

МАКСИМЕНКО ОКСАНА ГЕННАДЬЕВНА

**ДЕМОНСТРАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ РОЛИ ИНСУЛЯТОРОВ В
РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
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
П.Г. Георгиев

Официальные оппоненты: чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор
С.В. Разин

кандидат биологических наук Л.Г. Николаев

Ведущая организация: Институт молекулярной генетики РАН

Защита диссертации состоится октября 2007 года в час. 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 сентября 2007 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Л.С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.

Транскрипция - важная стадия в процессе реализации генетической информации. Ключевую роль в регуляции этого процесса играют транскрипционные факторы - белки, способные контролировать активность РНК - полимеразы. Как известно, для высших эукариот характерна наиболее развитая система регуляции транскрипции, связанная с необходимостью в транскрипции различных генов в зависимости от типа клеток и стадии развития организма, в результате только определенный набор генов экспрессируется в данном типе дифференцирующихся клеток, большинство же генов находится в стабильно неактивном состоянии. Доступность и набор специфических регуляторных элементов ДНК в совокупности с комбинациями активных транскрипционных факторов обеспечивают специфическую транскрипцию гена в данном типе клеток. Определенный контроль за экспрессией гена может осуществляться за счет прямых взаимодействий между белками основного транскрипционного комплекса, собранного на промоторе, и специфическими белковыми комплексами на регуляторных элементах, названных энхансерами (т.е. усилителями транскрипции). Энхансеры способны работать на очень больших дистанциях. Большая часть экспериментальных данных согласуется с так называемой «петлевой» моделью, согласно которой белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с белками, собранными на промоторе, в результате чего ДНК между этими элементами выпетливается. Однако в рамках этой модели возникает вопрос, каким образом энхансеру, взаимодействующему с промотором на больших расстояниях, удастся правильно узнавать свой промотор, какие механизмы препятствуют установлению связей (контакта) с другими генами. Ясно то, что должны существовать механизмы, разграничивающие регуляторные последовательности в специфические участки генной экспрессии, и, таким образом, препятствующие образованию случайных связей между энхансерами и промоторами. Возможно, важную роль в этих процессах играют инсуляторы – регуляторные элементы, при расположении между энхансером и промотором способные препятствовать установлению эффективного взаимодействия между этими элементами, в результате чего активация промотора не происходит. Кроме этого, инсуляторы могут разделять эу- и гетерохроматиновые участки, и с этой точки зрения основная роль инсуляторов - компартиментализация генома и организация хроматина в ядре, инсуляторы способны собирать хроматин в доменные структуры, каждая из которых представляет собой независимую функциональную единицу генной экспрессии. В данной работе на примере эндогенного Su(Hw)-зависимого инсулятора представлен сравнительный анализ инсуляторных активностей, более того, показано непосредственное влияние инсулятора на активность промоторов, продемонстрировано, какой вклад инсуляторы могут вносить в энхансер-промоторные взаимодействия благодаря еще одной, к настоящему моменту, не выделенной отдельно, активности – коммуникаторной.

Все вышесказанное и определяет актуальность настоящей диссертационной работы, посвященной изучению особенностей функционирования инсуляторов дрозофилы в контексте их влияния на процессы регуляции экспрессии генов, и, в частности, на установление энхансер-промоторных взаимодействий.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Основной целью работы явилось изучение роли инсуляторов в процессах регуляции экспрессии генов.

Для осуществления поставленной цели были определены следующие экспериментальные задачи:

- Проанализировать структурно-функциональные особенности Su(Hw)-зависимых инсуляторов и определить компоненты, ответственные за проявление энхансер-блокирующей и барьерной активностей;
- Подобрать оптимальную модельную систему для проверки взаимодействий между разными наборами Su(Hw)-зависимых инсуляторов;
- Продемонстрировать возможную потенциальную роль межинсуляторных взаимодействий в тонкой регуляции работы генов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ.

В работе впервые показано, что у Su(Hw)-зависимых инсуляторов за энхансер-блокирующую и барьерную активности отвечают разные белки, каждый из которых, в свою очередь, взаимодействует с белком Su(Hw). Более того, продемонстрировано, что эндогенный Su(Hw)-зависимый инсулятор, несмотря на свое структурное сходство с инсулятором из ретротранспозона МДГ4, обладает рядом уникальных свойств. Полученные результаты по изучению функциональных активностей 1A2 инсулятора позволили обобщить данные, ранее полученные для инсулятора из ретротранспозона МДГ4. Все это помогло создать удобную тест-систему на базе 1A2 инсулятора, при помощи которой удалось на примере простой модели с двумя маркерными генами показать влияние межинсуляторных взаимодействий на энхансер-промоторную коммуникацию. Результаты данной работы вносят вклад в развитие представлений о механизмах регуляции транскрипции генов на уровне активации энхансером промотора. Кроме того, они позволяют по-новому взглянуть на функциональное значение инсуляторов в процессах регуляции транскрипции, давая все основания подвергнуть сомнению упрощенные модели о разобщении энхансера и промотора друг от друга. В то же время появляются все основания рассматривать инсуляторы в качестве коммуникационных элементов, способных взаимодействовать друг с другом, и в зависимости от конфигурации таких взаимодействий возможна либо активация энхансером своего промотора либо его изоляция.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.

Результаты диссертационной работы были представлены на школе-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» (Звенигород, 2005), 10-й международной

конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2006), XIV международной конференции «Ломоносов 2007», на международных конференциях Meeting of International Research Scholars HHMI (Merida, Mexico, 2005), EMBO «4th Elmau conference on nuclear organization» (Gosau, Austria, 2006).

ПУБЛИКАЦИИ.

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ. Из них статей - 4, материалов конференций - 5.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.

Диссертация изложена на страницах, содержит рисунков и таблиц и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов исследования, Обсуждения, Выводов и Списка литературы, включающего источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В данной работе на примере Su(Hw)-зависимых инсуляторов показано влияние инсуляторов на экспрессию генов и исследованы свойства первого эндогенного Su(Hw)-зависимого инсулятора. В результате (I раздел) были изучены энхансер-блокирующая и барьерная активности этого инсулятора, определены белки, участвующие в реализации активностей, и были продемонстрированы эффекты влияния инсулятора на активность промотора гена *yellow*. Далее (II раздел) на основе 1A2 инсулятора была создана модельная система для анализа влияния межинсуляторных взаимодействий на энхансер-промоторные взаимоотношения. В качестве маркерных генов были использованы стандартные в подобных трансгенных работах *yellow* (пигментация кутикулярных структур) и *white* (окраска глаз) (описание см. в Диссертации).

I. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И АКТИВНОСТЕЙ ЭНДОГЕННОГО Su(Hw)-ЗАВИСИМОГО ИНСУЛЯТОРА.

К настоящему времени наиболее хорошо изученным инсулятором у дрозофилы является Su(Hw) из ретротранспозона МДГ4 (ниже в тексте называется просто Su(Hw)), найденный рядом с 5' длинным концевым повтором. Этот инсулятор содержит 12 сайтов связывания для белка Su(Hw), с которым взаимодействуют два других компонента инсуляторного комплекса - Mod(mdg4)-67.2 и CP190. Известно, что существует большое количество (более 500) эндогенных сайтов связывания для белка Su(Hw). Данная работа сконцентрирована на исследовании свойств первого идентифицированного эндогенного инсулятора, названного по месту локализации на X хромосоме - 1A2. Этот инсулятор содержит два сайта связывания белка Su(Hw) и интересен он с нескольких точек зрения (рис.1Б). Инсулятор 1A2 - эндогенный Su(Hw)-зависимый инсулятор, и его изучение важно с точки зрения выяснения значения белка Su(Hw) в рамках генома дрозофилы. Расположение данного инсулятора между геном *yellow*, имеющим относительно простую систему регуляции экспрессии, и генным комплексом *achaete-scute* (участвует в формировании периферической нервной системы)(рис.1А), для которого характерна очень сложная временная и пространственная регуляция экспрессии, возможно, важно в установления паттернов независимой экспрессии этих генов.

1. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ 1A2 ИНСУЛЯТОРА.

1.1 ИЗУЧЕНИЕ ЭНХАНСЕР-БЛОКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

Энхансер-блокирующая - основная активность инсуляторов: например, инсулятор Su(Hw) способен полностью изолировать энхансер от промотора, то есть он является очень сильным инсулятором. В рамках данной работы нас интересовал, прежде всего, 1A2 инсулятор. Ранее было показано, что этот инсулятор длиной 454 п.н. содержит на 3' (дистальном) конце два Su(Hw)-связывающих сайта. Однако 125 п.н. фрагмент 1A2 инсулятора, который содержит только сайты связывания для белка Su(Hw), теряет способность блокировать энхансеры. Это можно объяснить тем, что для работы 1A2 инсулятора нужны какие-то дополнительные белки. Например, недавно в системе *in vitro* было показано связывание белка CP190 с проксимальным концом 1A2 инсулятора и с белком Su(Hw), что дало основание предполагать участие белка CP190 в работе 1A2 инсулятора.

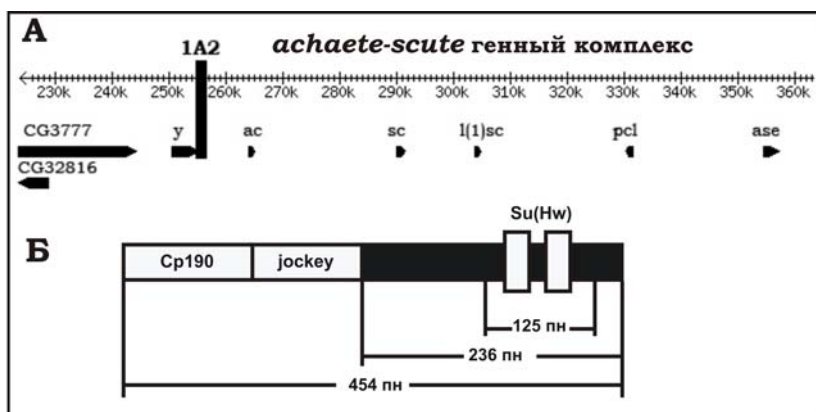


Рис.1. Инсулятор 1A2
А) Расположение 1A2 инсулятора в геноме
Б) Структура 1A2 инсулятора

Первой задачей настоящего исследования было выяснение значения проксимального участка в работе 1A2 инсулятора. Анализ последовательности 1A2 инсулятора выявил в центральной его части 92 п.н. участок, высоко гомологичный району из мобильного элемента *jockey*. Для выяснения роли в блокировании энхансеров проксимальной части инсулятора (218 п.н.), включающей CP190-связывающую область и гомологию с *jockey* (рис.1Б), мы сравнили эффективность действия 1A2 инсулятора и его части, содержащей только 236 п.н. с дистальной стороны, в трансгенных линиях. Для этого были использованы наиболее удобные регуляторные системы генов *yellow* (определяет пигментацию тела, крыльев, щетинок и др) и *white* (определяет пигментацию глаз). В созданных конструкциях $En(1A2^{454})YW$ и $En(1A2^{236})YW$ (рис.2А), ген *yellow* (Y) был встроен перед геном *white* (W). Перед промотором гена *yellow* находились энхансеры, ответственные за пигментацию кутикулы тела (B_{en}) и крыльев (W_{en}). Между ними был встроен энхансер, активирующий ген *white* в глазах (E_{en}). В интроне гена *yellow* находился энхансер, отвечающий за экспрессию этого гена в щетинках (Bg_{en}). Исследуемые элементы $1A2^{454}$ и $1A2^{236}$ были вставлены между энхансерами и промоторами генов в положение -893 относительно начала транскрипции *yellow*. $1A2^{454}$ и $1A2^{236}$ фрагменты были окружены *lox*-сайтами, узнающимися Cre рекомбиназой.

В результате трансформации конструкции $En(1A2^{454})YW$ в эмбрионы линии y^1w^{1118} было получено 28 трансгенных линий, содержащих единичную инсерцию конструкции. В 26 трансгенных линиях (рис.2Б) мухи имели промежуточную пигментацию тела, крыльев и глаз, что

предполагает частичное блокирование энхансеров генов *yellow* и *white* 1A2 инсулятором. При удалении инсулятора уровень пигментации мух значительно увеличивался. Таким образом, полный 454 п.н. инсулятор эффективно, но не полностью блокирует энхансеры генов *yellow* и *white*. При исследовании инсуляторной активности 236 п.н. фрагмента было получено 16 трансгенных линий (рис.2Б) с конструкцией En(1A2²³⁶)YW. Сравнение уровня пигментации мух исходных трансгенных En(1A2²³⁶)YW линий и производных с вырезанным 1A2²³⁶ элементом показал, что исследуемый элемент способен блокировать промоторы маркерных генов от их энхансеров. Более того, при сравнении среднего уровня пигментации трансгенных линий с 1A2⁴⁵⁴ и 1A2²³⁶ оказалось, что оба элемента обладают приблизительно одинаковой по силе энхансер-блокирующей активностью. Таким образом, 218 п.н. последовательность, содержащая CP190-связывающий участок, не нужна для блокирования энхансеров и, по всей видимости, функционирующий инсуляторный комплекс может собираться на базе 236 п.н. района.

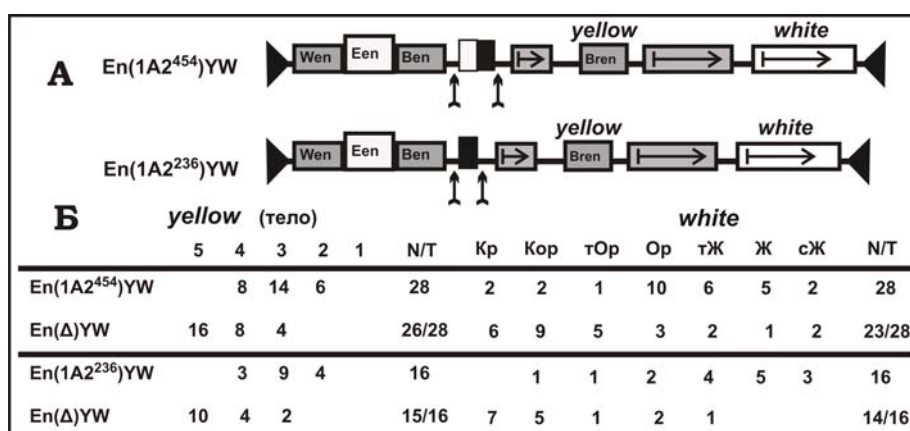


Рис.2. Исследование энхансер-блокирующей активности инсулятора 1A2.

А) Схема En(1A2⁴⁵⁴)YW и En(1A2²³⁶)YW конструкций. Черно-белый квадрат – инсулятор 1A2⁴⁵⁴, черный прямоугольник – участок 1A2²³⁶. Вертикальные стрелки - сайты узнавания рекомбиназы.

Б) Анализ экспрессии генов *yellow* и *white*. Ген *yellow* в последних парасегментах брюшка: 1 – отсутствие экспрессии; 5 – нормальный уровень экспрессии; 2-4 – промежуточные уровни. Ген *white* в глазах: Кр – красный, нормальный уровень экспрессии, Кор – коричневый, тОр – темно-оранжевый, Ор – оранжевый, тЖ – темно-желтый, Ж – желтый, сЖ – светло-желтый. Цифры в строках - число линий с соответствующим уровнем экспрессии гена. N/T - отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение уровня экспрессии гена при удалении исследуемого элемента, к общему числу анализируемых линий.

1.2. ИЗУЧЕНИЕ БАРЬЕРНОЙ АКТИВНОСТИ

Часть инсуляторов обладает способностью защищать экспрессирующийся ген от позитивных и негативных эффектов хроматина, окружающего ген или генный локус. Ранее для Su(Hw) инсулятора было показано, что он является не только самым эффективным в блокировании энхансеров, но и может создавать барьер между областями активного и репрессивного хроматина, в частности индуцированного комплексом из Polycomb-белков (далее Pc). Pc-белки образуют мультимерные комплексы на особых последовательностях, названных PRE (Polycomb Responsible Element). Механизм устанавливаемой ими репрессии пока до конца не ясен. Предполагается, что репрессивные комплексы, наподобие энхансеров, могут взаимодействовать непосредственно с белковыми комплексами на промоторе. В результате происходит репрессия транскрипции. Возможно, важную роль в репрессии играет участие Pc комплекса в осуществлении модификаций гистоновых белков, в результате этого Pc-зависимый репрессивный комплекс может

распространяться по нуклеосомам, что приводит к формированию неактивного хроматина и репрессии рядом расположенных генов.

Для исследования способности 1A2 инсулятора являться границей между активным и репрессивным хроматином нами был использован известный 660 п.н. элемент PRE из регуляторной области гена *Ultrabithorax*. В созданной конструкции (PRE)(1A2)Y(1A2)W элемент PRE был вставлен в регуляторную область *yellow* между энхансерами тела и крыльев и окружен сайтами узнавания для дрожжевой Flp рекомбиназы - *frt*. Два 1A2 инсулятора были вставлены выше промотора *yellow* в положении -893 и между генами *yellow* и *miniwhite* в положении +4964 относительно начала транскрипции *yellow*. Для исследования роли каждого из инсуляторов в регуляции экспрессии репортерных генов, они были клонированы между *lox* и *Sce-I* сайтами, узнающимися Cre рекомбиназой и Sce-I эндонуклеазой, соответственно (рис.3А).

В результате трансформации конструкции (PRE)(1A2)Y(1A2)W были получены 52 трансгенные линии. При этом только в трех линиях наблюдалась репрессия гена *yellow* в щетинках, которая восстанавливалась при удалении PRE из конструкции. В других трансгенных линиях удаление PRE не влияло на уровень экспрессии гена *yellow*. Эти данные предполагают, что элемент 1A2 является эффективной границей, способной препятствовать распространению Рс-белков. В 35 линиях наблюдалась полная репрессия гена *white* (белые глаза). При вырезании PRE происходило восстановление уровня экспрессии гена *white*. Подробное обсуждение этого результата будет представлено ниже (3 часть I раздела).

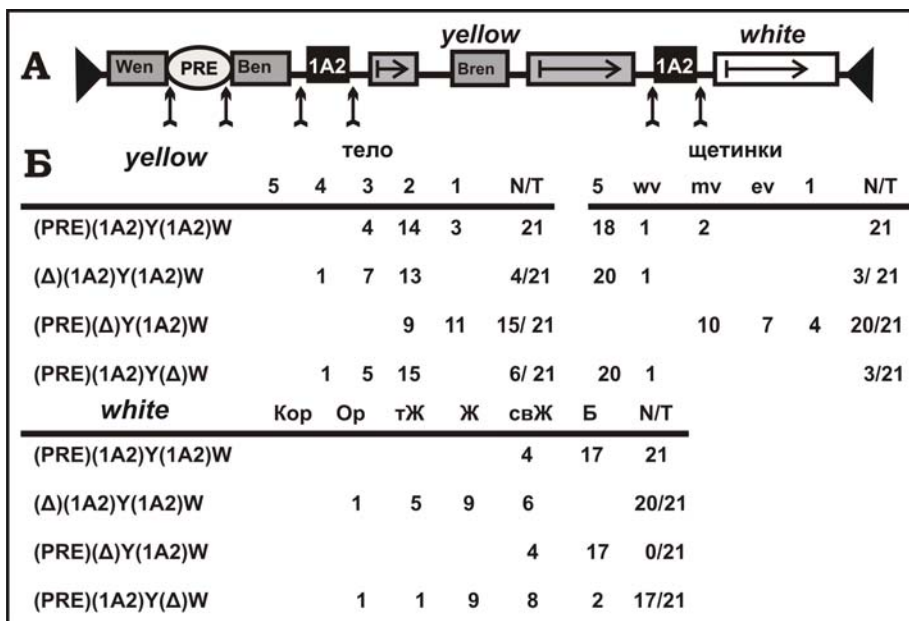


Рис.3. Изучение барьерной активности 1A2 инсулятора. А) Схема (PRE)(1A2)Y(1A2)W конструкции. Б) Анализ экспрессии генов *yellow* и *white*. Оценка уровней экспрессии генов *yellow* (тело) и *white* аналогична рис.2. Экспрессия гена *yellow* в грудных щетинках и волосках: 1 – все щетинки и волоски желтые, отсутствие экспрессии; ev – большинство щетинок желтые; mv – волоски и половина щетинок желтые; wv – волоски и 1-2 щетинки желтые; 5 – нормальный уровень экспрессии, все волоски и щетинки черные.

Для более детального анализа мы отобрали 21 линию (рис.3Б), в которых ген *white* был зарепрессирован. При удалении дистального 1A2 инсулятора, расположенного рядом с промотором гена *white*, ген *yellow* оставался защищен от репрессивного влияния PRE, а экспрессия гена *white* восстанавливалась. То есть наличия одной копии 1A2 инсулятора, отделяющего ген от PRE, достаточно для установления границы между активным и репрессивным хроматином. При вырезании проксимального фрагмента 1A2 наблюдалось распространение репрессивного комплекса на ген *yellow* (о чем свидетельствовала желтая

окраска тела, крыльев и большинства щетинок), что подтверждает сделанное выше предположение о барьерной активности инсулятора 1A2. В то же время ген *white* оставался зарепрессированным несмотря на то, что расстояние от PRE до промотора гена *white* превышало 5 т.п.н. и перед промотором гена располагался 1A2 инсулятор, способный выполнять барьерные функции. Возможное объяснение такого неожиданного результата представлено ниже (3 часть).

Таким образом, можно сделать выводы, что инсулятор 1A2: 1) обладает энхансер-блокирующей активностью средней силы по сравнению с Su(Hw) инсулятором, и реализация этой активности не зависит от проксимальной части инсулятора; 2) способен препятствовать распространению репрессивного хроматина, индуцированного белками Рс-группы.

2. РОЛЬ БЕЛКОВ Su(Hw), MOD(MDG4)-67.2 и E(y)2 В АКТИВНОСТИ 1A2 ИНСУЛЯТОРА.

Еще одной важной задачей при характеристике инсулятора является определение белков-участников реализации энхансер-блокирующей и барьерной активностей. Ранее для инсулятора Su(Hw) была показана важная роль белков Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2. Поэтому в данном случае мы сконцентрировали свое внимание прежде всего на этих белках. Кроме этого недавно в двугибридной дрожжевой системе было показано, что продукт гена *e(y)2* способен взаимодействовать с районом Su(Hw) белка, который включает несколько цинковых пальцев (лаборатория Ю.В.Ильина). Это взаимодействие было доказано в системах *in vitro* и *in vivo*. Более того, оказалось, что белок E(y)2 колокализуется с участками связывания белка Su(Hw), в частности, с районом 1A2 инсулятора. Все это наводило на мысль о возможном важном функциональном значении белка E(y)2 в функционировании Su(Hw)-зависимых инсуляторов. Поэтому особое место в настоящем исследовании заняло тестирование белка E(y)2 в качестве нового компонента Su(Hw)-зависимых инсуляторов.

2.1. БЕЛОК Su(Hw).

Для проверки роли белка Su(Hw) в функционировании инсулятора 1A2 были использованы 3 варианта мутантных аллелей гена *su(Hw)*:

su(Hw)^v – нуль-мутация, вызванная делецией промотора гена *su(Hw)*, летальна в гомозиготе из-за делеции соседнего гена;

su(Hw)² – гипоморфная мутация, десятикратное снижение экспрессии гена, инсерция мобильного элемента *jockey* в интрон гена.

Почти полную инактивацию гена Su(Hw) можно воспроизвести на фоне гетерозиготной мутации *su(Hw)²/su(Hw)^v* (*su(Hw)*⁻).

Во-первых, была изучена роль белка Su(Hw) в проявлении энхансер-блокирующей активности 1A2 инсулятора. Для этого 4 трансгенные линии En(1A2⁴⁵⁴)YW, в которых конструкция находилась на 2-ой хромосоме, были выведены на мутантный фон *su(Hw)*⁻ (рис.4А). У полученных таким образом линий уровень окраски тела и крыльев восстанавливался до уровня производных, содержащих En(1A2⁴⁵⁴)YW конструкцию с удаленным инсулятором. Для гена *white* был получен интересный результат: на *su(Hw)*⁻ фоне пигментация глаз восстанавливалась у 2

линий, а у других 2 - уменьшалась. Пока объяснение этому факту не найдено.

Далее мы приступили к выяснению роли белка Su(Hw) в осуществлении барьерной активности инсулятора: в линии (PRE)(1A2)Y(1A2)W были также введены мутантные аллели *su(Hw)* (рис.5B). Оказалось, что для установления эффективной границы на пути распространения Рс-белков, как и при реализации энхансер-блокирующей активности, необходимо наличие функционально активного белка Su(Hw).

2.2. БЕЛОК MOD(MDG4)-67.2.

Мутация *mod(mdg4)^{u1}* получена при вставке мобильного элемента Stalker в кодирующую область гена *mod(mdg4)*, в результате чего у белка Mod(mdg4)-67.2 отсутствует С-концевой домен, отвечающий за взаимодействие с белком Su(Hw). Именно этим фактом и обусловлен выбор данного аллельного варианта мутации при тестировании роли белка Mod(mdg4)-67.2 в функционировании 1A2 инсулятора. Эта мутация полностью жизнеспособна в гомозиготе, поэтому трансгенные линии со встройкой конструкции на 2-й хромосоме выводились на гомозиготный по мутации *mod(mdg4)^{u1}* фон. Ранее была описана роль белка Mod(mdg4)-67.2 в активности Su(Hw) инсулятора. Далеко не всегда инсулятор просто теряет энхансер-блокирующую активность, во многих случаях он превращается в сайленсер, который, в частности, способен специфично репрессировать промотор гена *yellow*. Стоит отметить, что такой интересный эффект, по всей видимости, сильно зависит от места интеграции трансгенных конструкций в геноме.

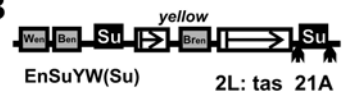


A		эффективность инсуляции											
		<i>su(Hw)^{2/v}</i>		<i>su(Hw)^{v/+}</i>		<i>mod^{u1/u1}</i>		<i>mod^{u1/+}</i>		<i>e(y)2^{u1/+}</i>			
En(1A2)YW		++	-	+	-	++	++	++	++	++	++		
B		тело					щетки						
<i>yellow</i>		5	4	3	2	1	N/T	5	wv	mv	ev	1	N/T
En(1A2 ⁴⁵⁴)YW m/m		5	9	1	2	17		10	1	1	2	3	17
En(1A2 ⁴⁵⁴)YW m/+		2	4	4	6	1	13/17	14	1	1		1	16/17
En(1A2 ²³⁶)YW m/m		5	6	1		12		12					12
En(1A2 ²³⁶)YW m/+			3	7	2		12/12	12					0/12
<i>white</i>		Kp	Kop	тOp	Op	тЖ	Ж	сЖ	N/T				
En(1A2 ⁴⁵⁴)YW m/m		5	3		4	3		2					17
En(1A2 ⁴⁵⁴)YW m/+			2	3	4	4	2	2					13/17
En(1A2 ²³⁶)YW m/m		1	2	3	4	1	1						12
En(1A2 ²³⁶)YW m/+				1	2	7	2						11/12
B		ΔSu											
		+ <i>su(Hw)^{2/v}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>							
EnSuYW(Su)	2L: tas_21A	5	1	ev		1	1						
B		Δ1A2 ^P					Δ1A2 ^d						
		+ <i>su(Hw)^{2/v}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>					
En(1A2)YW(1A2)	3R:12685208	wv	ev	ev	ev	ev	ev	ev	wv	ev			
	3L:22094115	wv	1	1	ev	1	ev	1	ev	1			
B		Δ1A2					Δg						
		+ <i>su(Hw)^{2/v}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>		+ <i>e(y)2^{u1}</i>					
En(1A2)YW(Su)	2R:14458492	5	5	5	1	1	5	ev					
		mv	1	1	1	1	1	1	1	1			

Рис.4. Изучение вклада белков Su(Hw), Mod9mdg4)-67.2, E(y)2 в энхансер-блокирующую активность инсулятора 1A2.

А) Влияние белков Su(Hw), Mod(mdg4), E(y)2 на блокирование энхансеров инсулятором 1A2: ++ средний уровень; + слабый; - отсутствие инсуляции.

Б) Анализ экспрессии генов *yellow* и *white* в линиях, полученных путем транспозиций Р-элемента на фоне мутации *mod(mdg4)^{u1}* (m - *mod(mdg4)^{u1}*, + - *mod(mdg4)⁺*). Оценка уровней экспрессии генов *yellow* (тело, щетки) и *white* аналогична рис.2, 3.

В) Роль белка E(y)2 в изоляции конструкций от негативного влияния окружающего хроматина. Оценка уровня репрессии гена *yellow* проводилась по степени пигментации щетинок в линиях и их производных.

1A2^P - инсулятор, вставленный между энхансерами и промотором;

1A2^d - инсулятор, вставленный в конце гена *yellow*.

Рядом с названиями конструкций указаны координаты встройки конструкций в геноме (карты с окружающими генами представлены в Диссертации).

Мутантный *mod(mdg4)^{u1}* фенотип был изучен на тех же линиях, что и *su(Hw)*. В

гомозиготных $mod(mdg4)^{u1}/mod(mdg4)^{u1}$ линиях $EyEe(1A2^{454})YW$ и $EyEe(1A2^{236})YW$ происходило полное восстановление пигментации тела, крыльев и глаз до дикого типа (рис.4А). То есть можно констатировать тот факт, что белок Mod(mdg4)-67.2 играет очень важную роль в блокировании энхансеров инсулятором 1A2. При анализе 4 линий на фоне гомозиготной $mod(mdg4)^{u1}$ мутации не было найдено ни одной, в которой инсулятор начинал бы вести себя как репрессор. Выше уже было отмечено, что способность к репрессии может сильно зависеть от места интеграции конструкции в геноме, поэтому для более детального исследования влияния мутации $mod(mdg4)^{u1}$ на активность 1A2 инсулятора необходимо было на фоне гомозиготной $mod(mdg4)^{u1}$ мутации получить достаточно большое количество независимых трансгенных линий, содержащих $EyEe(1A2^{454})YW$ или $EyEe(1A2^{236})YW$ конструкции. С этой целью в трансгенные линии, содержащие инсерции $EyEe(1A2^{454})YW$ или $EyEe(1A2^{236})YW$ конструкции на X-хромосоме, была введена мутация $mod(mdg4)^{u1}$. Затем в этих линиях на фоне мутации $mod(mdg4)^{u1}$ были индуцированы транспозиции конструкции с X-хромосомы на аутосомы. В результате были получены гомозиготные по мутации $mod(mdg4)^{u1}$ линии, содержащие единичную инсерцию либо $EyEe(1A2^{454})YW$ конструкции, либо $EyEe(1A2^{236})YW$ (рис.4Б). Во всех полученных линиях на фоне $mod(mdg4)^{u1}$ энхансер-блокирующая активность инсулятора 1A2 исчезала, и уровень пигментации тела, крыльев, глаз приближался к дикому типу. При введении в эти линии дикого аллеля $mod(mdg4)$ уже в гетерозиготе $mod(mdg4)^{u1}/+$ происходило восстановление энхансер-блокирующей активности инсулятора. Кроме этого, необходимо отметить, что для полного инсулятора 1A2⁴⁵⁴ наблюдалась картина, сходная с инсулятором Su(Hw) из МДГ4: в 6 из 17 линий происходила репрессия промотора гена *yellow* (щетинки становятся желтыми). В конструкции с элементом 1A2²³⁶ не было получено ни одной зарепрессированной линии, что, возможно, свидетельствует о том, что функциональная дистальная часть 1A2 инсулятора не способна к репрессии транскрипции *yellow* на фоне мутации $mod(mdg4)^{u1}$ без проксимального района, который *in vitro* связывает белок CP190.

В линии (PRE)(1A2)Y(1A2)W была также введена мутация $mod(mdg4)^{u1}$ (рис.5B). По полученным данным эта мутация не оказывает влияния на проявление барьерной активности инсулятором 1A2. По всей видимости, такой результат исключает белок Mod(mdg4)-67.2 из списка возможных кандидатов на участие в установлении границы между активным и репрессивным хроматином.

2.3. БЕЛОК E(y)2.

Во всех сериях экспериментов мы использовали достаточно слабую мутацию $e(y)2^{u1}$, которая была получена встройкой мобильного элемента *Stalker* в промоторный участок гена, в результате чего количество мРНК гена *e(y)2* уменьшается приблизительно в 2 раза. Сама по себе эта мутация характеризуется достаточно слабыми морфологическими проявлениями: короткое бочкообразное тело, разделенные крылья, измененные фасетки, низкая фертильность. Комбинация $su(Hw)$ с $e(y)2^{u1}$ приводит к смерти на личиночной стадии. Это является иллюстрацией того, что $su(Hw)$ и $e(y)2$ функционально связаны.

Вначале была изучена роль белка E(y)2 в реализации энхансер-блокирующей активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов. Ранее полученные в нашей лаборатории по введению мутации $e(y)2^{ul}$ в EnSuY(Su)W линии (в них Su(Hw) инсулятор вставлен в положении -893 относительно начала транскрипции *yellow* и за геном *yellow*) демонстрируют, что энхансер-блокирующая активность инсулятора не изменяется. Только в одной линии, попавшей в область гетерохроматина – теломер-ассоциированную последовательность на 2L хромосоме, на фоне мутации $e(y)2^{ul}$ происходила репрессия гена *yellow* в щетинках (рис.4В, верхняя панель). По аналогичной схеме, мы решили проверить роль белка E(y)2 в работе 1A2 инсулятора. В En(1A2)YW(1A2) и En(1A2)YW(Su) конструкциях (рис.4В, две нижние панели), 1A2, окруженный *frit*-сайтами был вставлен в положении -893 относительно старта транскрипции гена *yellow*, а окруженный *lox*-сайтами 1A2 или Su(Hw) были помещены с 3' стороны гена *miniwhite*. Среди полученных трансгенных линий были найдены 4, в которых делеция переднего 1A2 инсулятора либо инактивация белка Su(Hw) приводили к репрессии гена *yellow* в щетинках. Эти линии были локализованы, и оказалось, что во всех 4 случаях конструкции встроилась в межгенные участки, на значительном расстоянии от генов. Таким образом, в этих линиях инсуляторы, с которыми связывается белок Su(Hw), скорее всего, защищают транскрипцию гена *yellow* от негативного влияния окружающего хроматина. Но самое главное – мутация $e(y)2^{ul}$ влияла на экспрессию *yellow* только в этих четырех линиях, в то время как в остальных протестированных линиях (порядка 30) на фоне этой мутации 1A2 инсулятор «вел себя в рамках стандартной», энхансер-блокирующей, активности. Однако эти результаты не являются полным доказательством вовлеченности белка E(y)2 в проявление именно барьерной активности Su(Hw) инсуляторов.

Поэтому следующим шагом стала необходимость демонстрации того, что наблюдаемые выше эффекты на щетинках не связаны со специфичным участием белка E(y)2 в экспрессии гена *yellow* в щетинках. Для этого была создана конструкция EnPrY(1A2)YW (рис.5А), в которой 1A2 инсулятор был вставлен в положении +660 в интрон гена *yellow*, между энхансером щетинок и промотором гена. В 9 из 11 трансгенных линий у мух был промежуточный уровень пигментации щетинок, что подтверждает реализацию энхансер-блокирующей активности 1A2 инсулятора в этом положении. Далее во все исследуемые линии была введена мутация $e(y)2^{ul}$, и оказалось, что уменьшение количества белка E(y)2 не влияет на 1) проявление энхансер-блокирующей активности 1A2 инсулятора, 2) эффективность действия энхансера щетинок (что видно при вырезании инсулятора из трансгенных линий). Таким образом, белок E(y)2 не участвует в активации гена *yellow* в щетинках.

Далее мы использовали трансгенные конструкции с PRE. Конструкция (PRE)(Su)YW была ранее получена в нашей лаборатории, в процессе проверки барьерной активности Su(Hw) инсулятора (рис.5Б). Для анализа были выбраны линии, в которых PRE полностью репрессировал экспрессию гена *yellow* при удалении инсулятора, и протестированы на фоне мутации $e(y)2^{ul}$. Эта мутация имела менее выраженный эффект по сравнению с фоном *su(Hw)*, но тем не менее в 8 из

16 линий уменьшение количества белка E(y)2 приводило к заметному ухудшению барьерной активности инсулятора.

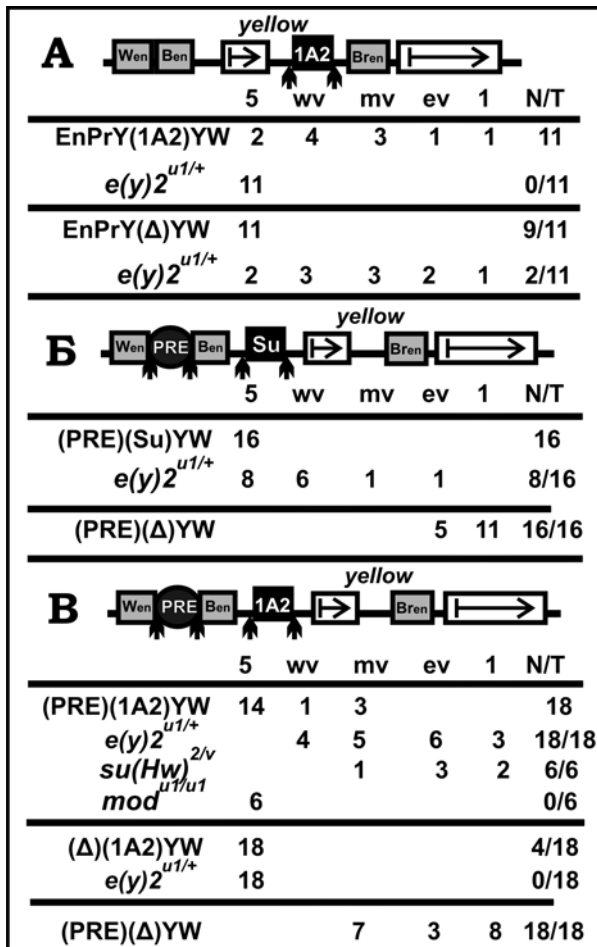


Рис.5. Изучение вклада белков E(y)2, Su(Hw), Mod(mdg4)-67.2 в барьерную активность инсулятора 1A2.
 А) Анализ EnPrY(1A2)YW – белок E(y)2 не нужен для блокирования энхансера щетинок.
 Б) Конструкция (PRE)(Su)YW. Роль белка E(y)2 в барьерной активности Su(Hw) инсулятора.
 В) Конструкция (PRE)(1A2)YW. Роль белков E(y)2, Su(Hw), Mod(mdg4) в барьерной активности 1A2 инсулятора. Оценка уровня экспрессии гена проводилась по щетинкам аналогично рис.3.

Подобная серия экспериментов была проведена и для 1A2 инсулятора (рис.5B). В конструкцию (PRE)(1A2)YW был введен аллель *e(y)2^{u1}*, в результате чего происходила практически полная репрессии гена *yellow*. То есть 1A2 инсулятор очень резко отреагировал на уменьшение количества белка E(y)2. В то же время при вырезании PRE из трансгенных линий *e(y)2^{u1}* мутация никак не влияет на уровень экспрессии гена *yellow*.

Таким образом, важным выводом этой части работы является то, что белок E(y)2 вовлечен в реализацию Su(Hw)-зависимыми инсуляторами именно барьерной, но никак не энхансер-блокирующей, активности.

Полученные результаты предполагают, что 1A2 инсулятор имеет модульное строение. Так, он содержит в своем составе, по крайней мере, два участка, обладающие разными активностями. Один участок, содержащий сайты связывания для белка Su(Hw), обладает энхансер-блокирующей и барьерной активностями, реализация первой зависит от белка Mod(mdg4)-67.2, второй – от белка E(y)2. Сам белок Su(Hw) необходим для проявления и энхансер-блокирующей и барьерной активностей. Другой участок, расположенный с 5'-стороны от первого, возможно, модулирует активность инсулятора и в некоторых случаях превращает его в репрессор. Роль белка CP190 в функционировании 1A2 инсулятора определить пока не удалось.

3. 1A2 инсулятор способен к функциональным взаимодействиям.

При постановке экспериментальных задач одной из причин детального изучения 1A2 инсулятора стала потенциальная возможность использования этого инсулятора для изучения вклада взаимодействий между инсуляторами в регуляцию экспрессии генов. Однако прежде чем использовать 1A2 инсулятор именно в этом контексте, помимо пристального изучения его энхансер-блокирующей и барьерной активностей, необходимым шагом является доказательство способности 1A2 инсулятора к функциональным взаимодействиям. Так, ранее возможности реализации такого типа взаимодействий были продемонстрированы для Su(Hw)-инсулятора и инсулятора MCP из локуса Abd-B гена.

Стоит отметить, что в первой части работы, где изучалась барьерная активность инсулятора на примере конструкции (PRE)(1A2)Y(1A2)W, для 1A2 инсулятора уже была продемонстрирована способность к функциональным взаимодействиям. Так, в большинстве трансгенных линиях наблюдалась полная репрессия гена *white*. При вырезании PRE происходило восстановление уровня экспрессии гена *white* до базового уровня. Этот результат вполне объясним, если предположить, что 1A2 инсуляторы в данном случае взаимодействуют друг с другом, в результате чего PRE приближается к промотору гена *white* и начинает репрессировать его через два инсулятора. В результате взаимодействия 1A2 инсуляторов друг с другом создается домен, в пределах которого ген *yellow* оказывается эффективно защищен от действия Рс-зависимой репрессии. Можно предположить, что домен, формируемый двумя взаимодействующими инсуляторами, стерически препятствует прямому взаимодействию репрессивного комплекса, связанного с PRE, с факторами транскрипции на промоторе гена *yellow*. В то же время, при взаимодействии инсуляторов PRE приближается к промотору гена *white*, в результате прямого контакта между белками репрессивного комплекса на PRE и транскрипционными факторами на *white* промоторе происходит репрессия транскрипции (рис.6А).

Чтобы показать, что наблюдаемый нами эффект взаимодействия двух 1A2 инсуляторов не является уникальным для модельных систем с элементами PRE, мы проверили эффективность взаимодействия между 1A2 инсуляторами на другой системе.

Для этого была создана конструкция lz(1A2)Y(1A2) (рис.6Б), в которой ген *yellow* был окружен 1A2 инсуляторами. Выше гена *yellow* в противоположном направлении вставлен ген β-галактозидазы под минимальным промотором *hsp43* (в результате ген практически не экспрессируется). За геном *yellow* были вставлены 10 сайтов связывания для дрожжевого белка-активатора GAL4, который способен активировать транскрипцию мишеневых генов только в тех случаях, когда оказывается приближен к промотору. На больших расстояниях (в данном случае порядка 5 т.п.н.) и с 3' конца гена (в данном случае *yellow*) он не работает. Скрещивая трансгенные линии с линией мух, экспрессирующей белок GAL4, активация гена β-галактозидазы не будет происходить в тех случаях, когда GAL-сайты оказываются на большом расстоянии от

hsp43 промотора. Однако если 1A2 инсульторы способны взаимодействовать друг с другом, они могут подтягивать GAL-сайты к промотору гена β-галактозидазы, и в этом случае при наличии белка GAL4 можно наблюдать активацию β-галактозидазы.

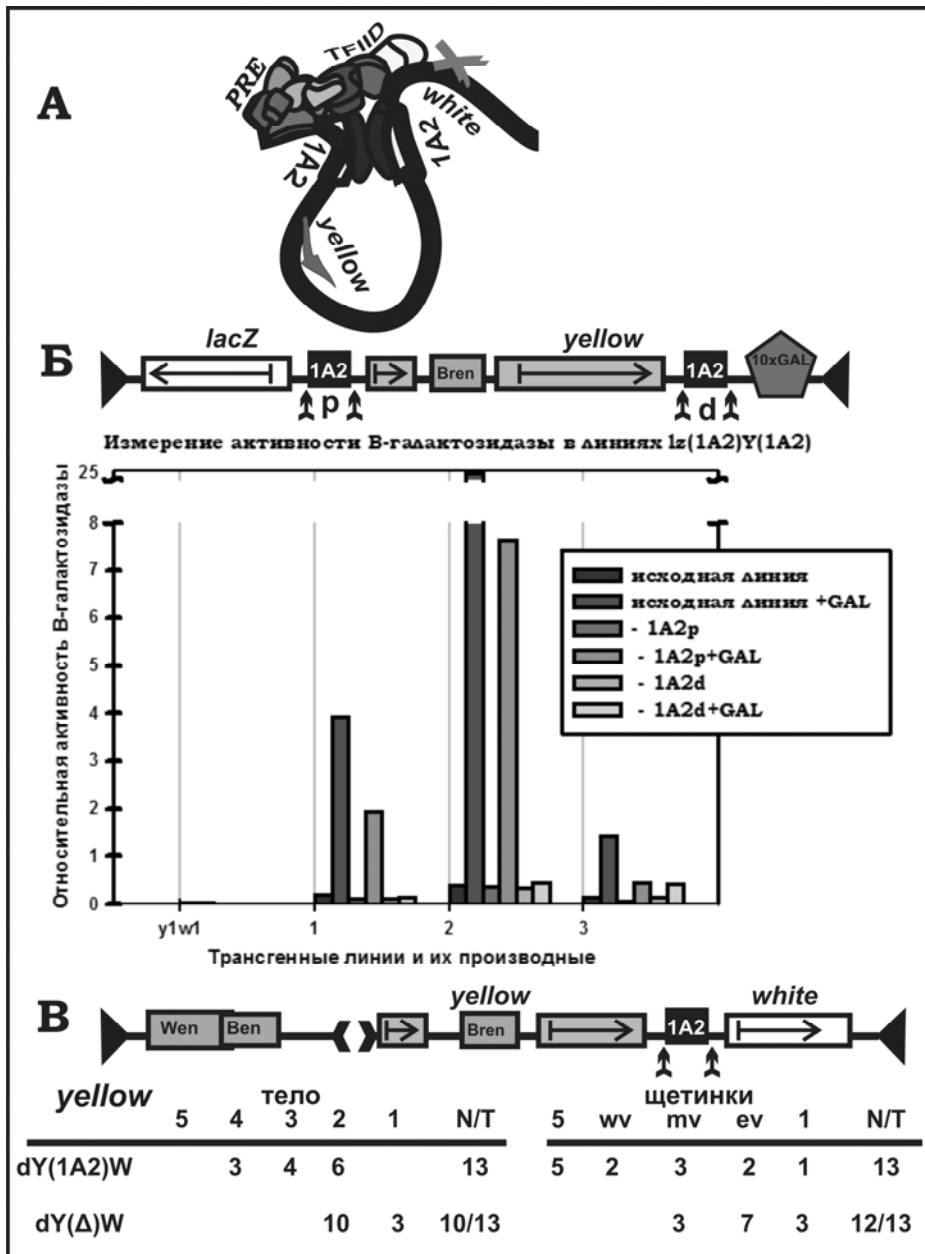


Рис.6. Способность 1A2 инсультора участвовать в установлении функциональных взаимодействий
А) модель функционирования 1A2 инсульторов при блокировании Рс-зависимой репрессии
Б) Конструкт Iz(1A2)Y(1A2). Оценивалось изменение активности гена lacZ при введении в трансгенные линии белка-активатора GAL4, способного работать на коротких дистанциях. Были проанализированы 3 линии с производными, в которых удалялись 1A2 инсульторы. Все измерения были нормированы на общее содержание белка в пробах. Представлены относительные значения активности гена в разных линиях. y¹w¹ – отрицательный контроль. 1A2p – инсультор, вставленный выше гена yellow; 1A2d – инсультор, вставленный ниже гена yellow
В) Конструкция dY(1A2)W. Скобками показана делеция в промоторной области гена yellow. Анализ экспрессии гена yellow проводился в брюшке и щетинках. Оценки уровней экспрессии аналогичны использованным в рис.2, 3.

Из полученных трансгенных линий детальный анализ активации гена β-галактозидазы был проведен для 3 линий. Приведены относительные средние значения активности β-галактозидазы, полученные в двух независимых повторностях и нормированные на общее содержание белка в пробах (рис.6Б). Из представленных данных видно, что во всех 3 линиях при введении белка GAL4 происходила активация гена β-галактозидазы. При вырезании 1A2 инсультора активность резко падает. Интересно, что при вырезании 1A2 инсультора, расположенного перед геном yellow, остается достаточно хорошо различимый уровень активации β-галактозидазы. Пока этот результат трудно объяснить с позиций известных свойств инсульторов. Однако подобные данные нами были уже получены выше, в первой части работы: при вырезании проксимального фрагмента 1A2 из конструкции с элементом PRE глаза у мух

оставались белыми, то есть уровень экспрессии гена *white* не восстанавливался даже несмотря на то, что расстояние от PRE до промотора гена *white* превышало 5 т.п.н. и перед промотором гена располагался 1A2 инсулятор, способный выполнять барьерные функции. То есть мы, по всей видимости, получили не артефакт системы, а закономерность. А в качестве объяснения такой закономерности можно предположить, что 1A2 инсулятор, расположенный в 3' области гена *yellow*, способен взаимодействовать с промотором гена *yellow*, и в результате GAL-сайты оказываются приближены к hsp43 промотору, а PRE - к промотору гена *white*.

Для подтверждения высказанной гипотезы о возможности взаимодействия между 1A2 инсулятором и промотором гена *yellow* мы использовали ранее сделанное наблюдение, что Su(Hw) инсулятор может на большом расстоянии стимулировать ослабленный промотор гена *yellow*. Наиболее вероятным объяснением такого дистанционного эффекта является прямое взаимодействие между Su(Hw) инсулятором и промотором гена *yellow*. Поэтому было решено проверить, может ли 1A2 инсулятор стимулировать ослабленный промотор гена *yellow* на большом расстоянии. Для тестирования стимулирующей активности 1A2 инсулятора была создана конструкция dY(1A2)W (рис.6B), в которой перед промотором была сделана делеция от -146 до -70 п.н. 1A2 инсулятор, окруженный *lox*-сайтами, был встроен между генами *yellow* и *white*. Возможность вырезать 1A2 инсулятор позволяла сравнивать экспрессию гена *yellow* в присутствии и отсутствии 1A2 инсулятора в одних и тех же местах генома. Во всех полученных линиях наблюдался пониженный уровень экспрессии гена *yellow*, что легко объясняется наличием в конструкции ослабленного промотора гена. При удалении инсулятора 1A2 происходило еще большее снижение уровня экспрессии гена *yellow* несмотря на то, что инсулятор располагался за геном *yellow* и не мог защищать промотор *yellow* от негативного эффекта окружающего хроматина. Следовательно, 1A2 инсулятор находясь на 3' конце гена (в своем нативном положении) может стимулировать работу ослабленного промотора. Полученные результаты можно объяснить наличием прямых взаимодействий между белковыми комплексами, собранными на промоторе и инсуляторе. Однако о глобальной роли установления таких связей в геноме дрозофилы пока ничего нельзя сказать. В дальнейшем неплохо было бы провести проверку на наличие таких взаимодействий непосредственно в локусе *yellow* в геноме дрозофилы.

Итак, два 1A2 инсулятора способны осуществлять функциональные взаимодействия даже на расстоянии в 5 т.п.н. через активный ген *yellow*. Полученные данные предполагают, что 1A2 инсулятор способен образовывать слабые контакты (прямые или опосредованные – неизвестно) с промоторной областью гена *yellow*.

II. ДЕМОНСТРАЦИЯ ВОЗМОЖНОГО УЧАСТИЯ ИНСУЛЯТОРОВ В УСТАНОВЛЕНИИ ЭНХАНСЕР-ПРОМОТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ.

В рамках этого раздела на примере «минимальной» системы с двумя генами осуществлена попытка демонстрации потенциальной возможности инсуляторов регулировать взаимодействия между энхансерами и промоторами. Необходимо отметить, что самая главная

задача при проведении этой части работы - показать, что инсуляторы являются не просто границами разделяющими независимые домены транскрипции. На самом деле даже просто разные варианты Su(Hw)-зависимых инсуляторов способны очень специфично и тонко регулировать уровень транскрипции генов. Несмотря на одинаковую природу этих инсуляторов и на то, что все они способны взаимодействовать друг с другом, эффекты таких взаимодействий порой оказываются непредсказуемыми. В соответствии с главной целью данной работы предполагается не только показать простую возможность взаимодействия разных инсуляторов друг с другом, но, прежде всего, на примере простой трансгенной системы представить насколько обширным может оказаться поле для возможностей тонкой регулировки работы генов благодаря межинсуляторным, по всей видимости, многополярным, взаимодействиям.

1. ДИЗАЙН ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ РАЗНЫМИ НАБОРАМИ ИНСУЛЯТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ.

Вся работа для упрощения интерпретации получаемых результатов была проведена на Su(Hw)-зависимых инсуляторах (рис.7А):

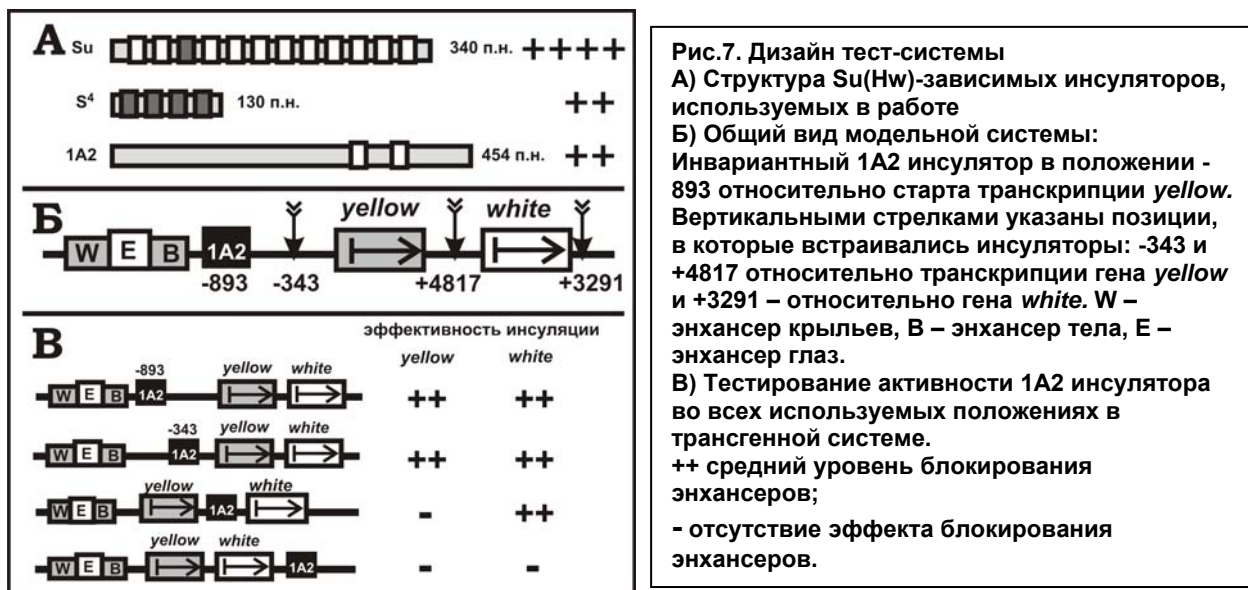
- Инсулятор Su(Hw) в 340 п.н. из ретротранспозона МДГ4, содержащий 12 сайтов связывания для белка Su(Hw), соединенных друг с другом АТ-богатыми последовательностями. Самый сильный из известных инсуляторов дрозофилы.
- Синтетический элемент S⁴, полученный путем тетрамеризации 30 п.н. последовательности, соответствующей 3-му сайту связывания Su(Hw) с окружающими участками в Gy инсуляторе. Средний по силе инсулятор.
- 1A2 инсулятор с 2 Su(Hw)-связывающими сайтами. Средний по силе инсулятор.

В одной серии конструкций окруженный *fmt*-сайтами 1A2 инсулятор был вставлен в положении -893 относительно старта транскрипции *yellow*, между энхансерами и промоторами генов, а окруженный *lox*-сайтами 1A2, S⁴ или Su(Hw) инсуляторы были встроены с 3' стороны гена *white* (рис.7Б, положение +3291). Таким образом, в данных конструкциях 2 вырезаемых инсулятора окружают оба маркерных гена, что дает возможность проверить, способны ли инсуляторы функционально взаимодействовать друг с другом на расстоянии в 10 т.п.н.

В другой серии 'инвариантный' 1A2 располагается в положении -893, в то время как 2 вырезаемых 1A2, S⁴ или Su(Hw) инсулятора встроены в положении -343 (*fmt*) и +4817 (*lox*) относительно начала транскрипции *yellow* (рис.7Б). Таким образом, в этих конструкциях можно сравнивать энхансер-блокирующую активность 1A2 инсулятора в комбинации с другими инсуляторами, помещенными либо между энхансерами и промотором гена *yellow* либо за 3' концом гена *yellow*.

Традиционно основная часть работ по функциональным взаимодействиям инсуляторов проводится на примере Su(Hw) инсулятора. Это очень сильный инсулятор, способный, с одной стороны, в случае одной копии, полностью изолировать энхансеры от промоторов, с другой стороны, в случае тандемной встройки 2 инсуляторов, эффективно сближать энхансер с

промотором. Однако вследствие большой силы инсулятора Su(Hw) промежуточные уровни инсуляции обычно оказывается невозможно продемонстрировать. С этой точки зрения 1A2 инсулятор является более чувствительным: так, он обладает всеми типичными инсуляторными активностями (что детально было продемонстрировано в первой части работы), при этом по сравнению с инсулятором Su(Hw) как более слабый инсулятор он будет работать в гораздо более чувствительной манере (появляется большое число промежуточных уровней блокирования энхансеров). Соответственно, и созданная на базе 1A2 инсулятора тест-система для изучения вклада инсуляторов в установление энхансер-промоторных взаимодействий будет обладать большей чувствительностью.



Прежде чем использовать 1A2 инсулятор в таком контексте был проведен контроль всех позиций в трансгенной системе, в которые планировалось встраивать инсуляторы. Так, была проанализирована серия конструкций (рис.7В), в которых 1A2 инсулятор был помещен в разные места относительно энхансеров и промоторов генов: -893, -343, +4817 относительно начала транскрипции гена *yellow* и +3291 относительно начала транскрипции гена *white*. Выше уже было показано, что в положении -893 1A2 инсулятор способен частично изолировать энхансер от промотора, далее такой уровень энхансер-блокирующей активности мы будем считать средним. В то же время энхансер-блокирующую активность, соответствующую Su(Hw) инсулятору, будем считать полной. При приближении инсулятора к промотору гена *yellow* в положении -343 1A2 инсулятор блокирует энхансеры генов *yellow* и *white* от промоторов с такой же средней силой. 1A2 инсулятор, помещенный между генами *yellow* и *white*, нормально инсулирует ген *white*, в то же время на уровень экспрессии гена *yellow* не влияет, что полностью согласуется с принципами реализации энхансер-блокирующей активности. Аналогично 1A2 инсулятор, размещенный ниже гена *white*, не оказывает никакого влияния на уровни экспрессии маркерных генов.

2. СИЛА ВЛИЯНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ИНСУЛЯТОРАМИ НА РАБОТУ ГЕНОВ ЗАВИСИТ ОТ ВЗАИМНОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ И РАССТОЯНИЙ МЕЖДУ ВСЕМИ УЧАСТНИКАМИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ СИСТЕМЫ.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ТАНДЕМНО РАСПОЛОЖЕННЫМИ ИНСУЛЯТОРАМИ – ВСЕГДА ЛИ РАБОТАЕТ НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ?

Прежде всего, было проведено сравнение энхансер-блокирующей активности 1A2 инсулятора в его комбинации с другим инсулятором, вставленным тандемно близко перед промотором гена *yellow*, но на расстоянии в 5 т.п.н. от промотора гена *white*.

Сначала проанализируем результаты по отношению к гену *yellow* (рис.8Б): во всех тестируемых тандемах (1A2–1A2, 1A2–S⁴, 1A2–Su) энхансеры достаточно эффективно активируют промотор, демонстрируя ранее описанный феномен нейтрализации инсуляции (Muravyova et al., 1999). Неожиданным оказался результат, полученный для гена *white*. Во всех 3 вариантах (рис.8Б) уровень инсуляции гена заметно не изменялся в присутствии одной или двух копий инсулятора. То есть в данном случае функциональные пары инсуляторов, расположенные на значительном расстоянии от промотора гена *white*, никоим образом не способны приводить к проявлению эффекта нейтрализации инсуляции.

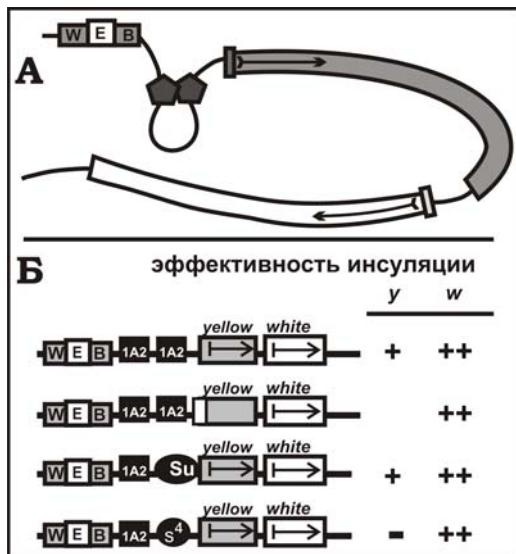


Рис.8. Эффекты взаимодействий между тандемно расположенными инсуляторами.
А) Модель влияния на энхансер-промоторную коммуникацию тандемно встроенных инсуляторов (пятиугольники): промотор гена *yellow* (серый прямоугольник) приближен к энхансерам и нормально активируется, промотор гена *white* (белый прямоугольник) оказывается в невыгодной конфигурации по отношению к энхансеру.
Б) Анализ эффективности блокирования промоторов генов *yellow* и *white* от их энхансеров:
 ++ средний уровень;
 + слабый уровень;
 - нейтрализация инсуляции.
 y – *yellow*.
 w – *white*.

Объяснение этого результата связано с двумя возможностями: во-первых, наблюдаемые эффекты могут быть сильно зависимы от природы энхансеров и/или промоторов, используемых в модельной системе, во-вторых, все регуляторные элементы в данной системе распределены в определенном порядке и на определенных расстояниях друг относительно друга. В данном случае (рис.8А) промотор гена *yellow* достаточно близко расположен по отношению к инсулятору, в результате при взаимодействии 2 инсуляторов энхансеры гена *yellow* оказываются в непосредственном соседстве с промотором. В то же время промотор гена *white* находится очень далеко от инсуляторов - на расстоянии в 5 т.п.н.,- и в данном случае при взаимодействии между инсуляторами расстояние от промотора гена *white* до энхансера практически не изменяется (с 5 т.п.н. до 4,5 т.п.н.). Другими словами, полученные результаты показывают, что взаимодействие

между tandemно расположенными инсуляторами помогает энхансеру активировать промотор только в том случае, когда инсуляторы оказываются вблизи энхансера и промотора и в процессе взаимодействия инсуляторов друг с другом происходит значительное сближение энхансера с промотором. В то же время существует еще один вариант возможного объяснения: не «оттягивает» ли на себя сигнал, идущий от всех энхансеров, промотор гена *yellow*, который в результате взаимодействия инсуляторов оказался в более выгодном положении относительно энхансеров по сравнению с промотором *white*. Для ответа на этот вопрос с парой 1A2 инсуляторов была сделана конструкция, в которой промотор гена *yellow* был удален. Как видно, результаты по уровню транскрипции гена *white* никак не отличаются от полученных выше. Это говорит о том, что в данном случае при интерпретации результатов, действительно, скорее всего, основное значение следует отводить расстоянию между элементами.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ИНСУЛЯТОРАМИ, ОКРУЖАЮЩИМИ ПЕРВЫЙ МАРКЕРНЫЙ ГЕН – ЧТО ПРОИЗОЙДЕТ ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ ИНСУЛЯТОРАМИ?

Следующим логичным шагом стала проверка значения линейных расстояний между взаимодействующими элементами при активации энхансером мишеневого промотора. В результате были проанализированы варианты, в которых инсулятор был приближен к промотору гена *white* и находился между генами, так что ген *yellow* оказывался окруженным инсуляторами (рис.9Б).

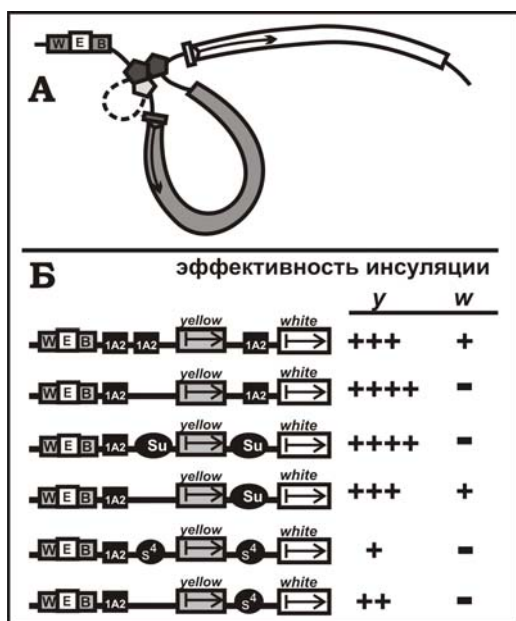


Рис.9. Эффекты взаимодействий между инсуляторами, окружающими один ген.
А) Модель влияния на энхансер-промоторную коммуникацию инсуляторов, фланкирующих ген: промотор гена *yellow* оказывается блокирован в петле и поэтому активация не происходит, промотор гена *white* в результате взаимодействия между инсуляторами сближается с энхансером и запускается активация гена *white*.
Б) Анализ эффективности блокирования промоторов генов *yellow* и *white*:
 ++++ полная инсуляция;
 +++ сильный уровень;
 ++ средний уровень;
 + слабый уровень;
 - нейтрализация инсуляции.

Как видно из представленных данных, при размещении инсулятора перед геном *white* во всех случаях изоляция его промотора снимается (рис.9Б, панели 2,4,6). Этот результат подтверждает предположение о том, что при помещении инсулятора вблизи промотора гена в результате взаимодействия между инсуляторами происходит уменьшение физического расстояния между энхансером и промотором, энхансер оказывается в выгодной конфигурации по отношению к промотору и начинает его эффективно активировать (рис.9А).

В то же время для *yellow* полученная картина тоже логично вписывается в логику наших рассуждений: эффект нейтрализации, наблюдаемый в предыдущей серии экспериментов, отсутствует (рис.9Б, панели 2,4,6). Более того, в парах 1A2-1A2 и 1A2-Su энхансер-блокирующая активность 1A2 инсулятора значительно усиливается.

Интересно, как будут перераспределяться «мощности», если в системе находятся все три инсулятора – можно было бы предположить, что преимущественно будут реализовываться взаимодействия между более близко друг по отношению к другу расположенными инсуляторами. Однако оказалось, что не все так просто (рис.9Б, панели 1,3,5): для гена *white* во всех случаях наблюдалась очень слабая инсуляция, а для гена *yellow*, в зависимости от конкретных комбинаций инсуляторов блокирование энхансеров варьировало от слабого до полного уровня. То есть, скорее всего, в данном случае мы имеем дело не с парами взаимодействующих инсуляторов, а с комбинациями именно из трех инсуляторов, так как два инсулятора, расположенные в предпромоторной области гена *yellow* не способны нейтрализовать друг друга в том случае, когда у них появляется третий напарник, размещенный ниже гена *yellow*.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ИНСУЛЯТОРАМИ, ОКРУЖАЮЩИМИ ОБА МАРКЕРНЫХ ГЕНА – МОЖНО ЛИ «СМОДЕЛИРОВАТЬ» НЕЗАВИСИМЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ДОМЕН?

В предыдущем разделе был описан случай значительного усиления энхансер-блокирующей активности 1A2 инсулятора в тех вариантах конструкций, когда инсулятор-партнер находился ниже гена *yellow* на расстоянии в 5 т.п.н. от инвариантного инсулятора. Для проверки возможностей взаимодействия между инсуляторами на еще более внушительных расстояниях мы переместили инсулятор еще дальше, расположив его ниже гена *white*. Таким образом, расстояние между потенциально взаимодействующими инсуляторами увеличилось до 10 т.п.н.

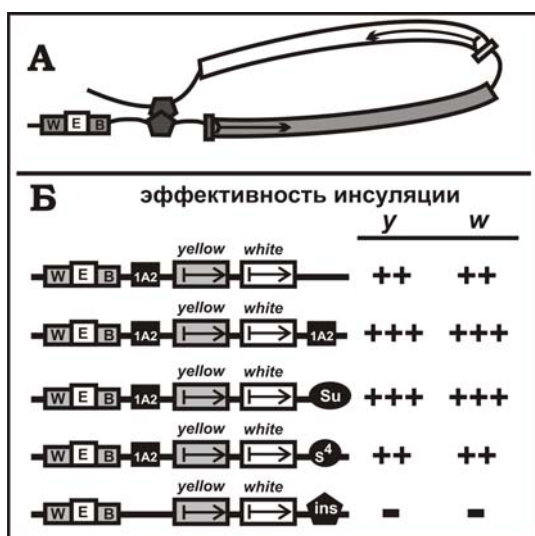


Рис.10. Эффекты взаимодействий между инсуляторами, окружающими два гена.
А) Модель влияния на энхансер-промоторную коммуникацию инсуляторов, фланкирующих два гена: промоторы генов *yellow* и *white* оказываются блокированы в петле и поэтому активация не происходит, более того, в результате взаимодействия между инсуляторами происходит значительное увеличение силы 1A2 инсулятора.
Б) Анализ эффективности блокировании промоторов генов *yellow* и *white*:
 +++ сильный уровень;
 ++ средний уровень;
 - отсутствие инсуляции.

Аналогичным образом 1A2 и Su(Hw) инсуляторы, вставленные ниже гена *white*, достаточно ощутимо увеличивали энхансер-блокирующую активность 1A2 инсулятора, расположенного перед геном *yellow* (рис.10Б). Единственным исключением, как и в случае с меньшим расстоянием (5 т.п.н.), оказалась комбинация с S⁴ инсулятором, который в этом

положении никак не влияет на усиление или ослабление активности промоторов генов, заключенных между инсуляторами.

Таким образом, по всей видимости, инсуляторы (1A2 и Su(Hw)), окружая маркерные гены, способны образовать петлю, которая формируется в виде компактно распределенной в пространстве структуры с конформационно и стерически изолированными регуляторными элементами (рис.10А). Однако природа взаимодействующих инсуляторов играет важную роль в формировании стабильной петли с эффективно изолированной от энхансеров конфигурацией. Вполне возможно, что на этом этапе важная роль отводится структуре белковых комплексов, связывающихся со взаимодействующими инсуляторами и стабилизирующих структуру петли – в одних случаях конформационно петля оказывается изолирована от поступающих извне сигналов, в других случаях (с другими белковыми комплексами) наоборот элементы, попавшие в петлю оказываются подвержены влиянию внешних элементов (как в случае с S⁴ инсулятором).

Таким образом, стерически-конформационная изоляция энхансеров сильно зависит от природы взаимодействующих инсуляторов, их окружения, взаимного расстояния и расположения энхансеров и промоторов.

3. ЗНАЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ИНСУЛЯТОРОВ ПРИ МОДУЛИРОВАНИИ ЭНХАНСЕР-ПРОМОТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ – SU(HW)-ЗАВИСИМЫЕ ИНСУЛЯТОРЫ НЕ ЕДИНЫ В ЭФФЕКТАХ ВЛИЯНИЯ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.

В результатах, представленных выше ясно видно, что поведение инсулятора S⁴ сильно отличается от 1A2 и Su(Hw). Можно было бы предположить, что он не взаимодействует с другими инсуляторами, однако при демонстрации феномена нейтрализации эффекта инсуляции для генов *yellow* и *white* он вел себя типично, не выбиваясь из рядов Su(Hw)-зависимых инсуляторов. В то же время в тестах по усилению энхансер-блокирующей активности инсуляторов и моделированию независимых доменов экспрессии он начинал проявлять себя в нетипичной манере, не оказывая никакого влияния на уровни экспрессии генов. Возможно, S⁴ инсулятор способен каким-то образом переключать активность 1A2 инсулятора либо взаимодействие между S⁴ инсуляторами создает особую конфигурацию, отличающуюся от создаваемых остальными наборами инсуляторов. Так, мы решили разобраться, какое направление реализуется в действительности. Поэтому для этого инсулятора была создана более «гомогенная» система, в которой инвариантный 1A2 инсулятор был заменен на S⁴. Итоговая конструкция содержала 3 копии инсулятора S⁴.

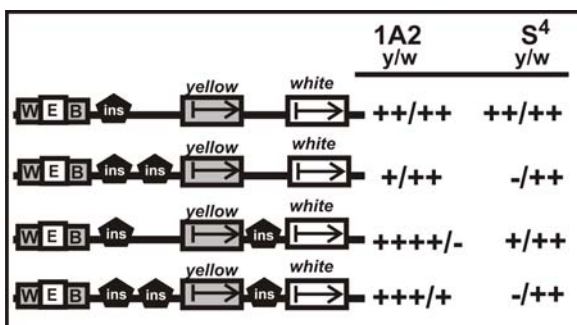


Рис.11. Сравнение функциональных активностей 1A2 и S⁴ инсуляторов. Анализ эффективности блокирования промоторов генов *yellow* и *white*:
 ++++ полная инсуляция;
 +++ сильный уровень;
 ++ средний уровень;
 + слабый уровень;
 - отсутствие инсуляции.
 Пятиугольники – 1A2 или S⁴ элемент

Как видно из результатов по этой конструкции инсулятор S^4 ведет себя во всех комбинациях точно также как и в сочетании с 1A2 инсулятором (особенно интересно, что усиление изоляции гена *yellow* в тех случаях, когда он оказывается окружен двумя S^4 инсуляторами, не происходит). Вполне возможно, что на S^4 элементах собираются белковые комплексы, отличные от 1A2 инсулятора, в результате чего формируется особая пространственная структура (в которой, например, по-особому изогнута ДНК-последовательность) и оказавшиеся в ней регуляторные элементы не оказываются функционально изолированными от внешних элементов, расположенных вне петли.

Таким образом, изоляция энхансера от промотора в петле далеко не всегда приводит к усилению энхансер-блокирующего эффекта. Возможно, это связано с формированием разных по природе белковых комплексов, собирающихся на разных типах инсуляторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе в процессе изучения структурно-функциональных особенностей эндогенного Su(Hw)-зависимого инсулятора был идентифицирован новый белковый компонент, участвующий в работе Su(Hw)-инсуляторов. Это белок E(y)2, способный связываться с цинковыми пальцами белка Su(Hw). E(y)2 необходим для осуществления инсулятором барьерной активности. Так, он является компонентом SAGA комплекса, одной из функций которого является ацетилирование гистонов. Можно предположить, что Su(Hw) рекрутирует через взаимодействие с белком E(y)2 SAGA комплекс, который, ацетилируя окружающие гистоны, блокирует распространение зоны гетерохроматина. Полученные в данной работе результаты для инсулятора 1A2 согласуются с этим механизмом, так как при введении мутации по гену *e(y)2* наблюдалось значительное снижение способности 1A2 инсулятора блокировать Pc-зависимую репрессию. Таким образом, в данной работе удалось не только разделить энхансер-блокирующую и барьерную активности, но и определиться с белками, осуществляющими каждую из этих активностей. Оказалось, что, в принципе, можно проводить параллель с наиболее хорошо изученным у позвоночных инсулятором 5'HS4 из β -глобинового локуса кур, в котором за энхансер-блокирующую и барьерную активности отвечают разные белки – CTCF и USF, соответственно. В случае с Su(Hw)-инсуляторами получена подобная картина: блокирование энхансеров – белок Mod(mdg4)-67.2, барьер между активным и зарепрессированным хроматином – белок E(y)2. Но есть и отличие, заключающееся в следующем: белки CTCF и USF содержат в своем составе ДНК-связывающие домены и поэтому посадочной площадкой для них выступает ДНК-последовательность инсулятора, а белки Mod(mdg4)-67.2 и E(y)2 специфичных ДНК-связывающих доменов не имеют, поэтому они пользуются услугами посредника, в роли которого выступает ДНК-связывающий белок Su(Hw), способный специфично взаимодействовать и с белками Mod(mdg4)-67.2 и E(y)2 и с ДНК-последовательностью инсулятора.

Далее в данной работе не просто продемонстрирована возможность функционального взаимодействия между инсуляторами. Здесь показано, что взаимодействия между одними и теми же наборами инсуляторов в одних случаях приводят к усилению эффекта изоляции энхансера от промотора, в других случаях, наоборот, способствуют сближению этих регуляторных элементов и эффективной активации энхансером промотора. Уровень влияния инсуляторов на регуляцию экспрессии гена зависит от природы инсуляторов-участников взаимодействия, взаимного расположения и расстояний между всеми элементами, вовлеченными в регуляторную машину, и их относительной «силы» друг по отношению к другу. Вероятно, что функционирование данного инсулятора сильно зависит от свойств самого инсулятора, его локализации относительно энхансера и промотора и присутствия других инсуляторов. Кроме этого нельзя исключать участие дополнительных сил в установлении определенного статуса экспрессии гена. Так, не исключено, что взаимодействие инсуляторов с белками ядерного скелета также может модулировать (усиливать или ослаблять) эффективность блокирования энхансеров. Наконец, активность инсуляторов, способных создавать границы между активным и неактивным хроматином, возможно, реализуется за счет привлечения инсуляторами комплексов, модифицирующих гистоны.

Можно предположить, что одной из функций регуляторных элементов, обладающих свойствами инсуляторов, является контроль за установлением правильных взаимодействий между энхансерами и промоторами. За счет эффективного и селективного взаимодействия на больших дистанциях инсуляторы могут регулировать пространственную локализацию хромосом в ядре. При активации ген перемещается в зоны активной транскрипции, названные «транскрипционными фабриками», в то же время неактивные гены аналогичным образом группируются в зонах с повышенным содержанием репрессоров (*West, Fraser, 2005*). Возможно, что инсуляторы с регулируемой активностью могут участвовать в таких процессах перелокализации генов в ядре.

Таким образом, стерическая изоляция энхансера может являться только одной из составляющих механизма действия инсуляторов. Образование петель само по себе не объясняет эффективную изоляцию энхансера от промотора. Например, в данной работе было показано, что как минимум три инсулятора могут одновременно взаимодействовать и в результате определять, какой из двух промоторов генов *yellow* и *white* оказывается более предпочтительным для активации энхансерами. Кроме этого рядом с инсуляторами могут находиться сайты связывания для регуляторных белков, рекрутируемых на энхансер или промотор или определяющих способность данного инсулятора взаимодействовать с другими инсуляторами в геноме для установления дальних взаимодействий между энхансерами и промоторами.

Хотя некоторые свойства и механизмы действия регуляторных элементов, обладающих свойствами инсуляторов, становятся понятными, их роль в регуляции транскрипции только начинает проясняться. Возможно, для того чтобы пролить свет на решение этой фундаментальной

проблемы, целесообразным шагом будет поиск новых подходов, направленных на изучение регулируемости и функциональной нагрузки взаимодействий между регуляторными элементами на больших дистанциях.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что 1A2 инсулятор имеет модульное строение: дистальная (236 п.н.) относительно гена *yellow* часть 1A2 инсулятора, содержащая два сайта связывания для белка Su(Hw), является достаточной для инсуляции, а проксимальная часть (218 п.н.) модулирует активность инсулятора и определяет способность инсулятора являться промотор-специфичным сайленсером в отсутствие белка Mod(mdg4).
2. Продемонстрировано, что за барьерную активность Su(Hw)-зависимых инсуляторов отвечает белок E(y)2, который связывается с доменом цинковых пальцев белка Su(Hw).
3. Впервые продемонстрировано, что как минимум три разных по структуре Su(Hw)-зависимых инсулятора могут функционально взаимодействовать друг с другом на расстоянии до 10 т.п.н.
4. Показано, что степень изоляции энхансера от промотора сильно зависит от природы участвующих в регуляторной системе инсуляторов, их окружения, взаимных расстояний и расположения.
5. Продемонстрировано, что изоляция энхансера от промотора в петле далеко не всегда приводит к усилению энхансер-блокирующего эффекта. Возможно, это связано с формированием разных по природе белковых комплексов, собирающихся на разных типах инсуляторов.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Максименко О.Г., Четверина Д.А., Георгиев П.Г. 2006. Свойства, механизмы действия инсуляторов высших эукариот и их роль в регуляции транскрипции. *Генетика* **42** (8), 845-857.
2. Kurshakova M. *, Maksimenko O. *, Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. 2007. Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Molecular Cell* **27**, 332-338.
3. Максименко О.Г., Георгиев П.Г. 2007. Исследование барьерной активности 1A2-инсулятора *Drosophila melanogaster*. *ДАН* **416** (2).
4. Максименко О.Г., Георгиев П.Г. 2007. Изучение структуры 1A2-инсулятора *Drosophila melanogaster*. *ДАН* **416** (3).
5. P. Georgiev, M. Kostuchenko, E. Kravchenko, D. Chetverina, O. Maksimenko, A. Parshikov, L. Melnikova, A. Golovnin. The mechanisms of long-distance interactions and insulator action in *Drosophila melanogaster*. HHMI, Merida, Mexico. June 22-25, 2005.

6. Максименко О.Г. Изучение свойств эндогенного Su(Hw) инсулятора у *Drosophila melanogaster*. Материалы школы-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия», Звенигород, 28 ноября-1 декабря 2005 г.
7. Максименко О.Г., Георгиев П.Г. Структура и функциональные взаимодействия 1A2 инсулятора у *Drosophila melanogaster*. Материалы 10-й Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 17-21 апреля 2006 г.
8. Максименко О.Г., Куршакова М.М., Краснов А.Н., Георгиев П.Г. Исследование участия белка E(y)2 в реализации барьерной активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов *D.melanogaster*. Материалы 14-й Международной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2007», Москва, МГУ, 17-21 апреля 2006 г.
9. Maksimenko O., Kurshakova M., Golovnin A., Georgiev P. E(y)2 protein is essential for the barrier activity of the Su(Hw) insulators in *Drosophila melanogaster*. 4th Elmau conference on nuclear organization at Gosau, Austria, October 12th – October 15th 2006.