

# ИНСУЛЯТОРЫ *DROSOPHILA MELANOGASTER*: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ

© 2002 г. Н. М. ГРУЗДЕВА, А. П. КУЛЛЫЕВ

*Институт биологии гена РАН, Москва*

I. Введение. II Инсуляторы в локусе гена теплового шока. III. Инсулятор в составе мобильного элемента. IV. Инсуляторные свойства промотора *eve*. V. Инсулятор в локусе гена *Notch*. VI. Инсуляторы в локусе гена *Abd-B*. VII. Возможные механизмы действия регуляторных элементов в локусе гена *Abd-B*. VIII. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Компактизация-декомпактизация хромосомальной ДНК и обеспечение высокоэффективной регуляции экспрессии генов эукариот осуществляется за счет активности хроматина. Вследствие сверхкомпактной упаковки ДНК в хроматине эффективная экспрессия генов обеспечивается посредством работы ряда регуляторных элементов, что способствует нейтрализации хроматин-индуцированной репрессии. Исследования последних десятилетий позволили приблизиться к разгадке механизмов функционирования этих регуляторных элементов: энхансеров, сайленсеров и инсуляторов. Энхансеры способны активировать экспрессию гена независимо от расстояния до его промотора [8]. Инсуляторы нарушают взаимодействия между энхансером и промотором, находясь между ними, но при этом не влияют на их активность, т.е. промотор может быть активирован любым неизоллированным энхансером, а энхансер может активировать любой другой неизоллированный промотор [14, 27]. В то же время репрессирующее действие сайленсеров не зависит от пространственного расположения по отношению к энхансеру или промотору.

Существует несколько моделей, предполагающих различные варианты функционирования этих регуляторных элементов. Одна из

---

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: nmg76@mail.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 00-04-48058) и РФФИ-школа (грант № 00-15-99359) и ФЦНТПП «Приоритетные направления генетики»

них — доменная модель организации хроматина. Согласно этой модели, геном эукариот разделен на домены-петли, связанные с ядерным матриксом или с ядерной мембраной, которые являются структурными и функциональными единицами хроматина [25]. Гены, расположенные в пределах одного домена, находятся под общим транскрипционным контролем и регулируются одним набором энхансеров. Предполагается, что границами доменов являются инсуляторы, способные изолировать ген от воздействия окружающего хроматина. Тем не менее, ни представленная выше модель, ни другие модели не могут полностью объяснить все экспериментальные данные о свойствах и функциях регуляторных элементов. Особенно интересную систему представляет локус гена *Abd-B*, механизмы функционирования регуляторных элементов которого до сих пор вызывают массу предположений. Следует отметить, что механизмы действия регуляторных элементов при собственно инсуляции и при функционировании в качестве границ доменов могут существенно различаться и еще до конца не изучены. Однако, полученные к настоящему времени экспериментальные данные позволяют выдвинуть несколько гипотез относительно роли инсуляторов в регуляции экспрессии генов. В настоящее время у *Drosophila melanogaster* обнаружены следующие инсуляторы: *scs* и *scs'* в локусе 87A7, последовательность *fa<sup>swb</sup>* в локусе гена *Notch*, *su(Hw)* в ретротранспозоне *mdg4* и ряд инсуляторов (*MCP*, *Fab-7*, *Fab-8*) в локусе гена *Abd-B*. Свойства инсулятора проявляет также промотор *eve*. Однако, несмотря на множество имеющихся данных о регуляции транскрипции, механизм взаимодействия между регуляторными элементами остается неясным.

Недавние исследования взаимодействий между энхансером и промотором на больших дистанциях позволили объединить регуляторные элементы в единую систему, которая и осуществляет контроль над экспрессией генов. В обзоре излагаются современные представления об инсуляторах как элементах, регулирующих взаимодействия между энхансерами и промоторами. На основе предложенной ранее модели, основывающейся на взаимодействии между инсуляторами, излагается возможный механизм регуляции транскрипции в локусе *Abd-B*.

## II. ИНСУЛЯТОРЫ В ЛОКУСЕ ГЕНА ТЕПЛОВОГО ШОКА

Инсуляторы впервые были обнаружены в локусе гена *hsp70* *Drosophila melanogaster* как гиперчувствительные к нуклеазам участки ДНК на границе локуса [35]. Этот локус содержит две копии гена теплового шока, противоположно ориентированные и разделенные участком ДНК размером 1,6 т.п.н. (рис. 1). Он был выбран в качестве объекта

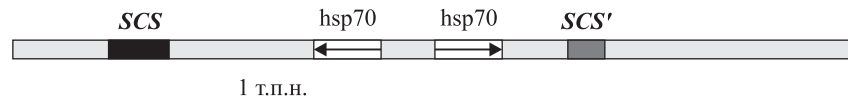


Рис 1. Схема локуса 87A7.

исследований, поскольку гены теплового шока экспрессируются независимо от окружающего хроматина и, следовательно, на границе локуса должны существовать структуры, отделяющие его от других доменов и обеспечивающие независимость экспрессии. Найденные участки были названы *scs* (specialised chromatin structure) и *scs'* [56]. *scs* локализован во фрагменте BglIII-BamHI размером 1,8 т.п.н, расположенном на расстоянии 4,3 т.п.н. от 3' конца проксимальной копии гена *hsp 70*, а *scs'* – в 1,1 т.п.н. фрагменте EcoRI-PstI на расстоянии 1,95 т.п.н. от 3' конца дистальной копии *hsp 70* [17]. Эти структуры состоят из двух гиперчувствительных к нуклеазам участков: 870–1080 п.н. и 1370–1530 п.н. в *scs*, 50–160 п.н. и 370–490 п.н. в *scs'*, разделенных устойчивым к нуклеазам АТ-богатым районом (73,2%

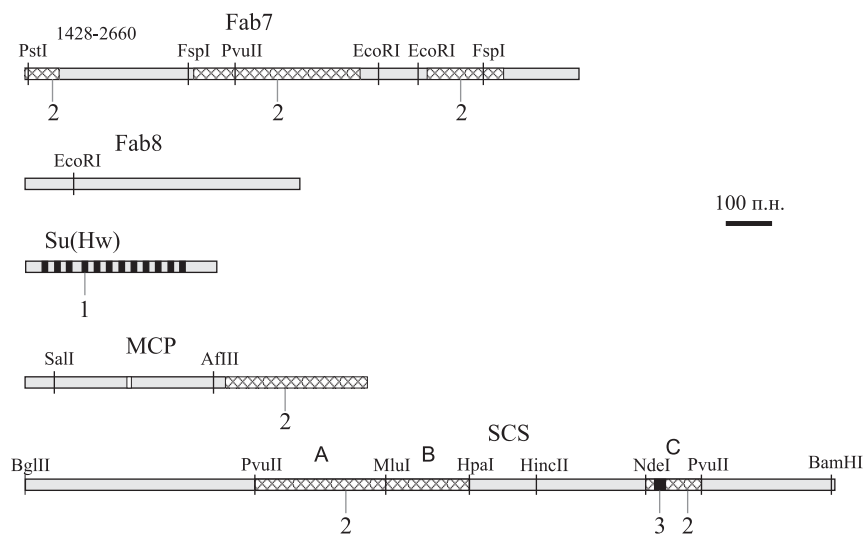


Рис 2. Структура инсуляторов.

1 — сайты связывания белка Su(Hw); 2 — гиперчувствительные к нуклеазам участки; 3 — сайт связывания белка Zw5.

На рисунке изображены фрагменты MCP, Fab-7 и Fab-8, используемые при исследованиях в нашей лаборатории; фрагменты, используемые другими исследователями, могут несколько отличаться по размеру.

АТ-пар в *scs* и 73.4% в *scs'*) (рис. 2). Очевидно, гиперчувствительность к нуклеазам вызвана нарушением нуклеосомной структуры хроматина вследствие связывания белков, ответственных за функцию инсуляторов. В настоящее время идентифицирован белок Zw5, или SBP (*scs*-binding protein), связывающийся с *scs*, и белки BEAF32A и BEAF32B (Boundary Element – Associated Factors), связывающиеся с *scs'* [58]. Zw5 – белок массой около 90 кДа и длиной 591 аминокислотный остаток. Методом футпринтинга было показано, что Zw5 связывается с последовательностью размером 24 п.н. в одном из гиперчувствительных районов *scs* (1402–1426 п.н.). Zw5 связывается *in vitro* с целым элементом *scs* и с его фрагментом С, проявляющим свойства инсулятора, но не с другими частями *scs* [21]. Белки BEAF32 имеют массу 32 кДа и включают в себя три домена: N, M, С (N-концевой, средний и С-концевой). Они гомологичны и различаются только своими N-концевыми доменами (1–80 а/к), которые ответственны за связывание с ДНК. Мультипликация сайтов связывания белка BEAF значительно усиливает инсуляцию. В геноме найдены два других сайта связывания BEAF, которые также могут блокировать взаимодействие между энхансером и промотором [11].

В серии экспериментов, проведенных в лаборатории Шедла, было показано, что *scs* и *scs'* элементы способны изолировать ген от эффекта положения, то есть от воздействия окружающего хроматина, как активирующего, так и репрессирующего. Это верно не только для локуса гена *hsp 70*, но и для гена *white*, ответственного за окраску глаз у дрозофилы [34]. В работе использован метод введения в эмбрионы дрозофилы рекомбинантных конструкций с помощью вектора трансформации, содержащего концы мобильного Р-элемента, необходимого для встраивания рекомбинантной ДНК в геном.

Максиген *white*, длиной 11 т.п.н., содержал все регуляторные последовательности, необходимые для его экспрессии на уровне дикого типа. Но при встраивании в геном конструкций, содержащих максиген *white*, вследствие репрессирующего действия окружающих последовательностей в большинстве трансгенных линий наблюдаемый уровень экспрессии гена *white* был значительно ниже, чем у мух дикого типа (негативный позиционный эффект). Однако, когда ген фланкировался элементами *scs* и *scs'*, наблюдался уровень экспрессии дикого типа. С другой стороны, миниген *white*, длиной приблизительно 5 т.п.н., был лишен большей части регуляторных последовательностей. При встраивании в геном некоторых трансгенных линий он активируется за счет воздействия окружающего хроматина (позитивный эффект позиции). Если же он окружен последовательностями *scs* и *scs'*, то активации не наблюдается. Кроме того, *scs* способен ингиби-

ровать репрессирующее действие PRE-элементов [26, 52]. *scs* и *scs'* способны блокировать взаимодействие энхансера и промотора, находясь между ними. Это показано не только для генов локуса *hsp 70*, но и для других систем. По тем же данным *scs*-подобный участок из кластера гена *90BC* тРНК также проявляет инсуляторную активность.

В то же время *scs* не является репрессором и не блокирует работу промотора, рядом с которым он расположен, если не отделяет его от энхансера. Отдельные фрагменты *scs*, включающие гиперчувствительные участки, также способны блокировать взаимодействия между энхансером и промотором, но с меньшей эффективностью. Путем мультимеризации фрагментов можно добиться проявления инсуляторной активности, сопоставимой с активностью целого *scs*. Так, четыре сайта связывания белка *Zw5*, помещенные между энхансером и промотором гена *white*, приводят к заметному падению уровня его экспрессии. Два сайта связывания белка *Zw5* незначительно влияют на уровень экспрессии гена. Мутации в сайтах связывания или снижение уровня экспрессии гена *zw5* приводят к падению инсуляторной активности [21]. Это свидетельствует о том, что *Zw5* — белок, ответственный за инсуляторную активность *scs*. Но, очевидно, с *scs* связываются и другие белки, так как инсуляторную активность проявляют участки *scs*, не содержащие сайтов связывания белка *Zw5*.

По некоторым данным *scs* и *scs'* способны изолировать промотор от энхансера на плазмиде, вне контекста хромосомы [37]. Однако эти выводы могли быть следствием неверной интерпретации результатов эксперимента. Наблюдаемый эффект мог быть вызван плазмидой, встроившейся в хромосому.

### III. ИНСУЛЯТОР В СОСТАВЕ МОБИЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА

Ретротранспозон *gypsy*, встраиваясь между промотором гена *yellow* и энхансерами, ответственными за его экспрессию в кутикуле тела и крыльях, нарушает взаимодействие между ними [51]. С другой стороны, он не препятствует активации промотора энхансером, ответственным за экспрессию *yellow* в щетинках. Таким образом, *gypsy* проявляет свойства инсулятора, которые связаны с наличием в его составе участка размером 460 п.н., включающего 12 октамерных сайтов связывания белка *Su(Hw)* [36]. Инактивация гена *su(Hw)* приводит к потере инсуляторной активности [23]. Инсуляторная активность пропорциональна количеству сайтов связывания. Делеция нескольких сайтов приводит к значительному снижению активности. Интересно, что две или три копии участков связывания *Su(Hw)*, помещенные между энхансером и промотором, не блокируют их взаимодействия [43].

Белок Su(Hw) имеет массу 110 кДа, экспрессируется в течение всего развития и присутствует в большинстве тканей [31, 45]. Он содержит ДНК-связывающий домен, состоящий из 12 цинковых пальцев, и кислые домены на С- и N-концах [13]. С помощью делеционного анализа было показано, что за инсультацию отвечает домен, расположенный между цинковыми пальцами и С-концевым кислым доменом [23, 36]. К потере инсультаторной активности su(Hw) приводит также мутация mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> [24, 31, 36]. Существует около 20 различных вариантов белка Mod(mdg4), возникающих в результате альтернативного сплайсинга. Мутация mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> приводит к делеции С-концевой области одного из них [24]. Именно эта С-концевая область взаимодействует с доменом белка Su(Hw), ответственным за инсультацию. Таким образом, мутация mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> приводит к нарушению взаимодействия между белками Su(Hw) и Mod(mdg4). В присутствии мутации mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> инсультатор su(Hw) может ингибировать активность некоторых промоторов. Очевидно, для репрессии необходим свободный С-концевой домен белка Su(Hw). Так, совмещение мутаций  $y^2$  и mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> приводит к полному ингибированию гена yellow [24]. Более того, описан случай, когда один инсультатор su(Hw) в присутствии мутации mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> частично ингибировал одновременно два промотора гена yellow, расположенные на гомологичных хромосомах [48]. Это можно объяснить тем, что промоторы гена yellow на гомологичных хромосомах находятся в непосредственной близости, что позволяет одному инсультатору su(Hw) взаимодействовать с обоими промоторами.

Инсультатор su(Hw) способен также определять границы между активным и неактивным хроматином. Транскрипция гена white, ограниченного двумя копиями инсультатора su(Hw), наблюдается даже при инсерции конструкции в прицентромерный гетерохроматин [48]. Мутация mod(mdg4)<sup>1<sup>ul</sup></sup> не влияет на эту его способность. Можно предположить, что для нарушения компактной нуклеосомной структуры гетерохроматина достаточно связывания одного белка Su(Hw). Кроме того, su(Hw) способен блокировать репрессию, контролируемую белками группы Polycomb (Pc-белками). Белки этой группы образуют мультимерные комплексы на регуляторных элементах, которые сокращенно были названы PRE (Polycomb Responsible Elements). Для максимально эффективного блокирования этой репрессии необходима функция обоих белков: Su(Hw) и Mod(mdg4) [58].

#### IV. ИНСУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРОМОТОРА EVE

Промотор *eve* (*even-skipped*) также проявляет инсуляторную активность; в системе, содержащей два гена и энхансер *iab-5*, энхансер не активирует дистальный промотор, если проксимальный ген находится под контролем энхансера *eve*. При замене *eve* на другой промотор наблюдается активация энхансером дистального гена. Инсуляторные свойства *eve* не связаны с участками TATA, Inr, Dre, ответственными за его промоторные функции, но зависят от элемента GAGA, расположенного между TATA и инициатором. Мутации в GAGA вызывают потерю инсуляторной активности, но не влияют на промоторные свойства *eve*. К таким же результатам приводит использование эмбрионов линий, мутантных по Trl (*Trithorax-like*) белку. Предполагается, что инсуляторные свойства *eve* обусловлены взаимодействием белка Trl с последовательностью GAGA [44].

#### V. ИНСУЛЯТОР В ЛОКУСЕ ГЕНА NOTCH

Обнаружено, что одна из мутаций в локусе гена *Notch, facet-strawberry* (*fa<sup>swb</sup>*), приводит к нарушению целостности границы домена, находящейся в междиске 3C6-3C7 и разделяющей диски 3C7 и дуплет 3C5,6. В результате мутации удаляется последовательность ДНК, которая в норме служит защитой от эффекта позиции. Этот фрагмент размером 880 п.н. в трансгенных исследованиях, проведенных на системах генов *white* и *hsp 70 lacZ*, проявляет свойства инсулятора, но не обладает активностью сайленсера. Аналогично *scs* и *scs'*, на системе максигена и минигена *white* показано, что *fa<sup>swb</sup>* последовательность защищает от позитивного и негативного эффекта позиции. Молекулярно-генетический анализ показал наличие трех гиперчувствительных к нуклеазам участков ДНК в составе *fa<sup>swb</sup>* последовательности [57].

#### VI. ИНСУЛЯТОРЫ В ЛОКУСЕ ГЕНА ABD-B

После того, как под воздействием генов *gap* и *pair-rule* групп эмбрион дрозофилы подразделяется на 14 парасегментов, каждый парасегмент приобретает специфические черты в результате активности гомеозисных генов *Antennapedia* и *bithorax* комплексов [54]. *bithorax*-комплекс включает три гомеозисных гена *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abd-A)* и *Abdominal B (Abd-B)*, которые определяют развитие третьего грудного и брюшных сегментов у дрозофилы [38, 39, 50]. Регуляторная область этих генов представляет собой участок ДНК длиной в 300 т.п.н. и подразделяется на серию регуляторных цис-доме-

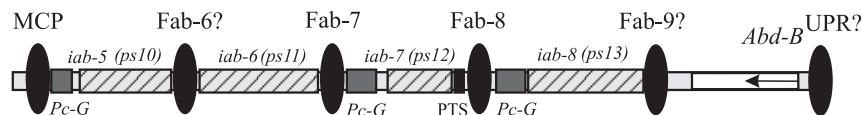


Рис. 3. Схема регуляторной области гена *Abd-B*.

Локус *Abd-B* содержит около 50 т.п.н. 3' цис-регуляторной ДНК. Стрелкой указан сайт начала транскрипции гена *Abd-B*. *iab* энхансеры (*iab-5*, *iab-6*, *iab-7* и *iab-8*) активируют экспрессию гена *Abd-B* в парасегментах 10–13 соответственно. Последние исследования указывают на то, что каждый *iab* энхансер окружен инсуляторами (MCP, Fab-7 и Fab-8). Предполагается существование Fab-6 и Fab-9 инсуляторов, а также инсулятора (UPR) в области промотора *Abd-B* гена.

нов, число которых соответствует числу сегментов, контролируемых bithorax-комплексом [15]. Экспрессия гомеозисного гена *Abdominal B* регулируется 3' цис-регуляторной областью, которая составляет приблизительно 50 т.п.н. геномной ДНК и включает три класса известных цис-элементов: энхансеры, сайленсеры и инсуляторы (рис. 3).

3' регуляторная область ДНК содержит серию инфра-абдоминальных (*iab*) участков, контролирующих экспрессию гена *Abd-B* в 5–8 брюшных сегментах (10–13 парасегментах). Например, *iab-5* цис-регуляторные элементы контролируют экспрессию гена *Abd-B* в парасегменте (ps) 10, тогда как *iab-7* регулирует экспрессию в ps 12 [9, 49]. Каждый *iab* домен содержит по меньшей мере один энхансер, активирующий экспрессию гена *Abd-B* в раннем эмбриогенезе, и сайленсер, поддерживающий паттерн экспрессии в процессе развития. Молекулярно-генетический анализ позволил выявить в локусе гена *Abd-B* граничные элементы MCP, Fab-7 и Fab-8. MCP расположен между цис-доменами *iab-4* и *iab-5*, Fab-7 — между *iab-6* и *iab-7*, а Fab-8 — между *iab-7* и *iab-8* [2, 19, 28, 33, 59].

Мутации, затрагивающие целостность этих граничных элементов, являются доминантными и приводят к трансформации сегментов. Например, у мутантов MCP ps 9 трансформируется в ps 10, что является результатом эктопической экспрессии энхансера *iab-5* в ps 9, где в норме работает энхансер *iab-4*. Аналогично, мутации в элементе Fab-7 приводят к эктопической экспрессии *iab-7* в ps 11, в результате паттерн экспрессии гена *Abd-B* одинаков в ps 11 и ps 12, а мутации в элементе Fab-8 приводят к трансформации ps 12 в ps 13. MCP, Fab-7 и Fab-8 способны блокировать взаимодействия между энхансером и промотором, находясь между ними, то есть являются инсуляторами. Это показано не только на различных генетических системах [29, 40, 59, 61], но и на гене *Abd-B* [2, 19], то есть инсуляторные свойства MCP, Fab-7 и Fab-8 важны для нормального функционирования гомеозисного гена и развития дрозофилы.



Таким образом, инсуляторы окружают каждый энхансер и организуют ДНК регуляторной области гена *Abd-B* в серии изолированных хроматиновых доменов. При этом в непосредственной близости от инсулятора или даже в его составе находятся так называемые PRE-сайты, участвующие в процессе сайленсинга, необходимого для нормального развития [10, 46, 53, 54]. В результате, регуляторные элементы, находящиеся между хроматиновыми доменами, с одной стороны функционируют как границы, а с другой стороны осуществляют функцию сайленсинга, что позволяет поддерживать индивидуальный и независимый паттерн экспрессии гена *Abd-B* [2, 5, 7, 29, 30, 40, 59, 61].

Основываясь на опубликованных экспериментальных данных, а также результатах исследований в нашей лаборатории, регуляторный элемент МСР можно разделить на две функционально различные части [6, 33, 59]. Одна часть функционирует как граница, проявляет свойства инсулятора и изолирует домен *iab-5* от действия проксимальных регуляторных элементов [28, 33, 42]. Вторая часть состоит из участка размером 138 п.н., проявляет функции PRE и включает четыре сайта связывания для белка *pleiohomeotic* (PHO) и два сайта связывания для GAGA-фактора (GAF), кодируемого *Trithorax-like* геном [6]. В лаборатории П. Шедла и в наших исследованиях инсуляторные свойства МСР были продемонстрированы на трансгенных системах:  $w_e$  – *mini-white*,  $y_e$  – *yellow*, *pbx* – *Ubx lacZ*, *NE*, *UPS* – *ftz* [42]. Причем для эффективной инсуляции гена *white*, помимо полноразмерного элемента МСР (800 п.н.), были необходимы дополнительные последовательности, находившиеся проксимальнее или дистальнее от МСР. В то же время, в остальных трансгенных системах было достаточно МСР размером 800 п.н., что позволяет предположить наличие таких вспомогательных последовательностей в самих репортерных генах [42]. Мутационный анализ показал, что для эффективного сайленсинга *in vivo* необходимы и PHO и GAF сайты, в то время как по отдельности они проявляют лишь слабую сайленсерную активность [6]. В трансгенных исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, показано, что ориентация МСР имеет принципиальное значение и влияет на конечный результат действия регуляторного элемента. Так, находясь между энхансером и промотором гена *yellow*, МСР функционировал как инсулятор, при этом, его сайленсерная активность проявлялась либо по одну, либо по другую сторону от граничной части МСР.

PRE может играть роль в трансекции на больших дистанциях. При этом сайленсерная активность зависит от кооперативных взаимодействий между двумя копиями PRE, которые наблюдаются в гомозиготном состоянии при гомологичном спаривании хромосом. За счет PRE-сайтов МСР проявляет регуляторную активность не

только в цис, но и в транс-положениях [42]. Причем в отличие от классической трансвекции, подобные взаимодействия в локусе гена *Abd-B* устойчивы к хромосомным перестройкам, нарушающим гомологичное спаривание, в то время как обычно эффективный сайленсинг отсутствует, когда PRE находятся на разных хромосомах или встроены в разные сайты *in trans* [22, 47]. Таким образом, МСР участвует в транс-регуляторных взаимодействиях, не зависящих от гомологичного спаривания и наблюдающихся не только между МСР в одном и том же сайте *in trans*, но и между МСР, находящимися на большом расстоянии друг от друга на одной хромосоме и даже на разных хромосомах [42]. На эффективность такого рода взаимодействий оказывает влияние введение мутаций по белкам РНО и РсG. РНО является гомологом транскрипционного фактора млекопитающих YY1, специфически связывается с ДНК, но сам не может рекрутировать белки РсG [4, 6, 18]. Недавно обнаружен белок RYBP, который взаимодействует с фактором YY1, а также связывается с белками РсG [20]. *In vitro* RYBP взаимодействует и с РНО, что говорит о возможном наличии белка-посредника, который может способствовать сборке репрессивного комплекса у дрозофилы. Роль такого белка может выполнять GAF, который способен создавать условия для образования «открытого» активного хроматина, вытесняя нуклеосомы из промоторной области и облегчая процесс связывания с ДНК других белков. GAF играет важную роль в блокировании активности *eve* промотора. Молекулы GAF взаимодействуют друг с другом, после чего такой комплекс связывается с GAGA-сайтами, которые могут находиться на расстоянии 1–2 т.п.н. друг от друга, в результате чего происходит выпетливание ДНК. GAGA-сайты необходимы для взаимодействия энхансера и промотора гена *engrailed*. Последние исследования А. Бастурия и др. [6], наряду с предыдущими работами [3, 4, 16, 18, 20, 33, 42, 44], позволили предложить модель, касающуюся возможного механизма сайленсинга с участием МСР. Согласно этой модели, GAF и РНО, последовательно или независимо друг от друга связываясь с ДНК, способствуют созданию активного хроматина и последующей сборке необходимого для сайленсинга белкового комплекса.

Аналогично регуляторному элементу МСР, разделяющему цис-домены *iab-4* и *iab-5*, между доменами *iab-6* и *iab-7*, а также *iab-7* и *iab-8* находятся инсуляторный и сайленсерный регуляторные элементы: Fab-7 и *iab-7* PRE, Fab-8 и *iab-8* PRE соответственно [2, 19, 28, 33, 59]. Инсулятор Fab-7 размером 1,2 т.п.н. блокирует взаимодействия между энхансером и промотором в трансгенных системах: *iab5* – *white*, *iab5* – *lacZ*, *H1* – *lacZ*, *2xPE* – *lacZ*, *NEE* – *white*, *NEE* – *lacZ* [33, 41, 61]. Причем Fab-7 менее эффективен, нежели инсулятор *su(Hw)*, а

две копии Fab-7 сопоставимы по действию с одной копией su(Hw). Эффективность действия Fab-7 не зависит от степени удаленности инсулятора по отношению к энхансеру и промотору [61]. *iab-7* PRE имеет размер ~230 п.н. и содержит два GAGA-сайта и два РНО-сайта [41]. Подобная организация PRE характерна не только для цис-доменов гена *Abd-B*, но и для регуляторных областей генов *Ubx*, *Sex combs reduced* и *engrailed* [4]. Транс-сайленсинг с участием PRE продемонстрирован на трансгенных системах  $w_e$  – *mini-white* и *pbx-Ubx lacZ* [30]. *iab-8* PRE также имеет в своем составе РНО-сайты и проявляет аналогичные свойства [2]. Инсулятор Fab-8 размером 590 п.н. блокирует взаимодействие между энхансером и промотором в трансгенных системах: *iab-5 – white*, *H1 – lacZ*, *NEE – lacZ*,  $w_e$  – *mini-white*, *NE*, *UPS – hsp70 lacZ* [60]. При этом блокирующая активность нейтрализуется, когда между энхансером и промотором помимо Fab-8 находится элемент PTS. Этот элемент размером 625 п.н. способен также нейтрализовать блокирующую активность инсулятора su(Hw) в системах *iab-8 – lacZ* и *AE1 – lacZ*. Активность PTS превращает дальнедействующие инсуляторы Fab-8 и su(Hw) в локальные границы доменов. Отмечено, что PTS демонстрирует селективную активацию промотора энхансером [55]. Возможно, PTS играет роль в стабилизации энхансер-промоторного комплекса, что не дает возможности энхансеру дополнительно активировать другие промоторы, когда один уже выбран. Вероятно также, что PTS конкурирует с инсуляторами за связывание с белками и, таким образом, нейтрализует их блокирующую активность [60].

Как и для других инсуляторов (инсулятор глобинового гена,  $fa^{swb}$ , *scs* и *scs'*), для МСР, Fab-7 и Fab-8 уже на ранних эмбриональных стадиях характерна специфическая структура хроматина. Молекулярно-генетический анализ позволил выявить гиперчувствительные к нуклеазам области ДНК, которые необходимы для функционирования регуляторных элементов. Так, в случае МСР, участок ДНК размером приблизительно в 400 п.н., имеющий специфическую структуру хроматина, включает в себя сайты связывания для белков РНО и GAGA-фактора и необходим для функции МСР как сайленсера. Область МСР, отвечающая за его свойства как инсулятора, содержит несколько минорных гиперчувствительных участков ДНК. Последовательности ДНК, необходимые для функционирования Fab-7 и *iab-7* PRE, содержат три больших гиперчувствительных области и несколько малых, а в составе Fab-8 один гиперчувствительный участок размером 400 п.н. соответствует области, выполняющей функции границы, а второй гиперчувствительный участок размером 150 п.н. приходится на область PRE-сайтов (см. рис. 2) [33, 41].

## VII. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛОКУСЕ ГЕНА *ABD-B*

Присутствие инсуляторов в регуляторной области гена *Abd-B* дает основание предложить варианты механизмов энхансер-промоторных взаимодействий, так как инсуляторы блокируют активацию промотора гена *Abd-B* энхансерами. Недавняя работа И. Хогга с соавторами [32] показала, что инсуляторы регуляторной области гена *Abd-B* имеют существенные различия в механизме действия по сравнению с инсуляторами *su(Hw)* и *scs*. Инсуляторы *su(Hw)* и *scs* обеспечивали автономность цис-доменов, находясь между ними вместо Fab-7. Причем подобная активность инсулятора *su(Hw)* не требовала наличия функционального белка Mod(mdg4). Однако подобная замена не позволяла дистальным энхансерам связываться с промотором гена *Abd-B*, в результате чего нарушался нормальный паттерн экспрессии. В то же время МСР, Fab-7 и Fab-8, обеспечивая автономность цис-доменов, не препятствуют взаимодействию энхансеров и промотора гена *Abd-B*. Таким образом, основываясь на наших и других литературных данных, можно говорить о работе инсуляторов и граничных элементов как о двух процессах, в основе которых лежат принципиально разные механизмы и принимают участие различные белковые комплексы. Недавние исследования показали, что инсуляторы *su(Hw)* могут взаимодействовать между собой, в результате чего их блокирующая активность нейтрализуется [43]. На основании этих и ранее полученных данных в нашей лаборатории была предложена модель, согласно которой при взаимодействии инсуляторов ДНК между ними выпетливается, что изменяет взаимное пространственное расположение энхансеров, инсуляторов и промотора и оказывает влияние на транскрипцию [1, 43]. Данная модель соответствует имеющимся данным об инсуляторах и может стать ключом при выяснении возможного механизма взаимодействий между энхансерами и промотором. Взаимодействия между регуляторными элементами, разделяющими цис-домены в локусе гена *Abd-B*, могут обуславливать эффективное связывание энхансеров с промотором и приводить к нормальной экспрессии гена (рис. 4). Недавно в трансгенных исследованиях нами были получены дополнительные доказательства в пользу этой модели. В системе, содержащей ген *white*, отделенный от своего энхансера двумя элементами МСР и геном *yellow*, наблюдалась значительная активация транскрипции, которая зависела от присутствия энхансера гена *white*. Таким образом, энхансер мог активировать свой промотор, и два инсулятора МСР ему не мешали. В то же время один МСР проявлял инсуляторную активность, что приводило к снижению экспрес-

сии гена *white*. Использование в аналогичной системе комбинаций разных инсуляторов (MCP и su(Hw); Fab-8 и su(Hw)) продемонстрировало менее сильное в одном случае и лишь незначительное во втором усиление экспрессии гена *white*, что позволяет предположить менее эффективное взаимодействие между инсуляторами, не приводящее к полной нейтрализации их блокирующих функций. Однако, при использовании комбинаций инсуляторов Fab8-Fab8 и Fab7-Fab7 взаимодействия не наблюдалось. Примечательно, что в этих инсуляторах не содержалось участков ДНК, проявляющих свойства PRE-сайтов, в то время как регуляторный элемент MCP был представлен и инсуляторной, и репрессорной частями.

Ранее высказывалась гипотеза о возможной роли ВТВ-доменов в образовании взаимодействий между энхансером, промотором и инсуляторами [1, 13, 24]. Действительно, известны белки, имеющие ВТВ-домены и принимающие участие в таких взаимодействиях (Mod(mdg4), GAF). Учитывая особенность расположения инсуляторов и PRE-сайтов в регуляторной области гена *Abd-B*, а также данные о необходимости РНО и GAF для эффективного сайленсинга, можно предположить участие этих белков в составе белкового комплекса в образовании взаимодействий между инсуляторами. При этом, возможно, РНО становится инициатором сборки репрессивного комплекса, а GAF способствует распространению этого комплекса и его эффективному воздействию на промотор. Эту же гипотезу подтверждают наши данные, согласно которым элементы MCP, содержащие РНО и сайты, могут взаимодействовать друг с другом и, в меньшей степени, с инсулятором, но при отсутствии этих последо-

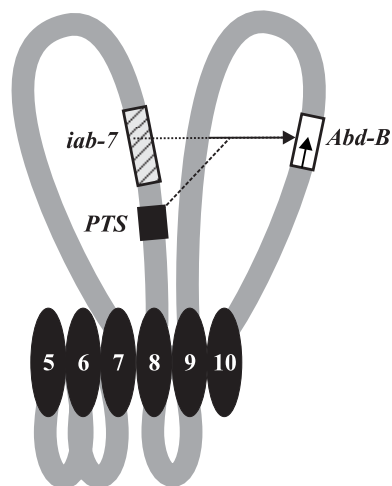


Рис 4. Модель взаимодействия между энхансерами и промотором в *Abd-B*.

Активные PRE элементы и границы доменов/инсуляторы взаимодействуют друг с другом и формируют неактивный хроматин. Границы доменов, окружающие активный *iab-7* энхансер, взаимодействуют с инсулятором, который находится в районе *Abd-B* промотора (UPR). Взаимодействия между границами доменов и PTS облегчают коммуникацию между *iab-7* энхансером и промотором гена *Abd-B*.

вательностей сохраняется лишь блокирующая функция инсулятора МСР, а способность к взаимодействию практически пропадает.

Недавно обнаружен ДНК-связывающий белок DSP1 (*Dorsal Switch Protein*), принадлежащий к классу HMG-белков, который участвует в образовании репрессорных хроматиновых комплексов и процессах, сопровождающих явление эффекта позиции [12]. Белок DSP1 необходим также для регуляции гомеостатических генов. У мутантов по этому белку происходит трансформация сегментов и отсутствует гиперчувствительный к нуклеазам участок элемента МСР. Таким образом, DSP1 может быть одним из белков, участвующим в процессах перестройки хроматина и взаимодействиях между регуляторными элементами в локусе гена *Abd-B*. Возможно, что специфичность взаимодействий в регуляторной области гена *Abd-B* определяется свойствами таких регуляторных элементов как PTS, и существуют другие механизмы взаимодействия и другие их участники. Тем не менее, высказанные гипотезы и модели основываются на ряде экспериментальных данных, а дальнейшие исследования, вероятно, позволят устранить имеющиеся противоречия в вопросе о роли инсуляторов и выяснить механизмы их участия в регуляции экспрессии генов.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена рассмотрению инсуляторов *Drosophila melanogaster*; однако эти регуляторные элементы встречаются и у других организмов – дрожжей, птиц, млекопитающих, человека. Кроме того, инсуляторы одних видов способны работать в организмах других видов. Так, показано, что инсулятор  $\beta$ -глобина курицы функционирует в клетках дрозофилы, а *scs* - в клетках мыши и ооцитах морского ежа [26]. Таким образом, инсуляторы разных организмов должны иметь сходные механизмы действия. Пока не установлено значение блокирования взаимодействия между энхансером и промотором для регуляции экспрессии генов *in vivo*. Однако сайты связывания для некоторых белков, образующих инсуляторы, часто находятся рядом с промотором, что свидетельствует в пользу участия инсуляторов в организации взаимодействия промоторов со своими энхансерами. В настоящее время в нашей и зарубежных лабораториях проводится дальнейшее изучение роли и механизмов действия инсуляторов.

Авторы выражают глубокую признательность член-корреспонденту РАН, профессору П.Г.Георгиеву за критические замечания и обсуждение работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Георгиев П.Г., Муравьева Е.Е., Головин А.К., Грачева Е.М., Бельнская Т.Ю. // Генетика. 2000. Т. 36. № 12. С. 1588–1597.
2. Barges S., Mihaly J., Galloni M., Hagstrom K., Muller M., Shanower G., Schedl P., Gyurkovics H., Karch F. // Development. 2000. Vol. 127. P. 779–790.
3. Bhat K.M., Farkas G., Karch F., Gyurkovics H., Gausz J., Schedl P. // Development. 1996. Vol. 122. P. 1113–1124.
4. Brown J.L., Mucci D., Whiteley M., Dirkesen M.L., Kassis J.A. // Mol. Cell. 1998. Vol. 1. P. 1057–1064.
5. Busturia A., Bienz M. // Embo J. 1993. Vol. 12. P. 1415–1425.
6. Busturia A., Lloyd A., Bejarano F., Zavortink M., Xin H., Sakonjo S. // Development. 2001. Vol. 128. P. 2163–2173.
7. Busturia A., Wrightman C., Sakonjo S. // Development. 1997. Vol. 124. P. 4343–4350.
8. Cai H., Levine M. // Nature. 1995. Vol. 376. P. 533–536.
9. Celniker S.E., Sharma S., Keelan D.J., Lewis E.B. // Embo J. 1990. Vol. 9. P. 4227–4286.
10. Chiang A., O'Connor M. B., Paro R., Simon J., Bender W. // Development. 1995. Vol. 121. P. 1681–1689.
11. Cuvier O., Hart C.M., Laemmli U.K. // Mol. Cell. Biol. 1998. Vol. 18. P. 7478–7486.
12. Decoville M., Giacomello E., Leng M., Lockergenetics D. // Genetics. 2001. Vol. 157. P. 237–244.
13. Dorn R., Krauss V., Reuter G., Saumweber H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 11376–11380.
14. Dorsett D. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1999. Vol. 9. P. 505–514.
15. Duncan I. // Annu. Rev. Genet. 1987. Vol. 21. P. 285–319.
16. Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H., Karch F. // Nature. 1994. Vol. 371. P. 806–808.
17. Farkas G., Udvardy A. // NAR. 1992. Vol. 20. P. 2604.
18. Fritsch C., Brown J., Kassis J., Müller J. // Development. 1999. Vol. 126. P. 3905–3913.
19. Galloni M., Gyurkovics H., Schedl P., Karch F. // Embo J. 1993. Vol. 12. P. 1087–1097.
20. Garcia E., Marcos-Gutierrez C., del Mar Lorente M., Moreno J., Vidal M. // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 3404–3418.
21. Gaszner M., Vazquez J., Schedl P. // Genes Dev. 1999. Vol. 13. P. 2098–2107.
22. Gelbart W. // Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 1982. Vol. 79. P. 2636–2640.
23. Georgiev P., Kozycina M. // Genetics. 1996. Vol. 142. P. 425–436.
24. Gerasimova T. I., Gdula D. A., Gerasimov D. V., Simonova O., Corces V. G. // Cell. 1995. Vol. 82. P. 587–597.
25. Gerasimova T.I., Corces V.G. // Cell. 1998. Vol. 92. P. 511–521.
26. Geyer P. K. // Curr. Opin. Genet. Dev. 1997. Vol. 7. P. 242–248.
27. Geyer P. K., Corces V. G. // Genes Dev. 1992. Vol. 6. P. 1865–1873.
28. Gyurkovics H., Gausz J., Kummer J., Karch F. // Embo J. 1990. Vol. 9. P. 2579–2585.
29. Hagstrom K., Muller M., Schedl P. // Genes Dev. 1996. Vol. 10. P. 3202–3215.
30. Hagstrom K., Muller M., Schedl P. // Genetics. 1997. Vol. 146. P. 1365–1380.
31. Harrison D. A., Gdula D. A., Coyne R. S., Corces V. G. // Genes Dev. 1993. Vol. 7. P. 1966–1978.
32. Hogga I., Mihaly J., Barges S., Karch F. // Mol. Cell. 2001. Vol. 8. P. 1145–1151.
33. Karch F., Galloni M., Sipos L., Gausz J., Gyurkovics H., Schedl P. // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 3138–3146.

34. Kellum R., Schedl P. // *Cell*. 1991. Vol. 64. P. 941–950.
35. Kellum R., Schedl P. // *Mol. Cel. Biol*. 1992. Vol. 12. P. 2424–2431.
36. Kim J., Shen B., Rosen C., Dorsett D. // *Mol. Cel. Biol*. 1996. Vol. 16. P. 3381–3392.
37. Krebs J. E., Dunaway M. // *Mol. Cell*. 1998. Vol. 1. P. 301–308.
38. Lewis E. B. // *Nature*. 1978. Vol. 276. P. 565–570.
39. Martin C.H., Mayeda C.A., Davis C.A., Ericsson C.L., Knafels J.D., Mathog D.R., Celniker S.E., Lewis E.B., Palaz-zolo M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. 1995. Vol. 92. P. 8398–8402.
40. Mihaly J., Hogga I., Gausz J., Gyurkovics H., Karch F. // *Development*. 1997. Vol. 124. P. 1809–1820.
41. Mishra R., Mihaly J., Barges S., Spierer A., Karch F., Hagstrom K., Schweinsberg S., Schedl P. // *Mol. Cel. Biol*. 2001. Feb. P. 1311–1318.
42. Muller M., Hagstrom K., Gyurkovics H., Pirrotta V., Schedl P. // *Genetics*. 1999. Vol. 153. P. 1333–1356.
43. Muravyova E., Golovnin A., Gracheva E., Parshikov A., Belenkaya T., Pirrotta V., Georgiev P. // *Science*. 2001. Vol. 291. P. 495–498.
44. Ohtsuki S., Levine M. // *Genes Dev*. 1998. V.12. P. 3325–3330.
45. Parkhurst S.M., Harrison D.A., Remington M.P., Spana C., Kelley R.L., et al. // *Genes Dev*. 1988. Vol. 2. P. 1205–1215.
46. Paro R., Harte P. J. // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1996. P. 507–528.
47. Pattatucci A.M., Kaufman T.C. // *Genetics*. 1991. Vol. 129. P. 443–461.
48. Roseman R.R., Johnson E.A., Rodesch C. K., Bjerke M., Nagoshi R.N., Geyer P.K. // *Genetics*. 1995. Vol. 141. P. 1061–1074.
49. Sanchez-Herrero E. // *Development*. 1991. Vol. 111. P. 437–449.
50. Sanchez-Herrero E., Vernys I., Marco R., Morata G. // *Nature*. 1985. Vol. 313. P. 108–113.
51. Scott K.S., Geyer P.K. // *EMBOJ*. 1995. Vol. 14. P. 6258–6279.
52. Sigrist C.J.A., Pirrotta V. // *Genetics*. 1997. Vol. 147. P. 209–221.
53. Simon J., Chiang A., Bender W., Shimmell M.J., O'Connor M. // *Dev. Biol*. 1993. Vol. 158. P. 131–144.
54. Simon J., Peifer M., Bender W., O'Connor M. // *Embo J*. 1990. Vol. 9. P. 3945–3956.
55. Sipos L., Mihaly J., Karch F., Schedl P., Gausz J. et al. // *Genetics*. 1998. Vol. 149. P. 1031–1050.
56. Udvardy A., Maine F., Schedl P. // *JMB*. 1985. Vol. 185. P. 341–358.
57. Vazquez J., Schedl P. // *Genetics*. 2000. Vol. 155. P. 1297–1311.
58. Zhao K., Hart C.M., Laemml U.K. // *Cell*. 1995. Vol. 81. P. 879–889.
59. Zhou J., Ashe H., Burks C., Levine M. // *Development*. 1999. Vol. 126. P. 3057–3065.
60. Zhou J., Levine M. // *Cell*. 1999. Vol. 99. P. 567–575.
61. Zhou J., Barolo S., Szymanski P., Levine M. // *Genes Dev*. 1996. Vol. 10. P. 3195–3201.