

На правах рукописи

УДК 575.22:595.773.4.

РОДИН СЕРГЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
РЕГУЛЯТОРНОГО ЭЛЕМЕНТА FRONTABDOMINAL-7 ГЕНА

ABDOMINAL-B 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, профессор Чуриков Н. А.

кандидат биологических наук Быстрицкий А.А.

Ведущая организация: Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Защита диссертации состоится 15.12.2005 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

11.11.2005 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Грабовская Л.С.

2006-4
19735

2194855

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Взаимосвязь между организацией хроматина внутри ядра и регуляцией генной экспрессии является одним из важнейших и интереснейших вопросов современной биологии. Хроматин внутри ядра эукариотической клетки организован в функциональные домены, содержащие индивидуальные или группы генов (Dillon and Sabbattini 2000). Гены внутри функционального домена имеют определенный во времени и процессе развития и независимый от окружающих последовательностей уровень экспрессии. Основными регуляторами активности гена являются энхансеры и сайленсеры, которые могут располагаться на больших расстояниях от регулируемого ими гена.

Энхансерами принято называть последовательности ДНК, которые способны активировать транскрипцию независимо от ориентации и расстояния до точки начала транскрипции. Обнаружение этого класса регуляторных элементов поставило вопрос о том, каким образом клетка ограничивает действие этих регуляторных элементов только определенным набором промоторов, специфическим для различных тканей и периодов жизненного цикла клетки. Как показали эксперименты на трансгенных организмах и линиях трансгенных клеток (далее - трансгенах), лишь небольшая часть энхансеров имеет специфичность к определенным промоторам (Butler and Kadonaga 2001, Smale 2001), тогда как большинство из них могут активировать экспрессию широкого спектра генов. Было предположено, что геном эукариотической клетки организован в функциональные домены. Эта гипотеза предсказала существование граничных элементов, которые не позволяют энхансерам активировать «чужие» промоторы. Такие элементы были найдены и получили название инсуляторы. Инсуляторы способны нарушать взаимодействие между энхансером и промотором, но только в том случае, если находятся между ними. Примером таких инсуляторов является Su(Hw). В то же время не все подобные регуляторные элементы обладают столь очевидными свойствами.

Гомеозисный ген *Abdominal-B* (далее в тексте - *Abd-B*) участвует в образовании парасегментов дрозофилы (Mihaly et al 1998). Его регуляторная область размером примерно 50 т.п.н. находится на 3' конце гена и состоит из отдельных регуляторных доменов, каждый из них содержит один энхансер и регулирует экспрессию *Abd-B* гена только в одном из парасегментов дрозофилы. Предполагается, что инсуляторы окружают каждый энхансер и образуют ряд независимых регуляторных доменов. Например, один из таких доменов окружен инсуляторами *Frontabdominal-7* и *Frontabdominal-8* (далее в тексте - *Fab-7* и *Fab-8*, соответственно). Исходя из определения инсулятора, трудно объяснить каким образом энхансер, окруженный двумя инсуляторами, может активировать транскрипцию гена *Abd-B*.

РОС. НАЦИОНАЛЬ.

БИБЛИОТЕКА

С.ПЕТЕРБУРГ

09 100

885.

Следовательно, элемент *Fab-7*, хоть и проявляет инсулиторные свойства в экспериментах на трансгенах (Hagstrom et al 1996), имеет более сложную структуру и функции

Одной из самых больших проблем при исследованиях на трансгенах является эффект положения. Эффект положения генетической конструкции в геноме приводит к тому, что экспрессия генов одной и той же генетической конструкции может существенно различаться у разных трансгенных линий. Причиной этого служит влияние регуляторных элементов, окружающих точку встраивания конструкции в геном. Следовательно, при исследовании, например, взаимодействия между регуляторными элементами необходимо иметь возможность удалять каждый из этих элементов из генетических конструкций. Для этого используют *Cre/loxP* и *Flp/ftc*- рекомбиназные системы (Golic and Lindquist 1989, Siegal and Hartl 1996), которые позволяют удалять части конструкций из генома трансгенных мух. Однако, для проведения многих современных исследований, двух этих систем недостаточно. Например, для исследования взаимодействий между инсулиторами, требуется "вырезать" все инсулиторы (не менее двух) и энхансеры маркерных генов конструкции. Следовательно, создание новых систем для *in-vivo* редактирования последовательностей генетических конструкций позволит облегчить исследования сложных регуляторных систем, например инсулиторов регуляторной области гена *Abd-B*.

Цель и задачи исследования.

Основная цель работы состояла в изучении структуры и описании новых функций регуляторного элемента *Fab-7 Drosophila melanogaster*

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1 Создать новый метод делекции заданной последовательности в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*.
- 2 Изучить внутреннюю структуру элемента *Fab-7 Drosophila melanogaster*
3. Изучить функциональную значимость составных частей элемента *Fab-7*
4. Исследовать возможность функционального взаимодействия между двумя копиями *Fab-7* инсулитора.

Научная новизна и практическое значение работы.

В работе разработан новый метод, позволяющий удалять заданную последовательность в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*. Это позволит существенно облегчить изучение ряда вопросов современной молекулярной биологии, таких как, например, изучение сложных регуляторных систем.

Впервые показано, что два элемента *Fab-7* могут функционально взаимодействовать между собой. Также впервые показано, что инсулиторные свойства элемента *Fab-7* зависят от положения в конструкции. Эти результаты помогут исследователям понять, каким образом

энхансеры могут стимулировать промотор через несколько инсулятаторов в процессе регуляции гомеозисного гена *Abd-B*.

Апробация работы. Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004) и на 9-ой международной Пущинской школе- конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи и тезисов научных сообщений.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 92 страницах, включает 7 таблиц и 15 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 115 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

1 Фрагмент Fab-7²⁶⁴, в отличие от фрагмента Fab-7⁸⁵⁸, обладает свойствами PRE.

Основной задачей работы является исследование структуры регуляторного элемента Fab-7. Как известно из литературы (Hagstrom et al 1997, Zhou et al 1996), он имеет сложное устройство как с точки зрения упаковки окружающего его хроматина, так и с точки зрения функционирования его различных частей. Было показано, что сайты связывания белков группы Polycomb локализуются в области третьего сайта гиперчувствительности к обработке ДНКазой-I (HS3, рис 1), фрагмент Fab-7²⁶⁴. Это позволило сделать предположение о существовании элемента PRF (Polycomb Responsible Element – последовательности ДНК, с которыми связываются белки группы Polycomb) в этой области.

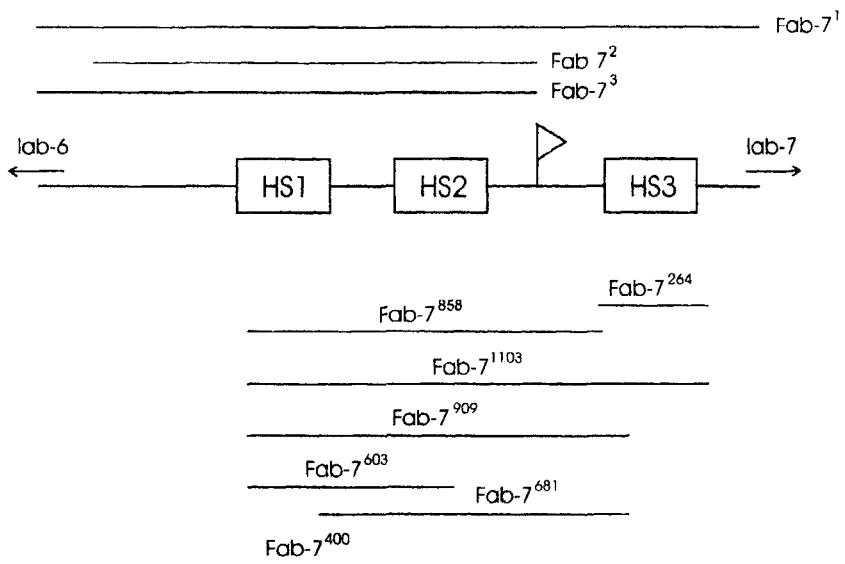


Рис 1. Фрагменты Fab-7, исследуемые в работе. В выше приведена схема регуляторного элемента Fab-7 и мутантных аллелей Fab-7¹, Fab-7² и Fab-7³. Флажок – место локализации транспозона Bluetail. HS1, HS2 и HS3 – сайты гиперчувствительности к обработке ДНК-азой I.

Существуют несколько признаков, которые характерны для всех элементов PRF. Во-первых эти элементы являются сайленсерами, т.е. подавляют экспрессию окружающих генов. Белки группы Polycomb (Pc-белки) взаимодействуют с PRF, образуя мультимерные

комплексы Рс-белки, связавшись с ДНК, могут распространяться на большие расстояния и подавлять экспрессию окружающих генов. Механизм их действия не известен, однако неактивное состояние генов может наследоваться следующими поколениями. Во-вторых, сайленсерная активность PRE увеличивается для организмов (в нашем случае мух), гомозиготных по аллелю, несущему элемент PRE. Например, если PRE в генетической конструкции (далее просто конструкции) расположен перед геном *minwhite*, то цвет глаз у мух, гомозиготных по аллелю с этой конструкцией, как правило, светлее, чем у гетерозиготных. В-третьих, степень подавления генов, окружающих PRE, зависит от дополнительных мутаций, нарушающих действие Рс-белков. Так, сайленсерная активность PRE может уменьшаться в присутствии мутации *ph^{4/0}*, которая затрагивает ген *polyhomeotic* (его продукт является белком группы Рс). В-четвертых, Рс-зависимое подавление экспрессии генов становится более эффективным при увеличении температуры.

Для исследования свойств предполагаемого PRE (фрагмент Fab-7²⁶⁴) из регуляторного элемента Fab-7 была создана конструкция Eny(Ene)F7²⁶⁴YW (см. рис. 2). Здесь фрагмент Fab-7²⁶⁴ (на рисунке – F264) был помещен между энхансерами тела (E(b)) и крыльев (E(w)) и промотором гена *yellow* в положении -893 пн относительно старта транскрипции гена. Энхансер гена был окружен сайтами для рекомбиназы Flp (на рисунке - frt) и встроен между энхансерами тела и крыльев. Фрагмент Fab-7²⁶⁴ был ориентирован своей дистальной (по положению в хромосоме) частью к промотору гена *yellow*.

В результате трансформации в эмбрионы линии *y^lw¹¹¹⁸* было получено 19 независимых трансгенных линий, содержащих одиночную инсерцию конструкции Eny(Ene)F7²⁶⁴YW. Для проверки функциональности элемента PRE мы сравнили уровень экспрессии гена *white* у мух гетерозиготных и гомозиготных по конструкции Eny(Ene)F7²⁶⁴YW (см. таб. 1). Здесь и далее пигментацию глаз оценивали в соответствии со следующей шкалой: белые (аллель *w¹¹¹⁸* – полная инактивация гена *white*, далее в таблицах – Б), светло-желтые (далее в таблицах – СЖ), желтые (Ж), темно-желтые (ТЖ), оранжевые (Ор), темно-оранжевые (ТОр), коричневые (К), темно-коричневые (ТК), красные (уровень пигментации дикого типа, в таблицах – Кр). В таблице – число трансгенных линий имеющих соответствующую окраску глаз у мух, гетерозиготных и гомозиготных по конструкции Eny(Ene)F7²⁶⁴YW. В 11 из 19 трансгенных линий интенсивность окраски глаз у гомозиготных мух была ниже, чем у гетерозиготных. В 6 случаях наблюдался противоположный эффект, в двух случаях окраска глаз гетерозиготных и гомозиготных мух не отличалась. Это означает, что в нашей системе фрагмент F7²⁶⁴ проявляет свойства PRE. Независимо от нас, в лаборатории проф. Кавалли был протестирован этот же фрагмент и

показано, что он обладает всеми четырьмя свойствами, характерными для элементов PRE (Dejardin and Cavalli, 2004)

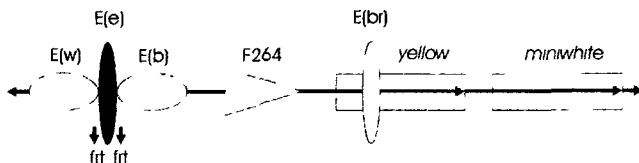


Рис. 2. Схема конструкции Eny(Ene)F7²⁶⁴YW

Другая картина наблюдалась для фрагмента Fab-7⁸⁵⁸. Эта часть Fab-7 покрывает первый и второй сайты гиперчувствительности к обработке ДНКазой-1 (HS1 и HS2, рис. 1) и является дополнительной к Fab-7²⁶⁴. Находясь в том же положении в конструкции (анализ конструкции (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W, делеция дистального Fab-7⁸⁵⁸), этот элемент не проявляет свойств PRE – во всех линиях мух гомозиготные по этой конструкции имеют более интенсивную окраску глаз, чем гетерозиготы. Таким образом, Fab-7 был разделен на две части одна из них является полноценным PRE, а другая не несет в себе сайтов связывания для Рс-белков и не проявляет характерных свойств, т.е не является PRE.

Таблица 1 Фенотипы мух гетерозиготных и гомозиготных линий по конструкции Eny(Ene)F7²⁶⁴YW (сокращения в тексте).

	Б	СЖ	Ж	ТЖ	Ор	ТОр	К	ТК	Кр
гетерозиготные мухи	0	1	2	3	2	6	4	1	0
гомозиготные мухи	2	6	3	0	0	3	1	0	4

2. Создание нового метода делеции заданной последовательности в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*.

В настоящее время изучение регуляции экспрессии генов у высших эукариот перешло на новый уровень от исследования активности отдельных энхансеров или промоторов к исследованию сложных регуляторных систем, состоящих из нескольких элементов. Примером таких сложных регуляторных систем может являться элемент Fab-7 – он имеет сложную структуру и различные его части выполняют иногда противоположные функции (см. ниже). Эффект положения генетической конструкции в геноме приводит к тому, что экспрессия генов одной и той же генетической конструкции может существенно различаться у разных трансгенных линий. Причиной этого служит влияние регуляторных элементов, окружающих точку встраивания конструкции в геном. Для решения этой проблемы

используют *Cre/loxP*- и *Fip/frt*- рекомбиназные системы, которые позволяют удалять части конструкций из генома трансгенных мух. Однако, современные исследования сложных регуляторных элементов требуют большего числа подобных систем (см. выше). Нами был разработан новый метод, который основан на использовании дрожжевой эндонуклеазы *I-SceI*. Этот фермент делает двухцепочечные разрывы по специфичной последовательности длиной 18 пн.

Ген, копирующий эндонуклеазу *I-SceI*, находится в интроне большой митохондриальной рРНК дрожжей (Dujon, 1988). Биохимические эксперименты показали, что этот фермент связывается со специфической последовательностью длиной 18 пн и вносит двойной разрыв, оставляя одноцепочечную 5'-последовательность длиной 4 пн (Colleaux et al. 1988). Как было показано ранее (Gong and Golic 2003), дрожжевая эндонуклеаза *I-SceI* может успешно разрезать ДНК в геноме *Drosophila melanogaster*. Однако, ген *yellow*, окруженный сайтами узнавания *I-SceI*, вырезался с частотой 2-7% (Gong and Golic 2003). С другой стороны, когда сайт *I-SceI* был окружен с двух сторон гомологичной последовательностью, двухцепочечные разрывы, индуцируемые *I-SceI* экзонуклеазой, эффективно reparировались (около 80% потомков) при помощи рекомбинации между гомологичными повторами (Rong and Golic 2003). Похожая частота гомологичной рекомбинации индуцируется вырезанием Р-элемента, окруженного двумя прямыми повторами (Preston et al. 2002). Для получения более высокой частоты вырезания, мы окружили *I-SceI* сайты прямыми повторами длиной 126 пн. Предполагалось, что двухнитевой разрыв, индуцируемый *I-SceI* эндонуклеазой, будет reparироваться с использованием гомологичных повторов, расположенных на одной и той же хроматиде. В результате, должна происходить делеция последовательности, которая находится между повторами.

Для подтверждения этого предположения было создана конструкция (En)YW (см. рис. 3). Здесь глазной энхансер был встроен между энхансерами крыльев и тела. Фрагмент ДНК размером около 3 тпн, содержащий энхансеры, был вставлен между сайтами *I-SceI* (на рисунке – прямоугольники с надписью *I-SceI*), которые снаружи были окружены прямыми повторами длиной 126 пн (на рисунке – жирные короткие стрелки). Если ферментативная активность эндонуклеазы *I-SceI* приводит к делеции всей последовательности ДНК заключенной между сайтами узнавания *I-SceI*, то удаление всех энхансеров приводит к резкому снижению экспрессии генов *yellow* и *white*, что коррелирует с изменением фенотипа трансгенных мух: тело и крылья становятся желтыми, глаза – слабо пигментированными.

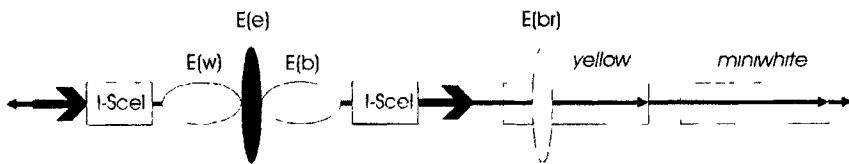


Рис 3. Схема конструкции (En)YW.

В результате трансформации в эмбрионы дрозофилы было получено 16 трансгенных линий, содержащих единичную копию конструкции (En)YW. В качестве источника эндонуклеазы I-SceI, была использована ранее созданная линия $v;P/v^+hsp70I-SceI$, несущая ген эндонуклеазы I-SceI под промотором теплового шока (Rong and Golic, 2000). Для сравнения частот вырезания в различном генетическом окружении, мы исследовали все 16 трансгенных линий. Для получения самцов содержащих (En)YW и $hsp70I-SceI$ мы проводили скрещивания мух, несущих эти конструкции. Для индукции экспрессии гена $hsp70I-SceI$, потомство, полученное после скрещивания (на первый день развития эмбрионов) обрабатывали тепловым шоком в течение одного часа. Степень мозаичности окраски тел и глаз в самцах F_1 отражала частоту вырезания в соматических клетках. Для определения частоты вырезания в половых клетках, самцы F_1 скрещивались с самками y^w^{118} , которые имеют неокрашенные глаза и тело. Анализируя это скрещивание, мы обнаружили, что часть потомков (примерно 8-12 %) имели желтое тело и крылья и слабо пигментированные глаза, что является следствием делекции энхансеров. Таким образом, во всех трансгенных линиях конструкции (En)YW эндонуклеаза I-SceI может индуцировать вырезания энхансеров.

Для дальнейшего анализа, мы выбрали по две линии, показавшие наибольшую (B1 и B2) и наименьшую (H1 и H2) частоту вырезания в предыдущем эксперименте. Для повышения частоты вырезания, мы увеличили время теплового шока до двух часов и выполняли его либо на первый, либо второй, либо третий день после начала кладки яиц. Мы обнаружили, что большинство самцов F_1 имели высокую мозаичность глаз и тела, что свидетельствует о высокой частоте вырезания в соматических клетках. В потомстве самцов F_1 , мы обнаружили от 20% до 50% мух, имеющих окраску кутикулы и глаз как у мух без энхансеров (см. таб. 2). Только 2% потомства имело промежуточную степень пигментации тела и глаз, что связано с частичной потерей энхансеров.

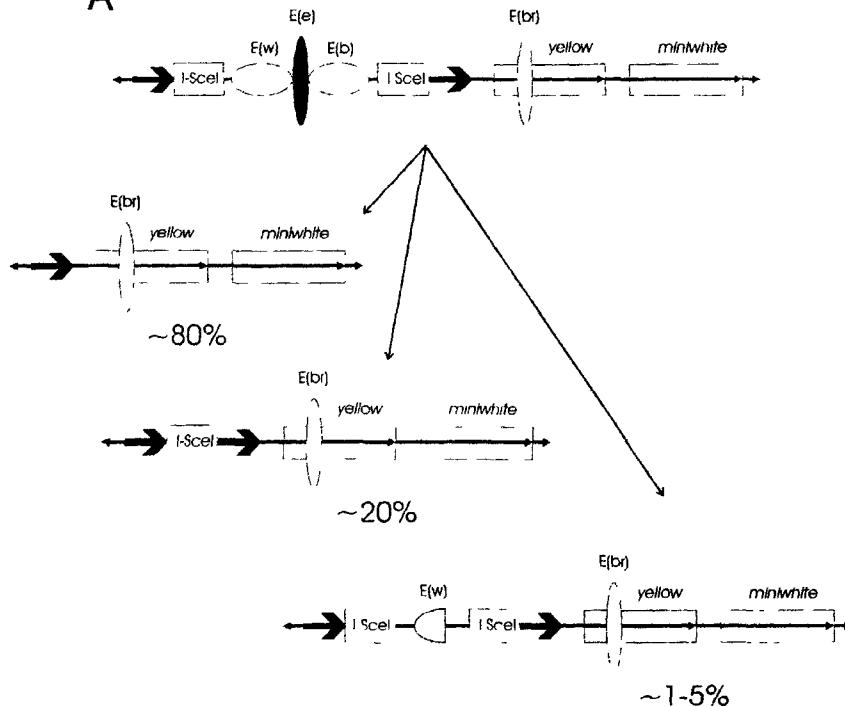
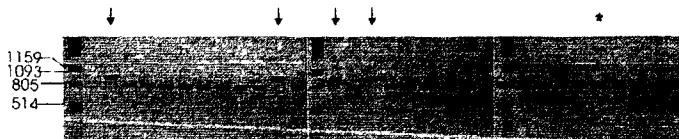
А**Б**

Рис. 4. А. Схемы конструкции (En)YW и ее производных после вырезания при помощи эндонуклеазы I-SceI. Под схемами производных приблизительная доля (в процентах от общего количества мух с вырезаниями) каждого варианта. Б. ПЦР – анализ ДНК независимо выбранных мух с новым фенотипом. Полосы длиной 920 пн отмечены стрелками, случай не полного вырезания – звездочкой.

Молекулярный анализ событий вырезания проводился с использованием метода ПЦР (Рис. 4). Для этого случайным образом было выбрано 93 независимых линий мух, имеющих фенотип отличный от начального. Амплификация ДНК между праймерами окружающими прямые повторы дала полосу в 760 пн (77 трансгенных линий) и 920 пн (15 трансгенных

линий), в то время как размер между этими праймерами в начальной конструкции был 3,5 пн (Рис 4). Секвенирование четырех полос длиной 760 пн показало, что они имеют один прямой повтор на месте делеции. Секвенирование двух полос по 920 пн показало, что их появление связано с восстановлением одного сайта I-SceI между двумя повторами по 126 пн. Амплификация ДНК между этими же праймерами в линии с промежуточным фенотипом дала полосу 2 пн, что подтвердило предположение о частичной потере энхансеров. Таким образом, показано, что примерно в 98% случаев двухцепочечный разрыв, индуцируемый эндонуклеазой I-SceI, приводил к потере энхансеров, оставляя или один прямой повтор или один сайт для I-SceI и два прямых повтора длиной 126 пн. Полученные данные демонстрируют, что I-SceI индуцирует в подавляющем количестве случаев полную делецию энхансеров.

Таблица 2. Эффективность вырезания энхансеров в половых клетках мух конструкции (En)YW.

Трансгенная линия	Условия проведения теплового шока ^a , ч/день	Общее число мух	Число мух с вырезанными энхансерами ^b	Частота вырезания энхансеров, %
H1	2 / 1	449	170	38
	2 / 2	399	115	29
	2 / 3	380	102	27
	2 / 3 раза	662	560 (5)	85
B1	2 / 1	373	132	35
	2 / 2	425	96	23
	2 / 3	589	175	30
	2 / 3 раза	715	634 (10)	89
B2	2 / 1	354	152	43
	2 / 2	467	240	51
	2 / 3	805	392	49
	2 / 3 раза	620	564 (6)	91
H2	2 / 1	127	26	20
	2 / 2	851	315	37
	2 / 3	290	77	27

Примечание. ^a условия проведения теплового шока: 2 часа на первый (2/1), второй (2/2), третий день (2/3) или трижды в течении первых трех дней после начала развития эмбрионов (2 / 3 раза). ^b в скобках - число мух с частичной потерей энхансера.

Для определения влияния уровня экспрессии эндонуклеазы I-SceI на частоту вырезания, мы выполняли тепловой шок по два часа трижды на 1-3 день после начала кладки яиц. Все самцы F_1 имели экстремально высокую степень мозаичности глаз и тела, что означает высокую частоту вырезания в соматических клетках. В потомстве самцов F_1 85-90% мух имели желтые глаза и неокрашенное тело, то есть имели фенотип как у мух без энхансеров тела и глаз. Таким образом, система на основе эндонуклеазы I-SceI может быть использована, наряду с ранее описанными Cre/loxP- и Flp/frt- системами, для вырезания части конструкции из трансгенных мух. Наши результаты свидетельствуют о том, что и другие редкошпящие эндонуклеазы также могут быть использованы для этой цели, что открывает возможность создания множества подобных систем. Существование нескольких систем для in-vivo редактирования позволяют, например, проводить изучение сложных регуляторных систем, несмотря на эффект положения в геноме. Кроме того, I-SceI система, в отличии от Cre/loxP- и Flp/frt- систем, дает 1-2% неполных вырезаний, что позволяет использовать ее для проведения экспериментов по исследованию функционально значимых участков энхансеров.

3. Фрагменты Fab-7¹¹⁰³ блокируют взаимодействие между энхансером и промотором и функционально взаимодействуют между собой.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что элементы MCP (Miscadastral pigmentation) и инсулаторы su(Hw) могут функционально взаимодействовать, друг с другом (Muravyova et al. 2001; Gruzdeva et al 2005). Поскольку такое взаимодействие может играть важную роль в регуляции экспрессии гена *Abd-B* мы, используя новую систему для вырезания части конструкции из трансгенных мух, исследовали возможность и причины функционального взаимодействия между различными фрагментами элемента Fab-7.

Известно, что фрагмент длиной 3.6 тпн, включающий в себя Fab-7, может взаимодействовать с таким же эндогенным фрагментом и с другой конструкцией, также содержащей этот фрагмент (Bantignies et al 2003). Учитывая способность элементов PRE усиливать свое действие в гомозиготе, авторы предположили, что этот эффект основан во многом, на взаимодействии Рс-белков. Для проверки этой гипотезы нами были созданы несколько конструкций.

В конструкции (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W (см. рис. 5), фрагменты Fab-7¹¹⁰³ (на рисунке - F1103) были встроены с разных сторон от гена *yellow* и в противоположной друг к другу ориентации: один в -893 относительно начала транскрипции гена *yellow* (проксимальный), второй - между генами *yellow* и *white* (дистальный). Дистальный фрагмент был окружен сайтами для рекомбиназы Cre (на рисунке - lox). Проксимальный окружен сайты для рекомбиназы Flp. Энхансеры, в свою очередь, были помещены между прямыми повторами и

сайтами узнавания эндонуклеазы I-SceI, как в конструкции (En)YW. При этом оба фрагмента находились в такой ориентации, что сайленсерные части были расположены со стороны гена *yellow*.

Таблица 3. Фенотипы трансгенных линий конструкции (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W. (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W, (En)Y(F7¹¹⁰³)W, (En)(F7¹¹⁰³)YW и (En)YW означает исходную конструкцию, производную без проксимального Fab-7¹¹⁰³, дистального Fab-7¹¹⁰³ и без обоих, соответственно. В таблице – число трансгенных линий, имеющих соответствующий цвет глаз.

	Б	СЖ	Ж	ТЖ	Op	TOp	К	TK	Kр
(En)(F7 ¹¹⁰³)Y(F7 ¹¹⁰³)W	0	0	2	4	1	3	3	6	2
(En)Y(F7 ¹¹⁰³)W	0	0	1	4	3	2	4	6	1
(En)(F7 ¹¹⁰³)YW	0	1	2	6	4	6	0	2	0
(En)YW	0	0	0	2	0	4	6	6	3

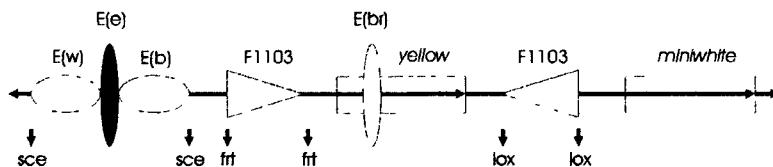


Рис. 5. Схема конструкции (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W.

Сначала мы изучили способность элемента Fab-7¹¹⁰³ блокировать взаимодействие между энхансером и промотором Делеция проксимального Fab-7¹¹⁰³, если дистальный уже удален, снижает уровень экспрессии гена *white* в 20 из 21 полученных трансгенных линий, причем в 16 из них степень пигментации глаз изменяется очень существенно (на несколько степеней градации). Это означает, что проксимальный фрагмент Fab-7¹¹⁰³ является хорошим инсулатором. С другой стороны, удаление дистального фрагмента, при заранее удаленном проксимальном, только в 4 случаях приводит к серьезному изменению степени пигментации глаз. В 7 трансгенных линиях уровень экспрессии лишь немного повысился, а в 10 из 21 линий цвет глаз не изменился вообще. Такое различие в свойствах дистального и проксимального фрагментов Fab-7¹¹⁰³ можно объяснить либо полярностью элемента Fab-7¹¹⁰³ (он включает в себя элемент PRE), либо зависимостью его инсулаторных свойств от положения в трансгене (см. ниже).

Делеция дистального Fab-7¹¹⁰³ существенно снижает уровень пигментации глаз в 14 из 21 трансгенных линий (см. таб. 3.). С другой стороны, удаление дистального Fab-7¹¹⁰³ не

влияет на пигментацию глаз, если удален проксимальный фрагмент и все энхансеры. Следовательно, дистальный фрагмент сам по себе не влияет на уровень экспрессии рядом расположенного гена *white*. Тогда увеличение экспрессии гена *white* в присутствии двух копий Fab-7 инсулатора в 14 трансгенных линиях можно объяснить частичной нейтрализацией блокирующей активности фрагментов Fab-7¹¹⁰³ при их взаимодействии. Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, что инсулаторы Fab-7¹¹⁰³ функционально взаимодействуют, а это предполагает также и их физическое взаимодействие. Однако эффективность такого взаимодействия, выражавшегося во взаимной нейтрализации инсулаторной активности, значительно ниже, чем было ранее показано для инсулатора Su(Hw). Наиболее вероятно, что эти различия связаны не с эффективностью физического взаимодействия между этими инсулаторами, а скорее с различиями в их свойствах и механизме действия.

С другой стороны, способность энхансера глаз в исходных линиях, несмотря на два PRE, активировать ген *white*, означает, что элемент Fab-7 способен ограничивать негативное действие Pcs- белков.

4. Элементы PRE не влияют на функциональное взаимодействие инсулаторов Fab-7.

Для определения роли PRE в способности элементов Fab-7¹¹⁰³ функционально взаимодействовать между собой была создана конструкция (En)F7⁸⁵⁸(F7²⁶⁴)Y(F7²⁶⁴)F7⁸⁵⁸W (см. рис 6). Фрагмент Fab-7¹¹⁰³ был разделен на две части (см. рис. 1.): Fab-7²⁶⁴, который заключает в себе сайты связывания для Pcs- белков и проявляет все свойства PRE, и Fab-7⁸⁵⁸, который не является PRE. Фрагменты Fab-7⁸⁵⁸ и Fab-7²⁶⁴, окруженный в одном случае сайтами для Cre- рекомбиназы, а в другом - для Flp- рекомбиназы, были соединены между собой. Затем они были встроены с разных сторон от гена *yellow* и в противоположной друг к другу ориентации: один в -893 относительно начала транскрипции гена *yellow* (проксимальный), второй - между генами *yellow* и *white* (дистальный). Энхансеры тела, крыльев и глазной энхансер были помещены между прямыми повторами и сайтами узнавания эндонуклеазы I-SceI, как в конструкции (En)YW.

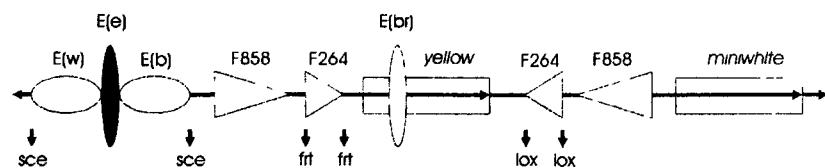


Рис. 6. Схема конструкции (En)F7⁸⁵⁸(F7²⁶⁴)Y(F7²⁶⁴)F7⁸⁵⁸W.

В результате трансформации в эмбрионы линии $y^l w^{118}$ было получено 18 независимых трансгенных линий, содержащих одиночную инсерцию конструкции (En)F7⁸⁵⁸(F7²⁶⁴)Y(F7²⁶⁴)F7⁸⁵⁸W. В 11 из 18 трансгенных линий кооперативное действие PRE приводило к пожелтению щетинок у мух. Уровень экспрессии гена *yellow* в теле и крыльях также был снижен, что можно объяснить как инсулиторной активностью фрагментов Fab-7, так и прямой репрессией промотора гена *yellow*. Уровень экспрессии гена *white* напротив был достаточно высок, на уровне экспрессии в конструкции (En)YW. В общем, фенотипы трансгенных линий были похожи на фенотипы линий конструкции (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W, а значит изменение во внутренней структуре элемента Fab-7 (за счет введения сайтов узнавания рекомбиназ) не оказало влияния на его функцию. Удаление как одного из элементов Fab-7²⁶⁴ (PRE), так и обоих сразу не привело к заметным изменениям в степени пигментации глаз ни у одной из 18 трансгенных линий ни в поколении F₃ (первое поколение после удаления фрагментов), ни в одном из последующих поколений. В 9 из 11 линий, у которых щетинки изначально не были окрашены, удаление обоих PRE привело к потемнению щетинок. Уровень экспрессии гена *yellow* оставался неизменным во всех производных исходных линий. Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, что элементы PRE не влияют на способность Fab-7¹¹⁰³ функционально взаимодействовать между собой. Следовательно, такой же способностью должны обладать более короткие фрагменты Fab-7⁸⁵⁸. Для проверки этого предположения, была создана конструкция (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W.

5. Фрагменты Fab-7⁸⁵⁸ блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, функционально взаимодействуют между собой, не обладают полярностью и их инсулиторные свойства зависят от положения в конструкции.

Конструкция (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W (см. рис. 7) была построена по той же схеме, что и (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W, только вместо фрагмента Fab-7¹¹⁰³ был взят фрагмент Fab-7⁸⁵⁸. Для 11 трансгенных линий, содержащих одиночную инсерцию конструкции (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W, нами было проанализировано все восемь возможных конфигураций трансгенов (см. таб. 4).

Как и предполагалось заранее, мухи всех 11 линий имели темные щетинки – фрагмент Fab-7⁸⁵⁸ не обладает свойствами PRE. Уровень экспрессии гена *yellow* в теле и крыльях, напротив, был снижен, что можно объяснить инсулиторной активностью фрагментов Fab-7⁸⁵⁸. Во всех линиях мухи имели высокий уровень экспрессии гена *white* в глазах. Длссия энхансеров приводила к резкому снижению степени окраски глаз, а значит, глазной энхансер способен эффективно стимулировать промотор через два Fab-7⁸⁵⁸. Причем, степень пигментации глаз у производных без обоих Fab-7⁸⁵⁸ была такой же, как и у исходных линий (см. таб. 4). Таким образом, два фрагмента Fab-7⁸⁵⁸ не оказывали существенного влияния на

взаимодействие между энхансером и промотором, и их функциональное взаимодействие приводило к потере ими инсулаторных свойств. Для изучения инсулаторных свойств отдельного Fab-7⁸⁵⁸, мы сравнили степень пигментации глаз у производных с делецей сначала дистального, а затем проксимального Fab-7⁸⁵⁸ с линиями без обоих элементов. Как и в случае с конструкцией (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W, были обнаружены существенные различия только проксимальный Fab-7⁸⁵⁸ эффективно блокировал глазной энхансер во всех 11 линиях, в то время как дистальный Fab-7⁸⁵⁸ в этих же 11 линиях не оказывал почти никакого влияния на взаимодействие между энхансером и промотором. Этот вывод был подтвержден при изучении уровня экспрессии гена *white* в семенниках. Мухи исходных линий, линий без проксимального Fab-7⁸⁵⁸ и без обоих инсулаторов имели высокую степень пигментации семенников. И наоборот, цвет семенников у мух линий без дистального инсулатора и всех производных без энхансеров был белым. Используя возможности трех систем для удаления частей из конструкции, путем сравнения различных конфигураций трансгена в одном и том же генетическом окружении, мы показали, что ни дистальный, ни проксимальный фрагменты Fab-7⁸⁵⁸ не могут непосредственно влиять на уровень экспрессии гена *white* ни в глазах, ни в семенниках. Тогда различия в свойствах двух Fab-7⁸⁵⁸ можно объяснить либо полярностью инсулаторов, либо зависимостью их свойств от положения в конструкции.

Таблица 4 Фенотипы трансгенных линий конструкции (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W, (En)Y(F7⁸⁵⁸)W, (En)(F7⁸⁵⁸)YW и (En)YW означает исходную конструкцию, производную без проксимального Fab-7⁸⁵⁸, дистального Fab-7⁸⁵⁸ и без обоих, соответственно (F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W, Y(F7⁸⁵⁸)W, (F7⁸⁵⁸)YW и YW – соответствующие производные без энхансеров. В таблице – число трансгенных линий, имеющих соответствующий цвет глаз.

	Б	СЖ	Ж	ТЖ	Op	TOp	К	ТК	Kр
(En)(F7 ⁸⁵⁸)Y(F7 ⁸⁵⁸)W	0	0	0	0	2	4	3	2	0
(F7 ⁸⁵⁸)Y(F7 ⁸⁵⁸)W	0	1	6	4	0	0	0	0	0
(En)YW	0	0	0	0	1	4	5	1	1
(En)Y(F7 ⁸⁵⁸)W	0	0	0	1	2	6	1	1	0
Y(F7 ⁸⁵⁸)W	0	1	8	2	0	0	0	0	0
(En)(F7 ⁸⁵⁸)YW	0	0	5	2	2	1	0	0	0
(F7 ⁸⁵⁸)YW	0	4	6	1	0	0	0	0	0
YW	0	1	9	1	0	0	0	0	0

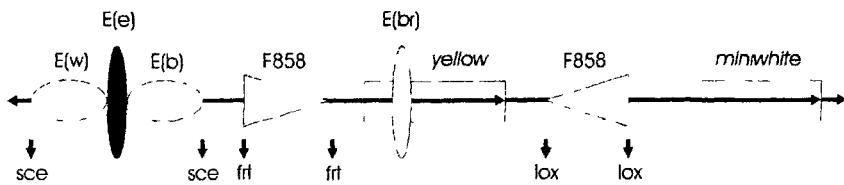


Рис. 7 Схема конструкции (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W

Для изучения полярности этого инсулитора было создано две конструкции. Первая конструкция (En)(Γ 7⁸⁵⁸REV)Y(F7⁸⁵⁸)W (см. рис. 8) была создана по той же схеме, что и (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W, но ориентация проксимального Fab-7⁸⁵⁸ была изменена на обратную. Фенотипы 17 трансгенных линий (см. таб. 5), а также фенотипы их производных, не отличались от соответствующих для конструкции (En)(F7⁸⁵⁸)Y(F7⁸⁵⁸)W. Несмотря на изменение ориентации, проксимальный инсулитор не потерял способности блокировать взаимодействие между энхансером и промотором гена *white*.

Таблица 5. Фенотипы трансгенных линий конструкции (En)(F7⁸⁵⁸REV)Y(F7⁸⁵⁸)W.

	Б	СЖ	Ж	ТЖ	Op	ТOp	К	ТК	Kр
(En)(F7 ⁸⁵⁸ REV)Y(F7 ⁸⁵⁸)W	0	0	0	1	3	6	4	1	2
(En)Y(F7 ⁸⁵⁸)W	0	0	0	3	2	5	6	0	1
(En)(F7 ⁸⁵⁸ REV)YW	0	3	7	1	4	2	0	0	0

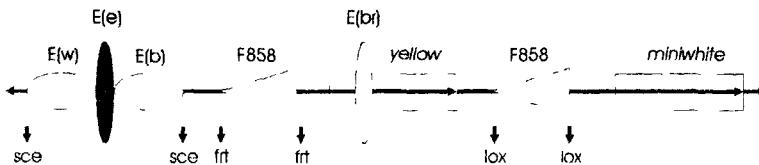


Рис. 8 Схема конструкции (En)(F7⁸⁵⁸REV)Y(F7⁸⁵⁸)W

Во второй конструкции (En)YF7⁸⁵⁸REVW (см. рис. 9) фрагмент Fab-7⁸⁵⁸ был вставлен в обратной ориентации (относительно дистального Fab-7⁸⁵⁸ в (En)(F7⁸⁵⁸REV)Y(F7⁸⁵⁸)W) между генами *yellow* и *white*. Энхансеры, как и в большинстве предыдущих конструкций, были помечены между прямыми повторами длиной 126 пн и сайтами узнавания эндонуклазы I-SceI.

В результате трансформации в эмбрионы линии *y¹w¹¹¹⁸* было получено 13 независимых трансгенных линий, содержащих одиночную инсерцию конструкции (En)YF7⁸⁵⁸REVW. Делекция энхансеров в 11 из 13 линий приводила к резкому уменьшению

уровня экспрессии гена *white* в глазах (см. таб. 6) Следовательно, глазной энхансер способен эффективно стимулировать промотор гена через Fab-7⁸⁵⁸ и этот элемент, находясь в “дистальном” положении, не проявляет инсуляторных свойств в обеих возможных ориентациях.

Таблица 6. Фенотипы трансгенных линий конструкции (En)YF7⁸⁵⁸REWW.

	Б	СЖ	Ж	ТЖ	Op	TOp	К	TK	Kр
(En)YF7 ⁸⁵⁸ REWW	0	0	2	0	1	5	4	1	0
YF7 ⁸⁵⁸ REWW	0	0	10	2	1	0	0	0	0

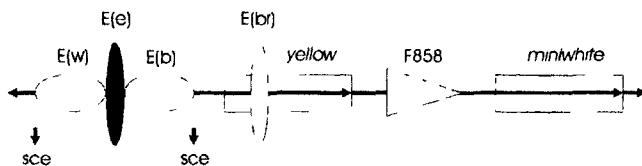


Рис. 9. Схема конструкции (En)YF7⁸⁵⁸REWW

Таким образом, инсуляторные свойства Fab-7⁸⁵⁸ не зависят от его ориентации относительно направления транскрипции генов *yellow* и *white* ни в “дистальном”, ни в “проксимальном” положении и определяются положением в конструкции.

6. Фрагмент Fab-7⁹⁰⁹ способен защитить промотор от негативного действия PRE.

Как было показано ранее при анализе конструкции (En)(F7¹¹⁰³)Y(F7¹¹⁰³)W, Fab-7 инсектиор способен полностью блокировать активность слабого PRE. Следующей задачей исследования было проанализировать степень эффективности действия Fab-7 инсектиора при блокировании сайленсеров. С этой целью был выбран наиболее сильный PRE, который регулирует активность энхансеров *Ubx* гена (Sigrist et al. 1997)

Для изучения способности Fab-7 блокировать активность PRE нами была создана конструкция Eny(PRE)(F7⁹⁰⁹)YEneW (см. рис. 10).

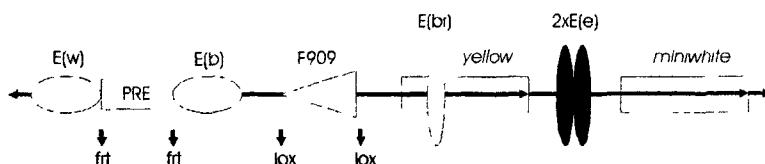


Рис. 10. Схема конструкции Eny(PRE)(F7⁹⁰⁹)YEneW.

Конструкция содержала PRF длиной 1,3 кпн из регуляторной части гена *Ubx* локуса *Bithorax complex*, любезно предоставленный проф. Пирротой. Этот фрагмент был окружен сайтами для FLP-рекомбиназы и вставлен между энхансерами тела и крыльев. Исследуемый фрагмент Fab-7⁹⁰⁹, в свою очередь, был окружен сайтами для Cre-рекомбиназы и встроен в положение -893 относительно начала транскрипции гена *yellow*. Энхансер глаз был удвоен и помещен между генами *white* и *yellow*.

Таким образом, исследуемый фрагмент находился между PRF и промотором гена *yellow*, причем энхансер щетинок был расположен в интроне гена *yellow* ниже точки начала транскрипции и мог активировать ген, если бы действие PRE ограничивалось Fab-7⁹⁰⁹. Было предположено, что, в случае положительного результата, найдется часть трансгенных линий, у которых изначально темные щетинки будут светлеть при вырезании фрагмента Fab-7⁹⁰⁹.

В результате трансформации в эмбриопы линии *y¹w^{111B}* было получено 15 независимых трансгенных линий, содержащих одиночную инсерцию конструкции (En)YF7⁸⁵⁸REVW. Было обнаружено три класса линий. В 9 из 15 линий степень пигментации щетинок была достаточно высокой, в то время как тело и крылья были окрашены слабо (от 1 до 3 по пятибалльной шкале). Делекция фрагмента Fab-7⁹⁰⁹ в 7 из 9 линий приводила к пожелтению щетинок. Другими словами, в этих линиях элемент PRF имел возможность препрессировать промотор гена *yellow* по его воздействию было ограничено последовательностью Fab-7⁹⁰⁹. Степень пигментации тела у производных без инсулятора в ряде случаев (3 линии) также уменьшилась, причем, как правило, это сопровождалось появлением мозаичности в окраске тела. Особенно хорошо этот эффект проявлялся при сравнении гомозигот, что характерно для PRE. В 2 из 9 линий, несмотря на удаление инсулятора, щетинки оставались интенсивно пигментированными. Отсутствие препрессии в этих линиях объясняется тем, что окружающие место инсерции конструкции регуляторные элементы могут подавлять способность PRE препрессировать транскрипцию.

Мухи второго класса линий (2 из 15) имели высокий уровень экспрессии как гена *white* в глазах, так и гена *yellow* в теле, крыльях и щетинках. Причем, степень пигментации не изменялась при удалении различных частей конструкции.

В 4 из 15 линий мухи имели окраску тела, крыльев и щетинок на уровне аллеля *y¹* (полная инактивация гена *yellow*). Это можно объяснить влиянием генетического окружения и кооперативным усилением препрессии при взаимодействии с эндоенными PRF. Причем, мухи этих линий имели высокий уровень экспрессии гена *white* в глазах, но в 3 из 4 случаев окраска глаз была мозаичной. Удаление, как исследуемого фрагмента, так и элемента PRE не приводило к изменениям в уровне экспрессии *yellow*. В дальнейшем, анализируя подобные линии в похожей конструкции Елу(PRE)(F7⁶⁰³)YEneW (см. ниже) мы обнаружили, что при

вырезании инсулятора степень пигментации глаз иногда уменьшаться и становиться мозаичной. Удаление инсулятора и PRE приводило к восстановлению уровня экспрессии гена *white* в глазах. Следовательно, в некоторых случаях, на фоне усиления репрессии за счет генетического окружения, PRE может негативно влиять даже на ген *white*, несмотря на два глазных эпхансера, которые расположены между ними.

Таким образом, было установлено, что фрагмент Fab-7⁹⁰⁹ может защитить промотор от негативного влияния PRE. Было установлено три вида эффектов, которые, в рамках выбранной системы, позволяют сделать такой вывод:

- пожелтение изначально темных щетинок при вырезании фрагмента Fab-7
- уменьшение степени пигментации тела и появление мозаичности при вырезании элемента Fab-7
- появление мозаичности окраски глаз в линиях фенотипа *y¹* при вырезании фрагмента Fab-7.

7. Идентификация минимального элемента в Fab-7 инсуляторе, который блокирует активность PRE.

Используя разработанную систему, был проведен поиск наименьшего фрагмента, способного ограничивать действие PRE. Для решения этой задачи были созданы три конструкции: Eny(PRE)(F7⁸⁸¹)YEneW, Eny(PRE)(F7⁶⁰³)YEneW и Eny(PRE)(F7⁴⁰⁰)YEneW. Все они являются аналогами конструкции Eny(PRE)(F7⁹⁰⁹)YEneW и отличаются друг от друга лишь последовательностью Fab-7 в положении -893 относительно начала транскрипции гена *yellow*.

Мухи трансгенных линий всех трех конструкций, полученные в результате трансформации в эмбрионы линии *y¹w¹¹¹⁸*, принадлежали к трем описанным для линий конструкции Eny(PRE)(F7⁹⁰⁹)YEneW классам. Для конструкции Eny(PRE)(F7⁶⁰³)YEneW у 12 из 26 линий, в результате анализа различных производных, были обнаружены черты, которые свидетельствуют о том, что элемент Fab-7⁶⁰³ может защитить промотор от негативного действия PRE (см. таб. 7). Для конструкций Eny(PRE)(F7⁸⁸¹)YEneW и Eny(PRE)(F7⁴⁰⁰)YEneW таких линий было 3 и 2 соответственно, причем эффекты проявлялись более слабо, чем в первом случае. Следовательно, только Fab-7⁶⁰³ может полноценно защитить промотор (см. рис. 11). Из рисунка видно, что ни последовательности первого сайта гиперчувствительности к обработке ДНК-азой I (HS1, см. гл. 3-4), ни второго не могут сами по себе выполнять эту функцию.

Таблица 7. Анализ трансгенных линий, содержащих конструкции Eny(PRE)(F7⁶⁸¹)YEneW, Eny(PRE)(F7⁶⁰³)YEneW и Eny(PRE)(F7⁴⁰⁰)YEneW. В таблице – количество линий у которых при вырезании соответствующего фрагмента Fab-7 пожелтели щетинки (столбец “щетинки”), изменилась окраска тела (“тело”) или уменьшилась интенсивность пигментации глаз (“глаза”) В столбце “всего” указано общее количество линий.

	щетинки	тело	глаза	всего
Eny(PRE)(F7 ⁶⁰³)YEneW	6	3	3	26
Eny(PRE)(F7 ⁶⁸¹)YEneW	0	2	1	23
Eny(PRE)(F7 ⁴⁰⁰)YEneW	0	1	1	16

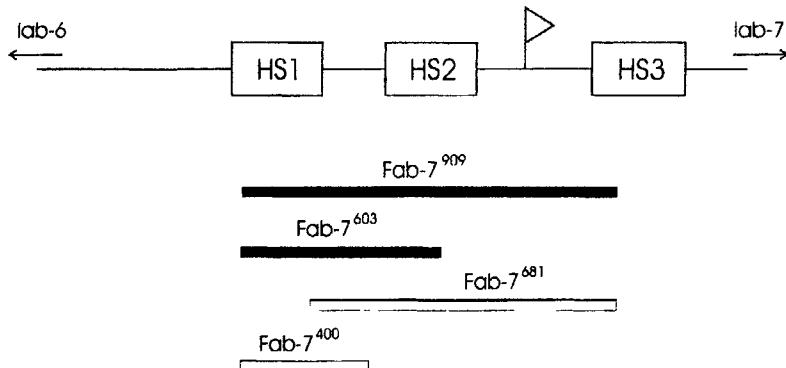


Рис 11 Схема регуляторного элемента Fab-7 и его части, использованные в работе по защите от PRE. Чёрные прямоугольники – фрагменты, которые могут ограничивать распространение Рс-белков, белые прямоугольники – фрагменты, которые таких свойств не показали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

1. Новая система деления заданной последовательности в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*. Перспективы применения для решения различных задач современной биологии.

Для изучения функционального взаимодействия инсулаторов Fab-7 нам потребовалось иметь возможность удалить из одной и той же генетической конструкции не только два этих элемента, но и энхансеры маркерных генов. Ранее существовало две системы, которые позволяли удалять части конструкций из генома трансгенных мух (Cre/loxP- и Flp/ft- рекомбиназные системы). Мы создали новую систему, которая с сопоставимой эффективностью может решить эту проблему. Возможность анализа различных производных конструкций в одном и том же генетическом окружении позволила не только установить факт функционального взаимодействия, но и показать, что элементы сами по себе не могут активировать или репрессировать транскрипцию маркерных генов и, тем самым, существенно повысила надежность полученных результатов. Также это позволило открыть новый эффект – зависимость инсулаторных свойств Fab-7 от места локализации в конструкции.

Применение новой I-SceI- системы, в сочетании с ранее известными рекомбинационными системами, позволило решить проблему эффекта положения конструкции в геноме. Эффект положения является одной из самых больших проблем при исследованиях на трансгенных организмах (в нашем случае – мухах). Одним из альтернативных способов решения этой проблемы может быть создание для конструкции собственного транскрипционного домена. Для этого на 3'- и 5'- концах конструкции размещают сильные инсулаторы, например Su(Hw). Такой подход имеет ряд недостатков. Инсулаторы Su(Hw) взаимодействуют между собой и это может влиять как на процесс интеграции конструкции в геном (не случайные места встраивания в геном), так и нарушать картину дальних взаимодействий между конструкцией и геномом трансгенных мух.

Наши результаты свидетельствуют о том, что и другие редкоцепчие эндонуклеазы также могут быть использованы для создания новых систем для *in-vivo* редактирования, что открывает возможность создания множества подобных систем. Существование нескольких таких систем позволит, например, проводить изучение взаимодействий на больших расстояниях, когда потребуется анализировать несколько конструкций в одной мухе.

Кроме того, I-SceI- система, в отличие от Cre/loxP- и Flp/ft- систем, дает 1-2% неполных вырезаний, что позволяет надеяться использовать ее для получения мутаций (делеций) в рамках заданной последовательности (которая находится между прямыми повторами и сайтами для эндонуклеазы I-SceI). Такая задача может возникнуть, например,

при поиске функционально значимых участков энхансеров Несомненным плюсом такого подхода может служить простота получения большого количества различных делеций в одном и том же случайном генетическом окружении, что невозможно в рамках существующих подходов к решению этой задачи

2. Новые свойства и возможный механизм действия регуляторных элементов гена *Abd-B*.

Хорошо известно, что *Abd-B* ген участвует в образовании парасегментов дрозофилы (Mihaly et al 1998). Его регуляторная область размером примерно 50 т.п.н. находится на 3' конце гена и состоит из отдельных регуляторных доменов. Каждый из них содержит один энхансер, *iab*, и регулирует экспрессию *Abd-B* гена только в одном из парасегментов дрозофилы. Например, энхансер *iab7* определяет экспрессию в парасегменте PS12. При этом регуляторные домены расположены на хромосоме в том же порядке, в котором чередуются парасегменты вдоль оси эмбриона.

Регуляция *Abd-B* гена происходит в два этапа. Во время раннего эмбриогенеза регуляторные белки, отвечающие за первые этапы дифференцировки, активируют в каждом парасегменте определенный энхансер гена *Abd-B*. Например, набор белков, присутствующих в области парасегмента PS11, способен активировать только *iab6* энхансер, но не *iab7* или *iab8*, что и приводит к правильному уровню экспрессии *Abd-B* гена в парасегменте PS 11.

Установленный активный или неактивный статус регуляторных доменов в определенном парасегменте поддерживается и после исчезновения первичных факторов дифференцировки. За это отвечают белки группы *Polyscomb* и их антагонисты из группы *trx* (*tritox*).

Рассмотрим оба случая на примере *iab-7*. Если в регуляторный домен *iab-7* неактивен, то с его элементами PRE связаны Рс-белки, которые не позволяют соответствующему энхансеру *iab* активировать ген *Abd-B*. Однако, элементы PRE способны распространять свое действие на большие дистанции и, если бы не показанная в работе способность фрагментов *Fab-7* ограничивать это распространение, Рс-белки полностью выключили бы экспрессию гена *Abd-B*. Таким образом, эта функция элемента *Fab-7* позволяет поддерживать независимый статус всех регуляторных доменов, содержащих энхансеры гена *Abd-B*. Ранее было показано, что граница *Fab-8*, расположенная на другом конце регуляторного домена энхансера *iab-7*, также имеет способность блокировать репрессию, вызываемую Рс-белками (Bargès et al. 2000). Это позволяет предположить, что такой способностью обладают все границы в регуляторной области гена *Abd-B*.

Если регуляторный домен *iab-7* активен, то его энхансер должен активировать промотор гена *Abd-B*. Но, как было показано ранее, *Fab-7* является инсулитором (Hagstrom et

al 1996) и должен препятствовать взаимодействию энхансера и промотора. Однако, как было показано в этой работе, свойства Fab-7 зависят от места положения в конструкции. Другими словами, существует возможность “выключить” этот инсулатор. Механизм такого “выключения” пока не известен и это один из самых интересных вопросов, на который еще предстоит найти ответ. В качестве кандидата можно предположить, например, транскрипцию последовательностей Fab-7. Как известно, в состав комплекса РНК-полимеразы II входят белки, способные модифицировать гистоны, входящие в состав нуклеосом, и влиять на структуру хроматина транскрибуируемой последовательности. Это, в свою очередь, может приводить к изменению состава белков, связанных с ней и, как следствие, влиять на ее функцию. Во всех конструкциях (см. рис. 7, 8, 9), где Fab-7 не влиял на взаимодействие между энхансером и промотором, он находился в “дистальном” положении, т.е. сразу за кодирующей частью гена *yellow*. Учитывая возможность не полной терминации транскрипции гена *yellow*, можно предположить, что комплекс РНК-полимеразы II мог транскрибировать последовательность дистального Fab-7. И наоборот, во всех конструкциях проксимальный Fab-7 не попадал в зону действия промоторов генов *yellow* и *white*, т.к. находился выше точки начала их транскрипции. Нельзя исключать также возможность влияния на процесс инсулляции либо расстояний от энхансера до инсулатора и от инсулатора до промотора, либо их соотношений.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что два элемента MCP могут взаимодействовать между собой. В этой работе было показано, что такой способностью обладают также два элемента Fab-7. Возможно, такая способность может облегчать взаимодействие между энхансерами *iab* и промотором за счет сокращения расстояний между ними.

Таким образом, элемент Fab-7 является не просто инсулатором, но является сложным регуляторным элементом, который активно участвует в процессе управления экспрессией гена *Abd-B*.

Выводы:

1. Разработан новый метод делекции заданной последовательности в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*, который позволит существенно облегчить исследования сложных регуляторных элементов
2. Впервые показано, что два Fab-7 инсулатора из регуляторной области гена *Abd-B* функционально взаимодействуют между собой.
3. Впервые продемонстрировано, что активность Fab-7 инсулатора сильно зависит от места инсерции между энхансером и промотором

4. Идентифицирован минимальный Fab-7 элемент, который способен блокировать активность сильного сайленсера PRE.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. С.А. Родин, О.В. Кырчанова, П.Г. Георгиев. Изучение структуры регуляторного элемента Fab-7 и его роли в пространственной организации хроматина внутри ядра. Тезисы стеновых сообщений III съезда биофизиков России (Воронеж, 24-29 июня 2004)
2. С.А. Родин, О.В. Кырчанова, П.Г. Георгиев. Белки группы Polycomb влияют на инсуляторную функцию регуляторного элемента Fab-7. Тезисы стеновых сообщений 9-ой международной Пущинской школы- конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 18-22 апреля 2005).
3. С.А. Родин, П.Г. Георгиев. Изучение свойств Fab-7 инсулятора у *Drosophila melanogaster*. ДАН, 2005, т. 404(2), с 263-266.
4. С.А. Родин, П.Г. Георгиев. Новый метод делечии заданной последовательности в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster*. ДАН, 2005, т. 404(3), с 419-421.



Отпечатано в копицентре « СТ ПРИНТ »
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.
www.stprint.ru e-mail: zakaz@stprint.ru тел: 939-33-38
Тираж 100 экз. Подписано в печать 10.10. 2005 г.

05-22104

РНБ Русский фонд

2006-4
19735