

На правах рукописи  
УДК 575.22.595.773.4

Силичева Маргарита Александровна

**Новые аспекты эффекта положения трансгенов**  
*Drosophila melanogaster*

Специальность 03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2008

Работа выполнена в группе Молекулярной Генетики Дрозофилы  
Учреждения Российской академии наук Институт биологии гена РАН

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Максименко Оксана Геннадьевна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук профессор

Крамеров Дмитрий Александрович

Кандидат биологических наук

Куликов Алексей Михайлович

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им.Н.И.Вавилова  
РАН

Защита состоится «\_\_\_\_\_» ноября 2008 г. в «\_\_\_\_\_» часов.

на заседании Диссертационного совета Д 002.37.01 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: 119991, Москва, В-334, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Л.С.Грабовская

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Транскрипция является одним из важнейших этапов реализации генетической информации. Транскрипция эукариот регулируется многочисленными цис- и транс-факторами, соответственно, регуляторными последовательностями и белками, которые осуществляют взаимодействие между дальними (энхансерами, сайленсерами) и ближними (проксимальный промотор, коровый промотор) регуляторными элементами. Для правильной работы гена необходимо, чтобы на промотор гена воздействовали только «свои» регуляторные последовательности. Однако регуляторные последовательности не являются абсолютно специфичными. Энхансеры могут активировать не только свой промотор (хотя специальные последовательности-коммуникаторы сильно повышают специфичность энхансера), но и другие доступные промоторы. Это может нарушать правильную регуляцию генов. Отчасти эту проблему помогают решить инсуляторы – последовательности, препятствующие взаимодействию промотора с энхансером. Предполагается, что они способны взаимодействовать друг с другом, образуя независимые транскрипционные домены (Geyer 1997).

Неспецифичностью регуляторных элементов в значительной степени объясняется эффект положения – различный уровень экспрессии гена в разном нуклеотидном окружении. Эффект положения наблюдается как при хромосомных перестройках, так и у трансгенов. На уровень экспрессии трансгена влияют:

- находящиеся рядом энхансеры и сайленсеры,
- уровень конденсированности хроматина,
- эндогенная транскрипция, проходящая через трансген.

Принято считать, что инсуляторы способны блокировать эффект положения, так как они блокируют взаимодействие промотора с энхансерами и останавливают распространение конденсированного хроматина, однако их взаимодействие с проходящей через трансген транскрипцией практически не изучено. Неизвестно, препятствует ли взаимодействие двух инсуляторов (и как следствие, образование независимого транскрипционного домена) элонгации транскрипции, которая началась за пределами домена.

В первой части данной работы мы исследовали вклад эндогенной транскрипции, проходящей через трансген на примере гена *miniwhite*, лишённого промотора, а также вклад транскрипции в общий эффект положения на примере гена *miniwhite*, содержащего функциональный промотор. Мы изучили влияние терминаторов на эффект положения на

примере вирусного терминатора транскрипции SV40, а также влияние инсуляторов на примере инсулятора Su(Hw).

Во второй части данной работы мы исследовали влияние эффекта положения на свойства регуляторной последовательности En(Hu). Последовательность En(Hu) является частью регуляторной области *achaete-scute* генного комплекса. В нашей лаборатории были получены данные о том, что эта последовательность, будучи перемещена при инверсии в район регуляторных элементов гена *yellow* нарушает работу и гена *yellow* и генов *ac-sc* локуса. Мы исследовали свойства последовательности En(Hu) в разных трансгенных системах.

### **Цели и задачи исследования**

Целями данной работы являлось:

- исследование вклада эндогенной транскрипции в эффект положения трансгенов, а также факторов, блокирующих эффект положения,
- исследование эффекта положения регуляторной последовательности на примере элемента En(Hu).

В связи с этим в данной работе ставились следующие задачи:

- Изучение влияния эндогенной транскрипции на эффект положения трансгенного гена *miniwhite* в отсутствие промотора.
- Изучение вклада эндогенной транскрипции в эффект положения гена *miniwhite*, содержащего функциональный промотор.
- Изучение влияния терминатора транскрипции из вируса SV40 и инсулятора Su(Hw) на эффект положения лишённого промотора гена *miniwhite* и гена *miniwhite*, содержащего функциональный промотор.
- Изучение влияния эффекта положения на свойства последовательности En(Hu) в различных трансгенных системах.

**Научная новизна и практическое значение работы.** В данной работе впервые было показано, что трансгенный ген *miniwhite* способен активироваться за счет эндогенной транскрипции в различных местах генома. Также было показано, что инсулятор Su(Hw) не препятствует прохождению через трансген эндогенной транскрипции. Таким образом, инсуляторы Su(Hw) не образуют независимых транскрипционных доменов, как считалось раньше.

Впервые было показано, что терминаторы транскрипции в значительной степени влияют на эффект положения трансгенов. Также впервые были исследованы свойства последовательности En(Hu) в различных трансгенных системах.

Исследование факторов, отвечающих за появления эффекта положения, и также факторов, отвечающих за блокирование эффекта положения, может помочь созданию независимо экспрессирующихся трансгенов у разных организмов.

**Апробация работы.** Основные научные результаты диссертационной работы были представлены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на конференции EMBO conference Series on Nuclear Structure and Dynamics (Montpellier, 2007), на научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань 2008), на международной конференции "Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии" (Харьков 2008) и на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2008).

**Публикации.** По теме диссертации были опубликовано 6 статей и тезисов научных сообщений.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 93 страницах, включает себя 9 таблиц, 28 рисунков и 3 диаграммы. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 171 источник.

## Результаты

### **1 Влияние эндогенной транскрипции на эффект положения**

Для изучения эффекта положения мы использовали ген *miniwhite Drosophila melanogaster*.

Ген *white Drosophila melanogaster* отвечает за пигментацию глаз и семенников. Он контролируется тканеспецифичными энхансерами, обеспечивающими экспрессию гена в глазах и семенниках мух. Ген *white* начинает экспрессироваться на личиночной стадии (Hiebert and Birchler, 1992; Davison et al, 1985). В присутствии энхансера глаза мух окрашены в ярко-красный цвет, в отсутствие – темно-желтый или оранжевый (Pirrotta et al, 1985). В нашей лаборатории были получены данные, указывающие на то, что ген *miniwhite* в способен экспрессироваться в генноинженерных конструкциях отсутствии промотора, хотя и с небольшой вероятностью. Ген *miniwhite* был получен *in vitro* путем делеции значительной части первого интрона гена *white* и также как и ген *white* отвечает за пигментацию глаз. Ген *miniwhite* также способен активироваться энхансером *white*

(Qian and Pirrotta, 1995). Мы предположили, что такая активация связана с эндогенной транскрипцией и исследовали это явление.

### 1.1 Способность гена *miniwhite* активироваться в отсутствие регуляторных элементов в трансгенной системе

Мы исследовали способность гена *miniwhite* активироваться в отсутствие регуляторных элементов. Для этого нами было получено несколько делеций 5' концевой части гена *miniwhite*. Эти делеции в разной степени затрагивают промоторную область гена.

Делеция  $\Delta 271$  захватывает 5' область гена до +271 п.н., считая от начала транскрипции. Эта делеция включает в себя инициатор транскрипции, внутренний DPE-промотор, сайт начала трансляции, целиком первый экзон и небольшую часть первого интрона.

Делеция  $\Delta 171$  захватывает 5' область гена до +171 п.н. В этом случае из гена удалены инициатор транскрипции, внутренний DPE-промотор, а также область до сайта инициации трансляции. Сам сайт ATG сохранен.

Делеция  $\Delta 33$  захватывает 5' область гена до +33 п.н. Из гена удален инициатор транскрипции и DPE-промотор, но сохранена область между DPE-промотором и сайтом инициации трансляции.

Ген *miniwhite*, содержащий такие делеции в составе однотипных генноинженерных конструкций был введен в геном дрозофилы (см. Материалы и методы). Конструкции отличаются друг от друга только размером делеции. Схема конструкций представлена на рисунке 1.

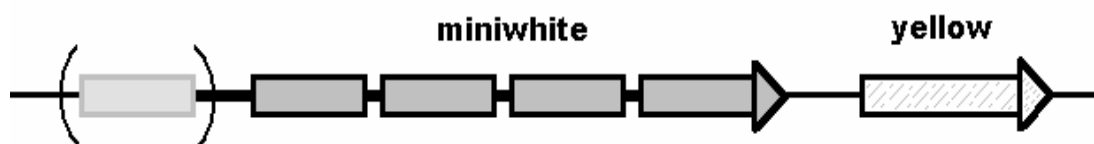


Рисунок 1. Схема конструкций  $\Delta 271$ ,  $\Delta 171$ ,  $\Delta 33$ . Конструкции содержат ген *miniwhite* с делецией в 5' области (на схеме изображена экзон-интронная структура гена *miniwhite*, светло-серым выделена делетированная последовательность) и маркерный ген *yellow*, регуляторные последовательности которого не нарушены.

Нами были получены трансгенные линии мух, содержащие в геноме одну копию конструкции. Затем были проанализированы фенотипы мух этих линий. Полученные результаты представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Фенотипы мух, содержащих в геноме делеции разной длины.**

Делеция	общее количество мух	количество мух с белыми глазами	количество мух с окрашенными глазами
$\Delta 271$	27	23	4 (14%)
$\Delta 171$	127	113	14 (11%)
$\Delta 33$	139	125	14 (10%)

Из таблицы видно, что, несмотря на отсутствие всех последовательностей, необходимых для инициации транскрипции, ген *miniwhite* активирован в некоторых линиях. Даже в отсутствие сайта инициации трансляции вероятность активации гена весьма высока. Она незначительно отличается от вероятности активации гена с меньшими делециями, поэтому для дальнейшего исследования нами была выбрана одна делеция -  $\Delta 33$ . Все последующие конструкции, содержащие делецию промоторной области гена *miniwhite*, создавались с использованием этой делеции.

## **1.2 Определение места инсерции конструкции в геноме**

Для того чтобы установить, каким образом ген *miniwhite*, лишенный промотора, приобретает способность экспрессироваться, мы определили места инсерции конструкции в геноме. Были исследованы 15 линий, в которых наблюдалась значительная активация гена *miniwhite*, а также 9 линий без активации. Оказалось, что активация гена *miniwhite* связана с транскрипцией в районе инсерции (см. текст диссертации). Активация возможна, если направление эндогенной транскрипции (т.е. транскрипции в месте инсерции) совпадает с направлением транскрипции трансгена. По всей видимости, транскрипция с эндогенного промотора приводит к образованию химерной РНК. 5' область этой РНК соответствует местному (т.е. эндогенному) гену, а 3' область – гену *miniwhite*. Очевидно, такая РНК способна транслироваться с образованием активного белка White.

## **1.3 Компьютерный анализ профилей активности местных генов**

Ген *miniwhite* начинает экспрессироваться на личиночной стадии. У взрослой мухи этот ген активен в глазах и семенниках (Hiebert and Birchler, 1992; Davison et al, 1985). Для того чтобы ген *miniwhite*, лишенный промотора, мог производить функциональный белок, восстанавливающий пигментацию глаз, эндогенный промотор должен быть активен в тканях зачатка глаза. Чтобы выяснить, совпадает ли профиль экспрессии местных генов с профилем экспрессии гена *miniwhite*, мы проанализировали эти гены с помощью базы данных FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu>, version FB2008\_06, released July 3, 2008).

Только для пяти генов (*lola*, *eIF-4E*, *skuld*, *prickle*, *muscleblind*) нам удалось обнаружить информацию о профиле экспрессии. Сведения о том, что эти гены экспрессируются именно в глазах в интересующий нас период мы найти не смогли. Однако все эти гены - *lola*, *eIF-4E*, *skuld*, *prickle* и *muscleblind* - необходимы для нормального развития мухи и экспрессируются на личиночной и куколочной стадиях. Поэтому они имеют возможность активировать встроившийся в них ген *miniwhite*.

#### 1.4 Создание новой модельной системы, описывающей активацию гена *miniwhite* эндогенным промотором

Итак, мы показали, что активация гена *miniwhite*, лишённого промотора, зависит от эндогенной транскрипции. Вероятность этого события составляет около 10-14%. Мы создали модельную систему, описывающую случай активации гена *miniwhite* эндогенным промотором. Для этого мы создали конструкцию GAL4- $\Delta$ 33, изображённую на рисунке 2.

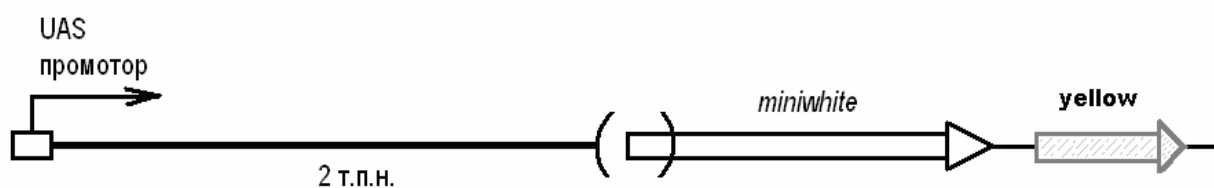


Рисунок 2. Схема конструкции GAL4- $\Delta$ 33. Активируемый UAS промотор отдален от кодирующей части гена *miniwhite* инертной последовательностью длиной 2т.п.н.

UAS промотор дрожжей способен активироваться в присутствии транскрипционного активатора GAL4 (Phelps and Brand, 1998). Между UAS промотором и геном *miniwhite*, лишённым промотора ( $\Delta$ 33) мы заклонировали инертную последовательность длиной 2 т.п.н. Нами были получены и проанализированы 32 линии, содержащие в геноме эту конструкцию.

В отсутствие активатора почти во всех линиях ген *miniwhite* не экспрессируется и глаза у мух белые. Исключение составляют 3 линии, в которых глаза у мух были активированы в разной степени (бледно-желтые, темно-желтые и оранжевые). По всей вероятности, активация гена *miniwhite* в этих случаях связана с инсерцией конструкции в активный ген.

В линии, в которых ген *miniwhite* не был активирован (29 шт.), мы ввели транскрипционный активатор GAL4. Транскрипционный активатор привел в действие UAS промотор, и ген *miniwhite* начал экспрессироваться. Глаза у мух во всех линиях,



кроме одной, стали коричневыми. В одной линии активация прошла в меньшей степени, и глаза у мух стали оранжевыми.

Таким образом, данная модель достаточно адекватно описывает активацию гена *miniwhite* эндогенным промотором и может быть использована для дальнейшего изучения влияния транскрипции на эффект положения.

### 1.5 Влияние эндогенной транскрипции на активацию гена *miniwhite* в модельной системе GAL4-Δ33

В ходе предыдущих экспериментов было установлено, что ген *miniwhite*, лишенный промотора, способен активироваться в трансгенной системе за счет активности эндогенного промотора. Следовательно, такая система может модулироваться с помощью терминаторов транскрипции.

Для того чтобы это проверить, мы использовали сильный терминатор транскрипции из вируса эукариот SV40 (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Вирусный терминатор транскрипции SV40 широко применяется при создании экспрессирующих векторов как млекопитающих, так и дрозофилы. Мы создали конструкцию GAL4-Δ33-SV40, аналогичную конструкции GAL4-Δ33, в которой перед геном *miniwhite* был встроены терминатор транскрипции SV40. Схема конструкции изображена на рисунке 3.

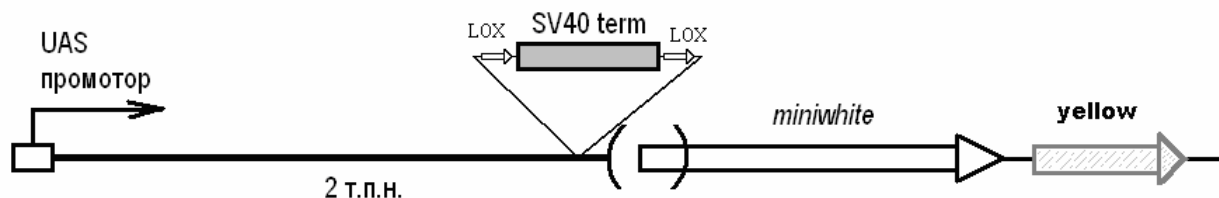


Рисунок 3. Схема конструкции GAL4-Δ33-SV40. Активируемый UAS промотор отдален от кодирующей части гена *miniwhite* инертной последовательностью длиной 2 т.п.н. Между инертной последовательностью и геном *miniwhite* заклонирован вирусный терминатор транскрипции SV40, окруженный сайтами узнавания Cre-рекомбиназы.

Нами были получены и проанализированы 32 линии, содержащие в геноме эту конструкцию. Мухи из всех этих линий имели непигментированные глаза. При введении транскрипционного активатора GAL4 картина не изменялась. Во всех линиях ген *miniwhite* оставался полностью неактивным.

С помощью сайт-специфической рекомбинации мы удалили из конструкции терминатор транскрипции. Практически во всех линиях (об исключениях будет сказано позже) глаза у мух продолжали оставаться непигментированными.

Введение транскрипционного активатора GAL4 резко изменяло картину. Ген *miniwhite* достаточно сильно активировался, и глаза мух во всех линиях становились коричневыми или красно-коричневыми.

Из этих экспериментов следует, что именно терминатор транскрипции SV40 препятствует активации гена *miniwhite* в данной системе.

## 1.6 Влияние эндогенной транскрипции на уровень экспрессии гена *miniwhite* в геноме

Для выяснения влияния терминатора транскрипции SV40 нам не пришлось создавать новые конструкции. Мы могли использовать некоторые линии конструкции GAL4-Δ33-SV40. В этих линиях инсерция конструкции произошла в активно транскрибируемый ген. Результаты анализа этих линий представлены в таблице 2.

Из приведенных данных видно, что активация гена *miniwhite* и восстановление пигментации происходят только после удаления терминатора транскрипции SV40.

Таблица 2. Окраска глаз у мух до и после удаления терминатора транскрипции SV40.

Номер линии	Окраска глаз у мух в исходных линиях	Окраска глаз у мух после удаления терминатора транскрипции SV40
1	белые	желтые
2	белые	желтые
3	белые	оранжевые
4	белые	ярко-оранжевые

Таким образом, терминатор транскрипции SV40 предотвращает активацию гена *miniwhite* эндогенным промотором.

## 1.7 Влияние инсулятора Su(Hw) на модельную систему GAL4-Δ33

Принято считать, что инсуляторы способны блокировать эффект положения, так как они блокируют взаимодействие промотора с энхансерами и останавливают распространение конденсированного хроматина, однако их взаимодействие с проходящей через трансген транскрипцией практически не изучено. Ранее не было показано, препятствует ли взаимодействие двух инсуляторов (и как следствие, образование независимого транскрипционного домена) элонгации транскрипции, которая началась за пределами домена.

Влияние инсулятора Su(Hw) на активацию гена *miniwhite* мы сначала исследовали на модельной системе GAL4-Δ33. Для этого была создана конструкция GAL4-Δ33-Su(Hw) (см. рис.4).

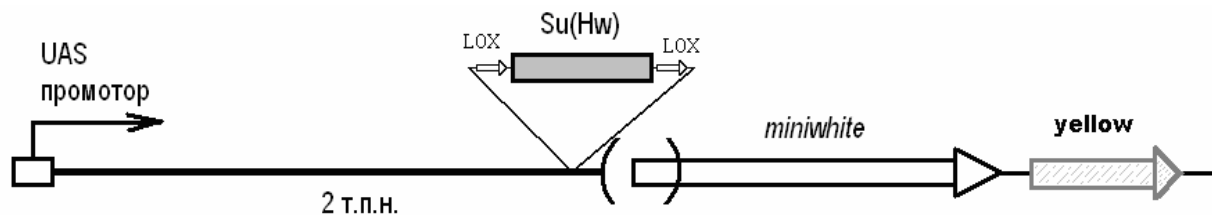


Рисунок 4. Схема конструкции GAL4-Δ33-Su(Hw). Активируемый UAS промотор отдален от кодирующей части гена *miniwhite* инертной последовательностью длиной 2т.п.н. Между инертной последовательностью и геном *miniwhite* заклонирован инсулятор Su(Hw), окруженный сайтами узнавания Cre-рекомбиназы.

Нами были получены и проанализированы 18 линий, содержащих в геноме эту конструкцию. В отсутствие активатора мухи почти всех линий имели белые глаза. Исключение составили две линии. Глаза у мух этих линий были темно-желтыми.

В линии, в которых ген *miniwhite* не был активирован (16 шт.), мы ввели транскрипционный активатор GAL4. Транскрипционный активатор привел в действие UAS промотор, и ген *miniwhite* начал экспрессироваться. Глаза у мух во всех линиях, кроме одной (с оранжевыми глазами), стали коричневыми.

Затем с помощью сайт-специфической рекомбинации мы удалили инсулятор Su(Hw). Фенотипы всех линий не изменились. Мухи линий с неактивированным геном *miniwhite* продолжали быть белоглазыми, мухи линий с активированным геном *miniwhite* сохранили прежнюю интенсивность окраски глаз.

Мы ввели в полученные линии транскрипционный активатор GAL4. Транскрипционный активатор привел в действие UAS промотор, и ген *miniwhite* начал экспрессироваться. Глаза у мух всех линий стали коричневыми.

Из этого следует, что инсулятор Su(Hw) никак не влияет на модельную систему GAL4-Δ33. Он не препятствует активации гена *miniwhite*, но и не стимулирует ее.

## 1.8 Влияние инсулятора Su(Hw) на способность гена *miniwhite* активироваться в геноме в отсутствие промотора

Для изучения влияния инсулятора Su(Hw) на активацию гена *miniwhite* в геноме нами была создана конструкция Su(Hw)-Δ33. Конструкция по строению похожа на предыдущие, но в ней перед геном *miniwhite* был заклонирован инсулятор Su(Hw), окруженный lox-сайтами рекомбинации. Схема конструкции изображена на рисунке 5.

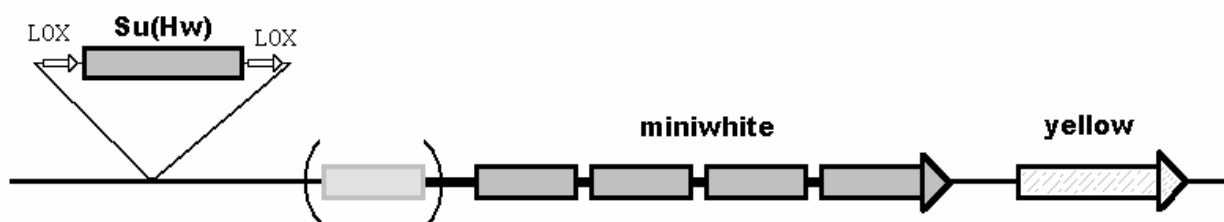


Рисунок 5. Схема конструкции Su(Hw)-Δ33. Перед лишенным промотора геном *miniwhite* заклонирована последовательность инсультатора Su(Hw). Она может быть удалена с помощью Cre-рекомбиназы. За геном *miniwhite* расположен маркерный ген *yellow*.

Нами были получены трансгенные линии мух, содержащие в геноме одну копию конструкции. Затем с помощью сайт-специфической рекомбинации Su(Hw) был удален. Мы проанализировали фенотипы мух 89 полученных линий до и после удаления инсультатора Su(Hw).

Из 89 линий, в 7 из них наблюдалась активация гена *miniwhite*. Глаза мух имели различную окраску глаз в каждой линии - от бледно-желтых до ярко-оранжевых. В остальных 82 линиях ген *miniwhite* активирован не был, и глаза у мух были белые.

С помощью сайт-специфической рекомбинации мы удалили из всех линий инсультатор Su(Hw). Фенотип ни одной из линий не изменился. Мухи линий с неактивированным геном *miniwhite* остались белоглазыми, мухи линий с активированным геном *miniwhite* сохранили прежнюю интенсивность окраски глаз.

Таким образом, инсультатор Su(Hw) не оказывает никакого влияния на способность гена *miniwhite* активироваться в отсутствие промотора. Он не препятствует активации гена, но и не стимулирует ее.

### 1.9 Влияние эффекта положения на экспрессию гена *miniwhite*, содержащего нормальный промотор

Ранее мы рассмотрели влияние эффекта положения на ген *miniwhite*, лишенный промотора. В данной главе мы покажем, как эффект положения влияет на ген *miniwhite* с ненарушенным промотором. Для этого мы получили 65 трансгенных линий мух, содержащих конструкцию mw (см. рис. 6).

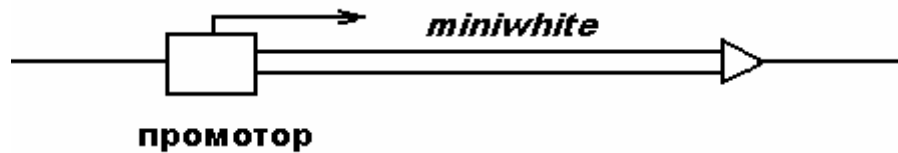


Рисунок 6. Схема конструкции *mw*. В этой конструкции использован ген *miniwhite* с нормальным промотором.

Наиболее часто встречающимися фенотипами оказались темно-желтые, оранжевые и ярко-оранжевые глаза. Это соответствует средней активации гена *miniwhite*. Таким образом, мы смогли разделить все фенотипы на три группы. Первая группа – линии мух с бледно-желтыми и желтыми глазами. Это случаи слабой активации гена *miniwhite*. Они составили 9,5% от общего числа линий.

Вторая группа, самая многочисленная – средняя или нормальная активация гена *miniwhite* (темно-желтые, оранжевые и ярко-оранжевые глаза). Эти линии составили 81%.

Третья группа – сильная активация. В эту группу вошли линии с коричневыми, красно-коричневыми и красными глазами мух (9,5%).

Факторы, влияющие на эффект положения, как мы предполагаем, должны влиять на соотношение количества линий, входящих в эти группы.

### 1.10 Влияние инсулятора Su(Hw) на эффект положения гена *miniwhite*, содержащего нормальный промотор

Для изучения влияния инсулятора Su(Hw) на эффект положения мы создали генноинженерную конструкцию Su(Hw)-*mw*. В этой конструкции мы окружили ген *miniwhite*, содержащий функциональный промотор, двумя инсуляторами Su(Hw) для того, чтобы исключить влияние на него эндогенных энхансеров и сайленсеров (см. рис.7).

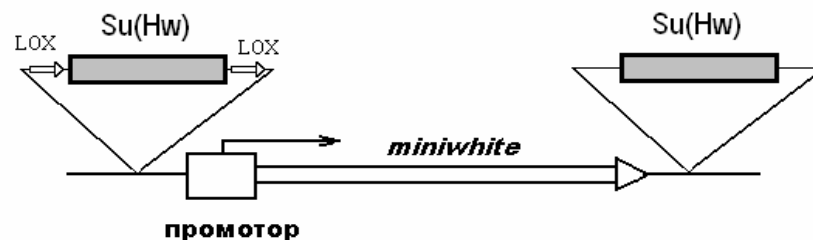


Рисунок 7. Схема конструкции Su(Hw)-*mw*. Ген *miniwhite* окружен двумя инсуляторами Su(Hw). Инсулятор перед промотором окружен сайтами связывания Cre-рекомбиназы.

Мы получили и проанализировали фенотип у 48 трансгенных линий. Затем эти линии были разделены на три группы по фенотипам, как и линии, содержащие

контрольную конструкцию mw. Группа слабой активации гена *miniwhite* составила 7%, группа нормальной активации – 84%, группа сильной активации – 9%.

Распределение фенотипов в конструкции Su(Hw)-mw и контрольной конструкции практически не отличаются. Этот странный результат противоречит описанным в литературе данным о том, что эндогенные энхансеры и сайленсеры способны воздействовать на промотор трансгена, несмотря на значительную специфичность взаимодействия энхансера с промотором.

Для объяснения этого факта мы с помощью сайт-специфической рекомбинации в ряде линий удалили один из инсуляторов Su(Hw), стоящий перед геном *miniwhite*. Полученные результаты оказались неоднородными. Их можно разделить на три группы. В одной из них наблюдалось увеличение уровня экспрессии гена *miniwhite* при удалении инсулятора Su(Hw). Во второй группе наоборот наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *miniwhite*. Фенотип третьей группы не изменился. Рассмотрим первые две группы.

Изменения фенотипа как в ту, так и в другую сторону в некоторых линиях оказались незначительными. Например, линии 8, 16, 23 (уровень экспрессии увеличивается), 39 (уровень экспрессии уменьшается). Окраска глаз у мух в этих линиях изменилась на один балл (см. Материалы и методы).

Значительное изменение фенотипа происходило в обеих группах линий. Удаление инсулятора Su(Hw) в этих линиях приводило к резкому возрастанию экспрессии гена *miniwhite* до сильной или падению сильной экспрессии до нормальной или слабой. Изменения происходят в обе стороны, поэтому они никак не изменили распределение фенотипов.

### 1.11 Влияние терминатора транскрипции SV40 на эффект положения гена *miniwhite*, содержащего нормальный промотор

Для изучения влияния терминатора транскрипции SV40 на эффект положения гена *miniwhite* мы создали конструкцию SV40-mw (см. рис. 8).

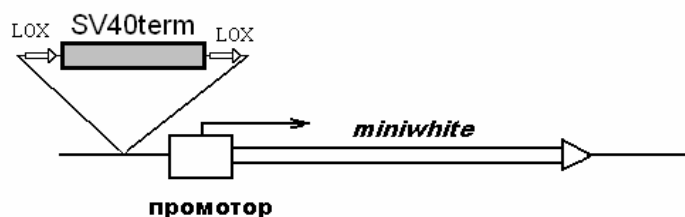


Рисунок 8. Схема конструкции SV40-mw. Перед геном *miniwhite*, содержащим нормальный промотор, заклонирован терминатор транскрипции SV40, окруженный lox-сайтами.

В этой конструкции терминатор транскрипции SV40 расположен перед геном *miniwhite*. В отличие от конструкции Su(Hw)-mw, мы использовали только один элемент перед промотором. Второй терминатор транскрипции за геном *miniwhite* мы не использовали, так как эндогенная транскрипция, идущая в обратную сторону, должна полностью подавить экспрессию гена *miniwhite*. Так как единственным маркерным геном в конструкции SV40-mw является ген *miniwhite*, то случаи его полной инактивации мы не увидели.

Нами были получены и проанализированы 36 линий, содержащие в геноме конструкцию SV40-mw. В 7 (19%) из этих линий ген *miniwhite* активирован слабо, в 27 (75%) ген активирован нормально, и в 2 (5%) линиях наблюдается сильная активация. Мы сравнили эти данные с результатами анализа контрольной конструкции mw.

Терминатор транскрипции SV40 смещает уровень экспрессии гена *miniwhite* в сторону снижения уровня экспрессии. Доля линий, в которых ген *miniwhite* активирован слабо, в 2 раза превышает таковую в контрольной линии. Доля линий с сильной активацией гена *miniwhite* заметно снижена.

С помощью сайт-специфической рекомбинации мы удалили терминатор транскрипции SV40 в 23 линиях. 15 из них в результате этого не изменили свой фенотип. В 8 наблюдалось увеличение уровня экспрессии гена *miniwhite*.

Таким образом, терминатор транскрипции оказывает заметное влияние на экспрессию гена *miniwhite*, содержащего нормальный промотор, и на эффект положения.

## **2 Влияние эффекта положения на свойства последовательности En(Hu) в различных трансгенных системах**

В первой части работы мы рассматривали влияние эффекта положения на кодирующую часть гена. Однако не стоит забывать, что в ходе незаконной рекомбинации в нетипичном окружении может оказаться и не кодирующая регуляторная последовательность. В качестве примера такой последовательности мы взяли для изучения последовательность из *achaete-scute* генного комплекса - En(Hu).

*Achaete-scute* генный комплекс *D. melanogaster* содержит в своем составе гены *achaete* и *scute*, которые начинают экспрессироваться уже на ранних стадиях развития эмбриона. Эти гены необходимы для формирования сенсорных органов периферической нервной системы у личинок. На поздней личиночной и куколочной стадии экспрессия генов *achaete* и *scute* определяет образование щетинок (сенсорных органов) у взрослой

мухи (Garcia-Bellido, 1979; Modolell and Campuzano, 1998). Сложная картина экспрессии этих генов регулируется целым рядом узко специфичных энхансеров, каждый из которых активирует оба гена в определенном месте имагинального диска (Ruiz-Gómez and Modolell, 1987; Ghysen and Dambly-Chaudière, 1988) и отвечает за образование одной определенной щетинки. Такая регуляция позволяет предположить наличие сложной структуры регуляторных элементов внутри локуса, позволяющей точно регулировать активность многочисленных энхансеров во времени и пространстве.

Ранее в нашей лаборатории были получены две линии *D. melanogaster*, содержащие инверсии на X хромосоме. Инверсии обеих линий затрагивают одну и ту же область гена *yellow*. Инверсия в линии В захватывает на 1 т.п.н большую область *ac-sc* комплекса. Инверсия А не приводит к полной инактивации генов *yellow* и *scute*. У мух присутствует большая часть щетинок и сохраняется их пигментация. Инверсия В приводит к значительным нарушениям работы этих генов. У мух отсутствует большая часть щетинок и полностью утрачена их пигментация.

Также в нашей лаборатории была получена линия, содержащая практически полную делецию последовательности En(Hu). Ген *scute* в этой линии работал нормально, за исключением исчезновения одной щетинки (она обозначается Hu). Это говорит о том, что в состав последовательности En(Hu) входит энхансер Hu. Однако инверсия одного энхансера не может привести к такому катастрофическому нарушению работы *ac-sc* и *yellow* локусов. По всей видимости, помимо щетиночного энхансера, последовательность En(Hu) содержит элементы, регулирующие работу генов *ac-sc* комплекса.

Последовательность En(Hu) была заклонирована, и затем ее свойства изучались в зависимости от окружения различных трансгенных системах.

## **2.1 Проявляет ли последовательность En(Hu) инсультаторные свойства?**

Для того чтобы выяснить, проявляет ли последовательность En(Hu) свойства инсультатора, мы использовали конструкцию En(w)-En(Hu)-mw (см. рис 9.) Между геном *miniwhite* и энхансером гена *miniwhite* мы заклонировали последовательность En(Hu), окруженную lox-сайтами.

Мы получили 15 трансгенных линий, содержащих в геноме такую конструкцию. Глаза у мух во всех линиях были коричнево-красные или красные. При удалении последовательности En(Hu) фенотип всех линий не изменялся. Это говорит о том, что последовательность En(Hu) не препятствует взаимодействию энхансера с промотором, то есть не проявляет инсультаторных свойств.



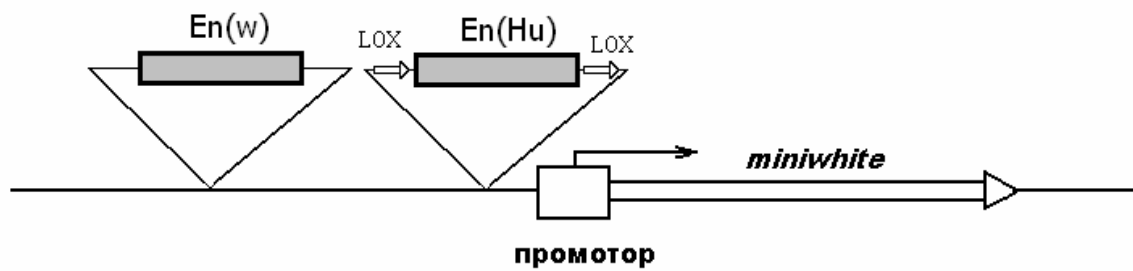


Рисунок 9. Схема конструкции En(w)-En(Hu)-mw. Между геном *miniwhite* и его энхансером находится последовательность En(Hu). Последовательность En(Hu) окружена сайтами узнавания Cre-рекомбиназы.

## 2.2 Проявляет ли последовательность En(Hu) свойства терминатора?

Для того чтобы выяснить, не обладает ли последовательность En(Hu) свойствами терминатора транскрипции, мы использовали описанную в I части модельную систему GAL4-Δ33. Мы создали две конструкции GAL4-Δ33-En(Hu)-dir и GAL4-Δ33-En(Hu)-rev. Конструкции по своему строению аналогичны GAL4-Δ33-SV40 (см. рис 10) и различаются между собой только ориентацией последовательности En(Hu). GAL4-Δ33-En(Hu)-dir содержит последовательность En(Hu) в нативной ориентации, GAL4-Δ33-En(Hu)-rev – в обратной.

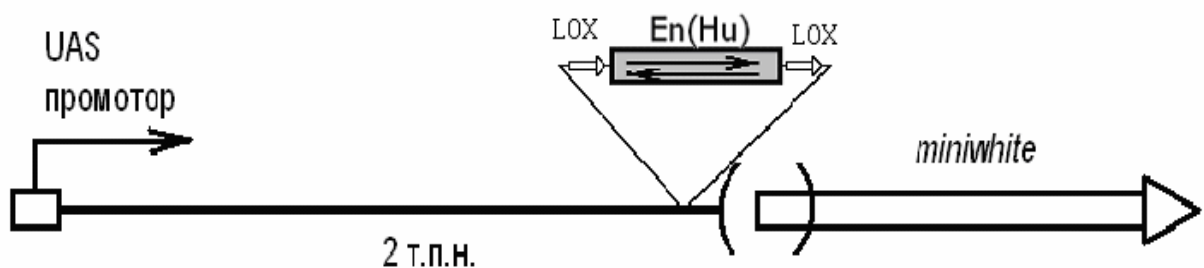


Рисунок 10. Схема конструкций GAL4-Δ33-En(Hu)-dir и GAL4-Δ33-En(Hu)-rev. Активируемый UAS промотор отдален от кодирующей части гена *miniwhite* инертной последовательностью длиной 2 т.п.н. Между инертной последовательностью и геном *miniwhite* в нативной и обратной ориентациях заклонирована последовательность En(Hu), окруженный сайтами узнавания Cre-рекомбиназы.

Мы получили и проанализировали 16 линий, содержащих в геноме конструкцию GAL4-Δ33-En(Hu)-dir и 6 линий, содержащих в геноме конструкцию GAL4-Δ33-En(Hu)-rev. Результаты анализа этих двух конструкций представлены в таблице 3.

Последовательность En(Hu) в нативной ориентации препятствует активации гена *miniwhite* UAS промотором, и глаза остаются белыми (подчеркнуто в таблице).

**Таблица 3. Результаты анализа конструкций GAL4-Δ33-En(Hu)-dir и GAL4-Δ33-En(Hu)-rev.**

Название конструкции		GAL4-Δ33-En(Hu)-dir	GAL4-Δ33-En(Hu)-rev
En(Hu) присутствует	UAS промотор не активирован	Белые глаза	Белые глаза
	UAS промотор активирован	<u>Белые глаза</u>	<u>Коричневые глаза</u>
En(Hu) удалена	UAS промотор не активирован	Белые глаза	Белые глаза
	UAS промотор активирован	Коричневые глаза	Коричневые глаза

В обратной ориентации последовательность En(Hu) инертна и не оказывает влияния на активацию гена *miniwhite*.

Таким образом, последовательность En(Hu) в данной трансгенной системе проявляет свойства терминатора транскрипции, несвойственные ей в нативном положении.

### **2.3 Исследование свойств последовательности En(Hu) в трансгенной системе *yellow-En(Hu)***

Для изучения влияния последовательности En(Hu) на элонгацию транскрипции, мы исследовали ее влияние на активность гена *yellow* в трансгенной системе. Если последовательность En(Hu) обладает свойствами терминатора, то она может нарушить транскрипцию гена *yellow*, если будет находиться в его интроне.

Ген *yellow* экспрессируется начиная с поздней эмбриональной стадии и определяет пигментацию кутикулярных производных (тело, крылья, щетинки) *D. melanogaster* (Nash and Yarkin, 1974). Ген *yellow* кодирует трансмембранный белок с неизвестными функциями (Kornezos and Chia, 1992; Walter et al, 1991). Так как уровень экспрессии гена *yellow* прямо коррелирует с интенсивностью пигментации кутикулы, его можно определять с помощью визуального анализа фенотипа мух (Geyer and Corces, 1987; Martin et al, 1989). Поэтому ген *yellow* удобно использовать в качестве модели для изучения различных регуляторных элементов.

Мы создали две генноинженерные конструкции En(Hu)-y-dir и En(Hu)-y-rev (см. рис 11), в которых поместили последовательность En(Hu) в интрон гена *yellow* в двух ориентациях, нативной и обратной.

Результаты анализа трансгенных линий, а также линий, полученных при удалении последовательности En(Hu) с помощью Cre-рекомбиназы (En(Hu)-y-dir dCre) представлены в таблице 4.

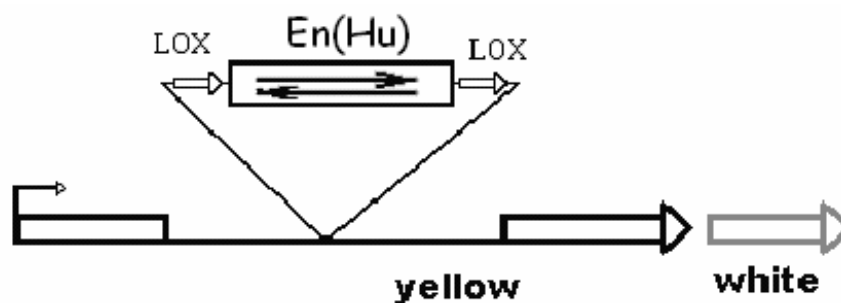


Рисунок 11. Схемы конструкций  $En(Hu)$ -y-dir и  $En(Hu)$ -y-rev. На схеме обозначены два экзона и интрон гена *yellow*. В интрон встроена последовательность  $En(Hu)$  в нативной (конструкция  $En(Hu)$ -y-dir) и обратной (конструкция  $En(Hu)$ -y-rev) ориентациях. За геном *yellow* находится маркерный ген *white*.

Таблица 4. Фенотипы мух линий  $En(Hu)$ -y-dir и  $En(Hu)$ -y-rev.

конструкция	фенотипы мух			количество линий
	тело	крылья	щетинки	
$En(Hu)$ -y-dir	-	-	-/+	15
$En(Hu)$ -y-dir dCre	+	+	+	15
$En(Hu)$ -y-rev	+	+	+	20

Из приведенных данных видно, что последовательность  $En(Hu)$  в нативной ориентации оказывает негативное влияние на экспрессию гена *yellow*. Удаление  $En(Hu)$  из конструкции приводит к восстановлению активности гена. В обратной ориентации эта последовательность никакого влияния на уровень экспрессии гена *yellow* не оказывает.

На первый взгляд, эти данные согласуются с предыдущими, полученными при анализе конструкций  $GAL4-\Delta 33-En(Hu)$ -dir и  $GAL4-\Delta 33-En(Hu)$ -rev. Для проверки этого мы исследовали мРНК гена *yellow*, образующуюся в конструкциях  $En(Hu)$ -y-dir и  $En(Hu)$ -y-rev.

## 2.4 Исследование мРНК гена *yellow*, образующуюся в трансгенной системе *yellow-En(Hu)*

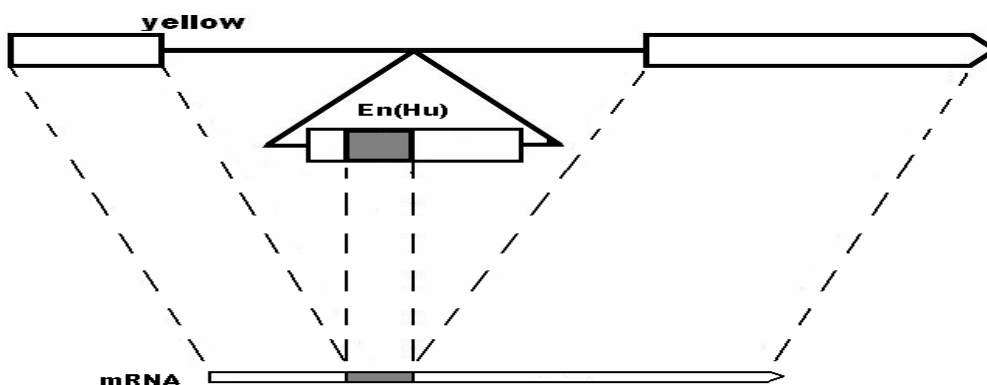
Для выяснения механизма репрессии гена *yellow* посредством последовательности  $En(Hu)$  мы исследовали мРНК гена *yellow* в конструкциях  $En(Hu)$ -y-dir и  $En(Hu)$ -y-rev. В качестве контрольной мы использовали линию  $En(Hu)$ -y-dir с удаленной  $En(Hu)$  последовательностью, в которой экспрессия гена *yellow* полностью восстанавливалась.

Для того чтобы транскрипция эндогенного гена *yellow* не мешала анализу, трансгенные линии были переведены на линию  $y^{\Delta c}$ , в которой эндогенный ген *yellow* делетирован.

Из трех линий была выделена РНК. С использованием oligo-dT праймера была синтезирована кДНК гена *yellow*. Полученная кДНК была проанализирована с помощью PCR с использованием праймеров из первого и второго экзонов.

В контрольной линии и в линии En(Hu)-y-rev был получен PCR-продукт размером около 550 п.н. Это совпадает с расчетной величиной. В линии En(Hu)-y-dir размер составил около 700 п.н. Это увеличение указывает на возможное нарушение сплайсинга гена *yellow*. Для проверки этого предположения такой удлиненный PCR продукт был секвенирован.

Секвенирование подтвердило, что увеличение размера PCR продукта является следствием неправильного сплайсинга пре-мРНК гена *yellow*. Так, оказалось, что участок En(Hu) последовательности содержит два сильных сайта сплайсинга – донорный и акцепторный. В связи с этим фрагмент En(Hu), длиной 131 п.н., встраивается в мРНК *yellow* в качестве дополнительного экзона (см. рис. 12). Так как белок-кодирующая область мРНК гена *yellow* начинается в первом экзоне, встраивание дополнительного экзона приводит к нарушению рамки считывания и полной утрате функциональности белкового продукта.



**Рисунок 12.** Схема неправильного сплайсинга в линии En(Hu)-y-dir. В верхней части схемы изображен ген *yellow*. В его интрон встроена последовательность En(Hu). В нижней части схемы изображена образующаяся мРНК. Серым цветом выделена та часть En(Hu), которая образует дополнительный экзон.

Таким образом, в этой трансгенной системе последовательность En(Hu) проявляет свойства экзон-интронной структуры, несвойственные ей как в нативном положении, так и в модельной системе GAL4-Δ33.

## 2.5 Исследование последовательности En(Hu) с помощью различных баз данных

Наличие внутри последовательности En(Hu) эффективного терминатора и двух сильных сайтов сплайсинга позволяет предположить, что эта последовательность могла произойти от гена, утратившего 5' концевую область и способность экспрессироваться. Мы попробовали найти последовательности, гомологичные «экзону» En(Hu). Последовательность «экзона» была проанализирована с помощью базы данных FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu>, version FB2008\_06, released July 3, 2008), а также с помощью NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

К сожалению, протяженной гомологии с какими-либо генами обнаружить не удалось.

## Обсуждение

### 1 Активация трансгена *miniwhite*, лишённого промотора

Ген *miniwhite* обладает способностью экспрессироваться в отсутствие промотора и инициатора транскрипции в некоторых местах генома. Это происходит в том случае, когда ген *miniwhite* попадает в кодирующую часть гена, активно транскрибирующегося в тканях глаза. Необходимо также, чтобы направление эндогенной транскрипции совпадало с направлением гена *miniwhite* (это происходит в 10-14% случаев). Таким образом, ген *miniwhite*, лишённый промотора, приобретает новые регуляторные элементы. Транскрипция начинается с помощью эндогенного промотора на инициаторе транскрипции местного гена, затем продолжается, проходя через трансген *miniwhite*, и терминируется в конце трансгена.

Ген *miniwhite* способен экспрессироваться даже тогда, когда у него удалены первые 24 кодона. Возможны два объяснения этому факту. Первое – трансляция получившейся химерной мРНК начинается на инициаторном ATG местного гена и заканчивается на stop-кодоне в конце кодирующей части гена *miniwhite*. В результате образуется химерный белок, N-концевая последовательность которого является продуктом местного гена, а C-концевая – продуктом гена *miniwhite*. Глаза у таких мух становятся окрашенными только в том случае, когда кодирующая часть гена *miniwhite* окажется в той же рамке считывания, что и транслирующаяся N-концевая часть. Необходимо также, чтобы получившийся химерный белок, не смотря на «довесок», не утрачивал функций белка White.

Второе объяснение состоит в том, что трансляция начинается внутри гена *miniwhite* с одного из внутренних ATG кодонов. В этом случае химерный белок не образуется, а получается белок White, лишенный нескольких десятков аминокислот на N-конце. Такую трансляцию мог бы сильно облегчить сигнал внутренней инициации трансляции (IRES). Однако даже после удаления первого экзона целиком, вероятность активации трансгена сохраняется.

В любом случае, для нормального функционирования белка White не важна N-концевая область в размере нескольких десятков аминокислот. В противном случае, экспрессия гена, лишённого первого экзона, тоже была бы невозможной.

## **2 Влияние инсуляторов и терминаторов транскрипции на экспрессию трансгенов и генов в геноме**

Транскрипция гена *miniwhite*, лишённого промотора, начинается с помощью эндогенного промотора на инициаторе местного гена, то есть транскрипция начинается снаружи от трансгена. Поэтому терминатор транскрипции, поставленный перед трансгенным *miniwhite*, препятствует его активации. Мы использовали терминатор транскрипции из генома вируса SV40. Этот терминатор, как и ожидалось, эффективно блокировал экспрессию гена *miniwhite*, лишённого промотора.

Инсулятор Su(Hw) экспрессию гена *miniwhite*, лишённого промотора, не блокирует. Инсулятор Su(Hw) никак не влияет на проходящую через него транскрипцию. Этот инсулятор эффективно препятствует взаимодействию промотора с энхансером (Roseman R.R. et al, 1993), однако по всей видимости, он критично влияет только на белковые комплексы, образующиеся на промоторе с помощью энхансера в период инициации транскрипции. На прохождение через него РНК полимеразы II на стадии элонгации он не влияет. По всей видимости, образуемые инсуляторами петли (Savitskaya et al, 2006) не являются препятствием для полимеразного комплекса на этой стадии.

В связи с этим эффективная работа терминаторов транскрипции в конце каждого гена является необходимой для правильной работы генов. Терминаторы препятствуют прохождению транскрипции с одного гена на соседние районы и нарушению таким образом их правильной экспрессии (Greger and Proudfoot, 1998).

Последовательность En(Hu) в трансгенной системе GAL4-Δ33 проявила свойства терминатора. Эта последовательность находится на границе *ac-sc* локуса и гена *l'sc*. Ген *l'sc* экспрессируется в ранний эмбриональный период и участвует в образовании нервной системы дрозофилы (Sreath and Carroll, 1994). Этот ген очень важен для развития, и почти

все мутации в этом гене летальны. Вероятно терминатор транскрипции, находящийся между генами *ac-sc* локуса и *l'sc* помогает разделить транскрипцию этих генов, а также припятствует возможной межгенной транскрипции.

### **3 Вклад энхансер-промоторных взаимодействий в эффект положения**

Влияние вклада энхансер-промоторных взаимодействий в эффект положения мы изучали с помощью конструкции Su(Hw)-mw, в которой с помощью двух инсуляторов были устранены взаимодействия энхансера и промотора. При удалении инсулятора Su(Hw) половина исследованных линий (12 из 25) изменила свой фенотип как в сторону увеличения уровня экспрессии гена *miniwhite*, так и в сторону уменьшения. В основном мухи этих линий в присутствии обоих инсуляторов имели темно-желтые глаза. При удалении одного инсулятора фенотипы мух становились более разбросанными (см. табл. 8). Таким образом можно сделать вывод, что энхансер-промоторные взаимодействия вносят значительный вклад в эффект положения. Это согласуется с работой Roseman (Roseman et al, 1993), в которой анализировались 15 линий, содержащих в геноме сходную конструкцию. Глаза у мух этих линий имели желтую окраску (авторы статьи не разбивали этот фенотип на три и все оттенки желтого объединили в одну группу).

Однако, среди 15 линий, проанализированных в данной статье, не оказалось ни одной линии с экстремальным фенотипом. В нашем исследовании были обнаружены линии со слабой и сильной активацией гена *miniwhite*. Получается, что двух инсуляторов Su(Hw) вокруг гена *miniwhite* недостаточно для полного блокирования эффекта положения.

9% линий имеют сильно активированный ген *miniwhite*. Это почти совпадает с вероятностью активации гена *miniwhite*, лишённого промотора, с помощью эндогенной транскрипции. Две из этих линий (14 и 25-2, мухи имеют красные глаза) имеют сильно активированный ген *miniwhite* и изменяют свой фенотип при удалении инсулятора. По всей видимости, своим высоким уровнем транскрипции они обязаны эндогенной транскрипции.

В двух линиях, утрачивающих сильную активацию гена *miniwhite*, вероятно, комбинируются влияния активирующей ген транскрипции и регуляторного элемента, обладающего сайленсерными свойствами. В отсутствие инсулятора он в значительной степени подавляет экспрессию трансгена. Наличие инсулятора позволяет эндогенной

транскрипции беспрепятственно активировать ген *miniwhite*, и его уровень экспрессии становится выше среднего.

#### **4 Вклад эндогенной транскрипции в общий эффект положения**

Вклад эндогенной транскрипции в общий эффект положения оказался значительным.

В 34% линий терминатор транскрипции SV40 в различной степени (на 1-2 балла, см. Материалы и методы) уменьшает уровень экспрессии трансгенного гена *miniwhite*. Из этого можно сделать вывод, что в некоторой степени за активацию гена способствует транскрипция, проходящая через трансген. При полном отсутствии промотора активация наблюдалась в 10-14% линий. При наличии функционального промотора активация наблюдается в 34% случаев. При этом значительное изменение фенотипа (на 2 и более балла) происходило в 13% линий.

По всей видимости, удаление протяженной (около 600 п.н.) нуклеотидной последовательности приводит к приближению эндогенных регуляторных последовательностей к промотору, и этим объясняется незначительное увеличение уровня экспрессии.

Таким образом, сильная эндогенная транскрипция может приводить к значительному изменению фенотипа трансгена.

#### **5 Эффект положения влияет на свойства регуляторной последовательности E<sub>n</sub>(H<sub>u</sub>)**

Последовательность E<sub>n</sub>(H<sub>u</sub>) в нативном положении проявляет свойства энхансера, отвечающего за появление двух щетинок у мухи (Garcia-Bellido, 1979, Modolell, Campuzano, 1998). Делеция этой последовательности приводит только к исчезновению этих двух щетинок. Однако, когда в результате инверсии последовательность E<sub>n</sub>(H<sub>u</sub>) оказывалась далеко от своего нативного положения, она нарушала работу как *ac-sc* локуса, так и гена *yellow*. Это можно расценивать как своеобразный эффект положения – различная активность последовательности в зависимости от ее положения в геноме.

Последовательность E<sub>n</sub>(H<sub>u</sub>) и в трансгенных системах проявила различные свойства. Между UAS промотором и лишенным промотора геном *miniwhite* последовательность E<sub>n</sub>(H<sub>u</sub>) проявила свойства терминатора. В интроне гена *yellow* последовательность E<sub>n</sub>(H<sub>u</sub>) продемонстрировала наличие двух сильных сайтов сплайсинга.

Проявление различных свойств в различных трансгенных системах говорит о сложном устройстве данной последовательности. Так, например, последовательность



МСР проявляет и инсуляторные, и сайленсерные свойства (Karch et al., 1994; Mihaly et al., 1998). Как уже говорилось выше, последовательность Eп(Hu) находится на границе *ac-sc* и *l'sc* локусов и может являться разграничителем экспрессии генов в этих локусах.

Наличие в последовательности Eп(Hu) эффективного терминатора транскрипции и двух сильных сайтов сплайсинга может говорить о том, что эта последовательность когда-то была геном. Она могла утратить 5' область в результате хромосомных перестроек, или переместиться в этот локус в результате их же. К сожалению, последовательность Eп(Hu) не имеет протяженной гомологии ни с одним из известных генов, поэтому мы ничего не можем сказать о ее происхождении.

## Выводы

1. Было показано, что трансгенный ген *miniwhite*, лишенный промотора, может активироваться за счет эндогенной транскрипции, сонаправленно проходящей через него.
2. Было показано, что инсулятор Su(Hw) в составе генно-инженерных конструкций не препятствует активации трансгена *miniwhite* за счет эндогенной транскрипции.
3. Было показано, что эндогенная транскрипция вносит значительный вклад в эффект положения трансгенного гена *miniwhite*.
4. Было показано влияние эффекта положения на регуляторную последовательность Eп(Hu), которое выражается в том, что Eп(Hu) в разных трансгенных системах проявляет различные свойства – энхансера, терминатора и источника сайтов сплайсинга.

## Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Golovnin A., Biryukova I., Romanova O., Silicheva M., Parshikov A., Savitskaya E., Pirrotta V., Georgiev P. An endogenous Su(Hw) insulator separates the yellow gene from the Achaete-scute gene complex in *Drosophila*. *Development*. 2003. 130(14):3249-58.
2. Kostuchenko M., Melnikova L., Silicheva M., Georgiev P. *Drosophila gypsy* insulator and *yellow* enhancers regulate activity of *yellow* promoter through the same regulatory element. *Chromosoma*. 2008. 117:137-145.
3. Melnikova L., Kostyuchenko M., Biryukova I., Kan T., Silicheva M., Georgiev P. *Drosophila gypsy* insulator and *yellow* enhancers regulate activity of the *yellow* promoter

through the same regulatory element. EMBO conference Series on Nuclear Structure and Dynamics Montpellier, September 1-5, 2007-07-16 P-095.

4. Силичева М.А., Георгиев П.Г. Активация гена *miniwhite* *D. melanogaster* в отсутствие промотора в трансгенной системе. Тезисы докладов научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». 15-16 сентября 2008 г. Казань. С. 117.
5. Максименко О.Г., Силичева М.А., Георгиев П.Г. Изучение системы активации транскрипции на основе модели гена *white* *Drosophila melanogaster*. Тезисы докладов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008 г. Новосибирск. С. 128.
6. Силичева М.А., Георгиев П.Г. Активация гена *miniwhite* *D. melanogaster* в отсутствие промотора в трансгенной системе. Тезисы докладов I международной конференции "Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии" 15-20 сентября 2008 г. Харьков. С. 63.