

На правах рукописи
УДК 575.22:595.773.4.

Тошаков Степан Владимирович

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ГРАНИЦАМИ
РЕГУЛЯТОРНЫХ ДОМЕНОВ ГЕНА *ABD-B* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2009

Работа выполнена в лаборатории регуляции генетических процессов
Учреждения Российской академии наук Институт биологии гена РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Кырчанова О.В.

Официальные оппоненты:

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

кандидат биологических наук Котнова А.П.

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

Защита диссертации состоится "27" октября 2009 года в 11 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук
Институт биологии гена РАН по адресу:
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии
наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу:
119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан "25" сентября 2009 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Дифференцировка клеток многоклеточного организма происходит благодаря эффективной регуляции экспрессии генов, которая обеспечивается специфическими *цис*-регуляторными элементами активирующими транскрипцию (энхансерами) или репрессирующими ее (сайленсерами). В геноме высших эукариот энхансеры и сайленсеры зачастую находятся на больших расстояниях от контролируемого промотора. Нередко между ними находятся гены с независимой программой экспрессии. Считается, что роль границ независимых доменов экспрессии играют инсуляторы. Инсуляторы – это *цис*-регуляторные элементы, которые способны функционально изолировать промотор от энхансера, если располагаются между ними, а также ограничивать распространение репрессии (Cai et al., 1995; Gerasimova et al., 1996).

Удобной моделью для изучения механизмов взаимодействия между энхансерами и промоторами является регуляторная область *Abd-B* гена *Drosophila melanogaster*. Регуляторная область *Abd-B* размером около 60 тпн содержит четыре энхансера (*iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, *iab-8*), каждый из которых определяет уровень экспрессии гена в соответствующем брюшном парасегменте. Энхансеры отделены друг от друга границами, три из которых были подробно изучены: *Mcр*, *Fab-7* и *Fab-8*. Было продемонстрировано, что в состав этих границ входят инсуляторы (Karch et al., 1994; Barges et al., 2000; Zhou et al., 1999; Gruzdeva et al., 2005). Таким образом энхансеры *Abd-B* способны активировать промотор несмотря на то, что они окружены инсуляторами. На основании этого было выдвинуто предположение о том, что инсуляторы *Vithorax* комплекса обладают дополнительными функциями. Продемонстрировано, что граница *Fab-7* может осуществлять физическое взаимодействие с предпромоторной областью гена *Abd-B* в некоторых тканях (Cleard et al., 2006). Исходя из этого, можно предположить, что границы регуляторных доменов отвечают за специфичную коммуникацию между энхансерами и промотором гена *Abd-B*.

Таким образом, для понимания механизмов, обеспечивающих специфичную и эффективную регуляцию экспрессии генов, очень важным является исследование дистанционных взаимодействий.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование взаимодействий между границами Fab-7, Fab-8 и предпромоторной областью гена *Abd-B*.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать способность границы Fab-8 и ее составных частей к взаимодействию на больших дистанциях.
2. Изучить способность белка dCTCF поддерживать дистанционные взаимодействия.
3. Исследовать возможность взаимодействий между различными границами гена *Abd-B* (Fab-7 и Fab-8)
4. Проверить на модельной системе способность границ гена *Abd-B* к коммуникации с его промоторной областью.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Подтверждена способность Fab-8 инсультатора взаимодействовать со своей копией на больших дистанциях. Идентифицированы минимальные фрагменты границы Fab-8, поддерживающие дистанционные взаимодействия.

Впервые на примере Fab-7 и Fab-8 продемонстрирована способность гетерологичных инсультаторов взаимодействовать друг с другом.

На трансгенной модели показана способность границ регуляторных доменов к осуществлению коммуникации с промоторной областью *Abd-B*. Полученные результаты позволяют глубже понять роль инсультаторов во взаимодействиях между энхансерами и промоторами.

Показано, что дрозофилиный гомолог инсультаторного белка позвоночных СТСФ (dCTCF) участвует в коммуникации границ на больших дистанциях. Получены результаты, свидетельствующие о наличии неизвестных белков, участвующих в организации дальних взаимодействий. Это является фундаментом для продолжения исследований по их идентификации.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 11-й международной школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007), международной конференции молодых ученых по молекулярной биологии и генетике (Киев, 2007), первом всероссийском биологическом конгрессе «Симбиоз Россия 2008» (Казань, 2008), на пятом съезде

ВОГиС (Москва, 2009), на Конференции по структуре и динамике ядра (Марсель, Франция, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано шесть печатных работ, из них статей – 1, тезисов устных и стендовых сообщений – 5.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 99 страницах, включает 2 таблицы, 21 рисунок и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов, Обсуждения результатов, Выводов и Списка литературы, включающего 127 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Исследование способности *Fab-8* инсультора взаимодействовать на больших дистанциях

Ранее было продемонстрировано, что в трансгенных системах две копии *Msр* или *Fab-7* инсультора могут взаимодействовать друг с другом на большой дистанции, тем самым облегчая коммуникацию между удаленными друг от друга энхансером и промотором (Gruzdeva et al., 2005; Rodin et al., 2007). Исходя из этого, можно допустить, что *Fab-8* обладает аналогичными свойствами.

Для тестирования способности элементов осуществлять взаимодействия на больших дистанциях, была использована разработанная ранее *G4-white* модельная система на основе генов *yellow* и *white* дрозофилы и неспецифического дрожжевого активатора GAL4 (Kurchanova et al., 2007). Эксперименты на дрожжах показали, что уровень стимуляции GAL4 активатором снижается по мере удаления GAL4 связывающих сайтов от промотора (De Bruin et al., 2001, Guarente et al., 1984, Struhl et al., 1984). 10 GAL4-связывающих сайтов (G4) были встроены в положении -893 от старта транскрипции гена *yellow*. В результате расстояние между G4 и промотором гена *mini-white* составляло около 5,5 тпн (рис 1). Были получены экспериментальные подтверждения того, что у дрозофилы GAL4 не способен активировать промотор гена *mini-white*, расположенного с 3' конца от гена *yellow* (Kurchanova et al., 2007). Однако, если рядом с G4-сайтами и промотором гена *mini-white* встроить элементы, способные к коммуникации на большом расстоянии (рис. 1), при их взаимодействии G4-сайты будут подтягиваться к промотору гена *mini-white* и активировать его. При

этом участок ДНК, находящийся между взаимодействующими элементами, будет выпетливаться.

Экспрессия белка GAL4 в трансгенных линиях достигалась путем скрещивания с линией мух, несущей ген *GAL4* под контролем тубулинового промотора, который обеспечивает экспрессию белка во всех тканях и на всех стадиях развития.

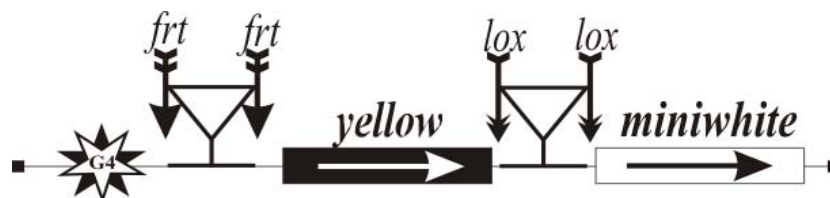


Рисунок 1. Схема трансгенной конструкции, используемой для тестирования различных элементов на способность к взаимодействию. Гены *yellow* и *mini-white* обозначены квадратами, направление транскрипции – стрелками. Стрелки, направленные вниз, обозначают сайты узнавания сайт-специфических рекомбиназ Fpr (*frr*-сайты) и Cre (*lox*-сайты). Сайты связывания GAL4 обозначены «G4». Треугольники обозначают места инсерции тестируемых фрагментов.

В составе границы Fab-8 были идентифицированы два функционально различных элемента: Fab-8 инсулятор и PTS (Promoter Targeting Sequence) элемент (рис.2). Элемент PTS обладает свойством преодолевать активность инсулятора, позволяя энхансеру эффективно стимулировать промотор (Zhou et al., 1999). Прежде всего, на способность взаимодействовать на больших дистанциях, был испытан фрагмент включающий оба эти элемента PTS/F8. Были созданы конструкции G4(P_{TS}/F8)Y(P_{TS}/F8^R)W и G4(P_{TS}/F8^R)Y(P_{TS}/F8^R)W (рис 3А,Б). Так как ранее было показано, что взаимодействие между инсуляторами может быть ориентационно-зависимым (Kurganova et al., 2007), элементы PTS/F8 в этих конструкциях были вставлены в противоположной и в прямой ориентации относительно друг друга.

В результате трансформации эмбрионов дрозофилы конструкцией G4(P_{TS}/F8)Y(P_{TS}/F8^R)W было получено 16 трансгенных линий, содержащих единичную инсерцию. При стимуляции транскрипции GAL4 активатором происходило значительное усиление пигментации глаз во всех 16 линиях (рис. 3А).

Таким образом, PTS/F8 способны взаимодействовать друг с другом, позволяя GAL4 активатору эффективно стимулировать промотор гена *mini-white*.

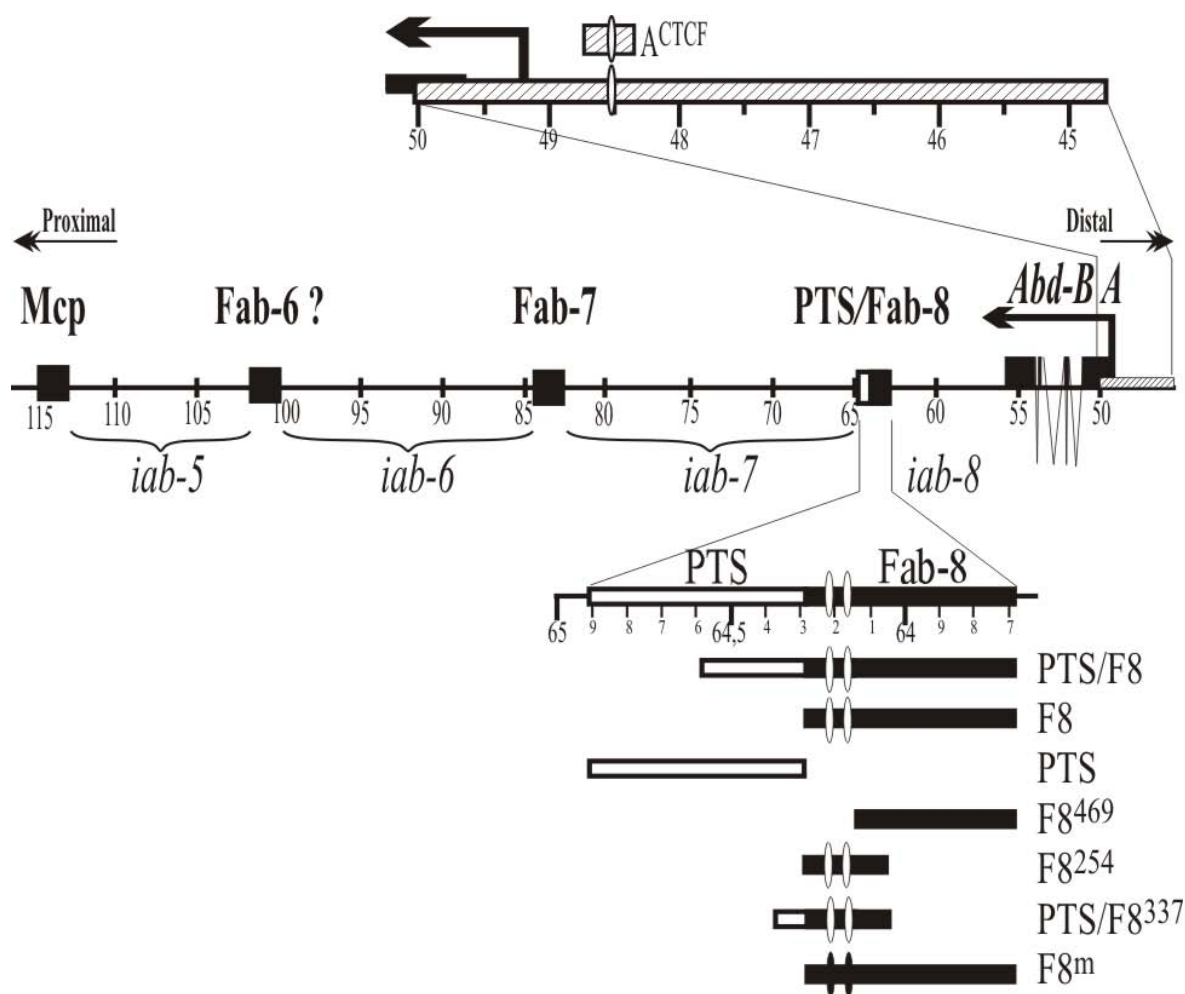


Рисунок 2. Схема регуляторной области *Abd-B* и расположения исследуемых элементов. Числа указывают координаты от начала *Vithorax* комплекса (согласно Martin et al., 1995). Горизонтальные стрелки, обозначенные «Proximal» и «Distal» - расположение центромеры и теломеры соответственно. Границы регуляторных доменов обозначены черными квадратами. Над схемой ВХ-С приводится схема промоторной области *Abd-B* и исследуемого фрагмента предпромоторной области (A^{CTCF}). Внизу приведена схема границы Fab-8 и фрагментов, используемых в работе. Элемент PTS и инсулятор Fab-8 обозначены белыми и черными прямоугольниками соответственно. Сайты связывания CTCF обозначены белыми овалами, мутированные сайты связывания – черными

В результате трансформации эмбрионов дрозофилы конструкцией $G4(PTS/F8^R)Y(PTS/F8^R)W$ было получено 20 трансгенных линий. Стимуляция гена *mini-white* GAL4 активатором приводила к изменению пигментации глаз только в 15 из 20 линий (рис. 3Б). При этом эффективность активации была значительно слабее, чем в случае, когда элементы находились во взаимно противоположной ориентации.

		<i>mini-white</i>							
		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б И/Н
А									
	G4(PTS/F8)Y(PTS/F8 ^R)W +GAL4	3	3	4	5	1	2	2 8 4	16 16/16
Б									
	G4(PTS/F8 ^R)Y(PTS/F8 ^R)W +GAL4	1		2	4	6	5 2	7 2	20 15/20
В									
	G4(F8)Y(F8 ^R)W +GAL4	3	4	4	2	3	2	7 7	16 16/16
Г									
	G4(F8 ^R)Y(F8 ^R)W +GAL4					4	2 2	11 3	18 11/18
Д									
	G4(PTS)Y(PTS ^R)W +GAL4			1		7	2 12	11	25 19/25
Е									
	G4(PTS ^R)Y(PTS ^R)W +GAL4			1		2	3 5	6	14 8/14

Рисунок 3. Исследование способности границы Fab-8 взаимодействовать на больших дистанциях. Уровень экспрессии гена *mini-white* в трансгенных линиях оценивался по интенсивности пигментации глаз: КР – красный (максимальный); ТК – темно-коричневый; К – коричневый; ТО – темно-оранжевый; ОР – оранжевый; ТЖ – темно-желтый; Ж – желтый; СЖ – светло-желтый, Б – белый (экспрессия полностью отсутствует). Цифры в строках указывают число линий с соответствующей пигментацией до (строка с названием конструкции) и после (строка + GAL4) введения GAL4 активатора. Верхний индекс «R» означает то, что тестируемый элемент вставлен в обратной ориентации относительно гена *mini-white*. Отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение (И) уровня пигментации при введении GAL4, к общему числу проанализированных линий (N) указано через слеш. На приведенных схемах инсультатор Fab-8 и PTS элемент обозначены черными и белыми пятиугольниками соответственно. Направление пятиугольника обозначает ориентацию элементов в конструкции. Белыми овалами обозначены сайты связывания dCTCF.

Данный результат подтверждает способность PTS/F8 осуществлять дистанционные взаимодействия, и свидетельствует о том, что эффективность стимуляции промотора GAL4 активатором зависит от взаимной ориентации элементов.

Затем на способность к ориентационно-зависимому взаимодействию были протестированы функциональные элементы границы F8/PTS. Были созданы конструкции G4(F8)Y(F8^R)W и G4(F8^R)Y(F8^R)W, в которых две копии Fab-8 инсулятора размером 600 пн (F8) были вставлены соответственно в противоположной и в прямой ориентации относительно друг друга (рис. 3В,Г).

В результате трансформации эмбрионов дрозофилы конструкцией G4(F8)Y(F8^R)W было получено 16 трансгенных линий. Введение GAL4 активатора приводило к эффективной стимуляции транскрипции гена *mini-white* во всех 16 линиях (рис. 3В).

Из 18 полученных трансгенных линий, содержащих единичную инсерцию конструкции G4(F8^R)Y(F8^R)W, усиление пигментации глаз при стимуляции GAL4 было менее выраженным и наблюдалось всего в 11 линиях (рис. 3Г). Таким образом, инсулятор F8 обладает способностью к ориентационно-зависимому взаимодействию.

Аналогичным образом на способность к дистанционному взаимодействию был испытан элемент PTS. Были созданы конструкции G4(PTS)Y(PTS^R)W и G4(PTS^R)Y(PTS^R)W (рис. 3Д,Е). В результате трансформации эмбрионов дрозофилы этими конструкциями было получено соответственно 25 и 14 трансгенных линий. Независимо от ориентации PTS, активация гена *mini-white* при введении GAL-активатора в этих конструкциях была незначительна. Слабое взаимодействие между PTS элементами можно объяснить тем, что при делении PTS/F8 границы на PTS элемент и Fab-8 инсулятор (Zhou et al., 1999) инактивируется значимый сайт связывания неизвестного белка. С другой стороны, сайты связывания для белка dCTCF в составе элемента F8 могут способствовать связыванию неизвестного белка с последовательностью PTS. Поэтому в отсутствие F8 эффективность связывания этого белка с PTS зависит от места инсерции трансгена (эффект положения).

Таким образом, граница PTS/F8 и входящий в ее состав инсулятор F8 способны осуществлять ориентационно-зависимые дистанционные взаимодействия. (рис. 3Д,Е).

2. Наличие сайтов связывания белка dCTCF необходимо для осуществления взаимодействия между двумя копиями Fab-8 инсулятора.

В составе границы Fab-8 были идентифицированы два сайта связывания для белка dCTCF, который является дрозофилиным гомологом инсуляторного белка позвоночных (Moon et al., 2005) (рис. 2). Для определения их роли во взаимодействии на больших дистанциях, F8 инсулятор был поделен на два перекрывающихся фрагмента: небольшой фрагмент F8²⁵⁴ размером 254 пн содержащий оба сайта связывания белка dCTCF, и 469 пн фрагмент F8⁴⁶⁹, включающий оставшуюся часть F8 (рис. 2).

Эти элементы были испытаны на способность к коммуникации со своей копией в G4-*white* модельной системе. Были созданы конструкции G4(F8⁴⁶⁹)Y(F8^{469R})W и G4(F8²⁵⁴)Y(F8^{254R})W, в которых тестируемые элементы встраивались в противоположной относительно друг друга ориентации.

В результате трансформации эмбрионов дрозофилы конструкцией G4(F8²⁵⁴)Y(F8^{254R})W было получено 8 трансгенных линий. При скрещивании этих линий с линией мух, несущей ген GAL4 активатора, во всех линиях наблюдалась эффективная стимуляция транскрипции с промотора гена *mini-white* (рис. 4Б). Таким образом, фрагмент Fab-8 инсулятора размером 254 пн, содержащий сайты связывания dCTCF способен осуществлять дистанционные взаимодействия.

В 8 полученных трансгенных линиях с единичной инсерцией конструкции G4(F8⁴⁶⁹)Y(F8^{469R})W введение GAL4 активатора приводило к незначительной активации гена *mini-white* только в 4 из 8 случаев (рис. 4А). Данный результат свидетельствует в пользу того, что основная роль во взаимодействии инсулятора Fab-8 на больших дистанциях принадлежит участку, содержащему сайты связывания dCTCF.



		<i>mini-white</i>								
		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
А										
	G4(F8 ⁴⁶⁹)Y(F8 ^{469R})W +GAL4						1	1	6	8
Б										
	G4(F8 ²⁵⁴)Y(F8 ^{254R})W +GAL4						1	8	6	15
В										
	G4(F8 ^{mut})Y(F8 ^{mutR})W +GAL4						2	4	3	9
Д										
	G4(4xCTCF)Y(4xCTCF)W +GAL4							8	4	12
			2	8	2					12/12

Рисунок 4. Исследование роли белка dCTCF во взаимодействии между Fab-8 инсуляторами. Обозначения см. на рисунке 3.

Для подтверждения участия белка dCTCF в осуществлении коммуникации между F8 инсуляторами, оба его сайта связывания были мутированы. Результаты анализа изменения электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (рис. 5) подтвердили, что белок dCTCF эффективно связывается с Fab-8 инсулятором и не связывается с мутированным элементом (F8^{mut}). Была создана конструкция G4(F8^{mut})Y(F8^{mutR})W, в которой мутированные Fab-8 элементы находились в противоположной относительно друг друга ориентации. Было получено 9 трансгенных линий, в которых стимуляция GAL4 активатором приводила к незначительному изменению экспрессии гена *mini-white*: только в четырех линиях пигментация глаз стала немного интенсивнее (рис. 4В). Следовательно, dCTCF необходим для поддержания эффективного взаимодействия между F8 элементами. Такой результат означает либо то, что dCTCF непосредственно обеспечивает взаимодействие между F8 инсуляторами, либо то, что он облегчает связывание белкового комплекса, отвечающего за этот процесс.

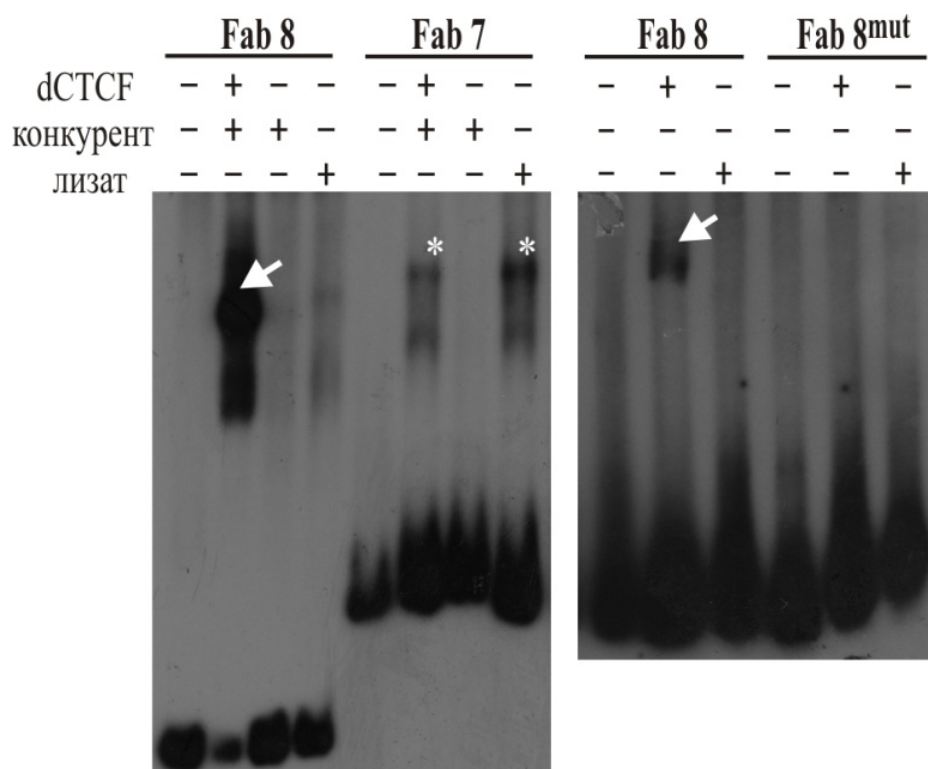


Рисунок 5. Исследование способности Fab-8, Fab-7 и Fab-8^{mut} связывать белок dCTCF при помощи анализа изменения электрофоретической подвижности. Помеченные ³²P фрагменты F8, F7 и F8^{mut} инкубировались с синтезированным *in vitro* белком dCTCF в присутствии конкурентов (холодные фрагменты Fab-8 или Fab-7, добавленные в избытке), или без них. После этого реакционная смесь подвергалась электрофоретическому разделению в 5% полиакриламидном геле. Полосы с измененной подвижностью (обозначены стрелкой) представляют собой ДНК-белковые комплексы, образуемые белком dCTCF со связывающим его фрагментом. Звездочками обозначено неспецифическое связывание dCTCF с лизатом ретикулоцитов кролика, в котором производился его синтез.

Для проверки этих предположений мы мультиплицировали сайт связывания белка dCTCF (4xCTCF). Была создана конструкция G4(4xCTCF)Y(4xCTCF)W (рис. 4Г). Во всех 12 полученных трансгенных линиях введение GAL4 приводило к сильной активации транскрипции гена *mini-white*, что говорит об эффективной коммуникации между двумя 4xCTCF фрагментами. Исходя из этого, можно сделать вывод, что именно белок dCTCF вовлечен в реализацию дальних взаимодействий между F8 инсуляторами.

3. Границы Fab-7 и Fab-8 способны к осуществлению функционального взаимодействия друг с другом.

Было показано, что граница Fab-7 не содержит сайтов связывания dCTCF (Holohan et al., 2007). Результаты проведенного анализа изменения электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (рис. 5) подтвердили, что связывание dCTCF с Fab-7 инсулятором отсутствует. Однако ранее была продемонстрирована способность 858 пн Fab-7 к осуществлению ориентационно-независимых дистанционных взаимодействий (Rodin et al., 2007).



		<i>mini-white</i>								
		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
А										
	G4(F7)Y(F7 ^R)W					2	2	7	2	13
	+GAL4	1	3	5	2	1	1			11/13
Б										
	G4(F7 ^R)Y(F7 ^R)W						2	8		10
	+GAL4	1	1	6	2					10/10

Рисунок 6. Подтверждение способности границы Fab-7 осуществлять дистанционные взаимодействия в G4-white модельной системе. Обозначения см. на рисунке 3

Для подтверждения способности инсуляторов Fab-7 взаимодействовать друг с другом в G4-white модельной системе, были созданы конструкции G4(F7)Y(F7^R)W и G4(F7^R)Y(F7^R)W, в которых элементы Fab-7 длиной 858 пн (F7) были вставлены в противоположной и прямой взаимной ориентации (рис. 6А,Б). В результате трансформации эмбрионов дрозофилы этими конструкциями было получено 13 (противоположная ориентация) и 10 (прямая ориентация) трансгенных линий, содержащих единичную инсерцию. Практически во всех линиях GAL4 активатор

эффективно стимулировал транскрипцию гена *mini-white* (рис. 6 А,Б). Это подтверждает полученные ранее данные о том, что функциональный эффект взаимодействия между Fab-7 инсуляторами не зависит от их взаимной ориентации.

Для того, чтобы проверить способность разных границ (Fab-7 и Fab-8), взаимодействовать друг с другом, были созданы конструкции G4(F7)Y(PTS/F8^R)W и G4(F7^R)Y(PTS/F8^R)W, в которых Fab-7 и PTS/Fab-8 элементы вставлены в противоположной и в прямой относительно друг друга ориентации (рис. 7 А,Б). При стимуляции GAL4 у мух, несущих конструкцию G4(F7)Y(PTS/F8^R)W интенсивность пигментации глаз в 14 из 15 полученных линий значительно усиливалась.

Стимуляция GAL4 в линиях с конструкцией G4(F7^R)Y(PTS/F8^R)W, в которой F7 и PTS/F8 находились в одной ориентации, также приводила к активации гена *mini-white* в 13 из 17 случаев (рис. 7Б). Однако по сравнению с линиями предыдущей конструкции, пигментация глаз в этих линиях была несколько ниже (рис. 7А,Б). Таким образом, границы, фланкирующие *iab-7* энхансер, способны к осуществлению ориентационно-зависимого функционального взаимодействия друг с другом.

С целью картирования фрагмента границы Fab-8, отвечающего за взаимодействие с Fab-7 инсулятором, были созданы конструкции G4(F7)Y(F8^R)W и G4(F7^R)Y(F8^R)W. При трансформации эмбрионов дрозофилы данными конструкциями было получено 18 и 7 трансгенных линий соответственно (рис. 7В,Г). Анализ полученных линий привел к неожиданному результату. Вне зависимости от взаимной ориентации Fab-7 и Fab-8 инсуляторов в большинстве полученных трансгенных линий активации транскрипции гена *mini-white* при введении GAL4 не возникало. Это предполагает отсутствие функционального взаимодействия между ними. Однако в 3 из 18 линий с конструкцией G4(F7)Y(F8^R)W наблюдалась значительная активация транскрипции гена *mini-white* (рис. 7В). Удаление инсуляторов с помощью Cre и Flp рекомбиназ из данной конструкции в этих линиях приводило к потере способности стимулировать ген *mini-white* активатором GAL4 (рис. 7В). Это свидетельствует о том, что изредка в некоторых местах генома F7 и F8 могут функционально взаимодействовать.

		<i>mini-white</i>								
		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
А	G4(F7)Y(PTS/F8 ^R)W				1	2	4	4	4	15
	+GAL4	3	1	4	5		1	1		14/15
Б		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
	G4(F7 ^R)Y(PTS/F8 ^R)W				2	2	4	7	2	17
	+GAL4		1	2	5	6	2	1		13/17
В		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
	G4(F7)Y(F8 ^R)W						4	12	2	18
	+GAL4	1	1	1			4	9	2	4/18
Г		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
	G4(F7 ^R)Y(F8 ^R)W						1	3	3	7
	+GAL4						2	2	3	1/7
Д		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
	G4(F7)Y(PTS ^R)W						1	11	2	14
	+GAL4					3	3	7	1	5/14
Е		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
	G4(F7)Y(PTS/F8 ^{337R})W				1	1	3	5	3	12
	+GAL4	1	2	7		1	2			12/12

Рисунок 7. Исследование функционального взаимодействия между границами Fab-8 и Fab-7. Обозначения см. на рисунке 3

Так как Fab-8 инсулятор не способен поддерживать коммуникацию с Fab-7, логично предположить, что участок, отвечающий за взаимодействие границы PTS/F8 с Fab-7, находится либо в PTS элементе, либо на границе Fab-8 инсулятора и PTS. Для проверки этого предположения была создана конструкция G4(F7)Y(PTS^R)W, в которой элементы находились в противоположных относительно друг друга ориентациях. Было получено 14 трансгенных линий, несущих одну копию данной конструкции. Введение GAL4 активатора приводило к слабой стимуляции промотора *mini-white* в 35 % линий (рис. 7Д).

Таким образом, обе части границы Fab-8: и F8 инсулятор, и PTS, по отдельности не способны осуществлять эффективное взаимодействие с Fab-7.

Логично предположить, что элемент, необходимый для коммуникации с гетерологичной границей находится в области условной границы между F8 и PTS. Для подтверждения данного заключения на способность к взаимодействию с Fab-7 был протестирован участок границы PTS/F8 размером 337 пн, сочетающий в себе фрагмент F8²⁵⁴ и прилегающий к нему фрагмент элемента PTS размером 83 пн (см. рис. 2). При трансформации эмбрионов конструкцией G4(F7)Y(F8^{337R})W, было получено 12 линий, содержащих единичную инсерцию трансгена. Во всех линиях наблюдалась эффективная стимуляция транскрипции гена *mini-white* активатором GAL4 (рис. 7E). Этот результат подтверждает, что белок, связывающийся в области границы между F8 инсулятором и PTS элементом необходим для взаимодействия с гетерологичной границей Fab-7.

4. PTS/F8 и Fab-7 способны взаимодействовать с предпромоторной областью гена *Abd-B*

Ранее в непосредственной близости от промотора гена *Abd-B* был обнаружен сайт связывания белка dCTCF (Holoahan et al., 2007). Мы протестировали участок предпромоторной области *Abd-B* размером 370 пн, содержащий сайт связывания белка dCTCF (A^{CTCF}, рис. 2), на способность к взаимодействию с границами Fab-7 и PTS/F8 в G4-*white* модельной системе.




		<i>mini-white</i>								
		КР	ТК	К	ТО	О	ТЖ	ЖСЖ	Б	И/Н
А										
	G4(A ^{CTCF})Y(PTS/F8 ^R)W +GAL4				1	1	1	3	2	7
Б										
	G4(PTS/F8 ^R)Y(A ^{CTCF})W +GAL4	1		1	1	4		1	3	7
В										
	G4(A ^{CTCF})Y(F7)W +GAL4						1	2	9	13
				1	2	7	3			13/13

Рисунок 8. Исследование способности границ PTS/Fab-8 и Fab-7 осуществлять коммуникацию с промоторной областью гена *Abd-B*. Обозначения см. на рисунке 3

Так как A^{CTCF} является элементом промоторной области, существовала вероятность того, что он может оказывать прямое действие на промотор гена *mini-white*. Для оценки этого были созданы конструкции $G4(A^{CTCF})Y(PTS/F8^R)W$ и $G4(PTS/F8^R)Y(A^{CTCF})W$, в которых A^{CTCF} фрагмент был вставлен либо за сайтами связывания GAL4, либо перед промотором гена *mini-white* соответственно. Уровень базовой транскрипции гена *mini-white* в полученных трансгенных линиях с конструкциями $G4(A^{CTCF})Y(PTS/F8^R)W$ и $G4(PTS/F8^R)Y(A^{CTCF})W$ практически не отличался. (см. рис. 8А,Б). Это говорит о том, что промоторной активностью элемент A^{CTCF} не обладает.

Было получено 7 трансгенных линий, содержащих одиночные инсерции конструкции $G4(A^{CTCF})Y(PTS/F8^R)W$. Во всех линиях при стимуляции GAL4 наблюдалась эффективная активация промотора *mini-white* (рис. 8А). Таким образом, граница PTS/F8 может осуществлять стабильную коммуникацию с A^{CTCF} элементом.

Расположение элемента A^{CTCF} перед промотором гена *mini-white* в конструкции $G4(PTS/F8^R)Y(A^{CTCF})W$ не повлияло на результат, и во всех 7 полученных трансгенных линиях наблюдалась значительная активация гена *mini-white* (рис. 8Б).

Аналогично на *G4-white* модельной системе была испытана способность границы Fab-7 взаимодействовать с A^{CTCF} . Было получено 13 трансгенных линий. Стимуляция GAL4 во всех линиях приводила к активации промотора *mini-white* (рис. 8В). Таким образом, граница Fab-7 также способна к осуществлению взаимодействия с промоторной областью Abd-B.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано, что две копии Msr инсулятора могут взаимодействовать на больших дистанциях, приводя к стимуляции транскрипции гена *mini-white* дрожжевым GAL4 активатором, сайты связывания которого находятся на большом расстоянии от промотора (Kurchanova et al., 2008). В настоящем исследовании приводятся доказательства того, что данное свойство не является уникальным для инсулятора Msr, а характерно для всех описанных границ регуляторных доменов гена *Abd-B*. Кроме того, показано, что, как и в случае Msr инсулятора, взаимная ориентация Fab-8 элементов имеет принципиальное значение для стимуляции транскрипции гена *mini-white*. Это связано с тем, что, по-видимому, с последовательностью инсулятора связывается по меньшей мере два белка, способных поддерживать коммуникацию. В результате при взаимодействии инсуляторов находящихся либо в прямой, либо в противоположной друг другу ориентации, формируются петли разной конформации (рис.9). При этом находящиеся снаружи от инсуляторов сайты связывания GAL4 и промотор *mini-white*, либо сближаются, либо изолируются друг от друга (рис. 9).

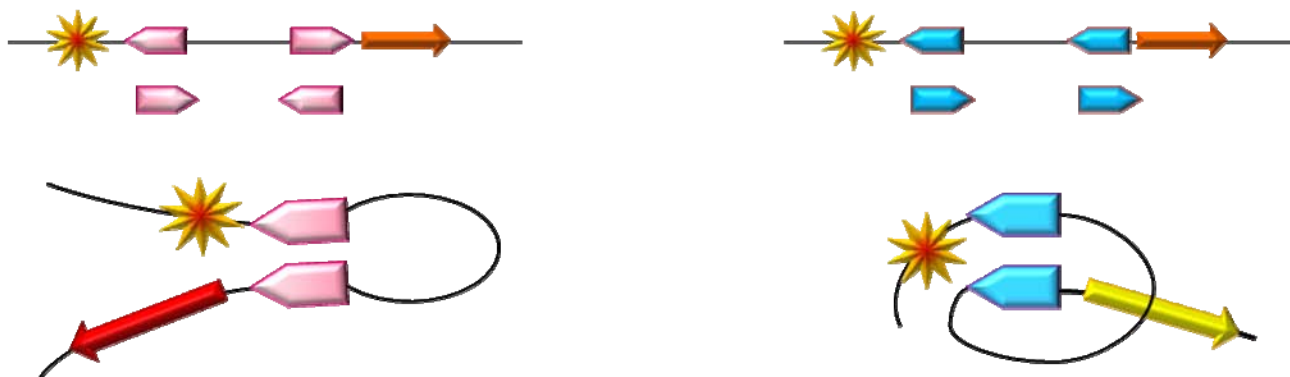


Рисунок 9. Взаимодействие элементов приводит к образованию петель, стерически способствующих (слева) или препятствующих (справа) коммуникации GAL4 связывающих сайтов и промотора. Сайты связывания GAL4 обозначены звездочкой. Взаимодействующие элементы – пятиугольником, направление которого соответствует ориентации элемента. Промотор активируемого гена обозначен стрелкой

Для инсулятора Fab-8 одним из этих белков является dCTCF. Наличие его сайтов связывания необходимо для осуществления взаимодействия между двумя копиями F8. В данной работе продемонстрировано, что F8 инсулятор, не содержащий сайтов для dCTCF, не способен взаимодействовать со своей копией. Это может быть объяснено тем, что белок dCTCF, связываясь с Fab-8, делает возможным связывание других, не идентифицированных белков. Очевидно, что сайт связывания одного из таких белков находится между F8 инсулятором и PTS элементом. Это подтверждается потерей способности границы Fab-8 при ее делении на F8 и PTS функционально взаимодействовать с инсулятором Fab-7. Функциональное взаимодействие между границей Fab-7, не связывающей dCTCF, с границей PTS/F8 и с промоторной областью *Abd-B*, также подтверждает существование неизвестных белков, участвующих в поддержании пространственной организации локуса *Abd-B*.

Недавно было показано, что регуляторные элементы *Vithorax* комплекса (VX-C), находящиеся в репрессированном состоянии, взаимодействуют друг с другом (Lanzuolo et al., 2007). Репрессионный статус генов VX-C поддерживается белками группы Polycomb (PcG), которые связываются с элементами PRE, прилежащими к регуляторным границам. Было показано, что транспозоны, содержащие границы Fab-7 и *Msc* в сочетании с PRE, способны взаимодействовать находясь на разных хромосомах (Bantignies et al., 2003; Muller et al., 1999; Vasques et al., 2006). Большинство исследователей предполагает, что подобная коммуникация на больших дистанциях обеспечивается белками группы Polycomb. Однако известно, что с хромосомами дрозофилы связывается множество комплексов PcG (Schwartz et al., 2006). В таком случае остается открытым вопрос: чем обеспечивается высокая специфичность дальних взаимодействий между удаленными элементами?

Все PRE, используемые в данных исследованиях, содержат прилежащие к ним инсуляторы, что говорит о том, что возможно именно инсуляторные белки осуществляют дистанционные взаимодействия. Экспериментальные доказательства способности PRE без дополнительных регуляторных элементов к осуществлению дистанционных взаимодействий отсутствуют. При этом существует достаточно большое количество работ, подтверждающих участие инсуляторов в осуществлении коммуникации между удаленными хромосомными районами. Например, у дрозофилы

взаимодействие между *gypsy* инсуляторами способствует активации промотора гена *yellow* его энхансерами, находящимися на расстоянии в несколько миллионов пн (Kravchenko et al., 2005). Взаимодействие между *gypsy* инсуляторами обеспечивается белками Mod(mdg4)-67.2 и Su(Hw), отвечающими за его инсуляторную функцию. Взаимодействие между границами *Mcp* обеспечивается минимальным инсулятором размером 210 пн (Kyrchanova et al., 2007), имеющим сайт связывания dCTCF. У млекопитающих взаимодействие между инсулятором из области контроля импринтинга, расположенной на седьмой хромосоме, с локусом *Wsb/Nf1*, расположенным на одиннадцатой хромосоме, зависит от белка CTCF (Ling et al., 2006). Продемонстрированное в данной работе эффективное взаимодействие между инсуляторами F8, а также между границами Fab-8 и Fab-7, которые не содержали в своем составе сайленсеров, также подтверждает гипотезу о роли инсуляторных белков в организации дистанционных взаимодействий.

В данной работе продемонстрировано, что разделение границы Fab-8 на два функционально различных элемента F8 и PTS (Zhou et al., 1999, 2004, 2007) не является вполне оправданным, так как при таком разделении инактивируется сайт связывания функционально значимого белка. Описанный ранее PTS элемент самостоятельно не способен к поддержанию дальних взаимодействий во взрослой стадии, однако необходим для взаимодействия с гетерологичными границами.

Способность инсуляторов взаимодействовать на больших дистанциях наводит на мысль, что в контексте *Abd-B* инсуляторы могут непосредственно взаимодействовать с предпромоторной областью, подтягивая *iab*-энхансеры к промотору. В данной работе подтверждается способность границ Fab-7 и Fab-8 к взаимодействию с элементом, расположенным в промоторной области *Abd-B*. Ранее при помощи Dam-метилирования было продемонстрировано, что граница Fab-7 приближается к промотору *Abd-B* в тканях, в которых *Abd-B* не экспрессируется (голова) (Cleard et al., 2006). Однако в брюшке мухи, где *Abd-B* активен, такое взаимодействие практически отсутствует. Опираясь на результаты нашей работы, эти данные могут быть объяснены тем, что в тканях, где *Abd-B* не экспрессируется, все границы и промоторная область гена взаимодействуют друг с другом. В брюшке мухи в каждом сегменте с предпромоторной областью взаимодействует только

определенная граница. Таким образом, Fab-7 сближается с промотором только в ПС12, поэтому сигнал метилирования размыт.

Результаты, полученные в данной работе, подтверждают разработанную в нашей лаборатории модель регуляции гена *Abd-B*. Согласно этой модели, в каждом парасегменте соответствующий инсулятор, взаимодействуя с промоторной областью гена *Abd-B*, подтягивает близлежащий энхансер к промотору. Этим обеспечивается специфичность взаимодействий между энхансером и промотором и нейтрализуется изолирующий эффект инсуляторов расположенных между ними. Одновременно инсулятор изолирует активный домен от репрессированных.

ВЫВОДЫ

- 1. Продемонстрирована способность Fab-8 инсулятора к поддержанию взаимодействия со своей копией на большой дистанции.**
- 2. Показано, что функциональное проявление взаимодействия между Fab-8 инсуляторами зависит от их взаимной ориентации.**
- 3. Белок dCTCF, связывающийся с инсулятором Fab-8, способен поддерживать дистанционные взаимодействия.**
- 4. Впервые продемонстрировано, что гетерологичные границы, Fab-8 и Fab-7, способны взаимодействовать.**
- 5. Показана способность границ Fab-8 и Fab-7 взаимодействовать с промоторной областью *Abd-B*.**

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Kyrchanova O, Toshchakov S, Podstreshnaya Y, Parshikov A, Georgiev P. Functional interaction between the Fab-7 and Fab-8 boundaries and the upstream promoter region in the *Drosophila Abd-B* gene. *Mol Cell Biol.* 2008, **28**:4188-4195.

Тезисы конференций:

1. Toshchakov S, Kyrchanova O, Georgiev P. Analysis of interactions between chromatin domain boundaries of *Abd-B* gene of *Drosophila melanogaster*. Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics dedicated to 120th anniversary of M.I.Vavilov, 20-22 September 2007, Kyiv, Ukraine.

2. Тошчаков С.В., Кырчанова О.В., Георгиев П.Г. Изучение взаимодействий между границами регуляторных доменов гена *Abdominal-B* у *Drosophila melanogaster*. 11-я международная школа-конференция «Биология – наука XXI века», 29 октября – 02 ноября 2007, Пущино.

3. С. Тошчаков, О. Кырчанова, П. Георгиев. Исследование взаимодействий между границами регуляторных доменов *Abd-B* у *Drosophila melanogaster*. Всероссийский биологический конгресс 'СимбиозРоссия2008'. 6 - 10 июля 2008, Казань.

4. О.В. Кырчанова, С.В. Тошчаков, Т.А. Ивлиева. Выяснение роли dCTCF в установлении дистанционных взаимодействий между регуляторными доменами гена *Abd-B* у *Drosophila melanogaster*. V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, 21-28 июня 2009, Москва.

5. O. Kyrchanova, A. Parshikov, S. Toshchakov, T. Ivlieva, P. Georgiev. Role of dCTCF in Functional Interaction between the Boundaries and the Abd-B Promoter Region in the bithorax complex of *Drosophila*. EMBO Conference of Nuclear Structure & Dynamics, 30 September – 4October 2009, Isle la Sorgue, France.