

Éléments isolateurs et protéines nucléaires à domaine BTB/POZ

Olivier Albagli
Patrick Martin

Le domaine BTB/POZ est un module d'interaction protéine/protéine phylogénétiquement conservé. Il est présent dans des protéines cytoplasmiques participant vraisemblablement à l'organisation du cytosquelette et dans des protéines nucléaires, dont plusieurs semblent impliquées dans la cancérogenèse humaine. Les protéines nucléaires à domaine BTB/POZ interagissent souvent (directement ou non) avec l'ADN et participent au contrôle de l'expression des gènes. Chez la drosophile, certains des éléments *cis*-régulateurs de l'ADN recrutant des protéines nucléaires à domaine BTB/POZ (codées par les gènes *mod(mdg4)* et *trithorax-like*) sont des isolateurs (*insulators*), c'est-à-dire des séquences qui ne règlent pas directement l'activité des promoteurs, mais les protègent de l'influence d'éléments stimulateurs (*enhancers*) ou répresseurs (*silencers*) de la transcription. Des approches génétiques et biochimiques suggèrent que les protéines nucléaires à domaine BTB/POZ, en particulier celles codées par *mod(mdg4)* et *trithorax-like*, sont capables de moduler la structure chromatinienne. De plus, nombre d'entre elles forment, *in vitro* et/ou *in vivo*, des complexes homo-multimériques capables, au moins dans certains cas, de rapprocher des éléments *cis*-régulateurs éloignés sur l'ADN. Ces propriétés pourraient contribuer à expliquer la fonction de certaines d'entre elles dans la régulation des éléments isolateurs.

ADRESSES

O. Albagli: UPR Cnrs 1983, BP 8, Institut André-Lwoff, 7, rue Guy-Môquet, 94801 Villejuif, France. P. Martin: Cnrs UMR 146, Institut Curie, Université Paris Sud, 91405 Orsay, France.

TIRÉS À PART

O. Albagli.

Chez les eucaryotes, la transcription est souvent réglée par des motifs contenus dans un court segment d'ADN (appelé promoteur) adjacent au site de début de la transcription et par des éléments plus éloignés (les éléments distaux, ED) qui, en amont ou en aval, stimulent (*enhancer*) ou diminuent (*silencer*)

l'activité du promoteur. La régulation transcriptionnelle propre à chaque gène suppose donc une communication préférentielle ou exclusive entre son (ses) promoteur(s) et certains éléments distaux. Or, les éléments distaux ne sont souvent pas intrinsèquement capables de « choisir » un promoteur puisqu'ils peuvent agir à longue distance (potentiellement

supérieure à la taille du gène) et généralement sans spécificité absolue, comme le montre la fonctionnalité de nombreuses combinaisons artificielles éléments distaux/promoteur. Ce risque d'interférence entre les régulations des gènes implique l'existence d'une autre catégorie d'éléments de régulation assurant la spécificité et, éventuellement, la modulation au cours du développement de la communication éléments distaux/promoteur, selon deux mécanismes possibles: en favorisant les communications adéquates ou en empêchant les communications indésirables. Les séquences capables d'empêcher les communications indésirables sont regroupées sous le nom d'isolateurs (*insulators*). Un isolateur n'exerce en lui-même aucune influence sur l'activité du promoteur (ce qui le distingue des éléments distaux classiques). En revanche, il « coupe » la communication entre un élément distal et un promoteur lorsqu'il est intercalé à peu près n'importe où entre eux deux. Son effet n'est donc pas dépendant de sa distance par rapport à l'élément distal ou au promoteur, mais de la position relative des trois éléments (figure 1). Les isolateurs constituent ainsi de véritables bornes délimitant la « zone d'influence » génomique d'un élément distal. L'activité isolatrice d'une séquence est testée de deux façons: en l'intercalant entre un élément distal (généralement un *enhancer*) et promoteur pour examiner sa capacité à couper leur communication (*enhancer blocking assay*) et/ou en la plaçant de part et d'autre d'un transgène, pour évaluer son aptitude à le protéger des « effets de position » (régulation, souvent négative, due au contexte chromatinien du site d'insertion). Les isolateurs pourraient permettre de mieux contrôler le niveau et la spécificité tissulaire de l'expression d'un transgène, notamment en thérapie génique [1-6].

Régulation d'éléments isolateurs par des protéines à domaine BTB/POZ

mod(mdg4) et l'isolateur de *gypsy*

Des isolateurs existent chez la plupart des eucaryotes [1]. Grâce aux approches génétiques, c'est principa-

m/s n°4, vol. 17, avril 2001

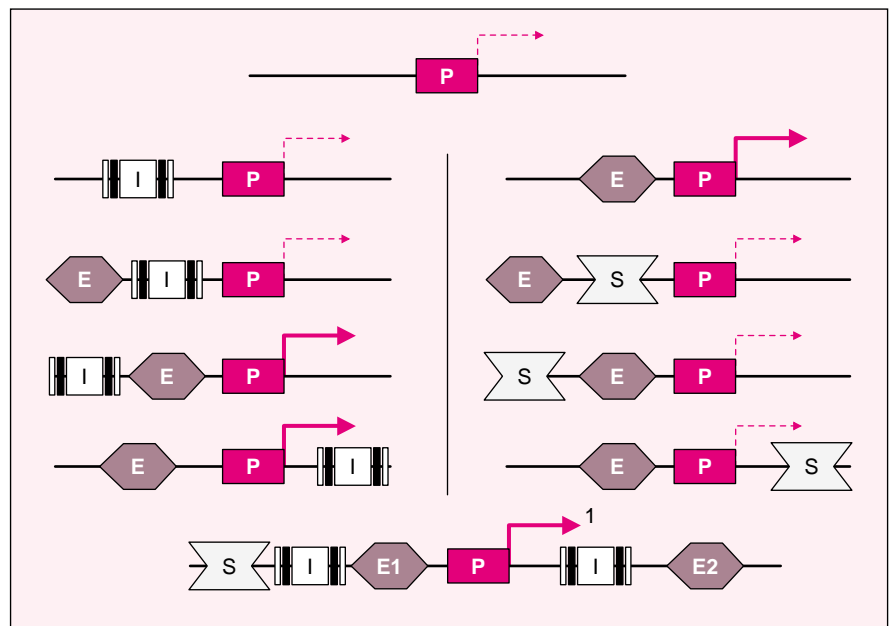


Figure 1. **Propriétés des isolateurs.** Le promoteur (P) correspond aux séquences adjacentes au site d'initiation de la transcription d'un gène. Seul, le promoteur permet généralement une expression faible si le gène est « extra-chromosomique » (présent sur un plasmide) et dépendante de son contexte lorsqu'il est intégré dans l'ADN cellulaire. La présence d'un enhancer (E) stimule le promoteur, tandis qu'un isolateur (I) n'a aucun effet. Cette construction distingue donc enhancer et isolateur. L'insertion d'un isolateur entre enhancer et promoteur « coupe » leur communication et diminue l'expression du gène. Ce type de construction constitue la stratégie classique pour examiner l'effet isolateur d'une séquence d'ADN (enhancer blocking assay). Toutefois, il est insuffisant, puisqu'un silencer (S) en lieu et place de l'isolateur conduira aussi à une inhibition. Afin de déterminer si une séquence est un isolateur ou un silencer, il faut la placer en amont de l'enhancer ou en aval du promoteur: le silencer continuera à fonctionner, tandis que l'isolateur, dont l'activité dépend de son intercalation entre enhancer et promoteur, sera inactif. L'encadrement d'une construction par deux isolateurs permet en théorie de protéger le transgène des effets de position c'est-à-dire de l'influence d'éléments de régulation au voisinage de son site d'intégration. Le promoteur ne subit alors que l'influence des éléments de régulation présents entre les deux isolateurs (E1), mais est insensible à celle des éléments à l'extérieur de ce « domaine » (S et E2). L'expression d'un tel transgène est donc indépendante de son site d'intégration, ce qui constitue le second test pour authentifier un isolateur.

lement la drosophile qui permet d'en développer l'étude. L'isolateur prototype de drosophile est celui du rétrotransposon *gypsy*: la présence de *gypsy* entre un *enhancer* et un promoteur diminue ou élimine la stimulation par cet *enhancer*, tandis que l'effet d'*enhancers* situés du même côté que le promoteur par rapport à *gypsy* n'est pas modifié [7-9]. Par exemple, la présence de *gypsy* en amont du gène de pigmentation *yellow (y)* provoque une décoloration spécifique des ailes et du corps (mutation *y²*), précisément là où

l'expression de *y* est contrôlée par des *enhancers* séparés du promoteur de *y* par *gypsy* [7, 9] (figure 2).

La fonction isolatrice de *gypsy*, plus générale vis-à-vis des *enhancers* que des *silencers* [10-12], est reproduite par un morceau de *gypsy* de 340 pb constitué d'une répétition (imparfaite) de douze motifs d'une douzaine de paires de base chacun [9]. La recherche de mutations affectant la fonction isolatrice de *gypsy* (ou de ses douze répétitions) a conduit au clonage de deux gènes: l'un, *su(Hw)* code pour une protéine contenant

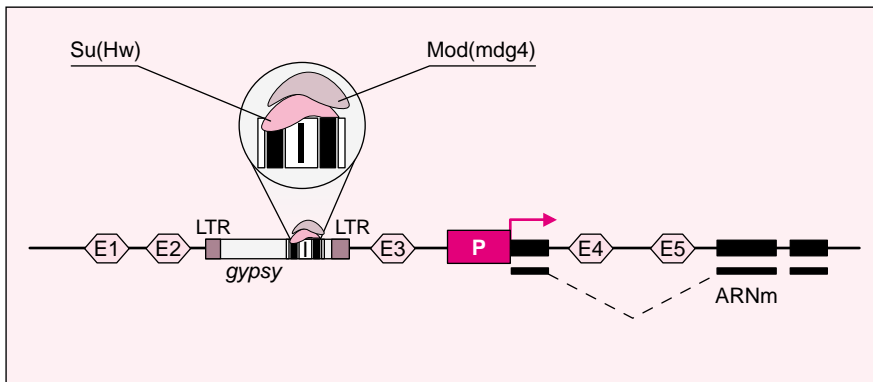


Figure 2. **Le rétrotransposon gypsy et la mutation yellow².** La mutation yellow² (y^2) est provoquée par la présence du rétrotransposon gypsy dans la région 5' (régulatrice) du gène de pigmentation yellow. L'expression yellow dans les différents tissus est spécifiée par des enhancers distincts (E). Chez les animaux y^2 , l'expression de yellow est affaiblie dans les tissus (cuticule du corps et lame de l'aile) où elle est normalement stimulée par les deux enhancers (E1 et E2) séparés du promoteur de yellow par gypsy, tandis que l'expression dans les autres tissus (et par conséquent l'effet des enhancers correspondants E3-5) n'est pas affectée. Gypsy présente donc une activité isolatrice, reproduite par la répétition, située un peu en amont de la région LTR (long terminal repeat) 5', d'un motif nucléotidique reconnu par la protéine Su(Hw) qui recrute les produits de mod(mdg4). L'isolateur de gypsy fixe vraisemblablement un multimère (de stœchiométrie inconnue) du complexe Su(Hw)/Mod(mdg4).

douze doigts à zinc C_2H_2 et fixant directement les motifs répétés. L'autre, *mod(mdg4)* code pour une vingtaine d'isoformes recrutées (au moins pour certaines) sur l'isolateur de *gypsy* par leur interaction physique avec Su(Hw) [9] (figure 2). Ces deux gènes jouent des rôles complémentaires dans l'activité isolatrice de *gypsy*: l'inactivation de *su(Hw)* entraîne l'élimination de cette activité dans toutes les combinaisons éléments distaux/promoteur étudiées; en revanche, des mutations affaiblissant la fonction de *mod(mdg4)* (son inactivation complète est létale pour l'embryon) conduisent à un phénotype plus variable selon le gène hôte de *gypsy*. Chez les animaux portant la mutation y^2 , l'inactivation partielle de *mod(mdg4)* généralise l'effet de *gypsy*, puisque la décoloration affecte tous les tissus, suggérant que *gypsy* bloque alors l'effet de tous les enhancers, y compris ceux situés plus près du promoteur que *gypsy*. Cette altération suggère que si *su(Hw)* est nécessaire à l'effet anti-enhancer de *gypsy*, *mod(mdg4)* impose une direction à cet effet, lui conférant par conséquent ses propriétés d'isolateur [9].

trl et l'isolateur de *even-skipped*

D'autres auteurs se sont intéressés au promoteur du gène de Drosophile *even-skipped* (*eve*). Ils montrent ainsi que, dans une construction artificielle contenant une enhancer (baptisé IAB-5 et contrôlant normalement l'expression du gène homéotique *Abd-B*) et deux exemplaires du promoteur de *eve* (*Peve*, chacun couplé à un gène distinct), seul le promoteur le plus près de IAB-5 est stimulé (figure 3) [13, 14]. Cette « préférence proximale », que l'on n'observe nullement, dans les mêmes conditions, avec deux exemplaires du promoteur du gène *white(w)* (*Pw*) suggère qu'un élément isolateur dans *Peve* coupe la communication IAB-5/promoteur distal. Un court motif GAGA de *Peve* reconnu par le facteur de transcription Trl (*trithorax-like*/facteur *Gaga*), initialement identifié par sa fixation au promoteur du gène *ultrabithorax*, est nécessaire à l'activité isolatrice de *Peve*, tandis que l'inactivation partielle du gène *trl* affaiblit cette activité. De plus, un promoteur hybride fusionnant *Peve* à la partie 3' de *Pw* présente une activité isolatrice, à

condition que le motif GAGA amené par sa partie *Peve* soit intact. Ces résultats indiquent que le couple motif GAGA/facteur Trl exerce l'activité isolatrice de *Peve* [14].

mod(mdg4) et *trl*: deux rôles distincts ?

Les produits des gènes *trl* et *mod(mdg4)* sont impliqués dans l'activité d'éléments isolateurs. Leur fonction semble *a priori* différente: l'inactivation partielle de *trl* diminue l'effet isolateur de *Peve*, tandis que celle de *mod(mdg4)* exacerbe, en l'étendant à tous les tissus, l'extinction par *gypsy* de l'expression de *y*. Cependant, à la différence de ce qui est observé vis-à-vis de *y*, l'inactivation partielle de *mod(mdg4)* élimine simplement l'effet isolateur de *gypsy* quand celui-ci est présent dans les régions régulatrices d'autres gènes [3, 7, 15, 24]. De plus, un examen attentif du phénotype induit par l'inactivation partielle de *mod(mdg4)* montre un effet ambivalent sur la mutation y^2 : si une dépigmentation globale est observée dans tous les tissus lorsque la fonction de *mod(mdg4)* est affaiblie, elle n'affecte pas uniformément toutes les cellules, puisque, sur le corps, des îlots de cellules ayant recouvré une pigmentation normale parsèment le « fond » de cellules décolorées. Cette expression « mosaïque » (*variegated*) indique que, dans certaines cellules, l'effet isolateur de *gypsy* est perdu de façon stable au cours des divisions cellulaires [7, 16]. Toutes ces données peuvent s'interpréter ainsi: en l'absence de *trl* et de *mod(mdg4)*, *Peve* et *gypsy*, respectivement, perdent leur fonction isolatrice. Cependant, alors que, dans ces conditions, *Peve* devient « neutre », *gypsy* acquiert une activité répressive sur certains promoteurs, notamment celui de *y*. Cette activité expliquerait l'apparente « bidirectionnalisation », dans *y*, de l'effet anti-enhancer de *gypsy* lorsque les mutations y^2 et *mod(mdg4)* sont combinées [7, 15].

mod(mdg4) et *trl* codent pour des protéines à domaine BTB/POZ

Les produits des gènes *mod(mdg4)* et *trl* présentent une ressemblance structurale: l'extrémité amino-terminale des

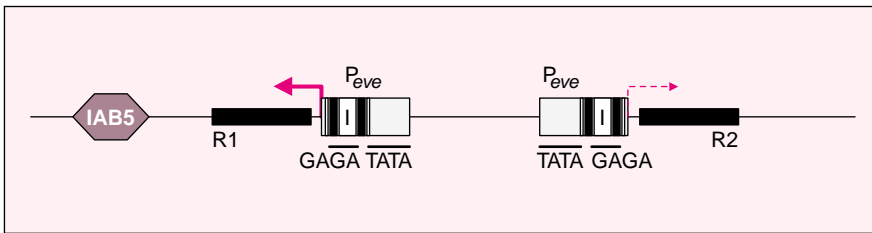


Figure 3. **Le promoteur du gène even-skipped contient un élément isolateur.** Une construction contenant deux copies du promoteur du gène even-skipped de drosophile (*Peve*, chacun couplé à un gène rapporteur distinct, R1 et R2) et un enhancer (*IAB-5*) est intégrée dans le génome de la drosophile. Dans l'embryon transgénique, R1 est bien plus fortement exprimé que R2, ce qui signifie que seule la copie proximale de *Peve* est efficacement stimulée par *IAB-5*. Cette « préférence proximale » est causée par l'existence d'un élément isolateur (*I*) dans *Peve* qui coupe la communication entre *IAB-5* et la copie distale de *Peve* et correspond à un motif GAGA reconnu par le facteur Trithorax-like (*Trl*). Notons que dans cette construction, le motif GAGA du promoteur proximal est plus près de *IAB-5* que son motif TATA. Cette orientation conduit non seulement à l'isolation du promoteur distal, mais également à l'« auto-isolation » du promoteur proximal lorsque celui-ci est un dérivé du promoteur de *white* artificiellement greffé des motifs GAGA et TATA. Cette « auto-isolation » n'est pas observée pour *Peve*, ce qui suggère une coopération entre les deux motifs dans un promoteur naturel.

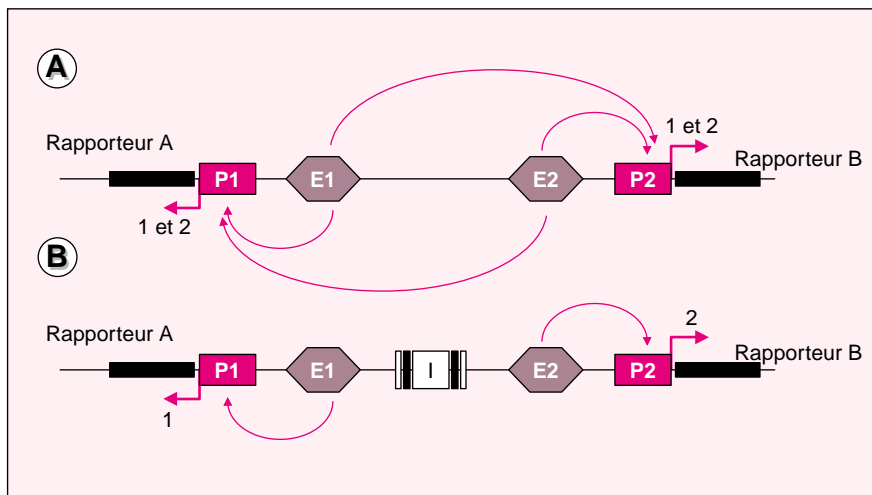


Figure 4. **Un isolateur coupe la communication enhancer/promoteur sans inactiver l'enhancer.** Une construction artificielle intégrée au génome de la *Drosophile* contient deux promoteurs (*P1* et *P2*) (couplés à des gènes différents) et deux enhancers (*E1* et *E2*), chacun stimulant l'expression dans une région distincte de l'embryon [10]. **A.** En l'absence d'élément isolateur, *E1* et *E2* stimulent tous deux à la fois *P1* et *P2*. **B.** Si un isolateur est inséré entre *E1* et *E2*, *E1* ne stimule plus *P2*, ni *E2* *P1*, mais *P1* est toujours stimulé par *E1*, et *P2* par *E2*, ce qui indique que ces deux enhancers ne sont pas inactivés par la présence de l'isolateur. Cette situation peut même conduire à une meilleure stimulation de *P1* par *E1* (et/ou *P2* par *E2*) [3, 13], comme si l'efficacité des enhancers augmente parfois dès lors que, grâce à l'isolateur, ils ne se « partagent » plus entre plusieurs promoteurs. Les isolateurs peuvent donc, en spécialisant les enhancers, favoriser leur communication avec les promoteurs. Il est possible que les enhancers « oscillent » bilatéralement pour établir un contact direct mais intermittent avec un promoteur [3, 58]. Entouré par plusieurs promoteurs, l'enhancer subirait une pulsation dont le rythme dépendrait de la position de chaque promoteur et/ou de séquences déterminant leur affinité pour l'enhancer partagé. L'isolateur pourrait définir une limite pour l'oscillation de l'enhancer, favorisant ainsi l'interaction entre l'enhancer et le promoteur de l'autre côté.

quatre produits du gène *trl* [17] et de la plupart [9] ou de la totalité [18] des isoformes codées par *mod(mdg4)* est constituée d'un domaine homologue d'environ 120 acides aminés, baptisé BTB (pour *bric à brac*, *tram-track*, *broad complex*, trois gènes de drosophile codant pour des protéines qui présentent ce domaine) ou POZ (pour *Pox virus* et *zinc finger*) et conservé dans de nombreuses protéines de métazoaires [19, 20] (figure 5A). La présence d'un domaine BTB/POZ est l'une des très rares caractéristiques structurales communes à plusieurs protéines capables de lier des isolateurs [1, 2]. Généralement, les protéines à domaine BTB/POZ possèdent, dans leur partie carboxy-terminale, une autre région capable d'interagir avec une macromolécule filamenteuse: il s'agit souvent de doigt(s) à zinc C_2H_2 (comme dans *Trl*, ou dans les oncoprotéines humaines LAZ3/BCL6 et PLZF), qui reconnaissent des séquences spécifiques dans l'ADN, ou de répétitions *kelch* (comme dans des protéines des poxvirus), qui permettent une association avec l'actine ou, sans doute, d'autres polymères cytosquelettiques [19, 20] (figure 5B). Parfois, les protéines à domaine BTB/POZ ne possèdent pas d'autres régions conservées: c'est le cas des produits de *mod(mdg4)* [9] même si un doigt à zinc atypique, au rôle inconnu, est présent sur certains d'entre eux [18]. Notons, cependant, que l'interaction entre *Mod(mdg4)* et *Su(Hw)* réunit sous forme hétérodimérique, le domaine BTB des produits de *mod(mdg4)*, et les doigts à zinc C_2H_2 de *Su(Hw)*. Le domaine BTB/POZ est nécessaire à cette hétéromérisation, non pas en contactant directement *Su(Hw)*, mais en permettant l'auto-association de *Mod(mdg4)**.

D'autres isolateurs réglés par *mod(mdg4)* ou *trl*?

Un anticorps contre les produits de *trl* révèle de nombreux sites sur les chromosomes polyténiques [17]. Comme dans le cas de *eve*, ces sites pourraient correspondre, en partie, à la fixation de *Trl* dans des promo-

* D. Ghosh and V. Corces, communication personnelle.

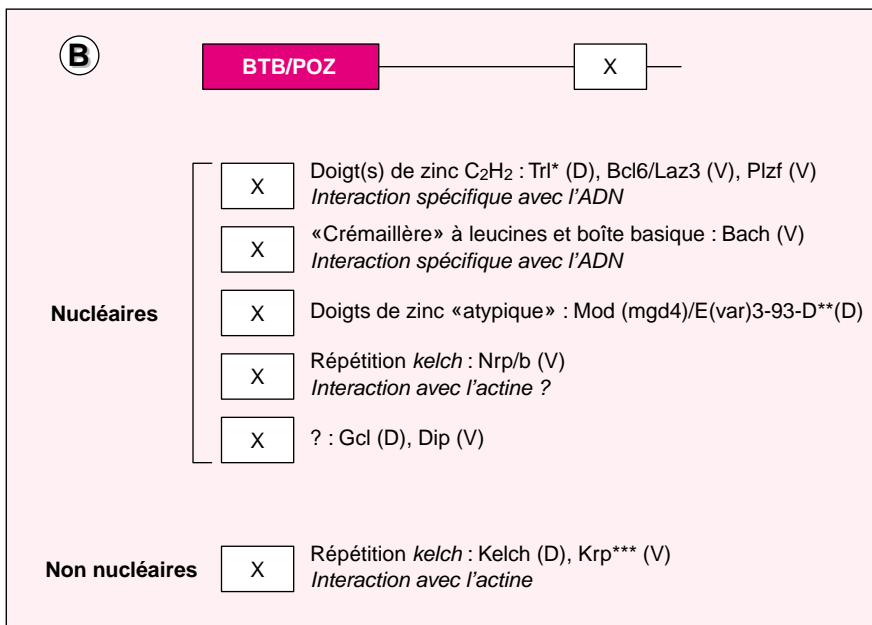


Figure 5. **Domaine BTB/POZ et protéines à domaine BTB/POZ.** Le domaine conservé baptisé BTB ou POZ est un module d'interaction protéine/protéine homo- et hétérotypique long d'environ 120 acides aminés et placé à l'extrémité N-terminale de protéines variées. **A.** Structure du domaine BTB/POZ des protéines de drosophile Mod(mdg4), Trl/Gaga et des oncoprotéines humaines PLZF et LAZ3/BCL6. Les acides aminés identiques encadrés en rouge sont identiques entre les quatre protéines, ceux encadrés en rose sont similaires. Les structures secondaires en hélice α ou en feuillet β du domaine BTB/POZ de PLZF [59] sont indiquées. **B.** La localisation subcellulaire et la présence d'une autre région conservée (X) dans la partie carboxy-terminale définissent des sous-classes de protéines à domaine BTB/POZ. Dans quelques cas cependant, la partie carboxy-terminale ne contient aucun autre domaine conservé (X = ?). Des exemples de chaque sous-classe sont donnés chez la drosophile (D), ou les vertébrés (V). La région entre les domaines BTB/POZ et X est souvent unique, mais présente parfois des similitudes entre protéines plus étroitement apparentées (telles Gcl et Dip). *Toutes les protéines présentent plusieurs doigts à zinc C₂H₂ sauf les produits de trl qui n'en contiennent qu'un. **Quelques isoformes codées par mod(mdg4) ne présentent pas de doigt à zinc atypique. *** Le nombre de motifs kelch varie, six pour Nrp/b et kelch, cinq pour Krp.

teurs et leur conférer parfois une activité isolatrice [3]. Ainsi, deux éléments adjacents au promoteur du gène codant pour la Tubuline α -1 fixant Trl *in vitro* sont requis pour protéger ce promoteur contre les effets de position, sans présenter d'activité *enhancer* [22]. Les produits de *mod(mdg4)* sont également présents sur plusieurs centaines de sites, avec, en plus, une distribution variable selon l'isoforme considérée

[18]. Su(Hw) n'est détecté que sur une fraction de ces sites, ce qui suggère que les produits de *mod(mdg4)* (ou une partie d'entre eux) interagissent avec d'autres protéines pour fixer certains éléments isolateurs [16]. Toutefois, l'existence d'isolateurs « endogènes » (distincts de *gypsy*) réglés par *mod(mdg4)* (avec ou sans l'aide de *su(Hw)*) reste hypothétique: il est possible que *gypsy* ait créé un isolateur à partir d'un élément de

régulation classique en multimérisant le motif fixant le couple Su(Hw)/Mod(mdg4) [12]. Même si l'existence d'une multitude d'éléments isolateurs endogènes est davantage prédite que montrée, la dissection de certains gènes illustre leur possible densité dans le génome. Ainsi, le gène *Abd-B* est réglé par une succession de régions régulatrices entre lesquelles s'intercalent autant d'isolateurs [23-25]. L'élément *Fab-7*

(*Frontabdominal 7*), par exemple, sépare physiquement et fonctionnellement les régions *cis*-régulatrices *iab-6* et *iab-7* contrôlant l'expression de *Abd-B* respectivement dans les segments PS11 et PS12. Lorsque *Fab-7* est délété, *iab-6* et *iab-7* ne sont plus des régions de régulation indépendantes, mais s'influencent pour n'en plus former fonctionnellement qu'une seule, spécifiant, pour *Abd-B*, la même expression (de type PS12) dans PS11 et PS12. *Fab-7* n'est pas exactement un isolateur puisqu'il contient un *silencer* (PRE), cible des protéines du groupe Polycomb, et que son rôle n'est pas de couper la communication entre ED et promoteur, mais entre les ED contenus dans *iab-6* d'une part et *iab-7* d'autre part. *Fab-7* est donc un élément complexe permettant l'indépendance fonctionnelle de *iab-6* et *iab-7* et la stabilisation de leur état actif ou inactif au travers des divisions cellulaires [26]. Toutefois, ses propriétés l'apparentent aux isolateurs, ce que confirment des constructions artificielles montrant qu'une partie de *Fab-7*, distincte du PRE, coupe la communication de plusieurs combinaisons ED/promoteur sans exercer d'effet *silencer* [23-25]. L'activité de l'isolateur de *Fab-7* ne dépend ni de *mod(mdg4)*, ni de *su(Hw)*, mais pourrait bien impliquer *trl* puisqu'il contient plusieurs motifs GAGA capables de fixer efficacement Trl *in vivo* [27].

Mécanismes

La complète dissemblance structurale entre la plupart des isolateurs et leur comportement disparate vis-à-vis des *silencers* [11] indiquent qu'ils ne forment pas un ensemble parfaitement homogène. Toutefois, ils agissent sans grande spécificité puisqu'ils bloquent la communication de plusieurs combinaisons éléments distaux/promoteur, ce qui suggère que leur action repose sur des mécanismes communs. Aucun des modèles proposés n'explique cependant l'ensemble des données expérimentales ([5, 6] et *figure 6*), en partie parce que les systèmes d'étude sont très variés et parce que l'effet des isolateurs résulte sans doute d'une combinaison, variable, des mécanismes envisagés. Partant de leurs caractéris-

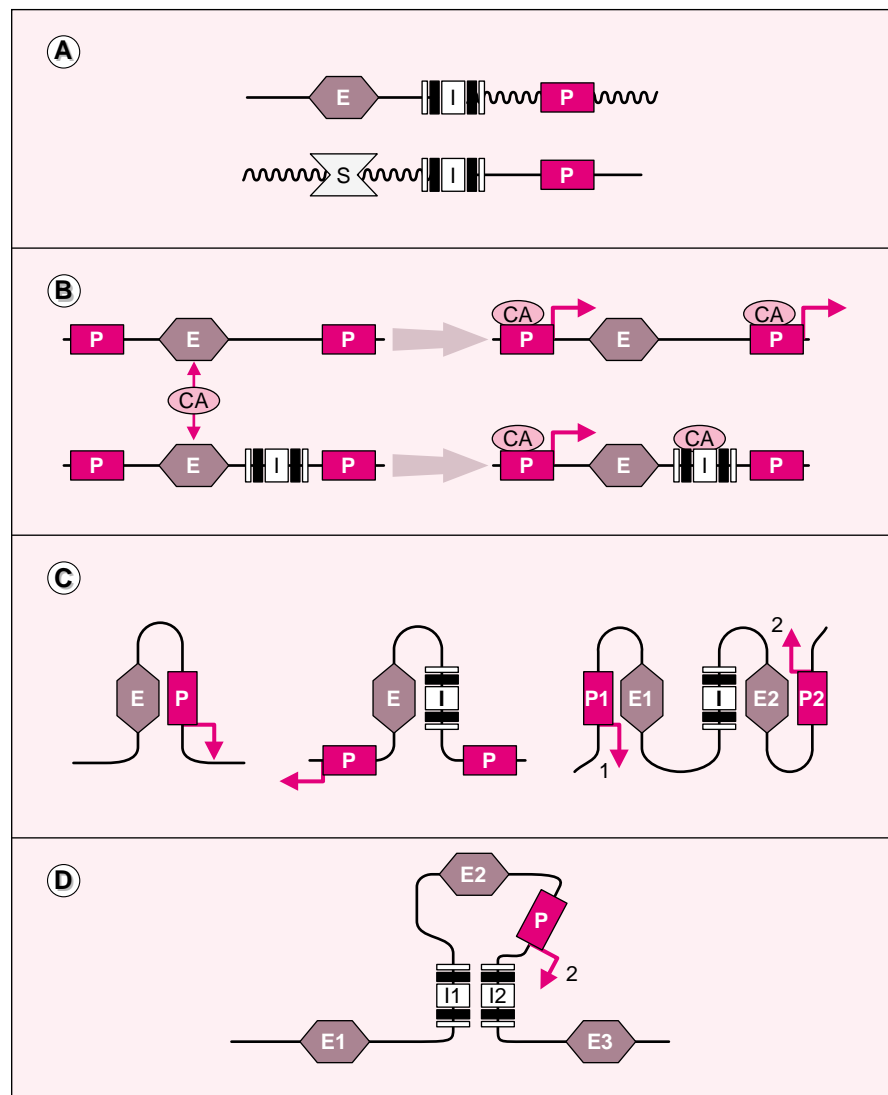


Figure 6. **Comment agissent les isolateurs ?** Plusieurs modèles tentent d'expliquer l'action des isolateurs, mais chacun ne rend qu'en partie compte des données expérimentales et recourt à des hypothèses controversées. **A.** L'isolateur agirait comme une barrière empêchant la propagation d'une structure chromatinienne permissive (« ouverte », trait droit) ou non permissive (« fermée », en zig-zag) émanant (bilatéralement) respectivement d'un enhancer ou d'un silencer. Ce modèle postule la réciprocité des mécanismes de répression et d'activation, et un changement « continu » de la structure chromatinienne depuis l'enhancer ou le silencer jusqu'au promoteur ou à l'isolateur. **B.** L'enhancer serait un point d'entrée pour un complexe d'activation transcriptionnelle (CA), glissant, de part et d'autre sur l'ADN, jusqu'à sa rencontre avec un promoteur ou sa « séquestration » par un isolateur. Cette idée explique la polarité de l'activité des isolateurs, mais pas leur effet parfois positif sur la communication enhancer/promoteur dans la situation décrite dans la figure 4 [3, 13]. **C.** L'enhancer et le promoteur interagiraient directement. Une « dynamique » nucléaire permettrait à un enhancer de rechercher et de contacter les promoteurs alentours (voir figure 3). L'isolateur interagirait également avec l'enhancer pour empêcher, d'un côté seulement, cette recherche et ce contact. On peut aussi imaginer que l'isolateur participe au complexe enhancer/promoteur, ce qui guiderait l'enhancer vers le promoteur de l'autre côté de l'isolateur [45]. **D.** Les isolateurs (I1 et I2) interagissent entre eux (et/ou avec une structure sous-jacente du noyau), ce qui définit physiquement un domaine fonctionnellement indépendant. Seuls les éléments de régulation à l'intérieur de la boucle ainsi définie peuvent communiquer (E2 et P), à l'exclusion des autres (E1 et E3).

tiques fonctionnelles établies par ailleurs, tentons d'expliquer comment des protéines à domaine BTB/POZ contribuent à ces mécanismes, distincts mais interdépendants [28-30], et contrôlent ainsi directement l'activité d'éléments isolateurs.

Isolateurs, domaine BTB/POZ et chromatine

Un modèle séduisant propose que l'effet unidirectionnel des isolateurs reflète leur capacité à séparer deux types de structure chromatinienne: d'un côté une chromatine non permissive (peu accessible, de type hétérochromatinienne) et, de l'autre, une structure plus accessible, permissive pour la transcription. Cette «asymétrie» chromatinienne centrée sur l'isolateur est étayée par des analyses biochimiques de la chromatine de part et d'autre de l'isolateur de poulet 5'HS4 [1]. Le plus simple était d'imaginer une création «autonome» de cette asymétrie par les isolateurs, c'est-à-dire leur capacité à mettre simultanément en place ces deux types de structure chromatinienne. Ce modèle était suggéré par la ressemblance entre l'extinction clonale subie par un gène placé au voisinage d'une région hétérochromatinienne (*position-effect variegation, PEV*) et la dépigmentation mosaïque obtenue par la combinaison de la mutation y^2 et de l'inactivation partielle de *mod(mdg4)* [7, 9, 31]. Toutefois, la mutation de *mod(mdg4)* ne conduit pas à l'extinction mosaïque de tous les gènes hôtes de *gypsy* [3, 7, 15, 24]. Surtout, un *enhancer* incapable de stimuler un promoteur à cause de la présence entre eux d'un isolateur (en particulier *gypsy*) reste actif vis-à-vis d'un autre promoteur situé du même côté que lui par rapport à l'isolateur ([10] et *figure 4*). Ce dernier ne provoque donc pas l'inactivation intrinsèque des *enhancers*, ce qui semble exclure qu'il «hétérochromatise» (même unilatéralement) la chromatine avoisinante.

L'asymétrie chromatinienne résulterait plutôt de la capacité des isolateurs à arrêter la propagation d'une modification chromatinienne émanant d'un ED, ce qui les rapprocherait de certains éléments barrières (ou frontières) des levures [32-34].

Vis-à-vis de l'influence, souvent répressive, de la chromatine avoisinante, les isolateurs bloqueraient l'extension de la chromatine non permissive d'un côté mais maintiendraient ou établiraient une chromatine permissive de l'autre côté, en accord avec la capacité de *gypsy* à contrecarrer la *PEV* ou la répression exercée par les protéines du groupe Polycomb [25, 36, 37]. De la même façon, l'effet anti-*enhancer* des isolateurs correspondrait à l'arrêt d'une «onde» propageant une structure chromatinienne permissive à partir d'un *enhancer*, comme le suggère la position des isolateurs de drosophile *scs* et *scs'* bordant une région chromosomique décondensée et transcrite sous l'effet d'un choc thermique [5]. La propagation de deux types de remodelage chromatinien partiellement interdépendants, la modification covalente des histones et celle de l'ADN, semble ainsi contrôlée par les isolateurs [37, 38]. En effet, *Fab-7* (entier) ou 5'HS4 stabilise une hyperacétylation de certaines histones associée au maintien d'une chromatine localement accessible et de la transcription, tandis que 5'HS4 protège parfois l'ADN de l'hyperméthylation, contribuant ainsi également à préserver la permisivité de la chromatine [26, 39, 40]. L'effet barrière des isolateurs pourrait résulter de leurs structures chromatinienes particulières, «réfractaires» au remodelage chromatinien induit par les ED et stoppant par conséquent sa propagation de proche en proche. Cet effet impliquerait donc des protéines capables de créer de telles structures au niveau des isolateurs, ce que pourrait corroborer l'association entre des complexes capables de désacétyler les histones et CTCF, une protéine à onze doigts à zinc (mais sans domaine BTB/POZ) vraisemblablement essentielle à l'activité de plusieurs isolateurs de vertébrés, notamment 5'HS4 [1, 2, 5, 41].

Des analyses génétiques et biochimiques impliquent également les protéines à domaine BTB/POZ dans la régulation de la structure de la chromatine. Chez les vertébrés, plusieurs d'entre elles recrutent, comme CTCF, des complexes capables de désacétyler les histones [21], tandis que, chez la drosophile, *trl* est indis-

pensable à l'intégrité et à la condensation des chromosomes [42]. De plus, des études biochimiques avaient montré la capacité de *Trl* à remanier localement l'architecture nucléosomale et à établir une chromatine plus accessible, en particulier sur certains promoteurs [43]. Surtout, l'inactivation partielle de *trl* ou de *mod(mdg4)* exacerbe la *PEV*, c'est-à-dire que ces deux mutations accentuent la répression exercée par une région hétérochromatinienne sur l'expression des gènes adjacents (d'où l'autre nom de *mod(mdg4)*: *e(var)3-93D*) [9, 44]. Cette remarquable similitude pourrait refléter la capacité commune de leurs produits à limiter l'extension de l'hétérochromatine et à contribuer ainsi à établir ou à maintenir une structure chromatinienne asymétrique de part et d'autre de l'isolateur.

Isolateurs, domaine BTB/POZ et interaction *enhancer*/promoteur

Il n'est toutefois pas certain que le remodelage chromatinien induit (bilatéralement) par les *enhancers* se propage sur la distance, parfois considérable, qui les séparent des promoteurs. D'autres auteurs envisagent qu'ils n'augmentent que localement l'accessibilité de la chromatine, offrant une entrée à un complexe de transcription qui glisserait sur l'ADN jusqu'à sa rencontre avec un promoteur ou un isolateur. Plus vraisemblablement [3], ces remaniements chromatinien locaux seraient associés à la formation de boucles d'ADN rapprochant physiquement *enhancer* et promoteur. Les isolateurs pourraient moduler la formation d'un tel complexe: soit indirectement, par la perturbation de la fonction ou de l'assemblage de possibles protéines «facilitatrices» fixées entre *enhancers* et promoteurs [4]; soit plus directement, par la formation d'autres boucles rapprochant *enhancers* et isolateurs et guidant ou empêchant les interactions entre *enhancers* et promoteurs [45, 46]. Cette dernière hypothèse n'explique pas, comme les modèles précédents, la polarité de l'effet anti-*enhancer* des isolateurs, mais s'accorde mieux avec leur effet en *trans*, ou pour *gypsy* et peut-être pour *scs/scs'*, leur activité dans des expériences utilisant des vecteurs épisomiques ne reproduisant qu'imparfaite-

ment une structure chromatiniennne normale [3-5, 46].

L'établissement ou le maintien de contacts physiques entre régions linéairement éloignées sur l'ADN semble en partie reposer sur l'homomultimérisation de protéines [3, 47]. Or, le domaine BTB/POZ est une grande surface d'interaction protéine/protéine permettant souvent, notamment pour Mod(*mdg4*) ou Trl, l'auto-association et la formation d'agrégats homomultimériques [19, 20]. De plus, une caractéristique structurale constante de ces protéines est l'éloignement entre le domaine BTB/POZ (toujours en position amino-terminale) et le domaine d'interaction avec l'ADN ou les répétitions *kelch* (en position carboxy-terminale) [19] (*figure 5*). Une telle organisation confère à la protéine Kelch de drosophile la capacité de rassembler les filaments d'actine dans une région d'un pont intercellulaire baptisé *ring canal* [48]. Transposée à des protéines à domaine BTB/POZ liant l'ADN, cette organisation, qui les distingue de nombreux autres facteurs de transcription, permet à Trl ou à la protéine Bach de vertébrés (mais pas à leurs dérivés amputés du domaine BTB/POZ) de former *in vitro* des complexes homo-multimériques rapprochant physiquement des séquences d'ADN linéairement éloignées [49, 50]. Les protéines à domaine BTB/POZ exercent donc une fonction « architecturale » sur l'ADN susceptible d'expliquer les propriétés *cis*-régulatrices des séquences auxquelles elles se fixent.

Isolateurs, domaine BTB/POZ et organisation nucléaire

Enfin, un autre modèle postule des interactions non entre *enhancers* et isolateurs, mais entre isolateurs, et/ou entre isolateurs et des sous-structures nucléaires « stables », en particulier un nucléosquelette (de nature biochimique encore obscure) baptisé matrice nucléaire. Ces interactions définiraient des boucles constituant des unités de transcription indépendantes (incapables d'influencer ou de subir l'influence des autres), peut-être parce que leur « fermeture » par les isolateurs y confine les remaniements chromatiniens, les mouvements des

complexes de transcription, ou les interactions *enhancers*/promoteurs [5, 16, 51]. Cette idée intuitive d'un lien entre le repliement en boucles du génome et sa régionalisation fonctionnelle prédit que certaines des régions d'ADN capables d'interagir avec la matrice nucléaire (MARE, *matrix attachment regions*) exercent une fonction isolatrice, ce que semblent confirmer, malgré des controverses, des données expérimentales récentes [52].

Les propriétés auto-agrégatives conférées par le domaine BTB/POZ pourraient également contribuer à des interactions à grandes distances rapprochant deux isolateurs ou un isolateur d'un compartiment particulier du noyau. En effet, la plupart des protéines à domaine BTB/POZ, notamment celles codées par *trl* et *mod(mdg4)*, se concentrent dans des sous-domaines nucléaires (caractéristique qu'elles partagent avec Beaf-32, une protéine fixant un motif important de *scs'* [53]) parfois associées à des régions riches en hétérochromatine ou à la matrice nucléaire [16, 19-21, 42, 54, 55]. Par exemple, un anticorps reconnaissant les produits de *mod(mdg4)* révèle, sous forme de points à la périphérie nucléaire, des structures incluant Su(Hw) et associées à la lamine, un composant de la matrice nucléaire [16]. L'intégrité et la distribution de ces structures semblent essentielles à la fonction de *mod(mdg4)* puisque la mutation de certains gènes *Trithorax* ou *Polycomb* affecte simultanément la localisation subnucléaire de Mod(*mdg4*) et l'activité isolatrice de *gypsy* [16].

Conclusions

Les conséquences phénotypiques de l'inactivation de *mod(mdg4)* et *trl* et leur ressemblance structurale suggèrent que leurs produits pourraient régler la fonction de leur isolateur respectif selon un mécanisme commun, la spécificité étant conférée par la fixation (directe ou indirecte) à des séquences distinctes sur l'ADN. Cependant, en attendant de connaître l'effet de protéines hybrides, soulignons que les produits de *mod(mdg4)* et de *trl* sont différents en dehors du domaine BTB/POZ, et se distinguent par certaines caractéristiques (comme la localisation subnucléaire), de sorte qu'il reste envisa-

geable qu'elles agissent selon des modalités distinctes. De plus, l'implication récente de Trl dans le recrutement de protéines du groupe Polycomb sur certains PRE [56] étend encore la diversité fonctionnelle des éléments *cis*-régulateurs reconnus par Trl. L'implication des protéines à domaine BTB/POZ dans le contrôle d'éléments isolateurs pourrait donc n'être qu'une facette de leur capacité à favoriser l'accès à l'ADN pour des partenaires variés réglant différents aspects de son métabolisme [42].

La difficulté à comprendre l'activité des isolateurs vient de notre connaissance très fragmentaire du phénomène essentiel que constitue la communication éléments distaux/promoteur. Un des écueils résulte de notre conception modulaire de la régulation transcriptionnelle alors que, pour quelques gènes très étudiés, le nombre et l'interdépendance des « éléments » régulateurs montrent qu'ils formeraient plutôt une chaîne ininterrompue, toujours plus étendue, et influencée par la position sur le chromosome [30]. Cette complexité est également dévoilée par d'autres approches génétiques visant, chez la drosophile, à l'identification de séquences (et des protéines associées) présentes entre *enhancer* et promoteur et facilitant, à l'inverse des isolateurs, leur communication. L'une d'elles, baptisée PTS (*promoter targeting sequence*) située juste en amont de l'isolateur *Fab-8* de *Abd-B*, est même capable de contrecarrer l'inhibition par *Fab-8* (ou par *gypsy*) de la communication entre *enhancer* et promoteur et restreint ainsi l'effet de *Fab-8* au blocage des interactions entre les régions régulatrices qu'il sépare (*iab-7* et *iab-8*) [57]. L'étude des séquences « facilitatrices » permettra de mieux comprendre le mode d'action des isolateurs et la contribution des gènes *mod(mdg4)* et *trl* à leur activité ■

Remerciements

Nous remercions vivement F. Karch pour avoir bien voulu améliorer cette revue par ses critiques et suggestions, D. Ghosh and V. Corces pour nous avoir communiqué des résultats non publiés, C. Lindon et H. Pelczar pour leur aide et leur curiosité constantes pour ce sujet et C. Pinset et F. Puvion-Dutilleul pour leur relecture du manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Sun F-L, Elgin SC. Putting boundaries on silence. *Cell* 1999; 99: 459-62.
2. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 1999; 98: 387-96.
3. Dorsett D. Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 505-14.
4. Bulger M, Groudine M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 1999; 13: 2465-77.
5. Bell AC, Felsenfeld G. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 191-8.
6. Udvardy A. Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J* 1999; 18: 1-8.
7. Gdula DA, Gerasimova TI, Corces VG. Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9378-83.
8. Roseman RR, Pirrotta V, Geyer PK. The Su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J* 1993; 12: 435-42.
9. Gerasimova T, Gdula D, Gerasimov DV, Simonova O, Corces VG. A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 1995; 82: 587-97.
10. Cains H, Levine M. Modulation of enhancer/promoter interaction in the *Drosophila* embryo. *Nature* 1995; 376: 533-6.
11. van der Vlag J, den Blaauwen JL, Sewalt RG, van Driel R, Otte AP. Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. *J Biol Chem* 2000; 275: 697-704.
12. Scott KC, Taubman AD, Geyer PK. Enhancer blocking by the *Drosophila* gypsy insulator depends upon insulator anatomy and enhancer strength. *Genetics* 1999; 153: 787-97.
13. Ohtsuki S, Levine M, Cai HN. Different core promoters possess distinct regulatory activities in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1998; 12: 547-56.
14. Ohtsuki S, Levine M. GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1998; 12: 3325-30.
15. Cai HN, Levine M. The gypsy insulator can function as a promoter specific silencer in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 1997; 16: 1732-41.
16. Gerasimova TI, Corces VG. Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 1998; 92: 511-21.
17. Benyajati C, Mueller L, Xu N, et al. Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3345-53.
18. Büchner K, Roth P, Schotta G, V. Saumweber H, Reuter G, Dorn R. Genetic and molecular complexity of the position effect variegation modifier *mod(modg4)* in *Drosophila*. *Genetics* 2000; 155: 141-57.
19. Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecoq G, Leprince D. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Diff* 1995; 6: 1193-8.
20. Bardwell VJ, Treisman R. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 1994; 8: 1664-77.
21. Dhordain P, Albagli O. SMRT est un co-répresseur commun aux récepteurs nucléaires et aux protéines oncogéniques à domaine BTB/POZ, LAZ3 et PLZF. *Med Sci* 1998; 14: 219-22.
22. O'Donnell KH, Chen C-T, Wensink P. Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* α 1-tubulin gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6398-408.
23. Zhou J, Barolo S, Szymanski P, Levine M. The Fab-7 element of the bithorax complex attenuates enhancer-promoter interactions in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1996; 10: 3195-201.
24. Hagstrom K, Müller M, Schedl P. Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes Dev* 1996; 10: 3202-15.
25. Mihaly J, Hogga I, Gausz J, Gyurkovics H, Karch F. *In situ* dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb responsive element. *Development* 1997; 124: 1809-20.
26. Cavalli G, Paro R. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science* 1999; 286: 955-8.
27. Cavalli G, Paro R. The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* 1998; 93: 505-18.
28. Schubeler D, Francastel C, Cimbora DM, Reik A, Martin DI, Groudine M. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev* 2000; 14: 940-50.
29. Jenuwein T, Forrester WC, Fernandez-Herrero LA, Laible G, Dull M, Grosschedl R. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* 1997; 385: 269-72.
30. Bonifer C. Developmental regulation of eukaryotic gene loci. Which cis-regulatory information is required? *Trends Genet* 2000; 16: 310-5.
31. Dernburg AF, Broman KW, Fung JC, et al. Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell* 1996; 85: 745-59.
32. Bi X, Broach JR. UASrpg can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev* 1999; 13: 1089-101.
33. Bi X., Braunstein M., Shei GJ, Broach JR. The yeast HML I silencer defines a heterochromatin domain boundary by directional establishment of silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11934-9.
34. Donze D, Adams CR, Rine J, Kamakaka RT. The boundaries of the silenced HMR domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1999; 13: 698-708.
35. Mallin DR, Myung JS, Patton JS, Geyer PK. Polycomb group repression is blocked by the *Drosophila* suppressor of Hairy-wing [Su(Hw)] insulator. *Genetics* 1998; 148: 331-9.
36. Sigrist CJ, Pirrotta V. Chromatin insulator elements block the silencing of a target gene by the *Drosophila* polycomb response element (PRE) but allow trans interactions between PREs on different chromosomes. *Genetics* 1997; 147: 209-21.
37. Lorincz MC, Schubeler D, Goetze SC, Walters M, Groudine M, Martin DI. Dynamic analysis of proviral induction and de novo methylation: implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 842-50.
38. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000; 24: 88-91.
39. Pikaart MJ, Recillas-targa F, Felsenfeld G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 1998; 12: 2852-62.
40. Rivella S, Callegari JA, May C, Tan CW, Sadelain M. The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol* 2000; 74: 4679-87.
41. Lutz M, Burke LJ, Barreto G, et al. Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1707-13.
42. Bhat KM, Farkas G, Karch F, Gyurkovics H, Gausz J, Schedl P. The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. *Development* 1996; 122: 1113-24.
43. Tsukiyama T, Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 1995; 83: 1011-20.
44. Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F. The trithorax like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 1994; 371: 806-8.

RÉFÉRENCES

45. Dunaway M, Hwang JY, Xiong M, Yuen HL. The activity of the *scs* and *scs'* insulator elements is not dependent on chromosomal context. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 182-9.
46. Krebs JE, Dunaway M. The *scs* and *scs'* insulator elements impart a cis requirement on enhancer-promoter interaction. *Mol Cell* 1998; 1: 301-8.
47. Bickel S, Pirrotta V. Self-association of the *Drosophila* Zeste protein is responsible for transvection effects. *EMBO J* 1990; 9: 2959-67.
48. Robinson DN, Cooley L. *Drosophila* kelch is an oligomeric ring canal actin organizer. *J Cell Biol* 1997; 138: 799-810.
49. Katsani KR, Hajibagheri MA, Verrijzer CP. Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology. *EMBO J* 1999; 18: 698-708.
50. Yoshida C, Tokumasu F, Hohmura KI, *et al.* Long range interaction of *cis*-DNA elements mediated by architectural transcription factor Bach1. *Genes Cell* 1999; 4: 643-55.
51. Corces V. Keeping enhancers under control *Nature* 1995; 376: 462-3.
52. Namciu SJ, Blochlinger KB, Fournier REK. Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2382-91.
53. Zhao K, Hart CM, Laemmli UK. Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* 1995; 81: 879-89.

Summary

Chromatin insulators and nuclear BTB/POZ proteins

The BTB/POZ is an evolutionarily conserved protein/protein interaction motif. It is present both in cytoplasmic proteins believed to contribute to the organization of the cytoskeleton, and in nuclear proteins, several of them appearing involved in human cancerogenesis. Nuclear BTB/POZ proteins usually interact (directly or indirectly) with DNA and are therefore presumably devoted to the regulation of genetic expression. Recent studies in *Drosophila* demonstrate that some of the DNA *cis*-acting sequences bound by nuclear BTB/POZ proteins (encoded by the *mod(mdg4)* and *trithorax-like* genes) are insulator elements which are unable to directly modulate promoter activity but can shield them from the influence of both enhancer and silencer elements. Both genetical and biochemical evidences point to the role of nuclear BTB/POZ proteins, in particular those encoded by *mod(mdg4)* and *trithorax-like*, in the regulation of chromatin modeling. Moreover, most of them form large homomultimeric complexes *in vitro* and/or *in vivo* so that they are able to bring together distant *cis*-regulatory elements when bound to DNA. These properties can, in part, underly the ability of some of them to directly regulate insulator activity.

54. Kim TA, Lim J, Ota S, *et al.* NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J Cell Biol* 1998; 141: 553-66.
55. Aoki K, Meng G, Suzuki K, *et al.* RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression. *J Biol Chem* 1998; 273: 26698-704.
56. Horard B, Tatout C, Poux S, Pirrotta V. Structure of a polycomb response element and *in vitro* binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3187-97.
57. Zhou J, Levine M. A novel *cis*-regulatory element, the PTS, mediates an anti-insulator activity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1999; 99: 567-75.
58. Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, *et al.* Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 1997; 87: 105-14.
59. Ahmad KF, Engel CK, Privé GG. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 95: 12123-8.