

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

На правах рукописи

ПОМЕРАНЦЕВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА

« ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ
ГЕНОМА У *Drosophila melanogaster* В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ГЕНОВ
yellow и white »

Специальность 03.00.26 - молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва

2006

Работа выполнена в лаборатории регуляции генетических процессов
Института биологии гена Российской академии наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук Мельникова Л.С.

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор Крамеров Д.А.
доктор биологических наук, профессор Глазков М.В.
Ведущая организация: Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Защита диссертации состоится 21 декабря 2006 года в 12 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 18 ноября 2006 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
канд.фарм.наук  Грабовская Л.С.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Перемещение мобильных элементов - транспозонов играет важную роль в обеспечении генотипического разнообразия у эукариот. В настоящее время подробно изучены транспозоны, обнаруженные в геноме плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Более половины спонтанных мутаций, возникающих в геноме дрозофилы, вызваны встраиванием транспозона в тот или иной ген. Наиболее исследованным мобильным элементом у *Drosophila melanogaster* является *P* элемент, который имеет на концах короткие инвертированные повторы. Ранее в нашей лаборатории были открыты супернестабильные мутации, которые возникали с высокой частотой в результате мобилизации активности *P* элемента. Было показано, что такие мутации вызваны химерным элементом, состоящим из уникальных участков генома, окруженных делецированными копиями *P* элемента. Мобилизация активности *P* элемента приводила к инверсиям последовательности между *P* элементами, увеличению или уменьшению фрагментов генома, входящих в состав химерных элементов. При этом внутренние части химерного элемента, содержащие регуляторные последовательности, могли влиять на экспрессию рядом расположенного гена, что приводило к проявлению мутантного фенотипа. Таким образом, химерные элементы способны играть значительную роль в эволюции регуляторных последовательностей, участвуя в создании наиболее эффективно действующей регуляторной системы для конкретного гена. В представленной работе было продолжено изучение механизмов возникновения и распространения химерных элементов. Кроме того, химерные элементы были использованы для выявления новых регуляторных последовательностей и изучения взаимодействия между ними.

Также, в работе было продолжено исследование наиболее изученного инсулятора дрозофилы, состоящего из 12 сайтов связывания для белка Su(Hw). Известно, что одна копия Su(Hw) инсулятора в составе трансгенной конструкции полностью блокирует взаимодействие между энхансерами тела и крыльев и промотором гена *yellow*, если находится между ними. Ранее в нашей лаборатории было показано, что две копии Su(Hw) инсулятора, расположенные между энхансером и промотором, не могут блокировать их взаимодействие. В представленной работе с помощью модельной системы гена *yellow* *Drosophila melanogaster* было доказано, что Su(Hw) инсуляторы не формируют независимых транскрипционных доменов, а степень инсуляции зависит от расстояния между ними.

Цели и задачи исследования.

Основными целями данного исследования являлись:

- (1) изучение регуляторных элементов, входящих в состав химерных элементов;
- (2) изучение зависимости взаимодействия между регуляторными элементами от их взаимного расположения и расстояния между ними.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Изучить механизмы возникновения химерных мобильных элементов, состоящих из *P* элементов и уникальных фрагментов генома и механизмы их транспозиций.
2. Исследовать влияние перемещения химерных элементов из одного локуса в другой на регуляцию генной экспрессии.
3. Исследовать свойства регуляторных элементов, входящих в состав химерных элементов.
4. Выяснить, как расстояние между двумя Su(Hw) инсулаторами, окружающими энхансеры, влияет на их способность блокировать взаимодействие между энхансерами и изолированным промотором гена *yellow Drosophila melanogaster*.

Научная новизна и практическое значение работы. В представленной работе были подробно изучены механизмы образования и транспозиции химерных мобильных элементов. Было показано, что химерные элементы могут включать в свой состав как инсулаторы, так и энхансеры, которые регулируют активность рядом расположенных генов. В составе изученного химерного элемента были обнаружены энхансер и промотор для гена CG3777 дрозофилы. Было показано, что регуляторный элемент размером 325 п.н., включающий промотор гена CG3777, является специфичным инсулатором для гена *yellow*. Также впервые были получены данные о функциональном взаимодействии между промоторами: продемонстрирована способность промоторов генов *yellow* и CG3777 взаимодействовать на сверхбольших дистанциях. Кроме того, было продемонстрировано, что расстояние между Su(Hw) инсулаторами, окружающими энхансеры гена *yellow*, является фактором, влияющим на инсулацию в данной модельной системе. Энхансеры, окруженные Su(Hw) инсулаторами, расположенными на большом расстоянии, сохраняют способность взаимодействовать с изолированным промотором. Таким образом, впервые доказано, что взаимодействие между Su(Hw) инсулаторами не приводит к созданию независимых транскрипционных доменов.

В настоящее время мобильные элементы и инсулаторы находят все большее

применение при создании генно-инженерных конструкций. Зависимость свойств регуляторного элемента от геномного окружения и способность различных регуляторных элементов взаимодействовать на больших дистанциях должны приниматься во внимание при использовании трансгенов, содержащих регуляторные элементы, в генотерапии, а также при проведении экспериментов по эктопической интеграции генетического материала в гены различных организмов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции *Advances in Molecular Cell Biology* (Москва, 2004), на XVIII зимней молодежной научной школе (Москва, 2006), на 46 и 47 Ежегодных конференциях по исследованиям на дрозофиле (Сан-Диего, США, 2005 и Хьюстон, США, 2006), на 10-ой школе-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2006) и на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2005).

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

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 105 страницах, включает 8 рисунков и сводную таблицу полученных результатов, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 134 источника.

Результаты исследования

1. Изучение новых регуляторных элементов из 1A района X хромосомы *Drosophila melanogaster*.

1.1 Обнаружение новых регуляторных элементов при помощи P элемент-зависимой генетической нестабильности. Ранее, при индукции Р-М гибридного дисгенеза, в нашей лаборатории были получены и охарактеризованы на молекулярном уровне супернестабильные мутации в локусе *yellow* (Georgiev *et al.* 1992). У *Drosophila melanogaster* ген *yellow* необходим для пигментации кутикулы и ее производных (Nash and Yarkin 1974). Его экспрессия, в зависимости от типа ткани и стадии развития, регулируется пятью энхансерами (Geyer and Corces 1987). Выявленные супернестабильные мутации были вызваны инсерциями химерных элементов в положение -69 п.н. (здесь и далее, в т.ч. на рисунках, нумерация в локусе *yellow* идет от сайта инициации транскрипции гена). Химерные элементы содержали разноразмерные последовательности

геномной ДНК, гомологичные различным участкам X хромосомы и окруженные частично делетированными P элементами (Georgiev *et al.* 1997).

Для исследования механизмов влияния химерного элемента на экспрессию расположенного рядом гена *yellow* был выбран супернестабильный аллель y^{*s} (рис 1A), который был получен в результате индукции гибридного дисгенеза в линии, содержащей мутацию y^2 . В аллеле y^2 между промотором и энхансерами тела и крыльев гена *yellow* находится ретротранспозон МДГ4 (*gypsy*) (Geyer *et al.* 1986). Инсулатор Su(Hw), расположенный в регуляторной области МДГ4, блокирует активацию гена *yellow* только энхансерами тела и крыльев (ЭнТ и ЭнК), а энхансер щетинок (ЭнЩ), расположенный в инtronе, сохраняет способность стимулировать транскрипцию в щетинках. Мутация y^{*s} была вызвана внедрением химерного элемента размером 5.4 т.п.н. в положение -69 п.н. и одновременной делецией *yellow* последовательностей между -146 и -70 п.н. Химерный элемент состоит из P элементов (P1 и P2), размером 1.2 т.п.н. каждый, расположенных «хвост к хвосту», и заключенной между ними последовательности ДНК длиной 3030 п.н. (рис. 1A). Эта последовательность является дупликацией 1A района X хромосомы, расположенного дистальнее локуса *yellow*. При изучении производных аллеля y^{*s} в 1A районе X-хромосомы были найдены новые регуляторные элементы 1A-RE и En1A.

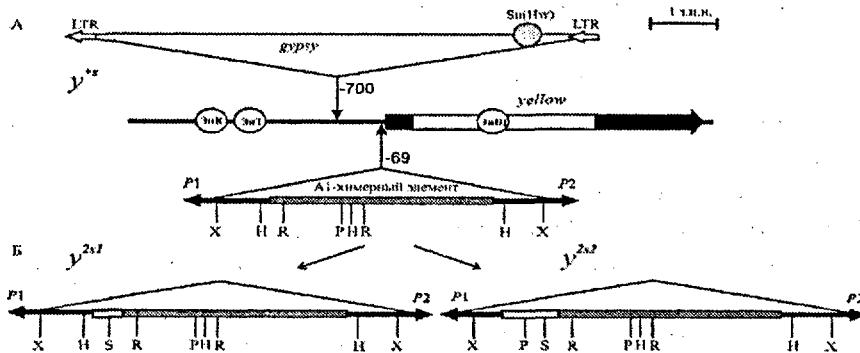


Рис 1. Схематичное изображение локуса *yellow* и структуры аллелей y^{*s} , y^{2s1} и y^{2s2} . В гене *yellow* черными прямыугольниками обозначены экзоны, белым – инtron, энхансеры – кружками. Треугольниками показаны инсерции мобильных элементов. Черными стрелками обозначены P элементы. Внутренняя часть химерных элементов показана серым прямыугольником, дополнительная последовательность в y^{2s1} и y^{2s2} – белым прямыугольником. Сайты рестриктаз обозначены вертикальными штрихами с символами: R, *EcoRI*; X, *XbaI*; S, *SalI*; P, *PstI*; H, *HindIII*. Прочие пояснения в тексте.

1.2 Структура и свойства нового энхансера En1A из 1A района X хромосомы *Drosophila melanogaster*. Мухи, несущие аллель *y⁺*, имеют темную окраску. Следовательно, при перемещении врекуляторную часть гена *yellow* участка ДНК из 1A района X хромосомы активируется экспрессия гена в теле и крыльях, несмотря на то, что соответствующие энхансеры заблокированы инсулятором *Su(Hw)*. При помощи трансгенных конструкций (рис. 2) в перемещенной последовательности ДНК был локализован генетический элемент, названный нами энхансер 1A (En1A).

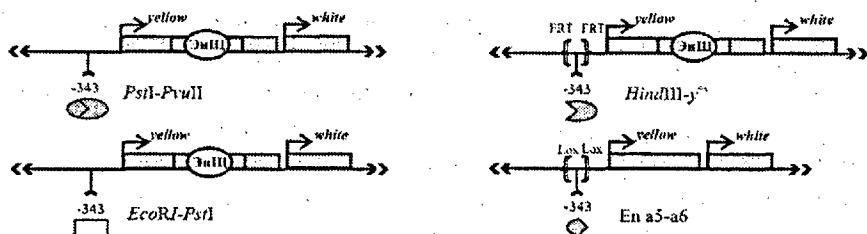


Рис. 2. Схемы конструкций, созданных для картирования и исследования свойств En1A энхансера. Стрелками показано направление транскрипции генов *yellow* и *white*. Серыми прямоугольниками обозначены экзоны, белым – инtron и кружком – энхансер щетинок. Вертикальными штрихами обозначены позиции фрагментов En1A, цифры под ними=numеруют нуклеотиды относительно старта транскрипции гена *yellow*. Название фрагментов En1A совпадает с названиями конструкций и написано рядом. Фигурные скобки обозначают сайты распознавания рекомбинаций.

Сначала для проверки способности стимулировать экспрессию *yellow* в составе трансгенной конструкции были выбраны два рестриктных фрагмента: *EcoR I-PstI* длиной 771 п.н. и *PstI-PvuII* длиной 1748 п.н., перекрывающие вместе большую часть дупликации из 1A района (рис. 6). Эти фрагменты были помещены перед геном, лишенным энхансеров тела и крыльев. Изучались трансгенные линии, содержащие в геноме одну копию конструкции. В линиях, содержащих конструкцию «*EcoR I-PstI*», в 19 случаях из 20 мухи имели неокрашенные тело и крылья. Фенотип мух, несущих конструкцию «*PstI-PvuII*», был близок к дикому типу в 23 из 31 полученной линии, что доказывает способность этого фрагмента функционально заменять энхансеры гена *yellow*. Следовательно, в пределах рестриктного фрагмента *PstI-PvuII* находится энхансер транскрипции, который получил название En1A.

Для точной локализации En1A был создан ряд генетических конструкций, которые содержали различные фрагменты химерного элемента в том же положении, что и в конструкции «*PstI-PvuII*». Фрагмент длиной 1681 п.н. - от сайта рестриктазы *HindIII* внутри химерного элемента до сайта рестриктазы *HindIII* в *P* элементе из аллеля *y⁺* - оказался лишен энхансерных свойств: в 10 из 10 полученных линий, трансгенных по конструкции «*HindIII-y⁺*», тело и крылья у мух были неокрашены. Вследствие этого был сделан вывод, что En1A должен находиться между сайтами *PstI* и *HindIII*.

При помощи компьютерного анализа в этом районе был проведен поиск потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов. В результате был выделен фрагмент размером 362 п.н., включающий вырожденные консенсусы для связывания белков. Этот фрагмент был получен при помощи ПЦР с использованием праймеров a5 и ab (рис. 6) и вставлен в положение -343 п.н. перед промотором гена *yellow*. Фрагмент был окружен сайтами для Cte рекомбиназы (точные сайты), позволяющими вырезать исследуемый элемент *in vivo* (Siegal and Hartl 2000). Для создания конструкции «En a5-ab» была использована кДНК гена *yellow*, которая не содержала энхансеров тела, крыльев и щетинок. Было получено 17 трансгенных линий. Во всех линиях мухи имели желтую окраску тела и крыльев, но щетинки были темными, несмотря на отсутствие энхансера щетинок. При вырезании последовательности, заключенной между точками сайтов, в 12 линиях из 15 пигментация щетинок исчезала. Таким образом, стимуляция экспрессии гена в щетинках связана с фрагментом a5-ab.

На основании полученных результатов мы предположили, что энхансер En1A имеет неоднородную структуру. Одна часть, размером 365 п.н., получившая название «коммуникаторной», сама по себе стимулирует экспрессию гена *yellow* только в щетинках, однако она необходима для стимуляции полноразмерным энхансером экспрессии *yellow* в теле и крыльях. Другая часть размером 1383 п.н. сама по себе не влияет на экспрессию гена *yellow*, но в комбинации с коммуникаторной частью индуцирует высокий уровень экспрессии в теле и крыльях. Возможно, в этой части содержатся сайты связывания для активаторов транскрипции гена *yellow* в теле и крыльях, поэтому она была названа «активаторной». Полный En1A, размером 1748 п.н., активирует транскрипцию гена *yellow* во всех кутикулярных структурах.

1.3 Исследование регуляторного элемента 1A-RE из 1A района X хромосомы *Drosophila melanogaster*. Новый регуляторный элемент 1A-RE был обнаружен в ходе дальнейшей работы с аллелем y^{*s} . В результате активации гибридного дисгенеза были получены производные этого аллеля - y^{2s1} и y^{2s2} (рис. 1Б). Структура производных аллелей была изучена с помощью молекулярных методов исследования (анализ продуктов ПЦР и секвенирование ДНК). Выяснилось, что появление новых аллелей y^{2s1} и y^{2s2} вызвано увеличением последовательности ДНК из 1A района X хромосомы, входящей в состав химерного элемента, на 126 и 570 п.н. соответственно. Фенотипическое проявление этих аллелей такое же как в аллеле y^2 (неокрашенные тело и крылья, темные щетинки). Следовательно, активность энхансера En1A, входящего в состав химерных элементов в производных y^{2s1} и y^{2s2} , заблокирована. Было сделано предположение, что *de novo* дуплицированный фрагмент из района 1A содержит регулятор экспрессии *yellow*. Предполагаемый регуляторный элемент был назван 1A-RE, (*Regulatory Element from 1A region*). Его влияние на экспрессию гена *yellow* изучалось при помощи экспериментов с трансгенными линиями дрозофилы.

В первую очередь, изучалась инсуляторная активность 1A-RE элемента. В трансгенных конструкциях фрагмент *EcoRI-PstI* длиной 594 п.н., предположительно содержащий 1A-RE (рис. 6), помещали в различное положение относительно энхансеров и промотора гена *yellow*. В двух первых конструкциях исследуемый фрагмент находился между промотором и энхансерами тела и крыльев гена *yellow* в положениях -893 п.н. и -343 п.н. (рис. 3). Было получено 6 линий, трансгенных по конструкции «-343 1A-RE», и 9 линий, трансгенных по конструкции «-893 1A-RE» (4 в прямой и 5 в обратной ориентации относительно нативного положения фрагмента *EcoRI-PstI*). В большинстве полученных линий - 6 из 6 для конструкции «-343 1A-RE» и 3 + 4 из 9 для конструкции «-893 1A-RE» - пигментация тела и крыльев были значительно снижены, что предполагает частичную инактивацию энхансеров. Однако в конструкциях, где фрагмент 1A-RE находился в положениях -2207 п.н. и +797 п.н., окраска тела и крыльев у мух практически соответствовали дикому типу. Следовательно, фрагмент 1A-RE проявляет свойства инсулятора, если располагается между энхансерами тела и крыльев и промотором гена *yellow*, независимо от ориентации. Окраска щетинок оставалась темной во всех трансгенных линиях. Возможно, фрагмент 1A-RE не способен блокировать активность энхансера щетинок или же 1A-RE способен стимулировать экспрессию *yellow* в щетинках.

Следующей задачей являлось уточнение локализации инсулитора внутри фрагмента *EcoRI-PstI*. Сначала была исследована инсулиторная способность субфрагмента *Sall-PstI* размером 206 п.н. (рис. 6) в положении -893 п.н. (рис. 3). Но 13 из 16 линий, трансгенных по конструкции «*Sall-PstI*», имели интенсивно окрашенные тело и крылья. Следовательно, фрагмент *Sall-PstI* не обладает способностью блокировать энхансеры тела и крыльев гена *yellow*. Далее был исследован участок длиной 325 п.н., расположенный между праймерами a7-a8 и содержащий сайт *Sall* (рис. 6). В конструкции «1A-RE 325» (рис. 3) этот фрагмент был помещен в положение -893 п.н. в окружении *lox* сайтов, обеспечивающих возможность его вырезания *in vivo*. Для проверки специфичности инсулиторного действия 1A-RE в той же конструкции энхансер глаз ЭнГ, контролирующий экспрессию гена *white* в глазах (Qian *et al.* 1992), был вставлен между ЭнГ и ЭнК. Чтобы обеспечить возможность вырезания, ЭнГ был окружен сайтами FRT, которые распознаются рекомбиназой Flp (Golic and Lindquist 1989). Как и в случае с фрагментом *EcoRI-PstI*, пигментация тела и крыльев в линиях, несущих конструкцию «1A-RE 325», была резко снижена. Удаление фрагмента 1A-RE 325 усиливало пигментацию в 14 из 15 трансгенных линий, из чего можно сделать вывод, что фрагмент 325 п.н. содержит функциональный 1A-RE инсулитор.

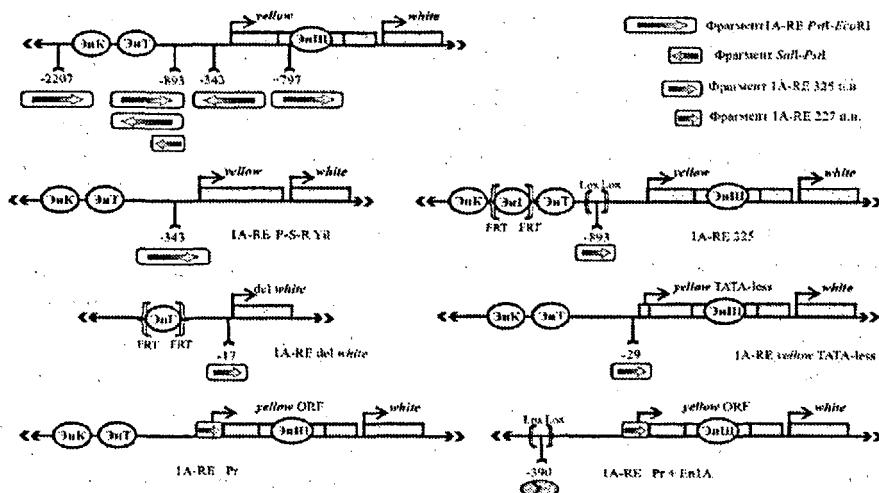


Рис 3. Схемы конструкций, созданных для исследования 1A-RE. Обозначения см. на рис. 1 и 2.

При вырезании фрагмента 1A-RE ни в одной из исследованных линий окраска глаз у мух не изменилась. Таким образом, 1A-RE не способен изолировать энхансер глаз от гена *white* и, следовательно, 1A-RE является специфичным инсулитором для гена *yellow*. Вырезание энхансера гена *white* заметно ослабило пигментацию глаз, что позволяет исключить вариант функциональной неполноты использованного энхансера.

Затем была изучена способность фрагмента 1A-RE активировать экспрессию гена *yellow* на большом расстоянии. При помощи молекулярных методов анализа было показано, что активация *P* элемента в линии $y^{2^{st}}$ с высокой частотой вызывала инверсию химерного элемента, заключенного между элементами *P1* и *P2* (рис. 4А). В результате инверсии были получены несколько линий, получивших название y^{+l_1} , в которых окраска крыльев и тела у дрозофил была темнее, чем в линии $y^{2^{st}}$. Затем, в одной из таких линий y^{+l_2} – снова было активировано перемещение *P* элементов. Полученная таким образом производная линия $y^{2^{ps21}sc^{es}}$ имела измененный *sc* фенотип, выраженный в исчезновении многих щетинок. С помощью молекулярных методов анализа была определена структура области *yellow-ac-sc* в этом аллеле. Выяснилось, что мутация в аллеле $y^{2^{ps21}sc^{es}}$ была вызвана инверсией между *P2* элементом и одним из *P* элементов длиной 1.2 т.п.н., изначально находившимся в положении 261789 (координаты *P* элементов здесь и далее приводятся по сиквенсу X хромосомы *Drosophila melanogaster* GenBank scaffold AE003417.3 в AS-C) (рис. 4Б). На основании полученных результатов был сделан вывод, что исходно два *P* элемента длиной 1.2 т.п.н. располагались в AS-C в позициях 262509 (он получил название *P3*) и 262703 (*P4*) и были ориентированы «хвост к хвосту». Они были разделены последовательностью 194 п.н. из AS-C. В результате инверсии между *P* элементами из областей *yellow* и AS-C, *P2* оказался рядом с последовательностью AS-C, а с другой стороны от инверсии регуляторная последовательность *yellow* обрывалась на -69 п.н. относительно старта транскрипции. Подвижные элементы *P3* и *P4* оказались между кодирующей областью гена *yellow* и энхансерами AS-C (рис. 4Б).

Ранее в нашей лаборатории были описаны инверсии между *yellow* и AS-C, при которых регуляторная область AS-C репрессировала экспрессию *yellow* в щетинках (Golovnin *et al.* 1999). Но у мух линий $y^{2^{ps21}sc^{es}}$ щетинки были пигментированы. Было сделано предположение, что в этом аллеле химерный элемент способен стимулировать экспрессию в щетинках, хотя и располагается на большом расстоянии 40 т.п.н. от гена *yellow*. Для картирования регуляторного элемента, отвечающего за этот эффект, решено

было снова индуцировать перемещения P элементов в линии $y^{2ps21}sc^{es}$. Среди полученных производных обнаружилось пять y^l -подобных аллелей, в которых репрессия *yellow* была практически полной. Анализ молекулярной структуры этих аллелей выявил в четырех из них, названных $y^{1s2Ia}sc^{es}$, полную делецию последовательности из 1A района, расположенной между $P1$ и $P2$ элементами. Следовательно, эта последовательность необходима для стимуляции экспрессии *yellow* в щетинках. В пятом аллеле $y^{1s2Ib}sc^{es}$ произошла относительно небольшая делеция ДНК из 1A района (длиной 660 п.н.), включавшая 1A-РЕ (рис. 4В). Это позволило сделать вывод, что именно фрагмент 1A-РЕ участвует в активации *yellow* в щетинках на расстоянии 40 т.п.н.

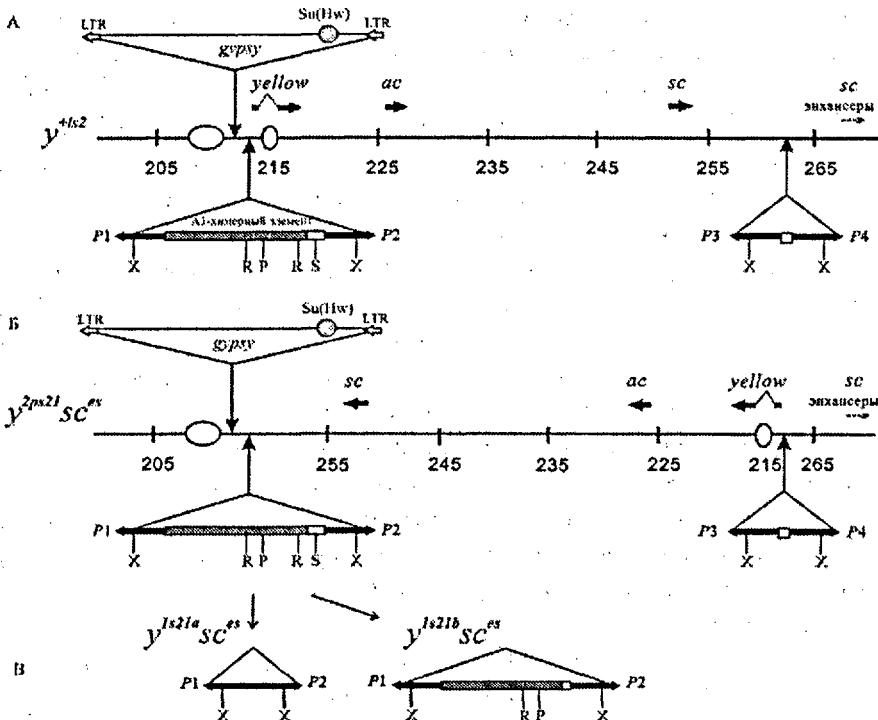


Рис 4. Схема аллелей y^{4ls2} , $y^{2ps21}sc^{es}$, $y^{1s2Ia}sc^{es}$ и $y^{1s2Ib}sc^{es}$. Прямая линия показывает последовательность Х хромосомы с нумерацией тысяч пар нуклеотидов в соответствии с сиквенсом GenBank scaffold AE003417.3.Черные стрелки над ней обозначают гены *yellow*, *ac* и *sc*. AOR, OC, SC, ANP энхансеры помечены как *sc* энхансеры. Прочие обозначения как на рис. 1.

Чтобы подтвердить, что 1A-RE может стимулировать экспрессию в щетинках, фрагмент *EcoRI-PstI* из 1A района был использован для создания генетических конструкций. Ождалось, что в трансгенных линиях мух этот фрагмент будет способен компенсировать отсутствие энхансера щетинок. Как было показано ранее, если ген *yellow* лишен интрона, в котором находится энхансер щетинок, то окраска щетинок у мух желтая (Geyer and Corces 1987). Была создана контрольная конструкция «Yil», несущая безинtronный ген *yellow*. В 16 линиях из 20, трансгенных по этой конструкции, экспрессия в щетинках полностью отсутствовала. Затем в конструкцию «Yil» в позицию -893 п.н. был вставлен фрагмент *PstI-EcoRI*. В 12 трансгенных линиях из 14, несущих полученную конструкцию «1A-RE P-S-R Yil» (рис. 3), пигментация щетинок варьировала от частичной до соответствующей дикому типу. Следовательно, 1A-RE активирует экспрессию *yellow* в щетинках даже в отсутствии соответствующего энхансера.

Далее было проверено, способен ли 1A-RE блокировать энхансеры AS-C. В результате мобилизации *P* элементов в линии $y^{2ps2l}sc^w$ был получен производный аллель $y^{2ps2l}sc^{ws}$ (рис. 5А). В нем произошла частичная реверсия мутантного *sc*-фенотипа. С помощью молекулярного анализа было установлено, что в этом случае произошла реинверсия всей области, заключенной между *P1* и *P4* элементами. Таким образом, 194 п.н. последовательность ДНК из AS-C, окруженная *P3* и *P4* элементами, переместилась в локус *yellow*, а химерный элемент в окружении *P1* и *P2* переместился в район AS-C.

У мух линии $y^{2ps2l}sc^{ws}$ было частично или полностью подавлено формирование нескольких типов щетинок. Химерный элемент в этом аллеле располагался между энхансерами AS-C и промоторами генов *ac* и *sc* (Campuzano *et al.*, 1985). Была выдвинута гипотеза, согласно которой в этом случае взаимодействие между энхансерами и промоторами генов AS-C нарушено вследствие инсуляторной активности 1A-RE. Для проверки гипотезы в линии $y^{2ps2l}sc^{ws}$ были проведены мобилизация активности *P* элемента и поиск производных линий, в которых мутантный *sc* фенотип ревертировал к норме. Было получено пять аллелей с полной, и три аллеля с частичной реверсией мутации *sc*^w. С помощью молекулярных методов анализа было установлено, что полные ревертанты $y^{2ns2l}sc^{+s}$ возникли в результате делеции последовательности 1A между *P2* и *P3* элементами. Причиной двух $y^{2ps2l}sc^{bs}$ частичных реверсий фенотипа стала делеция *P2*, а третьей $y^{2ps2l}sc^{bs2}$ – делеция участка последовательности 1A между 200041 и 200697, не содержащей 1A-RE (рис. 5Б). Поскольку реверсия мутантного *sc*-фенотипа не связана с

делецией 1A-RE, был сделан вывод о неспособности 1A-RE блокировать энхансеры AS-C.

У мух линии $y^{2ps2/c}sc^{ws}$ наблюдалась слабая вариабельность в окраске щетинок. В результате активации гибридного дисгенеза в линии $y^{2ps2/c}sc^{ws}$ было получено четыре производных аллеля $y^{2ps2/c}sc^{ws}$ с окраской щетинок, соответствующей дикому типу. При помощи секвенирования последовательности ДНК между $P1$ и $P3$ элементами было установлено, что участок ДНК длиной 194 п.н., прежде заключенный между ними, в $y^{2ps2/c}sc^{ws}$ удален (рис. 5Б). Предположительно, именно этот 194 п.н. фрагмент содержит регуляторный элемент из AS-C, влияющий на экспрессию *yellow* в щетинках.

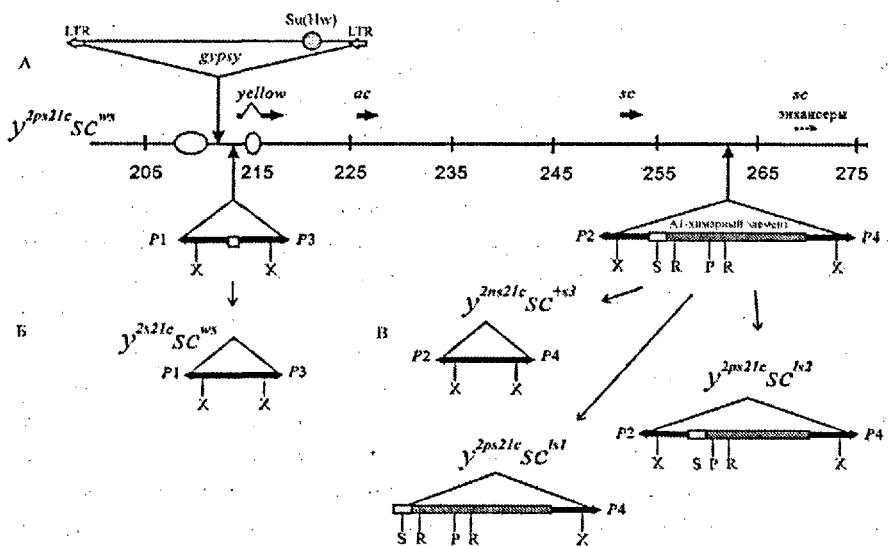


Рис 5. Схемы аллелей $y^{2ps2/c}sc^{ws}$, $y^{2ns2/c}sc^{ws}$, $y^{2ps2/c}sc^{lsl}$ и $y^{2ps2/c}sc^{lsl2}$. Обозначения как на рис. 1 и 4.

1.4 Изучение роли регуляторных элементов 1A-RE и En1A в естественном генетическом окружении. Был поставлен вопрос, какую функцию обнаруженные нами в составе химерного элемента регуляторные последовательности могут выполнять в том месте генома, где они находились исходно. Используя программу FlyBase BLAST, удалось

выяснить, что оба изучаемых элемента расположены в пределах малонизученного гена GC3777. Этот ген имеет размер 70502 п.н., но длина самого большого транскрипта из трех обнаруженных - GC3777-RC - составляет всего 3400 н. Вероятно, при определении границ гена последовательности первого экзона и первого интрона были включены в него ошибочно, на самом же деле ген начинается со второго из экзонов, отмеченных в базе данных. Если допустить, что истинное начало гена GC3777 находится во втором экзоне, то фрагмент 1A-RE находится в промоторной области этого гена, а En1A – в интроне.

В таком случае все полученные данные позволяют выдвинуть следующую гипотезу: En1A, скорее всего, служит энхансером гена GC3777, т.к. энхансеры генов могут располагаться в инtronах, как в случае того же гена *yellow*. Интересно, что активаторная часть En1A в отсутствие коммуникаторной восполняет отсутствие именно интронного энхансера *yellow*, стимулируя экспрессию гена только в щетинках. С другой стороны, специфичность инсуляторного действия 1A-RE по отношению к *yellow* заставляет предположить, что в исходном месте генома этот регуляторный элемент не является инсулятором, но в определенном генетическом окружении приобретает инсуляторные свойства.

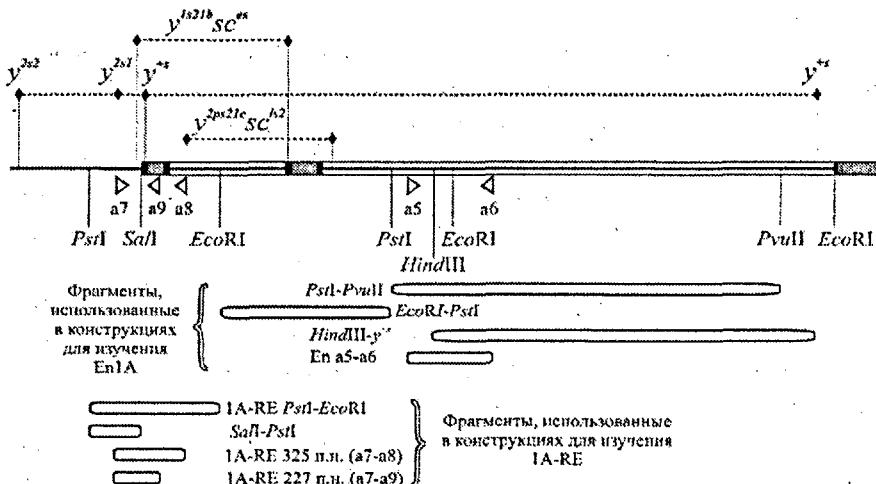


Рис. 6. Схема гена GC3777 с наложением границ мутаций в изученных аллелях и фрагментов, использованных в конструкциях.

Далее была проверена способность 1A-RE выполнять функцию промотора. Промоторная активность 1A-RE была исследована при помощи трансгенных конструкций (рис. 3). Для первичной проверки способности 1A-RE активировать транскрипцию с ослабленных промоторов генов *yellow* и *white* был использован фрагмент 1A-RE длиной 325 п.н. В конструкции «1A-RE *yellow* TATA-less» этот фрагмент был встроен перед геном *yellow*, TATA-бокс которого был мутирован. В линиях, несущих *yellow* TATA-less трансген, мухи имели желтую окраску тела, крыльев и щетинок. В 9 из 10 полученных «1A-RE *yellow* TATA-less» трансгенных линиях, мухи имели окрашенные щетинки. Таким образом, фрагмент 1A-RE способен выполнять функции TATA-промотора гена *yellow*. Для исследования способности 1A-RE активировать промотор гена *white* была создана конструкция «1A-RE del *white*», в которой важные для транскрипции участки, находящиеся непосредственно перед промотором гена *white*, были делетированы, поэтому экспрессия *white* в глазах была ослаблена. Во всех 22 полученных линиях фрагмент 1A-RE размером 325 п.н., расположенный перед геном, восстанавливал фенотип *white* до уровня, близкого к дикому типу в присутствии ЭнГ, или до базального уровня после *in vivo* вырезания ЭнГ.

Для окончательного подтверждения промоторной функции 1A-RE была создана конструкция «1A-RE Pr», в которой открытая рамка считывания гена *yellow* прилежала исследуемому элементу. В этой конструкции использовался фрагмент 1A-RE длиной 226 п.н., расположенный между праймерами a7-a9 (рис. 6). В 14 полученных линиях, несущих конструкцию «1A-RE Pr», все кутикулярные структуры дрозофил были интенсивно пигментированы. Таким образом, элемент 1A-RE является промотором, который при изменении местоположения в геноме начинает проявлять свойства инсулятора.

Затем была изучена способность 1A-RE взаимодействовать с En1A. Анализ гена GC3777 позволил предположить, что En1A служит энхансером этого гена, активирующим транскрипцию с промотора 1A-RE. Для проверки этого предположения была создана конструкция «1A-RE Pr + En1A», в которой энхансеры тела и крыльев гена *yellow* были заменены на полноразмерный En1A, окруженный lox сайтами, позволяющими удалять его *in vivo* (рис. 3). Муhi всех 22 полученных линий имели пигментированные тело и крылья. При вырезании En1A у 15 из 17 линий пигментация сохранялась только в щетинках.

Следовательно, генетические элементы 1A-RE и En1A взаимодействуют и энхансер

En1A является естественным регулятором активности промотора 1A-RE.

2. Исследование зависимости активности Su(Hw) инсулаторов от их взаимного расположения и расстояния между ними.

В следующей части работы с помощью модельной системы гена *yellow* изучалось влияние взаимного расположения двух инсулаторов и расстояния между ними на Su(Hw)-зависимую инсуляцию. Известно, что одиночная копия Su(Hw) в составе трансгенной конструкции полностью блокирует энхансеры тела и крыльев, если находится между этими энхансерами и промотором гена *yellow*. Фенотип трансгенных мух - y^2 , то есть светлые тело и крылья, темные щетинки. Однако ранее в нашей лаборатории было показано (Muravyova *et al.* 2001), что две копии инсулатора в положении между промотором и энхансерами теряют способность блокировать взаимодействие между ними и позволяют энхансерам активировать промотор. С другой стороны, когда два Su(Hw) инсулатора окружают энхансеры гена *yellow*, они полностью блокируют взаимодействие энхансеров с промотором, который находится вне домена, образуемого инсулаторами. Предположительно, блокирование активности энхансеров происходит в результате стерической изоляции энхансеров от промотора, возникающей вследствие взаимодействия между белковыми комплексами, связанными с Su(Hw) инсулаторами. Была выдвинута гипотеза, что при увеличении расстояния между взаимодействующими инсулаторами будет происходить восстановление активности энхансеров. Для проверки этой гипотезы был создан ряд трансгенных конструкций (рис. 7), в которых присутствовал спейсер длиной 6 т.п.н. В качестве спейсера использовался фрагмент кодирующей последовательности ретротранспозона *MdG4*.

В конструкциях Su(Hw)A и Su(Hw)B спейсер располагался между энхансерами тела и крыльев и инсулатором Su(Hw), находящимся в позиции -893 п.н. В конструкции Su(Hw)A вторая копия инсулатора в окружении Iox-сайтов для *in vivo* вырезания была поставлена за геном *yellow*, таким образом расстояние между двумя копиями Su(Hw) составляло 6 т.п.н. Было получено 30 линий, несущих конструкцию Su(Hw)A. Во всех линиях муки имели y^2 -фенотип, что свидетельствует о полном блокировании энхансеров тела и крыльев. В 7 линий с помощью генетических скрещиваний была введена мутация белка Su(Hw), необходимого для инсулаторной активности. В 6 из них произошло восстановление экспрессии *yellow* в теле и крыльях. Следовательно, энхансеры тела и крыльев сохраняют способность активировать промотор *yellow* в большинстве мест

генома, даже если находятся от него на расстоянии 7 т.п.н. Вырезание второй копии инсулятора не изменяло фенотип мух в 28 из 30 линий. Таким образом, одиночная копия Su(Hw) способна эффективно блокировать энхансеры, находящиеся на расстоянии 7 т.п.н.

В конструкции Su(Hw)B вторая копия инсулятора была помещена на расстоянии 1.8 т.п.н. перед энхансерами тела и крыльев. Инсуляторы окружали энхансеры и были удалены друг от друга на расстояние 10 т.п.н. В 6 из 7 полученных линий наблюдалась промежуточная пигментация тела и крыльев. После введения мутации белка Su(Hw) в 5 линиях тело и крылья у мух становились темнее. Следовательно, в этом случае активность энхансеров, окруженных двумя инсуляторами, находящимися на большом расстоянии, только частично заблокирована.

Чтобы проверить, происходит ли активация экспрессии *yellow* в линиях, несущих конструкцию Su(Hw)B, за счет энхансеров тела и крыльев, либо за счет взаимодействия между двумя копиями инсулятора, в контрольной конструкции Su(Hw)D энхансеры были удалены. Все 17 трансгенных линий, несущих конструкцию D, имели фенотип y^2 . Полученные результаты позволяют сделать вывод, что частичное взаимодействие между энхансерами и промотором становится возможным вопреки инсулятору Su(Hw), находящемуся между ними, если есть второй вышележащий инсулятор, находящийся от первого на расстоянии 10 т.п.н.

Было решено объединить элементы конструкции Su(Hw)A и Su(Hw)B в одну - Su(Hw)C, несущую 3 копии инсулятора, расположенные на большом расстоянии друг от друга, и проанализировать вклад третьей копии в эффект инсуляции. В 22 линиях, трансгенных по конструкции Su(Hw)C, мухи имели y^2 или близкий к нему фенотип. Вырезание инсулятора, расположенного за геном *yellow*, приводило к увеличению пигментации в 14 линиях, что соответствует данным, полученным при работе с конструкцией Su(Hw)B. Следовательно, именно третья нежелажащая копия Su(Hw) оказывает значительное влияние на взаимодействие двух вышележащих копий инсулятора, окружающих энхансеры, в результате чего инсуляция полностью восстанавливается.

Комбинация регуляторных элементов, аналогичная присутствующей в конструкции Su(Hw)A, была воспроизведена в конструкции Su(Hw)E, однако расстояние между двумя копиями инсулятора, окружающими ген *yellow* было увеличено до 12 т.п.н. Предполагалось, что увеличение расстояния между инсуляторами может привести к частичной нейтрализации эффекта инсуляции, как и в конструкции Su(Hw)B. Однако

фенотипический анализ мух, несущих конструкцию Su(Hw)E, не выявил различий в сравнении с конструкцией Su(Hw)A (мухи имели фенотип y^2). Полученные данные позволяют предположить, что в этом случае последовательность гена *yellow*, расположенная между двумя копиями инсулятора, влияет на их взаимодействие.

Для завершения серии конструкций, несущих несколько копий Su(Hw)-инсулятора, расположенных на различных расстояниях по отношению друг к другу и регуляторным элементам гена *yellow*, была сделана конструкция Su(Hw)F. В отличии от конструкции Su(Hw)B, расстояние между инсуляторами, окружающими энхансеры гена *yellow* было сокращено до 4 т.п.н. Во всех 18 полученных линиях, трансгенных по конструкции Su(Hw)F, мухи имели фенотип y^2 , что свидетельствует о полном блокировании энхансеров *yellow* в отличии от частичной инсуляции, наблюдавшейся в конструкции Su(Hw)B.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что расстояние между инсуляторами Su(Hw), окружающими энхансеры тела и крыльев, влияет на способность инсуляторов блокировать взаимодействие между этими энхансерами и промотором гена *yellow*.

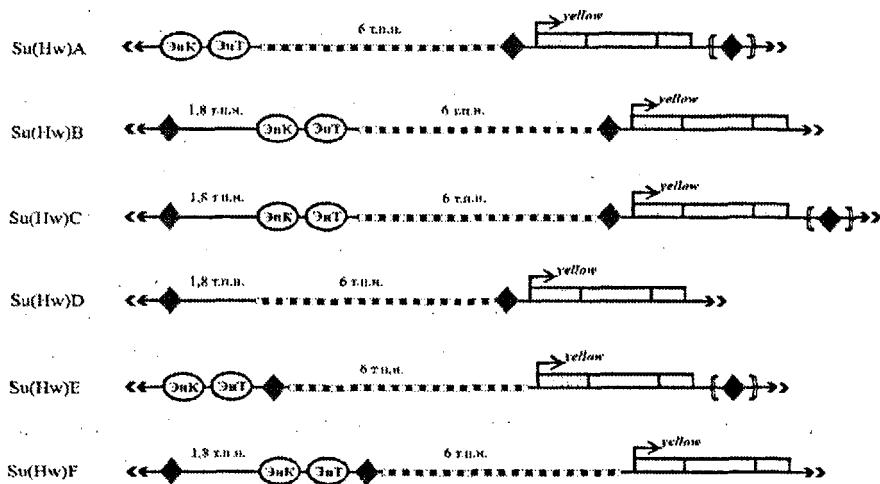


Рис. 7. Схемы конструкций, посвященных изучению взаимодействия между инсуляторами Su(Hw), находящимися на различных дистанциях. Инсуляторы изображены в виде черных ромбов, спайсер обозначен пунктирной линией. Остальные обозначения см. рис. 1 и 2.

Обсуждение результатов исследования

1. Исследование структуры и свойств регуляторных элементов, входящих в состав химерных элементов.

Одной из целей представленной работы являлось изучение процесса образования химерных элементов и перемещения их из одного локуса в другой. Было показано, что перемещения химерного элемента из локуса *yellow* в локус AS-C и 194 п.н. регуляторного фрагмента из локуса AS-C в локус *yellow* произошли в результате нескольких последовательных рекомбинаций между *P* элементами. А именно, перегруппировку претерпели *P* элементы, окружающие химерный элемент в гене *yellow* с одной стороны, и два *P* элемента в AS-C, с другой стороны.

Как было продемонстрировано ранее, вторичная интеграция *P* элемента - частое событие, которое преимущественно происходит вблизи места первичной интеграции (Hawley *et al.* 1988). В таких случаях образуются пары *P* элементов. Если происходит рекомбинация между внешними копиями *P* элементов двух таких пар, то последовательность ДНК, расположенная между двумя парами *P* элементов, инвертируется. Последующая рекомбинация уже внутренних *P* элементов ведет к реинверсии этой последовательности, а фрагменты ДНК, заключенные внутри каждой пары *P* элементов, меняются местами. В результате последовательность ДНК, в состав которой могут входить регуляторные элементы, перемещается от одного гена к другому. В представленной работе была исследована 194 п.н. регуляторная последовательность, переместившаяся из AS-C в регуляторную область гена *yellow*, в результате чего подавлялась экспрессия *yellow* в щетинках. В то же время, перемещение 1A химерного элемента в AS-C оказывает влияние на активность некоторых энхансеров AS-C. Этот пример свидетельствует, что мутации, связанные с перемещениями *P* элементов, в процессе естественного отбора могут служить источником создания генетического и фенотипического разнообразия.

При индукции генетической нестабильности с участием химерного элемента, содержащего ДНК из 1A района X хромосомы, была получена коллекция линий дрозофилы с разнообразными фенотипами гена *yellow*. Изучение мутаций химерного элемента позволило обнаружить два новых регуляторных элемента 1A-RE и En1A, по-видимому, являющихся в исходном генетическом окружении промотором и энхансером одного гена GC3777. Обнаруженный регуляторный элемент 1A-RE является примером

промотора, который при изменении местоположения в геноме начинает проявлять свойства инсулатора, приобретая способность блокировать энхансеры гена *yellow*.

Недавно было показано, что инсулатор *Su(Hw)* способен на большом расстоянии активировать экспрессию гена *yellow* с ослабленным промотором (Golovnin *et al.* 2005). Вполне вероятно, что и другие регуляторные элементы совмещают способность блокировать энхансеры и активировать промотор на большом расстоянии.

Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что некоторые регуляторные элементы потенциально способны к различным регуляторным активностям. Этот набор свойств может не полностью реализовываться в естественном генетическом окружении и проявляется только при перемещении регуляторного элемента. Функциональные свойства регуляторного элемента зависят от генетического окружения, в том числе от присутствия и взаимного расположения других регуляторных элементов.

2. Взаимодействующие *Su(Hw)* инсулаторы не формируют независимых доменов транскрипции.

Также в представленной работе была исследована способность двух *Su(Hw)* инсулаторов, окружающих энхансеры гена *yellow*, блокировать их взаимодействие с промотором гена *yellow*, который находится вне домена, созданного инсулаторами. Оказалось, что когда *Su(Hw)* инсулаторы находились на расстоянии 4 т.п.и, они полностью блокировали активность энхансеров. Однако при увеличении расстояния между инсулаторами до 10 т.п.и энхансеры гена *yellow* могли частично активировать промотор. В то же время, одна копия *Su(Hw)* инсулатора полностью блокировала активность энхансеров, если располагалась между ними и промотором..

Когда расстояние между взаимодействующими инсулаторами достаточно мало, энхансеры, расположенные между ними, не могут взаимодействовать с изолированным промотором в результате стерических/топологических проблем, созданных взаимодействующими инсулаторами. При увеличении расстояния между инсулаторами роль стерических/топологических препятствий уменьшается, что приводит к восстановлению взаимодействия между энхансерами и промотором. Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют, что взаимодействующие инсулаторы не приводят к созданию функционально изолированных доменов, как предполагалось ранее.

Выходы

1. Продемонстрирован один из механизмов образования химерных элементов и их перемещения. Такие события происходят в результате последовательных рекомбинаций между *P* элементами химерного элемента из регуляторной области гена *yellow* и *P* элементами, которые находятся в регуляторной области AS-C комплекса.
2. В химерном элементе обнаружен энхансер En1A, который был перенесен в химерный элемент из дистального 1A района X хромосомы. Энхансер En1A имеет неоднородную структуру: состоит из активаторной и коммуникаторной частей, которые вместе способны компенсировать отсутствие собственных энхансеров гена *yellow* и активировать экспрессию гена *yellow* во всех кутикулярных структурах.
3. При изучении мутационных изменений химерного элемента был обнаружен регуляторный элемент 1A-RE, который активирует экспрессию *yellow* на большом расстоянии и является инсулятором, специфичным для гена *yellow*. Исследование 1A-RE при помощи трансгенных конструкций позволило выдвинуть гипотезу, что 1A-RE в исходном генетическом окружении в 1A районе X хромосомы выполняет функцию промотора гена CG3777 и взаимодействует с En1A, расположенным в интроне этого гена.
4. Показано, что одна копия Su(Hw) инсулятора может эффективно блокировать взаимодействие между энхансером и промотором, которые находятся на расстоянии 7-9 т.п.н. друг от друга. Однако добавление второй копии инсулятора, в результате чего энхансеры оказываются между двумя Su(Hw) инсуляторами, расположенными на расстоянии 10 т.п.н. друг от друга, приводит к восстановлению взаимодействия между энхансером и промотором (нейтрализации активности инсулятора). Таким образом, взаимодействующие Su(Hw) инсуляторы не формируют независимых доменов транскрипции, как предполагалось ранее.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

- 1.** Pomerantseva E, Biryukova I, Silicheva R, Savitskaya E, Golovnin A, Georgiev P. Transposition of regulatory elements by *P* element-mediated rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2006, V. 172 P. 2283-2291.
- 2.** Savitskaya E, Melnikova L, Kostuchenko M, Kravchenko E, Pomerantseva E, Boikova T, Chetverina D, Parshikov A, Zobacheva P, Gracheva E, Galkin A, Georgiev P. Study of long-distance functional interactions between Su(Hw) insulators that can regulate enhancer-promoter communication in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 2006, V. 26 P. 754-761.
- 3.** Е.А. Померанцева, П. Г. Георгиев. Структура и свойства нового энхансера из 1A района X-хромосомы *Drosophila melanogaster*. Тезисы 10 Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" с. 42. Пущино, 17-21 апреля 2006г.
- 4.** Е.А. Померанцева, П. Г. Георгиев. Изучение нового регуляторного элемента 1A-RE *Drosophila melanogaster*. Тезисы докладов XVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 1.97 с.15 Москва, 7-10 февраля 2006 г.
- 5.** Ekaterina Pomerantseva, Pavel Georgiev. Promoter Performs As An Insulator Being Moved To An Ectopic Position By Means Of *P* Element Transposition. 47th Annual Drosophila Research Conference, Houston, USA, March 29 – April 2, 2006. Abstract 339B P.48
- 6.** L. Melnikova, E. Pomerantseva, E. Gracheva, P. Georgiev. Enhancer blocking depends on the size of the chromatin domain formed by the Su(Hw) insulators. 46th Annual Drosophila Research Conference, San Diego, USA, March 30 – April 3, 2005. Abstract 359B P.48
- 7.** P. Georgiev, E. Savitskaya, A. Golovnin, L. Melnikova, M. Kostuchenko, E. Kravchenko, D. Chetverina, E. Pomerantseva, A. Parshikov. The *gypsy* insulator – models of insulator function. Advances in Molecular Cell Biology. Moscow, June 17-18, 2004 Abstract P.8

Формат 60 × 90 $\frac{1}{16}$

Объем 1,5 п.л.

Тираж 100 экз.

Заказ 1183

Отпечатано с готовых оригинал-макетов в типографии
Издательства «Учеба» МИСиС,
117419, Москва, ул. Орджоникидзе, 8/9

