

На правах рукописи

УДК 577.21:577.218

ВОЛКОВ ИЛЬЯ АЛЕКСЕЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА MOD(MDG4) НА ОБРАЗОВАНИЕ
«ИНСУЛЯТОРНЫХ ТЕЛЕЦ» В ЯДРАХ КЛЕТОК
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2008

Работа выполнена в лаборатории Факторов транскрипции в Учреждении Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и в группе «Молекулярной генетики дрозофилы» в Учреждении Российской академии наук Институт биологии гена РАН.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Головнин Антон Клеменович.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Глазков Михаил Васильевич,

кандидат биологических наук Копытова Дарья Владимировна.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Защита диссертации состоится „30” октября 2008 года, в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д002.037.01 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: „30” сентября 2008 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Геном эукариот имеет доменную структуру. Внутри доменов могут находиться либо индивидуальные гены, либо группы генов с отдельными паттернами экспрессии. Специфические элементы молекулы ДНК, функционально изолирующие гены от влияния соседних доменов, были названы инсуляторами. Инсуляторы ограничивают действие регуляторных элементов, работающих на больших расстояниях, и обладают способностью снимать эффект положения гена, то есть препятствуют инактивирующему влиянию гетерохроматина на транскрипцию. Инсуляторы способствуют формированию и поддержанию работы транскрипционных программ и играют существенную роль в регуляции генов.

Наиболее полно у *Drosophila melanogaster* охарактеризован Su(Hw)-зависимый инсулятор. Впервые Su(Hw) инсулятор был обнаружен в 5'-нетранслируемой области ретротранспозона МДГ4. Этот инсулятор обладает энхансер-блокирующей активностью. Он способен блокировать более тридцати известных энхансеров в разных тканях и на разных стадиях развития *Drosophila melanogaster*. Su(Hw)-зависимый инсулятор способен блокировать различные репрессивные эффекты, включая гетерохроматин и белки группы Polycomb.

Около десяти лет назад было показано, что инсуляторные белки Su(Hw) и Mod(mdg4) колокализуются в дискретных скоплениях в ядрах интерфазных клеток *Drosophila*. Основываясь на том, что исчезновение этих иммунофлюоресцирующих скоплений при мутации белка Mod(mdg4) соответствовало ослаблению Su(Hw) инсулятора, такие ядерные образования были названы «инсуляторными тельцами».

Предполагается, что эти тельца представляют собой зафиксированные на ядерном матриксе скопления многих разнесенных по геному связанных с ДНК белковых комплексов Su(Hw) инсулятора. По какой-то причине инсуляторы объединяются друг с другом и держатся вместе, благодаря взаимодействию между белками Mod(mdg4) и CP190, таким образом, образуя «отдельные хроматиновые петли-домены» и контролируя высокоупорядоченную организацию и функционирование генома. Основываясь на этом предположении, была выдвинута структурная модель работы инсулятора, постулирующая, что энхансер, находящийся в одном функциональном домене, не может активировать промотор, находящийся в другом домене.

К сожалению, предполагаемое сосредоточение удаленных последовательностей ДНК инсуляторов внутри «инсуляторных тельц» не было подтверждено в течение многих лет.

Цель и задачи исследования:

Основной целью данной работы является изучение связи так называемых «инсуляторных телец» и инсуляции.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать связь функционирования Su(Hw)-зависимых инсуляторов и образования внутриядерных «инсуляторных телец».
2. Изучить роль сумолирования в образовании «инсуляторных телец».
3. Понять роль отдельных белков инсуляторного комплекса в образовании «инсуляторных телец».

Научная новизна и практическая ценность работы. В представленной работе впервые было доказано отсутствие прямой взаимосвязи между образованием внутриядерных «инсуляторных телец» и активностью Su(Hw)-зависимых инсуляторов у *Drosophila melanogaster*.

Впервые было показано, что вовлечение инсуляторного белка Mod(mdg4) в состав «инсуляторных телец» полностью зависит от процесса его сумолирования.

Также было продемонстрировано, что инсуляторный белок CP190 играет ключевую роль в образовании «инсуляторных телец».

Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу о роли «инсуляторных телец» как «фабрике» по быстрой сборке инсуляторного комплекса и хранения его компонентов.

Полученные в данной работе результаты позволяют лучше понять роль отдельных белков в организации работы инсуляторов, расширить знания о новом механизме посттрансляционной модификации – сумолировании, и по-новому взглянуть на структурную организацию генома *Drosophila* в определенные периоды развития клетки.

Практически полученные данные можно применить при конструировании генно-инженерных векторов, учитывая продемонстрированную нами роль отдельных доменов белков, участвующих в инсуляции.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции "Nuclear Structure & Dynamics" (Монпелье, Франция, 2008), на Международной молодежной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск, 2006), на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на школе-конференции «Биология: традиции и инновации в 21 веке» в рамках I Всероссийского конгресса студентов и аспирантов-биологов

«Симбиоз – Россия – 2008» (Казань, 2008) и на I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (Харьков, 2008).

Публикации

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

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах, включает 2 таблицы и 37 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, содержащего 209 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Мутантные варианты белка Mod(mdg4), используемые в работе

Белок Mod(mdg4) является одним из необходимых основных компонентов инсуляторного комплекса. Нарушение его связи с белком Su(Hw) приводит к потере инсуляции и, как было показано в прежних исследованиях (Gerasimova and Corces, 1998; Gerasimova et al., 2000), к исчезновению «инсуляторных телец». Поэтому основное внимание в наших экспериментах мы уделили этому важному компоненту инсуляторного комплекса.

Были созданы две производные белка Mod(mdg4): в **ModΔQ** делеция аминокислотных остатков с 145 по 276 удаляла глутамин(Q)-богатый домен и один сигнал ядерной локализации NLS; в **ModΔC** делеция 43-х С-концевых аминокислотных остатков удаляла основную часть домена, необходимого для связывания с белком Su(Hw) (Рис.1).

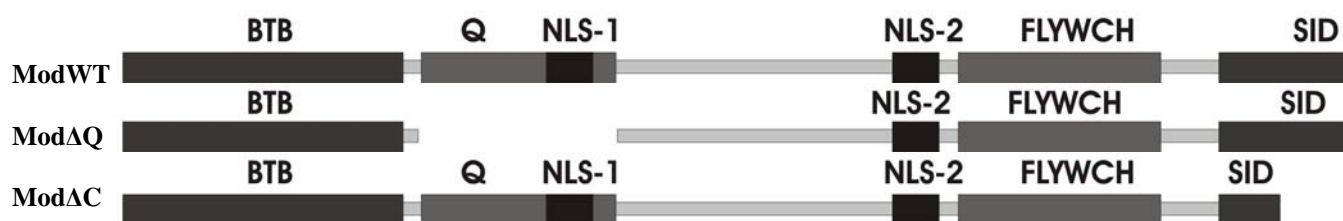


Рис.1. Схематическое изображение вариантов белка Mod(mdg4).
Сверху вниз: ModWT (дикого типа), ModΔQ и ModΔC.

В экспериментах с двугибридной дрожжевой системой белки ModWT (дикого типа) и ModΔQ продемонстрировали сильное взаимодействие с Su(Hw)^{MID}, в то время как производная ModΔC оказалась неспособной взаимодействовать с белком Su(Hw) (Таб.1). Как и ожидалось, ModΔC, также как производная ModΔQ, имеет способность как к гомологичной, так и к гетерологичной олигомеризации (с белком Mod дикого типа).

В экспериментах по коиммунопреципитации белок Su(Hw) полностью копреципитировался с производной ModΔQ и только частично с ModΔC (Рис.2). Это свидетельствовало о том, что обе производные находятся в одном комплексе с белком Su(Hw), однако в случае ModΔC производной взаимодействие с Su(Hw) опосредованно.

Взаимодействующие белки		Сила взаимодействия
GAL4BD	GAL4AD	
ModWT	Su(Hw) ^{MID}	+++
Su(Hw) ^{MID}	ModWT	+++
Su(Hw) ^{MID}	ModΔC	–
ModΔC	Su(Hw) ^{MID}	–
Su(Hw) ^{MID}	ModΔQ	+++
ModΔQ	Su(Hw) ^{MID}	+++
ModΔC	ModWT	+++
ModWT	ModΔC	++
ModΔC	ModΔC	+++
ModΔQ	ModWT	+++
ModWT	ModΔQ	++
ModΔQ	ModΔQ	+++

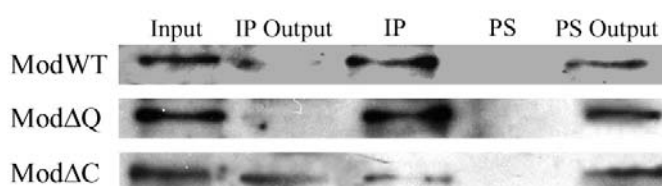


Рис.2. Коиммунопреципитация белка Su(Hw) и ModWT, ModΔQ и ModΔC, несущих последовательность FLAG, в трансформированных S2 клетках. Иммунопреципитированные комплексы промывали 500 mM и 100 mM KCl-содержащими буферами перед нанесением на ДСН-ПААГ. Анализировали методом Western-гибридизации при помощи антител к белку Su(Hw). **Input**, общее нанесение; **IP Output**, надосадочная жидкость после иммунопреципитации с антителами против Su(Hw); **IP**, иммунопреципитат; **PS**, первичная сыворотка; **PS Output**, надосадочная жидкость после иммунопреципитации с первичной сывороткой.

Таблица 1. Анализ взаимодействия производных белка Mod(mdg4) в двугибридной дрожжевой системе. Относительная сила взаимодействия обозначается символом “+”, отсутствие взаимодействия - “–”. В этих экспериментах мы использовали укороченную форму белка Su(Hw) – Su(Hw)^{MID} – которая содержала только участок белка, необходимый для взаимодействия с Mod(mdg4).

2. Локализация Mod(mdg4) производных в S2-клетках

Ядра S2-клеток, полученных из эмбрионов *Drosophila*, при окрашивании антителами к белкам Mod и Su(Hw) четко демонстрировали дискретные скопления белков (Рис.3). По размерам, количеству и расположению эти скопления совпадают с ранее описанными скоплениями, называемыми «инсуляторными тельцами».

Суперэкспрессия химерного белка дикого типа Mod(mdg4)-FLAG не изменила «нормального» окрашивания: окрашивание антителами к FLAG эпителию показывало

исключительно ядерное распределение в виде «инсуляторных телец», согласующееся с распределением белка Su(Hw). Ввиду большого количества белка при суперэкспрессии рекомбинантных генов скопления белков Mod(mdg4) и Su(Hw) были более насыщены, чем в контроле.

С другой стороны, интенсивная экспрессия ModΔQ-FLAG давала обильное диффузное распределение этого белка в цитоплазме, но не в ядре. Несколько ядерных скоплений, детектируемых антителами к белкам Su(Hw) и Mod(mdg4), скорее всего, существовали до трансфекции, поскольку ни один из них не окрашивался против FLAG.

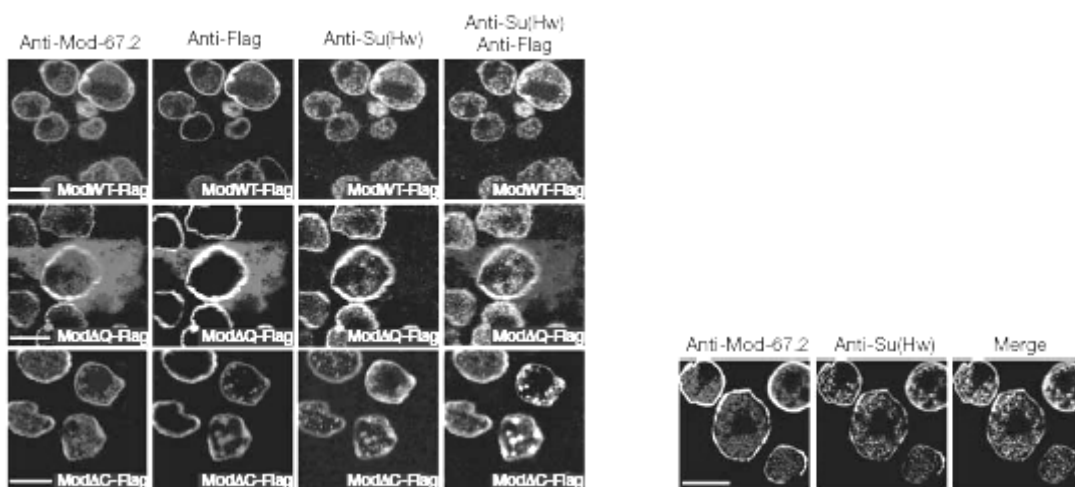


Рис.3. Распределение вариантов Mod(mdg4) в S2-клетках.

На левой части рисунка представлены результаты специфического иммунного окрашивания на фоне суперэкспрессии исследуемых вариантов белка Mod (ModWT – белок дикого типа; ModΔQ и ModΔC – мутантные варианты белка Mod). Справа показаны результаты окрашивания нетрансфицированных клеток.

При экспрессии белка ModΔC-FLAG наблюдалось ядерное распределение в виде «инсуляторных телец» и колокализация с белком Su(Hw). Количество ModΔC-FLAG «инсуляторных телец» было несколько меньше, но они были больше в размерах, чем в контроле Mod(mdg4)-FLAG или в диком типе Mod(mdg4). Все белковые скопления, которые окрашивались антителами к FLAG эпитопу, колокализовались со скоплениями, окрашивавшимися антителами к Su(Hw) белку. В то же время небольшая часть скоплений (наиболее вероятно, уже существовавших до трансфекции) содержала белки Mod(mdg4) и Su(Hw), но не ModΔC-FLAG.

3. Распределение мутантных вариантов белка Mod в цитоплазматической и ядерной белковых фракциях S2 клеток. X-ChIP анализ.

Полученное в предыдущих экспериментах распределение химерных белков предполагает, что Mod(mdg4)-FLAG и Mod Δ C-FLAG, в отличие от Mod Δ Q-FLAG, присутствуют в ядре и находятся в составе инсуляторного комплекса. Для подтверждения иммунохимических наблюдений в ядрах клеток, нами были проведены дополнительные молекулярные анализы *in vitro* и *in vivo*. В первом эксперименте мы анализировали распределение химерных белков в различных клеточных фракциях («ядро» – «цитоплазма»). В результате эксперимента мы показали, что химерный белок Mod Δ Q-FLAG присутствует в ядерной фракции трансфицированных клеток приблизительно в той же мере, как и химерные белки Mod(mdg4)-FLAG и Mod Δ C-FLAG. Отсюда можно сделать вывод, что, несмотря на отсутствие «инсуляторных телец» в ядре клеток трансфицированных Mod Δ Q-FLAG, этот белок там присутствует, не образуя скоплений (Рис.4).

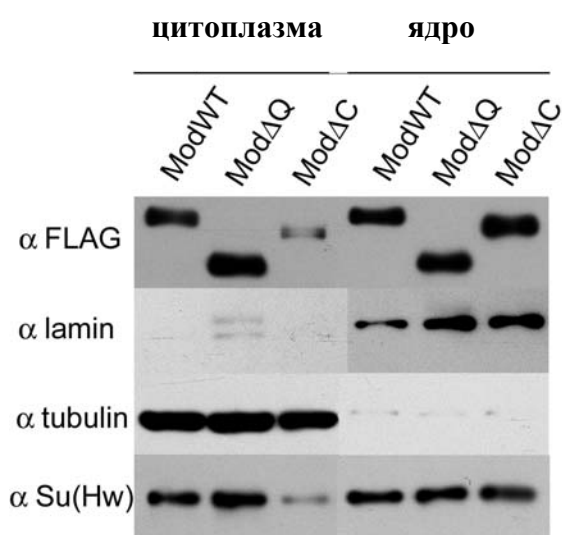


Рис.4. Распределение химерных белков Mod(mdg4)-FLAG, Mod Δ C-FLAG и Mod Δ Q-FLAG в цитоплазматической и ядерной белковых фракциях S2 клеток.

После фракционирования трансфицированных клеток, фракции анализировались с помощью Western-блот анализа. Детекция проводилась антителами к FLAG эпитопу, распознающему химерные белки, ламину (белку специфичному для ядерной фракции) и тубулину (белку специфичному для цитоплазматической фракции). В качестве контроля количества нанесенного материала использовались антитела к белку Su(Hw).

Цель следующего эксперимента заключалась в анализе наличия химерных белков в составе инсуляторного комплекса *in vivo*. Для этого был использован метод хроматин-иммунопреципитации (X-ChIP анализ). Для данного эксперимента использовались праймеры к уже известным эндогенным инсуляторам и инсулятору Su(Hw) в составе МДГ4 ретротранспозона. В качестве отрицательного контроля использовались праймеры к кодирующим последовательностям генов *ras* и *actin* (Рис.5). Значительное обогащение PCR-продуктов на сайтах связывания Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса наблюдалось в случае экспрессии Mod(mdg4)-FLAG и Mod Δ Q-FLAG белков. Однако при экспрессии белка Mod Δ C-FLAG обогащения на инсуляторных сайтах не наблюдалось. Результаты этого эксперимента привели нас к неожиданному выводу. Несмотря на наличие в ядре «инсуляторных телец», белок Mod Δ C-FLAG не способен *in vivo* связываться с

инсуляторными сайтами, в то время как белок Mod Δ Q-FLAG, не образующий «инсуляторных телец», участвует в формировании инсуляторов.

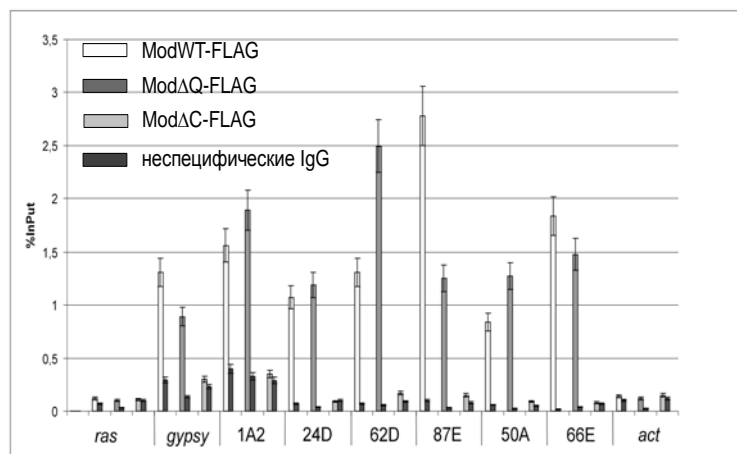


Рис.5. X-ChIP анализ. Пары наибольших пиков для каждой инсуляторной последовательности соответствуют экспрессии белков Mod(mdg4)-FLAG и Mod Δ Q-FLAG. В контролях (крайний слева и крайний справа) обогащения не происходит. При экспрессии белка Mod Δ C-FLAG обогащения также не наблюдается.

4. Тестирование мутантных форм белка Mod *in vivo*

Следующим нашим шагом было сравнение функциональной эффективности производных Mod Δ Q и Mod Δ C в *Drosophila melanogaster*. Для этого были созданы трансгенные линии, экспрессирующие Mod Δ Q и Mod(mdg4)-67.2 под промотором, содержащим UAS-последовательность. Последующее скрещивание такой линии с GAL-драйвером позволяет индуцировать экспрессию конструкции в любых тканях на любой стадии развития мухи. Все эксперименты с трансгенными конструкциями проводились на фоне мутации *mod(mdg4)^{u1}*. Эта мутация позволяет исследовать эффект экспрессии Mod(mdg4) производных без влияния эндогенного белка. Мутация *mod(mdg4)^{u1}* не позволяет эндогенному белку связываться с инсуляторными комплексами. Для анализа производной Mod Δ C была использована ранее описанная мутация *mod(mdg4)^{T6}*. В этой мутации, за счет образовавшегося стоп-кодона в аминокислотной позиции 570, транслируется белок, также как и в случае с Mod Δ C, лишенный 43 C-концевых аминокислот.

Анализ инсуляторной активности производных Mod(mdg4) был проведен на самцах *Drosophila* в аллелях локуса *ct* и *yellow*, вызванных инсерцией мобильного элемента МДГ4, в составе которого находился Su(Hw) инсулятор (Рис.6А). Экспрессия белка Mod(mdg4) дикого типа, как и Mod Δ Q, полностью преодолевает эффект мутации *mod(mdg4)^{u1}*. Экспрессия белка Mod Δ Q влияет на обе характерные черты *mod(mdg4)^{u1}* мутации: полностью снимается эффект репрессии и восстанавливаются инсуляторные свойства. Данный результат свидетельствует, что белок Mod Δ Q проявляет те же свойства, что и белок дикого типа. При этом, мутация *mod(mdg4)^{T6}*, при которой экспрессируется белок аналогичный Mod Δ C, проявляет совершенно такой же фенотип, как мутация *mod(mdg4)^{u1}*, демонстрируя, что белок Mod Δ C в инсуляции нефункционален.

В аллелях ct^b и ct^K ретротранспозон МДГ4 находится между энхансером, отвечающим за развитие крыловой пластины, и промотором. В аллеле ct^b инсулятор полностью блокирует этот энхансер, образуя фенотип с «обрезанными» крыльями (Рис.6Б). Мутация $mod(mdg4)^{u1}$ и мутация $mod(mdg4)^{T6}$ очевидно супрессируют мутантный фенотип ct^b , демонстрируя таким образом, что белок Mod(mdg4)-67.2 существенен для блокирования энхансера крыльев, и что ModΔC не способен компенсировать его потерю. С другой стороны, экспрессия белка ModΔQ полностью восстанавливает функцию Su(Hw)-инсулятора на фоне $mod(mdg4)^{u1}$, по эффекту воспроизводя белок Mod(mdg4) дикого типа.

Инсулятор Su(Hw) в аллеле ct^K слабее, чем в ct^b , поскольку он имеет только 7, а не 12 сайтов связывания для белка Su(Hw). Проявление этого аллеля выражается в промежуточном фенотипе: многочисленные сливающиеся вырезки по краям крыловой пластины (Рис.6Б). Поэтому аллель ct^K более чувствителен к уровню белка Mod(mdg4)-67.2 и почти полностью супрессируется одной копией мутации $mod(mdg4)^{u1}$. Производная ModΔQ восстанавливала активность инсулятора на фоне $mod(mdg4)^{u1}/mod(mdg4)^{u1}$ мутации, полностью воспроизводя эффект, наблюдаемый в случае экспрессии белка дикого типа (Рис.6). Этот эксперимент показал, что в ядре клетки присутствует достаточное количество функционального белка

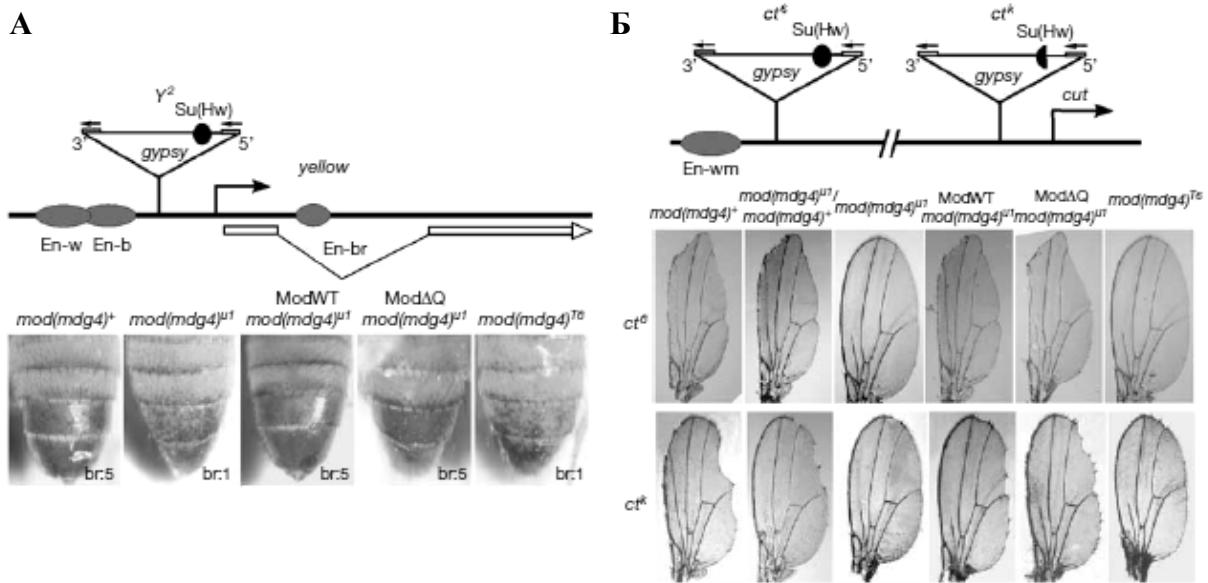


Рис.6. Модельные системы для исследований *in vivo*.

А. Схематическое изображение аллеля y^2

Б. Схематическое изображение аллелей ct^b и ct^K

Овалами обозначены энхансеры (En) крыльев (w, wing), тела (b, body), щетинок (br, bristle) и wing margin (wm). Треугольником обозначена инсерция ретротранспозона МДГ4 (другое название – *gypsy*), фланкированная длинными концевыми повторами. Инсулятор Su(Hw) обозначен темным кружком. На фотографиях слева представлены фенотип кутикулы брюшка и пигментация щетинок (5 – для дикого типа, 1 – при отсутствии работы инсулятора). На фотографиях слева показаны фенотипы крыльев.

Mod Δ Q, для того чтобы связаться с сайтами инсулятора. Производная Mod Δ C и в этой чувствительной модельной системе не смогла восстановить инсуляторные свойства: фенотипы крыльев у *mod(mdg4)^{T6}* и *mod(mdg4)^{u1}* мутаций были идентичными.

Для того чтобы определить эффект полученных нами производных белка Mod(mdg4) и на других модельных системах, мы использовали различные аллели *Achaete-Scute Complex* (AS-C), находящегося в непосредственной близости от гена *yellow* (Modolell and Campuzano, 1998).

Все описанные аллели были протестированы с помощью производных белка Mod(mdg4). И снова нами было обнаружено, что мутация *mod(mdg4)^{T6}* (производная Mod Δ C) проявляла себя точно так же, как *mod(mdg4)^{u1}* мутация, подтверждая наши предыдущие данные об инсуляторной нефункциональности производной Mod Δ C. В то же время экспрессия производной Mod Δ Q на фоне мутации *mod(mdg4)^{u1}* полностью восстанавливало энхансер-блокирующую способность как 1A2 инсулятора, так и инсулятора в составе ретротранспозона МДГ4, а также снимала гетерохроматиновую репрессию в аллеле *In(1)sc^{V2}*. Эти эксперименты еще раз подтверждают функциональность Mod Δ Q производной и не способность производной Mod Δ C восстанавливать инсуляцию.

5. Локализация производных белка Mod(mdg4) в личинках

Как было показано ранее (Gerasimova & Corces, 1998) при помощи иммунного окрашивания на политенных хромосомах, сайты связывания для белка Su(Hw) полностью колокализуются с сайтами связывания белка Mod(mdg4). Два хорошо видимых места локализации Su(Hw)-инсуляторов это инсерции МДГ4 в локусах *y²* и *sc^{D1}* на конце X-хромосомы.

Связывание производных белка Mod(mdg4) с сайтами инсуляторов было проанализировано на политенных хромосомах. Как и ожидалось, Mod Δ Q связывался с политенными хромосомами точно так же, как белок дикого типа, в частности, на бэндах, соответствующих Su(Hw) инсулятору в составе мобильного элемента МДГ4, в *y²* и *sc^{D1}* (цветные фотографии представлены в тексте диссертации). И, наоборот, в форме Mod Δ C (мутация *mod(mdg4)^{T6}*) практически терял способность связываться на политенных хромосомах, а имеющиеся редкие сайты не колоколизировались с белком Su(Hw). Эти данные подтверждают, что производная Mod Δ Q, так же как Mod(mdg4) дикого типа, но не Mod Δ C производная, взаимодействует с наблюдаемыми при иммунном окрашивании Su(Hw)-инсуляторами.

И, наконец, мы проанализировали иммунное окрашивание в клетках имагинальных дисков *Drosophila*. В соответствии с опубликованными ранее данными и нашими

экспериментами в S2 клетках, ядра дикого типа содержали множественные колокализирующиеся скопления белков Mod(mdg4) и Su(Hw). С другой стороны, в клетках с мутацией $mod(mdg4)^{u1}$ был смутно виден только неясный фон белка Su(Hw), не способного образовывать четких скоплений. Как и ожидалось, трансгенная экспрессия белка Mod(mdg4) дикого типа на фоне мутации $mod(mdg4)^{u1}$ восстанавливала распределение белков по дикому типу.

Как уже было продемонстрировано в наших экспериментах, белок ModΔQ восстанавливает все протестированные функции Su(Hw)-инсулятора и связывается со всеми инсуляторными сайтами на политенных хромосомах. Однако ModΔQ на фоне мутации $mod(mdg4)^{u1}$ не формировал «инсуляторные тельца» и не входил в какие-либо ядерные скопления, хотя мы видели четко выраженное цитоплазматическое распределение белков Mod(mdg4) и Su(Hw). Интересно, что при экспрессии белка ModΔQ на фоне $mod(mdg4)^+$ ядерные скопления восстанавливались как для белка Mod(mdg4), так и для Su(Hw). При этом цитоплазматическое распределение также сохранялось, хотя и в меньшей интенсивности. Эти данные хорошо согласуются с результатами полученными на S2 клетках *Drosophila*.

Белок ModΔC не может функционально поддерживать Su(Hw)-инсуляторы и связываться с соответствующими сайтами на хроматине. Однако, в клетках $mod(mdg4)^{T6}$ (экспрессирующих вариант ModΔC) была отмечена его колокализация с белком Su(Hw) в ядерных «инсуляторных тельцах», которых было меньше, чем в диком типе, но сопоставимо с ModΔQ на фоне $mod(mdg4)$.

6. Нефункциональный белок Su(Hw) способен образовывать спеклы

На следующем этапе мы решили проверить, каким образом связаны способность основного инсуляторного белка Su(Hw) взаимодействовать с консенсусной ДНК, образование «инсуляторных телец» и функционирование инсулятора. Для этого мы использовали трансгетерозиготную линию *Drosophila* с двумя мутациями по гену *su(Hw)* (Рис.7). Одна мутация – $su(Hw)^V$ – несла делецию промотора гена и части первого его экзона. Поэтому данный аллель не способен давать какой-либо продукт и являлся нуль-мутацией. Другая мутация – $su(Hw)^f$ – была вызвана точечной заменой аминокислоты цистеина на тирозин в позиции 525, что приводило к нарушению правильного сворачивания домена «цинковый палец №10» и, как следствие, к неспособности такого белка связываться с молекулой ДНК. Однако аллель $su(Hw)^f$ производит полноразмерный белок, который можно детектировать антителами. Сочетание этих мутаций приводит к потере инсуляции, что было подтверждено на нашей модельной системе: аллелях y^2 и ct^6 , вызванных инсерцией мобильного элемента МДГ4.

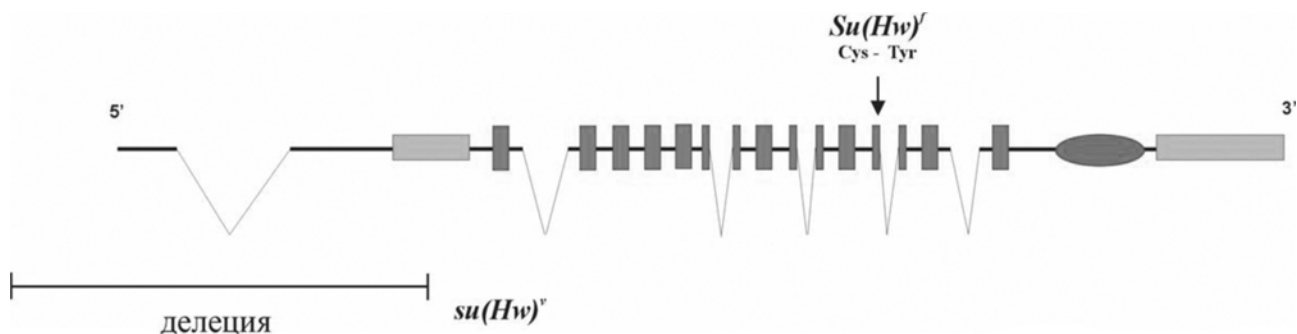


Рис.7. Схематичное изображение мутации *su(Hw)^v/su(Hw)^f*.

Мутация *su(Hw)^V* несет делецию промотора гена и части первого его экзона. Другая мутация *su(Hw)^f* вызвана точечной заменой аминокислоты цистеина на тирозин в позиции 525, что ведет к нарушению правильного сворачивания домена «цинковый палец №10» и, как следствие, к неспособности такого белка связываться с молекулой ДНК.

Окрашивание имагинальных дисков линии *su(Hw)^V /su(Hw)^f* антителами к белку *Su(Hw)* выявило нормально сформированные «инсуляторные тельца», образующиеся в ядрах клеток (цветные фотографии представлены в тексте диссертации). К тому же эти «инсуляторные тельца» полностью колокализировались с белками *CP190* и *Mod(mdg4)*, против которых проводилось также иммунное окрашивание.

Таким образом, белок *Su(Hw)*, неспособный связываться с ДНК и поэтому не поддерживающий инсуляцию, тем не менее, был способен к формированию полноценных «инсуляторных телец».

ЧАСТЬ II

1. Удаление сигналов ядерной локализации белка *Mod(mdg4)* влияет на распределение белка в клетке и не влияет на его инсуляторные свойства.

Для анализа роли сайтов ядерной локализации в распределении «инсуляторных телец» в клетке нами была сделана серия химерных конструкций с делецией первого и второго сайтов ядерной локализации. Обе конструкции содержали трехкратный FLAG-эпитоп на С-конце (Рис.1).

При иммунохимическом окрашивании против FLAG-эпитопа в трансфицированных S2 клетках во всех вариантах наблюдалось равномерное цитоплазматическое распределение белка. Белок был невидим в ядре и показывал диффузное распределение в цитоплазме. Таким образом, при удалении любого из сигналов NLS белок показывал цитоплазматическое распределение без образования «инсуляторных телец» (цветные фотографии представлены в тексте диссертации).

Функциональный анализ в мухах *Drosophila* проводился по той же схеме, что для ModΔQ и ModΔC производных (см. выше). В линиях с аллелями y^2 и ct^6 на фоне $mod(mdg4)^{u1}/mod(mdg4)^{u1}$ мутации, конструкции экспрессировали белки Mod-ΔNLS1 и Mod-ΔNLS2, которые полностью восстанавливали работу инсулятора. Во всех анализируемых конструкциях наблюдалось нарушение развития крыловой пластины (аллель ct^6) и снижение экспрессии гена *yellow* в абдоминальной части брюшка *Drosophila*.

Полученные неожиданные результаты показывают, что, несмотря на отсутствие сайтов ядерной локализации и цитоплазматическое распределение белка, наблюдаемом при иммуноокрашивании, Mod-ΔNLS1 и Mod-ΔNLS2 производные способны проникать в ядро клетки и функционировать в составе инсуляторных комплексов.

2. Процесс сумолирования играет ключевую роль в образовании спеклов белка Mod(mdg4)

Совсем недавно в лаборатории В. Корцеса была показана возможность сумолирования различных компонентов инсуляторного комплекса. В том числе было показано, что белок Mod(mdg4) сумолируется *in vitro* и *in vivo*. К тому же недавно в работе П.П. Пондолфи была показана важная роль процесса сумолирования в образовании PML телец, которые сильно похожи на исследуемые нами «инсуляторные тельца». Поэтому мы решили проанализировать связь сумолирования и образования «инсуляторных телец».

Методами биоинформатики нами были выявлены два мотива ΨКХЕ, являющихся консенсусом для связывания с белком SUMO. Один из них располагается за 62 аминокислоты от первого сайта ядерной локализации в позиции 160, а другой в позиции 423 непосредственно около второго NLS (Рис.8).



Рис.8. Схематическое изображение доменов белка Mod(mdg4). Вертикальными прямоугольниками отмечены аминокислотные замены в сайтах прикрепления белка SUMO (K160R и K423R).

Основываясь на этих данных, нами было сделано несколько конструкций. Производная Mod K160R имела точечную замену остатка лизина на аргинин в одном из сайтов прикрепления SUMO, таким образом, нарушалась консенсусная последовательность ΨКХЕ. Производная Mod K423R имела такую же точечную замену во втором сайте прикрепления SUMO. Производная Mod K160R/K423R имела такие же точечные замены в

обоих сайтах связывания для белка SUMO. В клетках S2, экспрессирующих мутантные варианты Mod K160R и ModK423R, при окрашивании антителами к эпитопу FLAG, белок распределялся как в клетках «дикого типа»: он находился в ядре и образовывал «инсуляторные тельца». Точно также распределялись и другие белки-компоненты инсуляторного комплекса (Su(Hw) и CP190), демонстрируя полную колокализацию с производными формами Mod(mdg4). Следовательно, изменение любого одного из сайтов сумолирования не влияло на способность белка Mod(mdg4) участвовать в формировании «инсуляторных телец» (цветные фотографии представлены в тексте диссертации).

Однако, при изменении обоих сайтов связывания SUMO, картина распределения белка Mod K160R/K423R коренным образом менялась (Рис.9). Белок по-прежнему находился в ядре, но не образовывал «инсуляторных телец», а распределялся равномерно внутри ядра. При этом наблюдалось изменение в распределении других белков инсуляторного комплекса. Распределение белка CP190 не менялось по сравнению с распределением в клетках дикого типа. Однако белок Su(Hw) имел более диспергированное по сравнению с контролем распределение: он с одной стороны частично колокализовался с белком CP190 в составе «инсуляторных телец», но с другой стороны частично локализовался с диффузным распределением Mod K160R/K423R производной. Следовательно, можно утверждать, что несумолированная форма белка Mod(mdg4) не в состоянии формировать или вступать в «инсуляторные тельца». При этом экспрессия такой производной белка Mod(mdg4) частично нарушает распределение связанного с ним Su(Hw) белка. Это указывает на то, что белок Mod(mdg4) может не только вовлекаться в «инсуляторные тельца», но и участвовать в их формировании (цветные фотографии представлены в тексте диссертации).

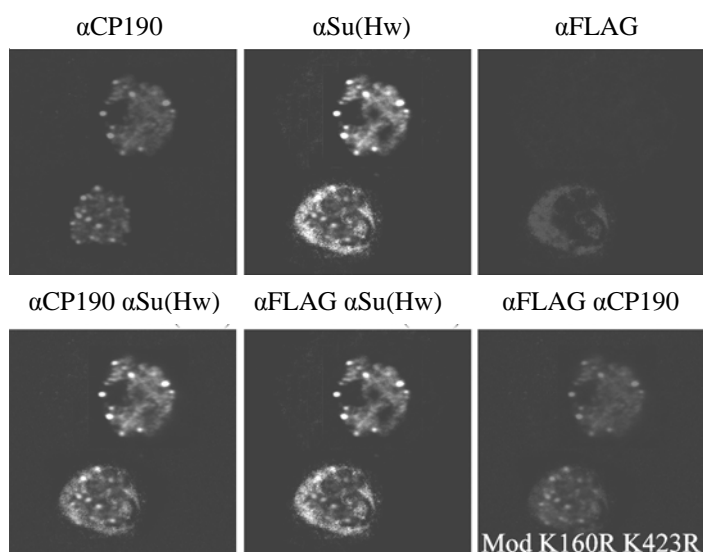


Рис.9 Распределение белка Mod с мутированными сайтами прикрепления белка SUMO в ядрах клеток S2. Представлены результаты специфического иммунного окрашивания ядер S2-клеток *Drosophila* (α FLAG – экспрессируемый рекомбинантный белок; α Su – белок Su(Hw); α CP190 – белок CP190; α Lamin – белок ядерной оболочки).

Один из компонентов процесса сумолирования, белок Ubc9, выполняет роль фермента конъюгации (E2 лигаза), ковалентно пришивая белок SUMO к субстрату. С помощью метода двугибридной дрожжевой системы, мы обнаружили, что белок Ubc9 непосредственно взаимодействует с ВТВ доменом белка Mod(mdg4) (см. диссертацию). Для дальнейшего анализа связи сумолирования и образования «инсуляторных телец» мы использовали полученные нами ранее мутации в ВТВ домене белка Mod(mdg4)-67.2, которые нарушали его способность к димеризации. Анализ мутаций Mod R47Q, Mod D33N/H46D и Mod D33N/R47Q показал их способность формировать разные по форме и размеру «инсуляторные тельца» в ядрах клеток. Однако в двугибридной системе белок Ubc9 очень хорошо взаимодействует с белком Mod R47Q, но совсем не взаимодействует с Mod D33N/H46D и Mod D33N/R47Q производными. Таким образом, мы показали, что нарушение связывания белка Ubc9 не коррелирует с разрушением «инсуляторных телец» в ядре: несмотря на то, что белок Ubc9 не может связаться с производными Mod(mdg4), «инсуляторные тельца» способны образовываться в ядре. По-видимому, существует дополнительный белок способный привносить Ubc9 и осуществлять сумолирование Mod(mdg4)-67.2. И действительно, мы показали, что CP190 также способен взаимодействовать с Ubc9 (см. диссертацию). К тому же, белок CP190 входит в состав инсуляторного комплекса, взаимодействует с Mod(mdg4)-67.2 и сумолируется. Таким образом, белком способным привносить фермент конъюгации Ubc9, который ковалентно пришивает SUMO к субстрату – может являться CP190.

Каким же образом мутации в белке Mod(mdg4), нарушающие сайты сумолирования и, как следствие, образование «инсуляторных телец» будут влиять на инсуляцию в *Drosophila*? Для ответа на этот вопрос были получены трансгенные линии мух, экспрессирующие под промотором, содержащим UAS-последовательность, мутантные производные «Mod K160R», «Mod K423R» и «Mod K160R K423R». Последующее скрещивание таких линий с GAL-драйвером позволяло индуцировать экспрессию конструкции в любых тканях на любой стадии развития мухи. Все эксперименты с трансгенными конструкциями проводились на фоне мутации *mod(mdg4)^{u1}*. Эта мутация позволяет исследовать эффект экспрессии Mod(mdg4) производных без влияния эндогенного белка, поскольку она не позволяет белку связываться с инсуляторными комплексами.

Анализ инсуляторной активности производных Mod(mdg4) проводился на самцах *Drosophila* в аллелях локуса *ct* и *yellow*, вызванных инсерцией мобильного элемента МДГ4 (см. Результаты I часть, описание модельной системы).

Выяснилось, что все исследуемые варианты Mod восстанавливали активность инсулятора Su(Hw) на фоне *mod(mdg4)^{u1}/mod(mdg4)^{u1}* мутации, полностью воспроизводя

эффект, наблюдаемый в случае экспрессии белка дикого типа. Таким образом, *in vivo* ни одна из этих мутаций не оказывала влияние на инсуляторную функцию белка Mod(mdg4).

3. Уникальные С-концевые домены белка Mod(mdg4) не нужны для образования «инсуляторных телец»

Локус *mod(mdg4)* является сложным и состоит как минимум из 26 сплайс-вариантов, каждый из которых имеет общий N- и различные С-концы. Один из сплайс-вариантов кодирует белок Mod(mdg4) с молекулярной массой 67.2 кДа (Mod(mdg4)-67.2), который является одним из необходимых основных компонентов Su(Hw) инсуляторного комплекса. Уникальная С-концевая часть этого белка включает в себя домен, ответственный за инсуляцию, домен «цинковый палец» FLYWCH типа и второй сигнал ядерной локализации. Нарушение связи белка Mod(mdg4)-67.2 с белком Su(Hw) приводит к потере инсуляции и, как было показано в прежних исследованиях (Gerasimova and Corces, 1998; Gerasimova et al., 2000), к исчезновению «инсуляторных телец».

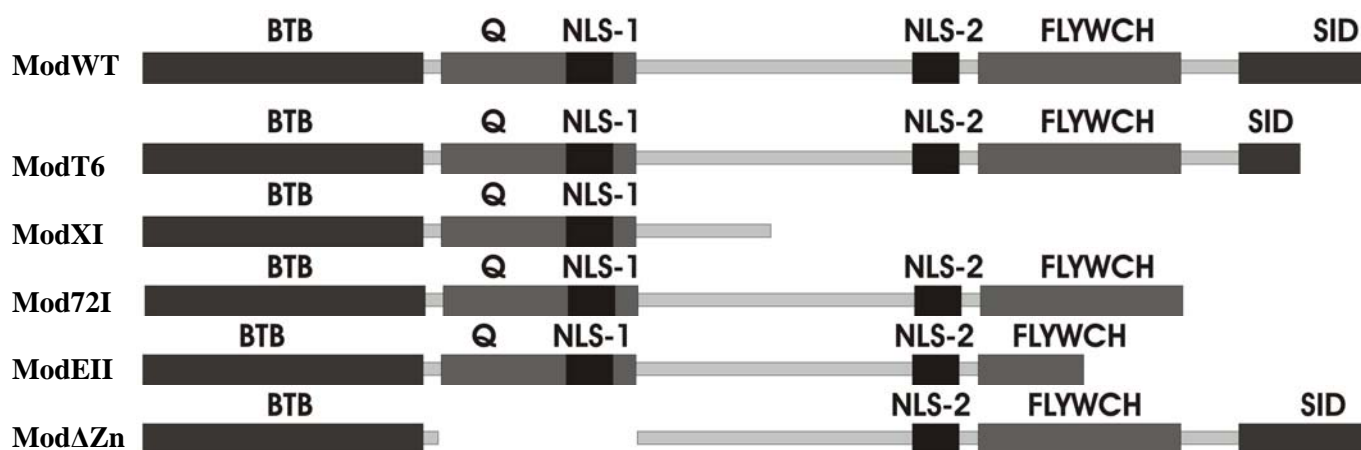


Рис.10. Схематическое изображение мутантных вариантов белка Mod(mdg4).
Сверху вниз: ModWT (дикий тип); ModT6 (аналог ModΔC); Mod XI; Mod 72I; Mod EII; Mod ΔZn.

Для того чтобы понять роль уникальных доменов белка Mod(mdg4)-67.2 в формировании «инсуляторных телец», нами были созданы ряд производных (Рис.10).

В конструкции ModΔZn был удален домен «цинковый палец» FLYWCH типа. Была создана производная ModEII идентичная мутации *mod^{ul}/mod^{ul}*, где от уникальной части белка оставался лишь второй сайт ядерной локализации с консенсусом для сумолирования. Мутация, при которой белок целиком лишился уникального для Mod(mdg4)-67.2 С-концевого района, получила название ModXI. При мутации Mod72I целиком удалялся район, ответственный за взаимодействие с белком Su(Hw). Все описанные выше конструкции имели на С-конце экспрессирующийся «в рамке» FLAG эпитоп. Анализ экспрессии полученных

производных в S2-клетках дал неожиданный результат. Все анализируемые белки имели ядерное распределение и образовывали полноценные «инсуляторные тельца» (цветные фотографии представлены в тексте диссертации). Причем, наблюдалась полная колокализация с другими белками инсуляторного комплекса – Su(Hw) и CP190. Однако генетический анализ тех же производных показал, что, по своей способности восстанавливать работу инсулятора, их можно разделить активные и не активные. Так танген *ModΔZn* полностью восстанавливал инсуляторную способность, в то время как конструкции экспрессирующие в мухах белки ModXI, Mod72I, а также мутации *mod^{u1}/mod^{u1}* (аналог производной ModEII) и *mod^{T6}/mod^{T6}* (аналог производной ModΔC) были не способны восстановить работу инсулятора. Эти эксперименты показали, что ни один из уникальных доменов белка Mod(mdg4)-67.2 не является необходимым для формирования «инсуляторных телец». Однако для нормальной работы инсулятора абсолютно необходим домен ответственный за взаимодействие с белком Su(Hw), так как при его отсутствии производные формы Mod(mdg4)-67.2 были не способны восстанавливать инсуляцию.

7. Выявление спеклообразующего компонента инсуляторных телец

Эксперименты с применением РНК-интерференции позволили нам выяснить, какой из белков, входящих в состав Su(Hw) инсулятора, является спеклообразующим. В трансфецированных S2-клетках спеклы полностью пропадали при снижении экспрессии белка CP190. И практически не исчезали при инактивации продукта гена *su(Hw)*. Western-блот анализ наглядно демонстрирует существенное снижение белка в ядерном экстракте, полученном из трансфецированных S2-клеток (Рис.10).

При снижении экспрессии белка Mod(mdg4), некоторое количество белка Su(Hw) не входит в ядерные спеклы, а распределено диффузно внутри ядра. Сформированные белком Su(Hw) спеклы менее интенсивно окрашены по сравнению с диким типом. В спеклах белок Su(Hw) колокализуется с белком CP190 (цветные фотографии представлены в тексте диссертации).

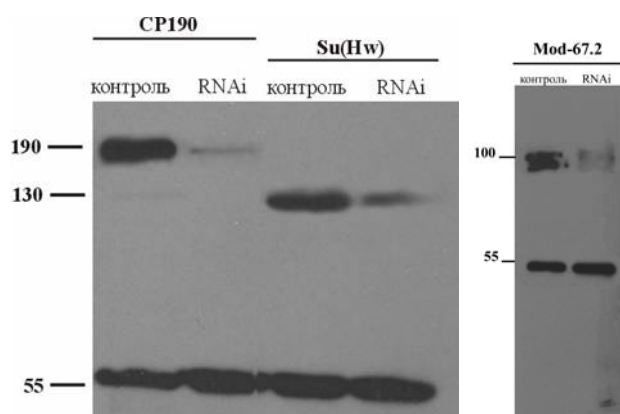


Рис. 10. Результаты Western-блот анализа.

Заметно существенное снижение белка, полученного из клеток, обработанных методом RNAi. В качестве контроля использовались нетрансфецированные клетки. Сравнение интенсивности экспрессии белков в трансфецированных и нетрансфецированных клетках проводили по уровню экспрессии белка тубулина. На рисунке отмечены размеры белков (в кДа): 190 кДа – белок CP190, 130 кДа – белок Su(Hw), 100 кДа – белок Mod(mdg4), 55 кДа – белок тубулин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большой интерес к вопросу о механизме действия инсуляторов вызван постепенным переносом центра тяжести в современных исследованиях с изучения простого взаимодействия между регуляторными элементами генов на выяснение влияния на экспрессию дальних и сверхдальних взаимодействий в геноме, а также влияние организации хроматина в ядре на экспрессию генов. Инсуляторы представляют один из ключевых механизмов эпигенетического контроля экспрессии генов и поддержания доменной структуры хроматина. Наконец, понимание механизма работы инсуляторов вносит большой вклад в выяснение основ работы энхансеров, сайленсеров и организации генома в целом.

Ранее была предложена модель механизма действия инсуляторов, основывающаяся на способности белков, входящих в состав инсуляторного комплекса, образовывать внутри ядра скопления, названные «инсуляторными тельцами». По этой модели, предполагается, что инсуляторные комплексы, связанные с ДНК, взаимодействуют друг с другом, образуя видимые в ядре скопления. Образовавшиеся «инсуляторные тельца» выпетливают хроматин, расположенный между ними, и формируют таким образом «домены независимой транскрипции». Предполагается, что регуляторные элементы, находящиеся в одном таком домене, не способны влиять на активность генов, расположенных в другом домене. Эта модель работы инсуляторов подкреплялась лишь тем, что в «инсуляторных тельцах» наблюдалась колокализация компонентов инсуляторного комплекса, а при введении мутации *mod(mdg4)^{ul}* наблюдалось ослабление инсуляторной активности и размывание «инсуляторных телец».

Изучая роль отдельных доменов белка Mod(mdg4), нам удалось разделить проявление инсуляторной активности и способность белков инсуляторного комплекса образовывать «инсуляторные тельца».

Используя производную белка Mod(mdg4) с делецией глутамин-богатого района – ModΔQ – мы показали, что этот белок аккумулируется в цитоплазме и не формирует каких-либо видимых образований в ядре. При этом в S2 клетках другие компоненты инсуляторного комплекса – белки Su(Hw) и CP190 – формировали нормально колокализирующиеся «инсуляторные тельца», а в имагинальных дисках, на фоне мутации *mod(mdg4)^{ul}/mod(mdg4)^{ul}*, происходило частичное или полное перераспределение белка Su(Hw) в цитоплазму, где он колокализовался с ModΔQ. Очевидно, что белок ModΔQ сохраняет способность взаимодействовать с белками, но не в ядре: его накопление и олигомеризация в цитоплазме может уменьшать количество доставляемых в ядро уже синтезированных белков Mod(mdg4) и Su(Hw). В то же время, в S2 клетках уже существует эндогенный белок

Mod(mdg4), способный участвовать в формировании и «закреплении» уже имеющихся на момент трансфекции «инсуляторных тельца». Это подтверждается данными, полученными при экспрессии белка ModΔQ на фоне $mod(mdg4)^+/mod(mdg4)^+$, когда «инсуляторные тельца» восстанавливались как для белка Mod(mdg4), так и для Su(Hw). При этом цитоплазматическое распределение также сохранялось, хотя и в меньшей интенсивности.

Другая производная, ModΔC, несла делецию части домена, отвечающего за взаимодействие с белком Su(Hw). Несмотря на это, ModΔC был способен образовывать «инсуляторные тельца» как в S2 клетках, так и в имагинальных дисках. При этом, образующиеся «инсуляторные тельца» очень хорошо колокализовались с белками Su(Hw) и CP190.

Для функционального анализа полученных производных мы использовали хорошо отработанные модельные системы: аллели y^2 и ct^6 , вызванные инсерцией мобильного элемента МДГ4, в составе которого находился Su(Hw) инсулятор. В этих модельных системах нами были получены неожиданные результаты: производная ModΔQ оказалась полностью функциональной, в то время как ModΔC (ее полный аналог мутация $mod(mdg4)^{T6}$) – нет. Абсолютно такая же ситуация наблюдалась в других модельных системах, которые позволяли тестировать функциональность производных белка Mod(mdg4) с обоими инсуляторами – *gypsy* и эндогенным Su(Hw)-зависимым (1A2) инсулятором.

В эксперименте по коиммунопреципитации белок Su(Hw) выявлялся в одном комплексе с ModΔC, но гораздо хуже, чем в случае белка ModΔQ. Анализ в двугибридной дрожжевой системе показал, что производная ModΔC, в отличие от ModΔQ, не способна взаимодействовать с белком Su(Hw) напрямую. Вероятно, взаимодействие между ModΔC и Su(Hw) опосредуется белком CP190, про которого известно, что он взаимодействует с белком Su(Hw) и Mod(mdg4) *in vitro* и *in vivo*.

Важно отметить, что исчезновение в ядрах окрашивания против ModΔQ не означает отсутствие самого белка. Это только значит, что внутриядерный белок ModΔQ не агрегирует сам или не примыкает к уже существующим спеклам. Стандартное субклеточное фракционирование и *western*-гибридизация четко демонстрировали наличие ModΔQ и Su(Hw) в ядре. Иммуоокрашивание политенных хромосом четко показало наличие белка ModΔQ на хроматине и его полную колокализацию, в отличие от производной ModΔC, с белком Su(Hw).

Однако более уместными в данном случае являются данные, полученные при иммунопреципитации хроматина (X-ChIP), которые показывали, что с районами хроматина, про которые было известно, что они содержат Su(Hw)-зависимые инсуляторы и похожие

мотивы, повсеместно были связаны одинаковые количества белка дикого типа Mod(mdg4) и ModΔQ. Уровень же белка ModΔC был неотличим от фона.

Обобщая, можно сказать, что белок ModΔQ сохраняет все существенные для инсультатора свойства. В ядра клеток *Drosophila* он доставляется, возможно, по причине наличия одно сигнала ядерной локализации (NLS). С сайтами Su(Hw)-инсультатора на хроматине связывается не менее эффективно, чем белок дикого типа. Но белок ModΔQ не формирует ядерные спеклы и не вступает в уже существующие. И наоборот, белок ModΔC, невзаимодействующий с белком Su(Hw), совершенно неспособен связываться с инсультаторными сайтами на хроматине. При этом он полностью колокализуется (возможно, присоединенный другими белками) с белком Su(Hw) в ядерных «инсультаторных тельцах».

Эти данные подтверждают, что в соответствии со свойствами, продемонстрированными *in vitro*, белок ModΔQ является функциональным эквивалентом белку дикого типа Mod(mdg4) на инсультаторах *Drosophila*, тогда как ModΔC таковым не является.

Однако остается вопрос: что же такое «инсультаторные тельца», как они формируются и какова их роль. В ядре клетки можно наблюдать множество различных образований на подобии «инсультаторных телец». К примеру, хорошо известные PML-NB, включающие в свой состав многие, не обязательно функционально связанные, белки. Недавно было показано, что в их образовании важную роль играет процесс сумолирования (Bernardi and Pandolfi, 2007). Также совсем недавно была показана возможность сумолирования различных компонентов инсультаторного комплекса. В том числе было показано, что белки Mod(mdg4) и CP190 сумолируются *in vitro* и *in vivo*, а белок Su(Hw) – нет (Corces et al, 2006). В нашей работе мы продемонстрировали, что ранее показанное сумолирование белка Mod(mdg4) необходимо для привлечения его в образующиеся «инсультаторные тельца», поскольку мутирование найденных нами сайтов сумолирования нарушает образование «инсультаторных телец» белка Mod(mdg4). При этом мутирование сайтов сумолирования Mod(mdg4) частично дестабилизирует входение в них белка Su(Hw) и никак не сказывается на способности белка CP190 формировать «инсультаторные тельца». По-видимому, сумолированный белок Mod(mdg4) стабилизирует входение Su(Hw) в «инсультаторные тельца».

Однако, такие изменения в структуре «инсультаторных телец» никак не повлияли на функциональную активность инсультатора. При экспрессии белка Mod(mdg4) с мутированными сайтами сумолирования, в нашей модельной системе (аллели y^2 и ct^6) инсультатор продолжал блокировать энхансеры, что было видно по измененной пластине крыла и снижению экспрессии гена *yellow* в кутикуле. Более того, все производные с различными делециями уникального района белка Mod(mdg4) были способны образовывать

полноценные «инсуляторные тельца» в ядре клетки. Однако, только те из них, которые имели домен отвечающий за связывание с белком Su(Hw), были способны участвовать в инсуляции. Все остальные производные в этом отношении были не функциональны.

Исходя из полученных данных, мы сделали вывод о том, что нет прямой связи между образованием «инсуляторных телец» в ядре клеток и функционированием инсулятора. Основываясь на этом, мы выдвигаем гипотезу, что «инсуляторные тельца» являются своеобразными «депо» различных, в том числе и инсуляторных, белков (Рис. 11). Клетка, сумолируя неиспользуемые в данный момент в каких-либо процессах белки, накапливает их в таких «депо». При необходимости, за счет процесса десумолирования, белки могут быстро собраться в необходимый комплекс. Таким образом, «инсуляторные тельца» могут являться аккумуляторами белков, участвующих в одних процессах, и могут способствовать быстрой сборке необходимых комплексов.

Проведенные нами исследования ставят под сомнение идею о «инсуляторных тельцах», как организаторах структуры и функции генома, поддерживающих высокоорганизованный хроматин и формирующих функциональные домены. Особенно это становится очевидно в свете давно и хорошо известных фактов о том, что сильные мутации по белку Su(Hw) нарушают только фертильность самок, а мутация $mod(mdg4)^{ul}$, являющаяся нуль-мутацией для инсуляции, не нарушает никаких процессов развития *Drosophila*.

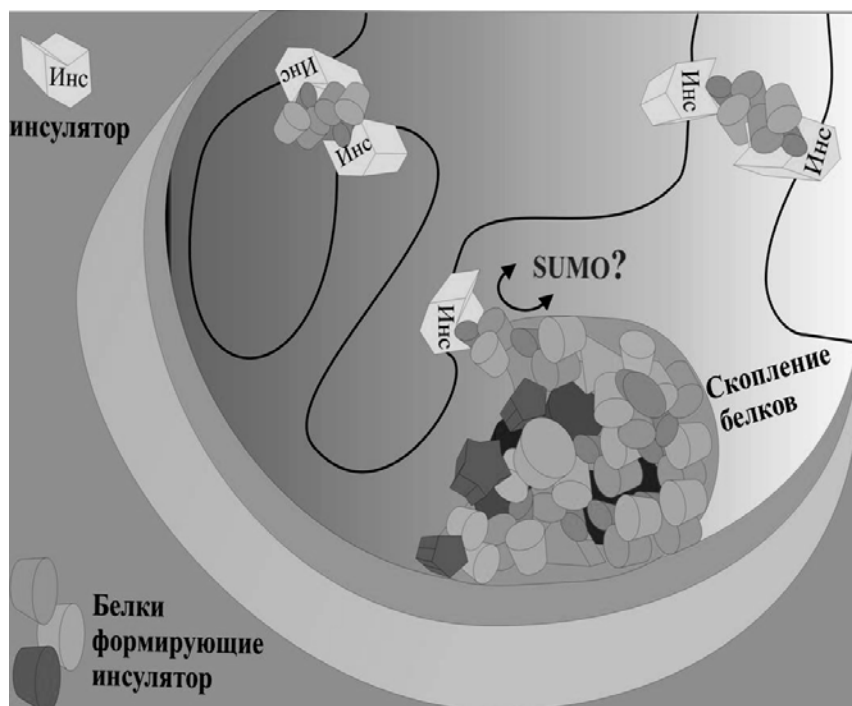


Рис. 11. Предлагаемая модель, по которой «инсуляторные тельца» являются «депо», в которых хранится запас белков. Сборка инсуляторных комплексов, по-видимому, контролируется процессами сумолирования-десумолирования. Схематически изображено ядро клетки с нитями хроматина, сближенными в сайтах связывания белка Su(Hw). Скопления белков (известные ранее как «инсуляторные тельца») напрямую не связаны с функционированием инсулятора.

ВЫВОДЫ

1. Доказано отсутствие прямой взаимосвязи между образованием внутриядерных «инсуляторных телец» и активностью Su(Hw)-зависимых инсуляторов у *Drosophila melanogaster*
2. Впервые показано, что вовлечение инсуляторного белка Mod(mdg4) в состав «инсуляторных телец» полностью зависит от процесса его сумолирования
3. Продемонстрировано, что инсуляторный белок CP190 играет ключевую роль в образовании «инсуляторных телец»
4. Выдвинута гипотеза о роли «инсуляторных телец» как «фабрике» по быстрой сборке инсуляторного комплекса и хранения его компонентов

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Golovnin A, Melnikova L, Volkov I, Kostuchenko M, Galkin A & Georgiev P. «'Insulator bodies' are aggregates of proteins but not of insulators». EMBO reports, 2008, V.9. P. 440-445.
2. Костюченко М. В., Савицкая Е. Е., Волков И. А., Головнин А. К., Георгиев П. Г. (2008) «Изучение функционального взаимодействия между тремя копиями инсулятора из мобильного элемента МДГ4 на примере модельной системы гена *miniwhite Drosophila melanogaster*» Доклады Академии Наук, 2008, Том 421, №6, Стр.830–835.

Тезисы конференций:

1. Волков И.А., Головнин А.К.
Международная молодежная научно-методическая конференция «Проблемы молекулярной и клеточной биологии»
Томский государственный университет (г. Томск) 10-12 мая 2007 г.
«Влияние различных доменов белка Mod(mdg4) на образование «инсуляторных телец» в ядрах клеток *Drosophila melanogaster*»
2. A. Golovnin, L. Melnikova, I. Krivega, M. Kostuchenko, I. Volkov, P. Georgiev. The nucleoskeletal proteins EAST and CP60 modulate activity of the *gypsy* insulator in

- Drosophila melanogaster*. "Nuclear Structure & Dynamics", Montpellier, France, 1-5 September, 2007.
3. Мельникова Л.С., Головнин А.К., Кривега И.В., Костюченко М.В., Волков И.А.
IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов
Новосибирск 11-15 мая 2008 г.
«Белки ядерного матрикса EAST и CP60 влияют на активность *gurus* инсулятора у *Drosophila melanogaster*»
 4. Головнин А.К., Волков И.А.
IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов
Новосибирск 11-15 мая 2008 г.
«Исследование распределения инсуляторных белков в соматических клетках дрозофилы»
 5. Волков И.А., Головнин А.К.
Школа-конференция «Биология: традиции и инновации в 21 веке» в рамках I Всероссийского конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз – Россия – 2008» Казанский государственный университет (г. Казань) 6-10 июля 2008 г.
«Влияние различных доменов белка Mod(mdg4) на образование «инсуляторных телец» в ядрах клеток *Drosophila melanogaster*»
 6. Волков И.А., Головнин А.К.
I Международная конференция «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии»
Харьковский государственный университет (г. Харьков) 15-20 сентября 2008 г.
«Влияние различных доменов белка Mod(mdg4) на образование «инсуляторных телец» в ядрах клеток *Drosophila melanogaster*»