

На правах рукописи
УДК 577.214.4:575.22

ПРОСКУРЯКОВ КИРИЛЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ
**Изучение молекулярно-генетических факторов, участвующих в регуляции
длины теломер у *Drosophila melanogaster*.**

Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидат биологических наук

Москва
2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН, в группе Структурно-функциональной организации генома *Drosophila melanogaster*

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Мельникова Л.С.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Любомирская Н.В.

кандидат биологических наук Лазебный О.Е.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2008 года в ___ часов на заседании диссертационный совет Д002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

канд.фарм.наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

Теломеры – это специализированные ДНК-белковые комплексы, находящиеся на концах линейных хромосом. Основной функцией теломер является обеспечение стабильности эукариотического генома. В настоящее время доказано, что поддержание строго определенного размера теломер критично для жизнедеятельности организма. Изменение длины теломер тесно связано с опухолеобразованием и старением клетки. Поэтому изучение механизмов контроля определенной длины теломер является актуальной научной задачей.

У большинства высших эукариот теломеры состоят из простых повторов G-богатой последовательности, а их удлинение обеспечивается специальным ферментом – теломеразой. У *Drosophila melanogaster* теломеры состоят из мобильных элементов типа LINE, ориентированных «голова к хвосту» - *HeT-A*, *TART* и *TANRE*.

Основными структурными единицами нормальной теломеры являются: 1) Терминальный комплекс, формирующийся на конце хромосомы и защищающий его от ферментов репарации; 2) Теломерный хроматин, который формируется на последовательностях теломерной ДНК. Данные структуры играют основную роль в процессе регуляции длины и стабильности теломер.

Несколько лет назад были получены линии *Drosophila melanogaster*, которые несли терминальные делеции. Было установлено, что терминально делетированные хромосомы дрозофилы также как и хромосомы с нормальными теломерами способны устойчиво поддерживаться в течение многих поколений. Кроме того, было показано, что *HeT-A* и *TART* элементы способны присоединяться к концам терминально делетированных хромосом. Эти данные свидетельствуют что у *Drosophila melanogaster* на концевых последовательностях терминально делетированных хромосом формируется нормальный теломерный хроматин и собирается терминальный белковый комплекс. Поэтому терминально делетированные хромосомы дрозофилы могут служить удобной модельной системой для изучения механизмов поддержания стабильной длины теломер и поиска составляющих компонентов специфических теломерных структур.

Данные, полученные в нашей лаборатории в течение нескольких последних лет, свидетельствуют, что теломерный хроматин, формирующийся у *Drosophila melanogaster* на концевых последовательностях ДНК длиной 4-5 т.п.н. обладает особыми свойствами. Однако вопрос о том, как - позитивно или негативно - влияет теломерный хроматин на сборку субтеломерных белковых комплексов, до сих пор остается открытым. В настоящей работе мы

изучили, каким образом теломерный хроматин влияет на репрессию, вызываемую белками группы Polycomb, которые участвуют в формировании субтеломерного хроматина.

Гены, контролирующие длину теломер, в настоящее время неизвестны. Несколько лет назад у *Drosophila melanogaster* были найдены два доминантных генетических фактора, влияющие на удлинение теломер – это *Telomere elongation (Tel)* и *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))*. В представленной работе с помощью одной и той же модельной системы было проведено сравнение свойств генетических факторов *Tel* и *E(tc)*.

Цели и задачи исследования:

Основными целями данной работы являлись: 1) изучение влияния теломерного хроматина на формирование субтеломерных белковых комплексов; 2) функциональное сравнение генетических факторов *Tel* и *E(tc)*, влияющих на удлинение теломер *Drosophila melanogaster*.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Создать модельные системы, позволяющие исследовать свойства теломерного хроматина и сравнить недавно открытые мутации *Enhancer of terminal gene conversion* и *Telomere elongation*.

2. Выяснить как теломерный хроматин влияет на формирование репрессионного комплекса белков группы Polycomb.

3. Определить участником какого механизма поддержания длины теломер (присоединения мобильных элементов к концу хромосомы или конверсии/рекомбинации) является доминантный генетический фактор *Telomere elongation*.

Научная новизна и практическое значение работы:

В представленной работе впервые было показано, что особая структура теломерного хроматина негативно влияет на формирование репрессионного Polycomb-зависимого комплекса. Полученные результаты позволяют предположить, что существует антогонизм между теломерным и субтеломерным (PcG-зависимым) хроматином.

Кроме того, были функционально разделены новые генетические факторы *Telomere elongation (Tel)* и *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))*, участвующие в контроле длины теломер у дрозофилы. Было установлено, что локализованные в одном и том же районе хромосомы 3 *Tel* и *E(tc)* являются разными мутациями. Также, впервые было показано, что на второй хромосоме в линии Gaiano присутствует неизвестный генетический фактор, участвующий в контроле длины теломер.

Несмотря на различия в структуре теломер, у теломеразозависимых организмов и у дрозофилы существуют общие механизмы, обеспечивающие поддержание стабильного

размера теломер. Во-первых, эксперименты, проведенные на дрожжах и млекопитающих, доказали, что при инактивации теломеразы у данных организмов индуцируется альтернативный механизм удлинения теломер, связанный с процессами конверсии\рекомбинации. В том числе, альтернативные механизмы удлинения теломер часто реализуются в раковых клетках. Во-вторых, в последнее время было найдено, что некоторые консервативные белки, участвующие в репарации ДНК, также принимают участие в формировании терминального комплекса, как у дрожжей и млекопитающих, так и у дрозофилы. Поэтому данные, полученные при изучении теломер дрозофилы помогают понять закономерности процесса регуляции длины теломер у различных эукариотических организмов и выявить основные белки, формирующие теломерный комплекс.

Апробация работы:

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции молодых ученых Young Scientist Forum (Вена, 2007), на 32-ой конференции FEBS (Вена, 2007), на международной молодежной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск, 2007).

Публикации:

По теме диссертационной работы опубликованы две научные статьи и тезисы, представленные на трех конференциях.

Структура и объем работы:

Диссертация изложена на 88 страницах, включает 2 таблицы, 18 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 112 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

1. Выбор базовой модельной системы для изучения свойств Polycomb-зависимого хроматина.

Ген *polyhomeotic* – один из генов группы Polycomb (PcG), которая включает около 30 локусов, играющих важную роль в процессе нормального развития дрозофилы и действующих как репрессоры гомеозисных генов (Jurgens, 1985). Известно, что PcG гены кодируют белки, которые влияют на компактизацию хроматина (Pirrotta & Rastelli, 1994) и связываются с особыми сайтами, названными Polycomb group Response Elements (PREs), найденными в регуляторных областях гомеозисных генов (Simon *et al.*, 1993).

Несколько лет назад в нашей лаборатории было показано, что в результате встраивания P-элемента в ген *polyhomeotic* возникает новый аллель *ph^{P1}* (Belenkaya *et al.*, 1998). Аллель *ph^{P1}*

кодирует химерный белок P-Polyhomeotic (P-Ph), состоящий из ДНК-связывающего домена транспозазы *P*-элемента и белка Polyhomeotic, у которого на N-конце отсутствуют 12 аминокислот. Белок P-Ph связывается с последовательностью *P*-элемента и рекрутирует другие PcG белки, что приводит к образованию функционального репрессивного комплекса, т.е. в этом случае концевые последовательности *P*-элемента выступают в роли PRE. Таким образом, если *P*-элемент встраивается перед промотором гена *yellow*, в присутствии мутации *ph^{P1}* наблюдается репрессия транскрипции этого гена. Ген *yellow* отвечает за окраску кутикулярных структур дрозофилы. В норме тело, крылья и щетинки у мухи имеют темную окраску. При *ph^{P1}*-зависимой репрессии тело и крылья дрозофилы становятся более светлыми, а щетинки приобретают переменную окраску (часть щетинок окрашена, а часть неокрашена). Сильная степень репрессии выражается в полном отсутствии окраски кутикулярных структур – тело, крылья и щетинки у мух светло-желтые.

Как упоминалось ранее, у дрозофилы теломерный хроматин может формироваться на любой неспецифичной последовательности ДНК. Ранее было показано, что теломерный хроматин, образующийся на концах терминально делетированных хромосом, негативно влияет на активность транспозазы *P*-элемента (Melnikova *et al.*, 2004). Чтобы выяснить, влияет ли теломерный хроматин на степень *ph^{P1}*-зависимой репрессии, мы использовали линии *Drosophila melanogaster*, в которых концевые последовательности ДНК, формирующие нормальную теломеру, отсутствовали, и концы X хромосом находились в кодирующей или регуляторной области гена *yellow* (линии *y^{TD}*) (Mason *et al.*, 1984; Biessmann & Mason, 1988). Локус *yellow* определяет пигментацию кутикулы, при этом степень пигментации прямо коррелирует с уровнем транскрипции, что позволяет визуально оценивать экспрессию гена. Эхансеры гена *yellow*, отвечающие за окраску тела и крыльев, расположены на расстоянии около 1 т.п.н. перед промотором гена, а эхансер, отвечающий за окраску щетинок находится в интроне (Рис. 1). Поэтому, когда в линиях, несущих терминальные делеции, отсутствуют дистальные эхансеры, мухи имеют фенотип *y²* - тело и крылья остаются желтыми, а щетинки окрашены. Однако необходимо отметить, что вследствие негативного влияния теломерного хроматина, эхансеры гена *yellow* неактивны, если они находятся на расстоянии менее 4 т.п.н. от конца терминально делетированной хромосомы (Mikhailovsky *et al.*, 1999).

Таким образом, степень пигментации кутикулы прямо коррелирует с расстоянием до конца терминально делетированной хромосомы: чем больше расстояние между эхансерами и концом хромосомы – тем темнее у мух тело и крылья.

Ген *yellow* находится на дистальном конце X хромосомы. Гемизиготные самцы или гомозиготные по y^{TD} -хромосоме самки не выживают, так как между геном *yellow* и теломерой находятся несколько жизненно важных генов.

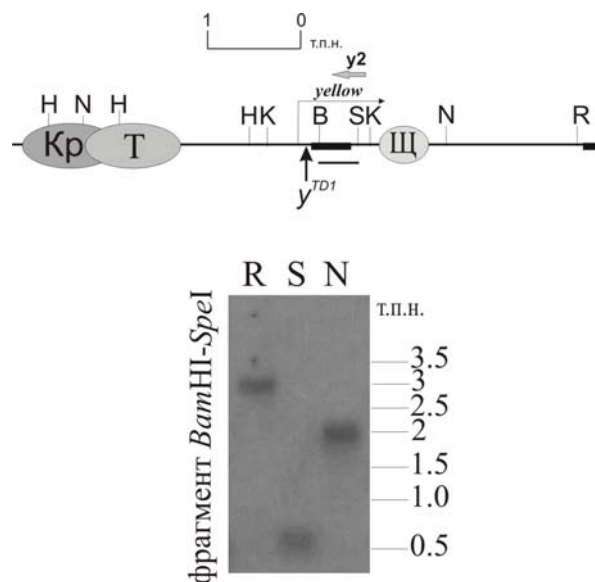


Рис. 1. Схема строения линии y^{TD1} . Обозначения: направление транскрипции гена *yellow* показано горизонтальной стрелкой над осью координат. Экзоны гена обозначены черными горизонтальными прямоугольниками. Энхансеры тела (Т), крыльев (Кр) и щетинок (Щ) обозначены серыми овалами. Н – *HindIII*, К – *KpnI*, В – *BamHI*, N – *NcoI*, S – *SpeI*, R – *EcoRI*. Серыми горизонтальными стрелками обозначены праймеры для ПЦР-анализа. Вертикальная стрелка обозначает место обрыва X хромосомы в линии y^{TD1} . Отрезок под осью координат - фрагмент гена *yellow*, использованный для гибридизации с ДНК полученных производных линий. Ниже приведены результаты Саузерн-блот анализа линии y^{TD1} , буквы над изображением обозначают использованные рестриктазы. Для гибридизации использовали фрагмент *BamHI-SpeI* из кодирующей части гена *yellow*.

Поэтому для поддержания терминально делетированных хромосом используют различные балансерные линии. Для проведения экспериментов нами была выбрана линия $y^{TD1}w^a/y ac w$. В балансерной линии $y ac w$ последовательности гена *yellow* отсутствуют, но сохраняется нормальная теломера. Поэтому хромосома $y ac w$ не мешает молекулярному и фенотипическому анализу гомологичной хромосомы, несущей терминальную делецию. Мухи линии $y^{TD1}/y ac w$ имели неокрашенные (светло-желтые) тело, крылья и щетинки, что говорит об отсутствии транскрипции гена *yellow*. С помощью Саузерн-блот анализа мы установили, что в описываемой линии отсутствует вся регуляторная область гена *yellow*, включая промотор (Рис. 1).

2. Получение терминально делетированных хромосом, содержащих *P*-элемент в предпромоторной области гена *yellow*.

Терминально делетированная хромосома может удлиняться при помощи генной конверсии, что позволяет получить измененные последовательности ДНК в нативном положении гена *yellow* (Melnikova & Georgiev, 2005). Это возможно, если матрица для конверсии частично гомологична оборванной хромосоме, но содержит в своем составе некую новую последовательность. В качестве матрицы для терминальной генной конверсии мы использовали линию дрозофилы $y^{2s14}w$, в которой *P*-элемент размером 1200 п.н. встроился перед промотором гена *yellow* в положение – 69 п.н. относительно сайта начала транскрипции гена (Belenkaya *et al.*, 1998) (Рис. 2). Самки из линии y^{TD1}/y^{acw} и самцы из линии $y^{2s14}w$ были скрещены между собой.

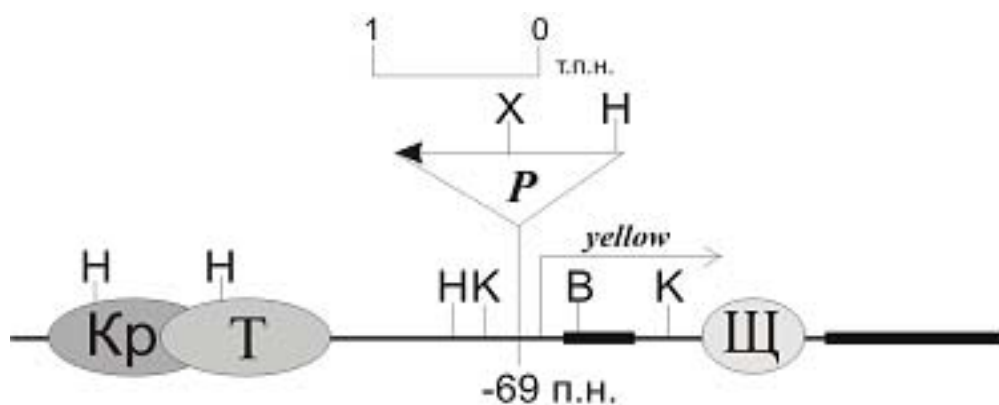


Рис. 2. Схема строения мутантного аллеля y^{2s14} . Ориентация *P*-элемента указана стрелкой внутри обозначающего его треугольника. -69 п.н. – расстояние от *P*-элемента до сайта начала транскрипции гена *yellow*. X – *XhoI*. Остальные обозначения смотри рис. 1.

Целью этого скрещивания являлось получение производных линий, в которых *P*-элемент, встроенный в предпромоторную область гена *yellow*, должен был находиться на разном расстоянии от конца терминально делетированных хромосом. Ранее было показано, что теломерный хроматин супрессирует генную конверсию, которая потенциально возможна при возникновении терминальной делеции (Melnikova *et al.*, 2004). Поэтому для повышения вероятности конверсионных событий в исходные линии дополнительно вводилась мутация *E(tc)*, которая увеличивает частоту терминальной генной конверсии в десятки раз. Полученные гетерозиготные самки $y^{TD}w^a/y^{2s14}w$ были скрещены с самцами $y^{2s14}w$. Линия $y^{TD1}w^a/y^{2s14}w$ поддерживалась на протяжении трех поколений, в течение которых происходили конверсионные события. Затем самки $y^{TD1}w^a/y^{2s14}w^1$ были скрещены с самцами

ywph^{p1}. В потомстве этого скрещивания были получены мухи с разной степенью *ph^{p1}*-зависимой репрессии.

Самки *y^{TD1}w^a/ywph^{p1}* с полностью окрашенными или варьируемыми щетинками были отобраны и индивидуально скрещены с самцами *y ac w*. Саузерн-блот анализ полученных производных линий (Рис. 3) выявил прямую корреляцию между эффектом, который мутация *ph^{p1}* оказывала на окраску щетинок и расстоянием от *P*-элемента до конца терминально делетированной хромосомы. Полученные результаты позволили нам разделить производные линии на 4 класса (A, B, C, D).

3. Анализ *ph^{p1}*-зависимой репрессии в полученных производных линиях *Drosophila melanogaster*.

Самки класса А - *y^{TD-A}w^a/ywph^{p1}*, имели фенотип *y²*. В этом случае терминальный обрыв хромосомы находился на расстоянии 100 – 500 п.н. по отношению к сайту встраивания *P*-элемента в аллеле *y^{2s14}* (Рис. 3, табл. 1 класс А).

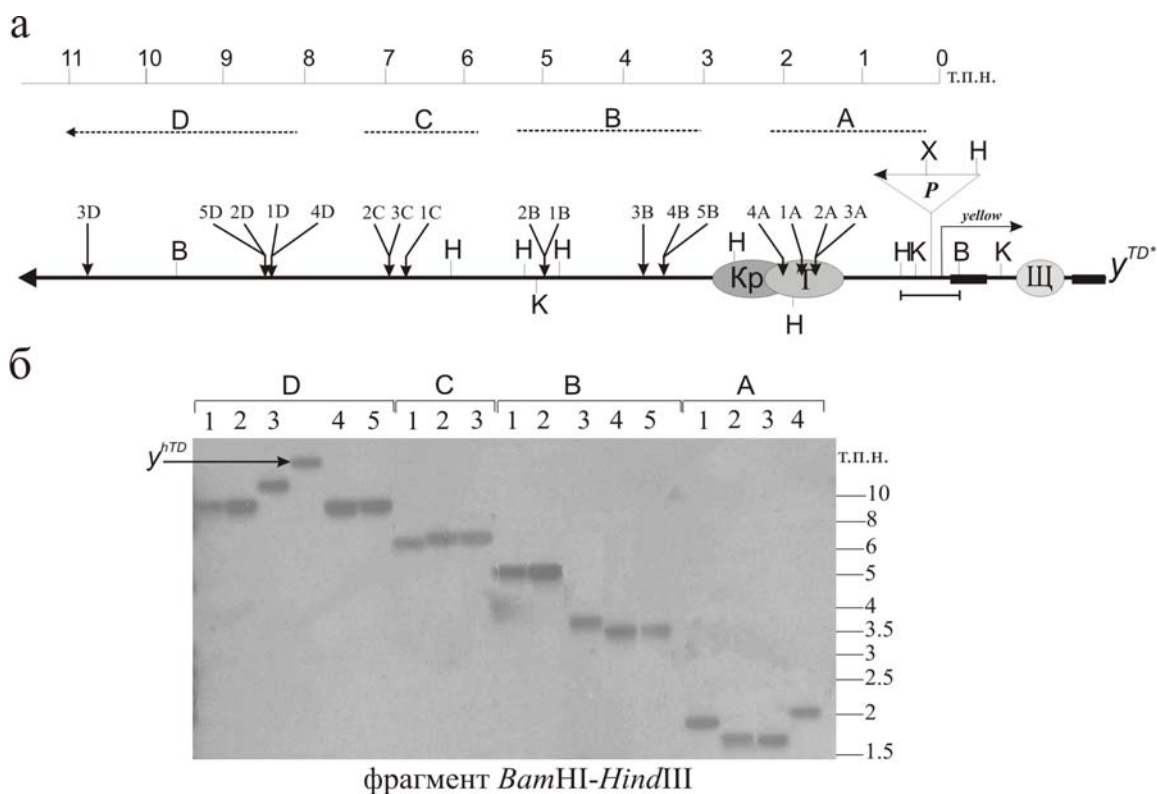


Рис. 3. а – Схематичное изображение линий с терминально делетированной X хромосомой, использованных в работе. Обозначения: Пунктирными отрезками обозначены районы, в которых были картированы терминальные обрывы - вертикальные стрелки над осью координат - у соответствующих классов производных линий. Остальные обозначения смотри рис. 1 и рис. 2. б – Картирование терминальных обрывов хромосом в полученных производных линиях разных классов. ДНК производных линий была обработана рестриктазой *Bam*HI, для гибридизации был использован фрагмент *Hind*III-*Bam*HI из гена *yellow*.

Однако несмотря на присутствие P -элемента в предпромоторной области гена *yellow*, в отобранных линиях класса А ph^{p1} -зависимая репрессия отсутствовала. Возможно, в данном случае на последовательностях P -элемента не собирался репрессивный комплекс.

Таблица 1. Влияние расстояния между P -элементом и концом терминально делетированной хромосомы на Polycomb-зависимую репрессию гена *yellow*.

| Класс | Генотип линии | Окраска щетинок |
|---------------------|------------------------------|---------------------|
| А (100-500 п.н.) | $y^{TD-A}/y\ ac$ | + |
| | $y^{TD-A}/y\ ph^{p1}$ | + |
| | $y^{TD-A}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ | + |
| В (2-3,5 тпн) | $y^{TD-B}/y\ ac$ | + |
| | $y^{TD-B}/y\ ph^{p1}$ | слабо вариабельная |
| | $y^{TD-B}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ | слабо вариабельная |
| С (5-6 тпн) | $y^{TD-C}/y\ ac$ | + |
| | $y^{TD-C}/y\ ph^{p1}$ | средне вариабельная |
| | $y^{TD-C}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ | средне вариабельная |
| D (>8 тпн) | $y^{TD-D}/y\ ac$ | + |
| | $y^{TD-D}/y\ ph^{p1}$ | сильно вариабельная |
| | $y^{TD-D}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ | неокрашены |
| y^{hTD} (>10 тпн) | $y^{hTD}/y\ ac$ | + |
| | $y^{hTD}/y\ ph^{p1}$ | сильно вариабельная |
| | $y^{hTD}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ | неокрашены |
| контроль | $y^{2s14}/y\ ph^{p1}$ | сильно вариабельная |
| | $y^{2s14}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ | неокрашены |

Пояснение: В скобках указано расстояние между P -элементом и терминальным обрывом хромосомы. Окраска щетинок: + - щетинки полностью окрашены как у мух дикого типа; слабо вариабельная - неокрашены 10-20% щетинок и волосков; средне вариабельная - неокрашены 30-60% щетинок и волосков; сильно вариабельная - неокрашены 80-90% щетинок и волосков; неокрашены - все щетинки и волоски светло-желтого цвета (фенотип y^1).

Чтобы проверить данное предположение, мы попытались воспроизвести известный феномен кооперативной репрессии, который выражается в усилении активности слабого PRE при наличие сильного PRE на гомологичной хромосоме. Для этого был использован аллель y^{2s11} (Belenkaya *et al.*, 1998), содержащий две копии P -элемента перед промотором гена *yellow* в положении – 69 п.н. относительно сайта начала транскрипции (Рис. 4).

В присутствии мутации ph^{p1} Рс-С комплекс, который собирается на двух P -элементах, вызывает полную репрессию транскрипции гена *yellow*. Поэтому последовательности P -элементов в аллеле y^{2s11} выступают в роли эффективного PRE. У гетерозиготных самок $y^{2s14}/y\ ph^{p1}$ тело и крылья слабо окрашены, а окраска щетинок сильно вариабельная, тогда как гетерозиготные самки $y^{2s14}/y^{2s11}\ ph^{p1}$ имеют фенотип y^1 (неокрашенные тело, крылья и щетинки) (табл. 1 контроль).

Наблюдаемое в этом случае усиление репрессии *in trans* обусловлено взаимодействием PcG комплексов, собирающихся на *P*-элементах гомологичных хромосом. Однако в гетерозиготных линиях $y^{TD-A}/y^{2s11}ph^{p1}$ щетинок у мух оставались полностью окрашенными, следовательно, даже мощный репрессивный комплекс на гомологичной хромосоме не усиливает репрессию в линиях, где P-Ph ассоциированный белковый комплекс, вероятно, не может связаться с последовательностью *P*-элемента, расположенного практически на конце хромосомы.

У гетерозиготных самок $y^{TD-B}w^a/ywph^{p1}$, отнесенных нами к классу В, в окраске щетинок наблюдалась слабая вариабельность, а терминальный обрыв находился на расстоянии 2 – 3,5 т.п.н. от места встраивания *P*-элемента. Однако аллель $y^{2s11}ph^{p1}$ не усиливал репрессию *in trans* (Рис. 3, табл. 1 класс В).

В линиях класса С расстояние между концом терминально deletированной хромосомы и *P*-элементом составляло около 5 т.п.н. В этом случае у гетерозиготных самок $y^{TD-C}w^a/ywph^{p1}$ часть щетинок была неокрашена (средняя степень вариабельности), т.е. наблюдалась частичная ph^{p1} -зависимая репрессия. Однако эта репрессия не усиливалась, даже если линии y^{TD-C} скрещивались с аллелем $y^{2s11}ph^{p1}$ (Рис. 3, табл. 1 класс С). Вероятно, в классах В и С связывание репрессивного белкового комплекса с последовательностью *P*-элемента, расположенного близко к концу хромосомы было очень нестабильным.

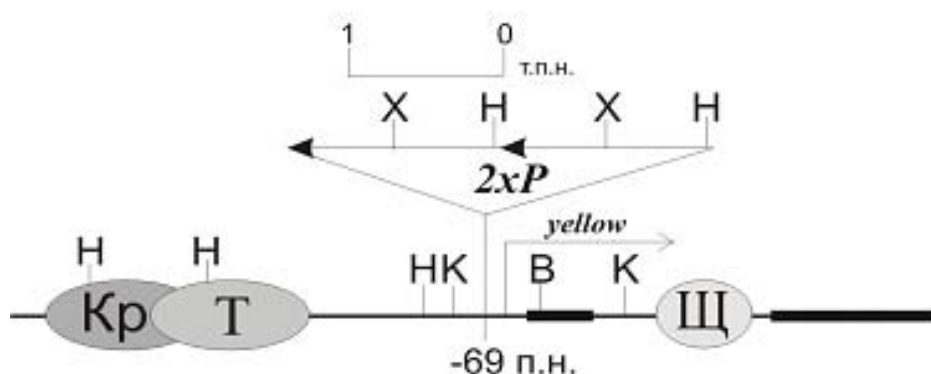


Рис. 4. Схема строения мутантного аллеля $y^{2s11}w$. Ориентация двух *P*-элементов указана стрелками внутри обозначающего их треугольника. Остальные обозначения смотри рис. 1 и рис. 2.

Для полного восстановления ph^{p1} -зависимой репрессии требуется, чтобы расстояние между *P*-элементом и местом терминального обрыва хромосомы было не менее 8 т.п.н. В линиях, отнесенных нами к классу D - y^{TD-D} размер последовательности, зачитанной с помощью терминальной генной конверсии составлял от 8 до 12 т.п.н. В этом случае энхансеры гена *yellow*, также как и *P*-элемент, находились на большом расстоянии от конца хромосомы, поэтому окраска тела, крыльев и щетинок у мух была сравнима с диким типом. У

гетерозиготных самок $y^{TD-D} w^a / ywph^{p1}$ тело и крылья светлели, а щетинки становились сильно варьируемыми в той же степени как в контрольной линии $y^{2s14} / ywph^{p1}$. Если же в положении *in-trans* присутствовала хромосома $y^{2s11} ph^{p1}$ ($y^{TD-D} / y^{2s11} ph^{p1}$), мухи имели фенотип y^1 (Рис. 3, табл. 1 класс D). Следовательно, в данном случае на последовательности *P*-элемента собирался функциональный репрессивный комплекс.

Интересно, что в одной из производных линий с максимальной степенью ph^{p1} -зависимой репрессии рестриктная карта последовательности ДНК, находящейся между *P*-элементом и концом терминально делегированной хромосомы частично не совпадала с рестриктной картой гена *yellow* (Рис. 5).

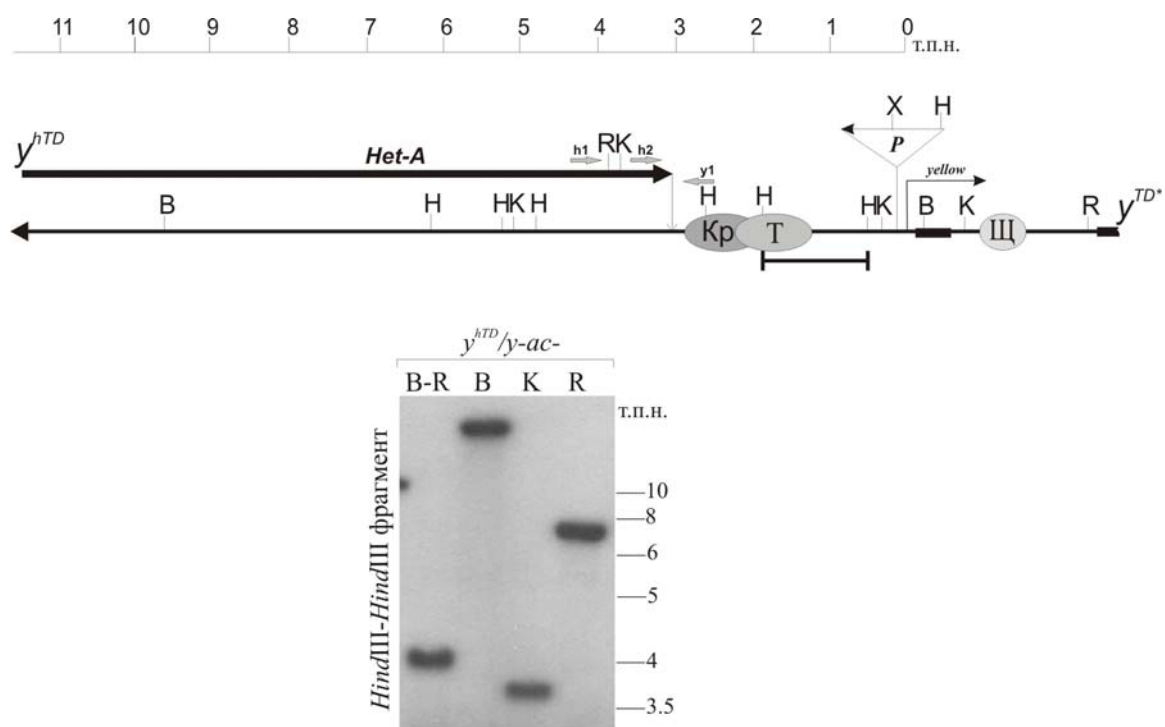


Рис. 5. Схематичное изображение линии y^{hTD} . Место присоединения *HeT-A* элемента в аллеле y^{hTD} показано вертикальной стрелкой над осью координат. *HeT-A* элемент обозначен черной горизонтальной стрелкой. Ниже приведены результаты Саузерн-блот анализа линии y^{hTD} , обработанной различными рестриктазами. Для гибридизации использовали фрагмент *HindIII-HindIII* из регуляторной части гена *yellow* (черный горизонтальный отрезок под осью координат). Остальные обозначения смотри рис. 1, рис. 2. и рис.3.

На основании дополнительного Саузерн-блот анализа было выдвинуто предположение, что в данном случае к последовательности гена *yellow*, зачитанной при терминальной конверсии, присоединился *HeT-A* элемент, поэтому линия получила название y^{hTD} . ПЦР с использованием праймеров из регуляторной области гена *yellow* и 5' нетранслируемой области *HeT-A* элемента позволила амплифицировать фрагмент ДНК в месте предполагаемого присоединения. В дальнейшем амплифицированный фрагмент был клонирован в плазмиду

pBluescript II SK(+) и просеквенирован. Полученные результаты подтвердили, что в линии y^{hTD} терминальный фрагмент ДНК является последовательностью *HeT-A* элемента.

4. Выбор базовой модельной системы для сравнения свойств мутаций *Telomere elongation (Tel)* и *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))*.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у дрозофилы удлинение теломер может происходить по трем механизмам: с помощью транспозиции мобильных элементов на конец хромосомы; с помощью генной конверсии и с помощью рекомбинации между теломерными повторами (Kahn *et al.*, 2000). В 2002 году у *Drosophila melanogaster* были найдены два доминантных генетических фактора, влияющие на удлинение теломер – это *Telomere elongation (Tel)* (Siriaco *et al.*, 2002) и *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))* (Melnikova & Georgiev, 2002). Мутация *Tel*, выделенная из природной линии Gaiano, существенно увеличивает количество мобильных элементов *HeT-A* и *TART* в теломерных районах хромосом. Мутация *Tel* была идентифицирована при помощи *in situ* гибридизации политеменных хромосом линии Oregon, несущей хромосому 3 из линии Gaiano, с фрагментами ДНК *HeT-A* и *TART* элементов. Поэтому неизвестно, какой именно механизм – присоединение новых ретротранспозонов или конверсия/рекомбинация между гомологичными последовательностями мобильных элементов – привел к увеличению количества *HeT-A* и *TART* (Siriaco *et al.*, 2002).

В отличие от *Tel*, мутация *E(tc)*, обнаруженная нами в лабораторной линии y^w , практически не влияет на присоединение *HeT-A* и *TART* элементов, но значительно повышает частоту терминальной генной конверсии. Функциональная роль *E(tc)* изучалась при помощи линий с терминально deletированной X хромосомой, в которых терминальный обрыв находился в регуляторной области гена *yellow* (y^{TD*}) (Melnikova & Georgiev, 2002).

С помощью генетической рекомбинации оба фактора, *Tel* и *E(tc)*, были локализованы в районе 91-93 хромосомы 3R. Этот район включает более 320 т.п.н. и 27 описанных на настоящий момент генов. Возникает вопрос: являются ли *Tel* и *E(tc)* одной и той же мутацией или это мутации в различных генах? Если мы имеем дело с одной и той же мутацией, то разница в природе наблюдаемых событий (присоединения мобильных элементов и терминальная генная конверсия) обусловлена модельной системой и методами исследования, при помощи которых был обнаружен соответствующий генетический фактор.

Чтобы выяснить, может ли *Tel* также как *E(tc)* вызывать увеличение частоты терминальных генных конверсий, мы решили протестировать мутацию *Tel* в обычно используемой нами модельной системе. Для этого мы заменили аутосомы в выбранных для работы линиях y^{TD*}/y^w на хромосому 2(*G2/G2*) или 3(*G3/G3*) из линии Gaiano. С помощью

генетических скрещиваний были получены контрольные линии y^{TD^*}/y^w ; CyO/If ; $TM6,Tb/MKRS,Sb$, в которых все аутосомы являлись балансерными хромосомами, то есть не несли какие-либо факторы, влияющие на изменение длины теломер; линии y^{TD^*}/y^w ; $G2/G2$; $TM6,Tb/MKRS,Sb$, которые несли хромосому II из линии Gaiano и линии y^{TD^*}/y^w ; CyO/If ; $G3/G3$, которые несли хромосому III из линии Gaiano.

5. Получение линий дрозофилы, несущих терминально делетированные хромосомы и аутосомы из линии Gaiano.

Изначально были использованы 3 линии, в которых концы терминально делетированных хромосом находились на расстоянии -80 п.н. (y^{TD-80}), -100 п.н. (y^{TD-100}), -140 п.н. (y^{TD-140}) от сайта начала транскрипции гена *yellow* (Рис. 6).

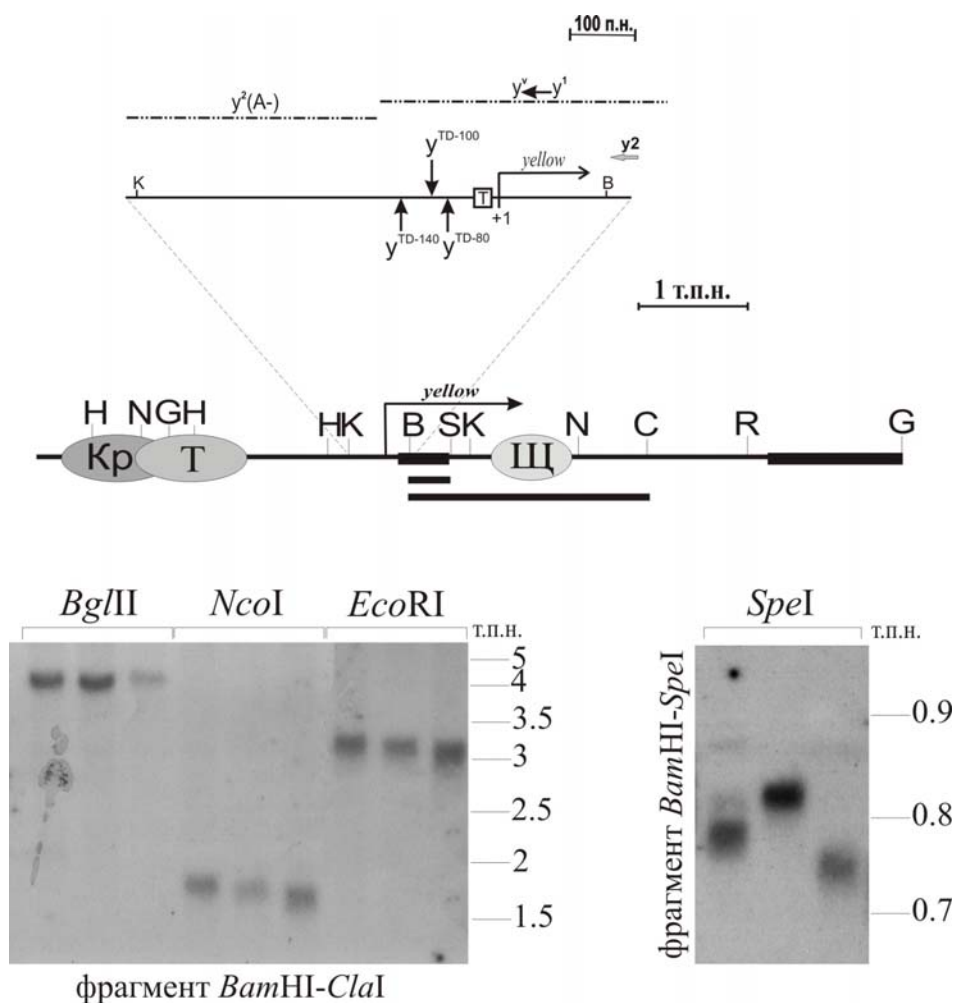


Рис. 6. Схематичное изображение линий с терминальными делециями y^{TD-80} , y^{TD-100} , y^{TD-140} . Обозначения: вертикальными стрелками обозначены места обрывов X хромосомы в соответствующих линиях. Пунктирными линиями обозначены различные фенотипы от y^1 до y^2 , не окрашенные аристы – А-. ТАТА-бокс (Т) обозначен квадратом, +1 – начало транскрипции. С – *Cla*I, G – *Bgl*II. Ниже приведены результаты Саузерн-блот анализа линий y^{TD-80} , y^{TD-100} , y^{TD-140} , над изображением обозначены использованные рестриктазы. Для гибридизации использовали фрагменты *Bam*HI-*Cla*I, *Bam*HI-*Spe*I из кодирующей части гена *yellow*. Остальные обозначения смотри рис. 1 и рис. 3.

В исходных линиях y^{TD*} терминальный обрыв хромосомы находился в непосредственной близости от промотора гена *yellow*, отсутствовали энхансеры, отвечающие за пигментацию тела и крыльев, но в интроне гена присутствовал энхансер, отвечающий за окраску щетинок, поэтому мухи имели неокрашенные тело и крылья и вариабельно окрашенные щетинки – фенотип y^v .

В таких линиях присоединение содержащего промотор *HeT-A* элемента к концам терминально делегированных хромосом приводит к появлению мух, у которых все щетинки становятся полностью окрашенными - фенотип y^2 (Kahn *et al.*, 2000). В используемых линиях хромосома y^{TD*} была сбалансирована хромосомой $y w$, т.к. гомозиготные по терминально делегированной хромосоме мухи не выживают. Аллель $y w$ не мешает фенотипическому анализу, т.к. вследствие замены нуклеотида в ATG кодоне ген *yellow* не экспрессируется. Однако в линии $y^{TD*}/y w$ хромосома, несущая аллель $y w$, может служить матрицей для терминальной генной конверсии (Mikhailovsky *et al.*, 1999). Поэтому удлинение хромосомы y^{TD*} может происходить как с помощью присоединений мобильных элементов, так и с помощью терминальных конверсий. Появление в результате конверсии перед промотором гена *yellow* последовательности размером до 1700 п.н. также приводит к возникновению y^2 фенотипа. После введения в линии y^{TD-80} , y^{TD-100} и y^{TD-140} аутосом из линии Gaiano и балансерных хромосом в потомстве были отобраны отдельные самки, имеющие фенотип y^2 . Необходимо отметить, что такие самки появились только в линиях $y^{TD*}/y w$; *CyO/If*; *G3/G3*.

6. Анализ природы производных линий, полученных на фоне мутации *Tel*.

Скрестив отобранных самок, имеющих фенотип y^2 с самцами $y ac w$, у которых на X хромосоме отсутствовали последовательности гена *yellow*, мы получили индивидуальные производные линии дрозофил. Чтобы выяснить, какое именно событие – терминальная генная конверсия или присоединение мобильного элемента явилось причиной изменения фенотипа в полученных линиях, структура терминально делегированных хромосом в этих линиях была изучена с помощью Саузерн-блот анализа и ПЦР-анализа с использованием праймеров из промоторной области гена *yellow* и из 5' нетранслируемой области *HeT-A* и *TART* элементов (Рис. 7).

Всего нами было протестировано 132 индивидуальные линии. Полученные результаты показали, что генетический фактор *Tel*, находящийся в линии Gaiano на хромосоме 3 вызывает два типа событий. Было установлено, что в 39 производных линиях удлинение хромосомы произошло вследствие присоединения мобильного элемента к концу терминально делегированной хромосомы, в остальных же 93 линиях при помощи терминальной генной конверсии.

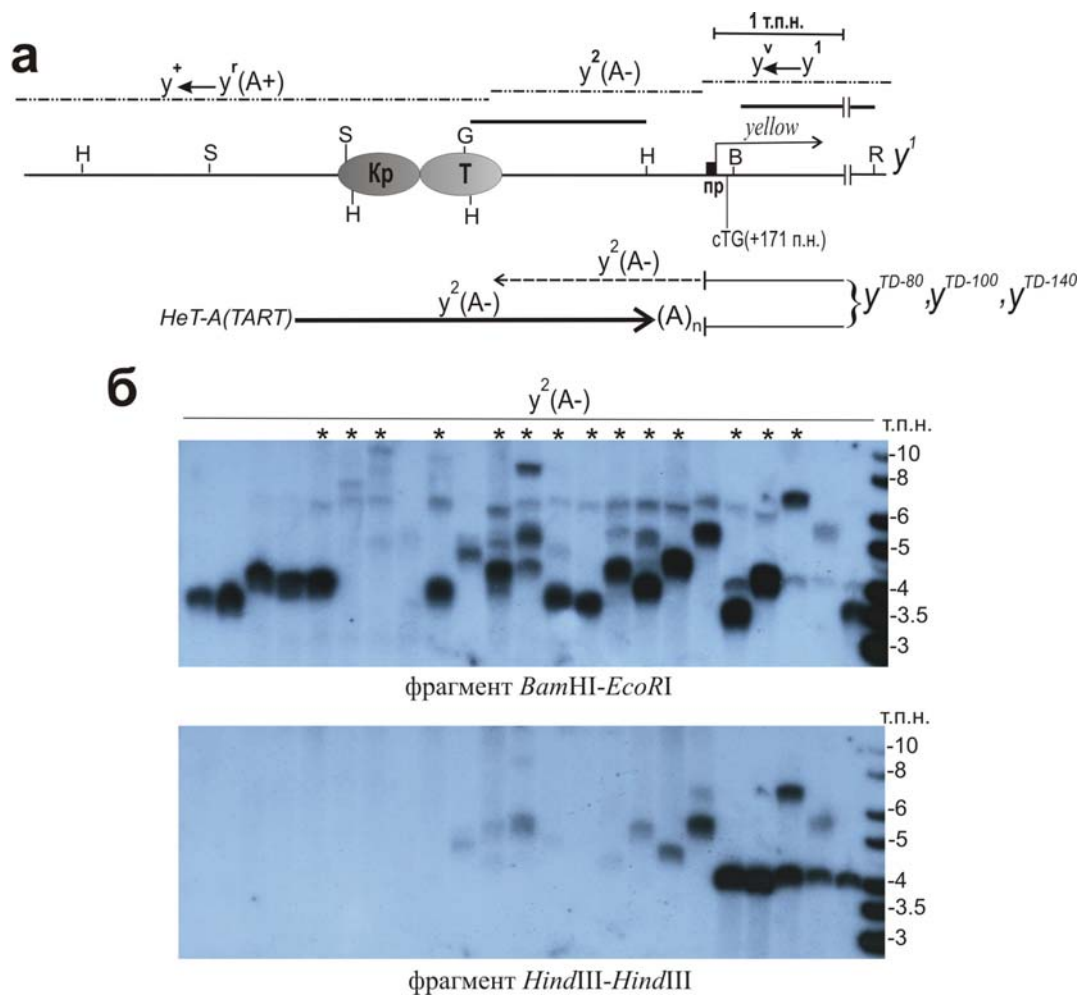


Рис. 7. а) Схематичное изображение линий с терминальными делециями y^{TD-80} , y^{TD-100} , y^{TD-140} . Положение терминальных обрывов указано по отношению к балансерной хромосоме y^w , черными стрелками изображены возможные присоединения мобильных элементов, а пунктирной стрелкой - терминальная генная конверсия, приведены исходные и производные фенотипы от y^1 до y^+ . Окрашенные аристы – A^+ , не окрашенные аристы – A^- . *S-SalI*. Остальные обозначения смотри рис. 1 и рис. 6. б) Результат Саузерн-блот анализа потомства производных от y^{TD-80} , y^{TD-100} и y^{TD-140} линий с фенотипом $y^2(A^-)$. Мембрана была последовательно гибридизована с двумя районами гена *yellow*. Звездочками отмечены линии, в которых происходили присоединения *Het-A* элемента, нижняя размытая полоса соответствует расстоянию от сайта *EcoRI* до конца хромосомы.

7. Анализ соотношения частоты терминальной генной конверсии и присоединений мобильных элементов к концу хромосомы в созданной модельной системе.

Чтобы выяснить, как в присутствии доминантного фактора *Tel* соотносятся частота конверсионных событий и частота присоединений мобильных элементов к концу хромосомы, мы использовали две полученные производные линии, в которых мухи имели фенотип y^2 и неокрашенные аристы, а терминальный обрыв хромосомы находился на расстоянии -900 п.н. (y^{TD-900}) и -1100 п.н. ($y^{TD-1100}$) от сайта начала транскрипции гена *yellow*, то есть в непосредственной близости от энхансеров тела и крыльев (Рис. 8а).

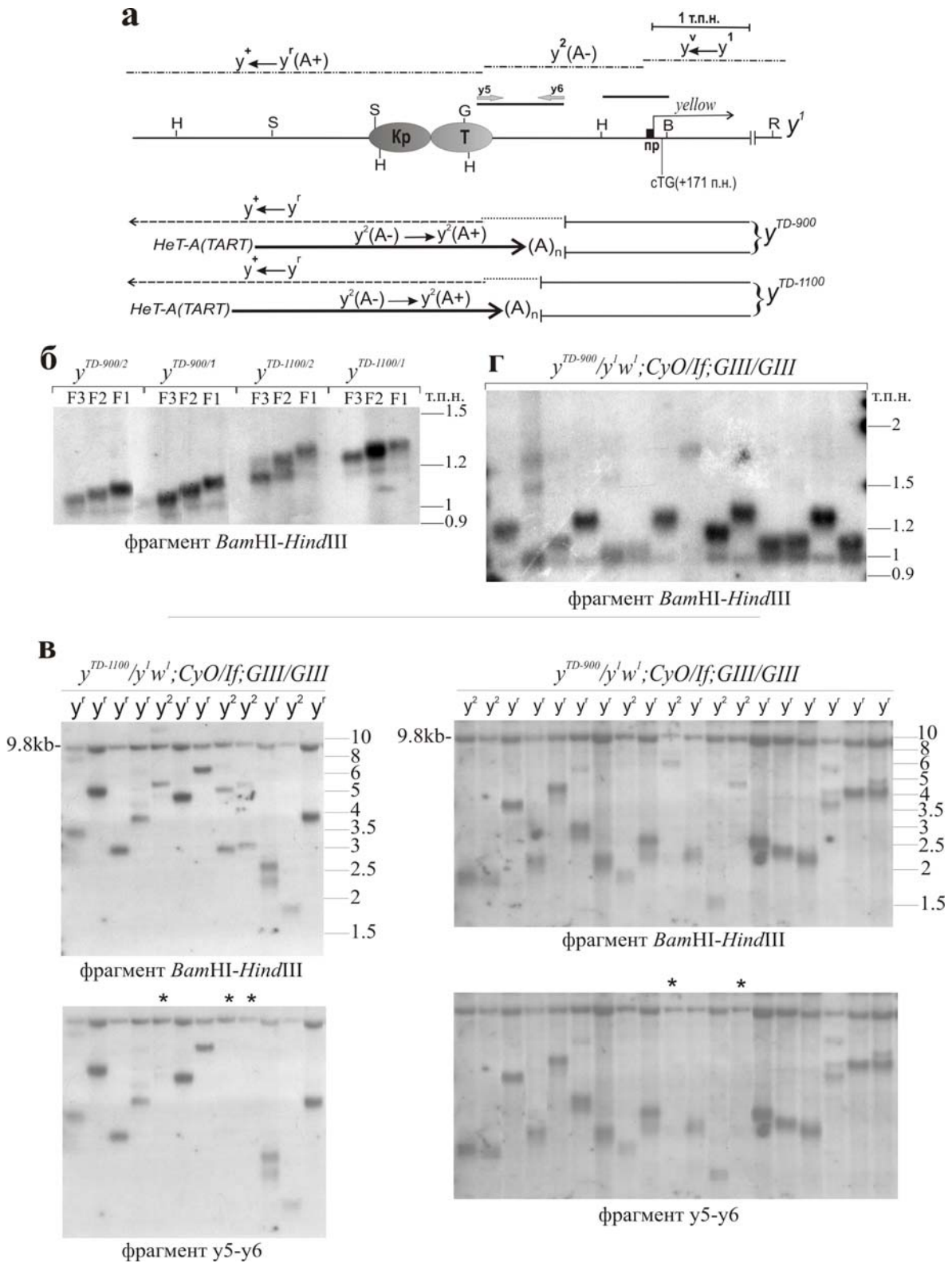


Рис. 8. а) Схематичное изображение линий с терминальными делециями y^{TD-900} , $y^{TD-1100}$. Многоточием обозначены конверсии, не приводящие к изменению фенотипа. б) Саузерн-блот анализ потомства индивидуальных самок $y^{TD-900}/y^1 w^1; CyO/Irf; TM6, Tb/MKRS, Sb$ с исходным фенотипом $y^2(A-)$. в) Саузерн-блот анализ потомства контрольных линий $y^{TD-900}/y^{TD-1100}/y^1 w^1; CyO/Irf; TM6, Tb/MKRS, Sb$. г) Пример Саузерн-блот анализа производных линий $y^{TD-900}/y^{TD-1100}/y^1 w^1; CyO/Irf; GIII/GIII$. ДНК линий обрабатывалась рестриктазой *Bam*HI. Мембраны, показанные на Рис. 8а и 9б, гибридизовались с фрагментом *Bam*HI-*Hind*III из регуляторной части гена *yellow*, на Рис. 8г дополнительно с фрагментом *y5-y6*. Остальные обозначения смотри рис. 1, рис. 5 и рис. 7.

Ранее было показано, что при присоединении *HeT-A* или *TART* элемента к концам терминально делетированных хромосом, расположенным в этой области, окраска тела и крыльев не изменяется, но полностью восстанавливается окраска аристов (Savitsky *et al.*, 2002). Также было показано, что при появлении на конце терминально делетированной хромосомы энхансеров тела и крыльев, мухи становятся более темными.

Уровень пигментации кутикулы прямо коррелирует с размером зачитанной при конверсии последовательности – чем больше расстояние от энхансеров до конца хромосомы, тем темнее тело и крылья – фенотипы y^r и y^+ (Mikhailovsky *et al.*, 1999) (Рис. 8а). Таким образом, мы можем фенотипически различать, какой именно механизм привел к удлинению хромосомы в потомстве выбранных линий. В линии y^{TD-900} и $y^{TD-1100}$ нами были введены хромосомы 2 и 3 из линии Gaiano, а также балансерные хромосомы. Затем из производных каждой линии нами были отобраны по 3 самки, которые имели только вторую (G2/G2) или третью (G3/G3) хромосому из линии Gaiano или же полностью стабилизированные аутосомы (*CyO/If; TM6,Tb/MKRS,Sb*).

Далее был проведен фенотипический анализ потомства этих самок. Все мухи, имеющие темную окраску тела и крыльев или окрашенные аристы были отобраны.

ПЦР-анализ с использованием праймеров из различных участков гена *yellow* и из 5' нетранслируемой области *HeT-A* элемента подтвердил, что различные обнаруженные в потомстве фенотипы соответствуют разным механизмами удлинения терминально делетированной хромосомы.

Потомство каждой линии с неизменным фенотипом (y^2 , неокрашенные аристы) было размножено и в следующем поколении был проведен количественный анализ частоты присоединений *HeT-A* элементов и терминальных генных конверсий (Табл. 2).

Среди потомства контрольных линий $y^{TD^*}/y w$; *CyO/If; TM6,Tb/MKRS,Sb* мы обнаружили только 3 самки с темными аристами, то есть частота присоединений мобильных элементов к отдельному концу хромосомы в этих линиях не отличалась от нормальной, которая варьирует в пределах от 10^{-1} до $< 10^{-4}$ (Biessmann *et.al.* 1992; Kahn *et.al.* 2000; Golubovsky *et.al.* 2001).

Саузерн-блот анализ выявил, что в контрольных линиях происходила постепенная деградация конца хромосомы (Рис. 8б). Этот результат подтверждает, что модельная хромосома y^{TD^*} не содержит какие-либо мутации, влияющие на изменение длины теломер.

В двух линиях $y^{TD^*}/y w$; *G2/G2; TM6,Tb/MKRS,Sb* также были найдены только 2 самки, у которых к концу терминально делетированной хромосомы присоединился *HeT-A* элемент. Однако в остальных четырех линиях, несущих хромосому 2 из линии Gaiano, наблюдалось небольшое увеличение частоты транспозиций мобильных элементов к концам терминально

делетированных хромосом (Табл. 2). Во всех линиях $y^{TD^*}/y w$; CyO/If ; $G3/G3$ удлинение терминально deletированных хромосом происходило с высокой частотой при помощи обоих механизмов - присоединений *HeT-A* элементов и терминальных генных конверсий - что было подтверждено молекулярными методами анализа (Рис. 8в, табл. 2).

Таблица 2. Анализ соотношения частот транспозиций мобильных элементов к концу хромосомы и терминальных генных конверсий в присутствии мутации *Tel*.

| Генотип линии y^{TD^*} | Общее количество самок в линии | Количество самок фенотипа y^2 , окрашенные аристы (% от общего количества) | Количество самок фенотипов y^r - y^+ , (% от общего количества) |
|--------------------------------|--------------------------------|--|---|
| $y^{TD-900/1}/y w$; контроль | 945 | 1 (0,1) | - |
| $y^{TD-900/2}/y w$; контроль | 450 | - | - |
| $y^{TD-900/3}/y w$; контроль | 832 | - | - |
| $y^{TD-1100/1}/y w$; контроль | 778 | 1 (0,1) | - |
| $y^{TD-1100/2}/y w$; контроль | 287 | - | - |
| $y^{TD-1100/3}/y w$; контроль | 985 | 1 (0,1) | - |
| $y^{TD-900/1}/y w$; G2/G2 | 1178 | 41 (3,5) | - |
| $y^{TD-900/1}/y w$; G2/G2 | 961 | 1 (0,1) | - |
| $y^{TD-900/3}/y w$; G2/G2 | 1274 | 9 (0,7) | - |
| $y^{TD-1100/1}/y w$; G2/G2 | 789 | 1 (0,1) | - |
| $y^{TD-1100/2}/y w$; G2/G2 | 1330 | 12 (0,9) | - |
| $y^{TD-1100/3}/y w$; G2/G2 | 583 | 24 (4,1) | - |
| $y^{TD-900/1}/y w$; G3/G3 | 450 | 12 (2,7) | 41 (9,1) |
| $y^{TD-900/1}/y w$; G3/G3 | 800 | 94 (11,8) | 4 (0,5) |
| $y^{TD-900/3}/y w$; G3/G3 | 860 | 195 (22,7) | 87 (10) |
| $y^{TD-1100/1}/y w$; G3/G3 | 973 | 161(16,5) | 12 (1,2) |
| $y^{TD-1100/2}/y w$; G3/G3 | 1168 | 306 (26,2) | 27 (2,3) |
| $y^{TD-1100/3}/y w$; G3/G3 | 688 | 124 (18,0) | 57 (8,3) |

Пояснение: В описании генотипа использованных линий контроль обозначает балансерные хромосомы (CyO/If ; $TM6, Tb/MKRS, Sb$); G2/G2 – введена хромосома 2 из линии Gaiano ($G2/G2$; $TM6, Tb/MKRS, Sb$); G3/G3 – введена хромосома 3 из линии Gaiano (CyO/If ; $G3/G3$).

Кроме того нами были протестированы несколько производных линий, имевшие исходный фенотип y^2 и неокрашенные аристы. Было установлено, что длина терминально deletированных хромосом у мух с неизменным фенотипом различна (Рис. 8г). В линиях

y^{TD*}/y^w ; *CyO/lf*; *G3/G3* происходили как длинные терминальные конверсии, приводившие к появлению мух с фенотипом y^r или y^+ , так и короткие конверсии размером до 500-700 п.н., которые не приводили к изменению фенотипа. Поэтому подсчитанная частота терминальных конверсий может быть несколько ниже реальной. Также был проведен анализ потомства нескольких отобранных во втором поколении самок *G3/G3*, имевших темную окраску тела и крыльев. Было обнаружено, что в нескольких производных линиях к концам удлинённых в результате конверсии хромосом присоединились *HeT-A* элементы. Таким образом, введение мутации *Tel* в y^{TD*} линии, которые обычно используются нами как модельная система для изучения влияния различных факторов на изменение длины теломер, не приводит к предпочтению конверсионного механизма удлинения теломер.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Антогонизм между теломерным и *Polysomb* – зависимым хроматином на конце терминально делегированных хромосом у *Drosophila melanogaster*.

Основной структурой, обеспечивающей стабильность теломер является особый теломерный хроматин. Именно с ним ассоциировано большинство белков, участвующих в регуляции длины теломер. В настоящее время наиболее хорошо изучена структура теломерного хроматина *Saccharomyces cerevisiae*, что связано с небольшим размером теломер у этих дрожжей (Louis, 1995). Структура теломерного хроматина у дрозофилы в настоящий момент практически не изучена. Однако в течение нескольких последних лет были проведены исследования, которые позволяют предположить, что у дрозофилы размер последовательностей, на которых формируется теломерный хроматин составляет 4-5 т.п.н. Кроме того, эта структура обладает особыми свойствами. Теломерный хроматин препятствует взаимодействию между регуляторными элементами, расположенными на конце хромосомы, но не препятствует связыванию транскрипционных факторов с промотором и даже облегчает его (Savitsky *et al.*, 2003; Melnikova *et al.*, 2008). Также теломерный хроматин препятствует связыванию транспозазы с концами *P*-элемента, расположенного на конце хромосомы (Melnikova *et al.*, 2004). Таким образом, теломерный хроматин дрозофилы негативно влияет на сборку либо стабильность одних белковых комплексов, сайты для которых находятся в зоне его действия, но в то же время может способствовать функционированию других, т.е. не обладает репрессорным эффектом.

Известно, что у всех эукариотических организмов непосредственно к теломерам примыкают особые субтеломерные повторяющиеся последовательности, с которыми ассоциирован специфический белковый комплекс (Kamner *et al.*, 1997). В формировании субтеломерного хроматина у дрозофилы участвуют белки группы *Polysomb*, обладающие

репрессорными свойствами (Pirrotta *et al.*, 1994). Предполагается, что именно с функционированием PcG – комплексов связан известный репрессорный эффект субтеломерных районов (Karpen & Spradling, 1992; Wallrath & Elgin, 1995; Gryderman *et al.*, 1999). Следовательно, теломерный хроматин отличается от субтеломерного хроматина и перицентрического гетерохроматина, которые репрессируют транскрипцию эухроматиновых генов. Возможно, репрессивный субтеломерный гетерохроматин и теломерный хроматин функционально антагонистичны. Поэтому вопрос о том, как - позитивно или негативно - влияет теломерный хроматин на сборку субтеломерных белковых комплексов, представляет особый интерес.

В представленной работе мы использовали модельную систему, в которой *P*-элемент был встроен перед промотором гена *yellow* и находился на различном расстоянии от конца терминально делетированной хромосомы. Последовательности гена *yellow*, находящиеся на конце хромосомы имеют свойства реальной теломеры. Это связано с тем, что теломерные белки дрозофилы не требуют специфичных сайтов связывания и могут образовывать теломерный комплекс на любой терминальной последовательности ДНК.

В использованной модельной системе *P*-элемент в присутствии мутантного аллеля *ph^{p1}* являлся местом связывания белков группы Polycomb (PcG). Таким образом, мы изучили, как теломерный хроматин, образующийся на концевых последовательностях гена *yellow*, влияет на формирование репрессивного Polycomb-зависимого комплекса, который собирается на последовательностях *P*-элемента и ассоциирован у дрозофилы с субтеломерными повторами.

Полученные результаты свидетельствуют, что расстояние между концом терминально делетированной хромосомы и *P*-элементом в используемой модельной системе является основным фактором, от которого зависит формирование белкового PcG-комплекса. Если расстояние между концом хромосомы и *P*-элементом составляло менее 4 т.п.н. то область формирования теломерного хроматина включала в себя последовательность *P*-элемента и формирование Polycomb-зависимого репрессивного комплекса было подавлено. При увеличении расстояния до 5-6 т.п.н. зона сборки теломерного хроматина непосредственно граничила с зоной сборки PcG-комплекса. Наблюдаемая в этом случае слабая репрессивная активность свидетельствует, что близость последовательностей, обладающих свойствами теломер, негативно влияет на формирование репрессивного комплекса. Хорошо выраженная Polycomb-зависимая репрессия наблюдалась нами только если расстояние от конца хромосомы до *P*-элемента возрастало до 8 т.п.н.. Вероятно, Pc-G комплекс в присутствии мутации *ph^{p1}* может стабильно связываться с последовательностью *P*-элемента и взаимодействовать с таким же комплексом, находящимся на гомологичной хромосоме, только

если расстояние между ним и теломерным комплексом, который формируется на конце хромосомы достаточно велико.

Если предположить, что у дрозофилы как и у дрожжей на конце хромосомы формируется Т-петля, то полученные нами результаты можно объяснить следующим образом: вероятно, в линиях класса А репрессивный РсG-зависимый комплекс не может собираться, т.к. Р-элемент находится в зоне сборки белкового комплекса, замыкающего Т-петлю (так называемой D-петли). В линиях класса В Р-элемент располагается внутри Т-петли. Он становится более доступным, но сборка репрессивного комплекса все еще сильно затруднена. В линиях класса С Р-элемент уже находится за пределами Т-петли. Однако ее близость влияет на сборку репрессивного комплекса. В случае класса D Р-элемент находится на значительном расстоянии от предполагаемой Т-петли. Связыванию репрессивных белков ничто не мешает, поэтому наблюдается максимальная степень Polycomb-зависимой репрессии. Таким образом, полученные нами результаты являются косвенным доказательством формирования Т-петли на конце хромосом у дрозофилы.

Отсутствие разницы в степени ph^{P1} -зависимой репрессии в линиях y^{TD-D} , полученных путем терминальной геной конверсии и в линии y^{hTD} , где к концу хромосомы присоединился *HeT-A* элемент, позволяет сделать вывод, что степень ph^{P1} -зависимой репрессии в терминально делетированных линиях напрямую зависит от расстояния до конца хромосомы и не зависит от природы концевой последовательности ДНК.

Полученные в представленной работе результаты свидетельствуют, что между теломерным и субтеломерным (Рс-G-зависимым) хроматином существует антагонизм.

Для понимания природы этого явления необходимо подробное изучение состава терминального белкового комплекса и теломерного хроматина, механизмов их образования, поддержания и функционирования.

2. Функциональное разделение генетических факторов *Telomere elongation (Tel)* и *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))*, участвующих в регуляции длины теломер у *Drosophila melanogaster*.

Терминально делетированные хромосомы *Drosophila melanogaster* являются наиболее удобной модельной системой как для поиска белков, которые образуют структуру теломерного хроматина или входят в состав терминального комплекса, так и для изучения влияния мутаций в различных генах на изменение длины теломер. В течение нескольких последних лет при успешном использовании этой модельной системы в нашей лаборатории было показано, что несколько белков играют негативную роль в регуляции удлинения последовательностей ДНК на конце делетированной хромосомы. Однако мутации в генах,

кодирующих эти белки, влияют на различные механизмы, участвующие в поддержании длины теломер.

Недавние исследования показали, что основным фактор, определяющий структуру гетерохроматина, HP1 (heterochromatin protein 1) связывается с теломерами и необходим для их функционирования (Fanti *et.al.*, 1998). Снижение концентрации белка HP1 в клетках приводит к слиянию теломер и резко снижает стабильность хромосом (Fanti *et.al.*, 1998). Белок HP1 также присутствует на концах терминальных делеций. Недавно было продемонстрировано, что мутации в гене *Su(var)²⁻⁵*, кодирующем HP1, в гетерозиготном состоянии увеличивают более чем в 100 раз частоту *HeT-A* и *TART* присоединений к концу делетированной хромосомы (Savitsky *et.al.*, 2002).

Два белка Ku70 и Ku80 являются высококонсервативными. Они были найдены у всех эукариот. Гетеродимер Ku70/Ku80 - это основной компонент белкового комплекса, осуществляющего репарацию ДНК (Pastwa & Blasiak, 2003). Неожиданно у дрожжей Ku белки были найдены на концах хромосом, а затем было доказано, что данные белки играют важную роль в метаболизме дрожжевых теломер. Недавно было показано, что Ku комплекс также участвует в регуляции длины теломер у млекопитающих и у растений (Bertuch & Lundblad, 2003). Ранее в нашей лаборатории было показано, что Ku белки связываются с концами теломер дрозофилы и участвуют в формировании терминального комплекса. Мутации в генах, кодирующих Ku70 и Ku80 влияли как на частоту транспозиций мобильных элементов так и на частоту терминальной генной конверсии (Melnikova *et al.*, 2005).

В отличие от *Su(var)²⁻⁵* мутаций и мутаций в генах *Ku70/ Ku80*, мутация *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))*, впервые описанная в нашей лаборатории, существенно увеличивает частоту удлинений терминальной ДНК при помощи генной конверсии, но не влияет на частоту транспозиций *HeT-A* и *TART* элементов к концу хромосомы (Melnikova *et al.*, 2005). В настоящее время неизвестно, в каком гене находится мутация *E(tc)* и какой белок кодирует этот ген.

Недавно была описана новая доминантная мутация, названная *Telomere elongation (Tel)*, стимулирующая удлинение теломер (Siriaco *et.al.*, 2002). Мутация *Tel* была обнаружена в линии Gaiano, изолированной из природной популяции *Drosophila* (Siriaco *et.al.*, 2002). Однако, механизм удлинения теломер, в котором участвует *Tel* не известен. Предполагается, что *Tel* может прямо или косвенно увеличивать активность обратной транскриптазы, которая обеспечивает транскрипцию *HeT-A* и *TART* элементов. Также возможно, что *Tel* может кодировать продукт, который увеличивает доступность РНК *HeT-A* и *TART* элементов для обратной транскриптазы или же является посредником в процессе

транспозиций к концам хромосом. Кроме того не отрицается, что *Tel* является участником механизма конверсии/рекомбинации на концах хромосом. Ген, в котором находится мутация *Tel* и белок, который этот ген кодирует также неизвестны. Интересно, что *Tel* и *E(tc)* картированы в одной области третьей хромосомы. Таким образом, мутации *Tel* и *E(tc)* имеют различное происхождение, но могут оказывать сходный эффект на удлинение теломер.

В представленной работе, совместив метод, при помощи которого был обнаружен доминантный фактор *Tel* и модельную систему, в которой был обнаружен *E(tc)*, мы функционально разделили эти две мутации. Ранее было показано, что именно мутация *Tel*, находящаяся на хромосоме III из линии Gaiano вызывает существенное увеличение *HeT-A* и *TART* элементов на концах хромосом (Siriaco *et.al.*, 2002). При введении хромосомы III из линии Gaiano в линии с терминально deletированными хромосомами было показано, что удлинение конца хромосомы может происходить как с помощью транспозиций мобильных элементов, так и путем терминальной генной конверсии. Таким образом, хромосома III из линии Gaiano, содержащая мутацию *Tel*, проявляет более широкие функции, чем мутация *E(tc)*. Какой-либо другой генетический фактор, кроме *Tel*, находящийся на хромосоме III и увеличивающий частоту присоединений *HeT-A* и *TART* элементов в настоящее время неизвестен. Поэтому полученные данные позволяют утверждать, что *Tel* и *E(tc)* – это не одна и та же мутация.

Нужно заметить, что мутация *Tel* также как *E(tc)* индуцирует только относительно короткие удлинения терминальной ДНК у *Drosophila*. Мы предполагаем, что короткие присоединения терминальной ДНК вызваны генной конверсией, а не механизмом сходным с BIR - нереципроктной рекомбинационно-зависимой репликацией, которая является эффективным механизмом репарации поврежденных хромосом. Ранее было показано, что BIR может вызывать очень большие удлинения ДНК (KRAUS *et al.*, 2001). Возможно, что события, инициированные BIR у *S. Cerevisiae*, могут не отличаться от возникающих во время генной конверсии. Однако, репликация ДНК в случае генной конверсии является менее эффективной, наблюдается высокий уровень диссоциации ДНК-полимеразы с матрицей. Поэтому мы предполагаем, что наблюдаемые нами события вызваны именно терминальной генной конверсией, использующей последовательности на гомологичной хромосоме в качестве матрицы.

Суммируя полученные данные, можно предположить, что хромосома III из линии Gaiano содержит оба генетических фактора - *Tel* и *E(tc)*, которые находятся в районе 91-93, а хромосома III из лабораторной линии у *w* - только *E(tc)*. Также можно предположить, что *Tel* и *E(tc)* являются аллельными вариантами одного и того же гена. Для физического разделения

этих генетических факторов необходимы дальнейшие молекулярно-генетические исследования, позволяющие выявить гены из района 91-93 хромосомы 3R, нарушения в которых влияют на изменение длины теломер.

Интересно также отметить, что при введении в используемую модельную систему хромосомы II из линии Gaiano наблюдалось некоторое увеличение частоты присоединений мобильных элементов к концам терминально делетированных хромосом. Полученный результат демонстрирует, что вторая хромосома из линии Gaiano содержит слабый, возможно рецессивный, генетический фактор, участвующий в контроле длины теломер. Возможно, это мутация в каком-либо гене, функциональная связь которого с регуляцией удлинения теломер еще не установлена. Однако нельзя отрицать возможность того, что обнаруженный фактор - это слабая мутация в гене *Su(var)²⁻⁵*, кодирующем белок HP1. Вероятно, этот фактор не был найден одновременно с *Tel*, т.к. модельная система, в которой ранее тестировалась хромосома II из линии Gaiano, была менее чувствительной по сравнению с используемой нами в представленной работе.

ВЫВОДЫ

1. Созданы оригинальные модельные системы, позволяющие выявить новые свойства теломерного хроматина и сравнить свойства недавно открытых мутаций *Enhancer of terminal gene conversion* и *Telomere elongation*, влияющих на регуляцию длины теломер у *Drosophila melanogaster*.

2. Доказано, что теломерный хроматин негативно влияет на формирование репрессивного белкового PcG-комплекса, что свидетельствует о наличии антагонизма между теломерным и субтеломерным Polycomb-зависимым хроматином.

3. Впервые показано, что доминантный генетический фактор *Telomere elongation*, участвует в различных механизмах поддержания длины теломер, он влияет как на присоединение мобильных элементов к концу хромосомы, так и терминальную генную конверсию.

4. Продемонстрировано, что доминантные генетические факторы *Enhancer of terminal gene conversion* и *Telomere elongation* не являются одной и той же мутацией.

5. Впервые показано, что вторая хромосома *Drosophila melanogaster* из линии Gaiano содержит генетический фактор, участвующий в контроле длины теломер.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Проскуряков К.А.**, Мельникова Л.С. Антогонизм между теломерным и Polycomb – зависимым хроматином на конце терминально делетированных хромосом у *Drosophila melanogaster*. Генетика. 2008. Т. 44. №11. С. 1562-1566.

2. **Проскуряков К.А.**, Мельникова Л.С. Функциональное разделение генетических факторов *Telomere elongation (Tel)* и *Enhancer of terminal gene conversion (E(tc))*, участвующих в регуляции длины теломер у *Drosophila melanogaster*. Доклады Академии Наук. 2008. Т. 421. №3 С. 406-410.

3. **Проскуряков К.А.**, Георгиев П.Г., Мельникова Л.С. Активация промотора на конце терминально делетированной хромосомы у *Drosophila melanogaster*. Сборник материалов международной молодежной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии». Томск, 9-12 мая, 2007. С. 149.

4. **К. Proskuryakov**, P. Georgiev and L. Melnikova Promoter activation at the end of the terminally truncated chromosome in *Drosophila melanogaster*. The FEBS journal. 2007. V. 234. I. s1. P. 72.

5. **К. Proskuryakov**, P. Georgiev and L. Melnikova Promoter activation at the end of the terminally truncated chromosome in *Drosophila melanogaster*. Abstracts of the 7th Young Scientist Forum: Molecular Networks, Vienna, Austria, 5-7 July, 2007. P. 44.