

На правах рукописи

УДК 575.22 595 773.4.

КРАВЧЕНКО ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**РОЛЬ GYPSY ИНСУЛЯТОРА В ПРОЦЕССАХ ТРАНСВЕКЦИИ
У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Специальность 03 00 26 - молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2005

Работа выполнена в лаборатории регуляции генетических процессов
Института биологии гена РАН

Научный руководитель:

Чл -корр РАН, доктор биологических наук, профессор Георгиев П Г

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Крамеров Д А

кандидат биологических наук Коробко Е В

Ведущая организация Институт биологии развития им Н К Кольцова РАН

Защита диссертации состоится **23** декабря 2005 года в **11** 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 **23** ноября 2005 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд фарм наук

Грабовская Грабовская Л С

2006-4
29268

2260121

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

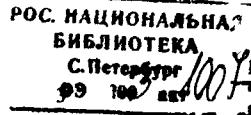
Актуальность проблемы. Геном высших эукариот содержит огромное количество генов и элементов их регуляции Регуляторные последовательности, такие как промоторы, энхансеры и инсулаторы, являются элементами, которые контролируют транскрипцию в пространстве и времени Энхансеры способны активировать транскрипцию с промотора гена-мишени независимо от их ориентации и расстояния до точки начала транскрипции. Некоторые энхансеры могут быть расположены на расстоянии около 100 Kb и более от промотора-мишени (Rollins et al 2004) Однако до сих пор остаётся неясным, каким образом происходит коммуникация между энхансером и промотором, которые находятся на большом расстоянии друг от друга.

Спаривание гомологичных хромосом – процесс, который наблюдается в мейозе у всех эукариот У большинства организмов он ограничен профазой мейоза клеток зародышевой линии, но у *Diptera* спаривание гомологичных хромосом наблюдается и в соматических интерфазных клетках Для ряда локусов было обнаружено, что их спаривание оказывает значительное влияние на экспрессию генов Этот феномен был назван «трансвекция» – влияние гомологичных аллелей на функционирование друг друга.

Хорошо известно, что на уровень экспрессии многих генов также оказывает влияние присутствие инсулаторов Инсулаторы – класс регуляторных элементов, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними При этом энхансер, изолированный от одного промотора инсулатором, тем не менее, способен активировать другой, неизолированный промотор Было показано, что два *gyrps* инсулатора, расположенные между энхансером и промотором, способны нейтрализовать действие друг друга Предполагается, что белки, связавшиеся с двумя *gyrps* инсулаторами, в дальнейшем могут взаимодействовать между собой, сближая отдельные участки ДНК В зависимости от взаимного пространственного расположения энхансера, промотора и инсулаторов сближение участков ДНК может оказывать разное влияние на транскрипцию

Для изучения регуляции генов хорошей моделью являются системы, содержащие все три класса основных регуляторных элементов К ним можно отнести системы, позволяющие смоделировать эффекты трансвекции, поскольку молекулярный механизм трансвекции напоминает способ действия энхансера, далеко отстоящего от промотора

Исследование роли инсулаторов в процессах трансвекции позволит более детально изучить как механизмы взаимодействия между энхансером и промотором, так и способы действия инсулаторов



Цель и задачи исследования. Основной целью настоящего исследования являлось изучение роли *gypsy* инсулатора в процессах трансвекции у *Drosophila melanogaster*

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1 Изучение возможности транс-активации гена *yellow* в различных местах генома *Drosophila melanogaster*
- 2 Создание модельной системы для изучения транс-взаимодействий между регуляторными элементами (промотором, энхансером и инсулатором) в геноме *Drosophila melanogaster*
- 3 Исследование роли *gypsy* инсулатора в регуляции уровня транс-активации энхансерами промотора
- 4 Изучение роли *gypsy* инсулатора в коммуникации между энхансером и промотором, которые находятся на большом расстоянии друг от друга

Научная новизна и практическое значение работы. В данной работе впервые показано, что уровень транс-активации энхансерами гена *yellow* промотора гена *yellow* в значительной степени зависит от места в геноме *D.melanogaster* и не коррелирует с уровнем цис-активации. Обнаружено, что присутствие *gypsy* инсулатора улучшает транс-активацию промотора гена *yellow* его энхансерами, расположенными на гомологичной хромосоме Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют, что *gypsy* инсулатор способен обеспечивать транс-взаимодействия между энхансером и промотором, которые находятся на больших расстояниях друг от друга

Эти данные способствуют пониманию механизма дальних взаимодействий между энхансером и промотором. Предложенная нами для изучения трансвекции модельная система на основе гена *yellow* дает возможность дальнейшей идентификации белков, участвующих в процессах трансвекции и коммуникации между локусами

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 46th Annual Drosophila Research Conference (San Diego, California March 30 - April 3, 2005) и на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2005)

Публикации. По теме диссертации опубликованы четыре печатные работы

Структура и объем работы. Диссертация изложена на страницах, включает 31 рисунок и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 128 источников

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Уровень транс-активации энхансерами гена *yellow* промотора гена *yellow* в значительной степени зависит от места в геноме *D.melanogaster* и не коррелирует с уровнем цис-активации.

Ген *yellow* отвечает за тёмную пигментацию кутикулярных структур личинки и имаго и контролируется несколькими тканеспецифичными энхансерами. Как было показано в предыдущих исследованиях (Chen et al. 2002) трансвекция гена *yellow* наблюдается в различных местах генома *D. melanogaster*. В работе Chen et al., которая посвящена исследованию этого факта, использовался локус *yellow* с окружающими его последовательностями – около 75 Kb с 5'-конца и 21 Kb с 3'-конца. Поэтому нельзя исключить, что во фланкирующих последовательностях могли находиться элементы, участвующие в соматическом спаривании гомологичных хромосом, что и обеспечивало стабильную транс-активацию гена *yellow* вне зависимости от места нахождения в геноме. По этой причине вначале нами была исследована возможность транс-активации гена *yellow* в различных позициях генома *D. melanogaster* без дополнительных фланкирующих последовательностей ДНК. Для этого нами была создана конструкция (E)(Y)W (см. рис 1) с минимальными фланкирующими областями, содержащая кодирующую часть гена *yellow*, 3 Kb область его энхансеров с 5'-конца и район размером 200 пн с 3'-конца гена *yellow*. Область энхансеров гена *yellow* была окружена FRT сайтами, а район промотора гена *yellow* находился между lox сайтами, что в дальнейшем с помощью сайтспецифичных рекомбиназ позволяло на базе одной конструкции получать различные ее производные (см. рис 2). В качестве маркерного гена в конструкции использовался ген *mini-white*.

После введения трансгенной конструкции в эмбрионы *D. melanogaster* было получено 12 однокопийных трансгенных линий, содержащих (E)(Y)W конструкцию в различных позициях генома *D. melanogaster*. Уровень пигментации кутикулы у гетерозиготных самок (E)(Y)W/+ колебался от ожидаемого уровня пигментации близкого к дикому типу (4-5 баллов) до слабой пигментации (2 балла). Такая разница в уровне экспрессии гена *yellow* может быть объяснена эффектом положения (влиянием окружающего хроматина). Затем, мухи из полученных трансгенных линий были скрещены с мухами, несущими ген FLP-рекомбиназы, и в результате были отобраны потомки с делецией энхансеров гена *yellow*.

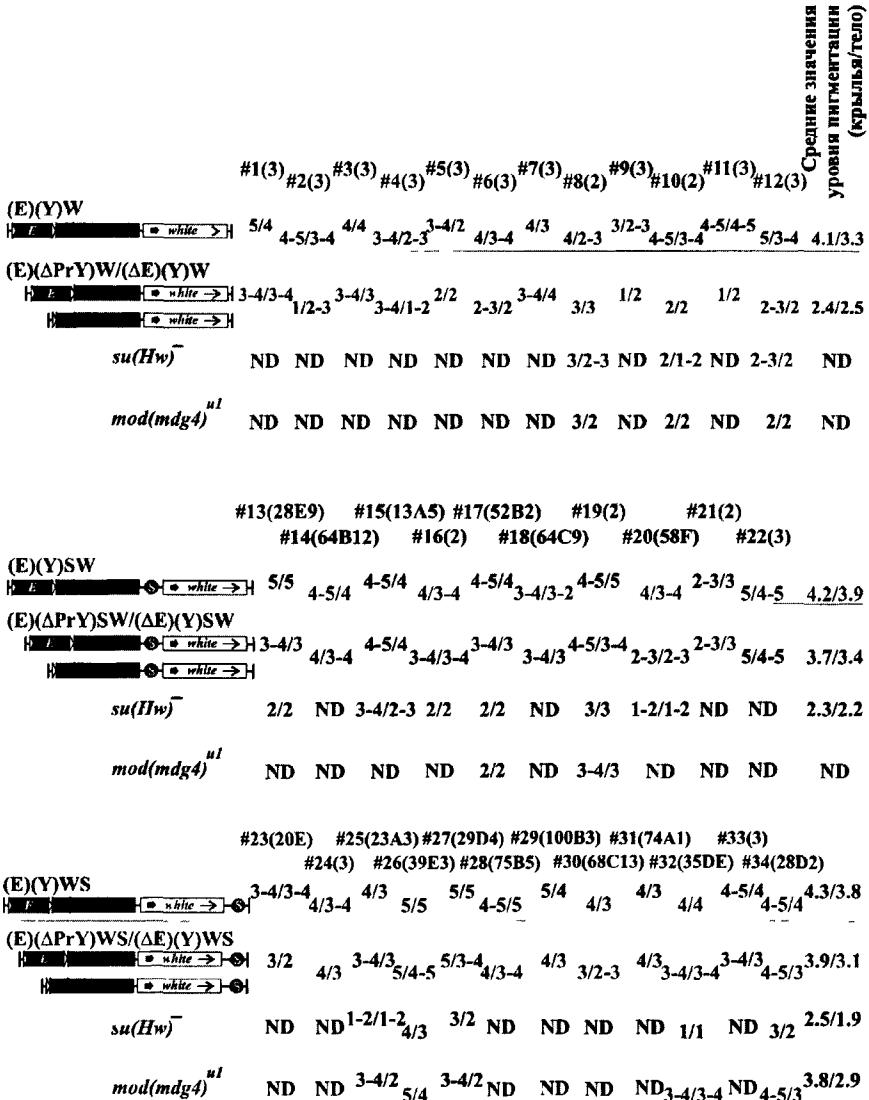


Рис 1 Схема конструкций и оценка уровня пигментации Е – энхансеры, активирующие ген *yellow S – gypsy* инсулятор Белые треугольники – сайты узнавания для FLP рекомбиназы, черные треугольники – сайты узнавания для Cre рекомбиназы Указаны номера линий и в скобках место нахождения конструкций в геноме ND – для данной линии изучение не проводилось.

Для получения производных линий мух с делецией промотора мухи из исходной трансгенной линии были скрещены с мухами, несущими ген Cre рекомбиназы, в результате были получены потомки (E) Δ YW/+.

Таким образом из всех двенадцати линий были получены линии-производные с делецией энхансеров и делецией промотора (см рис 2) Затем производные каждой линии были скрещены между собой и полученная гетерозигота содержала одновременно (E) Δ YW аллель и Δ E(Y)W аллель ((E) Δ YW/ $(\Delta$ E(Y)W)

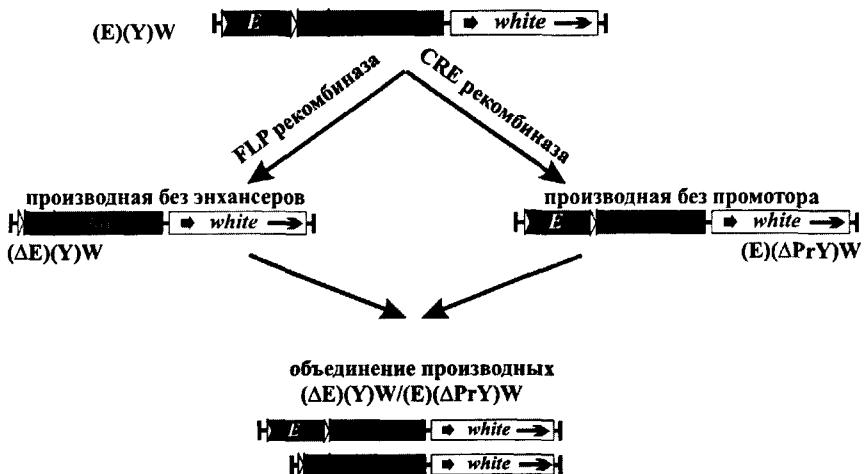


Рис 2 Схема получения и объединения производных исходной конструкции для оценки уровня транс-взаимодействий между ними

Оценка уровня пигментации тела и крыльев у мух, содержащих эту комбинацию аллелей, позволяла выявить случаи возникновения транс-активации (рис. 1) Во всех двенадцати случаях гетерозиготные самки (E) Δ YW/ $(\Delta$ E(Y)W имели более темную пигментацию тела и крыльев (средние значения степени пигментации 2,4,2,5/тело,крылья), чем самки Δ E(Y)W/+ (степень пигментации 1,1/тело,крылья), однако воспроизведения ситуации, описанной в работе Chen et al , в которой уровень транс-активации гена yellow во всех случаях обеспечивал пигментацию кутикулярных структур близкую к уровню дикого типа, нами не наблюдалось.

При этом уровень транс-активации в гетерозиготах (E) Δ YW/(E) Δ YW никак не коррелировал с уровнем цис-активации в исходной (E)(Y)W линии (см линии 3,8 и 11,12 рис 1) В частности, при высоком уровне цис-активации уровень транс-активации может

быть различным Вероятно, уровень транс-активации зависит от степени спаривания между гомологичными хромосомами в месте инсерции трансгенной конструкции

2. *Gypsy* инсулятор способствует транс-активации промотора гена *yellow*.

Для того чтобы оценить степень участия *gypsy* инсулятора в процессах трансвекции, была сделана конструкция (E)(Y)SW, в которой *gypsy* инсулятор был встроен между генами *yellow* и *mini-white* (рис 1) Было получено десять трансгенных однокопийных линий, для которых так же, как было описано в предыдущем случае, были созданы производные с делециями промотора или энхансеров гена *yellow*

У гетерозиготных самок $\Delta E(Y)SW/(E)\Delta YSW$ средний уровень пигментации составил 3 4,3 7/тело,крылья, что выше чем средний уровень пигментации тела и крыльев у гетерозиготных самок $\Delta E(Y)W/(E)\Delta YW$ (2 4, 2 5/ тело,крылья) По всей видимости, присутствие *gypsy* инсулятора в обоих аллелях гетерозиготы улучшает транс-активацию промотора гена *yellow* энхансерами, расположенными на гомологичной хромосоме (рис 1) Этот эффект можно объяснить или взаимодействием между *gypsy* инсуляторами, или тем, что инсулятор блокирует какие-то цис-взаимодействия между энхансерами гена *yellow* и промотором гена *mini-white*, что и приводит к улучшению транс-активации

Для проверки этих предположений была сделана конструкция (E)(Y)WS (рис 1), в которой *gypsy* инсулятор был встроен за геном *mini-white* Было получено двенадцать трансгенных линий, содержащих одну копию (E)(Y)WS конструкций, для каждой из которых были получены производные без энхансеров или без промотора гена *yellow* так же, как было описано ранее У гетерозиготных самок $\Delta E(Y)WS/(E)\Delta YWS$ средний уровень пигментации составил 3 1,3 9/тело,крылья, что сопоставимо со средним уровнем пигментации гетерозиготных самок $\Delta E(Y)SW/(E)\Delta YSW$ 3 4,3 7/тело,крылья, несущих инсулятор между энхансерами гена *yellow* и промотором гена *mini-white* Эти данные свидетельствуют о том, что усиление транс-активации между производными линии (E)(Y)SW не связано с блокированием каких-либо цис-взаимодействий между энхансерами гена *yellow* и промотором гена *mini-white*, а обусловлено присутствием *gypsy* инсулятора в обоих аллелях гетерозиготы

Для того чтобы продемонстрировать роль *gypsy* инсулятора в транс-активации, в линии (E)(Y)SW, (E)(Y)WS и их производные была введена мутация, приводящая к нарушениям белка Su(Hw), который является необходимым компонентом *gypsy* инсулятора Отсутствие нормального белка Su(Hw) никак не повлияло на пигментацию самок $\Delta E(Y)SW/+$ и $\Delta E(Y)WS/+$ Но у гетерозиготных самок $\Delta E(Y)SW/(E)\Delta YSW$ и $\Delta E(Y)WS/(E)\Delta YWS$ в отсутствие нормального белка Su(Hw) наблюдалось понижение

уровня транс-активации до уровня гетерозиготных самок $\Delta E(Y)W/(E)\Delta YW$, отмеченного в предыдущем эксперименте, где в тесте на комплементацию использовались производные, не содержащие *gypsy* инсулатор.

В качестве контроля мутации, приводящие к нарушениям *Su(Hw)* белка, были введены в три линии $(E)(Y)W$ и их производные, которые не содержали *gypsy* инсулатор Y гетерозиготных самок $\Delta E(Y)W/(E)\Delta YW$ отсутствие нормального *Su(Hw)* белка никак не сказалось на уровне транс-активации. Таким образом, присутствие белка *Su(Hw)* не является необходимым для осуществления транс-активации.

Другим важным компонентом *gypsy* инсулатора является белок *Mod(mdg4)*. В производные линии $(E)(Y)SW$ и $(E)(Y)WS$ была введена мутация *mod(mdg4)^{w1}*. В результате этой мутации синтезируется белок, не способный связываться с белком *Su(Hw)*. В гетерозиготных самках $\Delta E(Y)SW/(E)\Delta YSW$ и $\Delta E(Y)WS/(E)\Delta YWS$ отсутствие этого компонента *gypsy* инсулатора не оказалось значительного влияния на уровень транс-активации гена *yellow*.

3. *Gypsy* инсулатор улучшает трансвекцию между энхансерами и промотором гена *yellow*, расположенными в негомологичных локусах генома *Drosophila melanogaster*.

Согласно данным предыдущих экспериментов, присутствие *gypsy* инсулатора облегчало транс-активацию промотора гена *yellow* при объединении производных одной исходной трансгенной линии, т.е находящихся в одной и той же позиции «друг напротив друга» на гомологичных хромосомах. Поэтому следующим был вопрос, может ли присутствие *gypsy* инсулатора улучшать трансвекцию между производными различных трансгенных линий, находящихся в разных местах генома и на разных расстояниях друг от друга.

В качестве контроля вначале были взяты линии производные конструкции $(E)(Y)W - \Delta E(Y)W$ и $(E)\Delta YW$, находящиеся в различных местах генома, и самцы $\Delta E(Y)W$ были скрещены с самками $(E)\Delta YW$, содержащими производную в другой позиции генома. Таким образом, были поставлены 132 скрещивания, в результате которых были получены гетерозиготные самки с желтой окраской тела и крыльев. Этот результат полностью согласуется с данными, полученными в работе Chen et al., и свидетельствует о том, что в отсутствии *gypsy* инсулаторов трансвекции между энхансерами и промотором, находящимися в негомологичных сайтах, не наблюдается.

Затем, таким же образом нами были протестированы комбинации негомологичных производных для девяти $(E)(Y)SW$ и двенадцати $(E)(Y)WS$ трансгенных линий.

В итоге было поставлено 338 скрещиваний, в результате которых были получены особи, содержащие производные разных трансгенных линий в разных позициях генома. В тринадцати из 338 скрещиваний гетерозиготные самки имели выраженную темную пигментацию в теле и крыльях (рис.3).

Уровень пигментации тела и крыльев этих мух, а, следовательно, и уровень трансактивации, был ниже, чем у гетерозиготных самок, у которых производные трансгенных конструкции находились в одной и той же позиции на гомологичных хромосомах. В случаях негомологичной комплементации одно событие наблюдалось между производными, расположенными в разных сайтах III хромосомы (№14/№18), одно между производными, расположенными на X-хромосоме и II-хромосоме (№15/№13), и пять событий между производными, расположенными в разных участках второй хромосомы (№27/№34, №27/№32, №27/№26, №32/№26, №34/№26 см рис 3)

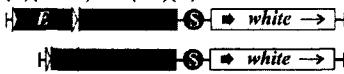
	#14/#18	#18/#14	#13/#15	#15/#13					
расстояние между позициями в геноме, kb	617	617	2L&X	2L&X					
(E)(ΔPrY)SW/(ΔE)(Y)SW									
	2-3/1	3/2	3/1	3-4/1-2					
<i>su(Hw)⁻</i>	ND	ND	ND	ND					
<i>mod(mdg4)^{u1}</i>	ND	ND	ND	ND					
	#27/#34	#26/#32	#27/#32	#27/#26	#26/#34				
	#34/#27	#32/#26	#32/#27	#26/#27					
расстояние между позициями в геноме, kb	667	667	~5334	~5334	~7755	~7755	13010	13010	13677
(E)(ΔPrY)WS/(ΔE)(Y)WS									
	3/2	3/2	4/2	3-4/2	3-4/1-2	3-4/1-2	2-3/1	2-3/1	3/1
<i>su(Hw)⁻</i>	1-2/1	ND	1/1	ND	1/1	ND	1-2/1	2/1	1/1
<i>mod(mdg4)^{u1}</i>	ND	ND	2-3/2	3/2	2/1	2/1	1-2/1	1-2/1	1/1

Рис 3 Уровень комплементации между производными различных трансгенных линий, находящихся в разных местах генома

Для дальнейшего изучения транс-взаимодействий между производными, находящимися в разных местах генома, нами были установлены места инсерций конструкции в геном для большинства (E)(Y)SW и (E)(Y)WS трансгенных линий (рис 1 и 4)

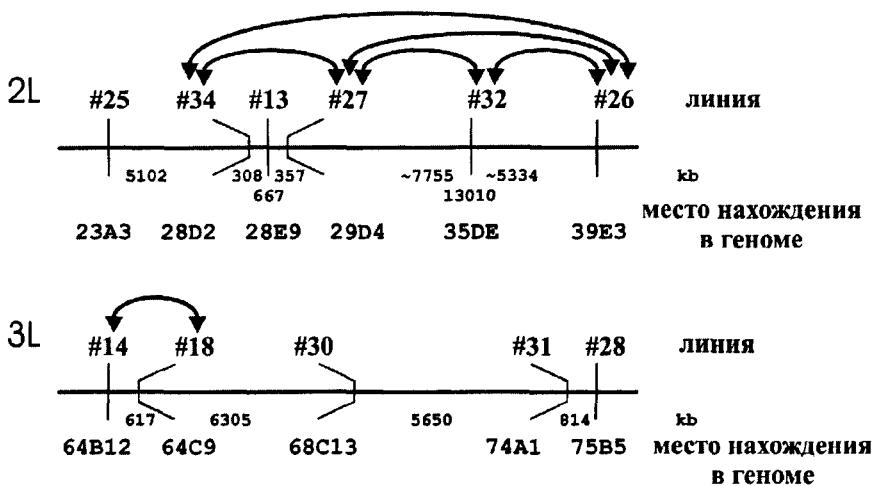


Рис 4 Схема расположения мест инсерций трансгенных конструкций в геноме *Drosophila*. Чёрными стрелками указаны конструкции, производные которых способны к негомологичным транс-взаимодействиям.

Локализация трансгенных конструкций в геноме позволила установить, что линейное расстояние между местами инсерций не является фактором, который однозначно определяет возможность транс-активации между негомологичными производными. Например, объединение производных линий №14 и №18 (расстояние между сайтами инсерций 617 Kb) и №27 и №34 (расстояние между сайтами инсерций 667 Kb) приводили к транс-активации гена *yellow*.

А объединение производных линии №13, сайт инсерции которой расположен между местами инсерций в линиях №27 и №34 на расстоянии 308 Kb и 359 Kb от них соответственно, с производными линий №27 и №34 не приводило к транс-активации гена *yellow*.

Этот факт не может быть объяснен тем, что в линии №13 трансгенная конструкция попала в такую область генома, в которой транс взаимодействия в силу каких-либо причин

невозможны, поскольку при объединении производных линии №13 и линии №15 (Х-хромосома) транс-активация гена *yellow* наблюдается

Наиболее вероятно, что уровень трансвекции между производными, находящимися в негомологичных позициях генома, главным образом зависит от их расположения относительно друг друга внутри трехмерной архитектуры ядра, и в гораздо меньшей степени зависит от линейных расстояний между сайтами инсерций в пределах одной хромосомы. Например, в ряде случаев транс-активация гена *yellow* наблюдалась при объединении производных линий, расстояния между сайтами инсерций которых были очень большими 7 16 Mb №27/№32, 5 33 Mb №26/№32, 13 01 Mb №27/№26 (рис. 4)

Для того чтобы выяснить степень участия *gypsy* инсулятора в транс-активации между производными, находящимися в различных позициях генома, в производные, не содержащие промотор или энхансеры гена *yellow*, были введены мутации, приводящие к инактивации белков Su(Hw) и Mod(mdg4). На фоне мутации *mod(mdg4)^{wl}*, уровень транс-активации между производными, находящимися в негомологичных локусах генома, значительно снижался. Отсутствие нормального белка Mod(mdg4) в большей степени влияло на уровень трансвекции, чем в случаях его отсутствия при транс-активации между производными одной линии. Вероятно, транс-активация на больших расстояниях более чувствительна к присутствию всех компонентов *gypsy* инсулятора. Отсутствие нормального белка Su(Hw) приводит к полному исчезновению транс-активации между производными, находящимися в различных местах генома. Таким образом, присутствие *gypsy* инсулятора позволяет осуществляться транс-активации гена *yellow* между производными, расположенными на больших расстояниях друг от друга в негомологичных позициях генома.

4. Наличие *gypsy* инсуляторов на обеих гомологичных хромосомах необходимо для эффективной транс-активации гена *yellow*.

Gypsy инсулятор принимает участие во многих процессах, происходящих в ядре *Drosophila*, в том числе взаимодействует с GAF и MCP элементами (Melnikova et al 2004). Также показано, что на политеческих хромосомах имеется большое число сайтов связывания для белка Su(Hw). Поэтому наблюдаемый нами эффект влияния белка Su(Hw) на уровень транс-активации может быть не прямым, а отражать какие-то общие изменения в структуре или организации хроматина в отсутствие этого белка.

Для того чтобы показать, что Su(Hw) белок принимает непосредственное участие в стабилизации трансвекции за счет взаимодействий между *gypsy* инсуляторами, нами была сделана конструкция, производные которой содержали или не содержали *gypsy* инсуляторы

В конструкции (ES)Y(SW) (см рис 5) ген *yellow* был окружен *gypsy* инсуляторами, один из которых был встроен в положение -893 по отношению к точке начала транскрипции гена *yellow*, а второй находился за 3'-концом гена *yellow*. Фрагмент конструкции, содержащий энхансеры гена *yellow*, энхансеры гена *white* и *gypsy* инсулятор в положении -893, находился между FRT-сайтами. Фрагмент конструкции, содержащий *gypsy* инсулятор с 3'-стороны от гена *yellow* и промотора гена *mini-white*, находился между lox-сайтами.

В результате было получено семь однокопийных (ES)Y(SW) трансгенных линий, в которых не наблюдалось цис-активации энхансерами гена *yellow* промотора гена *yellow*, так как между находится *gypsy* инсулятор (что приводит к изоляции энхансеров от промотора), и происходила цис-активация энхансерами гена *white* промотора гена *mini-white* (мухи имели ярко-красные глаза), поскольку между ними находятся два *gypsy* инсулятора (которые нейтрализуют друг друга).

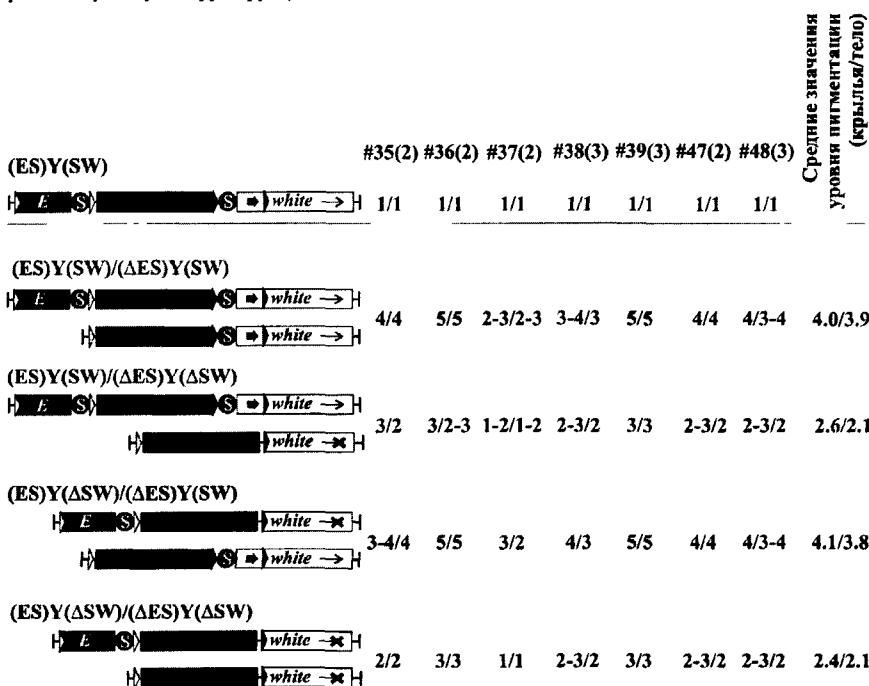


Рис 5 Схема конструкции (ES)Y(SW) и результаты оценки уровня пигментации гена *yellow* при объединении различных производных (ES)Y(SW)

При вырезании энхансеров гена *yellow*, энхансеров гена *mini-white* и *gypsy* инсулатора, находящегося в положении -893 перед промотором гена *yellow*, в линиях (Δ ES)Y(SW) происходило значительное падение уровня экспрессии гена *mini-white* и сохранение без изменений уровня экспрессии гена *yellow* (мухи имели желтые тело и крылья и оранжевые глаза)

При вырезании промотора гена *mini-white* и инсулатора, расположенного с 3'-стороны от гена *yellow* перед промотором гена *mini-white*, были получены производные (ES)Y(Δ SW) и производные с двумя делециями (Δ ES)Y(Δ SW). Муhi, содержащие одну из этих производных, имели белую окраску глаз. Таким образом, гетерозиготы (ES)Y(SW)/+ и все линии, содержащие производные этой конструкции, имели желтую окраску тела и крыльев либо из-за присутствия *gypsy* инсулатора между энхансерами и промотором гена *yellow*, либо из-за отсутствия энхансеров в результате делеции части конструкции.

Для всех семи трансгенных линий у гетерозиготных самок (Δ ES)Y(SW)/(ES)Y(SW) и (Δ ES)Y(SW)/(ES)Y(Δ SW) наблюдалась активация гена *yellow*. Поскольку в исходной линии (ES)Y(SW) и производной (ES)Y(Δ SW) *gypsy* инсулатор полностью блокирует цис-активацию энхансерами промотора гена *yellow*, появление активации гена *yellow* объясняется транс-действием энхансеров (ES)Y(SW) и (ES)Y(Δ SW) на промотор производной (Δ ES)Y(SW).

При дальнейшем комбинировании исходной линии и трех типов производных, было обнаружено, что наблюдается два уровня транс-активации гена *yellow*: высокий уровень транс-активации (у гетерозиготных самок (Δ ES)Y(SW)/(ES)Y(SW) и (Δ ES)Y(SW)/(ES)Y(Δ SW)), когда оба аллеля содержат *gypsy* инсулатор, и более низкий уровень транс-активации (у гетерозиготных самок (Δ ES)Y(Δ SW)/(ES)Y(SW) и (Δ ES)Y(Δ SW)/(ES)Y(Δ SW)), когда один из аллелей не содержит *gypsy* инсулатор (рис. 5). Из этих данных можно сделать вывод, что для эффективной транс-активации гена *yellow* необходимо присутствие *gypsy* инсулатора в обоих аллелях.

Несмотря на высокий уровень транс-активации гена *yellow* у гетерозиготных самок (Δ ES)Y(SW)/(ES)Y(Δ SW), транс-активации гена *mini-white* в этом же случае не наблюдалось. Однако по сравнению с системой, в которой происходит транс-активация промотора гена *yellow*, взаимное расположение инсулаторов, энхансера и промотора гена *mini-white* в обоих аллелях совсем иное. По всей видимости, отсутствие транс-активации гена *mini-white* связано с тем, что обе производные содержат *gypsy* инсулатор в таких положениях по отношению к энхансерам и промотору гена *mini-white*, что транс-взаимодействие инсулаторов приводит к изоляции энхансера и промотора друг от друга.

5. Gypsy инсулатор способствует транс-активации промотора гена yellow.

Согласно результатам наших исследований трансвекции между производными конструкции (ES)Y(SW), *gypsy* инсулатор, расположенный между энхансерами и промотором гена *yellow*, позволяет энхансерам активировать промотор гена *yellow*, расположенный на гомологичной хромосоме. Эти результаты не согласуются с данными (Morris et al 1999), полученными на гене *yellow* в эндогенном локусе, о том, что в аллелях y^2 и y^{69} энхансеры гена *yellow*, изолированные от промотора *gypsy* инсулатором в составе *gypsy* ретротранспозона, не способны транс-активировать промотор гена *yellow* аллеля $y^{82/29}$, не содержащего энхансеров.

Это противоречие может быть объяснено тем, что спаривание между гомологичными последовательностями иногда может приводить к тому, что энхансеры способны цис-активировать промотор, даже в присутствии между ними *gypsy* инсулатора (Morris et al 1998), и подобное спаривание между производными конструкции (ES)Y(SW) возможно позволяет энхансерам гена *yellow* преодолевать *gypsy* инсулатор и цис-активировать промотор.

Для того чтобы убедиться, что в нашей работе мы наблюдаем транс-активацию гена *yellow*, а не опосредованную соматическим спариванием цис-активацию, нами были сделаны конструкции (ES)(Y)SW и (ES)(Y)W (см рис 6). Как и в ряде предыдущих конструкций в положении -893 от точки начала транскрипции гена *yellow* находился *gypsy* инсулатор, который вместе с районом энхансеров гена *yellow* был окружен FRT-сайтами. Для того чтобы иметь возможность в части производных инактивировать ген *yellow*, но при этом сохранить его нормальную промоторную область, второй экзон гена *yellow* был окружен lox-сайтами. Отличие конструкций (ES)(Y)SW и (ES)(Y)W заключалось в том, что одна из них - (ES)(Y)SW содержала второй *gypsy* инсулатор после 3'-конца гена *yellow* перед геном *mimic-white*, а конструкция (ES)(Y)W не содержала его.

Было получено семь (ES)(Y)SW и пять (ES)(Y)W однокопийных трансгенных линий. Мухи, содержащие конструкцию, имели желтые тело и крылья, так как энхансеры были изолированы от промотора гена *yellow* *gypsy* инсулатором.

Поскольку делеция энхансеров гена *yellow* и следующего за ними *gypsy* инсулатора фенотипически никак не проявлялась, отбор мух с делецией осуществлялся с помощью ПЦР-анализа потомства индивидуальных особей, полученных после скрещивания мух из исходных трансгенных линий с мухами, несущими ген FLP-рекомбиназы.

Средние значения
уровня пигментации
(крылья/тело)

		#40(1)	#41(1)	#42(2)	#43(2)	#44(3)	#45(3)	#46(3)
(ES)(Y)SW								
H	E	S)	███████████	■ white → H	1/1	1/1	1/1	1/1
H	E	S)	███████████	■ white → H	5/4-5	3/3	4/3-4	3-4/3
H	███████████	■ white → H			5/4	3/2-3	2-3/2	3.7/3.2
(ES)(YΔEX)SW/(ΔES)(Y)SW								
H	E	S)	███████████	■ white → H	5/4-5	3/3	4/3-4	3-4/3
H	███████████	■ white → H			5/4	3/2-3	2-3/2	3.7/3.2
#47(1) #48(2) #49(2) #50(2) #51(3)								
(ES)(Y)W								
H	E	S)	███████████	■ white → H	1/1	1/1	1/1	1/1
(ES)(Y)W/(ΔES)(Y)W								
H	E	S)	███████████	■ white → H	2-3/2-3	1/1	3/3	3/2
H	███████████	■ white → H			3/2-3			2.5/2.2
(ES)(YΔEX)W/(ΔES)(Y)W								
H	E	S)	███████████	■ white → H	2-3/2-3	1/1	3/3	3/2
H	███████████	■ white → H			3/2-3			2.5/2.2

Рис 6 Схема конструкций (ES)(Y)SW и (ES)(Y)W и результаты оценки уровня пигментации гена *yellow*

У гетерозиготных самок (Δ ES)(Y)SW/(ES)(Y)SW и (Δ ES)(Y)W/(ES)(Y)W, содержащих два нормальных гена *yellow*, наблюдался тот же уровень транс-активации гена *yellow*, что и у гетерозиготных самок (Δ ES)(Y)SW/(ES)(Y $^{\Delta ex2}$)SW и (Δ ES)(Y)W/(ES)(Y $^{\Delta ex2}$)W, содержащих только один полноценный ген *yellow*, расположенный *in trans* по отношению к энхансерам. Таким образом, преодоления энхансерами цис-расположенного *gyru* инсулятора и цис-активации гена *yellow* не наблюдается, инсулятор не препятствует транс-активации

энхансерами промотора гена *yellow* и наблюдаемые нами эффекты обеспечены только транс-взаимодействиями

Как и ожидалось, уровень трансвекции у гетерозиготных самок $(\Delta\text{ES})(Y)\text{SW}/(\text{ES})(Y^{\Delta\text{ex}2})\text{SW}$ был выше, чем у $(\Delta\text{ES})(Y)\text{W}/(\text{ES})(Y^{\Delta\text{ex}2})\text{W}$, что подтверждает роль взаимодействия между *gypsy* инсулаторами, расположенными на гомологичных хромосомах в обеспечении эффективной транс-активации между энхансерами и промотором гена *yellow*

Таким образом, нами получены доказательства возможности транс-активации гена *yellow* для случаев трансгенной конструкции, находящейся в различных позициях генома *Drosophila melanogaster*. Учитывая полученные нами данные, предыдущий результат, что энхансеры, изолированные от промотора гена *yellow* встройкой *gypsy* ретротранспозона в аллелях y^2 и y^{69} , неспособны транс-активировать промотор гена *yellow* аллеля $y^{82/29}$, можно объяснить специфическими свойствами эндогенного локуса *yellow*. В частности, этот локус содержит недавно найденный 1A-2 инсулатор, похожий, но не идентичный *gypsy* инсулатору, а y^2 аллель содержит целый *gypsy* ретротранспозон, что приводит к иному взаимному расположению регуляторных элементов в комбинации аллелей $y^2/y^{82/29}$, чем расположение регуляторных элементов в производных трансгенных конструкций, используемых нами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Транс-взаимодействие между *gypsy* инсулаторами улучшает локальное спаривание между гомологичными хромосомами

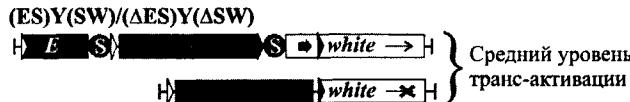
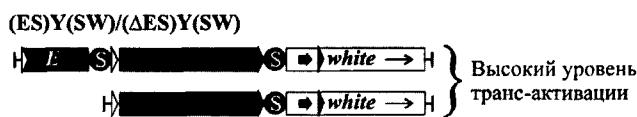
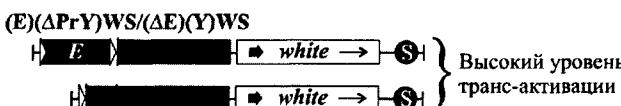
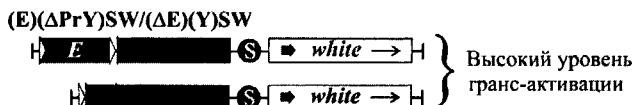
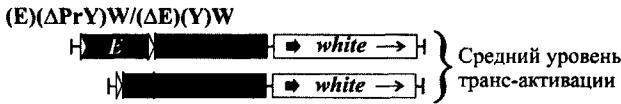
Нами было показано, что уровень транс-активации энхансерами гена *yellow* промотора гена *yellow* в значительной степени зависит от места в геноме *D.melanogaster* и не коррелирует с уровнем цис-активации. Различный уровень транс-активации в различных местах генома может быть объяснен неодинаковой степенью соматического спаривания между гомологичными хромосомами и существованием специальных элементов, присутствие которых усиливает соматическое спаривание.

К таким элементам можно отнести *gypsy* инсулатор, который, находясь на расстоянии 5 Kb и 9 Kb от промотора гена *yellow*, улучшает транс-активацию промотора гена *yellow* его энхансерами, расположенными на гомологичной хромосоме (см рис 7). Вероятно, транс-взаимодействие между *gypsy* инсулаторами улучшает локальное спаривание между гомологичными хромосомами.

Последовательности, окружающие ген *yellow*, играют большую роль в определении эффективности транс-активации, например 1A-2 инсулатор, расположенный с 3'-конца гена (Golovnin et al 2003, Parnell et al 2003) 1A-2 инсулатор, содержащий два сайта связывания для Su(Hw) белка, не присутствовал в наших конструкциях.

Таким образом, данные о воспроизводимой и эффективной транс-активации гена *yellow* в различных местах генома, полученные Chen et al (Chen et al 2002), могут быть объяснены присутствием в использованной ими конструкции 1A-2 инсулатора, улучшающего локальное соматическое спаривание и, таким образом, повышающим эффективность транс-активации.

Несмотря на то, что известно много примеров трансвекции, природа спаривания гомологичных хромосом в ходе интерфазы остается неясной. В некоторых случаях известны белки, принимающие участие в процессах трансвекции. К ним относится белок Zeste – сайт специфический ДНК связывающий белок, сайты связывания которого распределены по всему геному (Benson et al 1987, Benson et al 1988, Pirrotta et al 1987). Инактивация белка Zeste приводит к нарушению спаривания между аллелями и исчезновению эффектов трансвекции для генов *decapentaplegic* (Gelbart and Wu 1982, Gelbart 1982), *white* (Babu and Bhat 1980, Blackwood and Kadonaga 1998), *eyes absent* (Leiserson et al 1994) и *Ubx* генов (Goldsborough and Kornberg 1996).



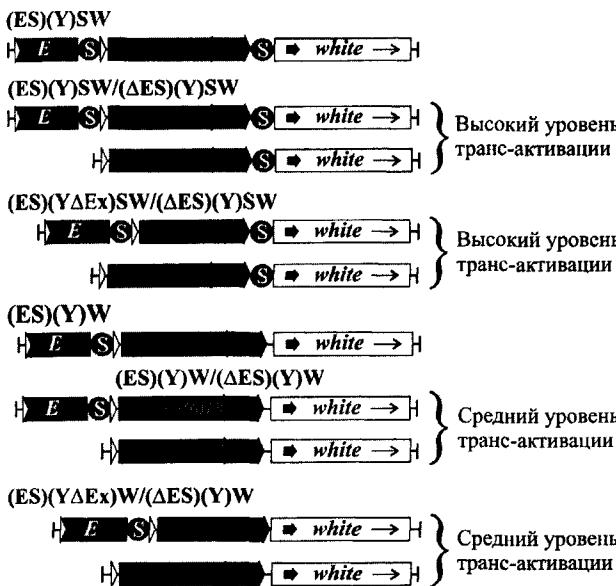


Рис 7 Схемы трансгенных конструкций, использованных в нашей работе, и оценка уровня транс-активации гена *yellow* между их производными

E – энхансеры гена *yellow*, S – *gypsy* инсулатор; белые треугольники – сайты узнавания FLP рекомбиназы; чёрные треугольники - сайты узнавания Cte рекомбиназы

Еще один класс элементов, которые могут улучшать соматическое спаривание между гомологичными хромосомами – это последовательности ДНК, с которыми связываются белки группы Polycomb (Pc-G) – Polycomb Responsible Elements (PRE). Это короткие последовательности ДНК, на которых собираются репрессионные комплексы, состоящие из белков группы Polycomb (Pirrotta 1998). В группу Polycomb входят как минимум пятнадцать белков, которые являются компонентами больших белковых комплексов, участвующих в репрессии транскрипции ряда генов. В трансгенных конструкциях, содержащих PRE, степень репрессии расположенных рядом с PRE генов во многих случаях значительно возрастила в линиях мух, гомозиготных по конструкции. Скорее всего два Pc-G комплекса, расположенные на гомологичных хромосомах, способны транс-взаимодействовать друг с другом, что увеличивает их стабильность, усиливает репрессионный эффект и в то же время улучшает спаривание гомологичных хромосом.

Показано, что GAGA фактор также способен сближать последовательности, находящиеся *in trans* по отношению друг другу, что обусловлено наличием BTB/POZ

домена и способностью к олигомеризации (Mahmoudi et al 2002) При этом происходит эффективная транс-активация энхансерами промотора Так же как и для белка Su(Hw) для GAGA фактора показана множественная локализация на политеческих хромосомах

Отличительной особенностью белков Zeste, GAGA, Pc-G и Su(Hw) является то, что они вовлечены в процесс организации ДНК в ядре и способны приближать друг к другу различные участки ДНК Например, Zeste может формировать из ДНК, содержащей сайты его связывания, сложные организованные структуры с образованием петель (Bickel and Pirrotta 1990) Хорошо известно, что трансгенные конструкции, содержащие MCP элемент, в состав которого входят инсулятор и PRE, и расположенные на различных хромосомах, ассоциированы в ядре вместе (Gruzdeva et al 2005, Muller et al 1999) Поэтому можно предположить, что эти белки могут принимать участие в соматическом спаривании

Было показано, что инсуляторы scs и scs', окружающие гены теплового шока *hyp70*, в ядре локализуются рядом (Blanton et al 2003) и тоже могут быть вовлечены в процесс соматического спаривания Спаривание scs и scs' может быть обеспечено за счет взаимодействий между белками Zw5 и BEAF, которые связываются с scs и scs' соответственно (Blanton et al 2003). В этом случае между scs и scs' образуется петля ДНК размером около 15 Kb, в которой находятся два гена теплового шока

Так как Su(Hw) белок имеет около двухсот сайтов связывания в геноме *Drosophila* и оказывает влияние на эффективность трансвекции, можно полагать, что он является одним из участников процесса соматического спаривания между гомологичными хромосомами В пользу этого свидетельствуют недавние цитологические данные (Byrd and Corses 2003) о том, что *gypsy* инсуляторы участвуют в формировании хроматиновых петель, которые ассоциированы с ядерным матриксом, причем в формировании петли участвуют обе гомологичные хромосомы (Byrd and Corses 2003)

2. *Gypsy* инсулятор способен обеспечивать транс-взаимодействия между энхансером и промотором, находящимися на больших расстояниях друг от друга.

Несмотря на то, что на политеческих хромосомах обнаруживаются около 200 сайтов связывания для белка Su(Hw), в ядрах регистрируется только 20-25 точек его локализации – так называемых инсуляторных телес. Принимая в расчет эти данные о распределении Su(Hw) белка в ядре (Gerasimova and Corses 1998), можно предположить, что Su(Hw) белок принимает участие в установлении пространственной организации ДНК в ядре и осуществлении коммуникации между различными локусами в геноме *D. melanogaster*

Однако следует отметить, что простого сближения локусов недостаточно для функционального транс-взаимодействия между элементами, входящими в них. Кроме

физического сближения промотора и энхансера значительную роль играет их взаимное пространственное расположение относительно элементов, формирующих пространственную организацию ДНК в ядре

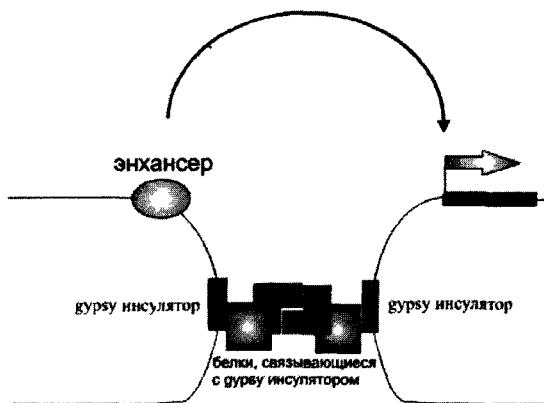


Рис 8 Модель транс-активации энхансерами промотора в присутствии *gypsy* инсулаторов

Таким образом, в ходе нашей работы, были получены данные о том, что *gypsy* инсулаторы участвуют в коммуникации между удаленными друг от друга локусами и, вероятно, в регуляции соматического спаривания гомологичных хромосом. Для того чтобы установить по одному или по разным механизмам осуществляются эти процессы, потребуются дальнейшие исследования. Использованная нами для изучения трансвекции модельная система на основе гена *yellow* дает возможность дальнейшей идентификации белков, участвующих в процессах трансвекции и коммуникации между локусами

ВЫВОДЫ

- 1 На основе регуляторных систем генов *yellow* и *mim-white* создана модельная система для изучения транс-взаимодействий между регуляторными элементами в геноме *Drosophila melanogaster*.
- 2 Установлено, что уровень транс-активации энхансерами гена *yellow* промотора гена *yellow* в значительной степени зависит от места в геноме *D melanogaster*
- 3 Показано, что *gypsy* инсулиторы, находясь на гомологичных хромосомах даже на некотором удалении от энхансер-промоторной пары, способны стабилизировать транс-активацию промотора
- 4 Продемонстрировано, что в ряде случаев *gypsy* инсулиторы участвуют в коммуникации между энхансером и промотором, которые находятся на большом расстоянии друг от друга. Выявлена роль белков Su(Hw) и Mod(mdg4) в этом процессе
- 5 Показано, что линейное расстояние между трансгенными инсерциями в негомологичные локусы не является определяющим условием для установления транс-взаимодействия между ними

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации:

- 1 E.Kravchenko, E Savitskaya, A Parshikov, P.Georgiev, M Savitsky *Gypsy* insulator facilitates enhancer action in *trans* throughout the *Drosophila* genome International Conference «Chemical & Biological Problems of Proteomics», Novosibirsk July 5-9 2004
- 2 M Savitsky, E.Kravchenko, E Savitskaya, A Parshikov, P Georgiev The pairing between *gypsy* insulators located in homologous chromosomes facilitates the enhancer action in *trans* throughout the *Drosophila* genome 46th Annual Drosophila Research Conference, San Diego, California March 30 - April 3, 2005
- 3 Kravchenko E, Savitskaya E, Kravchuk O, Parshikov A, Georgiev P, Savitsky M Pairing between *gypsy* insulators facilitates the enhancer action in *trans* throughout the *Drosophila* genome Mol Cell Biol 2005 Nov , 25(21) 9283-91
- 4 Кравченко Е.В., Паршиков А.Ф., Георгиев П.Г. Взаимодействие между Su(Hw) инсулиторами регулирует цис и транс активность энхансера гена *white* ДАН 2004, т 399, стр 392-395

Для заметок

Для заметок

Для заметок

Заказ № 2201 Подписано в печать 22.11.2005 Тираж 30 экз. Усл. п.л. 0,88



ООО "Цифровичок", тел. (095) 797-75-76; (095) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru

№ 25170

РНБ Русский фонд

2006-4
29268