

Факультет биоинженерии и биоинформатики
Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Курсовая работа студента 3 курса Тихонова Максима Васильевича

«Изучение влияния на энхансер-промоторную
коммуникацию функциональных взаимодействий 1A2
инсулятора *Drosophila melanogaster*».

Научный руководитель: асп.Максименко Оксана Геннадьевна
Лаборатория регуляции генетических процессов
Института Биологии гена РАН

10 апреля 2007г.

Содержание

Введение	3
Литературный обзор	4
Регуляторные последовательности	4
Промоторы	4
Энхансеры	5
Сайленсеры	6
Инсуляторы	6
Инсуляторы <i>Drosophila melanogaster</i> .	7
Инсуляторы генов теплового шока (scs, scs')	7
Su(Hw) содержащие инсуляторы.	7
gypsy	8
1A2	9
Механизмы действия инсуляторов.	9
Экспериментальная часть.	14
Актуальность работы.	14
Цель и задачи	16
Материалы и методы	17
Растворы.	17
Ферменты и соответствующие буферные системы	20
Использованные в работе олигонуклеотиды.	21
Оборудование.	21
Посуда.	22
Фирменные наборы реактивов.	23
Молекулярно - биологические методы.	24
Объекты.	33
Генетические методы.	33
Результаты.	36
Создание модельной трансгенной системы для анализа свойств инсулятора 1A2.	36
Анализ конструкторов.	37
Обсуждение.	38
Роль инсулятора 1A2 в регуляции экспрессии генов.	38
Выводы	42
Приложение 1	43
Приложение 2	54
Приложение 3	55
Приложение 4	56
Список литературы.	57

Введение

Транскрипция - решающая стадия реализации генетической информации. Сейчас очень важной проблемой является понимание молекулярных механизмов, позволяющих генам селективно экспрессироваться. Как мы прекрасно знаем, у высших эукариот только маленький набор генов экспрессируется в данном типе дифференцирующихся клеток, большинство же генов находится в стабильно неактивном состоянии. Активно транскрибирующиеся и стабильно неактивные участки различаются, главным образом, хроматиновыми структурами, чувствительностью к ДНКазе I и степенью ацетилирования гистонов. Таким образом, существование границы между активным и неактивным хроматином является неизбежным результатом генной организации и, по всей видимости, может считаться особенностью эукариотических хромосом. С другой стороны, определенный контроль за экспрессией гена может осуществляться за счет взаимодействий между белками основного транскрипционного комплекса, собранного на промоторе, и специфическими белковыми комплексами на энхансерных элементах. Эти энхансерные элементы работают на больших дистанциях и в независимом от ориентации состоянии, которое определяется степенью гибкости их взаимодействия с промоторными элементами. Так что же может воспрепятствовать неуместной активации энхансером промоторов соседних генов? Ясно то, что должны существовать механизмы, разграничивающие регуляторные последовательности в специфические домены генной экспрессии, и, таким образом, препятствующие образованию случайных связей между энхансерами и промоторами. Идея о том, что геномы представляют собой системы независимо экспрессирующихся профилей появилась из наблюдений в электронный микроскоп за хромосомами, организованными в большие петлевые домены (структуры типа ламповых щеток). Это наблюдение и привело к мысли о том, что такие структурные домены также представляют собой и функциональные домены специфической генной экспрессии. Именно в этот момент и понадобились инсультаторы. Они, в рамках этих позиций, сослужили неплохую службу, ведь если принять аксиому, что хромосомы представляют собой физически разделенные экспрессирующиеся домены, содержащие ген или генный кластер со всеми своими цис-регуляторными элементами, невольно возникает вопрос, а что же находится на границах таких доменов, какая сила может воспрепятствовать нежелательным влияниям близлежащего гетерохроматина и дистальных энхансеров.

Литературный обзор

Избирательную транскрипцию генов обеспечивает то, что многие факторы специфичны для определенных типов клеток либо действуют на отдельных этапах развития. То есть регуляция частоты инициации транскрипции происходит с помощью взаимодействий между специфическими последовательностями, которые находятся вблизи или удалены от сайта инициации транскрипции (цис-элементы), и набором специфических белков, многие из которых связываются со специфическими последовательностями ДНК (транс-действующие факторы транскрипции).

С другой стороны, как было сказано выше, хромосомы эукариот разделены на домены, состоящие из индивидуальных генов и генов, собранных в кластеры. Эти домены представляют собой четко упорядоченные структуры хроматина, организованного так, чтобы обеспечивать функциональную независимость. Кроме этого геномы эукариот содержат чередующиеся участки активного эухроматина и конденсированного гетерохроматина. Распространяясь, участки гетерохроматина могут блокировать активный ген и тем самым регулировать экспрессию.

Ключевую роль в процессе регуляции транскрипции играют транскрипционные факторы - белки, способные специфически связываться с последовательностью ДНК и контролировать активность РНК - полимеразы. Доступность и набор специфических регуляторных элементов ДНК в совокупности с комбинациями активных транскрипционных факторов обеспечивают специфическую транскрипцию гена в данном типе клеток.

Процесс транскрипции запускается после образования сложного белкового комплекса на ДНК. Различные комбинации регуляторных последовательностей узнаются соответствующими сайт-специфическими ДНК-связывающими белками.

Так как данная работа посвящена взаимодействиям регуляторных элементов на больших расстояниях, для начала необходимо рассмотреть типы регуляторных элементов и возможные модели их функционирования.

Регуляторные последовательности.

I. Базальный промотор - участок ДНК от - 40 до + 40 п.н. относительно старта транскрипции. Это особый элемент, определяющий место начала транскрипции. Он представляет собой участок ДНК, содержащий несколько, достаточно консервативных, сайтов, которые узнаются белками основного транскрипционного комплекса. Именно здесь осуществляется сборка активного комплекса ферментов, который осуществляет

транскрипцию близлежащего гена. В состав базального промотора могут входить ТАТА-боксы, TFIIB-узнающий элемент (BRE), инициатор, Downstream promoter element (DPE).

II. Перед базальным промотором от -200 до -50 п.н. располагаются сайты связывания белков-активаторов, играющих важную роль в регуляции экспрессии генов.

III. Существенный вклад в регуляцию транскрипции вносят энхансеры - сайты связывания белков-регуляторов. Энхансеры способны специфически влиять на транскрипцию гена, находясь на расстоянии нескольких тысяч пар нуклеотидов от промотора, в любой ориентации по отношению к нему [1]. К энхансерам относятся разные по нуклеотидному составу последовательности, не имеющие строгого консенсуса. Первый изученный энхансер представляет собой небольшой фрагмент генома вируса SV40, усиливающий транскрипцию вирусных генов, продукт которых необходим на ранних стадиях инфекции [2].

Энхансеры, как и многие другие регуляторные элементы, соединяются с сайт-специфическими ДНК-связывающими белками, которые и определяют их действие. Для белков, взаимодействующих с энхансерами, характерно наличие двух доменов - ДНК-связывающего и трансактивирующего (ответственен за белок-белковые взаимодействия с компонентами комплекса, осуществляющего транскрипцию) [1].

Часть этих регуляторных белков присутствует во всех тканях, тогда как другие обнаруживаются только в определенных типах клеток. С помощью такого механизма может осуществляться регулирование тканеспецифичного уровня экспрессии гена [1].

Один из предполагаемых механизмов действия энхансера основан на результатах изучения бактериальных систем. Известно, что в клетках бактерий началу транскрипции способствует образование петли ДНК. Согласно этой наиболее распространенной модели, и ДНК между энхансером и промотором образует петлю, в результате чего белковый фактор, связанный с энхансером, приобретает способность модулировать экспрессию соответствующего гена, непосредственно взаимодействуя с одним из общих факторов транскрипции или РНК-полимеразой. В подтверждение этой модели, недавно было установлено, что у млекопитающих некоторые связанные с энхансерами белки непосредственно взаимодействуют с белками основного транскрипционного комплекса или вспомогательными белками, собранными на промоторе, при этом ДНК между ними образует петлю [1]. Кроме этого такая точка зрения согласуется с данными о том, что энхансеры обычно наиболее эффективны, когда они находятся вблизи промотора; с увеличением расстояния их активность постепенно падает.

Предложены и другие гипотезы о механизме действия этого регуляторного

элемента [2].

1. Энкхансер может действовать на большом расстоянии, активируя ДНК-топоизомеразу, которая вносит торсионное напряжение в большую петлю ДНК, используя для этого энергию гидролиза АТФ.
2. Энкхансер может влиять на транскрипцию, действуя как сайт посадки мобильных белков, которые связываются с ДНК и затем движутся вдоль ее молекулы. И дойдя до промотора активируют транскрипцию.
3. Энкхансер может связывать белки, которые способствуют присоединению близлежащего гена к определенной области ядра, где локализованы факторы транскрипции.

Вопрос о специфичности механизма взаимодействия энхансера с промотором остается открытым.

IV. Некоторые гены сохраняются в молчащем состоянии благодаря расположенной рядом с ними на некотором расстоянии последовательности ДНК, которая блокирует их экспрессию. К таким последовательностям относятся сайленсеры. Как и у энхансеров, функции сайленсеров определяются сайт-специфическими ДНК-связывающими белками. Механизмы действия сайленсеров частично изучены на дрожжах и дрозофиле [1,3]. Сайленсеры у этих организмов представлены последовательностями ДНК с несколькими сайтами связывания для специальных белков. Основное сходство в работе сайленсеров у этих организмов - изменение статуса гистоновых белков, перевод их в неактивное состояние. Так, у дрожжей происходит деацетелирование, а у дрозофилы метилирование и триметилирование гистонов. Это приводит к распространению конденсированного хроматина на большие расстояния от сайленсера, достаточные, чтобы закрыть ген и, тем самым, заблокировать его экспрессию. Таким образом, можно постулировать, что сайленсинг вызывается обширными доменами конденсированного хроматина за счет кооперативного связывания характерных комплексов специфических белков. В этот процесс вовлечены ферменты, модифицирующие гистоны и создающие подходящие условия для связывания дополнительных репрессивных белков.

V. Как было сказано выше, каждый домен генома может содержать собственные регуляторные элементы. Но, каким образом каждый индивидуальный домен поддерживает свою независимость от регуляторных элементов соседних доменов? «Инсулятор» - имя, присвоенное особым регуляторным элементам, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения. Эта функция инсуляторов включает два различных направления. Во-первых, они блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находится между ними. При этом инсулятор выполняет только

разделительную функцию и не влияет на активность энхансера и промотора [1]. Во-вторых, инсулятор выполняет барьерную функцию для распространяющегося конденсированного хроматина. Показано, что существуют инсуляторы, как выполняющие одну из двух функций, так и обе.

Инсуляторы представляют собой сайты связывания особых, инсуляторных, белков. Тот факт, что инсуляторы могут влиять на энхансер-промоторные взаимодействия может быть рассмотрен в контексте роли этих последовательностей в модулировании функций энхансера. Энхансеры не обладают специфичностью действия, следовательно, у эукариот должны были выработаться механизмы, обеспечивающие невозможность активации генов в ненужном месте или в ненужное время развития энхансерами соседнего гена. Инсуляторы могут играть роль вратарей, корректирующих "энхансерную" беспорядочность.

Ниже мы более подробно остановимся на описанных к настоящему времени инсуляторах.

Инсуляторы *Drosophila melanogaster*.

Инсуляторы генов теплового шока (*scs*, *scs'*)

Инсуляторы *scs* и *scs'* - первые описанные инсуляторы у дрозофилы - находятся в цитогенетическом локусе 87A7 хромосомы 3. Между инсуляторами находится 4 гена (рис 1.) *scs* инсулятор содержит промоторы гена CG31211 и для неидентифицированного гена. В состав *scs'* инсулятора входят промоторы для генов CG3281 и *aurora*.

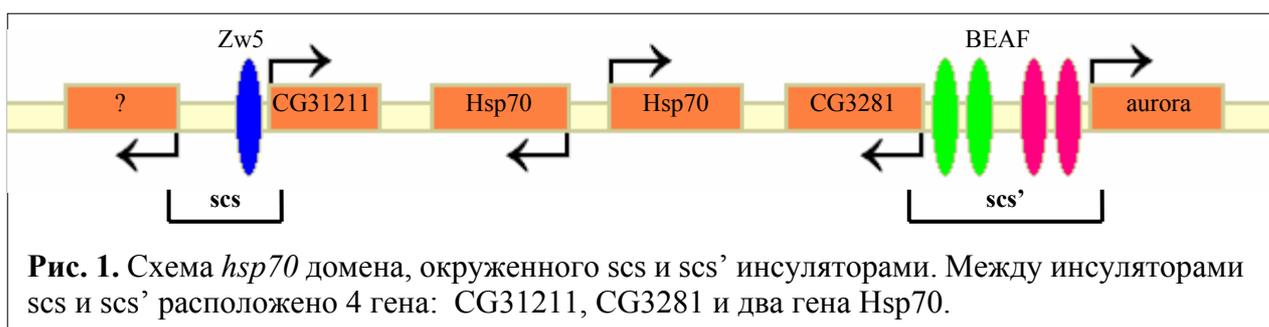


Рис. 1. Схема *hsp70* домена, окруженного *scs* и *scs'* инсуляторами. Между инсуляторами *scs* и *scs'* расположено 4 гена: CG31211, CG3281 и два гена Hsp70.

У *scs* инсулятора можно выделить три участка. Эти три последовательности не являются гомологами, но каждая обладает слабой энхансер-блокирующей функцией. В совокупности они формируют инсуляторную способность *scs* инсулятора. Показано, что эквивалентную *scs* инсулятору силу инсуляции можно получить, увеличив количество копий любой из трех частей [4-7].

Белок *Zw5*, опосредующий функцию инсулятора, содержит 8 цинковых пальцев и связывает сайт длиной 24 п.н., расположенный рядом с промотором гена CG31211 [8].

В *scs'* инсуляторе есть две области, содержащие мотив CGATA. С этими последовательностями связываются две изоформы белка BEAF и транскрипционный фактор DREF. Показано, что последовательность из 4 сайтов связывания для BEAF обладает инсуляторной активностью сравнимой с *scs'*. На основании этого был сделан вывод, что BEAF принимает участие в инсуляции [9].

Было показано, что инсуляторы *scs*, *scs'* сближены в ядре, а белки BEAF и Zw5 взаимодействуют друг с другом. На основании этого выдвинуто предположение о возможности формирования независимого домена при взаимодействии инсуляторов *scs* и *scs'*.

Su(Hw) содержащие инсуляторы.

gypsy.



Рис 2. Схематическое изображение ретротранспозона *gypsy*. Инсулятор представляет собой 12 сайтов связывания для белка Su(Hw) – изображено красными овалами.

Наиболее хорошо изучен инсулятор из ретротранспозона *gypsy*, ответственного за создание ткане-специфичных мутаций некоторых генов (рис.2). Эта последовательность обладает сильными инсуляторными качествами и во всех случаях блокирует действие энхансеров и распространение гетерохроматина. Инсулятор *gypsy* содержит 12 сайтов связывания для белка Suppressor of Hairy-wing {Su(Hw)}. Этот белок содержит 12 цинковых пальцев, некоторые из которых обеспечивают узнавание специального сайта. Мутация или делеция гена, кодирующего Su(Hw), приводит к полной потере инсуляторного эффекта [1,11,12].

Показано, что Su(Hw) связывает белок Mod(mdg4). Этот белок содержит несколько доменов, которые могут участвовать в гомо- или гетеродимеризации. На политенных хромосомах белки Su(Hw) и Mod(mdg4) локализованы вместе, что предполагает ключевую роль белка Mod(mdg4) в формировании инсуляторного комплекса [1,13].

Установлено, что Su(Hw) может взаимодействовать и с другими белками, обнаруженными в Su(Hw)-зависимых инсуляторах: Chip – предположительно участвует в организации дальних взаимодействий между энхансером и промотором; E(y)2 – вероятно, контролирует комплекс, ответственный за формирование границ между активным и не активным хроматином [1]; CP190 – образует комплекс с Su(Hw) и Mod(mdg4) и возможно взаимодействует с ДНК [18]. Помимо этих взаимодействующих с Su(Hw) белков из

Su(Hw)-зависимых инсуляторов выделен еще один фермент: dTopors – убиквитинная лигаза, метящая белки-мишени для их последующей деградации [1].

1A2

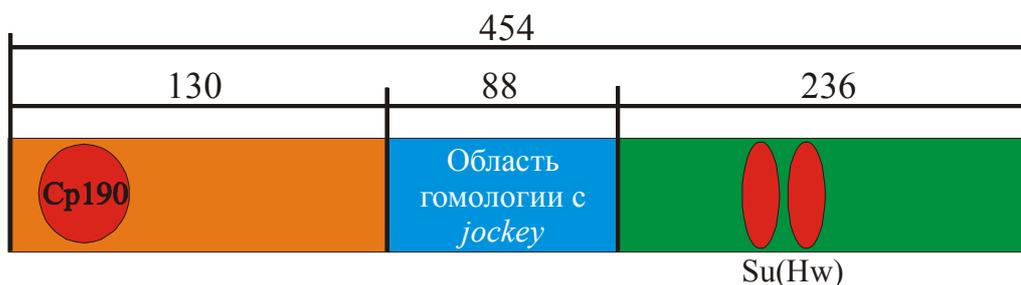


Рис 3. Схематическое изображение инсулятора 1A2. Инсулятор содержит 2 сайта связывания для белка Su(Hw) – изображено красными овалами и один сайт для белка Cp190.

Первый эндогенный Su(Hw)-зависимый инсулятор был обнаружен между геном *yellow* и *achaeta-scute* генным комплексом. Он содержит два сайта связывания для белка Su(Hw). Установлено, что двух сайтов для белка Su(Hw) не достаточно для устойчивого инсуляторного эффекта, поэтому, скорее всего, необходимо дополнительное участие других белков. К тому же для устойчивого действия *1A2* необходимы прилежащие к сайтам связывания белка Su(Hw) последовательности [14,15].

В инсуляторе *1A2* можно выделить три участка (рис.3). Первый включает сайт связывания для белка CP190. Вторая область обладает гомологией с мобильным элементом *jockey*. Третий участок содержит два сайта связывания для белка Su(Hw). Похоже, что первые две области не вносят значительного вклада в инсуляцию. Это доказывает факт сохранения инсуляторной функции у последовательности, у которой первые два участка делетированы [16,17].

1A2 инсулятор обладает основными качествами инсулятора. Показано, что он может останавливать распространяющийся гетерохроматин и эффективно блокировать действие энхансера на промотор, располагаясь между ними. При наличии в этой позиции двух инсуляторов приводит к нейтрализации инсуляторной функции (см. механизмы) [16,17].

Механизмы действия инсуляторов.

Действие инсуляторов опосредуется действием специфичных белков. Для большинства инсуляторов найдены ДНК связывающие белки. Они, как правило, содержат несколько доменов, один из которых осуществляет узнавание и связывание со специальным сайтом. Другие домены либо непосредственно выполняют основную

функцию инсулятора, либо играют роль маркеров, взаимодействуя с одним или несколькими белками и перекладывая инсуляторную функцию на них.

Механизм образования границы для распространяющегося гетерохроматина.

Для некоторых инсуляторов обнаружены белки, которые осуществляют барьерную функцию против распространяющегося гетерохроматина. Например, для Su(Hw)-зависимых инсуляторов характерен белок E(y)2, участвующий в рекрутировании комплекса, участвующего в модификациях гистоновых белков.

Механизмы блокирования действия энхансеров.

В связи с разнообразием полученных данных существует несколько моделей действия инсуляторов при блокировании энхансера. Все они, по всей видимости, существуют у разных инсуляторов. Можно выделить две категории моделей – транскрипционные и структурные.

Транскрипционные модели.

1) Инсулятор может вплотную подходить к энхансеру. При этом образуется контакт, при котором энхансер не может действовать на промотор (рис.4). Недостаток этой модели – блокирование энхансера. Т.е. не возможность активировать другой промотор. Другой возможный вариант - это взаимодействие инсулятора с промотором гена.

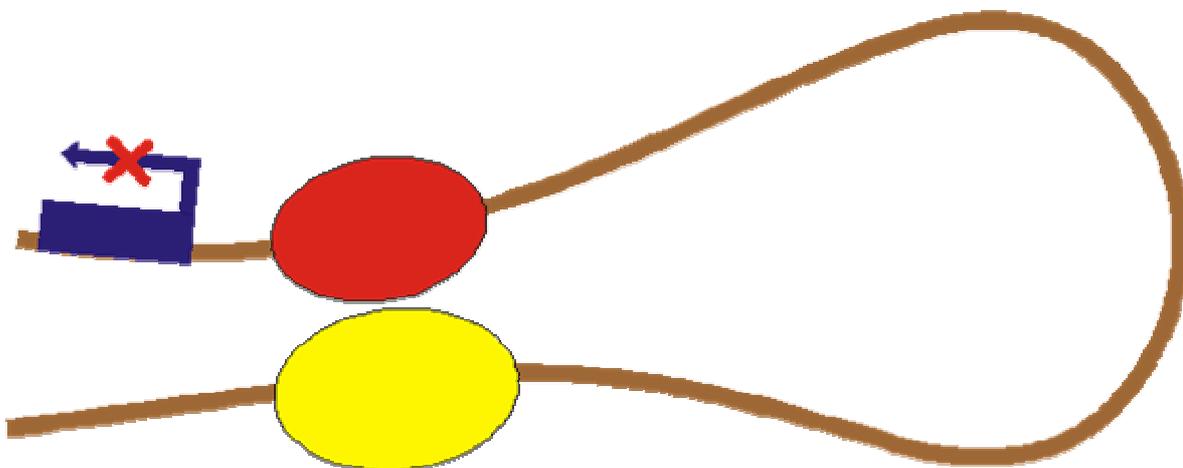


Рис 4. Инсулятор (красный) может вплотную подходить к энхансеру (желтый).

2) Инсулятор блокирует распространяющиеся от энхансера активаторные белки (см. модели действия энхансеров) (рис.5). Такой механизм работает, если энхансер и промотор расположены на одной хромосоме. В пользу этой модели свидетельствует тот факт, что увеличение количества копий энхансеров в одном положении приводит к нейтрализации инсулятора (наблюдается усиление транскрипции) – инсуляторный комплекс не может сдержать количество распространяющихся белков более чем одного

(или нескольких – зависит от силы инсультатора) энхансеров.

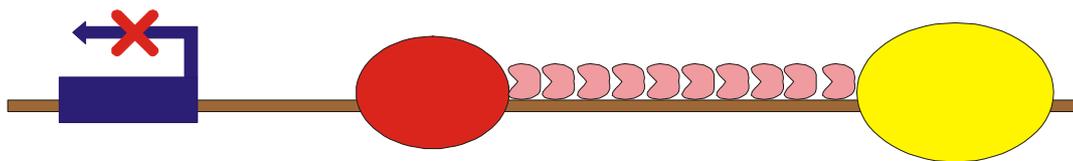


Рис 5. Инсультатор (красный) блокирует распространяющиеся от энхансера (желтый) активаторные белки

Наибольшее распространение получили *структурные модели* инсультации.

1) Инсультатор может взаимодействовать с различными структурами в ядре.

У некоторых инсультаторов обнаружены белки, которые могут образовывать контакты с различными компонентами ядерного матрикса. Показано, например, для локуса *cut*, что присутствие в нем инсультатора *gypsy* приводит к перемещению этого локуса на периферию ядра. Не исключен вариант, что белки инсультаторного комплекса могут образовывать контакт с белками ядерной поры или ламином.

2) Некоторые инсультаторы могут образовывать контакт друг с другом.

При этом происходит сближение двух участков хромосом и образуется особый петлевой домен. Как правило, взаимодействуют инсультаторы одного класса, а контакт разных инсультаторов не происходит [10].

Общей чертой этих механизмов является способность инсультаторного комплекса прикрепляться к какой-либо структуре. В обоих случаях происходит закрепление цепочки ДНК в определенном месте в ядре, формируется четко упорядоченный хроматин. При контакте инсультаторов или при прикреплении к компонентам ядерного матрикса образуется своеобразная обособленная петля.

При изучении энхансер-блокирующей функции обычно создают конструкторы, в которых энхансер расположен относительно недалеко от промотора. Инсультатор помещают между этими последовательностями. При этом наблюдается отсутствие усиления транскрипции гена – инсультаторный эффект. Согласно структурным моделям, в этом случае инсультатор прикрепляется к какой-либо структуре, происходит пространственная изоляция промотора и энхансера.

При введении дополнительного инсультатора такого же класса, что и первый, в систему, эффект зависит от положения введенного инсультатора.

Если инсультатор расположить выше энхансера, то тут поведение энхансера двояко. Достаточно близко расположенные инсультаторы к этой регуляторной последовательности, блокируют функцию энхансера. Напротив, расположив инсультатор далеко вверх от энхансера можно наблюдать активацию промотора. Данное явление объясняется, исходя

из структурных моделей, образованием петлевого домена при сближении двух инсуляторов. Небольшое расстояние между инсуляторами приводит к образованию петли малого радиуса, обладающей малой степенью свободы. Петля же с большим радиусом может более свободно перемещаться; при этом энхансер может достать до промотора и активировать транскрипцию, в отличие от предыдущего случая (рис.6).

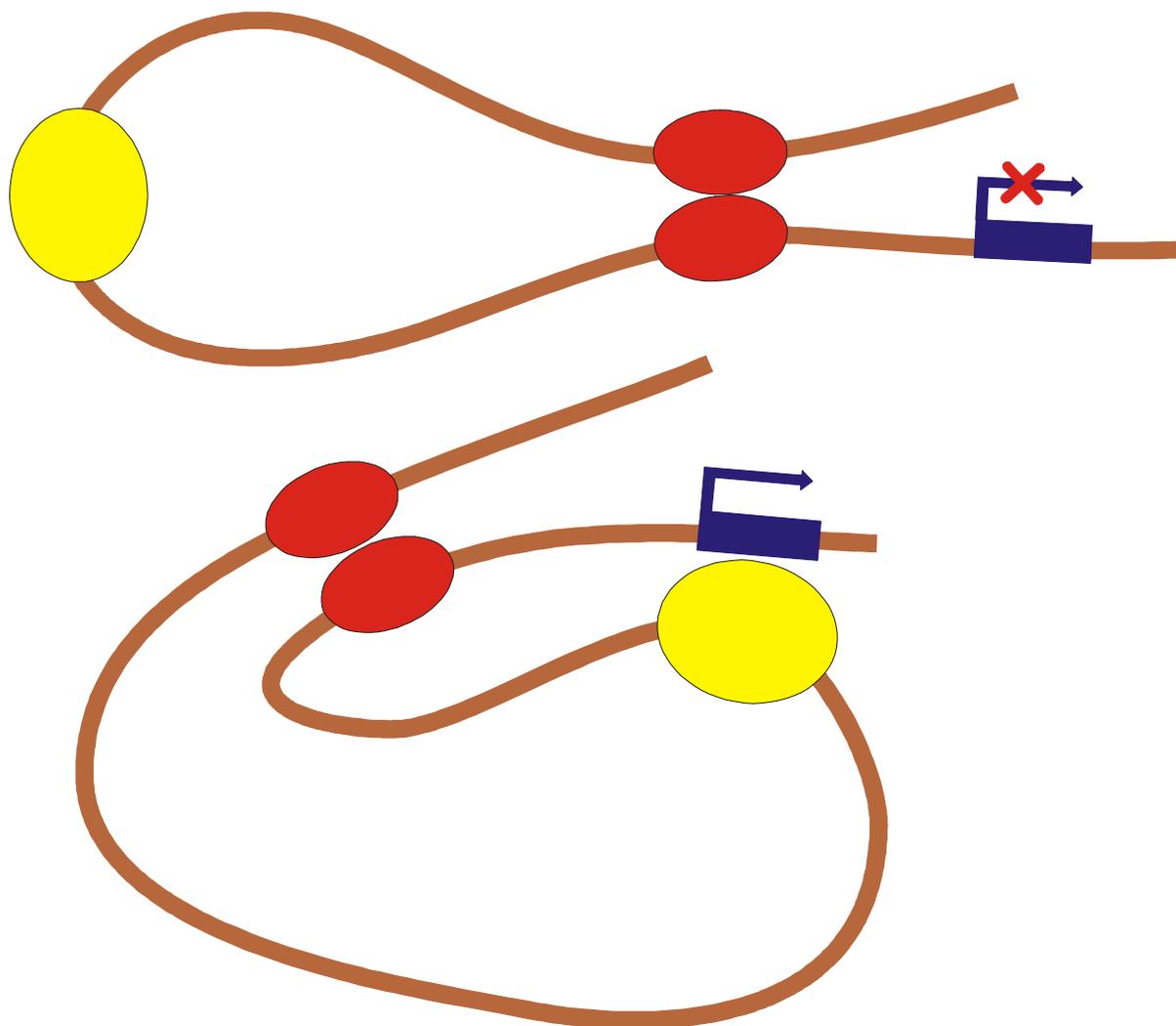


Рис 6. Инсуляторы, расположенные достаточно близко по отношению к энхансеру, блокируют его функцию. Напротив, расположив инсулятор далеко вверх от энхансера можно наблюдать активацию промотора

Когда два инсулятора идут подряд в позиции между энхансером и промотором, инсуляторного эффекта не наблюдается. Это явление получило название “bypass” или нейтрализация инсулятора. Это можно объяснить, предположив, что инсуляторы взаимодействуют друг с другом. При этом происходит образование петли. Энхансер и

промотор контактируют друг с другом, и происходит активация транскрипции (рис.7).

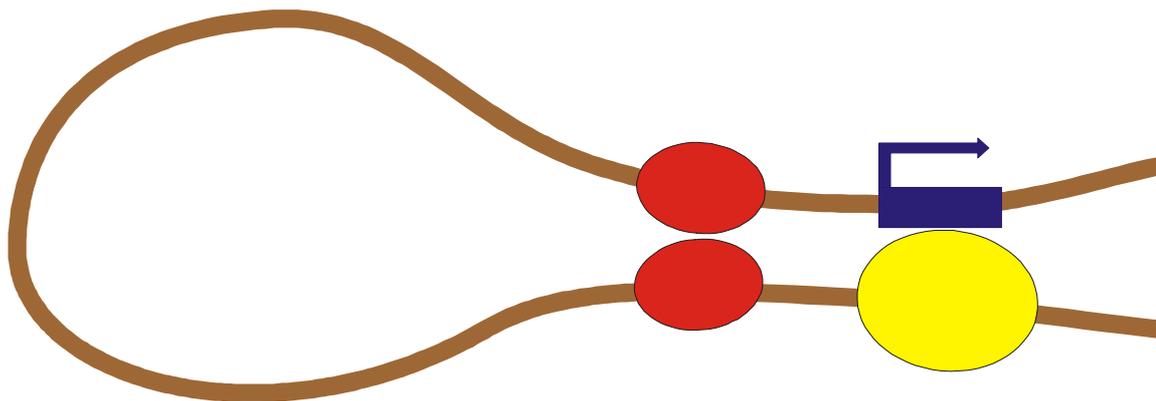


Рис 7. Явление, получившее название “bypass” или нейтрализация инсультатора

Когда второй инсультатор расположить после гена, опять же образуется петлевой домен. В него попадает промотор и кодирующая часть гена. При этом происходит изоляция промотора и кодирующей части от энхансера (рис.8).

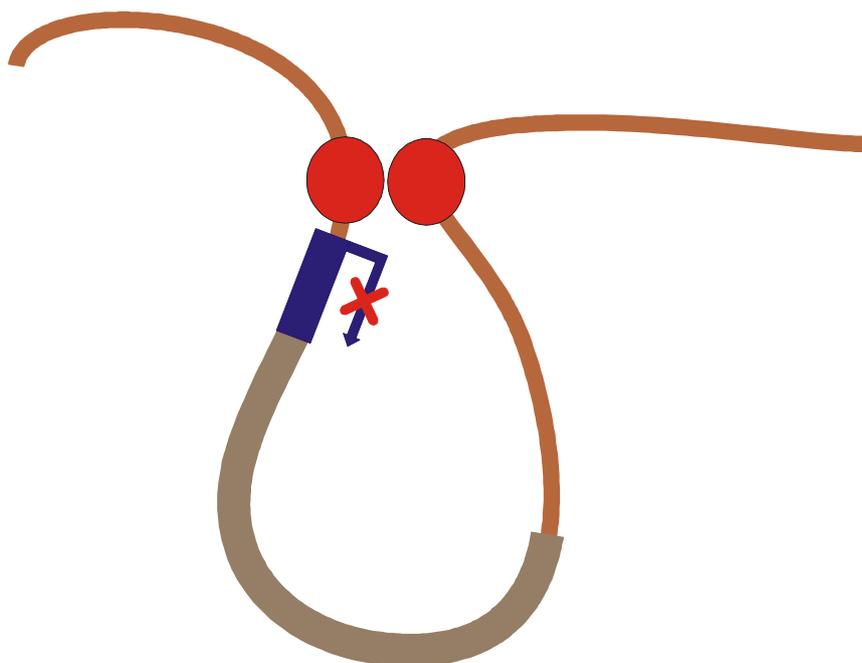


Рис 8. Образование петлевого домена, в котором изолирован ген.

Изначально считалось, что инсультаторы выполняют разделительную функцию между транскрипционными доменами. Действительно, существуют инсультаторы, работа которых, согласуется с таким представлением. Но было обнаружено, что для некоторых инсультаторных ДНК – связывающих белков сайты связывания встречаются в интронах, в области промотора, что противоречит первоначальным представлениям. Показано так же, что некоторые инсультаторные белки являются компонентами энхансеров, сайленсеров и промоторов. В связи с этими данными выдвинуто предположение, что инсультаторы

контролируют установление правильных взаимодействий между энхансерами и промоторами. За счет эффективных и селективных взаимодействий на больших расстояниях инсуляторы могут регулировать пространственную локализацию хромосом. Возможно, что инсуляторы могут принимать участие в перелокализации генов в ядре. [1] В настоящее время в нашей лаборатории ведется экспериментальная работа по проверке предложенных моделей.

Экспериментальная часть.

Актуальность работы.

Наиболее хорошо изученным инсулятором у дрозофилы является Su(Hw) из ретротранспозона *gypsy*. Известно, что сайты связывания Su(Hw) белка очень широко распространены в геноме дрозофилы (более 200). Поэтому невольно напрашивается вывод о том, что эти сайты, возможно, являются компонентами эндогенных инсуляторов. Но это оставалось только гипотезой, и роль Su(Hw) инсулятора в рамках генома дрозофилы так и не была определена. Однако недавно между геном *yellow* и *achaete-scute* генным комплексом был открыт инсулятор, названный 1A2, который содержит два сайта связывания белка Su(Hw). Этот инсулятор интересен с нескольких точек зрения.



Рис. 9. Инсулятор 1A2

- а) расположение инсулятора по отношению к гену *yellow* и *achaete-scute* генному комплексу.
- б) Su(Hw)-связывающие сайты инсулятора 1A2.

Во-первых, инсулятор 1A2 является первым идентифицированным эндогенным Su(Hw) инсулятором. Он может играть важную роль в регуляции экспрессии генов.

Расположение данного инсулятора в геноме между геном *yellow* (отвечает за пигментацию кутикулярных структур), имеющим относительно простую систему регуляции экспрессии, и генным комплексом *achaete-scute* (участвует в формировании периферической нервной системы), для которого характерна очень сложная временная и пространственная регуляция экспрессии, может быть ключевым в установлении паттернов независимой экспрессии этих генов. То есть на примере этого инсулятора мы можем увидеть очередную иллюстрацию реализации идеи о том, что гены, обладающие разными профилями экспрессии в пространстве и времени, скорей всего, отделены друг от друга элементами, обладающими инсуляторной активностью.

Во-вторых, наличие Su(Hw)-связывающих сайтов может свидетельствовать о том, что в рамках генома действительно возможно осуществление взаимодействий между инсуляторами (наличие таких межинсуляторных взаимодействий было показано для Su(Hw)инсулятора из *gypsy*), за счет которых и происходит упорядочивание высокоорганизованных хроматиновых структур. Для того, чтобы доказать такую точку зрения, нужно, прежде всего, показать способность нескольких инсуляторов взаимодействовать друг с другом и продемонстрировать то, что это взаимодействие может влиять на энхансер-промоторные отношения мишеневых генов.

Кроме этого, для эндогенных инсуляторов очень важно показать способность устанавливать границы между областями активного и зарепрессированного хроматина, так как эта активность инсуляторов является очень важной при установлении паттернов экспрессии в данном типе клеток. Это свойство инсулятора 1A2 было проанализировано и показана реальная возможность осуществления такой активности в геноме.

А в данной работе при помощи трансгенных конструкторов будет продемонстрирована роль инсуляторов в установлении энхансер-промоторных взаимодействий. Кроме этого будет показано, что эффекты инсуляции очень сильно зависят от взаимного расположения регуляторных элементов друг относительно друга и от расстояний между ними.

Цель и задачи.

Целью данной работы является изучение регуляторных свойств эндогенного инсулятора дрозофилы 1A2.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Подтвердить энхансер-блокирующую функцию инсулятора 1A2.
2. Показать возможность взаимодействия нескольких копий инсулятора 1A2.
3. Продемонстрировать влияние взаимодействий между инсуляторами на энхансер-промоторную коммуникацию.

Материалы и методы.

Растворы.

1) LB жидкий (основная бактериальная среда)

bacto – tryptone	10 g/l
bacto –yeast extract	5 g/l
NaCl	10g/l
ампициллин	40 mg/l
H ₂ O	до 1 л

Компоненты смешиваются, автоклавируются. После остывания добавляется ампициллин.

2) Tris 1 M, pH 8

Tris base	121,14 g/l
HCl (концентрированная)	≈ 42 ml/l (pH до 8)
H ₂ O	до 1 л

3) SDS 10%

SDS	100 g
H ₂ O	до 1 л

4) EDTA 0,5 M (щелочной)

EDTA	0,5 mol/l
NaOH	≈ 20 g/l
H ₂ O	до 1 л

5) CH₃COOK (AcK) 3 M pH 5,2

AcK	3 mol/l
CH ₃ COOH (концентрированная)	≈ 190 ml/l (pH до 5,2)
H ₂ O	до 1 л

6) CH₃COONH₄ (AcNH₄) 7,5 M

AcNH ₄	7,5 mol/l
H ₂ O	до 1 л

7) CH₃COONH₄ (AcNH₄) 2 M

AcNH ₄ (7,5 M)	266,6 ml/l
H ₂ O	до 1 л

8) NaOH 10 M

NaOH	10 mol/l
H ₂ O	до 1 л

9) S1

Tris 1 M, pH 8	50 ml/l
EDTA 0,5 M	20 ml/l
H ₂ O	до 1 l

10) S2

NaOH 10 M	20 ml/l
SDS 10%	100 ml/l
H ₂ O	до 1 l

11) TAE x50

Tris base	242 g/l
EDTA 0,5 M, pH8	100 ml/l
CH ₃ COOH	>57 ml/l
H ₂ O	до 1 l

12) Агароза 1%

Агароза	10 g/l
TAE	до 1 l
Бромистый этидий	10 µl/l

Агарозу залить TAE. Поставить в микроволновую печь до начала закипания. Остудить до 65 °С. Добавить бромистый этидий (осторожно мутаген!). Хранить в расплавленном виде в термостате на 65 °С.

13) H₂O mQ.

14) H₂O дистиллированная.

15) Твердая среда LB (для чашек Петри).

bacto – tryptone	10 g/l
bacto – yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l
агар	15 g/l
H ₂ O	1 l
ампицилин	1 ml/l

Раствор автоклавируется, после охлаждения добавляется ампицилин. Заливка осуществляется в стерильные, проультрафиолеченные чашки Петри.

16) CH₃COONa (AcNa) 3 M

AcNa	3 moll/l
H ₂ O	до 1 l

17) Раствор А:

трис pH 9	0,1 moll/l
ЭДТА pH 8	0,1 moll/l
H ₂ O	до 1 l

- 18) Лизирующий буфер (на 10 ml):
- | | |
|------------------|----------|
| раствор А | 9 ml |
| DEPC | 100 µl |
| SDS | 1% |
| H ₂ O | до 10 ml |
- 19) 20xSSC:
- | | |
|------------------|--------|
| NaCl | 3 M |
| цитрат натрия | 0,3 M |
| H ₂ O | до 1 l |
- Отфильтровать.
- 20) Гибридизационный буфер (100 ml):
- | | |
|---------------------|-----------|
| 20xSSC | 25 ml |
| 10% SDS | 10 ml |
| БСА | 0,1 g |
| фикол | 0,1 g |
| поливинилпирролидон | 0,1 g |
| | до 100 ml |
| H ₂ O | |
- Добавлять компонента в строгом порядке.
- 21) Сефадекс G-50 (на 100 ml):
- | | |
|------------------|-----------|
| G-50 | 5 g |
| 10% SDS | 1 ml |
| 1 M трис pH8 | 1 ml |
| 0,5 M ЭДТА | 1 ml |
| 5 M NaCl | 2 ml |
| H ₂ O | до 100 ml |
- G-50 перед приготовлением замочить на сутки в деионизованной воде и промыть 2-3 раза.
- 22) 1-й отмывочный буфер
- | | |
|------------------|--------|
| SSC | 2x |
| SDS | 0,1% |
| H ₂ O | до 1 l |
- 23) 2-ой отмывочный буфер
- | | |
|------------------|--------|
| SSC | 1x |
| SDS | 0,1% |
| H ₂ O | до 1 l |
- 24) 3-й отмывочный буфер
- | | |
|------------------|--------|
| SSC | 0,2x |
| SDS | 0,1% |
| H ₂ O | до 1 l |
- 25) Проявитель
- | | |
|-------------------|---------|
| метол | 2,2 g/l |
| гидрохинон | 8,8 g/l |
| сульфит натрия | 72 g/l |
| бикарбонат натрия | 48 g/l |
| бромид калия | 4 g/l |
| H ₂ O | до 1 l |

- 26) Фиксаж
- | | |
|----------------------|---------|
| тиосульфит натрия | 200 g/l |
| сульфит натрия | 20 g/l |
| 30% уксусная кислота | 25 ml/l |
| H ₂ O | до 1 l |
- 27) Буфер для нанесения материала ДНК на гель – электрофорез (6x):
- | | |
|---------------------|-------|
| бромфеноловый синий | 0,25% |
| ксиленцианол | 0,25% |
| ЭДТА (рН 8,0) | 10mM |
| глицерол | 50% |
| H ₂ O | |
- 28) Бромистый этидий:
- | | |
|------------------|----------|
| Бромистый этидий | 10 mg/ml |
| H ₂ O | |
- Порошок бромистого этидия растворить в воде до концентрации 10 мг/мл, для полного растворения поместить в качалку на 37°C при 220 об/мин на 5 часов. Для покраски ДНК оптимально использовать в концентрации 0,5 µг/мл.
- 29) буфер ТБ
- | | |
|-------------------|--------|
| МОPS или PIPES | 10 mM |
| CaCl ₂ | 15 mM |
| KCl | 250 mM |
| MnCl ₂ | 55 mM |
| H ₂ O | |
- 30) буфер SOB
- | | |
|--------------------|--------|
| Бактотриптон | 2% |
| Дрожжевой экстракт | 0,5% |
| NaCl | 0,5% |
| KCl | 2,5 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| H ₂ O | |
- Магниевые соли добавляются после автоклавирования среды, стоковые растворы должны быть стерильными. Стерилизовать фильтрованием.

Ферменты и соответствующие буферные системы.

В работе использовались следующие ферменты (фирма Fermentas):

- 1) рестриктазы *BamHI*, *BglII*, *EagI*, *Eco47III*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *ScaI*, *SmaI*, *SpeI*, *SphI*, *XbaI*, *XhoI*. Для них подбирались оптимальные буферные системы: $Y^+/tango$, O^+ , R^+ , G^+ , $BamHI^+$, Kpn^+ , $SacI^+$.
- 2) ДНК-лигаза бактериофага Т4; фрагмент Кленова; Т4 ДНК – полимеразы; фосфатаза SAP; Taq ДНК – полимеразы; Pfu ДНК – полимеразы.

Использованные в работе олигонуклеотиды.

Праймеры, используемые в работе, их нуклеотидная последовательность и расчетная температура отжига, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Название праймера	Последовательность	Температура отжига, °С
Ant 3	5'- ggagtactactaccaggc -3'	56
Cas 8	5'- cgcaaggagtagccgacatatat -3'	61
Cas 7	5' – ctttgagtagcgaatgcgctcg - 3'	60
Wrev 1	5'- cgctacaaacggtggcg -3'	58
Ant 2	5'- ggcaggtgattttgagc -3'	53
M13-dir	5'- cattttgctgccggtca -3'	53
Kpn-dir	5'- tagatcgtcaaataaagtccta -3'	55

Оборудование.

- 1) Центрифуга для фальконов на 50 ml. Производитель – Beckman Coulter. Модель – Allegra X-15.
- 2) Центрифуга для эппендорфов. Производитель – Eppendorf. Модель – 5415D.
- 3) Центрифуга для эппендорфов с охлаждением. Производитель – Eppendorf. Модель – 5415R.
- 4) Центрифуга-вортекс. Производитель – ELMi, SkyLine. Модель – CM-70M.07 №41010.
- 5) Прибор для получения льда. IceMarker.
- 6) Холодильник на -70 °С. Производитель – REVCO.
- 7) Холодильник на +4°С с морозилкой на -20 °С. Производитель – Stinol.
- 8) Термостат на 35 °С.
- 9) Термостат на 65 °С.
- 10) Термостат с устанавливаемой температурой «Гном». Производитель – ДНК-технология.
- 11) Весы аналитические. Производитель – Scout. Модель – SC6010.
- 12) Печь микроволновая. Производитель – FUNAI. Модель – MO888VT.
- 13) Источник питания для электрофореза. Производитель - ДНК-технология. Модель – Эльф-4
- 14) Камера для электрофореза. Производитель – Amersham Biosciences. Модель - Hoefel HE 99x.

- 15) Автоматическая пипетка на 2-20 μ l. Производитель – Gilson. Модель – G19666M.
- 16) Автоматическая пипетка на 20-200 μ l. Производитель – Gilson. Модель – X65484D.
- 17) Автоматическая пипетка на 200-1000 μ l. Производитель – Costar. Модель – #800827.
- 18) Пипетатор. Производитель – BioMark, Inc.
- 19) Скальпель.
- 20) Пинцет.
- 21) Маркер.
- 22) Амплификатор «Терцик». Производитель – ДНК-технология. Модель – ТП4-ПЦР01.
- 23) Часы с секундомером. Производитель – WENDOX. Модель – Ref. 8930.
- 24) Ламинар. Производитель – BSH. Модель – ВАВСОСК – BSH.
- 25) Газовая горелка. Производитель – INTEGRA BIOSCIENCES. Модель – Fireboy eco.
- 26) Качалка с устанавливаемой температурой. Производитель – New Brunswick Scientific. Модель – innova 4300.
- 27) Vortex. Производитель – Heidolph. Модель – REAX top.
- 28) Дистиллятор. Производитель – Тюмень МедиКо. Модель – Аквадистиллятор электрический АЭ – 10 МО.
- 29) Деионизатор. Производитель – Millipore. Модель – QGARD00R1.
- 30) Водоструйный насос.
- 31) Автоклав. Производитель – Tuttnauer. Модель – 2340 МК.

Посуда.

- 1) Эппендорфы на 2 ml.
- 2) Эппендорфы на 0,5 ml.
- 3) Фальконы на 50 ml.
- 4) Чашки Петри.
- 5) Пестик.
- 6) Наконечники для автоматической пипетки (2-200 μ l)
- 7) Наконечники для автоматической пипетки (200 - 1000 μ l)
- 8) Колбы стеклянные конические на 250 ml.
- 9) Пипетки пластиковые на 10 ml.
- 10) Стеклянные пробирки с пластиковыми колпачками.
- 11) Плашка для электрофореза
- 12) Гребенка для заливки геля
- 13) Банки стеклянные с крышкой для хранения растворов на 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l.
- 14) Банки пластиковые с крышкой для хранения растворов на 2 l.
- 15) Пробирки цилиндрические стеклянные плоскодонные с ватной пробкой.

Фирменные наборы реактивов.

Набор для очистки плазмидной ДНК - illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham GE Healthcare UK Limited).

Молекулярно-биологические методы.

1. Трансформация бактериальных клеток.

1. Компетентные клетки разморозить во льду.
2. Разлить по 100 μ l, добавить плазмиду 5 ng.
3. 30' во льду
4. Поставить на 42°C на 90".
5. 2' во льду
6. Растереть на чашку Петри.
7. Поставить в термостат на 8 часов.
8. Хранение при 4°C в холодильнике.

2. Выделение плазмидной ДНК (из большого объема бактериальной культуры - Maxiprep).

1. Одну колонию сколоть в 50 ml среды LB с ампицилином, налитой в 250 ml стеклянную коническую колбу. Закрывают фольгой. Инкубируют 12 часов (до заметного помутнения раствора) при интенсивном перемешивании на качалке при 37°C.
2. Перелить среду с бактериями в фалькон на 50 ml. Центрифугировать на 4750 оборотах/min 10'. Супернатант слить.
3. Осадок растворить в 4 ml S1 буфера, встряхивая на Vortex. Инкубировать 5' во льду.
4. Добавить 4 ml буфера S2. Инкубировать 5' во льду.
5. Добавить 4 ml AcK 3 M pH 5,2. Плавное перемешать. Инкубировать 5' во льду.
6. Центрифугировать на 4750 оборотах/min 20'. Супернатант перенести в свежий фалькон на 50 ml.
7. Добавить 10 ml изопропанола. Плавное перемешать. Инкубировать 10' во льду.
8. Центрифугировать на 4750 оборотах/min 20'. Супернатант слить.
9. Осадок просушить (\approx 40', при 37°C).
10. К осадку добавить 1 ml AcNH₄ 2 M, pH 7,4. Часть осадка растворить. Инкубировать 5' во льду. Перенести в эпендорф.
11. Центрифугировать на 13200 оборотах/min 5'. Отобрать супернатант в свежий эпендорф.
12. Добавить 700 μ l изопропанола. Инкубировать 10' во льду.
13. Центрифугировать на 13200 оборотах/min 10'. Супернатант слить.
14. Добавить к осадку 100 μ l C₂H₅OH 70%. Центрифугировать на 13200

оборотах/мин 5'. Супернатант слить.

15. Осадок высушить на 60°C. Растворить в 100 µl H₂O mQ.

3. Выделение плазмидной ДНК (из маленького объема бактериальной культуры - Miniprep)

1. Одну колонию (или суспензию одной колонии) перенести в 5 ml среды LB с ампицилином, налитой в стеклянные пробирки с пластиковыми колпачками. Инкубируют 12 часов (до заметного помутнения раствора) при интенсивном перемешивании на качалке при 37°C.

2. Перелить среду с бактериями в эпендорф. Центрифугировать на 13200 оборотах/мин в течение 1'. Супернатант слить. Для лучшего выделения можно долить среды и повторить процедуру.

3. Осадок растворить в 200 µl S1 буфера, встряхивая на Vortex. Инкубировать 5' во льду.

4. Добавить 200 µl буфера S2. Инкубировать 5' во льду.

5. Добавить 400 µl AcNH₄ 7,5 M. Плавно перемешать. Инкубировать 5' во льду.

6. В свежий эпендорф налить 400 µl изопропанола. Поставить охлаждаться на -20°C

7. Центрифугировать (из пункта 5) на 13200 оборотах/мин 10'. Супернатант перелить в охлажденный изопропанол.

8. Инкубировать 10' во льду.

9. Центрифугировать на 13200 оборотах/мин 15'. Супернатант слить.

10. Добавить к осадку 100 µl C₂H₅OH 70%. Центрифугировать на 13200 оборотах/мин 5'. Супернатант слить.

15. Осадок высушить на 60°C. Растворить в 30 µl H₂O mQ

4. Рестрикция аналитическая (в 20 µl)

ДНК	1-2 γ
Буфер x10	2 µl (или 4 µl)
Эндонулеза рестрикции	1 µl (или два фермента по 0,5 µl)
РНКаза	0,3 µl
H ₂ O mQ	до 20 µl

Поставить в термостат на необходимую температуру

5. Рестрикция препаративная. (в 50 µl)

ДНК	1 γ (вектор) или 3 γ (вставка)
Буфер x10	5 μl (или 10 μl)
Эндонулеаза рестрикции	2 μl (или два фермента по 1 μl)
РНКаза (при необходимости)	0,3 μl
H ₂ O mQ	до 50 μl

Поставить в термостат на необходимую температуру

6. Горизонтальный гель-электрофорез аналитический.

В качестве электродного буфера используется ТАЕ.

Гель агарозный 1% с бромистым этидием заливается с узкой гребенкой в плашку.

В качестве маркера используется ДНК фага λ, порезанная рестриктазой PstI.

Электрофорез идет на 90-180 в., 10'-30'

7. Горизонтальный гель-электрофорез препаративный.

В качестве электродного буфера используется ТАЕ.

Гель агарозный 1% заливается со специальной гребенкой (одна узкая лунка для маркера и несколько широких) в плашку.

В качестве маркера используется ДНК фага λ, порезанная рестриктазой PstI.

Электрофорез идет на 90-120 в., 20'-50'

8. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) с колоний E. coli.

1. В 30 μl H₂O mQ скалывается 1 колония E. coli, ресуспендируется.

2. Приготавливается ПЦР-ная смесь (20 μl):

Суспензия клеток E. coli	5 μl
Termo Bufer	2 μl
MgCl ₂	1,6 μl
DNTP	1 μl
праймер №1 (5 pmol/μl)	1 μl
праймер №2 (5 pmol/μl)	1 μl
Taq полимеразы	0,25 μl
H ₂ O mQ	до 20 μl

3. ПЦР проводится по следующей программе:

1. 94 °С – 5'
2. 94 °С – 30"
t° отжига праймера – 30"
72 °С – время элонгации зависит от длины фрагмента
3. 72 °С – 10'
4. 4 °С – хранение.

} 27 циклов

4. Аналитический форец ПЦР продукта.

9. **Переосаждение ДНК.**

1. ДНК развести до 90 µl. Добавить AcNa 3 M – 10 µl.
2. Добавить C₂H₅OH 96% - 300 µl.
3. Поставить на -70 °С в холодильник на 15'.
4. Центрифугировать на 13200 оборотах/min 20' (желательно с охлаждением).
Супернатант слить.
5. Добавить к осадку 100 µl C₂H₅OH 70%. Центрифугировать на 13200 оборотах/min
- 5'. Супернатант слить.
6. Осадок высушить на 60°С. Растворить в нужном количестве H₂O mQ.

10. **Выделение фрагмента из геля.**

1. После препаративного фореца вырезать фрагмент из геля.
2. Добавить Capture Buffer из расчета 10 µl буфера на 10 mg геля.
3. Поставить на 60 °С на 15', до полного расплавления геля.
4. Перенести расплав на колонку. Выдержать 1' при комнатной температуре.
5. Центрифугировать на 13200 оборотах/min 30".
6. Нанести Wash Buffer на колонку. Выдержать 1' при комнатной температуре.
7. Центрифугировать на 13200 оборотах/min 30".
8. Перенести колонку в эпендорф. Нанести H₂O mQ - 50 µl. Выдержать 1' при комнатной температуре.
9. Центрифугировать на 13200 оборотах/min 1'. В результате в эпендорфе будет водный раствор ДНК.

11. **Тупление липких концов фрагментом Кленова (в 50 µl)**

1. Смешать компоненты.

ДНК + H ₂ O mQ	40 µl
Bufer Klenow x10	5 µl
DNTP	3 µl
Фрагмент Klenow	2 µl

2. Поставить смесь на 37 °С, 20'
3. Инактивация фермента при 75 °С, 10'

12. Тупление липких концов T4 полимеразой (в 60 µl)

1. Смешать компоненты.

ДНК + H ₂ O mQ	40 µl
Буфер для T4 полимеразы x5	12 µl
DNTP	4 µl
T4 полимеразы	1,5 µl
H ₂ O mQ	до 60 µl

2. Выдержать при 11 °С, 20'
3. Инактивация фермента при 75 °С, 10'

13. Лигирование

1. Приготовить лигазную смесь (20 µl)

ДНК вставка	900 ng
ДНК вектор	100 ng
Ligase bufer x10	2 µl
Ligase	2 µl
H ₂ O mQ	до 20 µl

2. Лигирование проводить при комнатной температуре (липкое – 1 час, тупое – 2 часа)

14. Приготовление компетентных клеток.

Работа с бактериальными клетками проводилась в стерильных условиях. Для приготовления компетентных клеток использовали штамм *E.coli* DH5 α . Стоковый раствор клеток *E.coli* DH5 α хранился на -70°C в 60 % растворе глицерина.

1. Высеять из музея или из уже имеющихся замороженных компетентных клеток на чашку SOB агара клетки штамма DH5 α . Инкубировать ночь в термостате при 37°C до появления крупных (2-3 мм) колоний.
2. В ночь посеять клетки петлей, взяв с краев 10 колоний в 5 мл среды SOB в 50 мл фалькон.
3. Инкубировать при 18°C около суток на качалке при 180 rpm.
4. В ночь поместить 200 мкл этой суспензии в 250 мл среды SOB, которая налита в колбу объемом 2 л.
5. Инкубировать при 18°C на качалке при 180 rpm до оптической плотности суспензии (OD) 0,6 – 1,0 при $\lambda=600$ нм. Ориентировочно это занимает еще сутки.
6. После достижения необходимой плотности поместить клетки на 10 мин в лед. Затем перенести в охлажденный центрифужный стакан и открутить на центрифуге Jouan 10 мин при 2500 rpm (1200 g). Центрифуга должно быть предварительно охлаждена до $+4^{\circ}\text{C}$.
7. Клетки ресуспендировать в 80 мл охлажденного во льду буфера ТБ и перенести в две 50 мл пластиковые пробирки. Инкубировать 10 мин во льду и открутить на Jouan 10 мин при 2000 rpm (770 g).
8. Клетки ресуспендировать в 20 мл буфера ТБ и, медленно помешивая, добавить ДМСО до 7%. Инкубировать 10 мин, разлить по 100 мкл в охлажденные эппендорфы и заморозить в жидком азоте. Клетки хранить на -70°C .

15. Выделение ДНК из дрозофилы.

1. Из большого числа мух для проведения Саузерн-блот гибридизации.

Для выделения геномной ДНК отбирали по 80-100 мух (0.1-0.12г) каждой анализируемой линии в 1,5 мл пробирки. Мух растирали пестиком в 500 μl лизирующего буфера. Смесь выдерживали 30 мин в термостате Термо48 (Биоком) при 70°C , затем добавляли 78 μl КАС и оставляли на 30 мин в ледяной бане, после чего центрифугировали 10 минут при 12 тыс. об/мин, ДНК экстрагировали смесью фенол-хлороформа (1:1) и хлороформом. ДНК осаждали в течение 10 минут при $+4^{\circ}\text{C}$, добавляя 0.6 V изопропилового спирта, центрифугировали 10 минут (12000 об/мин), после центрифугирования изопропанол тщательно отбирали, осадок промывали 70% этанолом, центрифугировали 5-7 минут, высушивали и растворяли в деионизированной воде из расчета 1 мкл на 1 муху,

взятую на выделение ДНК. Концентрация раствора ДНК составляла приблизительно 1 мкг/мл.

2. Из одной мухи для проверки эффективности вырезания фрагментов по сайтам рекомбинации FRT и LOX при помощи ПЦР-анализа.

Одну муху необходимо поместить в 0,5 мл пробирку и суспендировать в течение 10 секунд наконечником пипетки, содержащим 50 мкл буфера SB (жидкость должна находиться внутри наконечника). Затем остатки буфера вытолкнуть. Смесь инкубировать в течение 30 минут при 37⁰С. затем протеиназа К инактивируется нагреванием до 95⁰С в течение двух минут. Выделенную таким способом ДНК можно в течение месяца хранить при 4⁰С. На одну ПЦР-реакцию в объеме 10 мкл брали 1 мкл ДНК, проводили 30 циклов амплификации.

16. Саузерн-блот гибридизация.

Рестрикция, электрофорез и мобилизация ДНК на мембрану.

Выделенную геномную ДНК гидролизовали эндонуклеазами рестрикции в стандартных условиях. К раствору ДНК (5-10 мкг) добавляли 1/10 объема соответствующего буфера 10-кратной концентрации и около 30-50 единиц рестриктазы. Смесь инкубировали при 37⁰С в течение 5 часов и потом разделяли в горизонтальном 0,8% агарозном геле на однократном трис-ацетатном буфере. В качестве маркеров молекулярного веса фрагментов ДНК использовался GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Mix #SMO331 (Fermentas). Затем гель депуринизировался экспозицией на трансиллюминаторе в течение 3 мин при коротковолновом UV-освещении. Гель помещали на специальный столик в кювете обернутый листом Whatman толщиной 3 миллиметра. В кювету наливали 600 мл 0,4 М NaOH. Мембрану Hybond N⁺, вырезанную по форме геля и с отрезанным для ориентации одним из углов, споласкивали в отдельной кювете 0,4 М NaOH. После этого мембрану помещали на гель, совместив срезанные углы. Два листа Whatman (3 мм), также вырезанные по форме геля, споласкивали в кювете 0,4 М NaOH и помещали поверх мембраны. Вплотную к гелю прикладывали полиэтиленовые спейсеры. Сверху листов Whatman (3 мм) и приложенных спейсеров, для создания осмотического давления, клали стопку фильтровальной бумаги высотой 2-3 см. Для улучшения осмоса поверх фильтровальной бумаги клали вафельные полотенца высотой 6-7 см. Конструкцию накрывали стеклом и сверху прижимали небольшим грузом. В кювету столика доливали оптимальное количество 0,4 М NaOH. Капиллярный перенос проводился в течение 12-18 ч, затем фильтр нейтрализовался в течение 2 мин в 5x SSC. После этого мембрану чуть подсушивали на фильтровальной бумаге и заворачивали в Saran Wrap для предотвращения

полного высыхания мембраны. Качество процесса переноса фрагментов геномной ДНК оценивали по флуоресценцию бромистого этидия в ультрафиолете.

Гибридизация ДНК на мембране с радиоактивными зондами

Приготовление и очистка зонда.

Радиоактивные зонды готовились методом статистической затравки (*Sambrook et al., 1989*), используя меченые α [^{32}P]-дАТФ (ИМБ РАН, Москва). Реакция проводилась в 15 μl . Реакционная смесь для приготовления зонда содержала:

50 ng ДНК;

0,25mM dCTP, dGTP, dTTP;

75 A₂₆₀ ед/мл смеси гексамеров (праймера);

1x буфер;

1x BSA;

50 μCi dATP³²;

2 ед фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I.

ДНК растворяли в рассчитанном количестве деионизованной воды в 1,5 мл пробирках. Для денатурации раствор двухспиральной ДНК кипятили (100 °С) в течение 4 минут. После кипячения пробирки сразу помещали в ледяную баню. После охлаждения последовательно добавляли остальные компоненты реакции. Меченый $^{32}\text{-P}$ дезоксиаденозинтрифосфат (dATP³²) и фрагмент Кленова добавляли в последнюю очередь.

Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. По прошествии 1 часа, чтобы остановить реакцию, в реакционную смесь добавляли 85 μl деионизованной воды и ставили на +4 °С.

Для очистки зонда использовали колонки из набора для очистки плазмидной ДНК фирмы Amersham (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit). В колонку наносили 0,5 мл буфера с шариками Sefadex G-50. Для удаления лишней жидкости колонку центрифугировали 30 секунд (2000 об/мин). Колонки помещали в новые пробирки объемом 1,5 мл и добавляли 100 μl приготовленного зонда. Центрифугировали одну минуту (2000 об/мин). Очищенный таким образом зонд кипятили (100 °С) в течение 5 минут, затем сразу помещали в ледяную баню.

Подготовка мембраны.

Мембрану инкубировали 1 ч при 65⁰С в предварительно прогретом до 65⁰С гибридизационном стакане, содержащим 15 мл предгибризационного буфера. Гибридизационный стакан помещали в гибридайзер (НВ-1D, Techne).

Гибридизация.

Гибридизацию проводили при 65⁰С 10-18 ч в 10 мл гибридизационного буфера с добавлением денатурированного ³²Р-ДНК зонда. Для визуализации длин ДНК одновременно готовили второй зонд: меченую ДНК бактериофага λ.

Отмывка мембраны после гибридизации.

Все отмывочные растворы предварительно нагревали до 65⁰С.

По истечении 8-12 часов гибридизационный раствор удаляли.

Отмывка фильтров выполнялась по следующей схеме: 2 раза по 5 мин. в растворе 2xSSC и 0,1% SDS при температуре 65⁰С, затем 2 раза по 10 мин. в растворе 1xSSC и 0,1% SDS, затем 4 раза по 5 мин в 0,1xSSC с 0,1% SDS. Далее фильтр подсушивали на фильтровальной бумаге, заворачивали в Saran Wrap, экспонировали с рентгеновской пленкой Retina x ray в кассете РЕНЕКС КРП с усиливающим экраном ЭУИ-1. Экспозицию проводили при -70⁰С в течение нескольких суток. Для последующих перегибридизаций фильтр откипячивался в 0,5% SDS.

Объекты.

- 1) *Escherichia coli* штамм DH5 α .
- 2) Линии и мутации *Drosophila melanogaster*, использованные в данной работе.

Обозначения аллелей даны согласно принятой символике (*Lindsley and Zimm, 1992*).

y^1w^{1118} - лабораторная линия, несущая мутацию гена *yellow* с нарушенным инициаторным кодоном и мутацию гена *white*, представляющую собой делецию значительной его части.

$y^1w^{1118}; SM5$ - лабораторная линия с балансерной хромосомой, несущая запиратели кроссинговера по второй хромосоме (доминантные маркеры *In(2RL), CyO*).

$y^1w^{1118}; TM3$ - лабораторная линия с балансерной хромосомой, несущая запиратели кроссинговера по третьей хромосоме (доминантные маркеры *In(3LR)TM3, Sb*).

$y^1w^{1118}; S^2CyO, FLP, ISA/Sco$ – линия источник сайт-специфической рекомбиназы FLP.

$y^1w^{1118}; CyO[w^+Cre]/Sco$ – линия, источник сайт-специфической рекомбиназы CRE.

Генетические методы.

Линии *Drosophila melanogaster* велись при температуре 25⁰С на стандартной дрожжевой среде. Скрещивания проводились в стеклянных пробирках (*Lindsley and Zimm, 1992*).

Трансформация эмбрионов *Drosophila melanogaster* и получение трансгенных линий.

ДНК конструкций и *P*-элемент с дефектными инвертированными повторами, использованный как источник транспозазы, *P25.7wc* (*Kares and Rubin, 1984*), были инъецированы в линию y^1w^{1118} на стадии пребластодермального эмбриона, как описано в (*Rubin and Sprandling, 1982*). Выжившие мухи были скрещены с линией y^1w^{1118} , трансгенные мухи были отобраны на основе фенотипического анализа по степени экспрессии маркерных генов *yellow* и *white*. Для определения хромосомы, на которую произошло встраивание конструкций, трансформанты последовательно скрещивались с линиями $y^1w^{1118}; SM5$ и $y^1w^{1118}; TM3$. Количество копий инсерций конструкции определяли методом Саузерн-блот гибридизации, в качестве зонда был использован фрагмент EcoRV-HindIII из плазмиды CasPeR2. Для исследования брались только линии, содержащие одну копию конструкции на геном.

Фенотипический анализ экспрессии генов *yellow* и *miniwhite* в трансгенных линиях.

Ген *yellow* определяет пигментацию тела, крыльев и производных кутикулы. Ген *miniwhite* определяет пигментацию глаз. Было показано, что уровень экспрессии этих генов прямо коррелирует с интенсивностью пигментации. Таким образом, можно определять степень экспрессии этих генов с помощью простого визуального анализа фенотипа.

Энхансеры, которые регулируют экспрессию гена *yellow* в теле и крыльях, расположены в 5'-области локуса, а энхансеры, регулирующие экспрессию гена в щетинках, находятся в интроне гена. Уровень пигментации кутикулярных структур, отражающий степень экспрессии *yellow* оценивался визуально у 3-5 дневных самок, развившихся при 25°C. Оценку проводили по 5-балльной шкале, где 1 соответствует отсутствию пигмента (*y^l* аллель – полная инактивация гена *yellow*) (желтый цвет), 5 - уровню пигментации дикого типа (черный цвет).

Пигментацию глаз оценивали в соответствии со следующей шкалой: белые (W) (полная инактивация гена), светло-желтые (pY), желтые (Y), темно-желтые (dY), оранжевые (Or), темно-оранжевые (dOr), коричневые (Br), красные (R) (уровень пигментации дикого типа).

Генетические скрещивания.

1. Инъектированных мух скрещивали с линией $y^l w^{1118}$:

$$F0: y^l w^{1118} K \times y^l w^{1118}$$

Из потомства F1 отбирали линии, в которые прошла инсерция конструкции путем фенотипического анализа. Затем отобранные линии еще раз скрещивали с $y^l w^{1118}$. Далее поколение F2 использовали для дальнейшего анализа и проверки копий инсерции конструкции на геном методом Саузерн-блот гибридизации.

2. Индукцию сайт-специфической рекомбинации по FRT сайтам проводили по следующей схеме, независимо от того, на какой хромосоме находится встройка конструкции (K):

$$F0: \text{♂ } y^l w^{1118} K \times \text{♀ } y^l w^{1118}; S^2 CyO, FLP, ISA/Sco; +$$

Эмбрионы второй-третьей личиночных стадий подвергались тепловому шоку при температуре 37°C в течении 2 часов.

$$F1: \text{♂ } +w^{1118}/y^l w^{1118}; S^2 CyO, FLP, ISA/+; K/+ \times \text{♀ } y^l w^{1118}; +; +$$

$$F2: y^l w^{1118}; K^{Afrt}/+$$

Удаление элемента, расположенного между FRT сайтами в конструкции (K^{Afrt}), подтверждали с помощью ПЦР.

3. Индукцию сайт-специфической рекомбинации по LOX сайтам проводили по следующей схеме, независимо от того, на какой хромосоме находится встройка конструкции (K):

$$F0: \text{♂ } y^l w^{1118} K \times \text{♀ } y^l w^{1118}; CyO[w^+ Cre]/Sco; +$$

$$F1: \text{♂ } w^{1118}/y^l w^{1118}; CyO[w^+ Cre]/+; K/+ \times \text{♀ } y^l w^{1118}; +; +$$

$$F2: \text{♂ } y^l w^{1118}; K^{Alox}/+$$

4. Определение хромосомы, содержащей копию конструкцию проводили по следующей схеме:

$$F1: \text{♂ } y^l w^{1118} K \times \text{♀ } y^l w^{1118}; TM3$$

F2: ♂ $w^{1118}/y^l w^{1118}; TM3/+; K/+$ × ♀ $y^l w^{1118}; SM5$

F3: ♂ $y^l w^{1118}; TM3/+; SM5/K$ - 2-я хромосома
или ♂ $y^l w^{1118}; K/+; SM5/+$ - 3-я хромосома

Результаты.

Создание модельной трансгенной системы для анализа свойств инсулятора 1A2.

Конструкт 1.

Ранее в нашей лаборатории был создан конструкт, содержащий 2 маркерных гена – *yellow* и *white* – расположенные последовательно друг за другом. Выше этих генов расположены специфичные энхансеры, ответственные за активацию промоторов.

Исследуемый инсулятор 1A2 длиной в 454 п.н. был вставлен между энхансерами и промоторами в положениях –893, –343, +4964 относительно точки начала транскрипции гена *yellow*. Инсулятор в положении –343 был окружен *frt*-сайтами, узнаваемыми FLP-рекомбиназой. Инсулятор в положении +4964 был окружен *lox*-сайтами, узнаваемыми CRE-рекомбиназой. Схема конструкта представлена на рис.10.



Рис 10. Схема конструкта 1.

Белые квадраты – энхансеры гена *yellow*: W – крыльев, B – тела, A – щетинок;
Серый квадрат – глазной энхансер гена *white*;
Стрелками обозначены сайты узнавания рекомбиназами.

Создание конструкта 2.

Используемые плазмиды (см. Приложение 1).

1. pSK 1A2 lox
2. Castrat
3. EnWEnb-w yellowCasper2
4. Casper700
5. pTz19R
6. Ee 1A2-1A2fx2 W700 pTZ19R

План создания.

1. pSK 1A2 lox /XbaI тип + Castrat/BamHI тип = 1A2 loxx2 Castrat
2. EnWEnb-w yellowCasper2/Eco47III-Sca + 1A2 loxx2 Castrat/SmaI = 1A2 lx2 Yellow Castrat
3. Casper700/BamHI-RI тип + pTz19R/ BamHI -SmaI= W700 pTZ19R
4. W700 pTZ19R/(SphI – KpnI) тип + 1A2 lx2 Yellow Castrat/XbaI тип = White 1A2lx2 Yellow Castrat
5. Ee 1A2-1A2fx2 W700 pTZ19R/(XbaI - EagI) тип + White 1A2lx2 Yellow Castrat/XbaI тип = (1A2)2W1A2Y (рис.11)

Рестрикционный анализ полученных плазмид представлен в Приложении 2.



Рис 11. Схема конструктора 2.

Белые квадраты – энхансеры гена *yellow*: W – крыльев, B – тела, A – щетинок;
Серый квадрат – глазной энхансер гена *white*;
Стрелками обозначены сайты узнавания рекомбиназами.

Анализ конструкторов.

Конструктор 1.

По данной конструкции нами было отобрано 22 линии мух, содержащих конструкцию, они были проверены на копийность при помощи Саузерн-блот гибридизации с зондом RV-III (из плазмиды CasPeR2), содержащим участок гена *white*. Для дальнейшего анализа были взяты только однокопийные линии (17 линий) (см. Приложение 3). Вначале был проведен фенотипический анализ (результаты представлены в Приложении 4). Путем скрещиваний с линиями SM5 и TM3 у линий была определена хромосома, в которую произошла инсерция конструкции. Далее в линиях проводили вырезание по сайтам FRT и LOX. При помощи FLP-рекомбиназы можно было вырезать 1A2 инсулятор, заключенный в FRT-сайты, а с помощью CRE-рекомбиназы вырезали фрагмент 1A2, окруженный сайтами LOX. Эффективность вырезания фрагментов была проверена при помощи ПЦР с одной мухи.

На рис.12 представлены обобщенные результаты, демонстрирующие уровни экспрессии маркерных генов *yellow* и *white* в полученных трансгенных линиях.

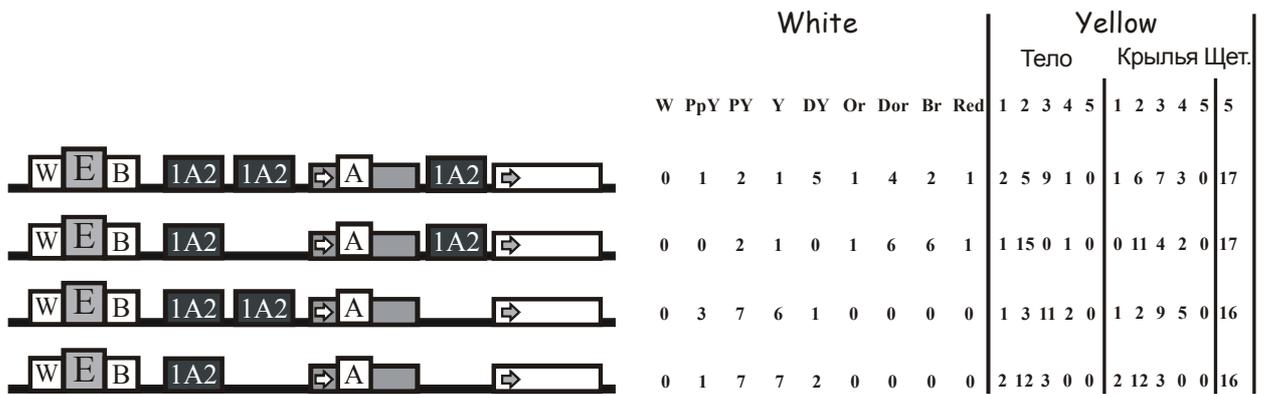


Рис 12. Результаты фенотипического анализа экспрессии генов *yellow* и *white* в конструкции 1.

Шкала оценки описана выше. Цифрами показано число линий с данным фенотипом.

Белые квадраты – энхансеры гена *yellow*: W – крыльев, B – тела, A – щетинок;

Серый квадрат – глазной энхансер гена *white*;

Стрелками обозначены сайты узнавания рекомбиназами.

Конструкт 2.

Получив результаты первого конструкта, было принято решение создать еще один. Новые результаты позволят судить, зависят ли наблюдаемые эффекты взаимодействия инсуляторов от типа промотора. На данном этапе работы создана конструкция 2, которая отличается от конструкции 1 взаимным расположением генов *yellow* и *white*. Ею были трансформированы эмбрионы мух линии y^1w^{1118} . Выжившие мухи y^1w^{1118} поставлены на скрещивание с линией y^1w^{1118} . Ожидается вылупление мух из куколок. Предстоит дальнейший генетический анализ.

Обсуждение.

Роль инсулятора 1A2 в регуляции экспрессии генов.

Участие инсулятора 1A2 в регуляции экспрессии генов было продемонстрировано при анализе конструкции 1.

Рассмотрим поочередно фенотипическое проявление модельных генов в этой конструкции и ее производных. Сначала следует обратить внимание на случай с одним инсулятором. Из данных по 17 линиям, представленным в рис.12, видно, что у подавляющего числа линий наблюдается инсуляция обоих генов. Ген *white* дает среднюю окраску в диапазоне pY-Y. Экспрессия гена *yellow* в среднем на 2 балла. Это свидетельствует о том, что инсулятор 1A2 блокирует действие энхансеров на промоторы этих двух генов. Исходя из фенотипического проявления, можно заключить, что инсулятор 1A2 не является таким сильным, как, например *gypsy*, и в то же время является более

сильным, чем инсуляторы *scs* и *scs'*. Поэтому, его можно отнести к инсуляторам средней силы (рис.13).

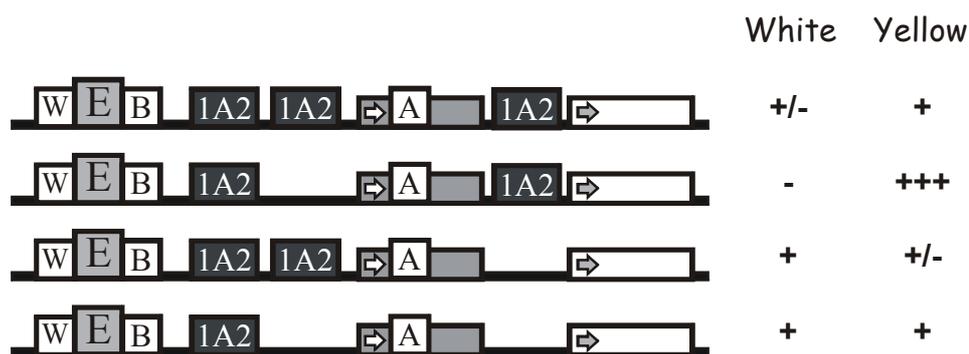


Рис.13 Эффекты инсуляции, полученные в конструкторе 1.

Обозначения степени инсуляции:

- +++ полная.
- ++ сильная.
- + средняя
- +/- слабая
- нет инсуляции

В случае, когда два инсулятора стоят вместе (третий между *yellow* и *white* вырезан) наблюдается более эффективная транскрипция гена *yellow*. Несмотря на то, что перед промотором стоят два инсулятора их эффект не суммируется, а ослабевает (рис.13). Это подтверждает наше предположение о том, что инсуляторы 1A2 могут взаимодействовать, нейтрализуя друг друга. При этом промотор гена *yellow* приближается к энхансеру, что приводит к его более эффективной экспрессии. Что касается гена *white*, то он остается заинсулированным, приблизительно также как и в присутствии только одного 1A2 инсулятора (рис. 14).

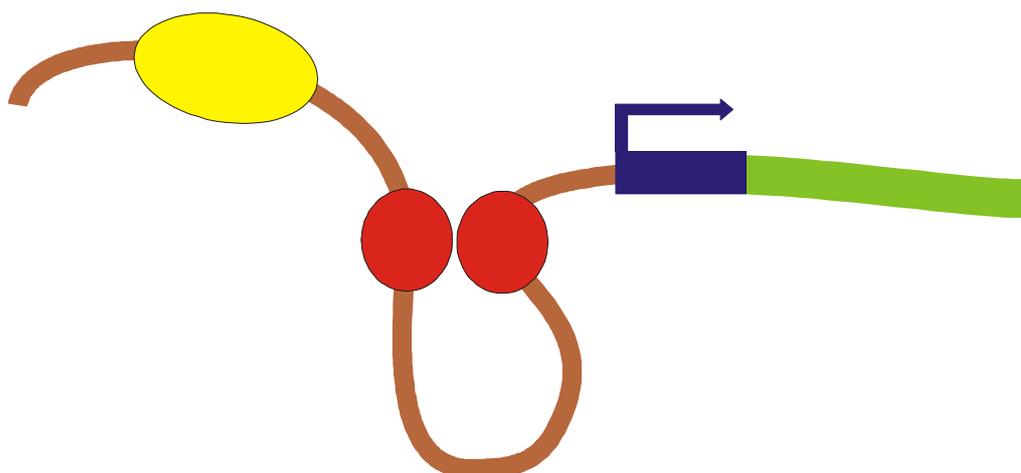


Рис 14. Инсуляторы 1A2 (здесь и далее красные) могут взаимодействовать, нейтрализуя друг друга. Энхансер – желтый. Промотор – синий со стрелкой. Кодировочная часть – зеленая.

В конструкторе с двумя инсуляторами (первый и третий), где второй инсулятор вырезан, наблюдается похожая картина. Только в этом случае сближение происходит между этими инсуляторами, облегчая взаимодействие между промотором гена *white* и соответствующим энхансером (рис.13). Это приводит к более интенсивной транскрипции с этого гена. Ген *yellow* в этом случае оказывается внутри петлевого домена, защищенного от влияния энхансера. Это и приводит к ослаблению его экспрессии (рис.15).

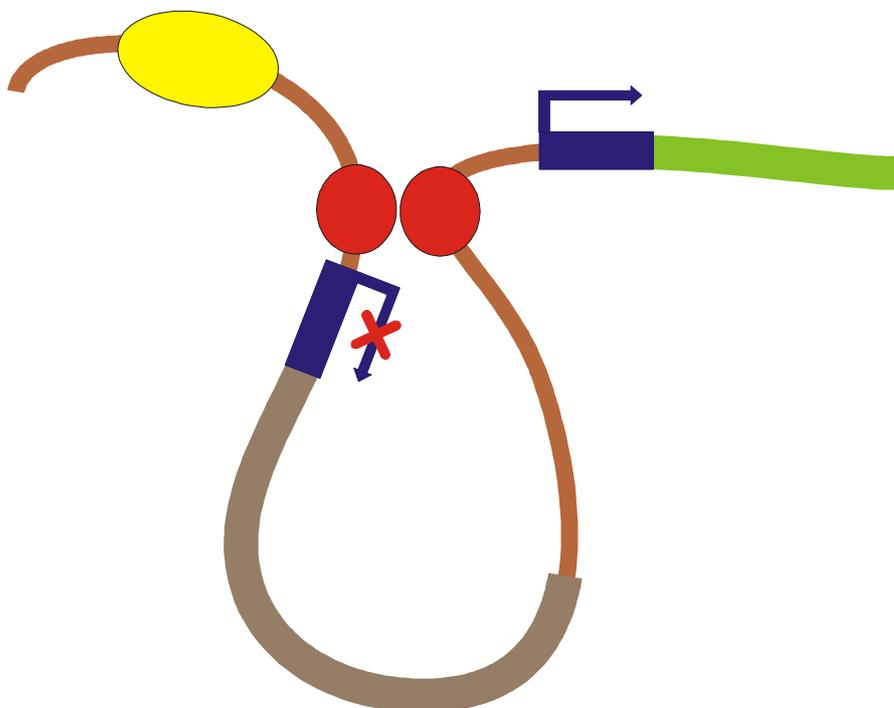


Рис 15. Инсуляторы 1A2 могут взаимодействовать. Ген *yellow* оказывается внутри петлевого домена, защищенного от влияния энхансера.

Когда все три инсулятора присутствуют в конструкции, по всей видимости, образуются два петлевых домена (рис.13). При этом происходит инсуляция среднего уровня для гена *yellow* в связи с тем, что он находится в большом петлевом домене. Ген *white* в данном случае заинсулирован слабо, но уровень экспрессии гена все-таки ниже по сравнению с предыдущим случаем. Это можно объяснить стерическими затруднениями, возникающими при появлении дополнительного петлевого домена (рис.16).

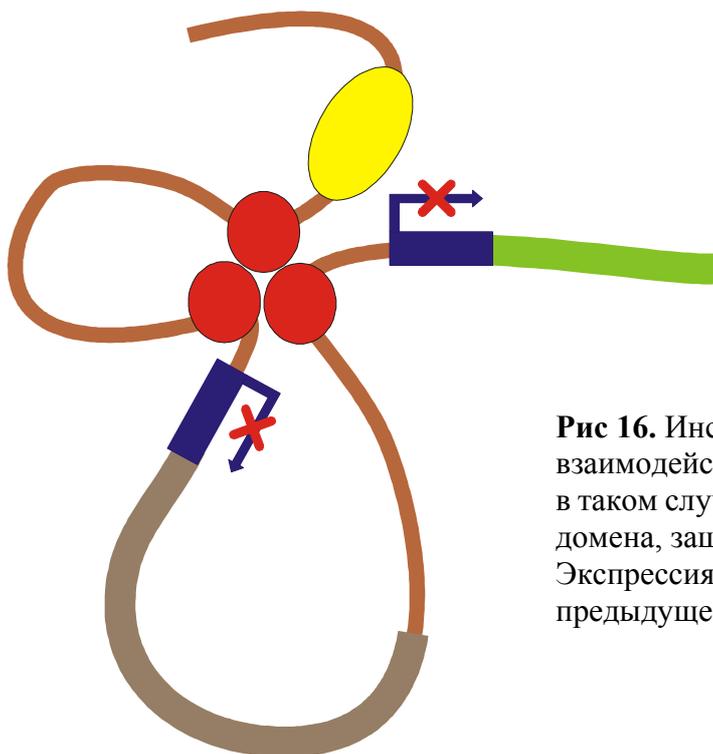


Рис 16. Инсуляторы 1A2 могут взаимодействовать друг с другом. Ген *yellow* в таком случае оказывается внутри петлевого домена, защищенного от влияния энхансера. Экспрессия гена *white* ниже, чем в предыдущем случае (рис.14).

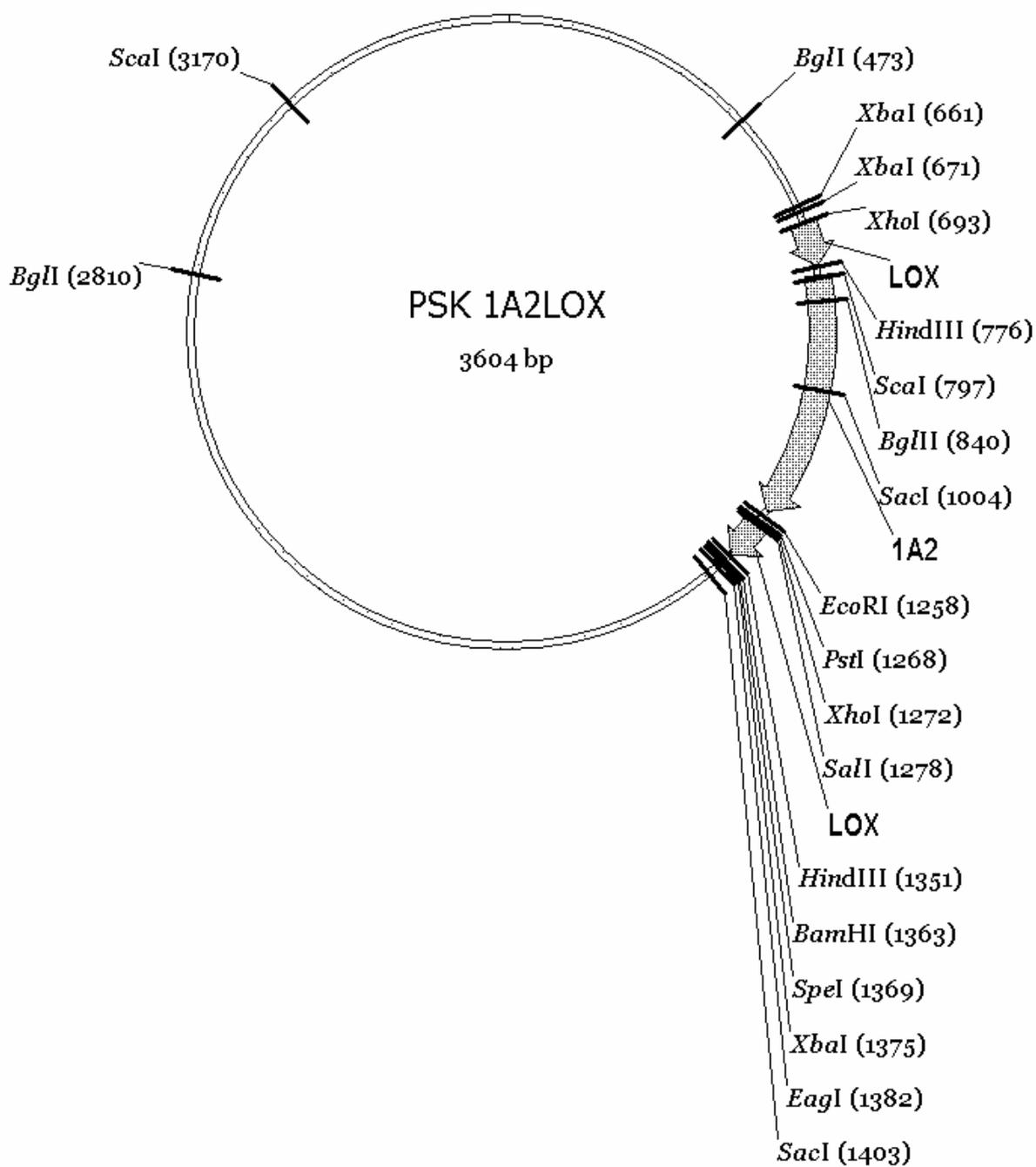
Из представленных данных можно сделать вывод, что два инсулятора способны взаимодействовать друг с другом. При этом попадающий в петлевой домен ген оказывается заинсулированным, а вышележащий ген, наоборот, приближается к регуляторным элементам и экспрессируется более сильно.

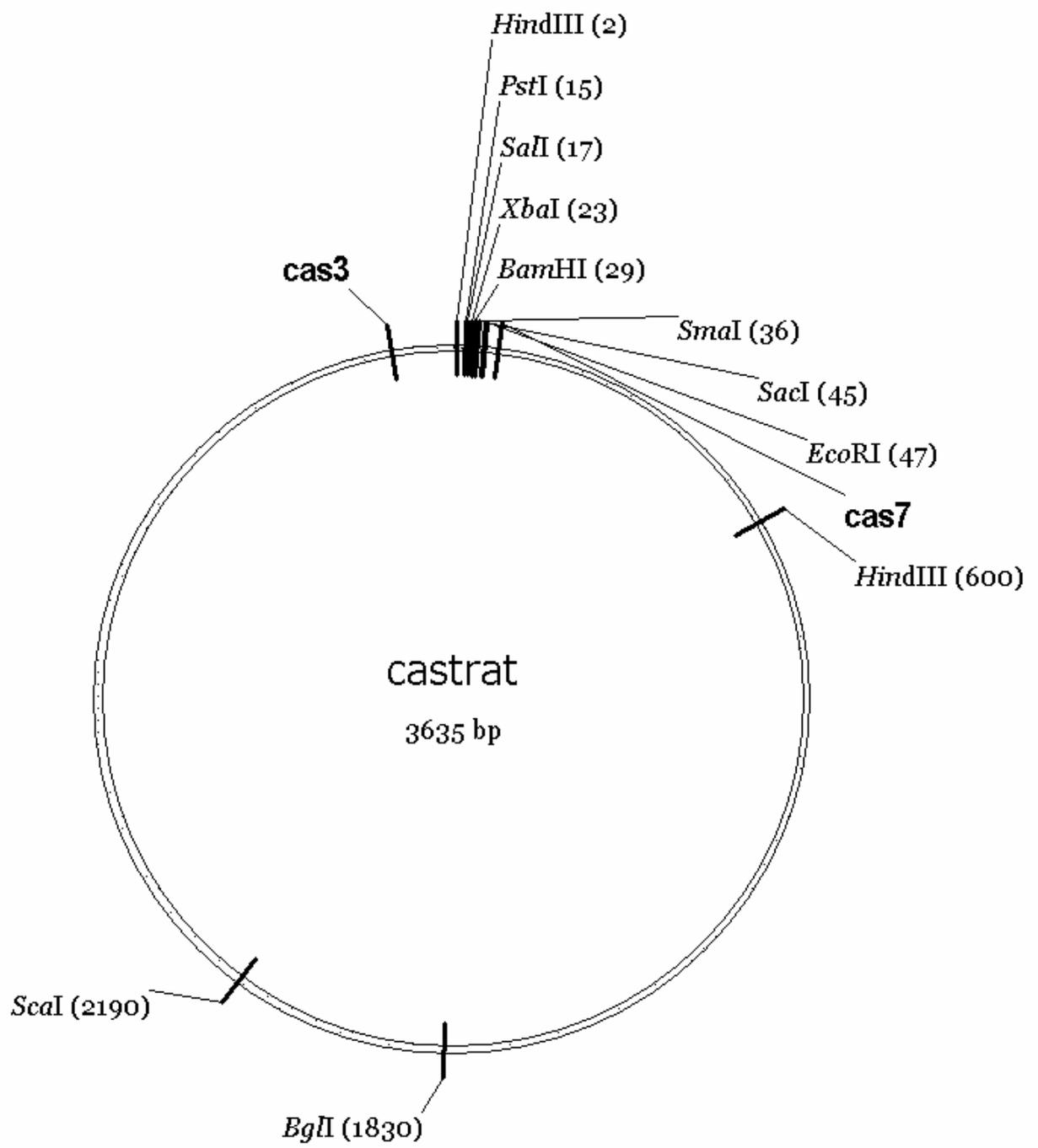
Таким образом, в настоящем исследовании показано, что два 1A2 инсулятора способны взаимодействовать по петлевому механизму, создавая домен, в пределах которого ген *yellow* оказывается защищен от влияния энхансеров. Более того, два 1A2 инсулятора способны, взаимодействуя на расстоянии в 6 т.п.н. через активный ген *yellow*, оказывать влияние на уровни экспрессии генов в зависимости от взаимного расположения друг относительно друга, при этом существенным являются размеры создаваемого инсуляторами петлевого домена и расстояния, на которые оказываются «разнесены» энхансеры и промоторы генов. Однако наблюдаемые эффекты могут быть связаны с тем, что промоторы генов *yellow* и *white* сильно отличаются друг от друга, и, возможно, они по-разному «реагируют» на те или иные комбинации инсуляторов. Поэтому на данном этапе работы для подтверждения нашей «петлевой» гипотезы необходимо провести анализ конструкта 2, который по своей структуре аналогичен конструкту 1, но в нем гены *yellow* и *white* расположены в обратном порядке.

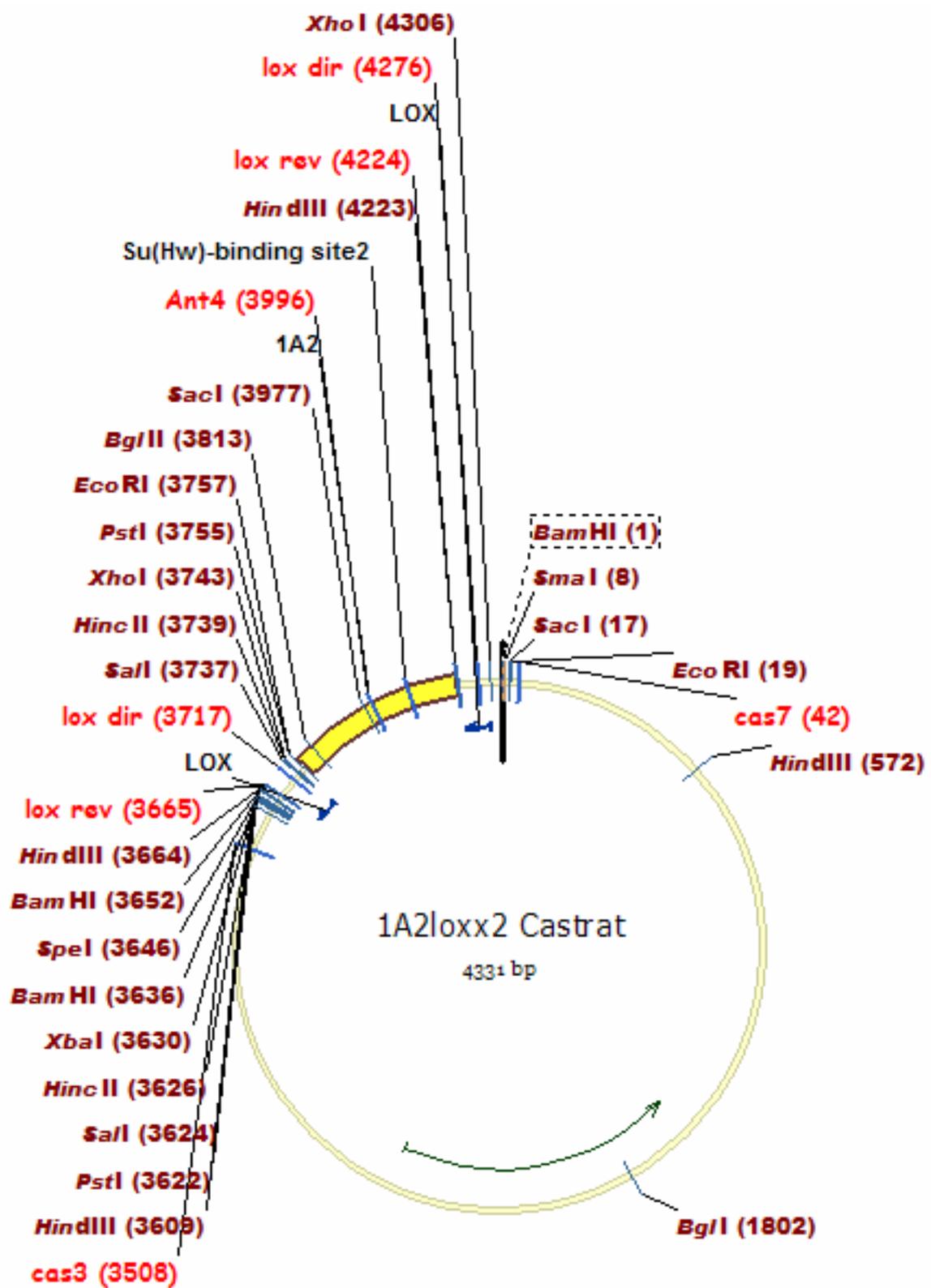
Выводы.

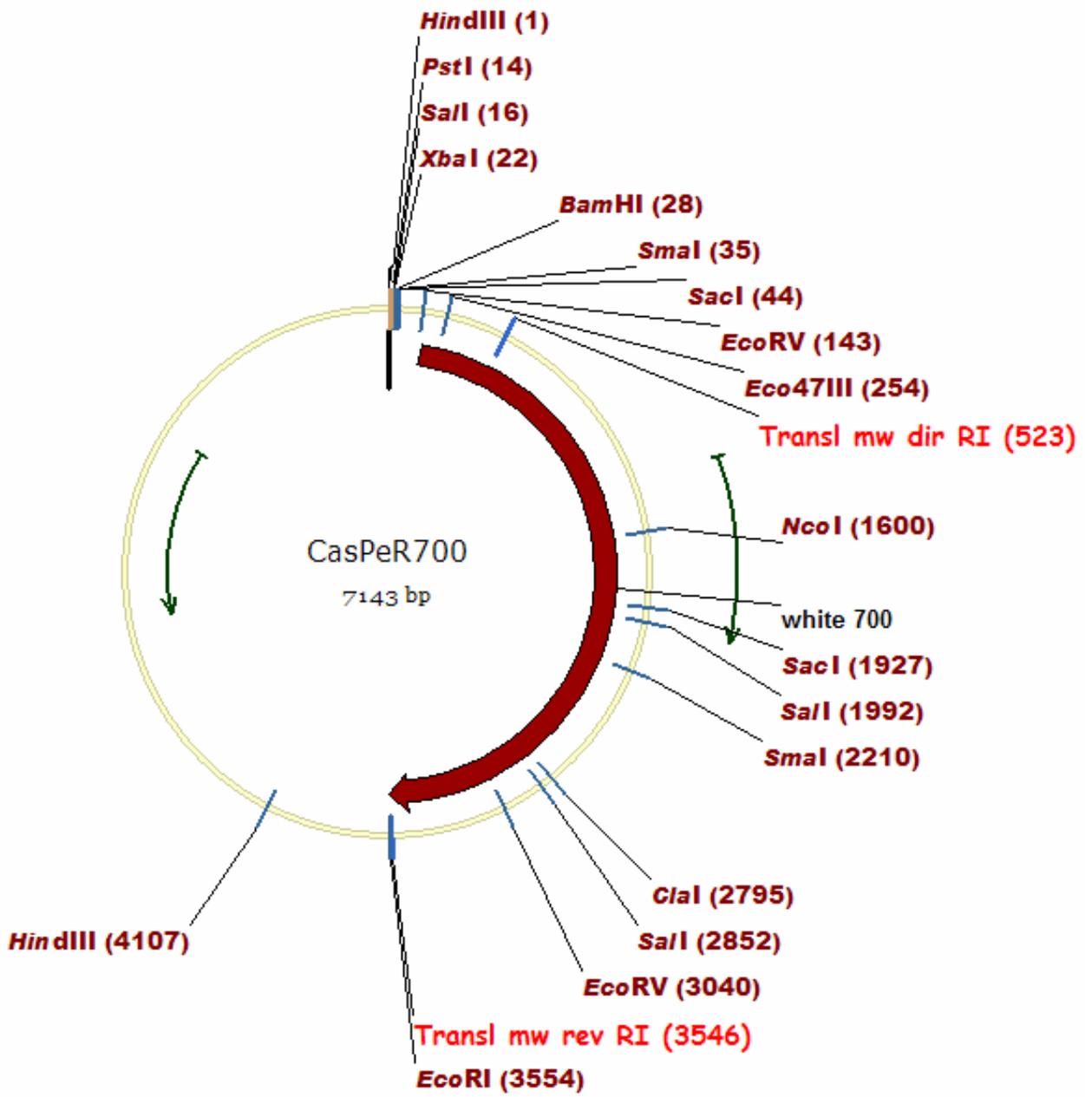
1. Инсулятор 1A2 обладает средней энхансер-блокирующей активностью.
2. Несколько 1A2 инсуляторов способны взаимодействовать друг с другом по петлевому механизму.
- 3.** В зависимости от взаимного расположения и расстояний между инсуляторами 1A2, энхансерами и промоторами маркерных генов наблюдаются различные уровни экспрессии, что укладывается в рамки гипотезы о существовании доменов с относительно независимыми профилями экспрессии генов.

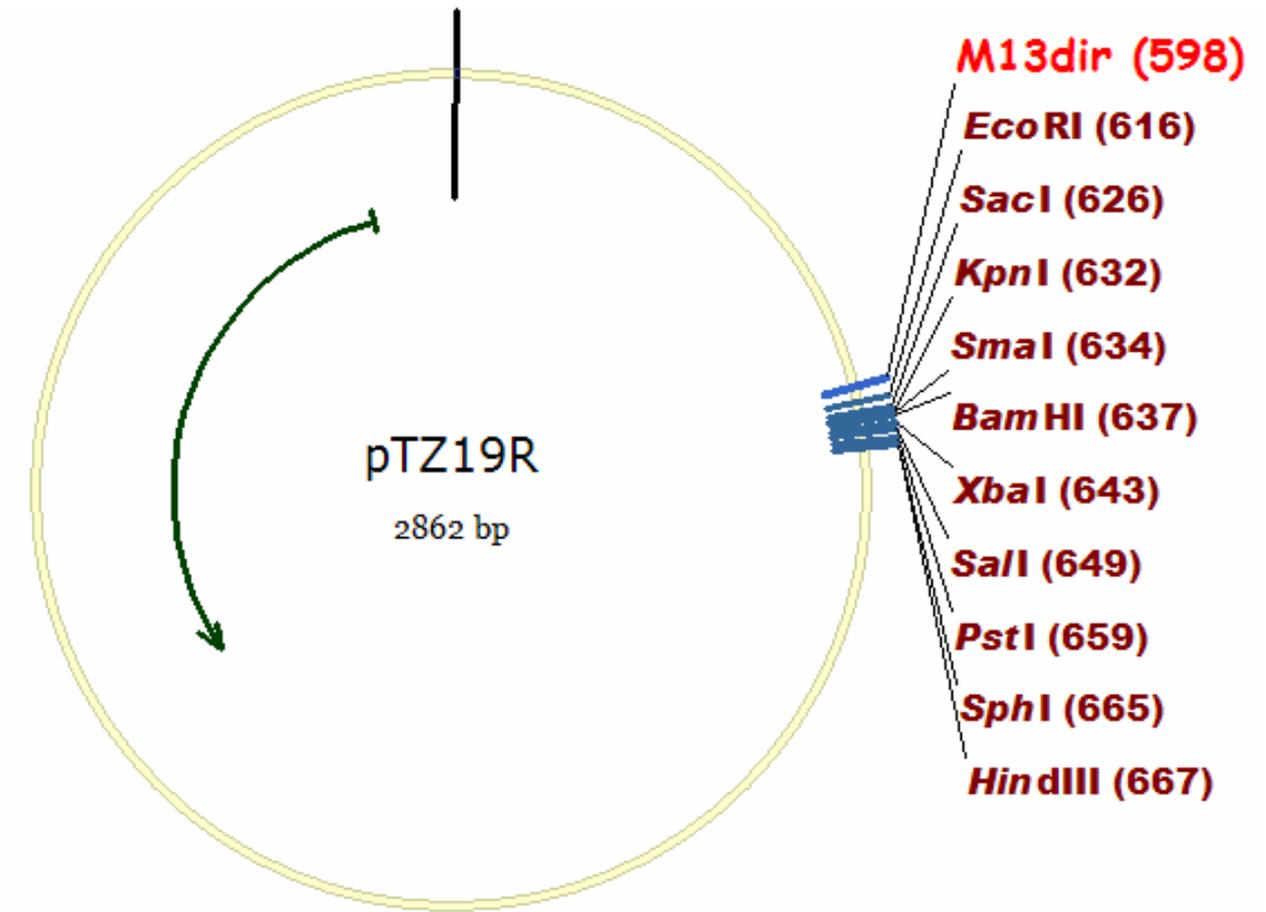
Приложение 1.

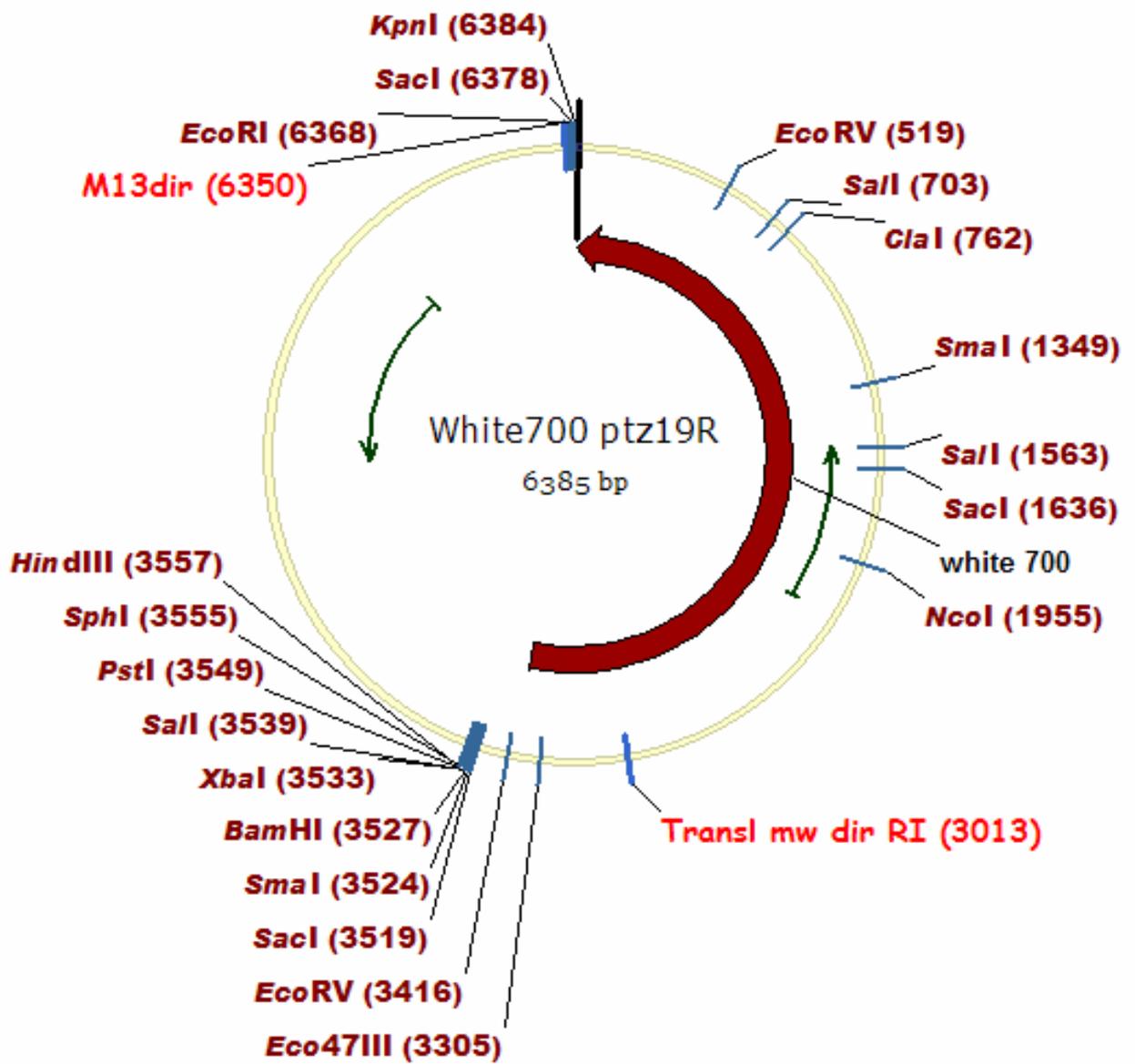


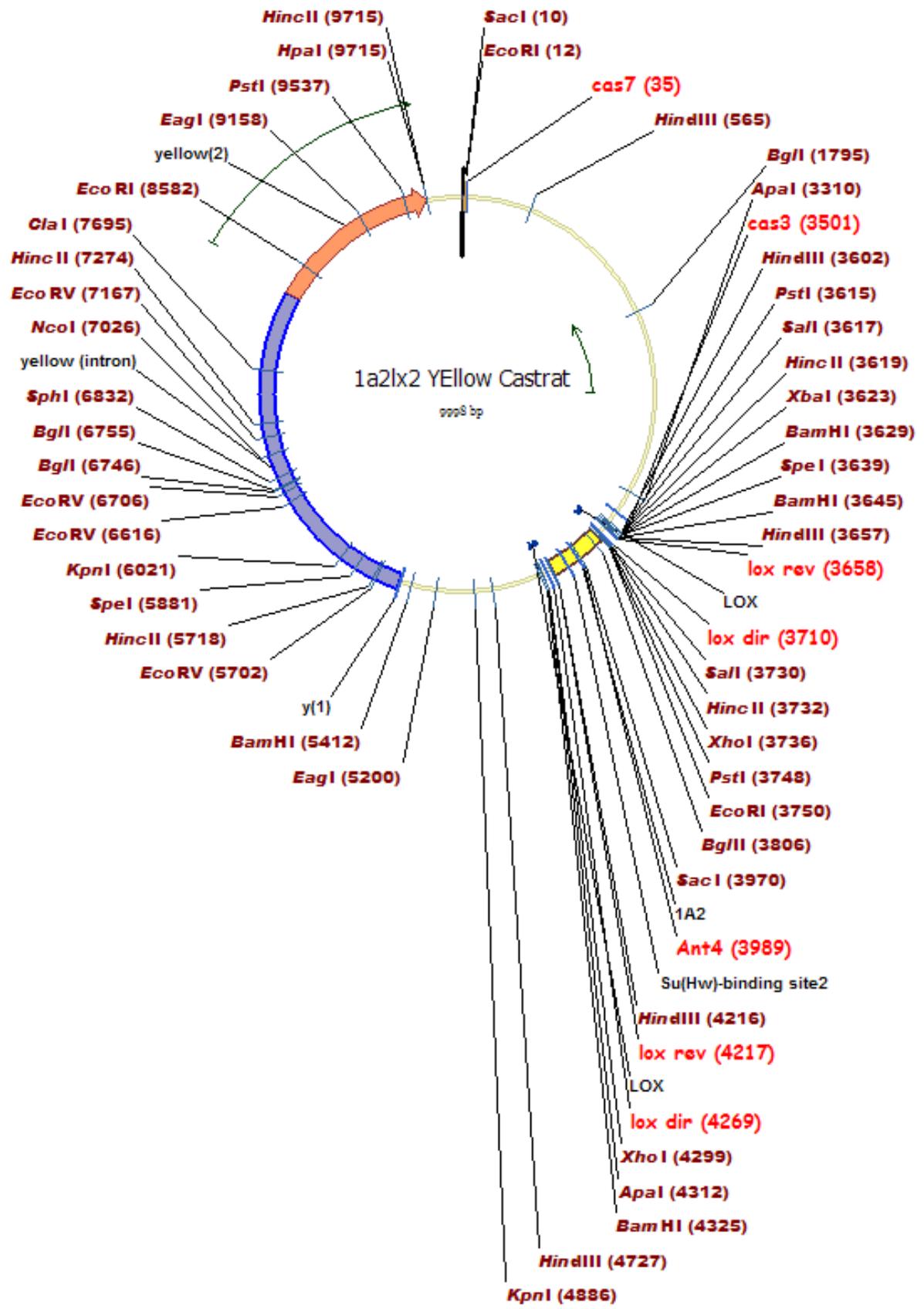


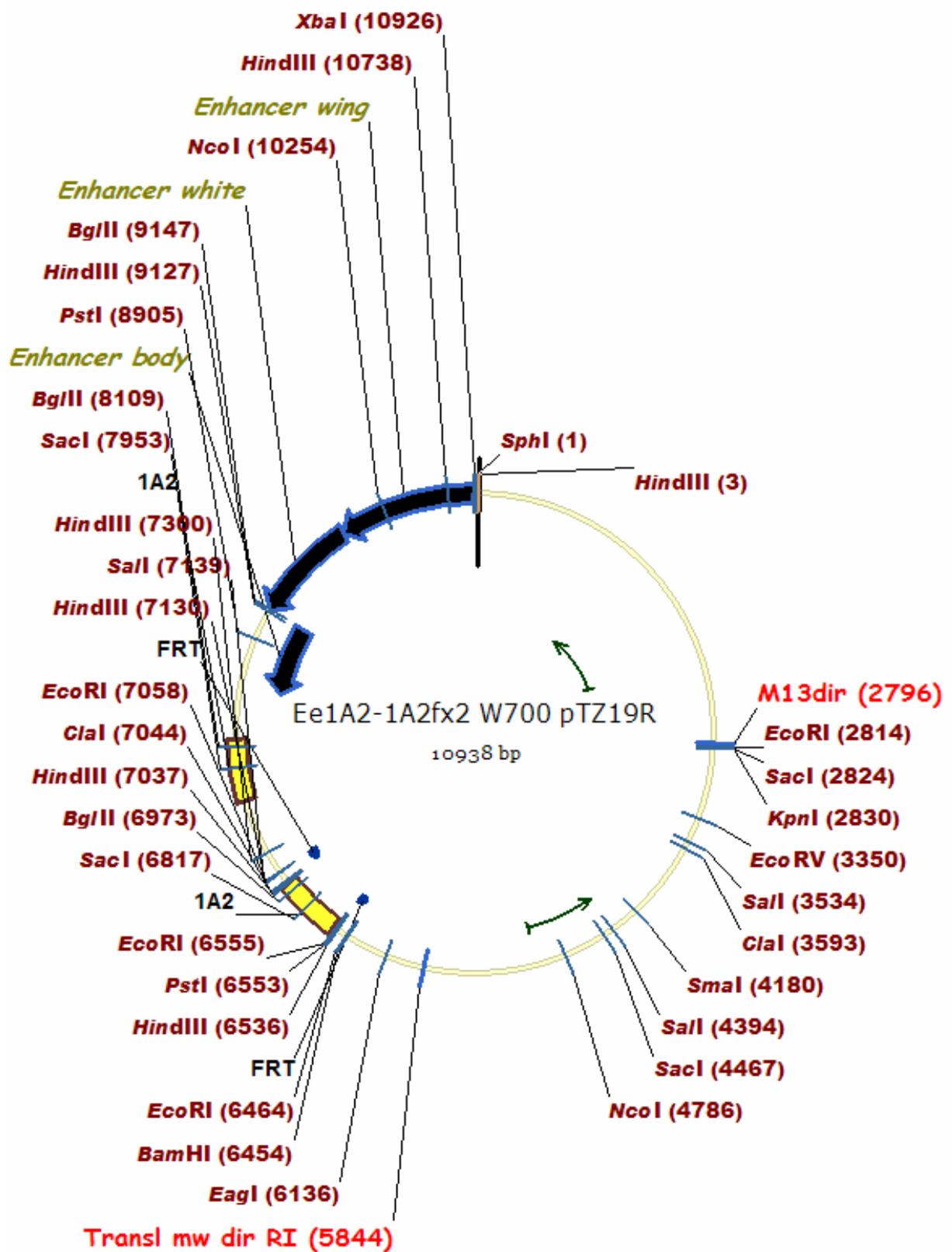


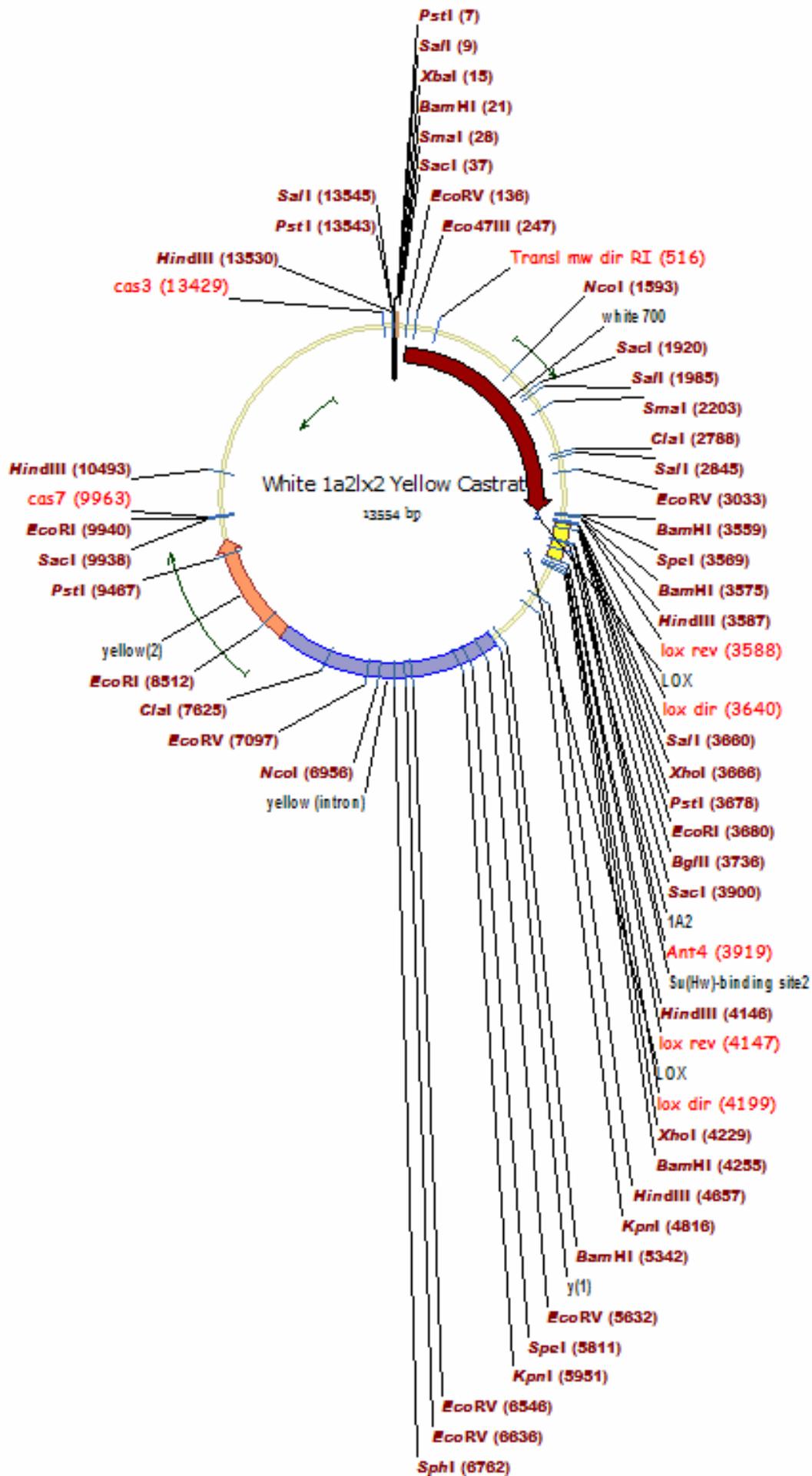


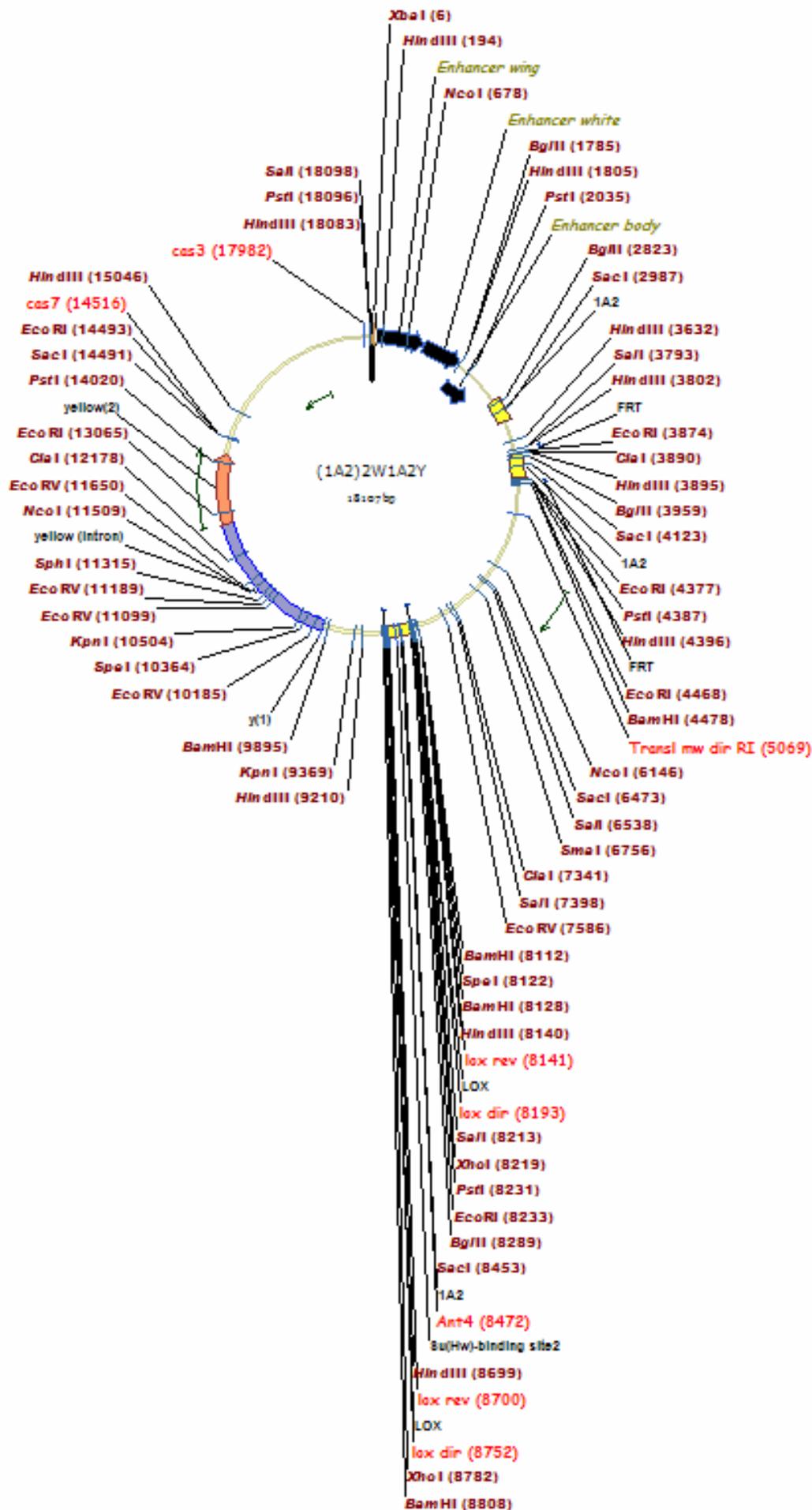






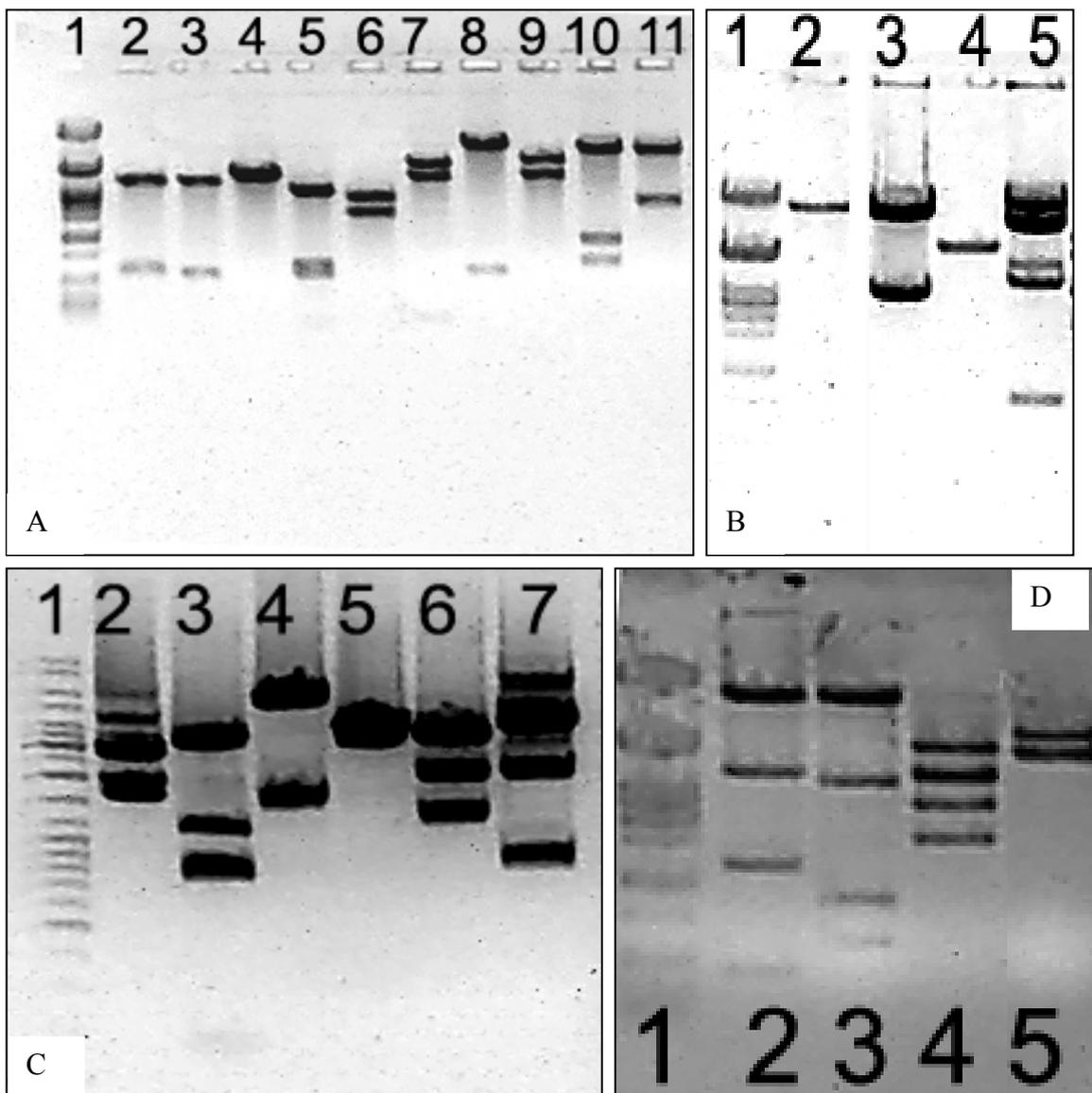






Приложение 2.

Аналитический электрофорез плазмид.



Результаты аналитические электрофорезов. Первая дорожка в случаях А, В, D – ДНК фага λ , порезанная рестриктазой PstI; C - GeneRuller™ 1kb DNA Ladder.

A: 2-6 плазида 1A2 loxx2 Castrat порезанная рестриктазами: 2)EcoRI, 3)XhoI, 4) SmaI 5)HindIII 6) XbaI + BglII

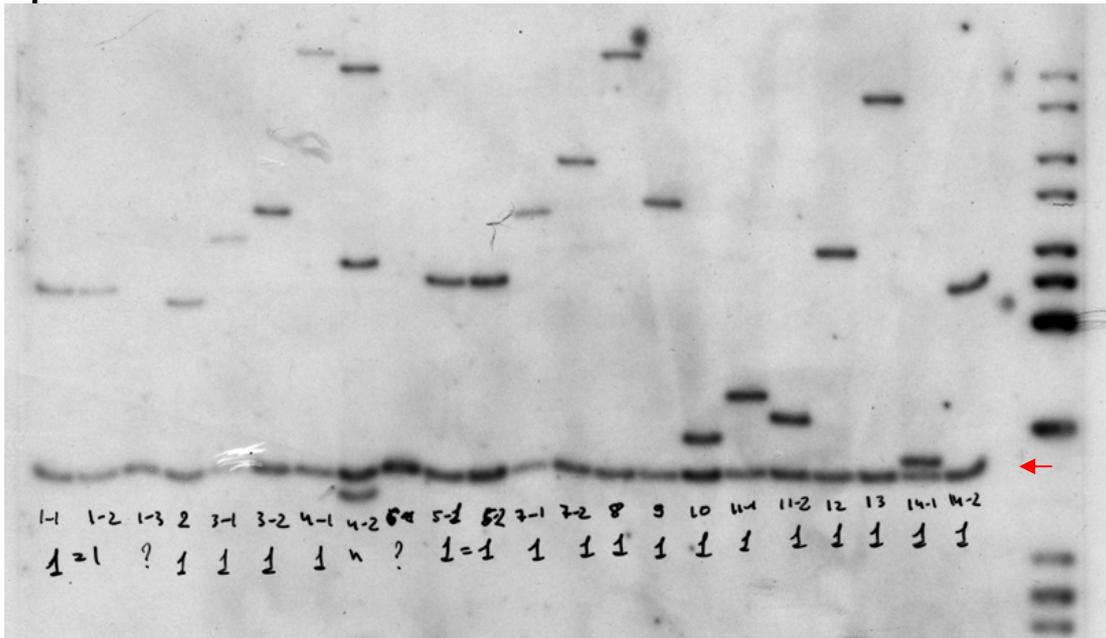
A: 7-11 плазида 1A2 lx2 Yellow Castrat порезанная рестриктазами: 7)PstI 8) XhoI 9)Sac I 10)BamHI 11) SpeI

B: 2-5 плазида Ee 1A2-1A2fx2 W700 pTZ19R порезанная рестриктазами: 2)EcoRV 3)PstI 4)NcoI 5)SalI

C: 2-7 плазида W700 pTZ19R порезанная рестриктажами: 2) SacI 3) HincII 4) NcoI-SphI 5) RV 6) BglII 7) SalI

D: 2-5 плазида (1A2)2W1A2Y порезанная рестриктажами: 2)BglII 3) BamHI 4) PstI 5) NcoI

Приложение 3.



Радиоавтограф результатов Саузерн-блот гибридизации. Правая дорожка Ladder (GeneRuller™ 1kb DNA Ladder). Остальные дорожки – пробы ДНК, выделенные из трансгенных линий конструкта 1. Красной стрелкой отмечен уровень, соответствующий геномному фрагменту участка гена *white*.

Приложение 4.

Таблица. Фенотипический анализ 22 линий мух.

№	Хромосома	White	Yellow			$\Delta 1A2$ anterior			$\Delta 1A2$ posterior			$\Delta 1A2$ - $\Delta 1A2$					
			тело	крылья	щетки	White	Yellow			White	Yellow			White	Yellow		
							тело	крылья	щетки		тело	крылья	щетки		тело	крылья	щетки
1-1	II	pY	2	2	5	pY-Y	4	4	5	pY	3	4	5	pY	3	4	5
1-2	II	Y	2-3	2-3	5												
1-3	X	Or	2-3	3	5												
2	III	ppY	1-2	2	5-wv	pY	2	4	5	ppY	2-3	3-4	5-wv	ppY	1-2	4-5	5
3-1	II	Or	2-3	2-3	5	dOr	2	2	5	pY	1	1	1	pY	1	1	1
3-2	III	dY	3	4	5	dOr	2	2	5	pY	3	3	5	pY	2	2	5
4-1	III	dOr-Br	1-2	1-2	5	dOr	2	2	5	dOr-Br	2	2	5	dY	2	2	5
4-2	II	Br	3	4	5												
5-1	III	dY	2	2	5	Or-dOr	2	2	5	pY	3	3	5	Y	2	2-3	5
5-2	III	Y	2	3	5												
6-1	II	Or	1	1	1												
7-1	III	Br	3-4	3-4	5	Br-Red	2	2	5	Y	2	2	5	Y-dY	2	3	5
7-2	II	dY-Or	2-3	3	5	dOr-Br	2	2	5	pY	3-4	3-4	5	Y	2	3	5
8	II	dOr-Br	3-4	3-4	5	Br	2	3	5	Y	3-4	4	5	Y	2	3	5
9	II	Br	3-4	4	5	Br	2-3	3	5	Y	4-5	4-5	5	pY-Y	2-3	3-4	5
10	III	dY-Or	2	2-3	5	Br	1-2	2	5-wv	Y	3	3-4	5-wv	pY	2	2-3	5
11-1	III	dY-Or	3-4	2-3	5	dOr	2	2	5	pY	3	3-4	5	Y	2	3	5
11-2	III	dOr	4	4	5	Br-Red	2	2	5	Y	4	4	5	Y	2-3	3	5
12	III	pY-Y	3	3-4	5	Y	2-3	3-4	5	ppY	3-4	3-4	5	pY	2	3	5
13	II	dOr	3	3	5	Br	2	3	5	pY-Y	3	4	5	pY-Y	3-4	4	5
14-1	II	R	3	3-4	5	R	2	2	5	Y	3-4	3	5	dY	3	3-4	5
14-2	III	Y	3	3-4	5	dOr	2	2	5	pY	3	3-4	5	Y	2	3	5

1. Максименко О.Г., Четверина Д.А., Георгиев П.Г. Свойства, механизмы действия инсуляторов высших эукариот и их роль в регуляции транскрипции, *Генетика*, т.42, №8, 2006, с.845-852.
2. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. Молекулярная биология клетки (учебник в 3-х томах)
3. Achim Breiling, Laura P.O'Neill, Donatella D'Eliseo, Bryan M. Turner & Valerio Orlando. (2004). Epigenome changes in active and inactive Polycomb-group-controlled regions. *EMBO Rep.*,
4. Kellum, R. and Schedl, P. (1992). A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol. Cell Biol.*, 12, 2424-2431.
5. Udvardy, A. and Schedl, P. (1984). Chromatin organization of the 87A7 heat shock locus of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 172, 385-403.
6. Udvardy, A., Maine, E., and Schedl, P. (1985). The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J. Mol. Biol.*, 185, 341-358.
7. Kuhn, E., Hart, C., Geyer, P. (2004). Studies of the role of the *Drosophila* scs and scs' insulators in defining boundaries of a chromosome puff. *Mol. Cell Biol.*, 2004 Feb;24(4):1470-80.
8. Gaszner, M., Vazquez, J., and Schedl, P. (1999). The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes Dev.*, 13, 2098-2107.
9. Zhao, K., Hart, C.M., and Laemmli, U.K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell*, 81, 879-889.
10. Blanton, J., Gaszner, M., and Schedl, P. (2003). Protein:protein interactions and the pairing of boundary elements in vivo. *Genes Dev.*, 17, 664-675.
11. Spana, C., Harrison, D.A., and Corces, V.G. (1988). The *Drosophila melanogaster* suppressor of Hairy-wing protein binds to specific sequences of the gypsy retrotransposon. *Genes Dev.*, 2, 1414-1423.
12. Kim, J., Shen, B., Rosen, C., and Dorsett, D. (1996). The DNA-binding and enhancer-blocking domains of the *Drosophila* suppressor of Hairy-wing protein. *Mol. Cell Biol.*, 16, 3381-3392.

13. Ghosh,D., Gerasimova,T.I., and Corces,V.G. (2001). Interactions between the Su(Hw) and Mod(mdg4) proteins required for gypsy insulator function. *EMBO J.*, 20, 2518-2527.
14. Parnell,T.J., Viering,M.M., Skjesol,A., Helou,C., Kuhn,E.J., and Geyer,P.K. (2003). An endogenous suppressor of hairy-wing insulator separates regulatory domains in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 13436-13441.
15. Golovnin,A., Birukova,I., Romanova,O., Silicheva,M., Parshikov,A., Savitskaya,E., Pirrotta,V., and Georgiev,P. (2003). An endogenous Su(Hw) insulator separates the yellow gene from the Achaete-scute gene complex in *Drosophila*. *Development*, 130, 3249-3258.
16. Kurshakova M.*, Maksimenko O.*, Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol.Cell*, in press.
17. Maksimenko O., Golovnin A., Galkin A., Georgiev P. Interplay of Various Insulators Can Redirect the Enhancer–Promoter Communication Flow in Transgenic *Drosophila*. На ревью в PNAS
18. Pai, C., Lei, C., Ghosh, D., Corces, V. (2004). The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Mol Cell*. Dec 3;16(5):737-48.