

На правах рукописи
УДК 575.22:595.773.4

КРИВЕГА МАРГАРИТА НИКОЛАЕВНА

**Исследование дистанционных взаимодействий между регуляторными
элементами у *Drosophila melanogaster***

03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2008

Работа выполнена в лаборатории «Регуляции генетических процессов» Учреждения Российской академии наук Институт биологии гена РАН.

Научный руководитель:

д.б.н., профессор, академик РАН Георгиев Павел Георгиевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Набирочкина Елена Николаевна

кандидат биологических наук Панкратова Елизавета Владимировна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Защита диссертации состоится 30 октября 2008 года, в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институт биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва., ул. Вавилова, д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан: 30 сентября 2008 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Правильная экспрессия генов организма необходима для обеспечения его существования. Экспрессия генов регулируется при помощи различных цис- и транс-регуляторных элементов. Цис-действующие элементы располагаются на той же хромосоме, что и регулируемые ими гены, транс-действующие – элементы расположенные на другой хромосоме. К подобным элементам относятся сайленсеры, инсуляторы, промоторы и энхансеры. На данный момент накоплено множество экспериментальных данных, показывающих, что эти элементы способны взаимодействовать друг с другом на большом расстоянии (до нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов). Однако механизм подобных взаимодействий недостаточно изучен до сих пор, хотя и было показано, что многие регуляторные элементы способны взаимодействовать друг с другом посредством образования петли.

В понимании механизма взаимодействия регуляторных элементов на дальних расстояниях большую роль играют инсуляторы. Инсуляторы влияют на дальние взаимодействия между энхансерами и промоторами, а также сами способны к дальним взаимодействиям. На данный момент только для одного инсулятора МСР показано существование ориентационной зависимости во взаимодействиях на большом расстоянии. Является ли это общим свойством инсуляторов неизвестно. В настоящее время один из наиболее изученных инсуляторов – инсулятор Su(Hw) из ретротранспозона *МДГ4*. Поэтому важно знать обладает ли он таким свойством, и как это может влиять на его инсуляторную активность.

Помимо инсуляторов к сверхдальним взаимодействиям способны Polycomb (Pc) зависимые репрессоры, называемые PRE (Polycomb Responsible Elements), так как с ними связываются различные белковые комплексы, состоящие из Pc-белков. Однако на данный момент ни для одного репрессора не обнаружены последовательности в их составе, ответственные за сверхдальние взаимодействия. До сих пор неясно, необходимо ли наличие репрессивного комплекса для обеспечения взаимодействий. Один из наиболее хорошо описанных Polycomb зависимых репрессоров дрозофилы – это PRE, найденный в регуляторной области гомеозисного гена *ubx*. Он регулирует экспрессию гена *ubx*, несмотря на то, что удален от него на расстояние в 29 т.п.н., но какая именно последовательность в составе данного элемента способна к такому взаимодействию неизвестно.

Цель и задачи исследования

Основной целью данной работы является установление элементов, ответственных за дистанционные взаимодействия между регуляторными элементами в геноме *Drosophila melanogaster*.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Установить последовательность, ответственную за дальние взаимодействия в геноме в составе PRE из регуляторной области гена *ubx*.
2. Выявить наличие или отсутствие ориентационной зависимости во взаимодействии между инсуляторами Su(Hw).
3. Выяснить, как взаимная ориентация инсуляторов Su(Hw) регулирует рекомбинацию между сайтами связывания для *Flp*-рекомбиназы.

Научная новизна и практическая ценность работы. В представленной работе впервые было продемонстрировано, что за сверхдальние взаимодействия PRE из регуляторной области гена *ubx* отвечает область связывания Рс-белков. Также показано, что белок Zeste для этого не является необходимым.

Также было показано наличие ориентационной зависимости во взаимодействии между инсуляторами Su(Hw) и влияние этого взаимодействия на их инсуляторную активность.

Показано, что взаимная ориентация инсуляторов Su(Hw) определяет рекомбинацию между сайтами для *Flp*-рекомбиназы.

Полученные в данной работе результаты позволяют лучше понять как сверхдальние взаимодействия в геноме могут влиять на экспрессию генов, что может быть полезно для понимания механизмов генетических заболеваний человека и их лечения.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на I Международной конференции «Дрософила в экспериментальной генетике и биологии» (Харьков, Украина, 2008) и на Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, Россия, 2008).

Публикации

По теме диссертации опубликована одна научная статья.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах, включает 7 таблиц и 46 рисунков, состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; материалы и методы; результаты;

обсуждение результатов; выводы и список литературы, содержащий 211 цитируемых источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Белок Zeste не нужен для дистанционной репрессии промотора гена *white* PRE из регуляторной области гена *ultrabitorax*

Сайленсер PRE, расположенный в регуляторной области гомеозисного гена *ultrabitorax* (*ubx*) имеет размер 1.2 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и регулирует экспрессию гена *ubx*, несмотря на то, что удален от него на расстоянии в 29 т.п.н. (Chan et al., 2003). Также эта последовательность способна к сверхдальним взаимодействиям (Sigrist, Pirrotta, 1997). Но на данный момент неизвестно, какая последовательность в составе данного элемента способна к такому взаимодействию.

В состав PRE из регуляторной области гена *ubx* входит суб-фрагмент размером 660 пар нуклеотидов (п.н.), обладающий способностью репрессировать транскрипцию гена *white* на больших дистанциях (Sigrist, Pirrotta, 1997).

Для изучения способности последовательности сайленсера (660 п.н.) из PRE регуляторной области гена *ubx* взаимодействовать с промотором гена *white* на дальнем расстоянии было использовано ранее описанное свойство дрожжевого активатора GAL4 стимулировать транскрипцию в дрозофиле (Kyrchanova et al., 2007). Ранее в нашей лаборатории было показано, что GAL4 не способен стимулировать промотор гена *white*, когда сайты связывания для GAL4 отделены от гена *white* последовательностью, размером 5 т.п.н., содержащей ген *yellow* (Kyrchanova et al., 2007). Ген *yellow* отвечает за пигментацию кутикулы и ее производных у дрозофилы (Geyer, Corces, 1987). Ген *white* определяет пигментацию глаз (Qian, 1992).

На основании приведенных данных была создана модельная система, позволяющая выявить способность сайленсера (660 п.н.) к взаимодействиям на дальних расстояниях. Данная модельная система содержала в качестве тест-системы ген *white* с промотором (W), без последовательности эндогенного инсулятора на 3' конце гена (Chetverina et al., 2008). Перед промотором гена *yellow* были вставлены 10 сайтов связывания для дрожжевого активатора транскрипции GAL4 (G4), а после кодирующей части гена *yellow* – ген *white* с промотором. Последовательность сайленсера (660 п.н.) была вставлена перед промотором гена *yellow* и отделена от промотора гена *white* последовательностью гена *yellow* с промотором (Y). Последовательность сайленсера (660 п.н.) в конструкциях была окружена

сайтами для *Cre*-рекомбиназы дрожжей (Siegal, Hartl, 2000), что дает возможность вырезать его *in vivo* и позволяет сравнивать экспрессию гена *white* в трансгенных линиях в присутствии и отсутствии данного элемента в одном и том же месте генома.

В случае, если сайленсер (660 п.н.) способен взаимодействовать с промотором гена *white* на дальнем расстоянии, то он способствует приближению дрожжевого активатора GAL4 к промотору гена *white*, что, в свою очередь, приводит к активации данного гена. Таким образом, если сайленсер взаимодействует с промотором гена *white*, то при введении в трансгенные линии дрожжевого активатора GAL4, появятся мухи с ярко окрашенными глазами. Если же сайленсер с промотором гена *white* не взаимодействует, то в результате введения в линии активатора GAL4, появления мух с ярко окрашенными глазами не произойдет.

На основании описанной выше модельной системы была создана конструкция G4(PRE660)YW (рис.1).

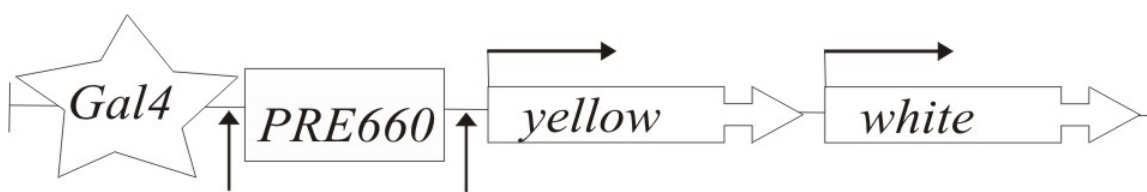


Рисунок 1. Схематичное изображение генетической конструкции G4(PRE660)YW. Обозначения: звездочка - 10 сайтов связывания для дрожжевого активатора транскрипции GAL4; прямоугольник – последовательность сайленсера PRE 660 п.н. из регуляторной области гена *ubx*; горизонтальные фигурные стрелки - последовательности генов *yellow* и *white*, направление стрелок соответствует направлению транскрипции этих генов; черные вертикальные направленные вверх стрелки - сайты узнавания для CRE-рекомбиназы; черные согнутые стрелки – промоторы генов *yellow* и *white*, начало стрелок указывает расположение промоторов генов, направление стрелок соответствует направлению транскрипции генов.

В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии y^1w^{1118} было получено 6 трансгенных линий G4(PRE660)YW, содержащих единичные инсерции конструкции в геноме.

В двух трансгенных линиях экспрессия гена *white* была полностью подавлена, у мух были белые глаза (табл.1), что говорит об активности сайленсера. В четырех других трансгенных линиях (табл.2) сайленсер не имел видимого влияния на экспрессию гена *white*, у мух были желтые глаза. Этот результат можно объяснить тем, что в мухах этих четырех линий сайленсер не активен.

Делеция активного сайленсера приводила к восстановлению транскрипции гена *white* на уровне, характерном для гена, лишённого энхансеров (табл.1). Таким образом, было доказано, что именно сайленсер ответственен за репрессию промотора гена *white*,

отделенного от него геном *yellow*. При этом транскрипция гена *yellow* не была подавлена, что предполагает прямое взаимодействие между сайленсером и промотором гена *white*. Для изучения способности дрожжевого активатора GAL4 активировать ген *white*, полученные трансгенные линии были скрещены с линией, содержащей ген, кодирующий GAL4-активатор (Kurganova et al., 2007). В присутствии белка GAL4 происходила сильная стимуляция транскрипции гена *white*, что предполагает прямое взаимодействие между GAL4-активатором и промотором гена *white* (табл.1). В производных трансгенных линиях G4(Δ PRE660)YW (трансгенные линии G4(PRE660)YW с делетированным сайленсером), введение гена, кодирующего активатор GAL4, не влияло на активность гена *white* (табл.1).

Таким образом, можно сделать вывод, что сайленсер способствует взаимодействию между активатором GAL4 и промотором гена *white*.

Трансгенные линии	Количество линий с той или иной окраской глаз					Число линий с новым фенотипом/ Общее число линий
	Красные	Коричневые	Оранжевые	Желтые	Белые	
G4(PRE660)YW	0	0	0	0	2	0/2
G4(PRE660)YW; <i>gal4</i>	1	1	0	0	0	2/2
G4(PRE660)YW; <i>z^{v77h}</i>	0	0	0	0	2	0/2
G4(PRE660)YW; <i>z^{v77h}; gal4</i>	1	1	0	0	0	2/2
G4(Δ PRE660)YW	0	0	0	2	0	2/2
G4(Δ PRE660)YW; <i>gal4</i>	0	0	0	2	0	0/2

Таблица 1. Фенотипическое проявление экспрессии гена *white* в трансгенных линиях с активным сайленсером. По вертикали указано количество линий с различной окраской глаз; по горизонтали – исходные линии и их производные: с делетированным сайленсером (Δ PRE660), с мутацией *z^{v77h}*, с введенным геном *gal4*.

Ранее в области промотора гена *white* были идентифицированы два сайта связывания для белка Zeste (Qian et al., 1992) (рис.2А). В экспериментах *in vitro* было показано, что белок Zeste может способствовать взаимодействию между удаленными регуляторными элементами (Chen, Pirrotta, 1993). Известна консервативная последовательность сайтов связывания для белка Zeste – (T/C/g)GAGTG(A/G/c) (Mohrman et al., 2002). Проведенный компьютерный анализ позволил обнаружить данную консенсусную последовательность в сайленсере (660 п.н.) из PRE регуляторной области гена *ubx*. Были обнаружены три сайта связывания для белка Zeste (рис. 2Б). На основании выше изложенного было выдвинуто предположение, что белок Zeste обеспечивает дистанционное взаимодействие между этим сайленсером и промотором гена *white*.

А
gggtatttgaagtagcagggtctttcgattacctcactcaaaatgacattcactcaaaagttagcagcgtgtttgcctccttctctgtccacagaatat
cgccgtctctttcgcgct

Б
tatgcaaccaagataaaaaatcttttcaacaaaaactgttttattattgtccctaaattaattttaaacgagactttcatgagcctttatacatgac
caagttttttatgagtgatccaaagttaagaacaacaataataagtgccggtgataaggtccataatcttctgttgccggagcaattgtcaccgcaag
gccactaaaaatcactaaagcgaataaaaaatatttttacggccctttatagatgttgaacaatctaataacaatccaagtaattatccaacaag
cgacggcaaatgtcaagaaggaaccctagaaaaatacaaaacacgaatacaagcccgaagaagaagaagcggcggaagaacg
cactcaaaatccgaaaatgagccataaaaccccagtgcaaatgctactgctctctaggccacgcccccttcacacggaagccataacggcaga
accaaaagtccgataactcaaaaagagagagggtattccaagtctgactgctgtaagagcagatacagataagactcgcgcaccataatg
gctgcccgtaaaagcagagcgcgatcggagcgaagaaggctaacggtatctctcctctctccgcagtcggcgagtcgctgctctgca

Рисунок 2. А. Фрагмент нуклеотидной последовательности промоторной области гена *white*. Б. Фрагмент нуклеотидной последовательности сайленсера (660 п.н.) из PRE регуляторной области гена *ubx*. Рамками отмечены сайты связывания для белка Zeste.

Для исследования роли белка Zeste в процессе взаимодействия между промотором гена *white* и сайленсером (660 п.н.) из PRE регуляторной области гена *ubx* была использована z^{v77h} мутация, которая приводит к полной инактивации гена *zeste* (Pirrotta et al, 1987). При введении мутации z^{v77h} в те линии G4(PRE660)YW, где сайленсер активен, не наблюдалось изменения окраски глаз (табл.1). Следовательно, белок Zeste не влияет на дистанционную репрессию гена *white* сайленсером. Введение мутации z^{v77h} также не влияло на GAL4-зависимую активацию гена *white*. Таким образом, белок Zeste не нужен для дистанционных взаимодействий между активным сайленсером и промотором гена *white*.

В четырех трансгенных линиях с неактивным сайленсером после делеции сайленсера окраска глаз не изменялась (табл.2). Полученный результат подтверждает вывод о том, что в этих трансгенных линиях сайленсер неактивен. Однако активатор GAL4 индуцирует экспрессию гена *white*, что предполагает сохранение взаимодействия между сайленсером и промотором гена *white* (табл.2). Этот вывод подтверждается тем, что после делеции сайленсера активатор GAL4 перестает стимулировать транскрипцию гена *white* (табл.2). Таким образом, сайленсер может не репрессировать транскрипцию, но при этом сохранять способность взаимодействовать с удаленным промотором гена *white*. При введении мутации z^{v77h} в линии G4(Δ PRE660)YW окраска глаз не изменялась (табл.2).

Данный факт говорит о том, что активность промотора гена *white* не зависит от белка Zeste. Однако на фоне мутации z^{v77h} , GAL4-активатор в трансгенных линиях G4(PRE660)YW с неактивным сайленсером теряет способность стимулировать транскрипцию гена *white* (табл.2). Таким образом, белок Zeste нужен для обеспечения взаимодействия между неактивным сайленсером и промотором гена *white*.

Трансгенные линии	Количество линий с той или иной окраской глаз					Число линий с новым фенотипом/ Общее число линий
	Красные	Коричневые	Оранжевые	Желтые	Белые	
G4(PRE660)YW	0	0	0	4	0	0/4
G4(PRE660)YW; <i>gal4</i>	0	1	3	0	0	4/4
G4(PRE660)YW; z^{v77h}	0	0	0	4	0	0/4
G4(PRE660)YW; z^{v77h} ; <i>gal4</i>	0	0	0	4	0	0/4
G4(Δ PRE660)YW	0	0	0	4	0	0/4
G4(Δ PRE660)YW; <i>gal4</i>	0	0	0	4	0	0/4

Таблица 2. Фенотипическое проявление гена *white* в трансгенных линиях с неактивным сайленсером. Обозначения такие же, как в таблице 1.

Исходя из описанных выше результатов, был сделан вывод о том, что за дистантные взаимодействия в PRE из регуляторной области гена *ubx Drosophila* отвечает последовательность, с которой связываются белки группы Polycomb. Также было установлено, что в некоторых случаях в дистантных взаимодействиях, в которые вовлечен PRE из регуляторной области гена *ubx*, принимает участие белок Zeste.

2. Изучение ориентационной зависимости взаимодействия инсуляторов Su(Hw)

Ранее было показано наличие функционального взаимодействия между двумя инсуляторами Su(Hw) (Muravyova et al., 2001). Для некоторых инсуляторов было показано, что их взаимная ориентация играет определяющую роль в характере взаимодействия. (Kurchanova et al., 2007). Инсулятор Su(Hw) состоит из сайтов связывания только для одного белка Su(Hw), с которыми он связывается с разной интенсивностью (Spana, Corces, 1990; Kim et al., 1996). Возникает вопрос, будет ли взаимодействие между инсуляторами Su(Hw) также зависеть от их ориентации?

Для исследования этого вопроса были сделаны 2 пары генетических конструкций. В качестве тест-системы был выбран ген *white*, активность которого регулируется в глазах тканеспецифичным энхансером (En(eye)).

Первая пара конструкций, $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$ и $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$, содержит энхансер гена *white* (*En(eye)*), окруженный сайтами для *Cre*-рекомбиназы, кодирующую последовательность гена *yellow* без промотора (Y^d), две последовательности инсулятора *Su(Hw)* (*Su(Hw)* и *Su(Hw)^R*) и последовательность гена *white* с промотором, идентичную описанной в разделе 1 (рис.3, рис.4). В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии y^1w^{1118} было получено 8 трансгенных линий $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$ и 5 трансгенных линий $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$, содержащих единичные инсерции конструкций в геноме.

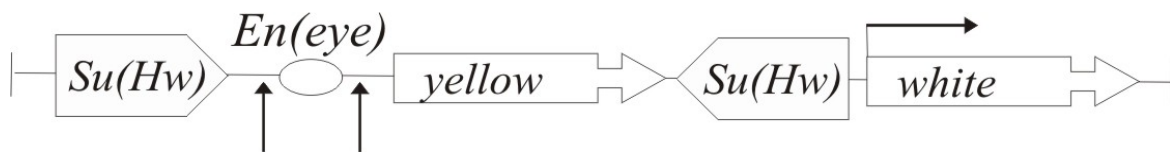


Рисунок 3. Схематичное изображение генетической конструкции $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$. Обозначения: овал – энхансер гена *white*; пятиугольные стрелки – последовательность инсулятора *Su(Hw)*, направление стрелок указывает ориентацию; остальные обозначения такие же, как на рисунке 1.

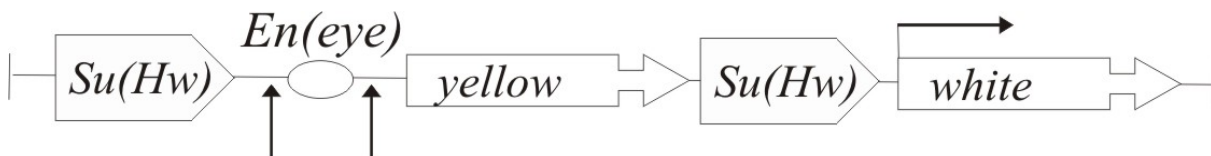


Рисунок 4. Схематичное изображение генетической конструкции $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$. Обозначения такие же, как на рисунке 3.

В трансгенных линиях, несущих генетическую конструкцию, в которой последовательности инсулятора *Su(Hw)* были направлены в разные стороны, $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$, глаза мух были слабо окрашены (табл.3). И вырезание энхансера гена *white* не оказывало влияния на цвет глаз (табл.3). Что говорит об отсутствии взаимодействия между энхансером гена *white* и промотором гена *white*.

В трансгенных линиях, несущих генетическую конструкцию $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$, в которой последовательности инсулятора *Su(Hw)* были сонаправлены, глаза мух были сильно окрашены (табл.3). При вырезании энхансера гена *white* окраска глаз значительно снижалась (табл.3), что демонстрирует роль этого энхансера в активации промотора гена *white*. Полученный эффект предполагает, что изоляция энхансера гена *white* от промотора гена *white* не происходила.

Трансгенные линии	Количество линий с той или иной окраской глаз					Число линий с новым фенотипом/ Общее число линий
	Красные	Коричневые	Оранжевые	Желтые	Белые	
$[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$	0	0	0	8	0	0/8
$[Su(Hw)][\Delta En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$	0	0	0	8	0	0/8
$[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$	3	2	0	0	0	0/5
$[Su(Hw)][\Delta En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$	0	0	0	5	0	5/5

Таблица 3. Фенотипическое проявление гена *white* в трансгенных линиях, несущих генетические конструкции $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$ и $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$. По вертикали указано количество линий с той или иной окраской глаз; по горизонтали – исходные линии и их производные: с делетированным энхансером ($\Delta En(eye)$).

Таким образом, в генетических конструкциях $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)^R]W$ и $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$ наблюдалась отчетливая зависимость эффекта от взаимной ориентации двух *Su(Hw)* инсуляторов. Когда эти инсуляторы были разнонаправлены, происходила изоляция энхансера гена *white* от промотора гена *white*, а когда они были сонаправлены – изоляции не происходило. Следовательно, инсулятор *Su(Hw)* полярен.

Для выяснения роли расстояния между инсуляторами *Su(Hw)* в обеспечении взаимодействия между энхансером гена *white*, находящимся между инсуляторами, и промотором гена *white* была создана генетическая конструкция, по дизайну почти идентичная $[Su(Hw)][En(eye)]Y^d[Su(Hw)]W$, но без кодирующей последовательности гена *yellow* – $[Su(Hw)][En(eye)][Su(Hw)]W$ (рис.5). Последовательность инсулятора *Su(Hw)*, находящаяся около промотора гена *white* была окружена сайтами для *FLP*-рекомбиназы. В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии y^1w^{1118} было отобрано 9 трансгенных линий, содержащих единичные инсерции конструкции в геноме.

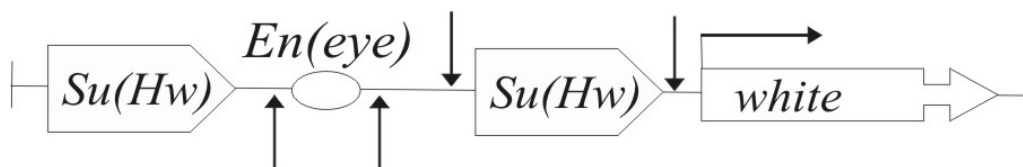


Рисунок 5. Схематичное изображение генетической конструкции $[Su(Hw)][En(eye)][Su(Hw)]W$. Обозначения: черные вертикальные направленные вниз стрелки - сайты узнавания для *FLP*-рекомбиназы; остальные обозначения такие же, как на рисунке 3.

В трансгенных линиях, несущих данную генетическую конструкцию, глаза мух были окрашены по-разному: от желтой (базовый уровень экспрессии гена) до красной (сильная стимуляция энхансером) (табл.4). При вырезании энхансера гена *white*, окраска

глаз ослабевала (табл.4), что доказывает роль энхансера гена *white* в активации гена *white* в трансгенных линиях.

Трансгенные линии	Количество линий с той или иной окраской глаз					Число линий с новым фенотипом/ Общее число линий
	Красные	Коричневые	Оранжевые	Желтые	Белые	
[Su(Hw)][En(eye)][Su(Hw)]W	0	2	6	1	0	0/9
[Su(Hw)][ΔEn(eye)][Su(Hw)]W	0	0	0	8	1	9/9

Таблица 4. Фенотипическое проявление гена *white* в трансгенных линиях, несущих генетическую конструкцию [Su(Hw)][En(eye)][Su(Hw)]W. По вертикали указано количество линий с той или иной окраской глаз; по горизонтали – исходные линии и их производные: с делетированным энхансером (ΔEn(eye)).

Полученные результаты показали, что наличие расстояния необходимо для обеспечения устойчивого взаимодействия между энхансером гена *white*, находящимся между двумя сонаправленными инсуляторами Su(Hw), и промотором гена *white*. При значительном уменьшении расстояния между инсуляторами, взаимодействие становится нестабильным.

Другая пара генетических конструкций, [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W и [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W, отличается от первой пары конструкций тем, что в них последовательность энхансера гена *white* находится перед первым инсулятором (рис.6, рис.7). В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии *y¹w¹¹¹⁸* было отобрано 7 трансгенных линий [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W и 6 трансгенных линий [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W, содержащих единичные инсерции конструкций в геноме.

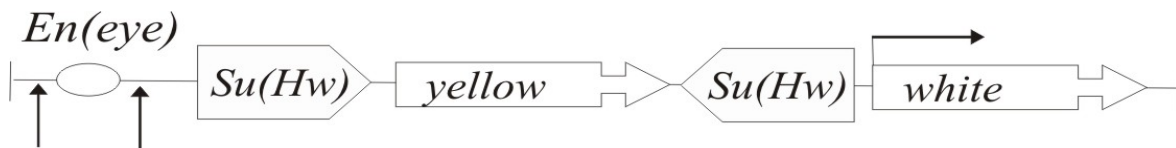


Рисунок 6. Схематичное изображение генетической конструкции [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W. Обозначения такие же, как на рисунке 3.

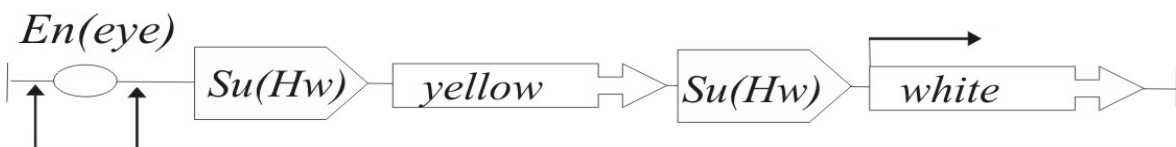


Рисунок 7. Схематичное изображение генетической конструкции [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W. Обозначения такие же, как на рисунке 3.

В трансгенных линиях, несущих генетическую конструкцию, в которой последовательности инсультатора $Su(Hw)$ были направлены в разные стороны, $[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W$, глаза мух были сильно окрашены (табл.5). При вырезании энхансера гена *white*, степень окраски глаз значительно снижалась (табл.5), что демонстрирует роль этого энхансера в активации промотора гена *white*. Для исследования роли белка Zeste в процессе взаимодействия промотора гена *white* и энхансера гена *white* была использована z^{v77h} мутация. Данная мутация, приводящая к полной инактивации гена *zeste* (Pirrotta et al, 1987), ответственного за коммуникацию между энхансером гена *white* и промотором гена *white* (Qian et al., 1992), не влияла на окраску глаз (табл.5). Полученный эффект предполагает, что изоляция энхансера гена *white* от промотора гена *white* не происходила и взаимодействие, устанавливаемое между инсультаторами $Su(Hw)$, обеспечивает контакт между энхансером и промотором гена *white*.

Трансгенные линии	Количество линий с той или иной окраской глаз					Число линий с новым фенотипом/ Общее число линий
	Красные	Коричневые	Оранжевые	Желтые	Белые	
$[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W$	4	3	0	0	0	0/7
$[\Delta En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W$	0	0	0	7	0	7/7
$[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W; z^{v77h}$	0	4	3	0	0	7/7
$[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W$	4	2	0	0	0	0/6
$[\Delta En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W$	0	0	0	6	0	6/6
$[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W; z^{v77h}$	0	0	4	2	0	6/6

Таблица 5. Фенотипическое проявление гена *white* в трансгенных линиях, несущих генетические конструкции $[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W$ и $[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W$. По вертикали указано количество линий с различной окраской глаз; по горизонтали – исходные линии и их производные: с делегированным энхансером ($\Delta En(eye)$), с мутацией z^{v77h} .

В трансгенных линиях, несущих генетическую конструкцию, в которой последовательности инсультатора $Su(Hw)$ были сонаправлены, $[En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W$, глаза мух были сильно окрашены (табл.5). При вырезании энхансера гена *white*, окраска глаз ослабевала (табл.5), что доказывает роль энхансера гена *white* в активации гена *white* в трансгенных линиях. Введение мутации z^{v77h} влияло на окраску глаз, она ослабевала (табл.5). Полученный эффект предполагает, что изоляция энхансера гена *white* от промотора гена *white* также не происходила, но взаимодействие между энхансером гена *white* и промотором гена *white* обеспечивается при участии белка Zeste.

Таким образом, в генетических конструкциях [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)^R]W и [En(eye)][Su(Hw)]Y^d[Su(Hw)]W наблюдалась отчетливая зависимость эффекта при введении мутации *z^{v77h}* от взаимной ориентации инсуляторов Su(Hw). Когда эти последовательности были разнонаправленны, то взаимодействие между Su(Hw) инсуляторами обеспечивало активацию промотора гена *white* энхансером гена *white*. А когда последовательности инсулятора Su(Hw) были сонаправлены, для эффективного взаимодействия между регуляторными элементами гена *white* был необходим белок Zeste. Таким образом, полученные экспериментальные данные согласуются с моделью, согласно которой взаимодействие между инсуляторами зависит от их взаимной ориентации, то есть инсуляторы полярны.

3. Взаимная ориентация инсуляторов Su(Hw) регулирует рекомбинацию между сайтами связывания *Flp*-рекомбиназы

Ранее было показано, что одна копия последовательности инсулятора Su(Hw) не мешает взаимодействию между *Flp*-рекомбиназными комплексами дрожжей (Parnell, Geyer, 2000).

Для того чтобы непосредственно продемонстрировать, что образование пары между инсуляторами Su(Hw) влияет на процесс прохождения рекомбинации между последовательностями сайтов связывания для *Flp*-рекомбиназы дрожжей (FRT сайты) и зависит от взаимной ориентации инсуляторов Su(Hw) было сделано 5 генетических конструкций.

Последовательности FRT сайтов были расположены во взаимопротивоположных ориентациях, чтобы отделить рекомбинацию между FRT сайтами, расположенными на одной хромосоме, от неравного обмена между FRT сайтами, расположенными на сестринских хроматидах (Golic, 1994; Ahmad, Golic, 1998; 1999). Известно, что рекомбинация между FRT сайтами в противоположной ориентации приводит к инверсиям, тогда как неравный обмен между сестринскими хроматидами во время рекомбинации между FRT сайтами приводит к образованию дицентрических хромосом. Образование дицентрических хромосом проявляется в виде дефектов развития и низкой жизнеспособности (Golic, 1994; Ahmad, Golic, 1998; 1999).

Рекомбинация между FRT сайтами индуцировалась введением в трансгенные линии гена *Flp*-рекомбиназы дрожжей, находящегося под контролем энхансера гена *eyeless*

(*eyFlp*). Время синтеза *Flp*-рекомбиназы неограниченно, но синтез происходит только в тканях глаз, что позволяет увеличить выживаемость мух.

В качестве тест-системы в исследованных генетических конструкциях был выбран ген *white*, так как экспрессия гена *white* автономна в каждой фасетке, что позволяет оценивать экспрессию гена *white* в каждой фасетке по отдельности. Эхансер гена *white* находился перед промотором гена *white*. Проксимальный FRT сайт был вставлен в четвертый интрон гена *white*, а дистальный FRT сайт – с 3'-стороны от кодирующей последовательности гена *white*. Сайты FRT были вставлены во взаимопротивоположной ориентации. Проксимальная последовательность инсулятора *Su(Hw)* (*Su(Hw)*), окруженная сайтами для *Cre*-рекомбиназы дрожжей, была вставлена после проксимального FRT сайта. Последовательность гена *yellow* была вставлена перед эхансером гена *white*. Все исследованные генетические конструкции отличаются только наличием и ориентацией дистальной последовательности инсулятора *Su(Hw)* (*Su(Hw)* и *Su(Hw)^R*), вставленной с 3'-стороны от кодирующей последовательности гена *white*, и ее расположением относительно дистального FRT сайта.

В конструкции FRT[*Su(Hw)*]-[*Su(Hw)*]FRT дистальный инсулятор *Su(Hw)* был вставлен перед FRT сайтом в той же ориентации, что и проксимальный инсулятор *Su(Hw)* (рис.8).

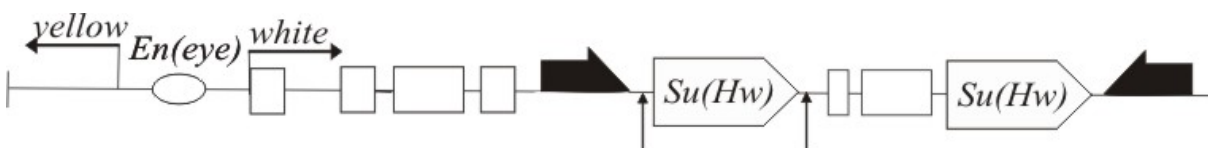


Рисунок 8. Схематичное изображение генетической конструкции FRT[*Su(Hw)*]-[*Su(Hw)*]FRT. Обозначения: черные горизонтальные полустрелки - FRT сайты; белые прямоугольники – экзоны гена *white*; остальные обозначения такие же, как на рисунке 3.

В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии $y^1 w^{1118}$ было отобрано 5 трансгенных линий FRT[*Su(Hw)*]-[*Su(Hw)*]FRT, содержащих единичные инсерции конструкций в геноме и имеющих пигментацию глаз близкую к дикому типу.

Введение в трансгенные линии, несущие генетическую конструкцию FRT[*Su(Hw)*]-[*Su(Hw)*]FRT, гена *eyFlp* вызывало слабую мозаичность глаз (табл.6). Полученные результаты говорят о том, что в данной генетической конструкции, при рекомбинации между FRT сайтами, неравный обмен между сестринскими хроматидами не происходит.

Трансгенные линии	Количество линий с тем или иным фенотипом						Общее число проанализированных линий
	Степень мозаичности глаз				Мутантный фенотип	Летальность	
	Отсутствует	Слабая	Умеренная	Сильная			
FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)]FRT	5	0	0	0	0	0	5
FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)]FRT; <i>eyFLP</i>	0	5	0	0	0	0	5
FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw) ^R]FRT	7	0	0	0	0	0	7
FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw) ^R]FRT; <i>eyFLP</i>	0	0	0	0	7	0	7
FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)]	6	0	0	0	0	0	6
FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)]; <i>eyFLP</i>	0	0	0	6	0	0	6
FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw) ^R]	8	0	0	0	0	0	8
FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw) ^R]; <i>eyFLP</i>	0	1	6	1	0	0	8
FRT[-]-[FRT]	7	0	0	0	0	0	7
FRT[-]-[FRT]; <i>eyFLP</i>	0	0	0	0	3	4	7

Таблица 6. Фенотипическое проявление гена *white* в трансгенных линиях. По вертикали указано количество линий с разной мозаичностью глаз, с наличием или отсутствием мутаций; по горизонтали – исходные линии и их производные с введенным геном *eyFlp*.

В конструкции FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)^R]FRT дистальный Su(Hw) инсулятор был вставлен перед FRT сайтом в ориентации, противоположной относительно проксимального инсулятора (рис.9).

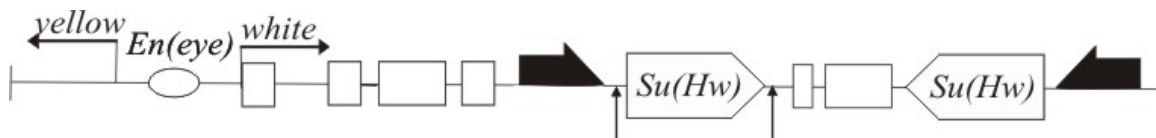


Рисунок 9. Схематичное изображение генетической конструкции FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)^R]FRT. Обозначения такие же, как на рисунке 8.

В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии $y^1 w^{1118}$ было отобрано 7 трансгенных линий FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)^R]FRT, содержащих единичные инсерции конструкций в геноме и имеющих пигментацию глаз близкую к дикому типу.

Введение в трансгенные линии, несущие генетическую конструкцию FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)^R]FRT, гена *eyFlp* вызывало сильную редукцию головы, что связано с массовой гибелью клеток (табл.6). Полученные результаты говорят о том, что в данной генетической конструкции, при рекомбинации между FRT сайтами, происходит неравный обмен между сестринскими хроматидами.

Анализ фенотипических эффектов вызванных *Flp*-рекомбиназой в конструкциях FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)]FRT и FRT[Su(Hw)]-[Su(Hw)^R]FRT подтверждает предположение о том, что взаимоориентация последовательностей инсулятора Su(Hw) влияет на прохождение рекомбинации между FRT сайтами.

В конструкции FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)] дистальная последовательность инсулятора Su(Hw) была вставлена после дистальных FRT сайтов в той же ориентации, что и проксимальная последовательность инсулятора Su(Hw) (рис.10).



Рисунок 10. Схематичное изображение генетической конструкции FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)]. Обозначения такие же, как на рисунке 8.

В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии y^1w^{1118} было отобрано 6 трансгенных линий FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)], содержащих единичные инсерции конструкций в геноме и имеющих пигментацию глаз близкую к дикому типу.

Введение в трансгенные линии, несущие генетическую конструкцию FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)], гена *eyFlp* вызывало сильную мозаичность глаз (табл.6). Полученные результаты говорят о том, что в данной генетической конструкции, при рекомбинации между FRT сайтами, неравный обмен между сестринскими хроматидами не происходит, а внутриврохромосомные инверсии происходят очень часто.

В конструкции FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)^R] дистальная последовательность инсулятора Su(Hw) была вставлена после дистальных FRT сайтов в ориентации, обратной проксимальной последовательности инсулятора Su(Hw) (рис.11).

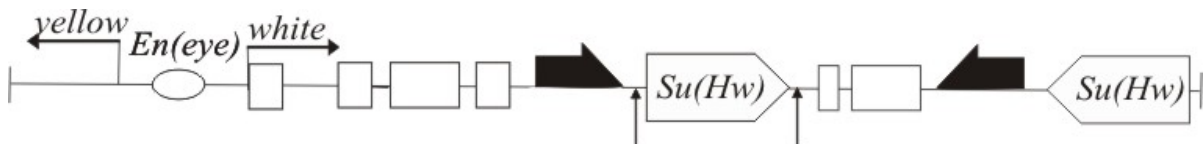


Рисунок 11. Схематичное изображение генетической конструкции FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)^R]. Обозначения такие же, как на рисунке 8.

В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии y^1w^{1118} было отобрано 8 трансгенных линий FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)^R], содержащих единичные инсерции конструкций в геноме и имеющих пигментацию глаз близкую к дикому типу.

Введение в трансгенные линии, несущие генетическую конструкцию FRT[Su(Hw)]-FRT[Su(Hw)^R], гена *eyFlp* вызывало умеренную мозаичность глаз (табл.6). Полученные результаты говорят о том, что в данной генетической конструкции, при рекомбинации между FRT сайтами, неравный обмен между сестринскими хроматидами не происходит, внутриврохромосомные инверсии происходят с умеренной частотой.

Для того, чтобы была возможность сравнить описанные выше результаты с тем, как проходит рекомбинация между FRT сайтами в отсутствие последовательностей инсулятора Su(Hw), была сделана конструкция FRT[]-[]FRT. В конструкции FRT[]-[]FRT отсутствовали обе последовательности инсулятора Su(Hw) (рис.12).



Рисунок 12. Схематичное изображение генетической конструкции FRT[]-[]FRT. Обозначения такие же, как на рисунке 8.

В результате трансформации эмбрионов *Drosophila melanogaster* линии $y^1 w^{1118}$ было отобрано 7 трансгенных линий FRT[]-[]FRT, содержащих единичные инсерции конструкций в геноме и имеющих пигментацию глаз близкую к дикому типу.

Введение в трансгенные линии, несущие генетическую конструкцию FRT[]-[]FRT, гена *eyFlp*, вызывало мутации при формировании глаз и головы или смерть мух (табл.6). Полученные результаты говорят о том, что при рекомбинации между FRT сайтами в отсутствие инсуляторов Su(Hw) происходит неравный обмен между сестринскими хроматидами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Белок Zeste не нужен для дистанционной репрессии промотора гена *white* PRE из регуляторной области гена *ultrabitorax*

Для установления последовательности, ответственной за сверхдальние взаимодействия между PRE из регуляторной области гена *ubx*, была проверена последовательность сайленсера (660 п.н.), с которой связываются Pc-белки (Sigrist, Pirrotta, 1997). На основании полученных в данной работе результатов был сделан вывод, что эта последовательность взаимодействует с промотором гена *white* на дальнем расстоянии за счет образования петли (рис.13).

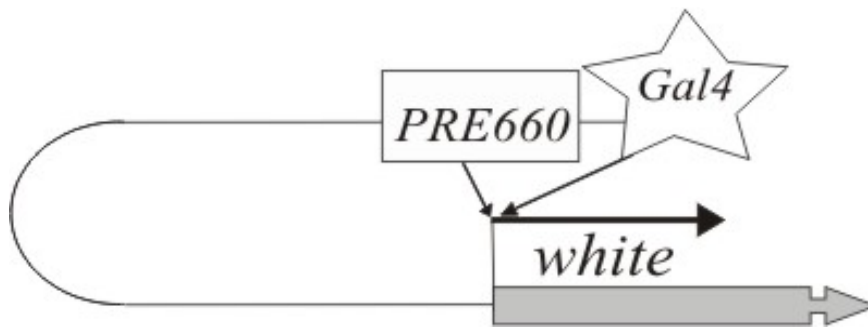


Рисунок 13. Схематичное изображение петли, образующейся между сайленсером (660 п.н.) и промотором гена *white*. Обозначения: горизонтальная фигурная стрелка - последовательность гена *white*, направление стрелки соответствует направлению транскрипции этого гена; серый цвет стрелки обозначает активацию промотора; направленные к промотору гена *white* стрелки обозначают взаимодействие между регуляторными элементами; остальные обозначения такие же, как на рисунке 1.

Ранее было показано, что сайленсер (660 п.н.) из PRE регуляторной области гена *ubx* способен ингибировать транскрипцию гена *white* на большом расстоянии (Comet et al., 2006). Полученные в данной работе результаты показывают, что репрессия, вызванная этим сайленсером (660 п.н.), происходит при непосредственном контакте между сайленсером и промотором. В последовательности сайленсера (660 п.н.) были найдены три сайта связывания для белка Zeste, что позволило предположить, что Zeste участвует в активности PRE. Ранее было показано, что Zeste является компонентом Pc-комплекса (Saurin et al., 2001). В промоторе гена *white* находятся два сайта связывания для белка Zeste. Недавно в нашей лаборатории было показано, что белок Zeste поддерживает дальние взаимодействия между энхансером и промотором гена *white*. На основании этих результатов можно было предположить, что Zeste нужен для поддержания дальних взаимодействий между PRE и промотором гена *white* на больших расстояниях. Однако,

инактивация белка Zeste не нарушает дистанционной репрессии гена *white*. Для активации промотора гена *white* активатором GAL4 необходимо присутствие сайленсера (660 п.н.) рядом с сайтами для GAL4, но не белок Zeste. Таким образом, активный сайленсер, на котором собирается функциональный Рс-зависимый комплекс, может взаимодействовать с удаленным промотором независимо от белка Zeste, видимо, при помощи Рс-белков. Этот результат согласуется с ранее полученными данными, что компоненты Рс-комплекса могут напрямую взаимодействовать с некоторыми компонентами TFIID белкового комплекса, который собирается на промоторах и является ключевым в транскрипции (Breiling et al., 2001). Возможно, такие взаимодействия являются достаточными для обеспечения дистанционного взаимодействия между сайленсером и промотором.

В тех случаях, когда на сайленсере не собирается активный Рс-комплекс, белок Zeste, который имеет сайты связывания в области промотора гена *white* и сайленсера, становится ключевым в поддержании взаимодействия между неактивным сайленсером и промотором.

2. Изучение ориентационной зависимости взаимодействия инсуляторов Su(Hw)

Инсулятор Su(Hw) из ретротранспозона *МДГ4* – это последовательность нуклеотидов, содержащая 12 сайтов связывания для белка Su(Hw) (Spana et al., 1988; Mazo et al., 1989). Поскольку белок Su(Hw) связывается с этими сайтами с разной силой (Spana, Corces, 1990; Kim et al., 1996), было выдвинуто предположение, что с последовательностью инсулятора Su(Hw) может связываться несколько различных белков. Ранее было показано наличие функционального взаимодействия между двумя последовательностями инсулятора Su(Hw) (Muravyova et al., 2001). Также известно, что последовательности инсулятора Su(Hw) могут взаимодействовать друг с другом с образованием петли (Savitskaya et al., 2006).

Полученные в данной работе результаты показали, что в зависимости от взаимной ориентации последовательностей инсулятора Su(Hw) образуются петли разной конфигурации.

В генетических конструкциях, где последовательность энхансера гена *white* находилась внутри петли, образуемой инсуляторами Su(Hw), взаимосвязь между взаимориентацией инсуляторов и активацией гена *white* энхансером проявилась наиболее отчетливо. Когда последовательности инсулятора Su(Hw) были разнонаправлены,

происходила изоляция энхансера гена *white* от промотора гена *white* (рис.14), а когда они были сонаправлены – изоляции не происходило (рис.15).

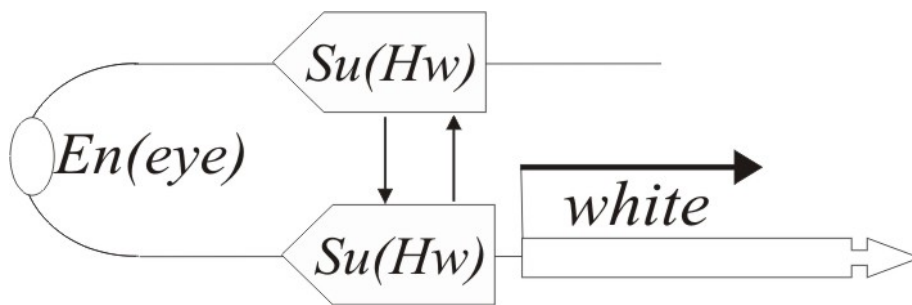


Рисунок 14. Схематичное изображение петли, образующейся между инсуляторами Su(Hw). Обозначения: горизонтальная фигурная стрелка - последовательность гена *white*, направление стрелки соответствует направлению транскрипции этого гена, белый цвет которой обозначает отсутствие активации; черные вертикальные стрелки обозначают взаимодействие между последовательностями инсулятора Su(Hw).

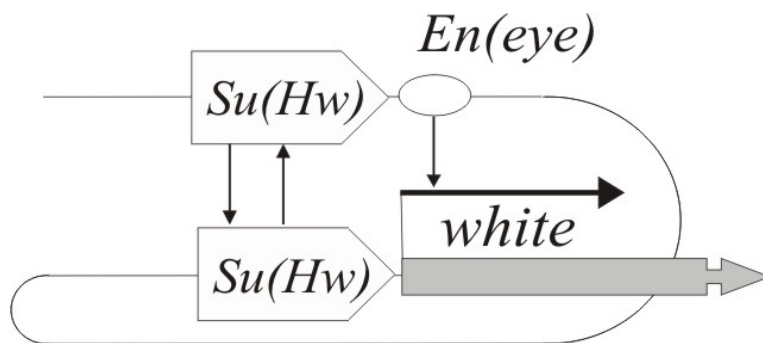


Рисунок 15. Схематичное изображение петли, образующейся между инсуляторами Su(Hw). Обозначения такие же, как на рисунках 13 и 14.

Также было показано, что наличие большого расстояния между сонаправленными последовательностями инсулятора Su(Hw) облегчает взаимодействие между последовательностями энхансера гена *white*, находящегося внутри петли и промотора гена *white*, находящегося снаружи от петли.

В генетических конструкциях, где последовательность энхансера гена *white* находилась снаружи от петли, образуемой последовательностями инсулятора Su(Hw), изоляция энхансера гена *white* от промотора гена *white* не происходила вне зависимости от взаимной ориентации последовательностей инсулятора Su(Hw). Взаимосвязь между взаимноориентацией инсуляторов и активацией гена *white* энхансером обнаруживалась только при введении мутации в гене *zeste*. Когда последовательности инсулятора Su(Hw) были разнонаправлены введение мутации в гене *zeste* почти не влияло на цвет глаз (рис.16), а когда последовательности инсулятора Su(Hw) были сонаправлены – влияло (рис.17, рис.18). Таким образом, взаимодействие между энхансером и промотором гена

white определяется взаимной ориентацией $Su(Hw)$ инсуляторов и белком *Zeste*, который определяет дальние взаимодействия между энхансером и промотором гена *white*.

Полученный эффект можно объяснить двумя способами:

- взаимодействие между промотором и энхансером гена *white*, обеспечиваемое посредством белка *Zeste*, сильнее, чем взаимодействие между последовательностями инсулятора $Su(Hw)$ (рис.17);
- после образования петли между последовательностями инсулятора $Su(Hw)$, энхансер и промотор гена *white*, оказавшиеся снаружи от образовавшейся петли, могут взаимодействовать (рис.18).

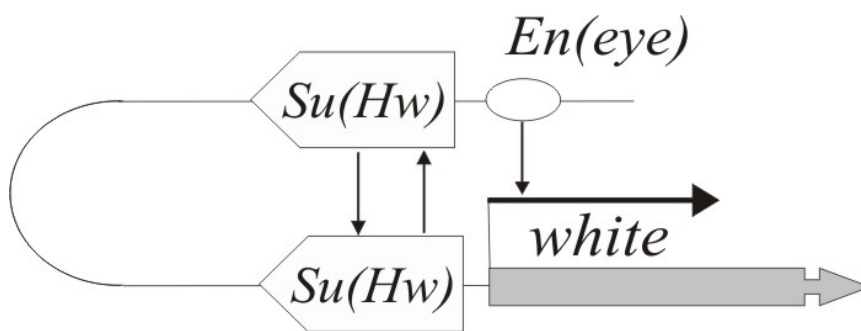


Рисунок 16. Схематичное изображение петли, образующейся между последовательностями инсулятора $Su(Hw)$. Обозначения такие же, как на рисунке 15.

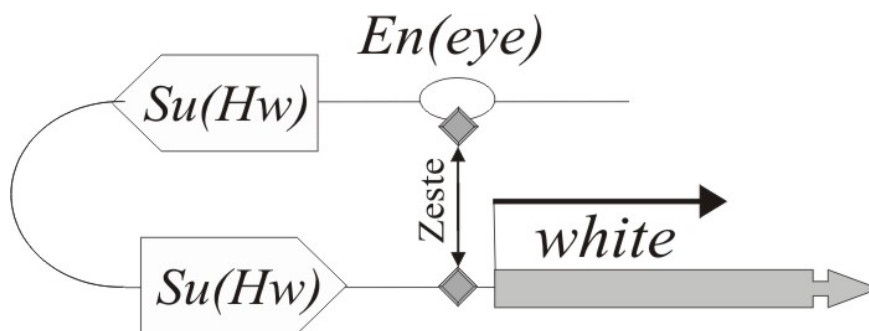


Рисунок 17. Схематичное изображение петли, образующейся между последовательностями инсулятора $Su(Hw)$. Обозначения: серые ромбы – сайты связывания для белка *Zeste*; черная двусторонняя стрелка – взаимодействие при белке *Zeste*; остальные обозначения такие же, как на рисунке 14.

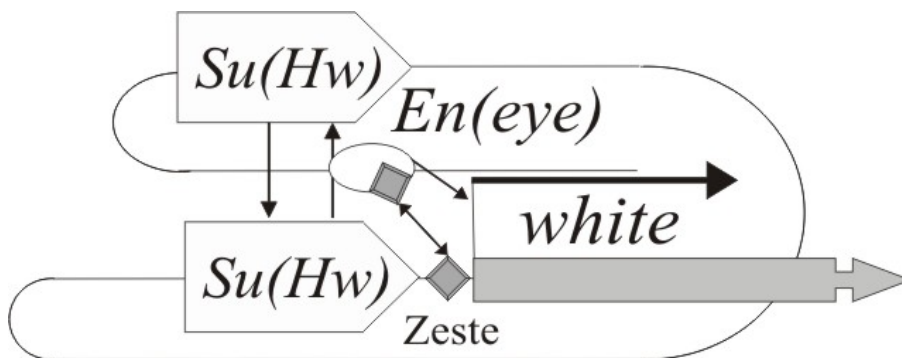


Рисунок 18. Схематичное изображение петли, образующейся между последовательностями инсулятора Su(Hw). Обозначения такие же, как на рисунке 17.

Полученные данные говорят в пользу модели о действии инсуляторов посредством образования петли. Если инсуляторы находятся в одной ориентации, то формируемая ими петля позволяет регуляторным элементам, которые находятся один внутри, а другой снаружи от петли, взаимодействовать друг с другом. В случае, когда инсуляторы находятся в разных ориентациях, происходит сближение регуляторных элементов, расположенных с разных сторон от петли, формируемой инсуляторами. Вероятным объяснением эффектов такого направленного действия может служить предположение о том, что с такими инсуляторами связываются как минимум два белка, обеспечивающих эффективное взаимодействие между инсуляторами.

3. Взаимная ориентация инсуляторов Su(Hw) регулирует рекомбинацию между сайтами связывания *Flp*-рекомбиназы

Результаты, полученные в данном исследовании, подтвердили значимость ориентации последовательности инсулятора Su(Hw). Взаимная ориентация последовательности инсулятора Su(Hw) оказывала существенное влияние на прохождение рекомбинации между FRT сайтами.

В генетических конструкциях, в которых одна из последовательностей инсулятора Su(Hw) была расположена между FRT сайтами, а вторая – за FRT сайтами, проявлялась зависимость рекомбинации при введении гена *euFlp* от взаимной ориентации последовательностей инсулятора Su(Hw). Когда последовательности инсулятора Su(Hw) были разнонаправлены, происходила изоляция одного FRT сайта от другого, расположенного на той же хроматиде, а когда они были сонаправлены – изоляции не происходило. Поэтому при введении *Flp*-рекомбиназы варибельность глаз у мух несущих

генетическую конструкцию с сонаправленными последовательностями инсулятора Su(Hw) была выше. В обеих генетических конструкциях наличие двух последовательностей инсулятора Su(Hw) препятствовало прохождению неравной рекомбинации между FRT сайтами, расположенными на сестринских хроматидах.

В генетических конструкциях, где обе последовательности инсулятора Su(Hw) были расположены между FRT сайтами при введении гена *euFlp* обнаруживалась отчетливая зависимость от ориентации. Когда последовательности инсулятора Su(Hw) были сонаправлены, введение гена *euFlp* вызывало незначительное число рекомбинаций. Когда последовательности инсулятора Su(Hw) были разнонаправлены происходил неравный обмен между FRT сайтами, расположенными на сестринских хроматидах, также, как и при полном отсутствии последовательностей инсулятора Su(Hw). Следовательно, взаимодействие между разнонаправленными последовательностями инсулятора Su(Hw) способствует образованию той же самой петли, что и взаимодействие между FRT сайтами.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что белок *Zeste* не является необходимым для репрессии гена *white* Polysomb-зависимым сайленсером на больших расстояниях.
2. Продемонстрировано, что энхансер гена *white*, заключенный между двумя инсуляторами Su(Hw), может стимулировать промотор гена *white* только в том случае, если инсуляторы имеют одинаковую ориентацию.
3. Установлено, что при наличии активного белка *Zeste*, энхансер гена *white* способен стимулировать промотор гена *white*, минуя два инсулятора Su(Hw) между ними, вне зависимости от взаимной ориентации инсуляторов.
4. Показано, что взаимная ориентация инсуляторов Su(Hw) влияет на процесс рекомбинации между сайтами связывания для *Flp*-рекомбиназы.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **М.Н. Кривега**, И.В. Кривега, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев. Исследование роли белка *Zeste* в обеспечении дистанционной инактивации гена *white* Рс-зависимым репрессорным комплексом. // ДАН. 2008. Т.421. N5. Стр.697-700.
2. **М.Н. Кривега**, И.В. Кривега, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев. Механизм дистанционного взаимодействия Рс-зависимого репрессорного комплекса с геном *white*. Тезисы I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». Харьков, Украина, 15-20 сентября 2008 г., 37-39.
3. **М.Н. Кривега**, И.В. Кривега. Исследование роли белка *Zeste* в обеспечении дистанционной инактивации гена *white* Рс-зависимым репрессорным комплексом. Тезисы Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Казань, Россия, 15-16 сентября 2008 г., 60-61.
4. **М.Н. Кривега**, П.Г. Георгиев. Ориентационные особенности взаимодействия инсулятора Su(Hw) из ретротранспозона *МДГ4*. Тезисы I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». Харьков, Украина, 15-20 сентября 2008 г., 40-42.
5. **М.Н. Кривега**. Взаимодействие инсуляторов из ретротранспозона *МДГ4* зависит от ориентации. Тезисы Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Казань, Россия, 15-16 сентября 2008 г., 59-60.

Автор выражает благодарность И.В.Кривега за помощь в работе, консультации и обсуждение полученных результатов, а также А.К.Головнину за содействие в выполнении работы.