

Кырчанова Ольга Викторовна

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ЭЛЕМЕНТА МСР,
УЧАСТВУЮЩЕГО В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНА *ABD-B* у *DROSOPHILA MELANOGASTER*
Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2007

Работа выполнена в лаборатории регуляции генетических процессов
Института биологии гена РАН

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Глазков М.В.

кандидат биологических наук Тиллиб С.В.

Ведущая организация: Институт молекулярной генетики РАН

Защита диссертации состоится 12 апреля 2007 года в 11 часов на заседании

Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН

по адресу:

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

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

119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан

2007 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Поддержание точной пространственной и временной программы экспрессии генов высших эукариот, подразумевает наличие сложной и высокоэффективной системы их регуляции. Работу каждого гена определяют и контролируют специальные *цис*-регуляторные элементы, активирующие транскрипцию (энхансеры) или репрессирующие ее (сайленсеры). Было показано, что преимущественным механизмом осуществления координированной регуляции транскрипции, является организация генов в независимые домены с одинаковыми паттернами экспрессии (Boutanaev et al. 2002, Spellman & Rubin 2002, Dillon & Sabbattini 2000). Принято считать, что функцию разграничения соседних доменов, выполняют инсуляторы. Инсуляторы – это *цис*-регуляторные элементы, которые способны функционально изолировать промотор от энхансера, если располагаются между ними, а также ограничивать распространение репрессии, то есть, защищать от эффекта положения (Cai & Levine, 1995; Gerasimova & Corces, 1996). Часто *цис*-регуляторная область и промотор гена находятся на расстоянии десятков тысяч пар нуклеотидов друг от друга, кроме того, между геном и его *цис*-регуляторной областью может располагаться ген с другой программой экспрессии, и гены могут перекрываться. Поэтому для правильного запуска работы гена важно, чтобы энхансер активировал только «свой» специфичный промотор. Однако механизмы, которые обеспечивают специфические взаимодействия между энхансерами и промоторами на больших дистанциях до сих пор неизвестны.

Одной из наиболее удобных моделей для изучения энхансер-промоторных взаимодействий и изучения роли инсуляторов в регуляции этих взаимодействий является гомеозисный ген *Abdominal-B (Abd-B) Drosophila melanogaster*, который отвечает за формирование с 10 по 14 брюшные парасегменты дрозофилы. Регуляторная область *Abd-B* гена простирается приблизительно на 50 тпн и включает в себя четыре парасегмент-специфичные *цис*-регуляторные единицы: *iab-5 (infraabdominal-5)*, *iab-6*, *iab-7* и *iab-8*, каждая из которых содержит, по меньшей мере, один энхансер и ответственна за формирование соответствующего ей парасегмента. Молекулярно-генетический анализ выявил наличие границ между этими регуляторными единицами: *Mcp (Miscadestral pigmentation)*, *Fab-7 (Frontabdominal-7)* и *Fab-8*. Было показано, что *Fab-7* и *Fab-8* являются инсуляторами (Karch et al., 1994; Hagstrom et al., 1996). Кроме того, к каждой границе вплотную прилегает сайленсер, включающий сайты связывания белков группы Polycomb (Polycomb Responsible Elements или PRE). Таким образом, каждый энхансер окружен инсуляторами и сайленсерами, но при этом способен активировать промотор *Abd-B*. Данная противоречивая ситуация наводит на мысль о сложной структуре граничных элементов и их особенной роли в обеспечении правильных энхансер-промоторных взаимодействий. Более пристальное изучение каждой границы по отдельности позволит понять роль этих элементов в

регуляции экспрессии *Abd-B* гена и предположить модель, объясняющую механизм коммуникации между энхансером и промотором, разделенных несколькими инсуляторами.

Цель и задачи исследования.

Основная цель работы состояла в изучении структуры и описании функций отдельных элементов регуляторной границы Мср *Drosophila melanogaster*.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать функциональную значимость составных частей Мср элемента *Drosophila melanogaster*.
2. Создать новую модельную систему для изучения способности регуляторных элементов взаимодействовать друг с другом на больших дистанциях.
3. Изучить возможность взаимодействия и его свойства между двумя Мср элементами, расположенными на больших дистанциях друг от друга.

Научная новизна и практическое значение работы.

В составе границы Мср был впервые выделен минимальный инсулятор размером 210 пн (Мср²¹⁰) и продемонстрировано, что он отвечает за взаимодействие между двумя Мср элементами. Также впервые показано влияние прилегающих последовательностей на силу инсулятора, и функциональная взаимозависимость инсулятора и рядом расположенного сайленсера в составе Мср элемента.

Разработана новая модельная система для изучения взаимодействий элементов, расположенных на больших расстояниях друг от друга в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*. С помощью такой модельной системы было впервые показано, что функциональное взаимодействие между Мср инсуляторами определяется их взаимной ориентацией относительно друг друга. Полученные результаты позволят создать удобные генетические системы для дальнейших исследований механизмов регулирующих взаимодействие между энхансерами и промоторами на больших дистанциях.

Апробация работы. Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на XIX международном конгрессе генетиков “Genomes – the Linkage to Life”, (Melbourne, 2003), конференции молодых ученых по молекулярной биологии и генетике (Киев, 2003), XIX всемирном конгрессе «Molecular & Cellular Proteomics» (Montreal, 2003), конференции «Advances in Molecular Cell Biology» (Moscow, 2004) и на межлабораторном семинаре ИБГ РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 2 статьи и 6 тезисов научных сообщений.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 88 страницах, включает 8 таблиц и 16 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 110 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1 Граница *Mcp* содержит инсулятор

Мутация *Mcp* (*Miscadestral pigmentation*) (Lewis, 1978) была описана как gain-on-function мутация, которая трансформирует ПС9 (А4) в ПС10 (А5). Оказалось, что эта мутация соответствует делеции *Mcp*¹, при которой была удалена граница между *iab-4* и *iab-5*, размером 3,6 тпн (Karch et al., 1994). Мутанты, несущие другие делеции этой области (*Mcp*^{H27} и *Mcp*^{B116}), имели такой же фенотип (Karch et al., 1994) (рис. 1). Область перекрытия всех трех делеций содержит один четко выраженный гиперчувствительный к ДНК-азеI сайт (HS) (рис. 1). Ранее было показано, что функция *Mcp* границы зависит от области размером 822 пн (*SalI-XbaI*) (Busturia et al. 1997, Muller et al. 1999), в которую входит HS сайт а также 138 пн сайленсер, содержащий сайты для связывания GAGA фактора и РНО (Karch et al 1994, Busturia et al. 2001) (рис. 1). В нашей лаборатории для исследований использовался *PstI-PstI* фрагмент *Mcp* размером 755 пн, входящий в состав *Mcp*⁸²² (Gruzdeva et al. 2005), и который, как было показано, обладает полярностью, то есть в зависимости от ориентации по отношению к промотору, он либо подавляет экспрессию гена, либо изолирует промотор от вышерасположенных энхансеров. Полярность *Mcp* предполагает присутствие в его составе граничного элемента или инсулятора, который при определенном положении экранирует близлежащий промотор от входящего в состав *Mcp* сайленсера.

Для того чтобы картировать инсулятор в составе *Mcp* были созданы делеционные производные *Mcp* элемента, которые встраивались между энхансерами и промотором гена *yellow* в положении -893 относительно начала транскрипции (рис.1, таблица 1). Способность фрагментов *Mcp* к инсуляции оценивалась по степени изоляции энхансеров тела и крыльев и отсутствию подавления энхансера щетинок, который расположен в интроне гена *yellow*. Различные элементы конструкций фланкировались *fit* или *lox* сайтами, что позволяло их вырезать с помощью *F1p* или *Cte* рекомбиназы соответственно.

В первую очередь, были протестированы фрагменты *Mcp*, из одного из которых был делетирован сайленсер - *Mcp*⁵⁸⁷, а из другого было удалено 247 пн из противоположной сайленсеру части (*Mcp*⁵⁰⁸) (рис. 1). В конструкции *Eu(e)(M^{508R})YW* *Mcp* элемент был встроен в обратной ориентации и окружен *lox*-сайтами для рекомбиназы *Cte*, в то время как в конструкции *Eu(e)M⁵⁸⁷YW* *Mcp* располагался в прямой ориентации для того, чтобы убедиться в отсутствии сайленсера и репрессивного действия на промотор гена *yellow* (таблица 1а,б).

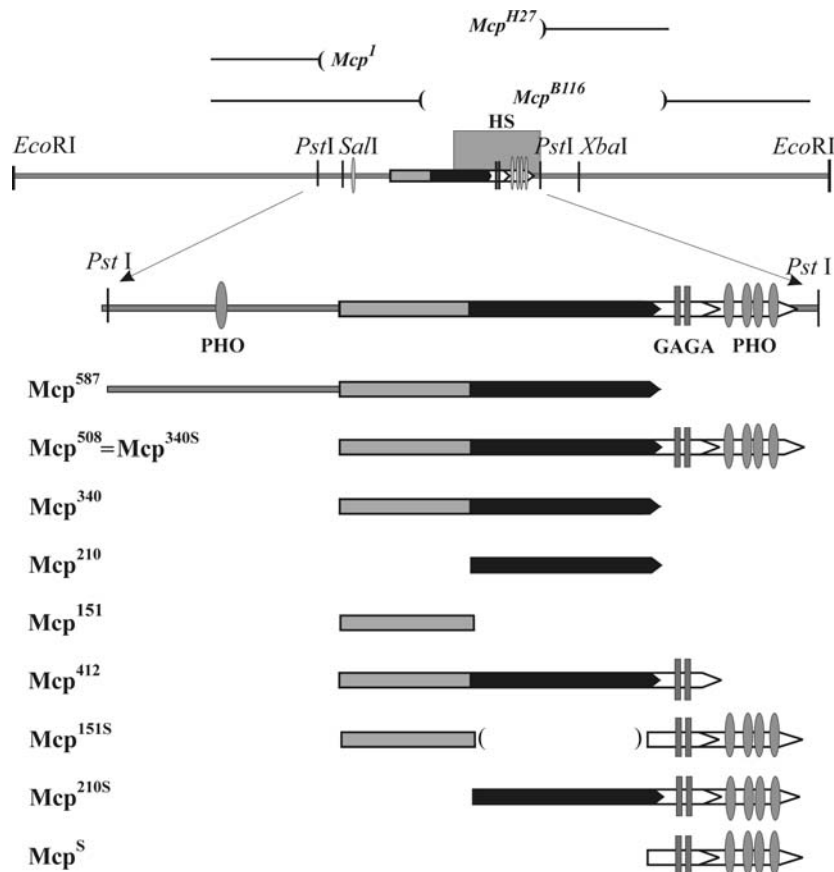


Рисунок 1. Схема регуляторного элемента *Mcp*. Показано расположение сайта гиперчувствительности к ДНК-азе I (HS) в составе *Mcp* (белый прямоугольник) по отношению к рестриктазам. Овалы показывают расположение сайтов связывания РНО, вертикальные брусочки - GAGA. Выше приведена карта делеций *Mcp* (Karch et al., 1994), ниже - фрагментов, используемых в работе.

В 7 из 9 линий, полученных при трансформации конструкции $Ey(e)M^{508R}YW$ в эмбрионы линии *uw*, которые содержали одиночную инсерцию, уровень пигментации щетинок был равен дикому типу, в то время как тело и крылья были желтыми. В двух линиях пигментация щетинок была слабо варьирующей, но делеция Mcp^{508R} с помощью *Cte* рекомбиназы не оказала эффекта на окраску щетинок, что говорит о непричастности Mcp^{508R} к репрессии щетинок в данных случаях. Сравнивая цвет глаз гетеро и гомозиготных мух в полученных трансгенных линиях в присутствии и при делеции Mcp^{508R} , мы обнаружили, что репрессия, возникающая при спаривании PRE-содержащих сайленсеров (pairing-sensitive silencing – PSS) возникла только в одной линии. Таким образом, сайленсер в составе Mcp^{508} не может эффективно репрессировать промотор генов *yellow* и *white* так как противоположная часть M^{508} содержит предполагаемый инсулятор.

Во всех линиях конструкции $Ey(e)M^{587}YW$ наблюдался уровень пигментации щетинок равный дикому типу, и при этом 11 из 12 линий имели светлую окраску кутикулы тела и крыльев, что говорит о достаточно эффективной изоляции энхансеров гена *yellow* от его промотора (таблица 1 б). Кроме того, присутствие двух копий элемента в гомозиготе приводило к потемнению глаз, что подтверждает отсутствие сайленсера в составе данного элемента. Следовательно, сайленсер не участвует в инсуляторной функции *Mcp*.

Таблица 1. Результаты оценки инсуляторной функции Mcr элементов в системе гена *yellow*

Название конструкции	Схема конструкции	Уровень пигментации									Всего линий
		тела					щетинок				
		5	4	3	2	1	5	в	1		
а	$Ey(e)(M^{508R})YW$ ΔM^{508R}		-	2	4	3	-	7	2	-	9
б	$Ey(e)M^{587}YW$		4	4	1	-	-	7	2	-	
в	$Eye(M^{340})YW$ ΔM^{340}		-	-	-	-	-	-	-	-	8
г	$(M^{340})EyeYW$ ΔM^{340}		1	2	2	3	-	8	-	-	
д	$Eye(M^{210R})Y(\Delta)W$ ΔM^{210R}		2	8	4	1	-	15	-	-	15
е	$Eye(M^{151x2})Y(\Delta)W$ ΔM^{151x2}		11	3	1	-	-	15	-	-	
ж	$Eye(M^{412})Y(\Delta)W$ ΔM^{412}		9	5	-	-	-	14	-	-	14
з	$Eye(M^{412R})Y(\Delta)W$ ΔM^{412R}		9	5	-	-	-	14	-	-	
			-	6	10	6	1	20	2	1	23
			16	7	-	-	-	21	1	1	
			1	7	21	8	-	34	2	3	39
			28	11	-	-	-	35	3	3	

Схемы конструкций: энхансеры изображены в виде овалов и обозначены соответственно: W- энхансер крыльев, E- глаз, B- тела, br- щетинок; фрагменты Mcr обозначены соответственно рис. 1. Тонкие стрелочки показывают сайты lox или frt. Уровень экспрессии гена *yellow* оценивался пигментации кутикулярных структур в гетерозиготных самцах по пятибалльной шкале: 5 – уровень дикого типа, в – переменное количество окрашенных и неокрашенных щетинок, 1 – отсутствие пигмента. Цифры в таблице показывают количество линий, имеющих тот или иной фенотип.

В результате перекрытия фрагментов Mcr⁵⁰⁸ и Mcr⁵⁸⁷, был вычислен инсулятор размером 340 пн (Mcr³⁴⁰) (рис.1). С целью проверки его свойств была создана конструкция Eye(M³⁴⁰)YW (таблица 1 в). В 7 из 8 трансгенных линий пигментация тела и крыльев была снижена. Кроме того, Mcr³⁴⁰ эффективно изолировал энхансер гена *white*, так как цвет глаз всех полученных линий трансгенных мух был на уровне базовой транскрипции. В тоже время уровень пигментации щетинок во всех полученных трансгенных линиях был равен дикому типу, что свидетельствует об отсутствии сайленсера в составе Mcr³⁴⁰. Вырезание Mcr³⁴⁰ фрагмента из трансгенов приводило к повышению уровня экспрессии генов *yellow* и *white*. Для подтверждения того, что Mcr³⁴⁰ является инсулятором, необходимо было убедиться, что при расположении Mcr³⁴⁰ с другой стороны от энхансеров, он не будет оказывать влияние на экспрессию маркерных генов, поэтому была создана конструкция (M³⁴⁰)EyeYW (таблица 1 г). Во всех 10 полученных трансгенных линиях Mcr³⁴⁰ не оказывал никакого влияния на уровень экспрессии *yellow* и *white*. Таким образом, можно сделать вывод, что Mcr³⁴⁰ фрагмент проявляет инсуляторную активность, не оказывая подавляющего влияния на активность энхансеров.

Далее, с целью более точного картирования инсулятора в составе Mcr, мы поделили Mcr³⁴⁰ на две перекрывающиеся части: проксимальную Mcr¹⁵¹ и дистальную Mcr²¹⁰ (рис.1). С этой целью были проанализированы конструкции Eye(M^{151x2})Y(Δ)W и Eye(M^{210R})Y(Δ)W (таблица 1 д, е). Выяснилось, что Mcr²¹⁰ проявляет слабые инсуляторные свойства. Так 13 из 15 полученных

трансгенных линий конструкции Eye(M^{210R})Y(Δ)W имели более светлую окраску тела по сравнению с контролем (те же линии, из которых элемент M²¹⁰ удален по *fit* сайтам). Элемент M¹⁵¹ был дублирован для усиления предполагаемого инсулятора, но не оказал никакого влияния на экспрессию генов *yellow* и *white*, а значит, можно сделать вывод, что он не обладает ни инсуляторной, ни сайленсерной активностью.

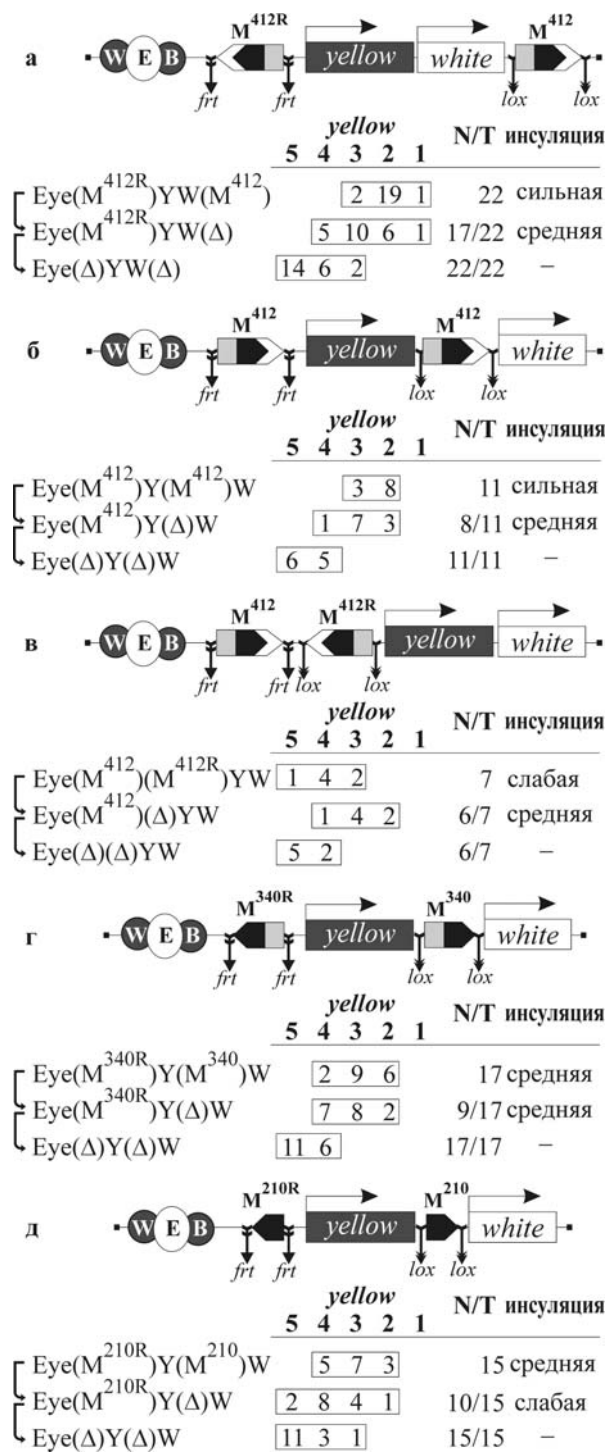
Как было показано ранее, для осуществления энхансер блокирующей функции инсуляторами Fab-7 и SF1 необходим GAGA фактор (Belozeroov et al. 2003, Schweinsberg et al. 2004). Для того чтобы проверить, какое значение GAGA фактор оказывает на функцию M^{cr}, мы скомбинировали M^{cr340} инсулятор с частью PRE, содержащую GAGA сайты (рис. 1) и протестировали на системе гена *yellow* (таблица 1 ж, з). Во всех линиях конструкций Eye(M⁴¹²)Y(Δ)W и Eye(M^{412K})Y(Δ)W, мухи имели значительно более светлую окраску тела и крыльев по сравнению с производными этих линий без M^{cr412}. Таким образом, степень изоляции энхансеров от промотора была выше и стабильнее по сравнению с M^{cr340} и не зависела от ориентации M^{cr412}. Исходя из этого, можно сделать вывод, что GAGA фактор улучшает работу инсулятора M^{cr} и ориентация M^{cr412} не влияет на экспрессию *yellow*.

Анализируя все вышеизложенное, можно предположить, что найденный минимальный инсулятор M^{cr210} является, сердцевинной целого инсуляторного комплекса, а прилегающие последовательности, содержащие сайты связывания для различных белков, в том числе GAGA фактор, делают этот инсуляторный комплекс более стабильным.

2 Элементы M^{cr}, содержащие минимальный инсулятор в своем составе, способны к функциональному взаимодействию

Ранее в нашей лаборатории на модельной системе генов *yellow* и *white* было показано функциональное взаимодействие двух копий M^{cr755}, с образованием двух независимых доменов (репрессированного и активированного). Мы решили проверить, будут ли различные фрагменты M^{cr} способны к подобным взаимодействиям. Прежде всего, мы решили протестировать M^{cr412} элемент, который содержит GAGA сайты. Ранее было показано, что GAGA фактор способен сближать удаленные друг от друга участки ДНК (Mahmoudi et al., 2002). С этой целью два элемента M^{cr412} встраивались в различных ориентациях относительно промоторов и относительно друг друга. Одна копия M^{cr412} была вставлена в положение -893 относительно старта транскрипции гена *yellow*. Другая вставлялась либо ниже *mini-white* гена, либо между генами *yellow* и *white* в положении +4964, либо в положении -343 между энхансером и промотором гена *yellow* (таблица 2 а, б, в).

Таблица 2. Результаты выяснения способности Mcr элементов функционально взаимодействовать друг с другом.



Приведены схемы конструкций и результаты оценки экспрессии гена *yellow* по уровню пигментации кутикулярных структур в них (см. материалы и методы). Цифры в таблице показывают количество линий, имеющих тот или иной фенотип. Дробью указано количество линий изменивших фенотип в результате вырезания исследуемых элементов (в числителе) по отношению к общему количеству линий с одиночной inserцией конструкции в геном.

Сравнивая *yellow* фенотип трансгенных мух созданных конструкций и их производных с делетированным Mcr⁴¹² элементом (таблица 1 ж, з), мы обнаружили, что вторая копия Mcr⁴¹², расположенная ниже гена *yellow*, значительно усиливает инсуляцию этого гена, а выше – нейтрализует действие первого (таблица 2 а, б, в).

Mcr³⁴⁰, Mcr²¹⁰ и Mcr¹⁵¹ также были протестированы аналогичным способом на способность к взаимодействию. Оказалось, что две копии Mcr³⁴⁰ или Mcr²¹⁰ элемента лучше блокируют энхансеры гена *yellow*, чем соответственно одна копия (таблица 3 г, д). Предположительно, взаимодействие между этими элементами, окружающими ген *yellow*, приводит к более эффективной изоляции энхансеров, которые находятся вне петли формируемой взаимодействующими инсуляторами. Mcr^{151x2} не проявлял инсуляторной активности ни отдельно, ни, в паре с Mcr⁴¹². Таким образом, можно сделать вывод, что элемент Mcr¹⁵¹, не обладающий инсуляторной активностью, также не способен взаимодействовать со второй копией Mcr на расстоянии.

Кроме того, анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что GAGA фактор, повышающий силу инсулятора Mcr, не является определяющим фактором при взаимодействии удаленных друг от друга Mcr элементов.

3 Взаимная ориентация взаимодействующих Msp элементов определяет способность глазных энхансеров стимулировать ген *white*

Способность глазного энхансера стимулировать промотор *white* оценивалась по уровню пигментации глаз в трансгенных линиях в соответствии со следующей шкалой: белые (полная инактивация гена *white*, далее в таблицах - б), светло-желтые (сж), желтые (ж), темно-желтые (тж), оранжевые (ор), темно-оранжевые (то), коричневые (к), темно-коричневые (тк), красные (кр - уровень пигментации дикого типа). Сравнивая уровень пигментации глаз мух трансгенных линий Eye(M⁴¹²)Y(M⁴¹²)W, и линий с конструкциями Eye(e)(M^{340R})Y(M³⁴⁰)W и Eye(e)(M^{210R})Y(M²¹⁰)W, становится очевидно, что не всегда взаимодействующие Msp элементы способствуют эффективной стимуляции гена *white* (таблица 3 а). Такой неожиданный результат мы объяснили тем, что в конструкции Eye(M⁴¹²)Y(M⁴¹²)W оба Msp⁴¹² находились в одинаковой, «прямой», ориентации, а в конструкциях Eye(e)(M^{340R})Y(M³⁴⁰)W и Eye(e)(M^{210R})Y(M²¹⁰)W, Msp элементы располагались во взаимно противоположных ориентациях. Возможно, взаимная ориентация элементов определяла взаимодействие глазного энхансера и промотора, либо *white* промотор репрессировался Msp⁴¹² элементом, содержащим часть PRE. Чтобы прояснить ситуацию, мы сделали дополнительные конструкции, в которых Msp⁴¹² был вставлен в положения -893 и +4964 в различных ориентациях: «обратная-прямая», «прямая-обратная» и «обратная-обратная» (таблица 3 б,в,г). Для оценки влияния энхансеров *yellow* и *white* на экспрессию соответствующих генов на фоне изучаемых элементов, мы использовали систему вырезания на основе рестриктазы I-SceI., (Rodin & Georgiev, 2005). Сравнивая окраску глаз у мух из полученных трансгенных линий на фоне удаленных энхансеров, мы обнаружили, что репрессия *white* наблюдается только в случаях, когда Msp⁴¹² находится в положении +4964 таким образом, что GAGA сайты располагаются вплотную к промотору *white*. Находясь в другой ориентации, Msp⁴¹² не влияет на экспрессию *white*, так как предполагаемый репрессор блокируется рядом расположенным инсулятором (рис. 11, таблица 4). Однако важно отметить, что независимо от ориентации Msp⁴¹² не подавляет экспрессию гена *yellow* в щетинках. Во всех полученных линиях конструкций (Eye)(M^{412R})Y(M⁴¹²)W и (Eye)(M⁴¹²)Y(M^{412R})W, в которых Msp⁴¹² элементы находились в противоположной друг другу ориентации, в гетерозиготе глазной энхансер сильно активировал *white* промотор. Причем удаление обоих инсуляторов из конструкции приводило к заметному снижению экспрессии *white*. Таким образом, можно сделать вывод, что взаимодействие между двумя Msp⁴¹², встроенными в противоположной друг другу ориентации, улучшает коммуникацию между энхансером и промотором гена *white* через ген *yellow* (таблица 3 б,в). Однако в некоторых гомозиготных линиях конструкции (Eye)(M^{412R})Y(M⁴¹²)W пигментация глаз снижалась – эффект pairing sensitive silencing (PSS) (Pirrotta, 1997; Kassis, 2002).

Таблица 3. Способность энхансера глаз стимулировать экспрессию *white* в зависимости от взаимной ориентации Msr элементов.

		<i>white</i>															
		кр	кк	к	то	ор	тж	ж	сж	б	N/T						
a		Eye(M ⁴¹²)Y(M ⁴¹²)W				2		7	1		1	11					
		Eye(Δ)Y(Δ)W						1	2	1	6	1	9/11				
		Eye(M ⁴¹²)Y(Δ)W				3		5		3		9/11					
		Eye(Δ)Y(M ⁴¹²)W				7		2		1	1	7/11					
б		(Eye)(M ^{412R})Y(M ⁴¹²)W				6		6	2	3	1	1	19				
		(Eye)(Δ)Y(Δ)W						1			1	6	5	6	19/19		
		(Eye)(M ^{412R})Y(Δ)W						4		7	6	1	1	16/19			
		(Δ)(M ^{412R})Y(M ⁴¹²)W						14		2	1	1	1	17/19			
		(Δ)(M ^{412R})Y(Δ)W									2	5	8	1	16/16		
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W										2	11	3	8/16		
		(Δ)(M ⁴¹²)Y(M ^{412R})W									3	4	7	2	15/16		
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W									3	5	7	1	16/16		
B		(Eye)(M ⁴¹²)Y(M ^{412R})W				10		5		1			16				
		(Eye)(Δ)Y(Δ)W						16						6/16			
		(Eye)(M ⁴¹²)Y(Δ)W						1		2	4	5	4	15/16			
		(Δ)(M ⁴¹²)Y(M ^{412R})W										10	3	3	15/16		
		(Δ)(M ⁴¹²)Y(Δ)W										4	9	3	16/16		
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W										3	4	4	4	14/16	
		(Δ)(M ^{412R})Y(M ^{412R})W										2	10	2	2	4/16	
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W										2	4	4	4	2	16/16
Г		Eye(M ^{412R})Y(M ^{412R})W				2		5		2	3	2		14			
		Eye(Δ)Y(Δ)W						1		3	3	2	3	2	14/14		
		Eye(M ^{412R})Y(Δ)W						3		2	5	4		8/14			
		Eye(Δ)Y(M ^{412R})W								11	1	1	1		11/14		
Д		Eye(M ^{340R})Y(M ³⁴⁰)W				13		3		1				17			
		Eye(Δ)Y(Δ)W										17			4/17		
		Eye(M ^{340R})Y(Δ)W						1		4	6	5	1	16/17			
		Eye(Δ)Y(M ^{340R})W										13	2	2	15/17		
e		(Eye)(M ³⁴⁰)Y(M ³⁴⁰)W				2		5		3	2	3	2	17			
		(Eye)(Δ)Y(Δ)W									8	3	2		10/13		
		(Eye)(M ³⁴⁰)Y(Δ)W						1		5	4	2	4	1	6/17		
		(Δ)(M ³⁴⁰)Y(M ³⁴⁰)W											11	1		13/13	
		(Δ)(M ³⁴⁰)Y(Δ)W										5	11	1	16/17		
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W										1	1	7	4	13/13	
		(Δ)(M ^{340R})Y(M ^{340R})W										4	11	2	2/17		
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W										1	1	6	5	13/13	
Ж		Eye(M ^{210R})Y(M ²¹⁰)W				8		6		1				15			
		Eye(Δ)Y(Δ)W										15			7/15		
		Eye(M ^{210R})Y(Δ)W						2		6	5	2		12/15			
		Eye(Δ)Y(M ^{210R})W										15			13/15		
3		(Eye)(M ²¹⁰)Y(M ²¹⁰)W				9		4		2	1			16			
		(Eye)(Δ)Y(Δ)W									4	1	7	2	2	16/16	
		(Eye)(M ²¹⁰)Y(Δ)W						2		3	4	5	2		16/16		
		(Δ)(M ²¹⁰)Y(M ²¹⁰)W											11	3		10/16	
		(Δ)(M ²¹⁰)Y(Δ)W											5	8	3	16/16	
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W											2	1	2	6	4
		(Δ)(M ^{210R})Y(M ^{210R})W											3	9	4	3/16	
		(Δ)(Δ)Y(Δ)W											1	3	3	5	4

Это возможно связано с тем, что GAGA фактор привлекает какие-то компоненты репрессивного комплекса белков Pc-G (Poux et al 2000), либо область расположения GAGA сайтов содержит дополнительные сайты для связывания пока не идентифицированного репрессора.

Экспрессия *white* в трансгенных линиях с конструкциями Eye(M^{412R})Y(M^{412R})W и Eye(M⁴¹²)Y(M⁴¹²)W, в которых M_{CP}⁴¹² находился в одной ориентации, почти не отличалась или была чуть выше, чем в производных без инсуляторов (таблица 3 г). В конструкции Eye(M⁴¹²)Y(M⁴¹²)W этот эффект можно было объяснить наличием репрессора в составе M_{CP}⁴¹², развернутого на промотор гена *white*, действие которого усиливалось в гомозиготе. Это подтверждается тем, что удаление обоих инсуляторов приводило к потемнению окраски глаз. Однако в конструкции Eye(M^{412R})Y(M^{412R})W, несмотря на то, что оба M_{CP} элемента развернуты инсулятором на промотор, трансгенные мухи также имели светлую окраску глаз, то есть активность энхансера была блокирована (рис. 11 А, D; таблица 4). Полученные результаты подтверждают наше предположение о том, что взаимная ориентация взаимодействующих M_{CP}⁴¹² элементов играет значительную роль в установлении коммуникации между энхансером и промотором гена *white*, обеспечивая формирование петель, которые стерически либо изолируют энхансер от промотора, либо способствуют их стабильному взаимодействию.

Далее мы решили исследовать подобным образом влияние на экспрессию *white* взаимодействующих M_{CP}³⁴⁰ либо M_{CP}²¹⁰ элементов. Также как и в предыдущем эксперименте, мы сделали конструкции, в которых элементы M_{CP}³⁴⁰ и M_{CP}²¹⁰ были поставлены в ориентациях противоположных друг к другу (конструкции Eye(M^{340R})Y(M³⁴⁰)W и Eye(M^{210R})Y(M²¹⁰)W), и в одинаковых по отношению друг к другу (конструкции (Eye)(M³⁴⁰)Y(M³⁴⁰)W и (Eye)(M²¹⁰)Y(M²¹⁰)W) ориентациях (таблица 3 д-з). В последних двух конструкциях энхансеры были фланкированы I-SceI сайтами, с целью последующего их удаления. Сравнивая пигментацию глаз в производных трансгенных линиях без энхансеров можно сделать вывод, что в отличие от M_{CP}⁴¹², ни M_{CP}³⁴⁰ ни M_{CP}²¹⁰ не оказывают влияния на экспрессию *white* (таблица 3). Эти данные подтверждают, что небольшой фрагмент PRE, содержащий GAGA сайты, присутствующий в элементе M_{CP}⁴¹² функционирует как слабый репрессор по отношению к промотору *white*.

После того, как мы убедились в отсутствии репрессорных свойств у элементов M_{CP}³⁴⁰ и M_{CP}²¹⁰, мы сравнили цвет глаз полученных трансгенов на фоне стимуляции энхансером *white* в присутствии и в отсутствии обоих исследуемых инсуляторов. Полученные результаты были аналогичны результатам по взаимодействию M_{CP}⁴¹², то есть, в зависимости от ориентации элементов относительно друг друга, наблюдалась либо стабильно высокая стимуляция экспрессии *white*, либо промотор гена *white* стерически изолировался. Таким образом, M_{CP}²¹⁰ является минимальным элементом, способным осуществлять ориентационно-зависимое взаимодействие.

4 Стимуляция white промотора активатором GAL4 также зависит от взаимной ориентации взаимодействующих Msp элементов

Как было показано на дрожжах, уровень стимуляции GAL4 активатором снижается по мере удаления GAL4 связывающих сайтов от промотора (De Bruin et al. 2001, Guarente et al. 1984, Struhl et al. 1984). Для того чтобы проверить, действительно ли Msp сближает удаленные друг от друга регуляторные элементы, мы использовали новую модельную систему на основе дрожжевого GAL4 активатора и генов *yellow* и *white*. В положение -893 от точки начала транскрипции мы поставили десять GAL4 связывающих сайтов (G4). Таким образом, расстояние между G4 и промотором гена *mini-white* составило 5 тпн. Для того чтобы экспрессировать GAL4 белок, мы использовали трансгенную линию, несущую ген GAL4 под постоянно и повсеместно работающим тубулиновым промотором.

Для начала, мы создали конструкцию G4(M⁴¹²)Y(M^{412R})W в которой Msp⁴¹² элемент был встроен в положение - 343 и +4964 от точки начала транскрипции *yellow* в ориентации «навстречу друг к другу» (рис.2 б, таблица 4а). Во всех полученных 17 трансгенных линиях GAL4 сильно стимулировал экспрессию *white*. Удаление одного или обоих M⁴¹² элементов приводило к потере способности GAL4 стимулировать экспрессию *white* во всех линиях, однако близлежащий промотор гена *yellow* (на расстоянии 893 пн) эффективно стимулировался (рис. 2 б, таблица 4а). Отсюда вытекает, что в модельной системе генов *yellow* и *white* у *Drosophila*, также как и в дрожжах, GAL4 является дистанционно зависимым активатором, то есть, работает, только на расстоянии не более 1 тпн, и не способен воздействовать на промотор гена, находящийся на расстоянии 5 тпн. Взаимодействующие Msp⁴¹² элементы располагают GAL4 активатор напротив промотора гена *white*, тем самым, опосредуя его активацию.

Мы решили подтвердить влияние взаимной ориентации Msp элементов на активацию гена *white* в новой модельной системе. С этой целью мы создали конструкцию G4(M^{412R})Y(M^{412R})W, в которой проксимальный Msp⁴¹², находящийся рядом с GAL4, был вставлен в той же ориентации, что и дистальный элемент. Только в 6 из 14 полученных трансгенных линий была заметна слабая активация гена *white*, и, так же как и в предыдущем случае, удаление одного или обоих элементов приводило к полной неспособности GAL4 активировать промотор *white* (рис. 2 в, таблица 4б). Таким образом, ориентация взаимодействующих элементов относительно друг друга, также как и в случае с энхансерами, важна для стимулирования экспрессии гена с помощью GAL4. Исходя из этих результатов, мы предположили, что взаимодействующие Msp элементы в зависимости от своей ориентации могут образовывать петли двух форм (рис.2), которые стерически либо изолируют активатор от промотора *white*, либо располагают их напротив друг друга. Для подтверждения этого предположения мы поместили GAL4 внутри предполагаемой петли между Msp⁴¹² и промотором гена *yellow*. второй Msp⁴¹² элемент мы поставили между генами *yellow* и *white* в двух ориентациях.

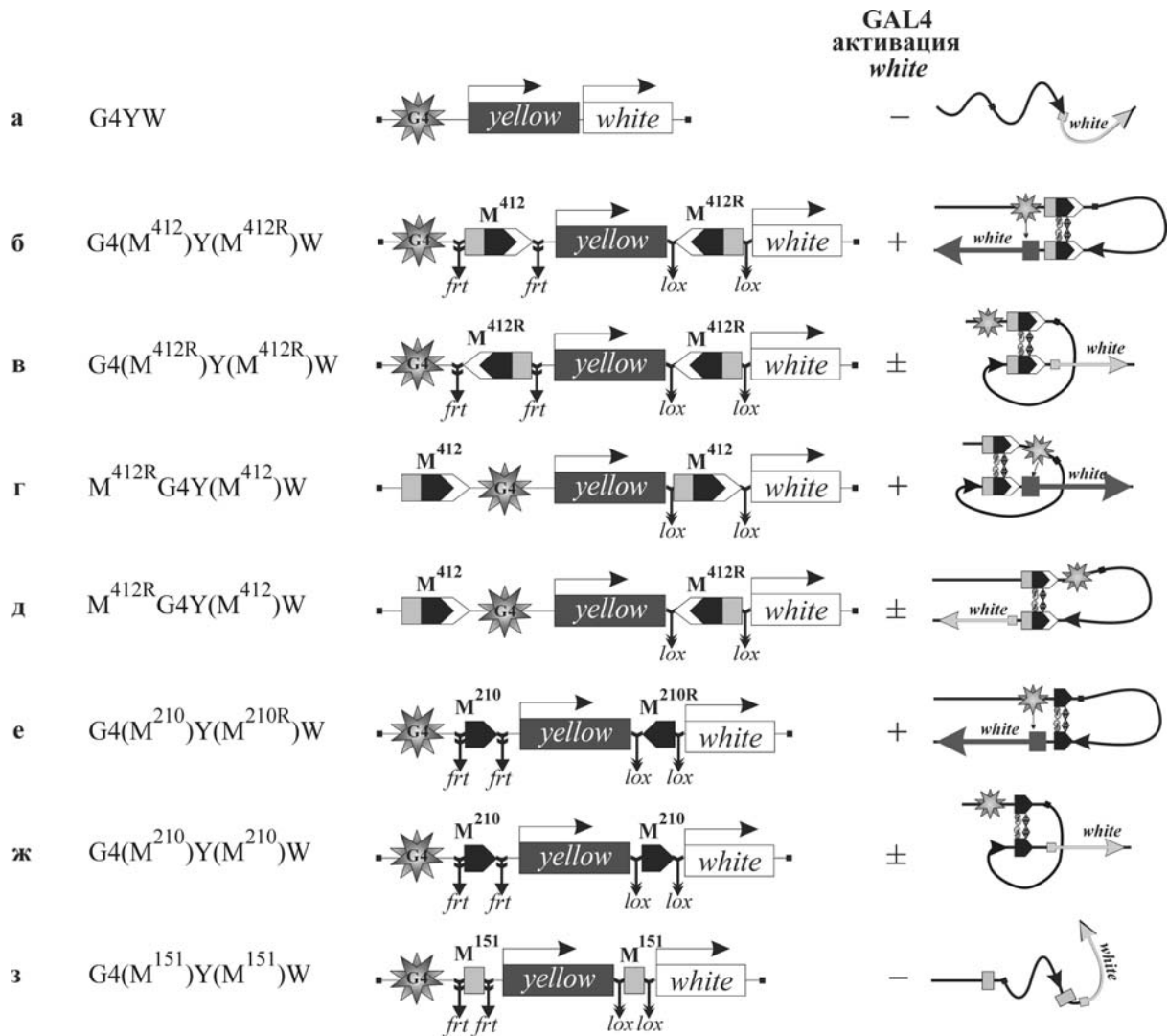


Рисунок 2. Проверка способности взаимодействующих Msp элементов модулировать энхансер-промоторные отношения в системе с GAL4 активатором. Представлены схемы конструкций и результат после индукции экспрессии GAL4 активатора: (-) -отсутствие стимуляции гена *white*, (+) - эффективная стимуляция гена *white*.

Как и ожидалось, в случае расположения элементов в одной ориентации, стимуляция GAL4 приводила к сильной активации промотора *white* (14 из 15 линий), тогда как при расположении Msp⁴¹² в ориентации «навстречу друг к другу» стимуляция GAL4 вызывала лишь незначительное увеличение пигментации глаз у 4 линий из 19 (рис. 2 г, д; таблица 4 в, г).

Msp²¹⁰ мы исследовали на наличие тех же свойств, что и у Msp⁴¹². Результаты анализа конструкций G4(M²¹⁰)Y(M^{210R})W и G4(M²¹⁰)Y(M²¹⁰)W (рис.2 е, ж) подтвердили, что взаимодействующие Msp²¹⁰ элементы, также способствуют GAL4 зависимой стимуляции *white*, если располагаются в противоположной друг другу ориентации, и изолируют промотор, если находятся в одной ориентации (таблица 4 д, е). Аналогично на способность к коммуникации был проверен элемент Msp¹⁵¹. Ни в одной из шести полученных линий конструкции G4(M¹⁵¹)Y(M^{151R})W при индукции GAL4 ген *white* не активировался, что подтверждает неспособность к взаимодействию Msp¹⁵¹ элементов (рис. 12 з; таблица 4 ж).

Таблица 4. Результаты, показывающие влияние взаимной ориентации взаимодействующих Mср элементов на коммуникацию между GAL4 и промотором гена *white*.

		<i>white</i>									
		кр	тк	к	то	ор	тж	ж	сж	б	N/T
а	G4(M ⁴¹²)Y(M ^{412R})W					2	4	8	3		17
	└┘+GAL4	3	5	6	3						17/17
	G4(Δ)Y(Δ)W					1	6	3		10	
	└┘+GAL4					2	5	3		1/10	
б	G4(M ^{412R})Y(M ^{412R})W				1	1	7	3	2		14
	└┘+GAL4	1				4	5	1	2		6/14
	G4(Δ)Y(Δ)W					1	6	3	1		10
	└┘+GAL4					1	6	3	1		0/10
в	M ⁴¹² G4Y(M ⁴¹²)W							9	10		19
	└┘+GAL4	5	4	4	3	2	1			16/19	
г	M ⁴¹² G4Y(M ^{412R})W				1	3	9	5	1		19
	└┘+GAL4	1	1	3	9	4	1			4/19	
д	G4(M ²¹⁰)Y(M ^{210R})W					1	3	1	1		6
	└┘+GAL4	5	1								6/6
	G4(Δ)Y(Δ)W					1	3	1	1		6
	└┘+GAL4					2	2	1	1		1/6
е	G4(M ²¹⁰)Y(M ²¹⁰)W					2	3	1		6	
	└┘+GAL4				2	1	2	1		2/6	
	G4(Δ)Y(Δ)W					4	2			6	
	└┘+GAL4					4	2			0/6	
ж	G4(M ¹⁵¹)Y(M ^{151R})W					4	1	1		6	
	└┘+GAL4					1	3	1	1		1/6
	G4(Δ)Y(Δ)W					4	1	1		6	
	└┘+GAL4					1	3	1	1		1/6

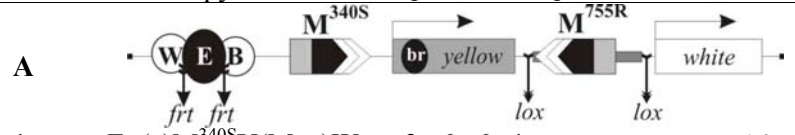
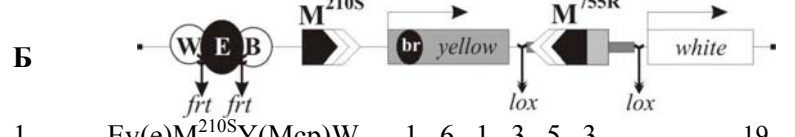

5 Mср³⁴⁰ способен защищать промотор от репрессирующего действия PRE

Мы решили выяснить способность инсуляторов Mср³⁴⁰ и Mср²¹⁰ блокировать распространению репрессии. С этой целью мы создали конструкции Eу(E)M^{340S}Y(Mср)W и Eу(E)M^{210S}Y(Mср)W, в которых Mср элементы соединялись с 138 пн сайленсером (S) и помещались в положение -893 от начала транскрипции *yellow* (рис. 1, таблица 5 а, б). В качестве второго фланкирующего *yellow* элемента был выбран Mср⁷⁵⁵, который содержит тот же сайленсер. Оба Mср элемента находились в ориентации, при которой сайленсеры были направлены на промотор гена *yellow*. Способность эффективно блокировать распространение репрессии мы оценивали по степени подавления окраски глаз в линиях, в которых сайленсеры функционировали полноценно, и ген *yellow* в щетинках был полностью зарепрессирован.

Во всех полученных 16 трансгенных линиях с конструкцией Eу(E)M^{340S}Y(Mср)W пигментация глаз приближалась к уровню дикого типа и усиливалась в гомозиготе. Делеция глазного энхансера в этих линиях приводила к значительному уменьшению окраски глаз. Полученные результаты показывают, что Mср³⁴⁰ элемент является эффективной границей, препятствующей распространению PRE-опосредованной репрессии, позволяя энхансеру глаз

активировать промотор гена *white* через зарепрессированный ген *yellow* (таблица 5 а). Однако уровень окраски глаз полученных трансгенных линий конструкции $Ey(E)M^{210S}Y(Mcp)W$ свидетельствовал о нестабильной активации промотора *white* его энхансером и, кроме того, в половине случаев в гомозиготе наблюдался PSS, то есть, *white* был сильно зарепрессирован (таблица 5 б). Таким образом, слабый инсулятор Mcp^{210} , несмотря на то, что он способен разделять энхансер и промотор, находясь между ними, и осуществлять коммуникацию на расстоянии, не способен эффективно блокировать распространение репрессии.

Таблица 5. Схемы конструкций и полученные результаты, показывающие способность элементов *Mcp* блокировать распространение PRE.

	Название и схема конструкции	Окраска глаз							Всего линий	S/T		
		кр	тк	к	то	ор	тж	ж			сж	б
А 	1	3	6	6	1					16	0/16	
	2				1	2	4	7	2		16/16	0/16
	Б 											
	1	1	6	1	3	5	3			19	10/19	
	2				1	3	3	12		19/19	10/19	
В 	1				1	3	5	3	1	13	13/13	
	2				1	1	1	6	4	10/13	13/13	

S/T – количество линий, проявляющих PSS к общему числу

Таким образом, Mcp^{151} , не обладающий инсуляторными свойствами, каким-то образом усиливает барьерную функцию элемента Mcp^{210} , поэтому мы решили проверить, обладает ли он барьерной функцией. Анализ трансгенных линий конструкции $Ey(E)M^{151S}Y(Mcp)W$ показал, что окраска глаз мух исходных линий, была светлая, то есть, элемент Mcp^{151} не способен осуществлять коммуникацию со второй копией *Mcp* и тем самым обеспечивать стабильную стимуляцию промотора *white* его энхансером (рис. 1, таблица 5в). Кроме того, репрессия, наблюдаемая в гомозиготе, была связана с функционированием PRE в составе Mcp^{755} , что подтвердилось его вырезанием. Таким образом, элемент Mcp^{151} самостоятельно не обладает барьерной функцией, экранирующей от репрессии Mcp^{755} (таблица 4 в), но в сочетании с минимальным инсулятором способен усиливать инсуляторную и барьерную функцию.

Таблица 6. Результаты, показывающие способность Mcr^{340} экранировать гены *yellow* и *white* от действия $PRE(Ubx)$.

Название и схема конструкции	Окраска глаз						Всего линий	Уровень пигментации тела					Всего линий	
	кр	тк	к	то	ортж	жсж		б	5	4	3	2		1
$Ey(PRE)(M^{340})YEeW$	10							10	1	1	5	2	1	10
$Ey(\Delta)(M^{340})YEeW$	10							0/10	1	4	4	1		4/10
$Ey(PRE)(\Delta)YEeW$	2	2	1	3	2			8/10						10/10

С целью выяснить, способен ли Mcr^{340} элемент экранировать гены *yellow* и *white* от влияния другого более мощного репрессора, мы создали конструкцию $Ey(PRE)(M^{340})YEeW$, в которой 1,5 тпн PRE из гомеотического гена *Ultrabithorax (Ubx)*, (Chan et al. 1994) был помещен между энхансерами *yellow*, а Mcr^{340} был вставлен в положение -893 между PRE и *yellow* промотором. Непосредственно перед геном *white* были вставлены два его энхансера. Так как активность PRE очень сильно зависит от эффекта положения, учитывались только те линии, в которых удаление PRE или Mcr^{340} приводило к каким-либо фенотипическим изменениям. Анализ полученных трансгенных линий показал, что Mcr^{340} эффективно, но не абсолютно, защищает гены *yellow* и *white* от репрессии (таблица 6).

Таблица 7. Результаты влияния различных элементов Mcr в сочетании со 138 пн сайленсером на экспрессию *yellow* в щетинках.

Название и схема конструкции	Уровень пигментации щетинок					всего линий
	5	4	3	2	1	
A 						
$Eye(MS)YW$	13	4	1	1	4	22
$Eye(\Delta)YW$	18	1	1	-	2	
B 						
$Ey(E)M^{340S}Y(\Delta)W$	4	1	2	2	5	16
B 						
$Ey(E)M^{210S}Y(\Delta)W$	3	1	2	1	12	19
Г 						
$Ey(E)M^{151S}Y(\Delta)W$	10	2	1	-	-	13

6 Мср²¹⁰ способствует репрессии, опосредованной прилегающим сайленсером

Ранее было показано, что 138 пн сайленсер Мср достаточен для подавления активности *lac-Z* в имагинальных дисках (Busturia et al. 2001). Мы решили проверить, способен ли данный сайленсер самостоятельно вызывать репрессию в системе генов *yellow* и *white*. С этой целью 138 пн сайленсер Мср был вставлен в положение -893 перед промотором гена *yellow* (конструкция $E_{ye}(M^S)YW$) (таблица 7а).

Способность элемента вызывать репрессию оценивалась по степени пигментации щетинок в присутствии элемента и после его вырезания. Из 22 полученных трансгенных линий в 9 окраска щетинок отличалась от дикого типа, однако, в 4 из этих 9 линий удаление Мср^S не приводило к потемнению щетинок, что говорит о репрессии, не связанной с Мср. Таким образом, Мср^S сам по себе не способен вызывать подавление экспрессии *yellow* в щетинках, то есть в данной модельной системе не функционирует как репрессор.

Тогда мы решили выяснить, будет ли иметь значение присоединение инсуляторов Мср³⁴⁰, Мср²¹⁰, либо фрагмента Мср¹⁵¹ к 138 пн сайленсеру. С этой целью мы проанализировали фенотип производных линий конструкций $E_{ye}(E)M^{340S}Y(\Delta)W$, $E_{ye}(E)M^{210S}Y(\Delta)W$ и $E_{ye}(E)M^{151S}Y(\Delta)W$, из которых был удален Мср⁷⁵⁵. Оказалось, что в положении -893, Мср^{340S} репрессировал *yellow* в щетинках больше, чем в половине случаев, а Мср^{210S} – почти во всех (таблица 7 б, в). Элемент Мср^{151S}, также как и изолированный 138 пн сайленсер, практически не подавлял экспрессию в щетинках. Исходя из вышеизложенных данных, вытекает, что для эффективной работы сайленсера необходим минимальный инсулятор (элемент Мср²¹⁰).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1 Идентификация инсулятора в составе Мср

Мы идентифицировали в составе Мср инсулятор размером 210 пн, который эффективно блокирует энхансеры гена *white*, но слабо – энхансеры гена *yellow* (рис. 3). В настоящее время механизм инсуляции неизвестен, но очевидно, что прилежащие к минимальному 210 пн инсулятору последовательности способны повышать инсуляторную активность. Так Мср³⁴⁰ более эффективно блокирует взаимодействия энхансера и промотора гена *yellow* и более эффективно защищает промоторы от репрессирующего действия PRE. Наличие последовательности, содержащей GAGA фактор (элемент Мср⁴¹²), делает этот инсуляторный комплекс еще более сильным. Ранее было показано, что GAGA фактор является необходимым компонентом ряда инсуляторов, в том числе Fab-7 (Belozarov et al. 2003, Schweinsberg et al. 2004). Известно, что GAGA фактор привлекает белковые комплексы, которые облегчают связывание других транскрипционных факторов с рядом расположенными регуляторными участками (Orlando et al.,

1998; Tsukiyama et al., 1994). Можно предположить, что GAGA фактор облегчает связывание белков с последовательностями инсулятора, а это приводит к увеличению инсуляторной активности.

2 Минимальный инсулятор Mср²¹⁰ необходим для эффективного функционирования сайленсера

Обращает на себя внимание факт, что PRE и последовательности, усиливающие репрессию, в отсутствие инсулятора теряют способность подавлять транскрипцию. Анализируя наши данные и данные, полученные ранее (Muller et al., 1999), можно сделать вывод, что для эффективного функционирования PRE, необходимо наличие инсулятора. Одним из объяснений этого факта является модель кооперативного связывания белков инсулятора и PRE: белки инсулятора способствуют формированию открытого хроматина на рядом расположенных последовательностях PRE, что повышает эффективность рекрутирования репрессивных комплексов. Также возможно, это связано со способностью инсулятора осуществлять *транс*-взаимодействия и подтягивать сайленсер в определенные зоны ядра, тем самым, стабилизируя репрессию.

3 Изолирующая и барьерная функция инсулятора Mсз³⁴⁰ разделены

В некоторых случаях добавление к Mср²¹⁰ (или к Mср³⁴⁰) 138 пн сайленсера, одновременно с усилением способности PRE подавлять энхансер, расположенный ниже (со стороны сайленсера) ослабляло способность Mср инсулятора изолировать промотор от энхансеров, расположенных выше, т.е., наблюдалась восстановление активности энхансеров в стимуляции промоторов *yellow* и *white*. При этом энхансеры, расположенные выше Mср инсулятора были экранированы от действия сайленсера. Это наводит на мысль, что функции инсуляции, то есть, изоляции энхансера от промотора, и барьерная функция, предотвращающая распространение репрессивных факторов, в составе инсулятора разделены. Аналогичным примером разделения активностей является 5'HS4 инсулятор, который находится на границе куриного β -глобинового локуса. В этом инсуляторе энхансер блокирующие функции связаны с сайтами связывания белка CTCF, тогда как барьерные зависят от остальной части 250 пн инсулятора, с которой связывается белок USF (West et al., 2002; Recillas-Targa et al., 2002). Предполагается, что USF привлекает белковые комплексы, которые создают на нуклеосомах код соответствующий активному хроматину. Можно предположить, что с элементом Mср²¹⁰, барьерная функция которого, выражена слабо, связываются белки инсулятора, а с рядом расположенными последовательностями (Mср¹⁵¹) связываются белки, которые рекрутируют модифицирующие комплексы, о чем свидетельствует усиление барьерной функции Mср³⁴⁰ (рис.3). Таким образом, функционирование и барьерных белков, и сайленсера зависит от наличия инсулятора Mср²¹⁰. Вероятно, рекрутирующиеся на PRE белки взаимодействуют с белками элемента Mср²¹⁰, отвечающими за инсуляцию, и вследствие этого, нивелируется энхансер

блокирующая функция, но при этом барьерная функция сохраняется. Таким образом, получается, что прилегающие последовательности модулируют инсуляторные функции Mcr^{210} , а элемент Mcr^{210} является основой для функционирования окружающих элементов (рис. 3)

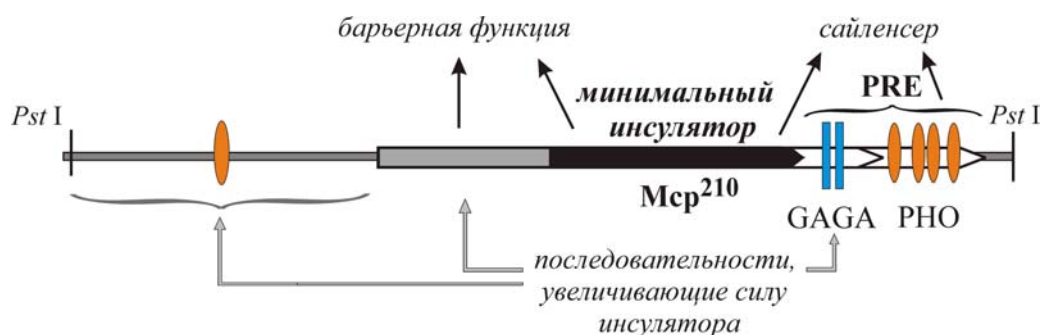


Рисунок 3. Карта функциональных элементов границы Mcr.

4 Создание модельной системы с использованием дрожжевого GAL4 активатора для проверки способности регуляторных элементов взаимодействовать на больших дистанциях

Как было показано, дрожжевые энхансеры (UAS) менее гибки и расположены поблизости от регулируемых промоторов, в отличие от энхансеров высших эукариот, и не работают на расстоянии более 1200 пн от промотора (De Bruin et al. 2001, Guarente et al. 1984, Struhl et al. 1984). Однако существует целый класс белков, облегчающих энхансер-промоторные взаимодействия, и наличие по соседству элементов, связывающих эти белки, способствует перемещению UAS в непосредственную близость к промотору, несмотря на большие расстояния (Petraschek et al., 2005; Mahmoudi et al., 2002; Su et al., 1991). Мы показали, что в *Drosophila* GAL4 активатор не способен активировать промотор гена *white*, будучи отделен от него геном *yellow*, т.е. расположен на расстоянии 5 тпн.

5 Две копии Mcr инсулятора взаимодействуют в ориентационно-зависимой манере и эта способность зависит от инсулятора Mcr^{210}

Изучение Mcr (Muller et al., 1999, Vazquez et al., 2006), Fab-7 (Bantignies et al., 2003), Fab-8 (Zhou et al., 1999) показало, что все эти элементы, расположенные в трансгенах, способны приближаться к своим копиям, находящимся в геноме. Нами было обнаружено, что за подобные взаимодействия элемента Mcr отвечает минимальный инсулятор Mcr^{210} , так как делеция именно этого элемента из состава Mcr приводила к неспособности к функциональному взаимодействию двух Mcr и активации гена *white*.

Взаимодействующие Mcr элементы способствуют сближению GAL4 и *white*, с выпетливанием участка ДНК. Неожиданно оказалось, что ориентация элементов относительно друг друга имеет принципиальное значение для регуляции активности гена, так как в зависимости от образующейся формы петли, происходит либо активация, либо изоляция промотора *white*. То

есть, если Mсp элементы находятся в противоположных ориентациях и при этом GAL4 активатор находится снаружи, либо Mсp элементы находятся в одной ориентации, а GAL4 активатор располагается между ними (близко к проксимальному), то создается петля, стерически устанавливающая GAL4 активатор напротив промотора *white* (рис. 14 а). И наоборот, если Mсp элементы находятся в одной ориентации и при этом GAL4 активатор находится снаружи, либо Mсp элементы находятся в противоположных ориентациях, а GAL4 активатор располагается между ними, то создается петля, стерически изолирующая GAL4 активатор от промотора *white* (рис. 14 б). Такое ориентационно зависимое взаимодействие может быть объяснено связыванием, по меньшей мере, двух белков с последовательностью в составе Mсp²¹⁰.

Подобный результат был получен и на модельной системе глазной энхансер – *white* промотор, между которыми находится ген *yellow*. В данной модельной системе для активации гена *white* использовался энхансер, который имеет собственную систему обеспечения коммуникации с промотором, но взаимодействие Mсp элементов корректирует энхансер-промоторные взаимоотношения, делая их либо более стабильными, либо изолируя энхансер от промотора, в зависимости от ориентации элементов Mсp по отношению друг к другу.

4.3 Модель регуляции *Abd-B* гена

Исходя из полученных нами результатов и данных литературы, становится очевидна принципиально важная роль инсуляторов в составе границ, разделяющих *iab* домены, в регуляции экспрессии *Abd-B* гена. Границы Mсp, Fab-7 и Fab-8 содержат в своем составе инсуляторы (Schweinsberg et al., 2004; Barges et al., 2000; Zhou et al., 1999), которые способны осуществлять *транс*-взаимодействия со своими копиями в геноме (Muller et al., 1999; Bantignies et al., 2003). Можно предположить, что инсуляторы в составе этих границ способны взаимодействовать и друг с другом, а прилегающий PRE/TRE контролирует эту способность, в зависимости от комплекса белков, который связался с ним в конкретном парасегменте. В соответствии с этим нами была предложена модель, согласно которой границы гена *Abd-B* физически взаимодействуют друг с другом и с предпромоторной областью, в результате чего их инсуляторная активность нейтрализуется, и *iab* энхансер, находящийся внутри активной петли, может свободно активировать промотор *Abd-B* гена. Одновременно взаимодействие между соседними граничными элементами может эффективно защищать *iab* энхансеры, изолируя их от окружающих зарепрессированных элементов (рис. 4). Недавно с помощью Dam метилирования было показано, что граница Fab-7 сближается с промотором *Abd-Bm* (Cleard et al., 2006). Интересно, что это взаимодействие максимально эффективно в тканях, в которых *Abd-B* не экспрессируется, и практически не детектируется в брюшке, где *Abd-B* активен. Опираясь на нашу гипотезу, эти данные могут быть объяснены тем, что в тканях, где *Abd-B* не экспрессируется, все границы взаимодействуют друг с другом и с предпромоторной областью (это отражается в формировании

четкого сигнала метилирования). Однако в брюшке в каждом сегменте с предпромоторной областью взаимодействует только определенная граница, и Fab-7 приближается к промоторной области только в А6, поэтому сигнал метилирования размыт. К сожалению, в этом эксперименте не проверялось, приближается ли Fab-7 к другим границам в составе VХ-С. Однако недавно нами были получены данные о том что, действительно границы Fab-7 и Fab-8 способны взаимодействовать друг с другом (неопубликованные данные).

Можно представить, что запуск работы *Abd-Bm* происходит следующим образом. Как известно, позиционный сигнал представляет собой набор активаторов и репрессоров в определенной точке эмбриона, в том числе белки, связывающиеся с последовательностями энхансеров в том или ином *iab* домене. Связавшись с энхансером, специфичный активатор предотвращает связывание репрессоров и рекрутирует белки группы *trx*, которые, в свою очередь, активируют инсулятор в составе границ. Активированный инсулятор начинает взаимодействовать с предпромоторной областью, подтягивая энхансер к промотору *Abd-Bm*, и одновременно изолирует активный домен от расположенных ниже репрессированных доменов. В отсутствие специфического активатора, в область *iab* домена рекрутируются белки группы *Pc*, которые, связываясь с последовательностями *PRE*, переключают работу инсулятора на поддержание стабильной репрессии. При этом инсулятор теряет способность взаимодействовать с промоторной областью *Abd-B* гена, но сохраняет свою барьерную функцию, защищая активный *iab* домен.

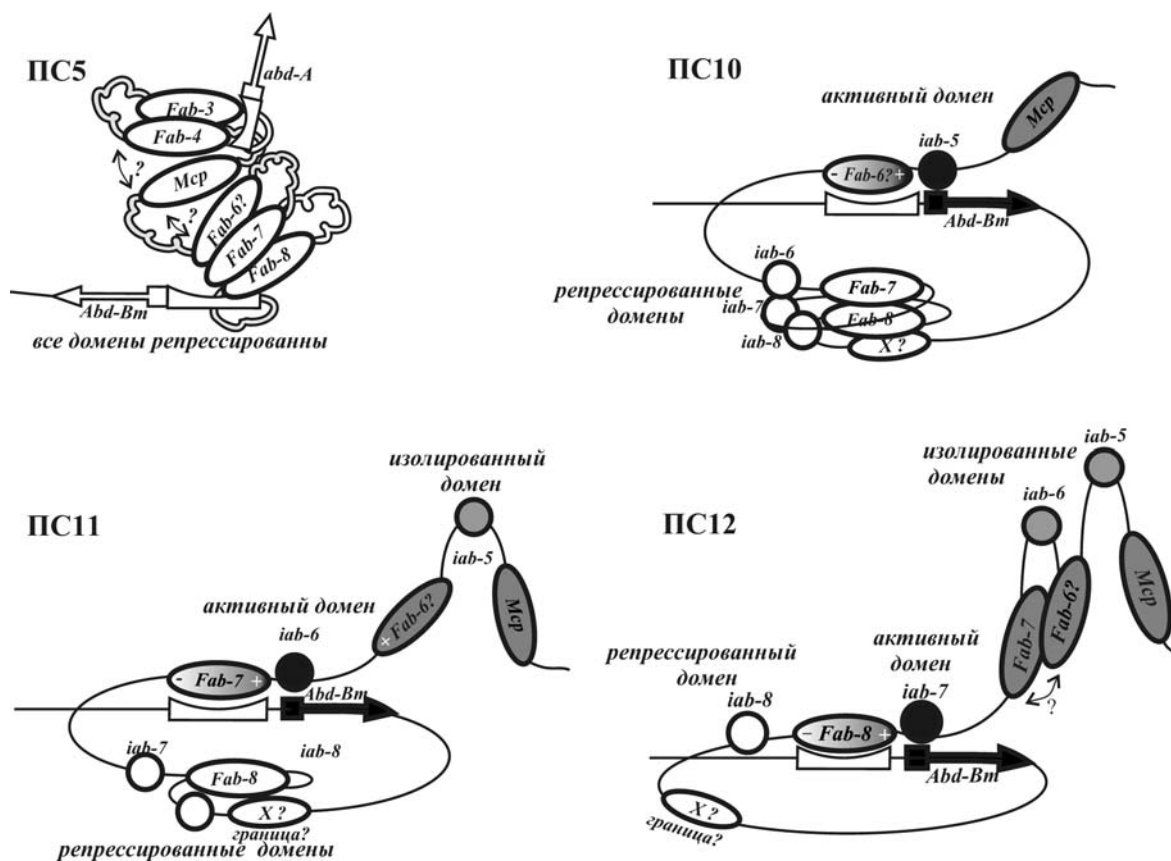


Рисунок 4. Модель регуляции экспрессии *Abd-Bm* в различных парасегментах.

Выводы

1. В составе Mср идентифицирован минимальный 210 пн инсулятор. Показано, что последовательности окружающие минимальный инсулятор усиливают его способность блокировать изолированные энхансеры.
2. Показано, что функциональное взаимодействие между двумя элементами Mср зависит от инсулятора Mср²¹⁰. Впервые продемонстрировано, что взаимная ориентация взаимодействующих инсуляторов определяет способность энхансера стимулировать промотор.
3. Продемонстрировано, что инсуляторные и барьерные функции 340 пн Mср элемента разделены.
4. Выявлена функциональная взаимозависимость инсулятора и сайленсера в составе Mср элемента
5. Разработана новая модельная система на основе GAL4 активатора, генов *yellow* и *white*, для изучения способности регуляторных элементов взаимодействовать друг с другом на больших дистанциях.

Список работ опубликованных по теме диссертации:

1. Gruzdeva N, Kyrchanova O, Parshikov A, Kullyev A, Georgiev P. The Mср element from the *bithorax* complex contains an insulator that is capable of pairwise interactions and can facilitate enhancer-promoter communication // Mol Cell Biol. 2005, V. 25. P. 3682-3689.
2. Kyrchanova O, Toshchakov S, Parshikov A, Georgiev P. Study of the functional interaction between Mср insulators from the *Drosophila bithorax* complex: effects of insulator pairing on the enhancer-promoter communication. // Mol Cell Biol. 2007, Feb 5; [Epub ahead of print]
3. N.M. Gruzdeva, A.P. Kullyev, O.V. Kyrchanova, P.G. Georgiev // Mechanisms of Long-Distance Enhancer-Promoter Interactions in the *Abdominal-B* Gene (3.E.0328), - Genetics, XIX international congress of genetics "Genomes – the Linkage to Life", Melbourne, 6-11 July 2003, p. 177.
4. N.M. Gruzdeva, A.P. Kullyev, O.V. Kyrchanova, P.G. Georgiev // The Interaction Between the Regulatory Elements May Facilitate Enhancer – Promoter Interaction in the *Abdominal-B* Gene, - Molecular & Cellular Proteomics, XIX World Congress, Montreal, September 2003, Vol. 2, No. 9, p.900.
5. N.M. Gruzdeva, A.P. Kullyev, O.V. Kyrchanova, P.G. Georgiev // The Interaction Between the Regulatory Elements Can Modulate Enhancer – Promoter Interaction in the *Abdominal-B* Gene, - Conference for young scientists on molecular biology and genetics, Kyiv, 25-27 September, 2003, p.65.

- 6.N.M. Gruzdeva, A.P. Kullyev, O.V. Kyrchanova, P.G. Georgiev //Mcp element from the *Abdominal-B* gene can participate in long distance enhancer-promoter interactions, - Advances in Molecular Cell Biology, Moscow, 17-18 June, 2004, p.26.
- 7.Родин С.А., Кырчанова О.В., Георгиев П.Г. // Изучение структуры регуляторного элемента Fab-7 и его роли в пространственной организации хроматина внутри ядра, - III съезд биофизиков России, Воронеж, 24-29 июня 2004, стр.164.
- 8.Родин С.А., Кырчанова О.В., Георгиев П.Г. // Белки группы Polycomb влияют на инсуляторную функцию регуляторного элемента Fab-7. Тезисы стендовых сообщений 9-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 18-22 апреля 2005).