

На правах рукописи

УДК 577.214.4:575.22

**ЧЕТВЕРИНА ДАРЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**ОБНАРУЖЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ИНСУЛЯТОРА  
У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Специальность 03.00.26 - молекулярная генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва

2008

Работа выполнена в лаборатории Регуляции генетических процессов

Института биологии гена РАН

**Научный руководитель:** академик РАН, доктор биологических наук, профессор  
П.Г. Георгиев

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук Е. Н. Набирочкина  
кандидат биологических наук Ю. Я. Шевелев

**Ведущая организация:** Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и  
Ю.А.Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ года в \_\_\_\_\_ часов на заседании  
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им.  
В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан

Ученый секретарь диссертационного совета

канд. фарм. наук

Л.С. Грабовская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.** Геном эукариот обеспечивает сложнейшие программы развития и клеточной дифференцировки. Эти программы осуществляются за счет четкой, последовательной активации и инактивации множества генов, белковые продукты которых взаимодействуют друг с другом. На современном этапе развития молекулярной генетики и смежных с ней наук изучение принципов экспрессии генов является одной из важнейших задач. За последние годы было накоплено много информации о нуклеотидной последовательности ДНК различных организмов. Однако данные о нуклеотидной последовательности генома практически ничего не сообщают о роли отдельных последовательностей в регуляции экспрессии генов. В настоящее время важной задачей является идентификация последовательностей, вовлеченных в регуляцию транскрипции. Анализ возможностей и роли внутригеномных последовательностей несомненно необходим для понимания принципов контроля и поддержания экспрессии генов. Это определяет актуальность таких работ в настоящее время.

Тканеспецифичная и различающаяся на разных стадиях развития организма активация транскрипции генов высших эукариот зависит от активного статуса цис-регуляторных ДНК-элементов: промотора гена, на котором собираются белки основного транскрипционного комплекса, и энхансера, который, посредством регуляторных белков, усиливает транскрипцию гена.

Энхансеры высших эукариот способны активировать гены на больших расстояниях, достигающих нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. Эти регуляторные элементы действуют вне зависимости от положения относительно направления транскрипции гена. Существует несколько моделей функционирования энхансеров, большинство из них предполагает, что белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с белками, собранными на промоторе, а ДНК между ними выпетливается. Энхансеры практически не обладают специфичностью действия, следовательно, у высших эукариот должны были выработаться механизмы, контролирующие и ограничивающие способность энхансеров к активации генов, направляющие энхансер на активирование только определенного промотора, и, таким образом, определяющие специфичность его действия.

Помимо энхансеров, активирующих экспрессию генов, в геноме был найден другой класс регуляторных элементов, репрессирующих транскрипцию, – сайленсеры. Сайленсеры репрессируют транскрипцию генов, и так же, как и энхансеры, они действуют вне

зависимости от их положения относительно направления транскрипции гена и не обладают специфичностью действия.

Предполагается, что важная роль в контроле специфичности действия энхансеров и сайленсеров принадлежит еще одному типу регуляторных ДНК элементов – инсуляторам. Инсуляторы блокируют активность энхансера (сайленсера), но это происходит только в том случае, если инсулятор находится между энхансером (сайленсером) и промотором гена. При этом инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера, сайленсера и промотора: энхансер (сайленсер) сохраняет способность влиять на незаблокированный инсулятором промотор, а промотор может быть активирован (репрессирован) другим энхансером (сайленсером). В настоящее время, несмотря на достаточно большое количество предложенных моделей действия инсуляторов, детальный механизм их функционирования остается неизвестным.

Большой прогресс в выяснении принципов работы инсуляторов стал возможен в результате использования трансгенных модельных систем с репортерными генами и энхансерами. Одна из популярных трансгенных систем включает использование гена *mini-white* (модифицированного гена *white*, белковый продукт которого необходим для пигментации глаз у *Drosophila melanogaster*) и его тканеспецифичный энхансер. Однако даже хорошо изученная модельная система может преподнести «сюрпризы».

Данная работа посвящена обнаружению и изучению энхансер-блокирующей активности нового инсулятора, названного нами Wari (от **White-Abutting Resident Insulator** - инсулятор, сопутствующий гену *white*). В геноме этот инсулятор находится между расположенными друг за другом генами *white* и CG32795 и присутствует во всех модельных системах, использующих ген *mini-white*. Выявлена зависимость энхансер-блокирующей активности от наличия двух инсуляторов, один из которых или оба представлены Wari-инсулятором. Продемонстрировано, что взаимодействие Wari-инсулятора с другими инсуляторами может реализовываться как в усилении инсуляции, так и в ее «нейтрализации».

**ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Основной целью работы явилось изучение энхансер-блокирующих свойств нового инсулятора (названного впоследствии Wari), обнаруженного между генами *white* и CG32795 у *D.melanogaster*.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) Подтвердить присутствие инсулятора за геном *white* у *D.melanogaster*.
- 2) Выяснить возможность влияния Wari-инсулятора на активность других инсуляторных элементов.

- 3) Выявить функциональную область Wari-инсулятора.
- 4) Проверить, входит ли в состав Wari-инсулятора промотор гена CG32795.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ.** В работе впервые показано наличие инсулятора между генами *white* и CG32795. Продемонстрировано, что Wari-инсулятор влияет на энхансер-блокирующую активность других инсуляторов: Wari (своей второй копии) и двух Su(Hw)-зависимых инсуляторов, Su(Hw) и 1A2. Показано, что энхансер-блокирующая активность Wari-инсулятора не связана с инсуляторными белками Su(Hw), Mod(mdg4)-67.2. Полученные данные позволили сделать модельную систему более «чистой» (удаление Wari-инсулятора из модельной системы позволяет избежать его влияния) и проанализировать энхансер-блокирующую активность Su(Hw)-зависимых инсуляторов, Su(Hw) и 1A2, в отсутствие Wari-инсулятора. Результаты данной работы расширяют представление о регуляторных элементах с энхансер-блокирующими свойствами и позволяют по-новому взглянуть на механизм действия инсуляторов, опровергая упрощенные модели их функционирования.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Результаты диссертационной работы были представлены на 10-й международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2006); на международных конференциях Meeting of International Research Scholars HHMI (Merida, Mexico, 2005); Workshop on Molecular and Cell Biology at Spetsai (Spetses, Greece, 2006); 4<sup>th</sup> Elmau conference on nuclear organization, EMBO (Gosau, Austria, 2006); 48th Annual Drosophila Research Conference (Philadelphia, PA, 2007); 7th Young Scientist Forum and 32nd FEBS Congress (Vienna, Austria, 2007); Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics (Kyiv, Ukraine, 2007).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ. Из них статей – 2, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях – 7.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.** Диссертация изложена на 127 страницах, содержит 27 рисунков и 3 таблицы, состоит из Введения, Обзора литературных данных, Материалов и методов, Результаты исследования, Обсуждения, Выводов и Списка литературы, включающего 138 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА I. Новый инсулятор обнаружен непосредственно за геном *white*

Для создания трансгенных конструкций во многих лабораториях мира часто используют плазмидный вектор pCaSpeR. Он содержит ген *mini-white* между 5' и 3'-концами Р-элемента, включающими концевые инвертированные повторы, необходимые для интеграции конструкции в геном *Drosophila melanogaster*. После кодирующей части гена *mini-white* данный вектор содержит последовательность ДНК генома *Drosophila melanogaster* длиной почти 1 т.п.н. (Рис. 1). В геноме эта последовательность находится между расположенными друг за другом генами *white* и CG32795. В нашей лаборатории при изучении роли инсуляторов (их свойства блокировать энхансеры) время от времени появлялись данные, позволяющие предположить возможность существования за геном *mini-white*, используемого в качестве репортерного гена в трансгенных конструкциях, инсулятор-подобного элемента. Таким образом, **первой задачей настоящего исследования было выяснение присутствия инсулятора за геном *mini-white*.**

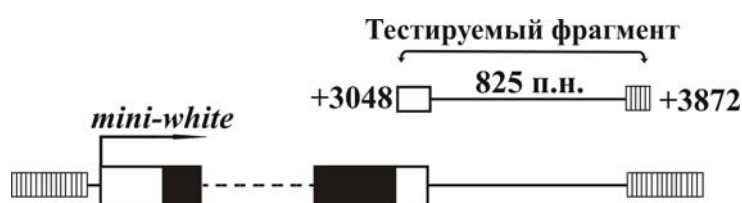


Рис. 1. Схематическое изображение плазмидного вектора pCaSpeR. Отмечен 825 п.н. фрагмент, тестируемый на энхансер-блокирующую активность. Цифрами обозначены первый и последний нуклеотиды тестируемого фрагмента относительно старта транскрипции гена *mini-white*. Белые прямоугольники обозначают некодирующие области гена *mini-white*, черные – кодирующие области гена *mini-white*, заштрихованные – концы Р-элемента.

Чтобы проверить данное предположение, мы использовали стандартную тест-систему, содержащую ген *mini-white* и его тканеспецифичный энхансер. Ген *mini-white* представляет собой ген *white*, у которого делетирована значительная часть первого интрона. Ген *white* отвечает за пигментацию глаз, он находится под контролем тканеспецифичного энхансера, обеспечивающего высокую экспрессию гена *white* в глазах мух ( $E_{en}$ , далее энхансер глаз). Энхансер глаз гена *white* способен активировать экспрессию гена *mini-white*. Уровень экспрессии гена *mini-white* легко оценивать фенотипически по пигментации глаз: красная окраска является пигментацией глаз мух дикого типа (энхансер-зависимая экспрессия гена *mini-white*); желтая и темно-желтая окраски представляют собой средне-статистическое

проявление базовой пигментации (экспрессия гена *mini-white* в отсутствие энхансера), белая окраска глаз наблюдается в отсутствие пигментации (у мух с инактивированным геном *mini-white*).

Для тестирования на инсуляцию был выбран ДНК-фрагмент длиной 825 п.н (далее: «825 п.н. ДНК-фрагмент») из плазмидного вектора pCaSpeR, включающий участок геномной ДНК, в том числе сигнал полиаденилирования гена *mini-white* и 50 п.н. из Р-элемента (Рис. 1). Этот ДНК-фрагмент был фланкирован сайтами FRT для сайт-специфической рекомбиназы Flp. Индукция сайт-специфической рекомбинации между FRT-сайтами позволяет удалить фланкированный этими сайтами участок *in vivo*, в результате можно сравнить экспрессию гена *mini-white* в присутствии и в отсутствие тестируемого фрагмента в одном и том же месте генома. 825 п.н. ДНК-фрагмент, фланкированный сайтами FRT, был вставлен между энхансером глаз гена *white* и геном *mini-white* (рис. 2А). Оказалось, что пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих такую конструкцию, находится в диапазоне от Оранжевого до Коричневого (рис. 2А). Такая пигментация значительно меньше, чем при энхансер-зависимой экспрессии гена *mini-white*. Такой результат позволил предположить, что активность энхансера скорее всего существенно заблокирована вставленной между геном и энхансером 825 п.н. ДНК-последовательностью. Это предположение было подтверждено делецией встроенного между сайтами FRT тестируемого ДНК-фрагмента. Делеция ( $\Delta$ frt) восстановила активацию гена энхансером, пигментация глаз стала Коричневой или Красной (рис. 2А). Таким образом, тестируемый фрагмент способен предотвращать активацию промотора гена *mini-white* энхансером глаз.

Способность тестируемого 825 п.н. ДНК-фрагмента предотвращать активацию генов энхансерами была подтверждена и в системе с двумя маркерными генами: содержащей, кроме энхансера глаз и гена *mini-white*, ген *yellow* и его тканеспецифичные энхансеры (рис. 2Б). Ген *yellow* отвечает за пигментацию кутикулярных структур личинки и имаго и находится под контролем нескольких тканеспецифичных энхансеров. В данной конструкции присутствовали энхансеры, определяющие экспрессию гена *yellow* в кутикуле тела и в крыловых пластинках (далее энхансеры тела ( $B_{en}$ ) и крыльев ( $W_{en}$ )). Изменения в экспрессии гена *yellow*, так же как и гена *mini-white*, легко оценивать фенотипически: уровень пигментации кутикулярных структур оценивается по пятибалльной шкале, где 5 соответствует уровню пигментации дикого типа (энхансер-зависимая экспрессия гена *yellow*), 2 соответствует базовому уровню пигментации (экспрессия гена *yellow* в отсутствие энхансера), 1 соответствует отсутствию

пигментации ( $y^1$  аллель – полная инактивация гена *yellow*), 3 и 4 – частичная активация энхансерами базовой транскрипции.

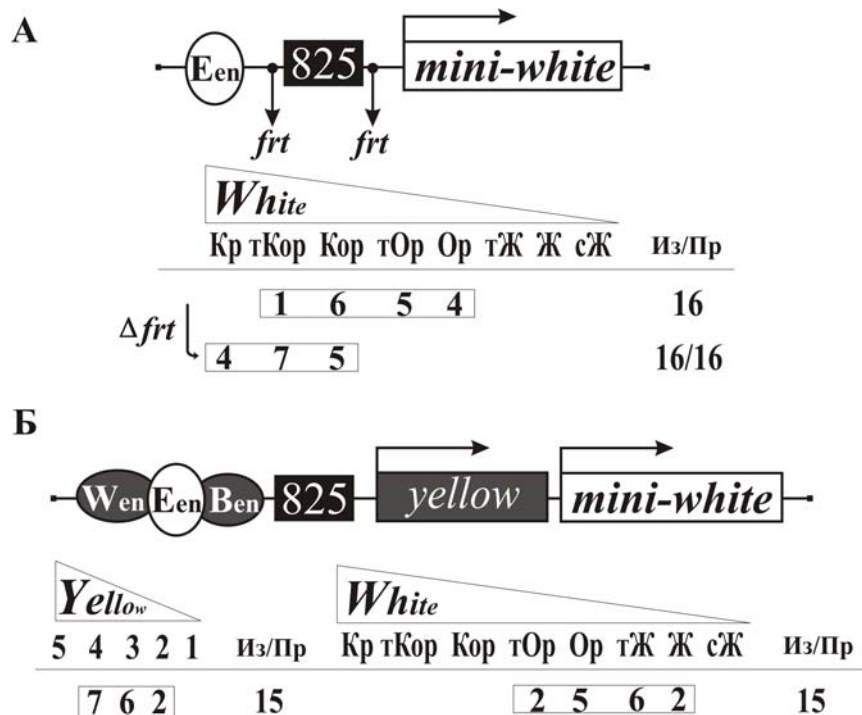


Рис. 2. Энхансер-блокирующая активность 825 п.н. ДНК-фрагмента. А) Блокирование энхансера глаз гена *white*. Б) Блокирование энхансеров тела и крыльев гена *yellow* и одновременно энхансера глаз гена *white*.

Сверху представлена схема конструкции, под схемой суммированы результаты по фенотипам трансгенных линий мух, несущих эту конструкцию. Обозначения:  $E_{en}$  – энхансер глаз гена *mini-white*;  $W_{en}$  – энхансер крыльев гена *yellow*;  $B_{en}$  – энхансер тела гена *yellow*; серый и белый прямоугольники с горизонтальными стрелками сверху – гены *yellow* и *mini-white*, соответственно; горизонтальными стрелками указано направление транскрипции генов. Вертикальными стрелками отмечены сайты *frit* для сайт-специфической рекомбиназы *Frt*. Пигментация глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *mini-white*: Кр – красный; тКор – темно-коричневый; Кор – коричневый; тОр – темно-оранжевый; Ор – оранжевый; тЖ – темно-желтый; Ж – желтый; сЖ – светло-желтый, Б – белый. Пигментация тела и крыльев, зависящая от уровня экспрессии гена *yellow*: 1 – отсутствие пигментации; 5 – уровень пигментации, соответствующий энхансер-зависимой экспрессии гена; 2-4 – промежуточные уровни. Цифры в строках – число линий с соответствующей пигментацией. Из/Пр – отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение (Из) пигментации при удалении исследуемого элемента, к общему числу проанализированных (Пр) линий.

Ген *yellow* был встроен перед геном *mini-white*. Перед промотором гена *yellow* находились энхансеры тела и крыльев. Между ними был встроен энхансер глаз гена *white* ( $E_{en}$ ). Исследуемый 825 п.н. ДНК-фрагмент был встроен между группой энхансеров и промотором гена *yellow* в положение –893 относительно начала транскрипции гена *yellow*.



При инсерции данной конструкции в геном *Drosophila melanogaster* энхансеры тела и крыльев гена *yellow* практически не активировали ген *yellow* (рис. 2Б), т.е. энхансеры были заблокированы 825 п.н. ДНК-фрагментом. Как и в первой конструкции, энхансер глаз гена *mini-white* также был заблокирован 825 п.н. ДНК-фрагментом. Таким образом, 825 п.н. ДНК-фрагмент способен блокировать как энхансер глаз гена *mini-white*, так и энхансеры тела и крыльев гена *yellow*.

Однако на основе полученных на данном этапе результатов невозможно утверждать, что 825 п.н. ДНК-фрагмент, расположенный за геном *mini-white*, является инсулятором, так как таким же эффектом на уровень транскрипции может обладать и сайленсер. Как известно, инсуляторы ограничивают активность энхансеров в зависимости от взаимного расположения регуляторных элементов. Блокирование энхансера происходит только в том случае, если инсулятор находится между энхансером и промотором гена. Активность же сайленсера не обладает позиционной зависимостью. Таким образом, чтобы однозначно ответить на вопрос, является ли 825 п.н. ДНК-фрагмент инсулятором, необходимо было выяснить, меняется ли уровень транскрипции в случае, если 825 п.н. ДНК-фрагмент находится не между энхансером и промотором, а с любой другой стороны от энхансер-промоторной пары. Для этого были созданы 2 конструкции, аналогичные конструкции, приведенной на рис. 2Б, но в одной из них 825 п.н. ДНК-фрагмент был встроен перед энхансерами (рис. 3А), а в другой – в интрон гена *yellow* (рис. 3Б).

825 п.н. ДНК-фрагмент был окружен LOX-сайтами для сайт-специфической рекомбиназы Cre. Аналогично FRT-Flp-системе, индукция сайт-специфической рекомбинации между LOX-сайтами позволяет *in vivo* удалить фрагмент, расположенный между этими сайтами. Энхансеры тела и крыльев гена *yellow* и встроенный между ними энхансер глаз были окружены FRT-сайтами. Пигментация глаз трансгенных линий мух, несущих конструкцию с 825 п.н. ДНК-фрагментом, встроенным перед энхансерами, не была нарушена (рис. 3А). В присутствии и в отсутствие ( $\Delta lox$ ) 825 п.н. ДНК-фрагмента способность энхансеров активировать гены *yellow* и *mini-white* была одинаковой. То, что энхансеры в такой конструкции активны, было дополнительно подтверждено их делецией ( $\Delta ftr$ ). При делеции энхансеров пигментация глаз, тела и крыльев соответствовала базовому уровню экспрессии генов. Таким образом, 825 п.н. ДНК-фрагмент, находящийся перед энхансерами, никак не влиял на уровень транскрипции.

В случае, если 825 п.н. фрагмент находился внутри интрона гена *yellow* (рис. 3Б), энхансеры гена *yellow* эффективно стимулировали ген *yellow*. Энхансер глаз гена *white* был практически полностью заблокирован тестируемым фрагментом, что и должно наблюдаться,

если тестируемый фрагмент является инсулятором, так как он расположен между энхансером глаз и стимулируемым этим энхансером геном *mini-white* (рис. 3Б). Как и ожидалось, делеция тестируемого фрагмента ( $\Delta lox$ ) не изменила уровня экспрессии гена *yellow*, однако восстановила способность энхансера глаз активировать ген *mini-white* (рис. 3Б).

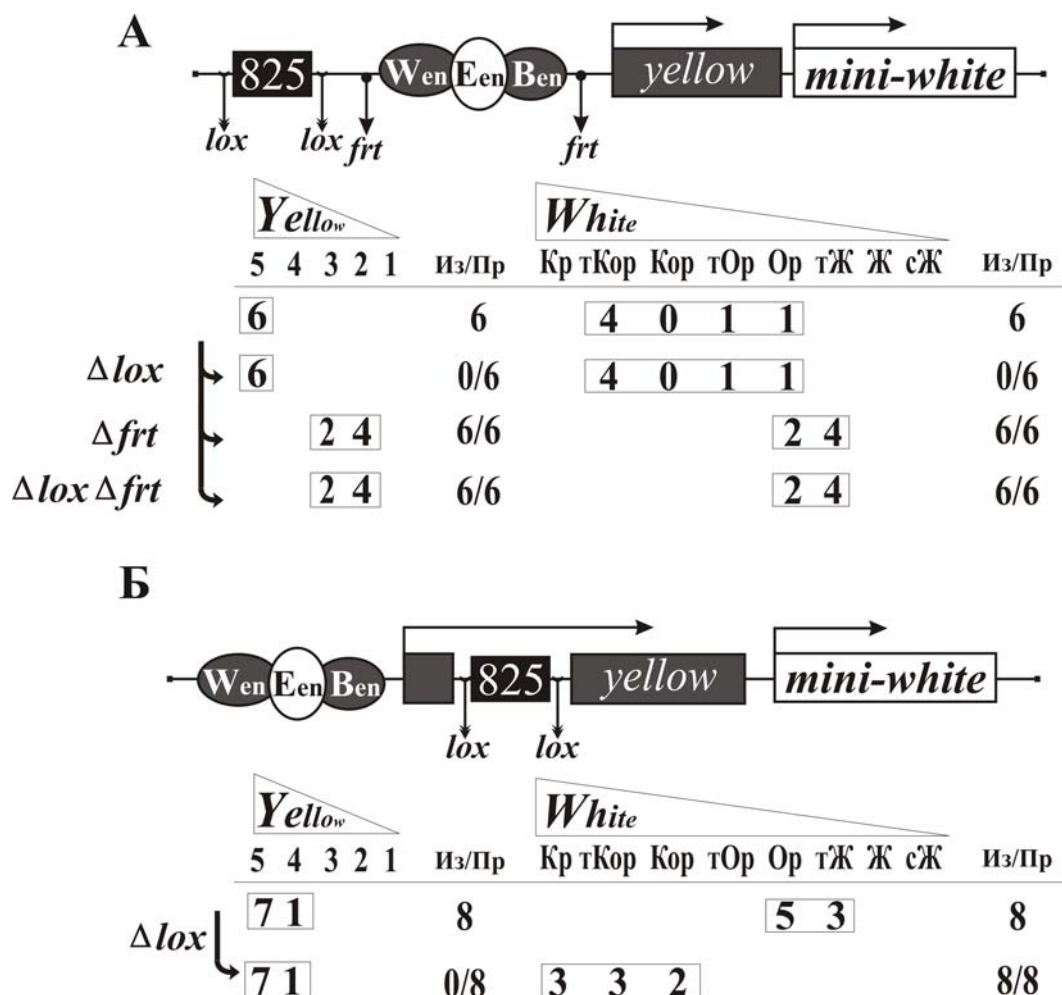


Рис. 3. Энхансер-блокирующая активность 825 п.н. ДНК фрагмента. А) 825 п.н. ДНК-фрагмент встроен перед энхансерами. Б) 825 п.н. фрагмент встроен в интрон гена *yellow*. Обозначения: вертикальными стрелками отмечены сайты *lox* и *frt* для сайт-специфических рекомбиназ Cre и F1p, соответственно. Остальные обозначения как на рис. 2.

Таким образом, можно однозначно утверждать, что элемент, расположенный за геном *white* в геноме *Drosophila melanogaster*, обладает энхансер-блокирующей активностью: он способен предотвращать активацию генов энхансерами, только если расположен между энхансером и промотором гена. Было решено дать протестированному 825 п.н. ДНК-фрагменту название Wari (*White-Abutting Resident Insulator*). Далее этот 825 п.н. ДНК-фрагмент будет называться Wari-инсулятором.

## ГЛАВА II. Влияние Wari-инсулятора на активность инсуляторных элементов

### 1) Влияние Wari-инсулятора на энхансер-блокирующую активность своей второй копии, Su(Hw)- и 1A2-инсуляторов; усиление инсуляции.

Необходимо отметить, что в экспериментах, изложенных в Главе I, одновременно присутствовали сразу две копии Wari-инсулятора: одна – тестируемая, вторая – расположенная за геном *mini-white*.

Ранее для некоторых инсуляторов было продемонстрировано, что они способны функционально взаимодействовать между собой. Такие взаимодействия могут приводить либо к усилению, либо к «нейтрализации» инсуляции (к неспособности инсуляторов блокировать энхансеры). Вполне возможно, что два Wari-инсулятора тоже могут взаимодействовать друг с другом.

Поэтому следующей задачей стало **выяснение влияния копии Wari-инсулятора, находящейся за геном *mini-white*, на энхансер-блокирующую активность тестируемого Wari-инсулятора.**

Для этого была создана конструкция, аналогичная используемым ранее (рис. 2Б и рис. 3), но отличающаяся тем, что с 3'-стороны гена *mini-white* была делетирована последовательность, соответствующая Wari-инсулятору, (на рисунках такая делеция обозначена как  $W^{\Delta}$ ) и заменена на точно такую же, но фланкированную LOX-сайтами (на рисунках обозначена как  $W^{\Delta}(\text{Wari})$ ). Второй Wari-инсулятор, окруженный FRT-сайтами, был встроен между группой энхансеров ( $W_{\text{en}}$ ,  $B_{\text{en}}$  – энхансеры гена *yellow*,  $E_{\text{en}}$  – энхансер гена *mini-white*) и промотором гена *yellow* в положении -893 относительно старта транскрипции гена *yellow* (рис. 4).

Пигментация глаз, тела и крыльев трансгенных линий мух, несущих такую конструкцию  $[\text{En}(\text{Wari})YW^{\Delta}(\text{Wari})]$ , была на уровне или чуть выше уровня базовой экспрессии генов *yellow* и *mini-white*. Делеция Wari-инсулятора, находящегося за геном *mini-white*  $[\text{En}(\text{Wari})YW^{\Delta}]$ , привела к значительному усилению пигментации глаз, тела и крыльев мух, т.е. один Wari-инсулятор, расположенный между энхансерами и промотором гена *yellow*, слабо блокировал активацию генов энхансерами (рис. 4). Делеция Wari-инсулятора, расположенного между энхансерами и промотором гена *yellow*  $[\text{En}YW^{\Delta}(\text{Wari})]$ , так же как и делеция обоих Wari-инсуляторов  $[\text{En}YW^{\Delta}]$ , привела к полному восстановлению энхансер-зависимой активации

генов: пигментация глаз, тела и крыльев мух соответствовала пигментации мух дикого типа (рис. 4).

Таким образом, **Wari-инсулятор**, находящийся за геном *mini-white*, необходим для **эффективного блокирования энхансеров Wari-инсулятором**, находящимся между энхансерами и промотором гена *yellow*.

Этот результат отражает наличие функционального взаимодействия между двумя Wari-инсуляторами. Как говорилось выше, такое функциональное взаимодействие было показано для других инсуляторов. Наиболее вероятно, что происходит физическое взаимодействие между двумя Wari-инсуляторами, приводящее к выпетливанию участка ДНК между инсуляторами, более эффективно изолируя промоторы генов от энхансеров.

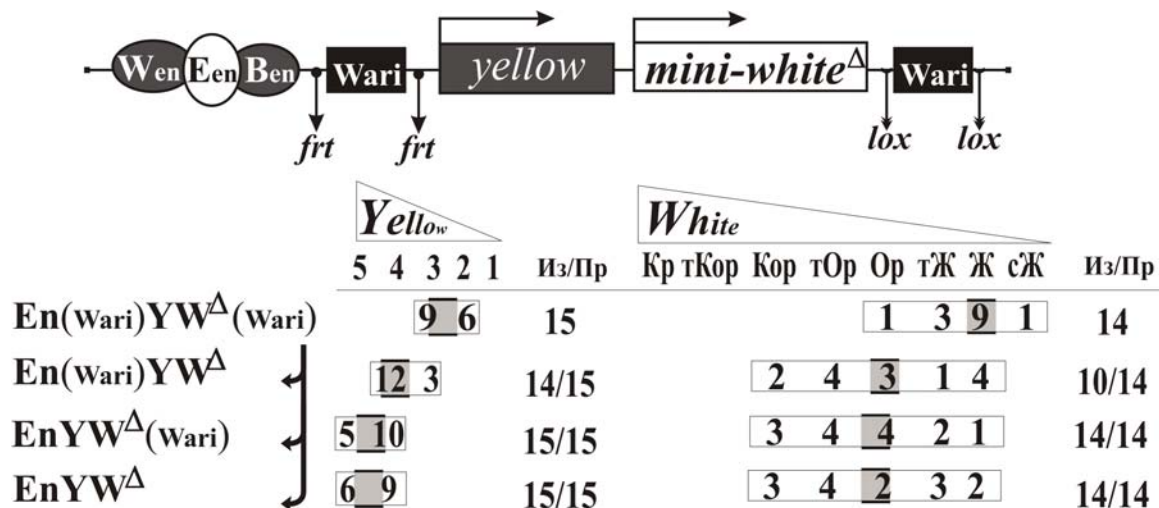


Рис. 4. Влияние Wari-инсулятора, расположенного за геном *mini-white*, на энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора, расположенного между энхансером и промотором: усиление инсуляции. Обозначения: черный семиугольник – инсулятор Wari. Сокращения в названиях линий: En – энхансеры тела и крыльев гена *yellow* и энхансер глаз гена *white*; Y – ген *yellow*; W – ген *white*; элементы, заключенные в скобки, фланкированы сайтами *frt* или *lox*, символом Δ обозначена делеция Wari-инсулятора за геном *mini-white*. Серым курсором на цифровой панели указано среднее значение фенотипа в анализируемых линиях мух. Остальные обозначения как на рис. 2.

Полученные данные о таком сильном эффекте второй копии Wari-инсулятора привели к закономерному вопросу о возможности влияния Wari-инсулятора, расположенного за геном *mini-white*, на энхансер-блокирующую активность других инсуляторов. Для ответа на это вопрос были выбраны два хорошо изученных инсулятора: Su(Hw)-инсулятор из ретротранспозона МДГ4 и 1A2-инсулятор. Активности обоих инсуляторов зависят от ДНК-связывающего белка Su(Hw).

Были созданы две аналогичные предыдущей (рис. 4) конструкции: одна – с Su(Hw)-инсулятором (рис. 5А), вторая – с 1A2-инсулятором (рис. 5Б). Su(Hw)- и 1A2-инсуляторы, как и Wari-инсулятор в предыдущей конструкции, были встроены между группой энхансеров и промотором гена *yellow* в положение -893 относительно старта транскрипции гена *yellow*.

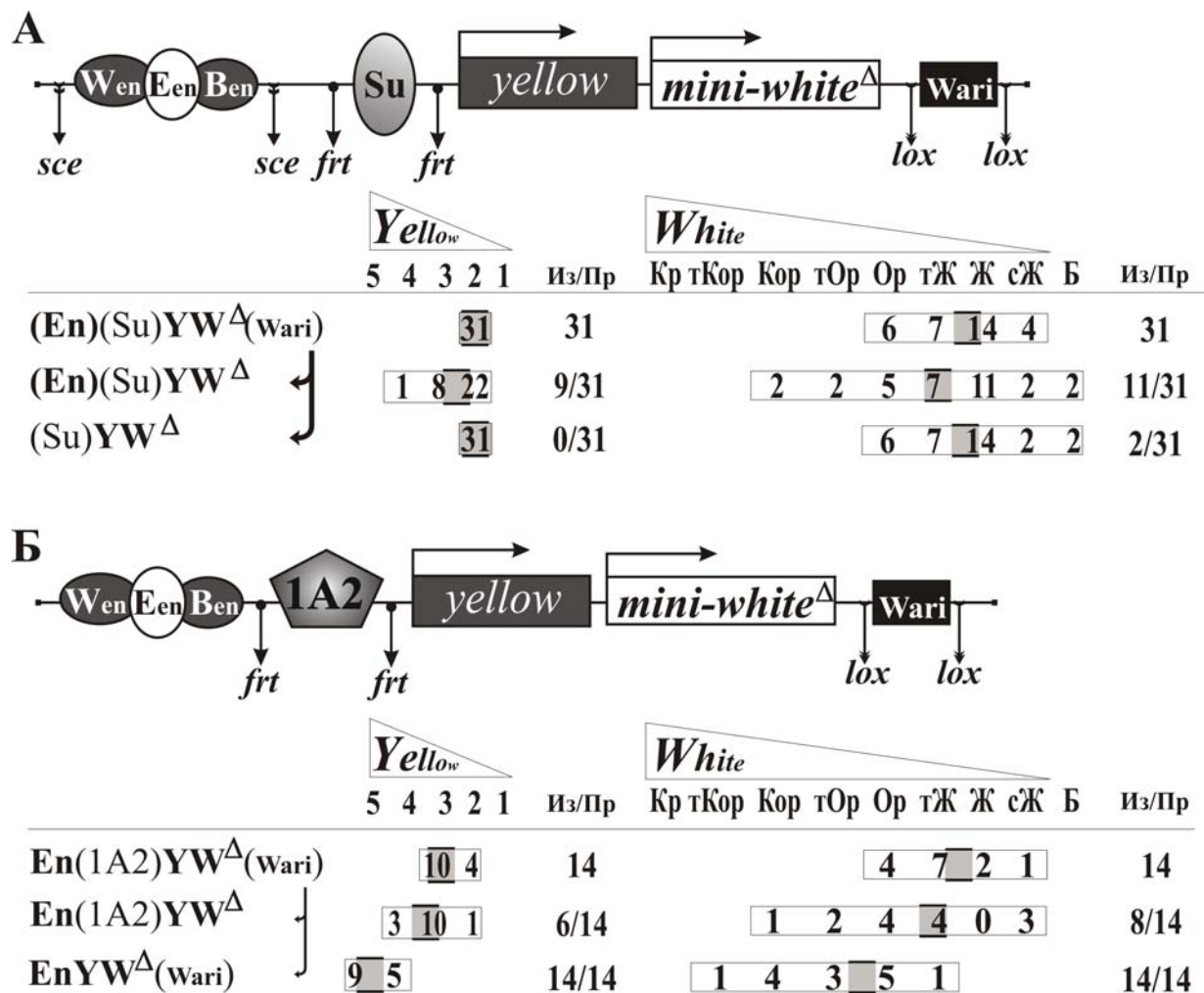


Рис. 5. Влияние Wari-инсулятора, расположенного за геном *mini-white*, на проявляемую Su(Hw)-инсулятором (А) и 1A2-инсулятором (Б) энхансер-блокирующую активность: усиление инсуляции. Обозначения как на рис. 4. Вертикальные стрелки с символом «sce» обозначают сайты эндонуклеазы рестрикции SceI.

Активность энхансеров в трансгенных линиях мух, несущих данные конструкции, была полностью заблокирована в ситуации с Su(Hw)-инсулятором (рис. 5А, [(En)(Su)YW<sup>Δ</sup>(Wari)]) и практически полностью заблокирована в ситуации с 1A2-инсулятором (рис. 5Б, [En(1A2)YW<sup>Δ</sup>(Wari)]).

При делеции Wari-инсулятора наблюдалось значительное падение энхансер-блокирующей активности Su(Hw)- и 1A2-инсуляторов (рис. 5А, [(En)(Su)YW<sup>Δ</sup>] и рис. 5Б, [En(1A2)YW<sup>Δ</sup>]) как для гена *mini-white*, так и гена *yellow*.

Таким образом, показано, что **Wari-инсулятор**, находящийся за геном *mini-white*, влияет на энхансер-блокирующую активность **Su(Hw)-** и **1A2-инсуляторов**, находящихся между энхансерами и промотором гена *yellow*, усиливая инсуляцию.

## **2) Влияние Wari-инсулятора на энхансер-блокирующую активность Wari-, Su(Hw)- и 1A2-инсуляторов, «нейтрализация» инсуляции.**

Как было сказано выше, функциональные взаимодействия между инсуляторами могут приводить к «нейтрализации» инсуляции.

Поэтому следующей задачей было **выяснение возможности проявления функциональных взаимодействий между Wari-инсулятором и Wari-, Su(Hw)- и 1A2-инсуляторами в эффекте «нейтрализации» инсуляции.**

В других работах нашей лаборатории эффект нейтрализации инсуляции наблюдался, если два инсулятора находились между энхансером и промотором на расстоянии в несколько тысяч пар нуклеотидов друг от друга.

Были созданы три конструкции, в которых попарно тестировалась способность инсуляторных элементов к нейтрализации: Wari-Wari, Wari-Su(Hw), 1A2-Wari. Один из инсуляторов был встроен между энхансерами и промотором гена *yellow*, а другой инсулятор, фланкированный LOX-сайтами, был встроен между генами *yellow* и *mini-white* (рис. 6). Расстояние между инсуляторами составляло около 5 т.п.н.

Оказалось, что, если между энхансером глаз и геном *mini-white* находились два инсулятора (один из которых Wari-), то во всех трех конструкциях экспрессия гена *mini-white* была на более высоком уровне, чем в случае, когда присутствовал только один инсулятор (рис. 6). Более высокий уровень экспрессии гена *mini-white* в линиях с двумя инсуляторами отражает стимуляцию промотора гена *mini-white* энхансером глаз, присутствующим в конструкции  $EnWariY(Su)W^{\Delta}$ , так как удаление этого энхансера приводило к резкому падению экспрессии (конструкция  $En^{\Delta e}WariY(Su)W^{\Delta}$ , рис. 6Б). В то же время, экспрессия гена *yellow* не зависела от присутствия инсулятора между генами *yellow* и *mini-white*.

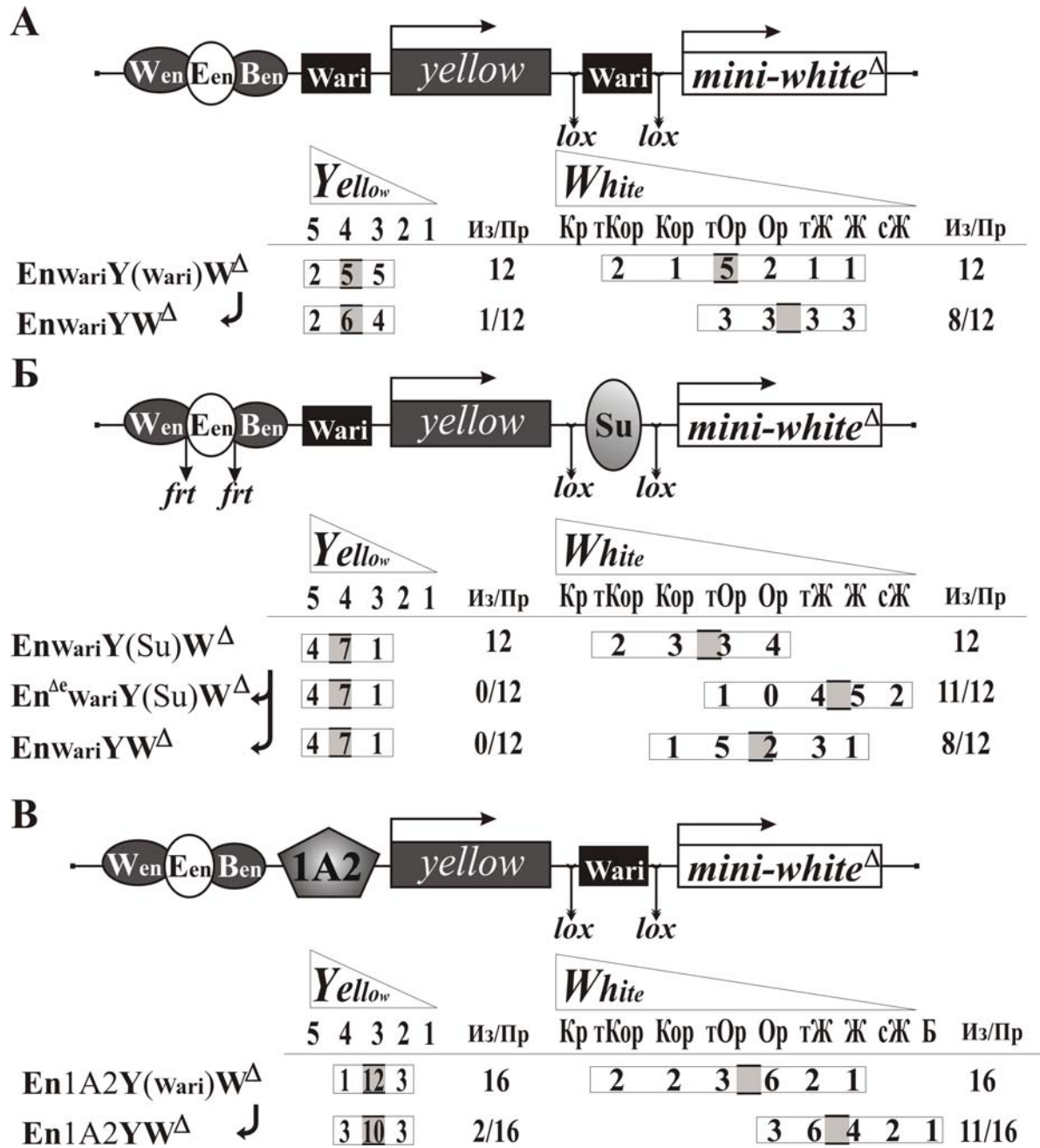


Рис. 6. Влияние Wari-инсулятора на проявляемую другим Wari-инсулятором (А), Su(Hw)-инсулятором (Б) и 1A2-инсулятором (В) энхансер-блокирующую активность: «нейтрализация» инсуляции. Обозначения как на рис. 5.  $En^{\Delta e}$  обозначает делецию энхансера глаз.

Таким образом, инсулятор, расположенный между генами *yellow* и *mini-white*, «нейтрализует» инсулятор, расположенный между энхансерами и промотором гена *yellow* в отношении энхансера глаз гена *mini-white*. Эффект «нейтрализации» инсуляции отражает наличие функциональных взаимодействий между инсуляторами. Наиболее вероятно, что инсуляторы физически взаимодействуют между собой, что, в свою очередь, приводит к



выпетливанию ДНК гена *yellow*, сближая, таким образом, энхансер глаз с промотором гена *mini-white*. В то же время, промотор гена *yellow* остается заблокирован инсулятором.

Таким образом, **функциональные взаимодействия между парами инсуляторов Wari-Wari, Wari-Su(Hw) и 1A2-Wari могут проявляться в эффекте «нейтрализации» инсуляции. В нашем случае это происходит, когда оба инсулятора находятся между энхансерами и промотором гена на расстоянии 5 т.п.н. друг от друга.**

### **3) Wari-инсулятор отличается от других найденных ранее инсуляторов.**

Так как инсуляторы осуществляют свои функции посредством специфических ДНК-связывающих белков, то закономерен вопрос: с помощью каких белков осуществляется энхансер-блокирующая активность Wari-инсулятора и с помощью каких белков реализуется взаимодействие Wari-инсулятора с инсуляторами Su(Hw) и 1A2. Однако анализ ДНК-последовательности Wari-инсулятора не выявил сходств ни с ДНК-последовательностями Su(Hw)- и 1A2-инсуляторов, ни с ДНК-последовательностями других регуляторных элементов, обладающими энхансер-блокирующими активностями. Тестирование ДНК-последовательности Wari-инсулятора на наличие уже известных консенсусов сайтов связывания также не дало результатов: используемая нами программа TRANSFAC(R) Professional r10.2 не выявила сайтов связывания для известных ДНК-связывающих инсуляторных белков: Su(Hw), dCTCF, GAGA, Zw5. Этот факт отличает Wari-инсулятор от других обнаруженных инсуляторных элементов, таких как scs-инсулятор, Fab6, Fab-8 и Msp, Su(Hw)-инсулятор, 1A2-инсулятор, других Su(Hw)-зависимых инсуляторов. Но так как отсутствие консенсуса сайта связывания для белка не является доказательством неспособности этого белка связываться с последовательностью ДНК, то было решено дополнительно проверить, могут ли самые распространенные инсуляторные белки, а именно Su(Hw) и dCTCF, быть вовлечены в энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора.

С использованием метода торможения ДНК-белковых комплексов в геле Wari-инсулятор был протестирован на способность связываться с белками Su(Hw) и dCTCF. Белки Su(Hw) и dCTCF получали *in vitro* с помощью системы сопряженной транскрипции-трансляции. В качестве положительного контроля были использованы 1A2-инсулятор, который имеет 2 сайта связывания белка Su(Hw), и Fab8, который имеет 2 сайта связывания белка dCTCF. В то время как белок Su(Hw) связывался с последовательностью ДНК инсулятора 1A2, а белок dCTCF связывался с последовательностью ДНК инсулятора Fab8, связывания этих белков с последовательностью ДНК Wari-инсулятора не наблюдалось.



Следовательно, эти белки, по крайней мере *in vitro*, в отсутствие каких-либо дополнительных факторов, не связываются с последовательностью ДНК Wari-инсулятора.

Эксперименты с линиями мух с мутациями в генах *su(Hw)* и *mod(mdg4)* также не выявили участия белков Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2 в энхансер-блокирующей активности Wari-инсулятора. Белок Mod(mdg4)-67.2 является вторым белковым компонентом инсуляторного комплекса Su(Hw)-зависимых инсуляторов, он связывается непосредственно с белком Su(Hw) и так же, как и белок Su(Hw), необходим для энхансер-блокирующей активности инсуляторов Su(Hw) и 1A2. В данной работе были использованы линии со следующими мутациями: *mod(mdg4)<sup>u1</sup>* – мутация гена *mod(mdg4)*, представляющая собой вставку ретротранспозона *Stalker* в третий экзон гена, в результате чего у белка Mod(mdg4)-67.2 отсутствует С-концевой домен, отвечающий за взаимодействие с белком Su(Hw); *su(Hw)<sup>v</sup>* – делеция локуса *su(Hw)*, приводящая к полному отсутствию белка Su(Hw); *su(Hw)<sup>2</sup>* – инсерция мобильного элемента *jockey* в первый интрон, приводящая к десятикратному снижению экспрессии гена *su(Hw)*.

Были проанализированы девять независимых линий мух, несущих мутации генов *su(Hw)<sup>v</sup>/su(Hw)<sup>2</sup>* и *mod(mdg4)<sup>u1</sup>/mod(mdg4)<sup>u1</sup>* и содержащих конструкцию, в которой два Wari-инсулятора фланкировали гены *yellow* и *mini-white* (рис. 4). Оказалось, что данные мутации никак не влияют на энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора. Следовательно, белки Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2 не нужны для энхансер-блокирующей активности Wari-инсулятора.

Таким образом, белки, отвечающие за энхансер-блокирующую активность Wari-инсулятора, и белки, посредством которых реализуется способность Wari-инсулятора взаимодействовать с инсуляторами Su(Hw) и 1A2, еще предстоит открыть. Пока можно лишь утверждать, что **Wari-инсулятор отличается от ранее обнаруженных инсуляторов ДНК-связывающими белковыми компонентами**, а также, что **энхансер-блокирующая активность Wari-инсулятора не связана с инсуляторными белками Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2.**

### ГЛАВА III. Выявление функциональной области Wari-инсулятора

В геноме *Drosophila melanogaster* Wari-инсулятор находится между генами *white* и CG32795, в непосредственной близости от предсказанного начала транскрипции гена CG32795 и включает сигнал полиаденилирования гена *white*.

Было решено более детально проанализировать 825 п.н. Wari инсулятор **и выявить функциональную область Wari-инсулятора.**

Для сокращения функциональной области Wari-инсулятора за основу была взята тест-система с двумя маркерными генами, использованная нами для тестирования Wari-инсулятора на энхансер-блокирующую активность (рис. 2Б и рис. 7А), но, в отличие от предыдущей системы, энхансер глаз был фланкирован сайтами FRT для сайт-специфической рекомбиназы *flp* с целью более четкого контроля активности энхансера глаз. Исследуемые фрагменты Wari-инсулятора были фланкированы LOX-сайтами и встроены между энхансерами и промотором гена *yellow* в положение –893 относительно начала транскрипции гена *yellow* (рис. 7А).

Для определения функциональной области Wari-инсулятора, соответствующей меньшей длине ДНК-последовательности, было протестированно 6 фрагментов ДНК Wari-инсулятора: 5'-концевой фрагмент длиной 150 п.н., включающий сигнал полиаденилирования гена *white*; фрагмент длиной 554 п.н., содержащий весь Wari-инсулятор, кроме 5'-концевого фрагмента длиной 150 п.н. и 121 п.н. 3'-области, содержащей 50 п.н. Р-элемента (рис. 7Б). Дополнительно фрагмент Wari-инсулятора длиной 554 п.н. был разбит на два фрагмента, длиной 368 п.н. и 191 п.н., и на два пересекающихся фрагмента, длиной 271 п.н. и 215 п.н. (рис. 7Б).

В результате анализа трансгенных линий мух было выяснено, что делеция 150 п.н. области, содержащей сигнал полиаденилирования гена *white*, не влияла на энхансер-блокирующую активность инсулятора, так как фрагмент длиной 554 п.н. обладал полной инсуляторной активностью Wari-инсулятора (рис. 7Б). по себе 150 п.н. фрагмент инсуляторной активностью не обладал (рис. 7Б). Это означает, что активность Wari-инсулятора не ассоциирована с сигналом полиаденилирования гена *white*. Дополнительная делеция 3'-области Wari-инсулятора также не влияла на способность блокировать энхансеры: фрагмент длиной 191 п.н. инсуляторной активностью не обладал (рис. 7Б), в то время как фрагмент длиной 368 п.н. обладал полной инсуляторной активностью Wari-инсулятора (рис. 7Б).

В результате проведенных экспериментов функциональная область Wari-инсулятора была сокращена до 368 п.н. (45% исходной длины). Однако дальнейшее сокращение Wari-инсулятора привело к резкому уменьшению способности тестируемых фрагментов блокировать энхансеры генов *yellow* и *white*. Два перекрывающихся фрагмента длиной 271 п.н. и 215 п.н. лишь частично (по сравнению с полным инсулятором) блокировали энхансеры (рис. 7Б).

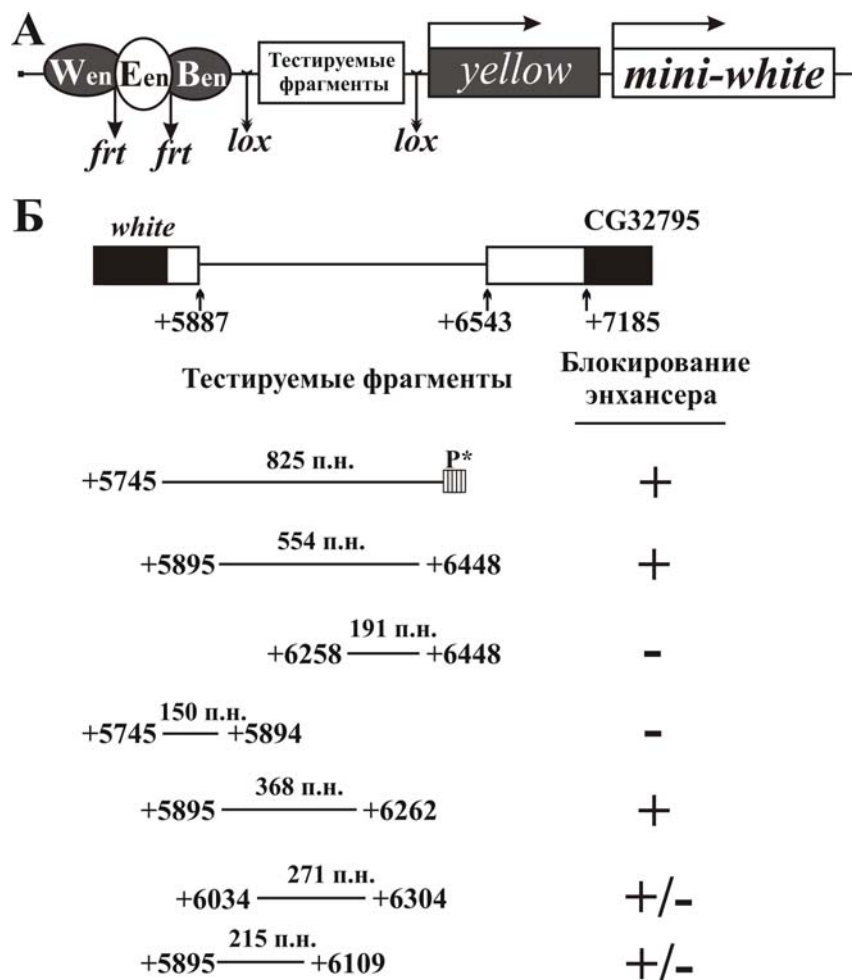


Рис. 7. Поиск функциональной области Wari-инсулятора.

А) Модельная система для тестирования ДНК-фрагментов Wari-инсулятора на способность блокировать энхансеры тела и крыльев гена *yellow* и энхансер глаз гена *mini-white*.

Б) Сверху представлено схематическое изображение изучаемой области. Черные прямоугольники – кодирующие части генов *white* и CG32795, белые прямоугольники – 3'-НТО и 5'-НТО генов *white* и CG32795, соответственно.

P\* – 50 п.н. фрагмент P-элемента из вектора pCaSpeR, содержащийся в 825 п.н. Wari-инсуляторе.

Цифрами обозначено положение тестированных ДНК фрагментов в геноме относительно старта транскрипции гена *white*. Сверху схематически изображенных фрагментов обозначена их длина. Колонка справа суммирует результаты энхансер-блокирующей активности тестированных фрагментов.

«+» – фрагменты Wari-инсулятора, обладающие исходной энхансер-блокирующей активностью;

«-» – фрагменты Wari-инсулятора, не способные блокировать энхансеры;

«+/-» – фрагменты Wari-инсулятора, обладающие частичной, по сравнению с полным Wari-инсулятором, энхансер-блокирующей активностью.

Таким образом, можно сделать вывод, что энхансер-блокирующая активность Wari-инсулятора не зависит от присутствия сигнала полиаденилирования гена *white*.

**Выявлена функциональная область Wari-инсулятора: она расположена внутри 825 п.н. фрагмента и её длина не превышает 368 п.н.**

#### **ГЛАВА IV. Проверка Wari-инсулятора на наличие в его составе промотора гена CG32795**

Существует несколько моделей действия инсуляторов. Часть из них основана на конкуренции инсулятора с промотором за активность энхансера. Такие модели предполагают, что инсулятор может являться промотором и выступать как «псевдопромотор», перехватывая сигнал энхансера. Как было сказано, в геноме *Drosophila melanogaster* Wari-инсулятор находится между генами *white* и CG32795, в непосредственной близости от предсказанного начала транскрипции гена CG32795. Таким образом, нельзя исключить, что 825 п.н. тестируемый фрагмент может содержать промотор гена CG32795, и что именно промоторная активность обуславливает способность Wari-инсулятора блокировать энхансеры.

Для выяснения этого вопроса в данной работе применили систему определения промоторной активности в эмбриональной клеточной линии S2 *Drosophila* с использованием плазмид, несущих гены люциферазы светлячка и люциферазы медузы.

Для тестирования промоторной активности Wari-инсулятора было выбрано 7 фрагментов ДНК: полный Wari-инсулятор (длиной 825 п.н.); фрагменты Wari-инсулятора, использованные ранее (длиной 554 п.н. и 191 п.н.); фрагмент 1291 п.н. (содержащий область геномной ДНК, 5'-конец которой соответствовал 554 п.н. фрагменту, а 3'-конец заканчивался перед инициаторным кодоном трансляции, т.е. данный фрагмент содержал сокращенный до 368 п.н. инсулятор и всю 5'-НТО гена CG32795; фрагмент длиной 736 п.н., содержащий всю 5'-НТО гена CG32795, за исключением Wari-инсулятора; фрагмент длиной 285 п.н., содержащий 3'-конец полного Wari-инсулятора и область до предсказанного старта транскрипции гена CG32795; фрагмент длиной 93 п.н., содержащий область от Wari-инсулятора до предсказанного старта транскрипции гена CG32795 (рис. 8).

Все тестируемые фрагменты были встроены в плазмидный вектор pGL-3-Basic перед кодирующей областью гена люциферазы светлячка (Fluc, firefly luciferase) в двух ориентациях. Исходный плазмидный вектор pGL-3-Basic перед кодирующей частью гена люциферазы светлячка не содержит своего промотора. Для контроля эффективности трансфекции S2 клетки были котрансфецированы тестируемыми плазмидами и плазмидой pAcRL. Плазмида pAcRL содержит кодирующую часть гена люциферазы медузы (Rluc, Renilla luciferase) под контролем актинового промотора. Активности люцифераз определяли

на люминометре с помощью системы детекции, позволяющей отдельно измерять активность люциферазы медузы и активность люциферазы светлячка в одной пробе.

Специфический сигнал определяли по отношению активности люциферазы светлячка к активности люциферазы медузы. Фоновый уровень определяли по уровню люминесценции не трансфицированных клеток. Уровень люминесценции клеток, трансфицированных вектором pGL3-Basic, не содержащим промотора, был равен уровню люминесценции не трансфицированных клеток.

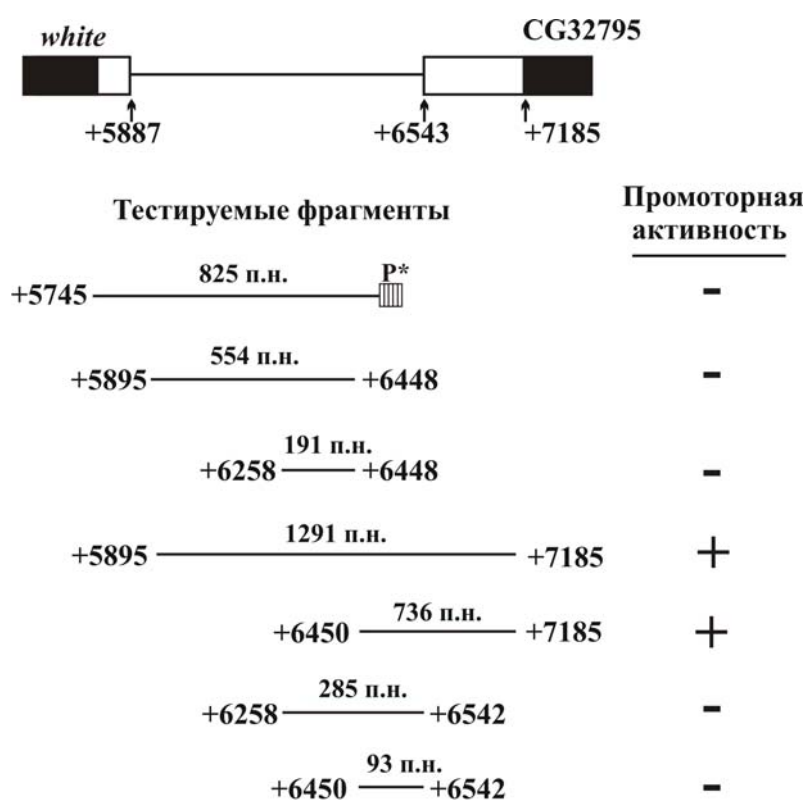


Рис. 8. Определение промоторной активности *Wari*-инсулятора.

Сверху представлено схематическое изображение изучаемой области. Черные прямоугольники – кодирующие части генов *white* и *CG32795*, белые прямоугольники – 3'-НТО и 5'-НТО генов *white* и *CG32795*, соответственно. Цифрами обозначено положение анализируемых ДНК-фрагментов относительно старта транскрипции гена *white*.

Сверху схематически изображенных фрагментов обозначена их длина.

«+» – фрагменты, обладающие промоторной активностью; «-» – фрагменты, не обладающие промоторной активностью.

В результате анализа люциферазной активности в клетках, трансфицированных тестируемыми плазмидами, нами было обнаружено, что промоторной активностью обладали только два фрагмента в прямой ориентации: фрагмент длиной 1291 п.н. и фрагмент длиной 736 п.н. (рис. 8). Ни 825 п.н. фрагмент, ни другие фрагменты, не включающие 5' – НТО гена

CG32795, промоторной активностью не обладали (рис. 8), что говорит о том, что промотор гена CG32795 не входит в состав Wari-инсулятора.

Следовательно, можно утверждать, что **энхансер-блокирующая активность Wari-инсулятора не ассоциирована с промоторной активностью гена CG32795.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе обнаружен новый инсулятор и изучены его свойства. Этот инсулятор находится в геноме *Drosophila melanogaster* между генами *white* и CG32795. Новый инсулятор был назван Wari. Оказалось, что Wari-инсулятор присутствует во всех модельных системах, содержащих ген *mini-white*, и расположен непосредственно за этим геном. Показано, что Wari-инсулятор блокирует энхансеры тела и крыльев гена *yellow* и энхансер глаз гена *white*.

Продемонстрировано, что Wari-инсулятор, находящийся за геном *mini-white*, усиливает инсуляцию своей собственной копии, расположенной между энхансером и промотором гена. Этот эффект можно объяснить физическим взаимодействием между двумя Wari-инсуляторами. Вероятно, в результате такого взаимодействия, ДНК между инсуляторами образует петлю, а блокирование энхансеров усиливается за счет образования более массивного белкового комплекса, ограничивающего энхансеры от промоторов генов.

Выяснено, что белки Su(Hw) и Mod(mdg4)-67.2, являющиеся белковыми компонентами Su(Hw)-зависимых инсуляторов, не требуются для проявления энхансер-блокирующей активности Wari-инсулятора. Тем не менее, Wari-инсулятор способен функционально взаимодействовать, хотя и слабее, чем с Wari-инсулятором (своей второй копией), с Su(Hw)- и 1A2-инсуляторами, влияя на их энхансер-блокирующую активность. Это свойство Wari-инсулятора может объясняться возможным участием общих белковых компонентов инсуляторных комплексов. Так, недавно в одной из работ другой лаборатории было показано, что, хотя Su(Hw) и dCTCF белки не взаимодействуют друг с другом и их сайты связывания не перекрываются на политенных хромосомах, они оба взаимодействуют с белком CP190. Возможно, что CP190 или другой аналогичный белок, присутствующий сразу в нескольких инсуляторных комплексах, может принимать участие во взаимодействиях между разными инсуляторами. Однако какие белки взаимодействуют с Wari-инсулятором, еще предстоит выяснить.

В данной работе показано, что функциональное взаимодействие Wari-инсулятора с Wari-, Su(Hw)- и 1A2-инсуляторами может выражаться как в усилении, так и в «нейтрализации» инсуляции. Полученные данные отражают сложность функциональных

взаимодействий между регуляторными элементами в геноме и подчеркивают неприемлемость упрощенных моделей их действия. В любом случае, становится очевидно, что изучение функциональных свойств инсуляторов должно включать, а предлагаемые модели механизмов их действия должны учитывать возможность взаимодействия с другими инсуляторами.

Одним из важных результатов данной работы является обнаружение ранее неизвестного инсулятора в трансгенной модельной системе, используемой во многих лабораториях мира. Такие трансгенные системы, содержащие ген *mini-white* и, как оказалось, одновременно Wari-инсулятор, использовались для тестирования инсуляторов на энхансер-блокирующую активность, анти-инсуляторную активность регуляторных элементов PTS, барьерную активность инсуляторов и MAR-элементов и просто в качестве маркерного гена.

Как было показано в данной работе на примере инсуляторов Su(Hw) и 1A2, обнаруженный инсулятор мог влиять на проявляемые свойства тестируемых элементов. Вполне вероятно, что Wari-инсулятор мог оказывать влияние и на другие получаемые результаты, и, по крайней мере, некоторые из них должны быть пересмотрены с учетом присутствия в системе Wari-инсулятора и проанализированы в его отсутствие.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружен новый инсулятор у *D.melanogaster*, который находится между генами *white* и CG32795. Этот инсулятор назван инсулятором Wari.
2. Продемонстрировано, что Wari-инсулятор способен функционально взаимодействовать со своей второй копией, а также с Su(Hw)- и 1A2-инсуляторами.
3. Выяснено, что энхансер-блокирующая активность Wari-инсулятора не зависит от сигнала полиаденилирования гена *white*. Показано, что функциональным (обладающим полной энхансер-блокирующей активностью) является участок Wari-инсулятора длиной 368 п.н.
4. Показано, что Wari-инсулятор не обладает промоторной активностью.

## СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах:

1. Chetverina D, Savitskaya E, Maksimenko O, Melnikova L, Zaytseva O, Parshikov A, Galkin AV, Georgiev P. 2008. Red flag on the white reporter: a versatile insulator abuts the *white* gene in *Drosophila* and is omnipresent in *mini-white* constructs. *Nucl. Acids Res.* **36**, 929-937.

2. Максименко О.Г., Четверина Д.А., Георгиев П.Г. 2006. Свойства, механизмы действия инсульторов высших эукариот и их роль в регуляции транскрипции. *Генетика* **42** (8), 1029-1044.

#### Тезисы конференций:

1. Darya Chetverina, Ekaterina Savitskaya, Olga Zaytseva, Alexander Parshikov, Pavel Georgiev. CHARACTERIZATION OF NEW ENDOGENOUS INSULATOR FOUND BETWEEN *WHITE* AND CG32795 GENES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120<sup>th</sup> anniversary of M.I.Vavilov, 20-22 September 2007, Kyiv, Ukraine.
2. D. Chetverina, E. Savitskaya, A. Parshikov, M. Karakozova and P. Georgiev. Characterization of new endogenous insulator located downstream the *white* gene in *Drosophila melanogaster*. 7<sup>th</sup> Young Scientist Forum Molecular Networks (YSF Vienna) July 5-7 2007 and 32<sup>nd</sup> FEBS Congress MOLECULAR MACHINES July 7-12, Vienna, Austria.
3. Pavel G Georgiev, Darya Chetverina. Study of an endogenous insulator found downstream of the *Drosophila mini-white* gene. 48th Annual Drosophila Research Conference, Philadelphia, PA, March 7-11, 2007.
4. Daria Chetverina. Properties of new insulator located at the end of the *white* gene in *D. melanogaster*. 4th Elmau Conference On Nuclear Organization At Gostau, Austria. October 12th – October 15th 2006. EMBO Workshop on Nuclear Organization: Systems Biology Meets Chromatin Function.
5. Daria Chetverina. Study of new insulator located downstream of the *white* gene in *D.melanogaster*. 40 Years' Spetsai Summer School Anniversary. Workshop on Molecular and Cell Biology at Spetsai: Past, Present and Future – A Forty Years Anniversary. Island of Spetses, Greece – 1-5 September 2006.
6. Четверина Д.А., Савицкая Е.Е., Каракозова М.В., Георгиев П.Г. Изучение свойств нового инсультора, локализованного в 3'-нетранслируемой области гена *white* у *D.melanogaster*. Материалы 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 17-21 апреля 2006 г.
7. P. Georgiev, M. Kostuchenko, E. Kravchenko, D. Chetverina, O. Maksimenko, A. Parshikov, L. Melnikova, A. Golovnin. The mechanisms of long-distance interactions and insulator action in *Drosophila melanogaster*. HHMI, Merida, Mexico 2005