

На правах рукописи
УДК 575.22:595.773.4

КРИВЕГА ИВАН ВАЛЕРЬЕВИЧ

Изучение нового семейства генов *su(mg)* у *Drosophila melanogaster*.

03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2007

Работа выполнена в группе «Молекулярной генетики дрозофилы» Института биологии гена РАН.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Головнин Антон Клеменович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Глазков Михаил Васильевич

кандидат биологических наук Краснов Алексей Николаевич

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН.

Защита диссертации состоится _ 2007 года, в _ часов на заседании Диссертационного совета _ 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: 119334, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан: ____ 2007 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Экспрессия гена регулируется при помощи различных цис- и транс-регуляторных элементов. К цис-регуляторным элементам относятся последовательности ДНК, непосредственно прилежащие к генам, так называемые промоторы, и дистально расположенные энхансеры и сайленсеры. Большинство энхансеров не обладает специфичностью по отношению к промоторам, следовательно должна существовать система, ограничивающая активность энхансера только «правильным» промотором. Предполагается, что в функционировании данной системы значительную роль могут играть инсуляторы. Инсулятор представляет собой последовательность ДНК, которая, находясь между энхансером и промотором, ограничивает их взаимодействие. Таким образом, инсуляторы выполняют важную функцию регуляции транскрипции, определяя какой энхансер должен активировать данный промотор.

На настоящий момент механизм действия инсуляторов полностью не изучен. Существует несколько моделей их функционирования, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки, но практически все они предполагают связь работы инсулятора с ядерной периферией и белками ядерного матрикса. К сожалению, до сих пор не выявлены конкретные белки, входящие в эти ядерные структуры и одновременно влияющие на работу инсулятора. Это направление исследований представляет большой интерес, так как рассматривает инсуляцию как составную часть глобального процесса регуляции транскрипции в ядре в целом. Выяснение функциональных связей между процессом инсуляции и белками ядерного матрикса позволит понять роль инсуляторов в образовании различных областей ядра: с повышенной и пониженной активностью транскрипции.

В представленной работе было продолжено изучение широко известного Su(Hw)-зависимого инсулятора, впервые обнаруженного в последовательности ретротранспозона *МДГ4* у *Drosophila melanogaster*. Известно, что инсулятор Su(Hw) способен блокировать более 30 известных энхансеров, работающих в разных тканях и на разных этапах развития. Белковый комплекс инсулятора Su(Hw) состоит из трех известных на данный момент белков: связывающегося с ДНК белка Su(Hw), белка Mod(mdg4) и недавно открытого белка CP190. Мутация в гене *mod(mdg4)* нарушает связывание кодируемого им белка Mod(mdg4) с инсуляторным комплексом. Отсутствие белка Mod(mdg4) приводит к нарушению инсуляции в различных модельных системах. Недавно в нашей лаборатории была обнаружена группа генов *su(mg)* (suppressor of *mod(mdg4)*), мутации в которых

приводили к восстановлению Su(Hw)-зависимой инсуляции даже при отсутствии белка Mod(mdg4)67.2. Один из клонированных генов группы *su(mg)* кодирует белок EAST, который, как предполагается, является компонентом ядерного матрикса. Изучение свойств и функций этого белка позволит более детально понять связь между инсуляцией, ядерным матриксом и транскрипцией.

Цель и задачи исследования

Основной целью данной работы является изучение структуры и функций гена из семейства *su(mg)*, который кодирует белок EAST.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Изучить генетические взаимодействия между геном *east* и генами, кодирующими белки, входящие в состав инсуляторного комплекса Su(Hw).
2. Найти в составе ретротранспозона *МДГ4* последовательность, отвечающую за проявление эффектов гена *east*.
3. Доказать существование молекулярных взаимодействий между белками EAST, CP60 и белками инсуляторного комплекса.

Научная новизна и практическая ценность работы. В представленной работе впервые было продемонстрировано непосредственное участие в составе инсуляторного комплекса белка CP60, который считается компонентом ядерного матрикса. Впервые было показано прямое взаимодействие белков CP60 и EAST, при этом белок EAST является также одним из возможных компонентов ядерного матрикса.

Также было показано, что для проявления эффектов гена *east* в изучаемой модельной системе, необходимы последовательности инсулятора Su(Hw) и длинного концевой повтора из ретротранспозона МДГ4.

Полученные генетические данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что белок EAST является компонентом неизвестной ранее системы репрессии генов, находящихся в эухроматиновых районах генома.

Таким образом, в представленной работе впервые было показано наличие функциональных и физических взаимодействий между белками инсуляторного комплекса и белками, предположительно входящими в состав ядерного матрикса, - EAST и CP60.

Полученные в данной работе результаты позволяют лучше понять организацию транскрипции в ядре в целом и выявить области ядра с разным уровнем генной активности, что может быть полезно для создания стабильно экспрессирующих продуцентов.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции "Nuclear Structure & Dynamics" (Монпелье, Франция, 2007) и на 10-ой школе-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2006).

Публикации

По теме диссертации опубликованы две научные статьи и тезисы, представленные на двух конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на ___ страницах, включает ___ таблиц и 25 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, содержащего 250 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучение влияния гена *east* на функционирование инсулятора в системе аллеля y^2

Ранее были обнаружены две слабые мутации в гене *east*, относящиеся к семейству генов *su(mg)*: $east^{P1}$ и $east^{P2}$ (Bezborodova et al., 1997). Эти мутации вызваны встраиванием *P*-элемента в промоторную область гена и приводят к незначительному снижению уровня экспрессии.

Для изучения того, как ген *east* влияет на функционирование Su(Hw) инсулятора, были получены две линии *Drosophila melanogaster*. В линии $y\ east^{P1}\ w$, где гены *yellow* и *white* были полностью инактивированы, концентрация белка EAST снижалась благодаря наличию мутации. В другой линии $yw; P\{east^+\}; w\}/CyO; P\{east^+\}; w\}/TM6, Tb$, где гены *yellow* и *white* также были инактивированы, концентрация белка EAST значительно возрастала из-за присутствия конструкции, содержащей геномную последовательность гена *east*.

В качестве модельной системы для изучения участия белка EAST в инсуляции была использован аллель y^2 . Мутация y^2 вызвана встраиванием ретротранспозона *МДГ4* между энхансерами, отвечающими за экспрессию гена *yellow* в теле и крыльях, и промотором этого гена. В результате мухи имеют желтое тело и крылья, так как входящий в состав *МДГ4* инсулятор Su(Hw) блокирует взаимодействие между энхансерами и промотором

гена. Однако экспрессия гена *yellow* в щетинках не нарушена, поскольку соответствующий энхансер находится в интроне гена и не блокирован инсулятором. Поэтому у мух фенотипа y^2 щетинки полностью окрашены.

Скрещивание линии y^2 с линией $y^{east^{P1}}$ не влияет на экспрессию гена *yellow*. Однако при введении одной или двух дополнительных копий гена *east* в линию y^2 наблюдается почти полная репрессия гена *yellow* в щетинках. Эффект гиперэкспрессии гена *east* не проявляется на диком аллеле y^+ . Таким образом последовательность ретротранспозона *МДГ4* необходима для проявления эффектов гена *east*.

Мутация $mod(mdg4)^{u1}$ нарушает связывание белка Mod(mdg4)67.2, одного из компонентов инсуляторного комплекса, с инсулятором Su(Hw). В линии $y^2; mod(mdg4)^{u1}/mod(mdg4)^{u1}$ наблюдается почти полная репрессия гена *yellow* в щетинках мух и частичное снятие инсуляции в абдоминальных сегментах брюшка (Georgiev and Kozycina, 1996). Дестабилизация инсуляторного комплекса на фоне мутации $mod(mdg4)^{u1}$ превращает аллель y^2 в чувствительную тест-систему, позволяющую генетическими методами обнаруживать белки, влияющие на работу инсулятора Su(Hw).

Комбинация мутации $east^{P1}$ и $mod(mdg4)^{u1}$ на фоне аллеля y^2 приводит к восстановлению экспрессии гена *yellow* в щетинках и абдоминальных сегментах брюшка. Гиперэкспрессия гена *east*, совмещенная с мутацией $mod(mdg4)^{u1}$, на фоне аллеля y^2 приводит к почти полной репрессии гена *yellow* – абдоминальные сегменты брюшка и щетинки не окрашены. Для подтверждения функциональности линии $yw; P\{east+; w\}/CyO; P\{east+; w\}/TM6, Tb$ был проведен эксперимент по «спасению фенотипа». Одновременное сочетание мутации $east^{P1}$ и гиперэкспрессии гена *east* в линии $y^2; mod(mdg4)^{u1}/mod(mdg4)^{u1}$ приводило к репрессии гена *yellow* в щетинках и вариабельной окраске брюшка. Таким образом, мутация $east^{P1}$ и гиперэкспрессия гена *east* компенсируют эффект друг друга, что говорит о функциональности линии $yw; P\{east+; w\}/CyO; P\{east+; w\}/TM6, Tb$.

2. Определение последовательности, ответственной за проявление EAST-зависимой репрессии

Чтобы выяснить, будет ли увеличение количества последовательностей ретротранспозона *МДГ4* в предпромоторной области гена *yellow* приводить к усилению EAST-зависимой репрессии, в следующей серии экспериментов были использованы описанные ранее производные аллеля y^2 , названные y^{TD} (Melnikova and Georgiev, 2002). Данные аллели несут терминальные обрывы хромосомы непосредственно в зоне энхансеров, контролирующих экспрессию гена *yellow* в теле и крыльях, дистальнее

ретротранспозона *МДГ4*. Увеличение концентрации белка EAST не влияет на экспрессию аллеля y^{TD} , который содержит только одну копию ретротранспозона *МДГ4*. При увеличении количества копий *МДГ4* в аллелях y^{TD} эффект действия лишних копий гена *east* на экспрессию *yellow* в щетинках становился все сильнее. В линиях, содержащих 2 копии ретротранспозона *МДГ4*, наблюдалась частичная репрессия, то есть только часть щетинок не была окрашена. Тогда как в линиях, содержащих 4-5 копий ретротранспозона *МДГ4*, экспрессия гена *yellow* в щетинках была полностью подавлена – все щетинки у мух были неокрашены и, кроме того, наблюдалась слабая репрессия в теле и крыльях (табл.1).

Название аллеля	Степень пигментации кутикулярных структур при нормальном уровне экспрессии гена <i>east</i>		Степень пигментации кутикулярных структур при введении 1 копии трансгена $P\{east+; w\}$		Степень пигментации кутикулярных структур при введении 2 копий трансгена $P\{east+; w\}$	
	Т/А/Кр	Щ	Т/А/Кр	Щ	Т/А/Кр	Щ
y^2	2/2/2	5	2/2/2	ev	2/2/2	1
y^{TD} (1 копия <i>МДГ4</i>)	2/2/2	5	2/2/2	5	2/2/2	5
y^{TD} (2 копии <i>МДГ4</i>)	4/4/4	5	4/4/4	wv	4/4/4	mv
y^{TD} (4-5 копий <i>МДГ4</i>)	4/5/5	5	4/5/5	ev	3/5/4	1

Таблица 1. Анализ влияния гиперэкспрессии гена *east* на y^{TD} аллели. В аллелях y^{TD} в скобках указано количество копий *МДГ4* в изучаемой линии. Обозначения: Т-тело, А-абдоминальные сегменты. Кр-крылья, Щ-щетинки. Пигментация щетинок: 1-все щетинки неокрашены, ev-большая часть щетинок не окрашена, mv-количество окрашенных и неокрашенных щетинок примерно одинаково, wv-большая часть щетинок окрашена, 5- все щетинки окрашены. Пигментации тела, крыльев и абдоминальных сегментов оценивалась согласно работе Gause et al., 1998, где 1-нет окраски, 5-окраска как у дикого типа.

Данные результаты позволяют предположить, что в теломерных районах влияние гиперэкспрессии гена *east* на экспрессию гена *yellow* частично подавлено. Возможно теломерный белковый комплекс нейтрализует действие белка EAST. Возрастание количества копий ретротранспозона *МДГ4* в линиях, несущих аллель y^{TD} , приводит к увеличению расстояния между теломерным комплексом и промотором гена *yellow* и усилению репрессии. Поэтому y^{TD} линии, содержащие несколько копий ретротранспозона *МДГ4*, наиболее чувствительны к изменению концентрации белка EAST.

Полученные результаты подтверждают вывод о том, что для проявления эффекта гена *east* в системе аллеля y^2 необходимо присутствие последовательности ретротранспозона *МДГ4*. Исходя из генетических взаимодействий, можно предположить, что белок EAST действует как репрессор на экспрессию аллеля y^2 .

Для выявления последовательности *МДГ4*, необходимой для EAST-зависимой репрессии, были использованы описанные ранее частичные или полные ревертанты аллеля y^2 (Georgiev et al., 1990) (рис.1).

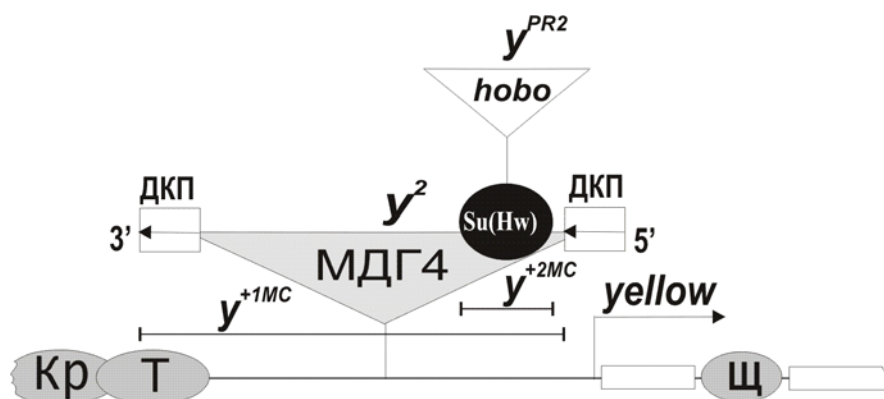


Рисунок 1. Схематичное изображение аллелей гена *yellow*, в которых присутствуют различные последовательности ретротранспозона *МДГ4*. Обозначения: стрелка - направление транскрипции гена *yellow*; белые горизонтальные прямоугольники - экзоны гена; серые овалы - энхансеры, контролирующие экспрессию гена *yellow* в теле (Т), крыльях (К) и щетинках (Щ); черный овал - инсулятор *Su(Hw)*; отрезки - размер делеций в аллелях y^{+1MC} и y^{+2MC} .

В полном ревертанте y^{+1MC} , вследствие делеции в ретротранспозоне *МДГ4*, остается только один из его длинных концевых повторов (ДКП). Повышение концентрации белка EAST не влияло на экспрессию аллеля y^{+1MC} (табл.2). Поэтому можно предположить, что для EAST-зависимой репрессии необходимо более одной последовательности ДКП. В частичном ревертанте y^{PR2} мобильный элемент *hobo* встроился в последовательности инсулятора *Su(Hw)*, что привело к его частичной инактивации, при этом другие последовательности *МДГ4* остались неизменными (рис.1) (Geyer et al., 1988). Совмещение аллеля y^{PR2} с двумя дополнительными копиями гена *east* привело к полной инактивации гена *yellow* в щетинках и восстановлению репрессии в теле и крыльях (табл.2). Таким образом, увеличение концентрации белка EAST влияет на экспрессию гена *yellow* во всех кутикулярных структурах. В полном ревертанте y^{+2MC} встраивание мобильного элемента *jockey* в последовательность *МДГ4* привело к полной делеции последовательностей инсулятора, в то же время другие последовательности *МДГ4* были сохранены (рис.1). Увеличение концентрации белка EAST приводило к полной репрессии гена *yellow* в щетинках и слабой репрессии в теле и крыльях (табл.2). Исходя из структуры использованных аллелей можно предположить, что за эффект репрессии отвечают первые 500 нуклеотидов последовательности длинного концевой повтора (ДКП) *МДГ4*, оставшаяся в аллеле y^{+2MC} (координаты согласно Marlor et al., 1986).

Название аллеля	Степень пигментации кутикулярных структур при нормальном уровне экспрессии гена <i>east</i>		Степень пигментации кутикулярных структур при введении 1 копии трансгена $P\{east;w\}$		Степень пигментации кутикулярных структур при введении 2 копий трансгена $P\{east;w\}$	
	Т/А/Кр	Щ	Т/А/Кр	Щ	Т/А/Кр	Щ
y^2	2/2/2	5	2/2/2	ev	2/2/2	1
y^{+1MC}	2/2/2	5	2/2/2	5	2/2/2	5
y^{PR2}	3/3/3	5	3/3/3	ev	2/2/2	1
y^{+2MC}	5/5/5	5	5/5/5	ev	5/5/5	1

Таблица 2. Анализ влияния гиперэкспрессии гена *east* на ревертанты аллеля y^2 . Обозначения так же, как в таблице 1.

Согласно изложенным выше данным, гиперэкспрессия гена *east*, совмещенная с мутацией $mod(mdg4)^{ul}$ приводит к почти полной репрессии гена *yellow* в аллеле y^2 . Следовательно, наблюдаемый эффект зависит от присутствия белка Mod(mdg4)67.2, участвующего в формировании инсуляторного комплекса Su(Hw). Ранее было показано, что мутация $mod(mdg4)^{ul}$ никак не влияла на экспрессию y^{+2MC} аллеля, что говорит о взаимодействии белка Mod(mdg4)67.2 только с последовательностью инсулятора в составе МДГ4 (Georgiev and Corces, 1995). Таким образом, белок EAST оказывает влияние на функционирование инсулятора при помощи двух последовательностей: инсулятора Su(Hw) и длинного концевого повтора (ДКП).

Для изучения влияния инсулятора Su(Hw) и ДКП на проявление EAST-зависимой репрессии была создана генетическая конструкция $P\{ДКП-Su;w^+\}$. В состав данной конструкции входили инсулятор Su(Hw), содержащий 12 сайтов связывания для белка Su(Hw), и ДКП, содержащий первые 500 нуклеотидов (Marlor et al., 1986). Данные последовательности были встроены между энхансерами, контролирующими экспрессию гена *yellow* в теле и крыльях, и промотором гена *yellow* (рис.2).

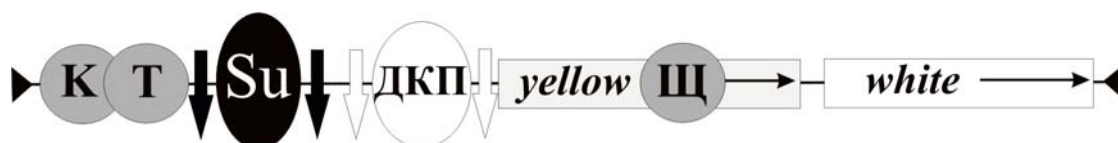


Рисунок 2. Схематичное изображение генетической конструкции $P\{ДКП-Su;w^+\}$. Обозначения: серые круги - энхансеры гена *yellow*, черный овал - последовательность инсулятора Su(Hw) (Su), белый овал - последовательность длинного концевого повтора (ДКП), горизонтальные прямоугольники - последовательности генов *yellow* и *white*, горизонтальные стрелки - направление транскрипции этих генов, черные вертикальные стрелки - сайты узнавания для FLP-рекомбиназы, белые вертикальные стрелки - сайты узнавания для CRE-рекомбиназы.

Данная генетическая конструкция была встроена в 17 различных районов генома *Drosophila melanogaster*. Все трансгенные линии имели максимально окрашенные щетинки. Удаление последовательности ДКП никак не влияло на экспрессию гена *yellow* в

щетинках. Введение гиперэкспрессии гена *east* приводило к подавлению экспрессии гена *yellow* в щетинках в половине трансгенных линиях (таб. 3), данный эффект зависел от наличия последовательности ДКП. Введение мутации $mod(mdg4)^{ul}$ приводило к подавлению экспрессии гена *yellow* в щетинках во всех трансгенных линиях. Репрессия ослаблялась при удалении последовательности ДКП.

Введение мутации $mod(mdg4)^{ul}$ одновременно с гиперэкспрессией гена *east* в трансгенные линии усиливало репрессивный эффект даже в отсутствие последовательности ДКП. Полученные данные говорят о том, что последовательность ДКП необходима для проявления EAST-зависимой репрессии и усиления эффекта мутации $mod(mdg4)^{ul}$. При этом на фоне мутации $mod(mdg4)^{ul}$ гиперэкспрессия гена *east* в отсутствие ДКП может оказывать репрессивный эффект через последовательность инсультатора Su(Hw).

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что белок EAST связан с белковыми комплексами, собирающимися на последовательностях инсультатора Su(Hw) и ДКП из ретротранспозона *МДГ4*.

Генотип исследуемых линий	$P\{ДКП\ SU;w\}$					$P\{\Delta ДКП\ SU;w\}$				
	1	ev	mv	wv	5	1	ev	mv	wv	5
+/+	0	0	0	0	17	0	0	0	0	17
$mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}$	15	1	0	1	0	7	2	4	1	3
$P\{east+; w\}$	3	1	3	2	8	0	0	0	5	12
$P\{east+; w\}; mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}$	16	1	1	0	0	14	1	2	0	0

Таблица 3. Анализ влияния гиперэкспрессии гена *east* на генетическую конструкцию $P\{ДКП-Su;w^+\}$. Обозначения: Δ - вырезание последовательности ДКП из конструкции. Окраска щетинок оценивалась так же, как и в таблице 1. Цифрами в таблице указано количество линий с соответствующей окраской щетинок.

3. Участие белков CP60 и EAST в функционировании инсультатора Su(Hw)

Полученные результаты позволяют предположить, что белок EAST регулирует активность инсультатора Su(Hw) в составе ретротранспозона *МДГ4*. Так как белок EAST в нормальных условиях не взаимодействует с хроматином (Wasser and Chia, 2007), должен существовать другой белок или белковый комплекс, обеспечивающий функциональную связь белка EAST с инсультатором Su(Hw).

Один из предполагаемых компонентов ядерного матрикса, белок CP60, колокализуется в ядре с белком EAST в межхромосомном пространстве и его локализация зависит от уровня экспрессии гена *east* (Wasser and Chia, 2000). Кроме того, было показано, что белок CP60 колокализуется в ядре с белком CP190, компонентом инсультатора Su(Hw)

При помощи упоминавшейся выше библиотеки кДНК, выделенной из линии *Drosophila melanogaster* Oregon, была получена последовательность, кодирующая белок EAST. Для того, чтобы доказать прямое взаимодействие между белками CP60 и EAST, были созданы конструкции для дрожжевой двугибридной системы. В результате было показано, что белок EAST способен взаимодействовать с белком CP60 своим С-концевым доменом. Таким образом, белок EAST может влиять на функционирование инсулятора Su(Hw) при помощи белка CP60.

3.2 Взаимодействие белка CP60 и инсулятора Su(Hw) *in vivo* в клетках линии S2.

Для изучения свойств белка CP60 были созданы конструкции, позволяющие экспрессировать данный белок с пришитым к нему FLAG-эпитопом в культуре клеток S2 и имагинальных дисках личинок *Drosophila melanogaster*.

С помощью метода X-ChIP на клетках линии S2 было проверено взаимодействие белка CP60-FLAG с инсуляторами, которые были использованы в предыдущем эксперименте и в исследованиях Parnell et al., 2006. В качестве контроля использовалось взаимодействие белка Mod(mdg4)67.2-FLAG с этими же инсуляторами. Согласно полученным данным, белок CP60 взаимодействует с последовательностями эндогенных инсуляторов, инсулятором из ретротранспозона *МДГ4 in vivo* и не взаимодействует с последовательностями из кодирующими белок части генов *actin* и *ras* (рис.4).

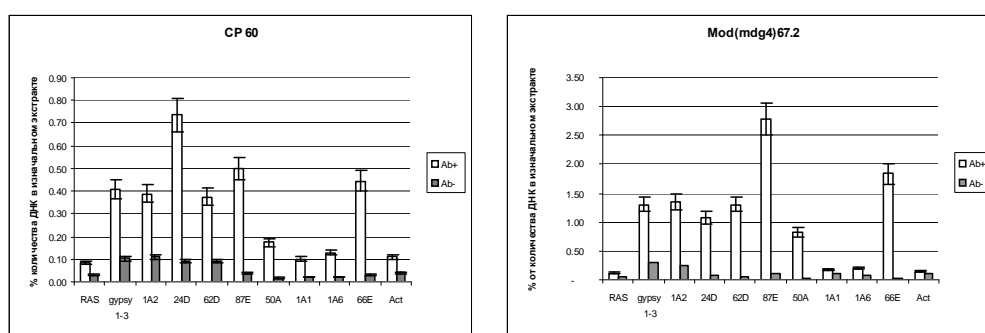


Рисунок 4. Результаты хроматиниммунопреципитация белков CP60-FLAG и Mod(mdg4)67.2-FLAG в клетках линии S2. Показан усредненный результат трех экспериментов. Результаты представлены в виде процентов от количества ДНК в изначальном клеточном экстракте. Белым цветом показаны результаты, получившиеся с антителами к эпитопу FLAG. Серым цветом указаны результаты, получившиеся с неспецифическими антителами. Обозначения: gypsy1-3 – последовательность инсулятора Su(Hw) из *МДГ4*; 1A2, 24D, 62D, 87E, 50A, 66E – последовательности эндогенных инсуляторов из соответствующих локусов (Parnell et al., 2006; Golovnin et al., 2003); 1A1, 1A6 – последовательности ДНК, не содержащие сайты связывания для белка Su(Hw); RAS - последовательность из гена *ras*, кодирующая белок; Act - последовательность из гена *actin*, кодирующая белок.

Чтобы подтвердить вхождение белка CP60 в состав инсуляторного комплекса, был проведен эксперимент по коиммунопреципитации белка CP60-FLAG и белка Mod(mdg4)67.2, входящего в состав инсулятора Su(Hw). Положительным контролем служила коиммунопреципитация белков Su(Hw)-FLAG и Mod(mdg4)67.2. Было установлено, что белки CP60-FLAG и Mod(mdg4)67.2 могут входить в состав одного

комплекса, что подтверждает участие белка CP60 в формировании инсуляторного комплекса Su(Hw) (рис.5).

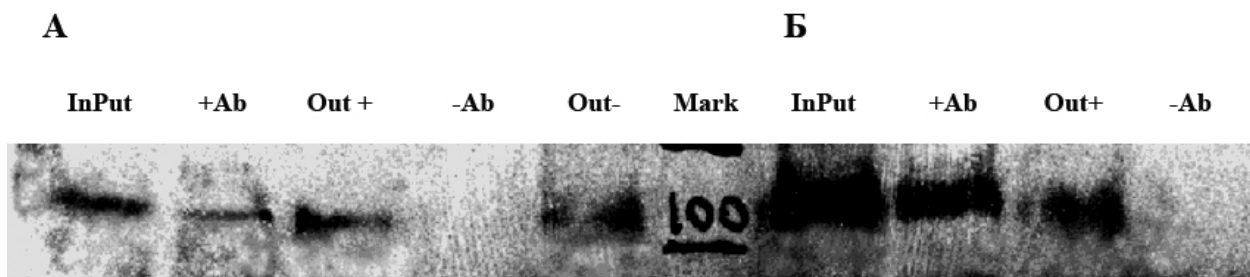


Рисунок 5. Результат коиммунопреципитации белков CP60FLAG и Mod(mdg4)67.2 (А) и белков Su(Hw)FLAG и Mod(mdg4)67.2 (Б). Обозначения: InPut – дорожка геля, на которую был нанесен клеточный экстракт, +Ab – дорожка с элюцией фракции ядерного экстракта, связавшегося с антителами к эпитопу FLAG, Out+ – дорожка с ядерным экстрактом, не связавшимся с антителами к эпитопу FLAG; -Ab – дорожка с элюцией фракции ядерного экстракта, связавшегося с неспецифическими антителами; Out- – дорожка с ядерным экстрактом, не связавшимся с неспецифическими антителами; Mark – дорожка с маркером молекулярной массой белков (изображена полоса соответствующая размеру 100 кДа).

3.3 Изучение свойств белка CP60 *in vivo* в клетках *Drosophila melanogaster*.

Участие белка CP60 в составе инсуляторного комплекса было также проверено с помощью окрашивания политенных хромосом клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster*. В результате было установлено, что многие сайты связывания для белков CP60-FLAG и Mod(mdg4)67.2 колокализуются на политенных хромосомах. Однако иногда встречаются локусы, где белок CP60-FLAG находится в районах, не содержащих белки Mod(mdg4)67.2, и наоборот, локусы, содержащие сайты связывания только для белка Mod(mdg4)67.2 (цветные фотография представлена в тексте диссертации). Таким образом, при помощи иммунного окрашивания политенных хромосом слюнных желез *Drosophila melanogaster* было показано, что белок CP60 ассоциирован с большинством сайтов связывания для белка Mod(mdg4)67.2 (цветные фотография представлена в тексте диссертации).

В ядре клетки инсуляторные белки Su(Hw), Mod(mdg4)67.2 и CP190 образуют большие комплексы, названные «инсуляторными тельцами» (Gerasimova et al. 2000; Pai et al. 2004). Предполагается, что «инсуляторные тельца» представляют собой совокупность инсуляторных комплексов, связанных с ДНК. Таким образом, участвующие в инсуляции белки должны колокализироваться в «инсуляторных тельцах» или влиять на их формирование. Поэтому была проверена локализация белка CP60-FLAG в клетках линии S2 и в клетках имагинальных дисков личинки *Drosophila melanogaster*. В результате было выяснено, что белок CP60FLAG в значительной степени, но не полностью, колокализуется с белком Mod(mdg4)67.2, который был использован в качестве маркера «инсуляторных тельца» (цветные фотография представлена в тексте диссертации).

Описанные выше результаты подтверждают участие белка CP60 в функционировании инсулятора Su(Hw).

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что изменение экспрессии генов *east* и *cp60* будет влиять на формирование белками Su(Hw) и Mod(mdg4)67.2 «инсуляторных телец» в ядрах клеток имагинальных дисков личинки *Drosophila melanogaster*. Увеличение (дополнительная копия трансгена, кодирующего белок CP60-FLAG) или уменьшение (введение мутации в гене *cp60* - *cp60^{D1}/+* в гетерозиготе) уровня экспрессии гена *cp60* не влияло на распределение белков Su(Hw) и Mod(mdg4)67.2 в ядрах клеток имагинальных дисков. Однако увеличение уровня экспрессии гена *east* (две копии конструкции *P{east+;w+}*) приводило к резкому снижению количества «инсуляторных телец» и перемещению оставшихся к ядерной оболочке. В то же время, частичная инактивация гена *east* в мухах, несущих мутацию *east^{P1}*, никак не влияла на распределение белков Su(Hw) и Mod(mdg4)67.2 в ядрах клеток имагинальных дисков. Данные результаты указывают на взаимосвязь уровня экспрессии гена *east* с формированием и распределением «инсуляторных телец», образованных белками инсуляторного комплекса (цветные фотография представлена в тексте диссертации).

3.4 Функциональное взаимодействие между белками CP60 и EAST и белками инсуляторного комплекса. Для изучения функционального взаимодействия между белками инсуляторного комплекса и белками CP60 и EAST был проведен ряд генетических скрещиваний между линиями мух, несущими мутации или дополнительные копии исследуемых генов. В качестве модельной системы использовался аллель *y²*. Прежде всего, было проанализировано взаимодействие гена *east* с геном *cp190*, кодирующим один из белковых компонентов инсуляторного комплекса (Pai et al., 2004). Мутация в гене *cp190* - *cp³* связана с нарушением рамки считывания, в результате получается укороченный нефункциональный белок. Одна или две дополнительные копии гена *east* приводят к почти полному подавлению экспрессии гена *yellow* в щетинках мух, а дополнительное введение мутации *cp³* в гетерозиготе усиливает наблюдаемую репрессивную активность. При совместной гиперэкспрессии генов *cp190* и *east* наблюдался обратный эффект: полное восстановление транскрипции гена *yellow* в щетинках.

Затем для выявления взаимодействий между белками CP60 и EAST были проведены скрещивания, приводящие к совмещению дополнительной копии гена *east* и мутации в гене *cp60* - *cp60^{A1}*. Было установлено, что мутация *cp60^{A1}* усиливает репрессивный эффект *east*, что говорит о наличии взаимодействия между этими генами.

Мутации в генах *cp190* (*cp³*), *cp60* (*cp60^{Δ1}*) и *east* (*east^{P1}*) влияли на выживаемость мух. Совмещение мутаций *cp³* и *east^{P1}* приводило к значительному снижению выживаемости мух. Совмещение мутаций в генах *cp60^{Δ1}* и *east^{P1}*, напротив, увеличивало выживаемость мух. Эти данные говорят о совместном влиянии изучаемых генов на развитие организма.

Для изучения взаимодействий между генами *cp60*, *east* и *mod(mdg4)* была создана генетическая конструкция $P\{E-Su;w^+\}$. Данная конструкция содержала ген *yellow* и инсулятор Su(Hw), встроенный между энхансерами, контролирующими экспрессию в теле и крыльях и промотором гена *yellow* (рис.6).

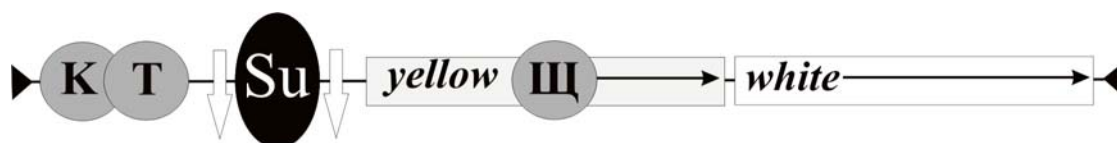


Рисунок 6. Схематичное изображение генетической конструкции $P\{E-Su;w^+\}$. Обозначения такие же, как на рисунке 2.

Данная генетическая конструкция была встроена в 15 различных районов генома *Drosophila melanogaster*. В 9 из 15 полученных линий инсулятор частично или полностью репрессировал экспрессию гена *yellow* в щетинках на фоне мутации *mod(mdg4)^{ul}*. Репрессия зависела от присутствия последовательности инсулятора Su(Hw). В трансгенных линиях *east^{P1}*; *mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}* уровень экспрессии гена *yellow* в щетинках частично восстанавливался. Гиперэкспрессия гена *east*, напротив, усиливала репрессивный эффект мутации *mod(mdg4)^{ul}*, но только в линиях, где наблюдалась частичная репрессия в щетинках (табл.4). Данные результаты аналогичны полученным в системе аллеля *y²*.

Генотип исследуемых линий	Окраска щетинок			
	5	var	1	N/T
+/+	15	0	0	0/15
<i>mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}</i>	6	7	2	9/15
$P(w^+;east^+);mod(mdg4)ul/mod(mdg4)ul$	5	1	9	10/15
<i>east^{P1}</i> ; <i>mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}</i>	12	3	0	3/15
<i>cp60^{Δ1}</i> ; <i>mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}</i>	6	2	7	9/15

Таблица 4. Анализ влияния генов *east*, *cp60* на генетическую конструкцию $P\{E-Su;w^+\}$. Обозначения: N – количество линий, изменивших свой фенотип по сравнению с исходной конструкцией; T – общее число линий; Var – часть щетинок мух неокрашена. Пигментация щетинок определялась так же, как в таблице 1. В таблице отражено количество линий, имеющих тот или иной фенотип щетинок.

Мутация в гене *cp60* (*cp60^{Δ1}*) на фоне мутации *mod(mdg4)^{ul}* усиливала репрессию, вызванную инсулятором Su(Hw) (табл.4). Данные результаты говорят о совместном

действии белков CP60 и Mod(mdg4)67.2 направленном на предотвращение репрессии, вызванной белком EAST (табл.4).

Однако в 6 из 15 полученных линий мутация $mod(mdg4)^{u1}$ не вызывала репрессию гена *yellow*. Сочетание мутации $mod(mdg4)^{u1}$ с гиперэкспрессией гена *east* также не подавляло транскрипцию гена *yellow* в этих линиях.

Полученные результаты подтверждают наличие функционального взаимодействия между белками CP60, EAST и белками инсуляторного комплекса. Также можно сделать вывод, что репрессивный эффект белка EAST зависит от положения инсулятора в геноме.

4. Влияние белка EAST на функционирование инсулятора в системах, отличных от аллеля y^2

Генный комплекс *achaete-scute* (AS-комплекс) расположен рядом с геном *yellow*, на экспрессию которого влияет изменение концентрации белка EAST. Гены *achaete* и *scute* отвечают за развитие щетинок у дрозофилы. Точная работа этих генов регулируется большим количеством специфичных энхансеров (Modolell and Campuzano, 1998). Мутация sc^{D1} вызвана встраиванием ретротранспозона МДГ4 между геном *scute* и частью его энхансеров, вследствие чего активность этих энхансеров блокируется инсулятором Su(Hw) (рис.7).

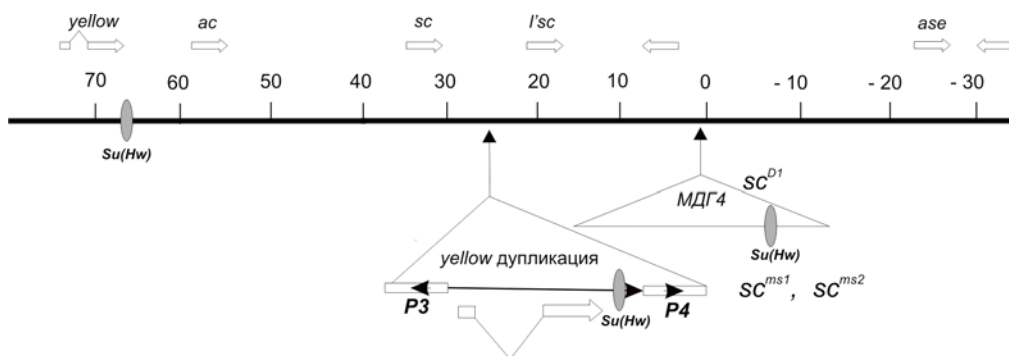


Рисунок 7. Схематичное изображение аллелей генного комплекса *achaete-scute*, использованных в работе. Обозначения: координаты в AS-комплексе указаны в тысячах пар нуклеотидов, инсулятор Su(Hw) обозначен серым овалом, горизонтальные стрелки над осью координат указывают направление транскрипции и положение соответствующих генов, делеции в аллелях sc^3 и sc^5 показаны горизонтальными прямоугольниками под осью координат, ориентация P-элементов указана стрелками внутри обозначающих их прямоугольников.

Мутации sc^{ms1} и sc^{ms2} вызваны встраиванием химерного элемента, содержащего ген *yellow* и инсулятор Su(Hw) из локуса 1A2, окруженные P-элементами, в регуляторную область AS-комплекса. Увеличение концентрации белка EAST при скрещивании всех вышеперечисленных аллелей с линией $yw;P\{east+;w\}/CyO; P\{east+;w\}/TM6,Tb$ не влияло

на их фенотипическое проявление. Таким образом, можно сделать вывод, что белок EAST не влияет на экспрессию генного комплекса *achaete-scute*.

Ранее были описаны различные мутации в гене *cut*, вызванные встраиванием ретротранспозона *МДГ4* (Jack et al., 1991). Мутация *ct⁶* вызвана встраиванием *МДГ4* между промотором и энхансером гена *cut*, которые разделены 70 тысячами пар нуклеотидов. Инсулятор Su(Hw), входящий в состав ретротранспозона *МДГ4*, приводит к полной изоляции энхансера, который регулирует экспрессию гена *cut* в крыльях. Частичная делеция последовательностей инсулятора в мутации *ct^{pN}* приводит к неполному восстановлению активности энхансера гена *cut*. Кроме того, были описаны две мутации, вызванные либо полной (*ct^{2S}*), либо частичной (*ct^{pN2S}*) делецией энхансера гена *cut* (Mogila et al., 1992) (рис.8).

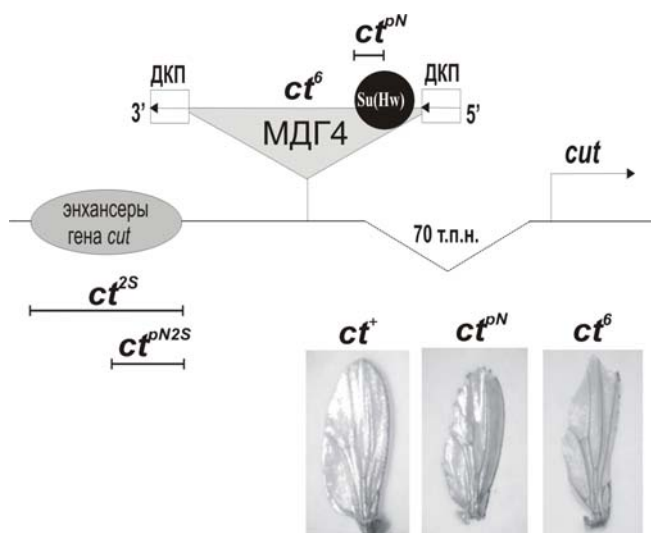


Рисунок 8. Схематичное изображение аллелей гена *cut*, использованных в работе. Обозначения: горизонтальная стрелка - направление транскрипции гена *cut*; серый овал - энхансеры гена *cut*; черный овал - инсулятор Su(Hw); отрезки - размер делеций в аллелях *ct^{pN}*, *ct^{2S}*, *ct^{pN2S}*; серый треугольник - ретротранспозон *МДГ4*; белые прямоугольники - длинные концевые повторы (ДКП); стрелки внутри прямоугольников - направление транскрипции; 70 т.п.н. - расстояние между ретротранспозоном *МДГ4* и промотором гена *cut*. На фотографиях представлены фенотипы аллелей, использованных в работе.

Увеличение концентрации белка EAST при скрещивании мух линии *uw;P{east+;w}/CyO;P{east+;w}/TM6,Tb* с мухами, несущими различные аллели гена *cut*, приводило к значительному усилению проявления мутантного фенотипа только тех аллелей, в которых энхансер гена *cut* был частично инактивирован (*ct^{pN}*, *ct^{pN2S}*). В то же время, увеличение концентрации белка EAST не влияло на *ct⁶* и *ct^{2S}* мутации, в которых энхансер был полностью инактивирован. Мутации *east^{P1}* и *east^{P2}* также супрессировали мутантное проявление только тех аллелей гена *cut*, в которых энхансер сохранял частичную активность. Таким образом, белок EAST регулирует активность гена *cut* вне

зависимости от присутствия МДГ4. Возможно белок EAST взаимодействует с белковыми комплексами, непосредственно участвующими в регуляции экспрессии этого гена.

5. Изучение влияния гена *east* на функционирование различных репрессивных белковых комплексов

Так как белок EAST проявляет свойства репрессора гена *yellow*, была осуществлена попытка выяснить, участвует ли он в работе известных репрессивных белковых комплексов у *Drosophila melanogaster*. Наиболее изучен репрессивный комплекс, формируемый на последовательности PRE (*Polycomb* responsible element) (Chan et al., 1994). Для исследования роли белка EAST в активности белков группы *Polycomb* (*Pc*-белки) была создана конструкция PRE(S)YW, в которой PRE из локуса *Ubx*, размером 660 пар нуклеотидов, был вставлен в регуляторную область гена *yellow* (рис.9). Ген *white*, определяющий пигментацию глаз у дрозофилы, использовался в этой конструкции как дополнительный маркерный ген. Кроме того, PRE был отделен от промотора гена *yellow* инсулятором Su(Hw).

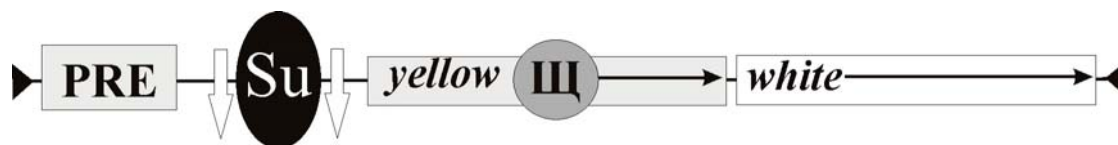


Рисунок 9. Схематичное изображение конструкции PRE(S)YW. Обозначения: серый прямоугольник - PRE-элемент. Остальные обозначения такие же, как на рисунке 2.

В результате трансформации эмбрионов дрозофилы было получено 11 линий, в которых инсулятор защищал промоторы генов *yellow* и *white* от PRE-зависимой репрессии. При делеции инсулятора в большинстве трансгенных линий PRE индуцировал реессию. Однако увеличение или уменьшение концентрации белка EAST не оказывало значительного влияния на PRE-зависимую реессию генов *yellow* и *white*. Таким образом, белок EAST не участвует в *Pc*-зависимой реессии (табл. 5).

Трансгенная линия	Окраска глаз у мух									Число линий с новым фенотипом/ Общее число линий
	Кр	Кор-Кр	Кор	т. Ор	Ор	т.Ж	Ж	св.Ж	Б	
PRE(S)YW	0	0	0	0	3	2	3	3	0	0/11
<i>east^{P1}</i>	0	0	0	0	3	2	4	2	0	1/11
PRE(Δ)YW	0	0	0	0	1	1	2	4	3	7/11
<i>east^{P1}</i>	0	0	0	0	1	2	1	4	3	8/11

Таблица 5. Анализ влияния мутации в гене *east* на *Pc*-зависимую репрессию в модельной системе гена *white*. В левой колонке приведено название использованной в работе конструкции. Обозначения: S - присутствие в линии инсультатора Su(Hw), Δ - вырезание Su(Hw) инсультатора из конструкции, *east^{P1}* - введение в обозначенные выше линии мутации в гене *east*. Окраска глаз у мух обозначена с помощью следующих сокращений: Кр-красная, Кор-Кор-коричнево-красная, Кор-коричневая, т.Ор-темно-оранжевая, Ор-оранжевая, т.Ж-темно-желтая, Ж-желтая, св.Ж-светло-желтая, Б-белая. Цифрами в таблице указано количество линий с соответствующей окраской глаз.

Затем было исследовано влияние мутации в гене *east* на экспрессию гена *white* в составе описанных ранее трансгенных конструкций, встроенных в гетерохроматиновые районы теломер второй и третьей хромосом (линии: 39C-5 (2L), 39C-27 (2R), 39C-31 (3R), 39C-51 (3R)) или в 4 хромосому (линии: 118E-10 (102A), 39C-34 (102A), 118E-3 (102A), 39C-12 (102B), 39C-52 (102B-C), 118E-19 (102D-E)) (Sun et al., 2000; Cryderman et al., 1999).

Известно, что гетерохроматиновые районы генома способны репрессировать транскрипцию встроенного в них трансгена. Ранее было показано, что экспрессия трансгена, встроившегося в теломер-ассоциированные повторы (TAS), подавляется. Во всех использованных линиях окраска глаз у мух была мозаичной – красные пятна и точки различной интенсивности на светло-оранжевом фоне, что свидетельствует о выраженной репрессии гена *white*. Мутация *east^{P1}* не оказывала значительного влияния на экспрессию гена *white* во всех трансгенных линиях.

Таким образом, белок EAST не участвует в репрессии, вызываемой белками группы *Polycomb* или прителомерным гетерохроматином *Drosophila melanogaster*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучение влияния гена *east* на функционирование инсультатора в системе аллеля y^2

Согласно полученным в представленной работе результатам, ген *east* оказывает влияние на функционирование инсультатора Su(Hw) в модельной системе гена *yellow*. Гиперэкспрессия гена *east* приводит к подавлению транскрипции гена *yellow* в щетинках. Мутация *east^{P1}* восстанавливает функционирование инсультатора на фоне мутации в гене *mod(mdg4)*, кодирующем один из компонентов инсультаторного комплекса Su(Hw). Также

ген *east* генетически взаимодействует с геном *cp190*, который кодирует еще один белок, входящий в состав инсулятора Su(Hw). Две дополнительные копии гена *east* приводят к подавлению экспрессии гена *yellow*, а дополнительное введение мутации *cp³* в гетерозиготе усиливает наблюдаемую репрессивную активность. При совместной гиперэкспрессии генов *cp190* и *east* наблюдался обратный эффект: полное восстановление транскрипции гена *yellow*.

Анализ различных ревертантов аллеля *y²* и генетических конструкций $P\{ДКП-Su;w^+\}$ и $P\{E-Su;w^+\}$, позволил установить последовательности, ответственные за проявление EAST-зависимой репрессии. Этими последовательностями оказались инсулятор Su(Hw) и длинный концевой повтор из ретротранспозона *МДГ4*.

Ранее было показано, что отличные от инсулятора последовательности *МДГ4* определяют положение этого мобильного элемента на периферии ядра (Xu et al., 2004). Также ранее было показано, что длинные концевые повторы ретротранспозона *Idefix* и его 5'-нетранслируемая область влияют на эффект инсуляции и положение генетической конструкции в ядре (Brasset et al., 2007). Исходя из этих данных, можно предположить, что влияние белка EAST на транскрипцию гена *yellow* связано с положением этого гена в ядре, которое зависит от присутствия последовательностей длинных концевых повторов ретротранспозона *МДГ4*. Возможно, присутствие последовательностей *МДГ4* в аллельных вариантах гена *yellow* способствует контакту между регуляторными последовательностями этого гена и белковыми факторами, аккумулярованными на ядерной оболочке и оказывающими репрессирующее влияние на ген. При этом увеличение концентрации белка EAST приводит к активизации репрессивного комплекса.

2. Исследование молекулярных взаимодействий между белками EAST, CP60 и белками инсуляторного комплекса

Ранее было показано, что белок CP60 колокализуется в ядре с белком EAST в межхромосомном пространстве и его локализация зависит от уровня экспрессии гена *east* (Wasser and Chia, 2000). Кроме того, было показано, что белок CP60 колокализуется в ядре с белком CP190, компонентом инсулятора Su(Hw) (Kellogg et al. 1995 Whitfield et al. 1995). При помощи молекулярных исследований, проведенных в данной работе, было показано присутствие белка CP60 в инсуляторном комплексе Su(Hw). Белок CP60 связывается с последовательностью ДНК инсулятора Su(Hw) и взаимодействует с белком CP190. Также белок CP60 коиммунопреципитируется с белком Mod(mdg4)67.2, являющимся компонентом инсуляторного комплекса Su(Hw). Так как было показано наличие прямого взаимодействия между белками CP60 и EAST, можно утверждать, что белок EAST

оказывает свое влияние на функционирование инсулятора Su(Hw) при помощи белка CP60.

Исходя из взаимодействий между генами *east*, *cp60*, *mod(mdg4)* и *cp190*, можно выдвинуть гипотезу о существовании на последовательности инсулятора Su(Hw) группы белков (CP60, CP190 и Mod(mdg4)67.2), в функции которых входит блокирование репрессивной активности белка EAST.

3. Влияние белка EAST на функционирование различных репрессивных комплексов

Согласно полученным в данной работе результатам, белок EAST не влияет на репрессию генов, вызванную белками группы *Polycomb* или прителомерным гетерохроматином. Ранее было показано, что при гиперэкспрессии гена *east* изменяется компактизация и распределение хромосом в ядре (Wasser and Chia, 2000). При этом внехромосомные структуры занимают больший объем ядра, чем обычно. Можно предположить, что такое перераспределение хромосом делает регуляторные системы активно экспрессирующихся генов более доступными для влияния репрессивных компонентов ядерного матрикса. Полученные результаты позволяют предположить, что белок EAST не является компонентом каких-либо репрессивных комплексов, но при этом выступает как часть глобальной системы белков ядерного матрикса, который обеспечивает правильную временную и тканеспецифичную экспрессию всех генов.

ВЫВОДЫ

1. С помощью различных генетических модельных систем, как нативных, так и искусственно созданных, была показана функциональная взаимосвязь между инсуляторными и репрессивными свойствами инсулятора Su(Hw) и уровнем экспрессии генов *east* и *cp60*. Также было показано, что изменение уровня экспрессии генов, кодирующих входящие в инсуляторный комплекс белки, в сочетании с мутациями в генах *east* и *cp60*, также меняло свойства инсулятора.

2. Установлено, что для проявления эффектов, связанных с экспрессией гена *east*, необходимы последовательности инсулятора Su(Hw) и длинного концевой повтора из ретротранспозона МДГ4.

3. Показано прямое взаимодействие между белком CP60 и белком CP190, компонентом инсуляторного комплекса, а также взаимодействие между белком CP60 и белком EAST, предполагаемым компонентом ядерного матрикса. Способность белка CP60 связываться с последовательностью инсулятора Su(Hw) и коиммунопреципитация белка CP60 с основным компонентом инсулятора Su(Hw) – белком Mod(mdg4)67.2 подтверждает, что белок CP60 также является компонентом инсуляторного комплекса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Л.С. Мельникова, **И.В.Кривега**, П.Г. Георгиев, А.К. Головнин А.К. Белок ядерного матрикса EAST участвует в регуляции транскрипции гена *yellow* у *Drosophila melanogaster*. ДАН, 2007, 415(5): 1-4.

2. Л.С. Мельникова, **И.В.Кривега**, П. Г. Георгиев, А.К. Головнин. Белок ядерного матрикса EAST влияет на транскрипцию генов *Drosophila melanogaster* независимо от присутствия последовательностей ретротранспозона *МДГ4*. Генетика. 2007, 43(10): 1-5.

3. **И.В. Кривега**, Л.С. Мельникова, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев. Выявление нового гена супрессора *mod(mdg4)* и изучение его свойств. Тезисы 10 Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" с. 25. Пущино, 17-21 апреля 2006г.

4. **И.В. Кривега**, М.В. Костюченко, Е.В. Кравченко, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев. Создание новой модельной системы для изучения роли белков Mod(mdg4) и супрессоров *mod(mdg4)* в процессе инсуляции. Тезисы 10 Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" с. 26. Пущино, 17-21 апреля 2006г.

5. A. Golovnin, L. Melnikova, **I. Krivega**, M. Kostuchenko, I. Volkov, P. Georgiev. The nucleoskeletal proteins EAST and CP60 modulate activity of the *gypsy* insulator in *Drosophila melanogaster*. "Nuclear Structure & Dynamics", Montpellier, France, 1-5 September, 2007: