сайта связывания для белка Su(Hw), и кодирующей области гена *RpL32*, соответственно. Хроматин был иммунопреципитирован с использованием антител против белка CP190, являющегося белковым компонентом 1A2-инсулятора. В результате было показано, что сигнал обогащения присутствует только на минимальном промоторе гена теплового шока, но не на промоторе и не на кодирующей области гена *yellow* (рис.11). При делеции 1A2-инсулятора обогащение белка CP190 на минимальном промоторе гена теплового шока 70 исчезало, что свидетельствует о том, что данный сигнал опосредован присутствием 1A2-инсулятора в составе трансгена. Следовательно, при взаимодействии инсулятора и промотора происходит пространственное сближение этих элементов.

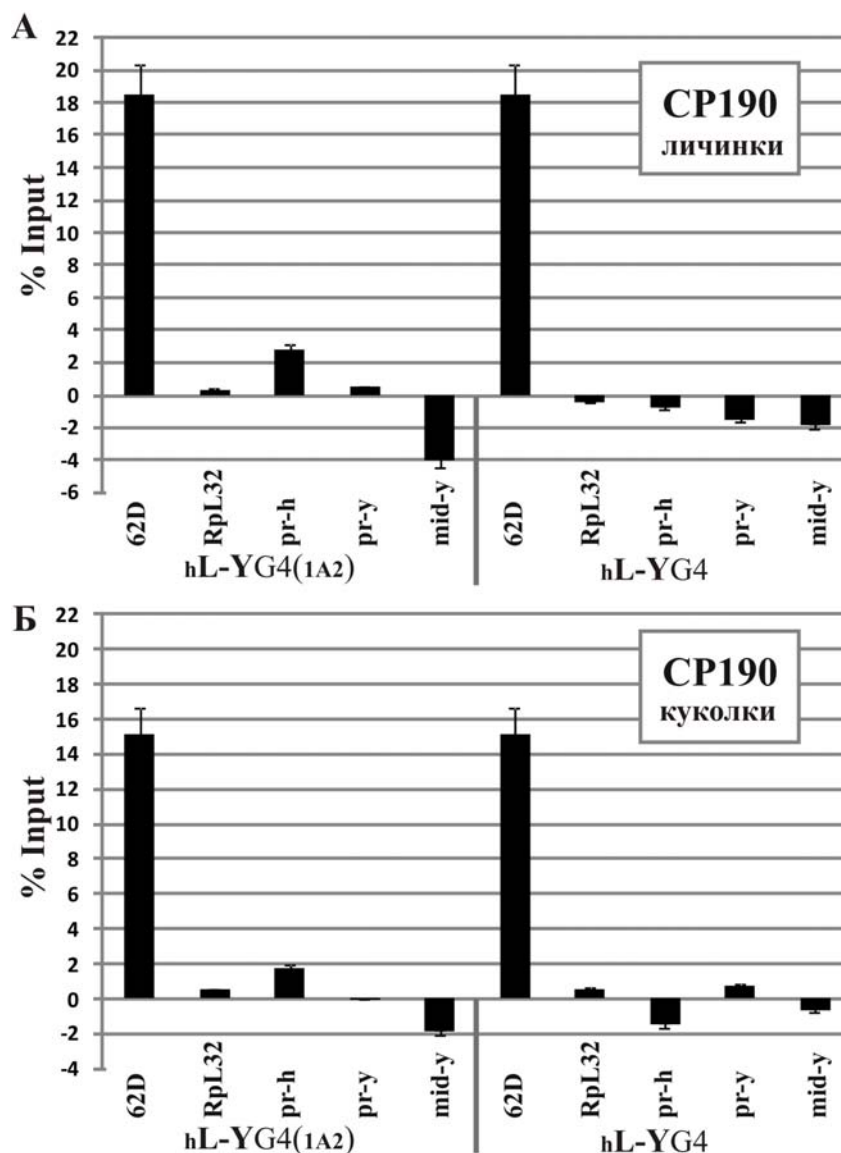


Рис. 11. Инсулятор 1A2 физически взаимодействует с минимальным промотором гена теплового шока 70. По оси X представлены результаты ПЦР в реальном времени с разных пар праймеров. Геномные области 62D и *RpL32* – положительный и отрицательный контроли, соответственно. Остальные пары праймеров специфичны к ДНК-последовательностям в составе трансгенной конструкции. *pr-h*, *pr-y* и *mid-y* – проанализированные области конструкции, соответствующие минимальному промотору гена теплового шока 70 (*pr-h*), промотору гена *yellow* (*pr-y*) и кодирующей части гена *yellow* (*mid-y*), удаленной на расстояние около 2 т. п. н. как от промотора, так и от 1A2-инсулятора. Хроматин выделялся из поздних личинок для одной линии (А) и из средних куколок для другой линии (Б), несущих конструкцию hL-YG4(1A2), а также из производных этих линий с делетированным 1A2-инсулятором на соответствующих стадиях развития (производные hL-YG4). Иммунопреципитация проводилась с использованием антител против белка CP190 и неспецифических антител. Результаты экспериментов для конструкций и их производных нормированы на значение положительного контроля (62D). Остальные обозначения как на рис. 3.

ГЛАВА III. Создание новой системы для исследования инсуляторов *D. melanogaster*.

Тестирование ДНК-последовательностей на инсуляторную активность в настоящее время проводят с использованием трансгенных модельных систем, что является трудоемким, занимающим много времени процессом. Для быстрого анализа регуляторных элементов на инсуляторную активность и для обнаружения белковых компонентов инсуляторов необходимо создание эффективных экспресс-систем. Поэтому следующей задачей данного

исследования было разработать быструю и удобную в использовании тест-систему для исследования инсуляторов на эмбриональных клеточных линиях *D. melanogaster*.

Культуры эмбриональных клеточных линий дрозофила представляют собой мало изученную систему. Поэтому, на первом этапе исследования было необходимо выбрать активаторы транскрипции и промоторы, которые способны функционировать в данных клеточных линиях. Для идентификации активности исследуемых регуляторных элементов были использованы гены люциферазы светлячка и люциферазы *Renilla*. Уровень экспрессии данных генов легко оценивать по эффективности люминесценции, измеряемой при определенных длинах волн. Для введения генов люцифераз, находящихся под контролем различных регуляторных элементов, в клетки эмбриональных линий *D. melanogaster* применялся метод транзientной трансфекции. Плазмидный вектор, содержащий ген люциферазы светлячка без промотора, использовался для подбора необходимых регуляторных элементов тест-системы. Для контроля уровня эффективности трансфекции клетки были котрансфицированы плазмидным вектором, содержащим кодирующую часть гена люциферазы *Renilla* под контролем актинового промотора. Специфический сигнал определялся по отношению активности люциферазы светлячка к активности люциферазы *Renilla* (Fluc/Rluc).

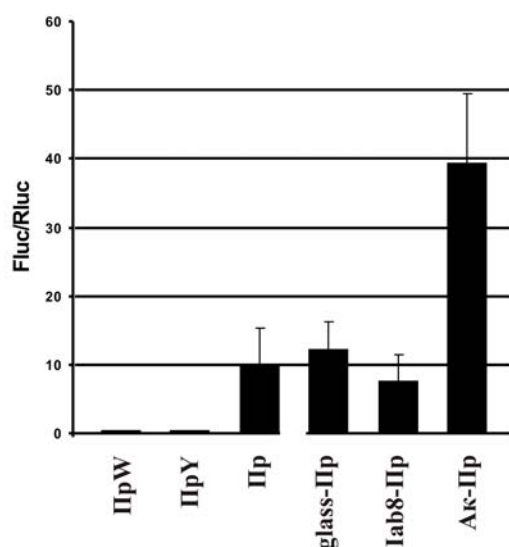


Рис.12. Тестирование промоторов и активаторов на функциональную активность в клеточной линии Sg4 *D. melanogaster*. По оси Y – относительная активность люциферазы светлячка, нормированная на активность люциферазы *Renilla* (Fluc/Rluc). По оси X – значения люминесценции для разных конструкций. Все эксперименты проведены как минимум в трех повторах. Обозначения конструкций: ПрW, ПрУ, Пр – ген люциферазы светлячка под контролем промоторов генов *white*, *yellow*, *CG32795*, соответственно; glass-Пр, Iab8-Пр, Ак-Пр – перед промотором гена *CG32795* встроены активаторы *glass*, *Iab8* и PRE *Ubx*, соответственно.

Вначале были протестированы промоторы двух хорошо изученных маркерных генов *white* и *yellow*, которые экспрессируются в эмбрионах *D. melanogaster*, и ранее часто использовались для исследования активности инсуляторов. Для этого были созданы конструкции, в которых ген люциферазы светлячка находился под контролем промоторов данных генов (конструкции ПрW и ПрУ, соответственно). К сожалению, оказалось, что промоторы генов *white* и *yellow* не способны стимулировать экспрессию репортерного гена в клеточных линиях дрозофила S2 и Sg4 (рис. 12). Поэтому в анализе был использован промотор гена *CG32795*, который, как было показано ранее, способен эффективно активировать транскрипцию репортерного гена в S2 клетках *D. melanogaster*. Действительно, данный промотор эффективно функционировал не только в клеточной линии S2, но и в линии Sg4 (конструкция Пр, рис. 12). При поиске активатора, который способен усилить

транскрипцию с промотора гена *CG32795*, были проверены несколько известных элементов: *glass*, *Iab8* и элемент PRE *Ubx* из регуляторной области гена *Ubx* (конструкции *glass*-Пр, *Iab8*-Пр и Ак-Пр, соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что способностью активировать транскрипцию с промотора гена *CG32795* обладал лишь элемент PRE *Ubx*. В эмбриональной клеточной линии S2 при наличии данного активатора (конструкция Ак-Пр) уровень экспрессии гена люциферазы светлячка увеличивался примерно в 2.5-3 раза; в эмбриональной клеточной линии Sg4 – примерно в 3-3.5 раза. Исходя из полученных данных, в дальнейших экспериментах использовалась клеточная линия Sg4.

Для проверки способности элемента PRE *Ubx* активировать промотор на расстоянии, были созданы конструкции, в которых между активатором и промотором располагались спейсерные участки ДНК. В качестве спейсеров были выбраны кодирующая область гена *eGFP* (≈ 700 п. н.; конструкция (Ак-(700)-Пр) и участок ДНК из фага λ (≈ 2000 п. н.; конструкция Ак-(2000)-Пр). Оказалось, что вставки этих фрагментов ДНК практически не снижали уровень активации промотора гена *CG32795*; некоторое уменьшение активации в случае конструкции Ак-(2000)-Пр можно объяснить значительным увеличением длины плазмиды (\approx на 25%) и, как следствие, снижением эффективности трансфекции. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности элемента из регуляторной области гена *Ubx* активировать транскрипцию при увеличении расстояния между ним и промотором.

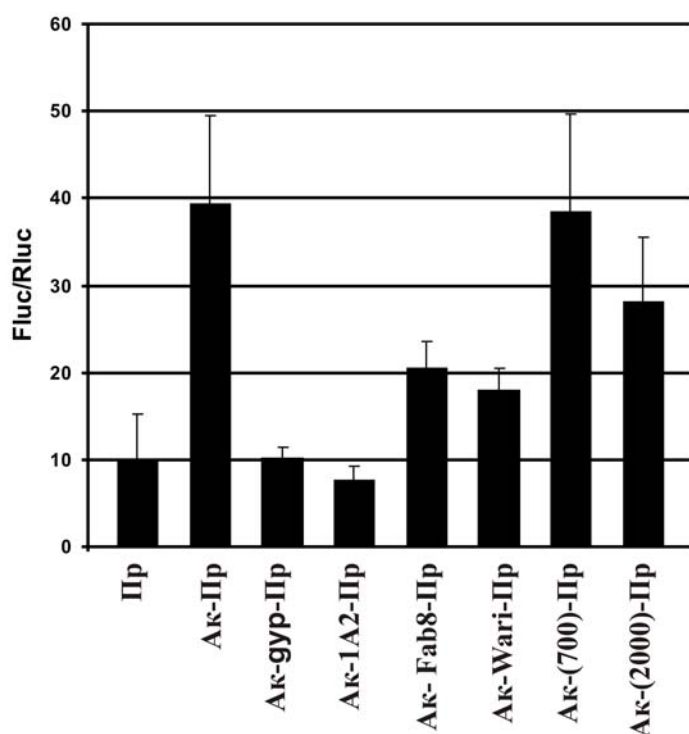


Рис.13. Проверка способности различных инсуляторов блокировать действие активатора в описываемой тест-системе. По оси Y – относительная активность люциферазы светлячка, нормированная на активность люциферазы *Renilla* (Fluc/Rluc). По оси X – значения люминесценции для разных конструкций. Все эксперименты проведены как минимум в трех повторах. Обозначения конструкций: Пр – ген люциферазы светлячка под контролем промотора гена *CG32795*; Ак-Пр – перед промотором гена *CG32795* встроены активатор PRE *Ubx*; Ак-гур-Пр, Ак-1A2-Пр, Ак-Fab8-Пр, Ак-Wari-Пр – между активатором и промотором встроены инсуляторы *gypsy*, *1A2*, *Fab8* и *Wari*, соответственно; Ак-(700)-Пр, Ак-(2000)-Пр – между активатором и промотором встроены спейсерные участки длиной 700 п.н. и 2000 п.н., соответственно.

Для проверки адекватности выбранной нами модельной системы были протестированы четыре хорошо изученных инсулятора *D. melanogaster* на способность

блокировать активацию промотора гена *CG32795* элементом PRE *Ubx*: *gypsy*, 1A2, Fab8 и Wari. Инсулятор Fab8 находится в регуляторной области гена *AbdB* и содержит два сайта связывания для белка dCTCF. Все эти инсуляторы были способны блокировать активацию промотора в созданной системе. Важно отметить, что эффективность блокирования активатора разными инсуляторами была сравнима с данными, полученными ранее на трансгенных конструкциях и описанными в литературе. Таким образом, созданная модельная система может быть использована для тестирования инсуляторов *D. melanogaster*.

ОБСУЖДЕНИЕ.

Глава I. Барьерная активность и инсуляторный комплекс Wari-инсулятора.

В данной работе установлено, что Wari-инсулятор обладает сайленсер-блокирующей активностью. Так, он способен защищать гены *yellow* и *white* от репрессии сайленсера из регуляторной области гена *Ubx*. Как и в случае энхансер-блокирующей активности, хотя и не так эффективно, вторая копия Wari-инсулятора усиливает сайленсер-блокирующую активность этого элемента. Однако, в отличие от энхансер-блокирующей активности, сайленсер-блокирующая активность Wari-инсулятора зависит от расстояния между ним и промотором гена. Вместе с тем, участок Wari-инсулятора длиной 368 п. н. достаточен как для сайленсер-блокирующей, так и для энхансер-блокирующей активностей. Можно предположить, что зависимость от расстояния обусловлена тем, что, подобно энхансерам, Polcomb-зависимые сайленсеры обладают способностью непосредственно взаимодействовать с промотором гена *white*. Одним из вероятных объяснений дистанционной зависимости активности Wari-инсулятора является возможность взаимодействия с ним комплекса ремоделинга хроматина (см. ниже).

В данной работе показано, что с Wari-инсулятором *in vivo* взаимодействуют белки CP190 и E(y)2. Известно, что белок CP190 взаимодействует с разными инсуляторами *D. melanogaster*, такими как Su(Hw), dCTCF и BEAF-зависимыми инсуляторами. E(y)2 участвует в сайленсер-блокирующей активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов. Вероятно, белки CP190 и E(y)2 взаимодействуют с пока не известным ДНК-связывающим компонентом Wari-инсулятора. Результат данной работы свидетельствует о том, что E(y)2, также как и CP190, может являться общим компонентом для большого числа инсуляторов, активность которых зависит от разных ДНК-связывающих транскрипционных факторов. Важно отметить, что как и в случае Su(Hw)-зависимых инсуляторов, белок E(y)2 определяет способность Wari-инсулятора блокировать активность сайленсеров, но не энхансеров.

Недавно было показано, что E(y)2 является компонентом SAGA/TFTC-комплекса. Вполне возможно, что E(y)2 обеспечивает присутствие этого комплекса на Wari- и Su(Hw)-зависимых инсуляторах. Таким образом, сайленсер-блокирующая активность инсуляторов может определяться компонентами SAGA/TFTC-комплекса, содержащим в своем составе гистон-ацетилтрансферазы (HATs), детерминирующие локальный статус активного хроматина. Можно предположить, что гистон-ацетилтрансферазы данного комплекса, связывающиеся с последовательностью Wari-инсулятора, могут изменять статус хроматина только на относительно небольшом расстоянии. Это может объяснить дистанционную зависимость активности Wari-инсулятора при блокировании сайленсера.

Ранее было показано, что хотя Wari-инсулятор не взаимодействует с белком Su(Hw), он способен функционально взаимодействовать с Su(Hw)-зависимыми инсуляторами, *gypsy* и 1A2. Наличие общих белковых компонентов данных инсуляторов может объяснить их способность к функциональному взаимодействию.

В данной работе была исследована стадиоспецифичность взаимодействий белков CP190 и E(y)2 с Wari-инсулятором. На эмбриональной и взрослой стадиях развития *D. melanogaster*, также как и в культуре клеток, наблюдалось сильное обогащение белков CP190 и E(y)2 на последовательности ДНК Wari-инсулятора. Вместе с тем, на стадиях личинки и куколки связывания этих белков зафиксировано не было. Таким образом, вероятно, что

связывание инсуляторных белков может быть стадио-специфичным. Так как белок E(y)2 необходим для защиты экспрессии гена *yellow* от репрессии на стадии куколки, то отсутствие белка E(y)2 на Wari-инсуляторе можно объяснить тем, что чувствительности метода X-ChIP не хватает для детекции связывания белка E(y)2 (также, как и CP190) с Wari-инсулятором на этой стадии в достаточно небольшом проценте клеток. Вместе с тем, нельзя исключить возможности того, что на данных стадиях эти белки экранированы другими белковыми факторами и не доступны для антител. Исходя из того, что антитела против белков CP190 и E(y)2, используемые для экспериментов X-ChIP в этой работе, являлись поликлональными, более вероятным является стадио- и тканеспецифичное связывание данных белков с Wari-инсулятором. В подтверждение этого свидетельствует и тот факт, что разные культуры клеток *D.melanogaster* имеют разные профили связывания инсуляторных белков. Таким образом, связывание инсуляторных белков с Wari-инсулятором является ткане- и стадиоспецифичным процессом; возможно, этот процесс имеет весьма тонкую регуляцию в ходе развития *D.melanogaster*.

Глава II. Взаимодействие инсуляторов с промоторами генов.

Для проверки возможности прямого взаимодействия инсуляторов с промоторами генов в данной работе была разработана модельная система, основанная на неспособности GAL4-активатора стимулировать промотор гена, если сайты связывания для GAL4-активатора расположены с 3'-стороны относительно данного гена. На примере генов *yellow* и *white* *D. melanogaster* было показано, что инсуляторы 1A2 и Wari способны взаимодействовать с промоторами соответствующих генов.

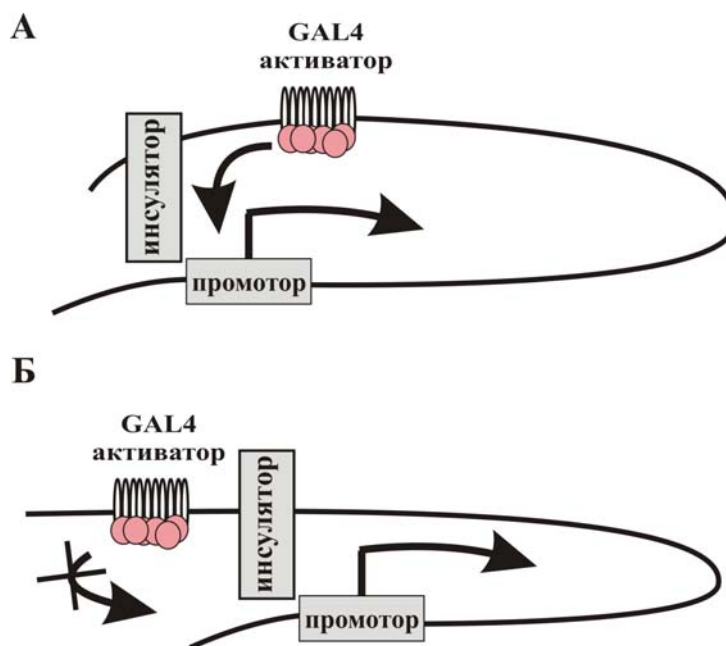


Рис.14. Способность GAL4-активатора стимулировать транскрипцию гена посредством инсулятора зависит от взаимного расположения сайтов связывания активатора и инсулятора внутри системы. А. GAL4-активатор стимулирует транскрипцию гена. Б. GAL4-активатор заблокирован инсулятором.

В данной работе показано, что способность GAL4-активатора стимулировать транскрипцию гена посредством инсулятора зависит от взаимного расположения сайтов связывания активатора и инсулятора внутри системы. Вероятнее всего, данное свойство объясняется тем, что если инсулятор находится с 3'-стороны от сайтов связывания активатора, то при взаимодействии инсулятора с промотором гена, GAL4-активатор находится внутри образуемой петли (рис.14А). Если GAL4-активатор находится с 3'-стороны

от инсулятора, то при взаимодействии инсулятора с промотором он будет стерически вынесен за пределы петли и изолирован инсулятором (рис.14Б).

Было показано, что для взаимодействия с промотором гена *yellow* достаточно сайтов связывания белка Su(Hw), а, следовательно, инсуляторного комплекса.

Для прямого доказательства физического сближения участков ДНК инсуляторов и промоторов генов был использован метод иммунопреципитации хроматина. Показано, что в присутствии 1A2-инсулятора в трансгенной системе с двумя генами наблюдалось обогащение белка CP190 на минимальном промоторе гена теплового шока 70, но не на промоторе гена *yellow*. В случае промотора гена *yellow* можно предположить, что сигнала обогащения на нем не наблюдалось вследствие тканеспецифичной экспрессии этого гена. Так, с минимального промотора гена теплового шока транскрипция идет повсеместно. Это, по-видимому, приводит к тому, что инсулятор способен взаимодействовать с данным промотором во всех типах клеток. Таким образом, можно предположить, что взаимодействие инсуляторного комплекса с промотором зависит от транскрипционного статуса промотора.

Способность инсуляторов взаимодействовать с промоторами подтверждает выдвинутую ранее гипотезу «ловушки промотора», по которой инсулятор, взаимодействуя с промотором, лишает промотор валентностей на взаимодействие с энхансером (рис.15).

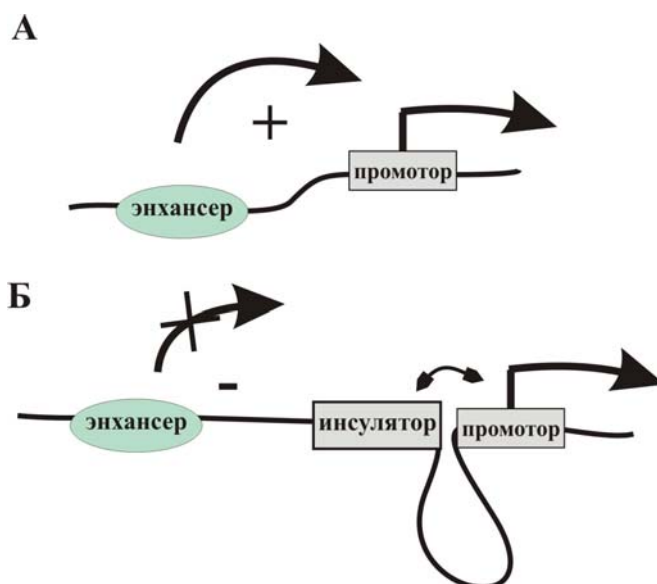


Рис.15. «Ловушка» промотора. А. Энхансер стимулирует транскрипцию. Б. Энхансер не способен стимулировать транскрипцию, так как промотор заблокирован инсулятором.

Пока остается не известным, какие белковые факторы необходимы для инсулятор-промоторных взаимодействий. Можно предположить, что в этом процессе могут играть роль некие общие белки, которые связываются как с инсулятором, так и с промотором. В качестве претендентов на эту роль выступают компоненты SAGA-комплекса, такие как белок E(y)2, который, вероятно, входит в состав как промоторных, так и инсуляторных комплексов.

Глава III. Создание системы для исследования инсуляторов на клеточных линиях *D. melanogaster*.

Одним из основных методов исследования инсуляторов *D. melanogaster* является создание и анализ трансгенных организмов. В результате на анализ множества трансгенных линий тратится много времени и сил. В данной работе описывается модельная система для изучения инсуляторов на клеточных линиях *D. melanogaster*. Использование метода транзientной трансфекции клеточных линий сильно сокращает затрачиваемое время на исследование инсуляторов. Адекватность системы проверена с использованием ряда инсуляторов *D. melanogaster*, принадлежащих к разным классам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено изучение свойств инсуляторов 1A2 и Wari из областей генов *yellow* и *white D. melanogaster*. Показано, что Wari-инсулятор, также как и 1A2 (что было известно ранее), обладает сайленсер-блокирующей активностью. Несмотря на различные ДНК-связывающие компоненты, оба эти инсулятора обладают рядом общих белковых факторов, в том числе CP190 и E(y)2. При этом как для одного, так и для другого инсулятора белок E(y)2 необходим только для барьерной, но не для энхансер-блокирующей активности. Показано, что взаимодействие белков CP190 и E(y)2 с ДНК-последовательностью Wari-инсулятора является стадиоспецифичным. С целью лучшего понимания механизма действия инсуляторов разработана трансгенная система для изучения взаимодействий инсуляторов и промоторов. Показано, что Wari-инсулятор функционально взаимодействует с промотором гена *white*, а 1A2-инсулятор – с промотором гена *yellow*. При этом для взаимодействия с промотором гена *yellow* достаточен только инсуляторный комплекс. Продемонстрировано, что 1A2-инсулятор способен взаимодействовать с двумя промоторами в одной системе. Методом иммунопреципитации хроматина подтверждено наличие прямого взаимодействия между инсулятором 1A2 и минимальным промотором гена теплового шока 70. Для сокращения затрачиваемого времени на исследование инсуляторов разработана удобная модельная система, с помощью которой можно изучать и осуществлять поиск инсуляторов в клеточных культурах *D. melanogaster*.

ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что Wari-инсулятор способен блокировать сайленсер из регуляторной области гена *Ubx*.
- 2) Установлено, что белки CP190 и E(y)2 взаимодействуют с Wari-инсулятором *in vivo*. При этом белок E(y)2 необходим только для сайленсер-блокирующей активности Wari-инсулятора.
- 3) Разработана модельная система для изучения взаимодействия инсуляторов с промоторами генов. С использованием этой системы показано, что Wari- и 1A2-инсуляторы взаимодействуют с промоторами генов *white* и *yellow*, соответственно. Продемонстрировано, что белковый комплекс, собирающийся на сайтах связывания для белка Su(Hw), достаточен для взаимодействия с промотором гена *yellow*.
- 4) Показано физическое взаимодействие инсулятора 1A2 с минимальным промотором гена теплового шока 70.
- 5) Разработана новая модельная система для идентификации инсуляторов и исследования их свойств на культурах клеток *D. melanogaster*.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

- 1) М. М. Ерохин, П. Г. Георгиев, Д. А. Четверина. Создание новой системы для исследования инсуляторов *Drosophila melanogaster*. ДАН. 2009. том 428 (1): 115–117.

Тезисы конференций:

- 1) М. Erokhin, D. Chetverina and P. Georgiev. Analysis of the barrier activity of Wari insulator in *D. melanogaster*. EMBO conference Nuclear Structure and Dynamics, France, Isle sur la Sorgue, 30 Sept - 4 Oct, 2009
- 2) Четверина Д.А., Ерохин М.М., Георгиев П.Г. Новые свойства 1A2- и Wari-инсуляторов *Drosophila melanogaster*. Пушкино. 28 сентября - 2 октября 2009.
- 3) D.Chetverina, М.Erokhin and P.Georgiev. Characterization of the barrier activity of Wari insulator in *D. melanogaster*. 34rd FEBS Congress "Life's Molecular Interactions". Prague, Czech Republic, 4-9 July, 2009.
- 4) М.Erokhin, D.Chetverina and P.Georgiev. New insights into the role of 1A2 and Wari insulators in *D.melanogaster*. 9th Young Scientist Forum Labyrinth of cells and molecules (YSF Prague) July 2-4 2009 and 34rd FEBS Congress "Life's Molecular Interactions". Prague, Czech Republic, 4-9 July, 2009.
- 5) Ерохин М.М. Изучение взаимодействия инсуляторов 1A2 и Wari с промоторами генов у *D. melanogaster*. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2009". 13 - 18 апреля 2009.
- 6) Четверина Д.А., Ерохин М.М., Максименко О.Г., Георгиев П.Г. Изучение функциональных активностей Wari-инсулятора *D.melanogaster*. IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, 11-15 мая, 2008.
- 7) Ерохин М.М., Четверина Д.А., Георгиев П.Г. Изучение барьерной активности WARI-инсулятора у *Drosophila melanogaster*. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008». Москва. 7-11 апреля, 2008.