

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 575.16

№ НИОКР 01201351273

№ ИС ГЗ 0108-2014-0001

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 1. РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И МОРФОГЕНЕЗА:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

(заключительный отчет)

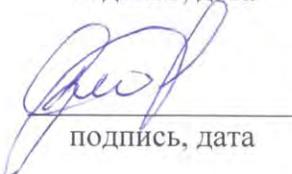
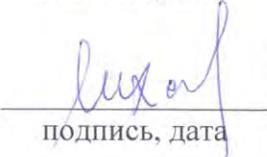
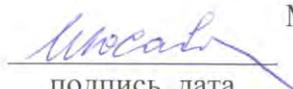
Руководитель темы д.б.н., г.н.с.

Б.А. Кузин

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р биологических наук, профессор	 подпись, дата	Б.А. Кузин (введение, раздел 3 заключение)
Ведущие исполнители темы: Кандидат биол. наук	 подпись, дата	О.Б. Симонова (раздел 1)
Кандидат биол. наук	 подпись, дата	Д.А. Куликова(раздел 2)
Доктор биол. наук, профессор	 подпись, дата	Р.Д. Зиновьева (раздел 4)
Доктор биол. наук	 подпись, дата	М.В. Глазков (раздел 5)
Доктор биол. наук, профессор	 подпись, дата	А.К. Гапоненко (раздел 6)
Доктор биол. наук, профессор	 подпись, дата	В.С. Михайлов (раздел 7.1.)
Доктор биол. наук	 подпись, дата	В.А. Краевский (раздел 7.2.)
Кандидат биол. наук	 подпись, дата	А.В. Широкова (раздел 8)
Кандидат биол. наук	 подпись, дата	М.Ю. Савицкий (раздел 9)

УДК 575.16

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Раздел 1. Особенности регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих морфогенетические процессы высших организмов	8
Раздел 2. Роль новых нейроспецифических эволюционно-консервативных транскрипционных факторов семейства d4 в сигнальных путях, контролирующих морфогенез.	22
Раздел 3. Эволюционно-морфогенетический потенциал стресс-индуцибельных систем.	33
Раздел 4. Исследования молекулярно-генетических механизмов пролиферации и дифференцировки клеток глаза в развитии.	44
4.1. Экспрессия регуляторных генов в дифференцированных и малодифференцированных клетках тканей глаза человека	44
4.2. Экспрессия транскрипционных факторов семейства <i>vsx</i> в ходе морфогенеза сетчатки кур <i>Gallus domesticus</i>	47
Раздел 5. Структурно-функциональная организация эукариотических хромосом.	56
Раздел 6. Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений.	66
Раздел 7. Регуляция активности генов и процессы онтогенеза	69
7.1. Изучение репликации бакуловирусов в клетках эукариот.	69
7.2. Исследование влияния перестроек хроматина на взаимодействие хроматина с SET доменами метилтрансфераз гистонов.	73
Раздел 8: Влияние химических мутагенов на морфогенез ряда сельскохозяйственных (рапс) и декоративных (петунья) растений.	75
8.1. Влияние химических мутагенов на морфогенез рапса	75
8.2. Влияние химических мутагенов на морфогенез петунии и сальпиглоссиса	82
Раздел 9: Влияние экспрессии генов <i>Sxl-dsx</i> каскада на детерминацию пола у <i>Drosophila melanogaster</i> .	87

РЕФЕРАТ

Отчет 94 с., 9 ч., 36 рис., 1 табл., 94 источника, 69 публикаций.

Ключевые слова: морфогенетические процессы, обратные транскрипты, дифференцировка клеток глаза, экспрессия генов-регуляторов, химический мутагенез, генетическая трансформация, сорта пшеницы, протеолитический стресс, бакуловирусы, селекция рапса, петунья, определение пола у насекомых. *Drosophila melanogaster*, хроматин, засухоустойчивость, трансгенная пшеница, интегрин, хрусталик, метилтрансферазы гистонов, домены, эволюционно-консервативные гены.

Объектом исследования являются эволюционно-консервативные гены беспозвоночных (дрозофила) и позвоночных животных (мышь, человек), а также сельскохозяйственных и декоративных растений.

Основная цель работы состояла в проведении экспериментального исследования функции новых генов и механизмов их дифференциальной активности в ходе развития.

Работа выполнена с учетом всех этапов современной методологии исследования, начиная с традиционного метода генетического анализа и заканчивая новейшими методами геной инженерии.

В результате была охарактеризована новая система перекрывающихся генов (*lawc* и *Trf2*) с общей регуляторной областью. Получены предварительные результаты, показывающие значимость экспрессии генов семейства *d4* на этапе закладки нервной системы; разработана тест-система для выявления и изучения специфичности действия ксенобиотиков, включая фармакологические средства, способные активировать транскрипционный фактор человека - Арил Гидокарбонный рецептор. Было показано, что гены *Vsx1* и *Vsx2* семейства *Vsx* обладают терапевтическим потенциалом для лечения пигментного ретинита, макулярной дегенерации сетчатки и дегенерации сетчатки недоношенных; исследована функциональная роль участков прикрепления интерфазных хромосом к ядерной оболочке (яоДНК) в формировании хромосомных доменов кластеров генов с координированной экспрессией (кластер бета-глобиновых генов курицы); получено более 30 трансгенных событий у продуктивных сортов российской яровой пшеницы сортов Злата и Эстер: введен ген транскрипционного фактора OsGATA, индуцируемый засолением, и продуктивных сортов российской озимой пшеницы Дея и Линия 1, введен ген TaDREB3, повышающий морозостойкость, под контролем холод индуцибельного промотора pWRKY71; проведены опыты с ингибиторами деубиквитираз и выяснен вопрос об относительном вкладе активности 26S и 20S протеасом в регуляцию протеома в клетках насекомых; получены новые данные о молекулярных механизмах перестройках структуры хроматина активных генов «ремоделирующими» комплексами ISWI (в модельной системе *in vitro*); изучено накопление лигнина в клетках побегов устойчивых к полеганию линий рапса; проведено сортоиспытание 2

сорта ярового рапс, оценено наследование окраски цветка у мутантов М4 сальпиглоссиса; апробирован новый метод сайт-направленного мутагенеза у дрозофилы, основанного на репарации индуцированного двуцепочечного разрыва.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ:

м-РНК – матричная РНК,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

я-ДНК – ядерная ДНК,

TADs – Topologically Associated Domains,

яоДНК – фрагменты ДНК, участвующие в прикреплении интерфазных хромосом к ядерной оболочке,

LINE – Long Interspersed Repeat Sequences,

SINE – Short Interspersed Repeat Sequences,

LADs – Lamina Associated Domains,

scs/scs' – specialized chromatin structures,

FISH – Fluorescence in situ Hybridization.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ЖК – жирные кислоты

FAD2 - fatty acid desaturase 2

FAD3 - fatty acid desaturase 3

ВВЕДЕНИЕ

Актуально исследование феноменов некодирующей РНК и природных антисмысловых транскриптов с использованием конкретных генетических систем и в конкретных ситуациях *in vivo* на хорошо аннотированных генетических системах. Эта проблема решается путем получения достоверных данных о структурной организации исследуемых генов и их транскриптов.

Группа новых нейроспецифических генов, относящихся к эволюционно-консервативному семейству d4, впервые была выявлена авторами раздела, были установлены факты, что UBI-D4/REQUIREM/DPF2 является корепрессором для ядерного эстроген-подобного рецептора ERR α и связывается с ацетилированным гистоном H3 и гистон-деацетилазой HDAC1, а также выступает в роли коактиватора транскрипции в неканоническом NF- κ B сигнальном пути. Используя метод нокаута, далее было выяснено функционального значения генов семейства d4 и их роли в индивидуальном развитии организма млекопитающих. В настоящее время наше исследование сосредоточено на выяснении роли генов семейства d4 в сигнальных путях, контролирующих морфогенез.

Гипоморфные мутации высоко консервативных генов дрозофилы, контролирующих морфогенетические процессы и системы реагирования на воздействия токсических и температурных факторов активны в процессе развития, а их полиморфизм содержит важный адаптационный и эволюционный потенциал.

Фенотипическое проявление некоторых мутантных аллелей *ss*, *tgo* и *lawc* зависит от воздействия окружающей среды и в первую очередь от температуры развития. Это обстоятельство позволяет предполагать возможность взаимодействия *ss*-, *tgo*- и *lawc*- генов с генами теплового шока, участвующими в ответе на стрессовые воздействия. Основания для такого предположения дополняются сведениями об участии белка теплового шока Hsp90 в активации AHR (гомолога *spineless*) у млекопитающих. У насекомых физическая связь между Hsp90 и *Spineless* не обнаружена, но по предварительным данным авторов раздела она существует с другими генами семейства белков теплового шока.

Актуально изучение неизвестного механизма их взаимодействия, которое может помочь в понимании адаптационной эволюции морфогенетических процессов. Так как исследования, направленные на изучение взаимодействия *ss*-, *tgo*- и *lawc*- генов с генами теплового шока на сегодняшний день отсутствуют, их ожидаемые результаты будут важны для всего научного сообщества.

Учитывая то, что используемые гены высоко консервативны, а модуляция их экспрессии приводит к формированию структур характерных для организмов, адаптированных к различным экологическим нишам и уровням эволюционной организации, то понимание механизмов их взаимодействия имеет дополнительное эволюционно историческое значение.

Изучение экспрессии регуляторных генов, их дифференциальной активности в ходе развития организма, участие в дифференцировке клеток различного типа представляет собой центральное направление современной биологии развития, а глаз является удобной модельной системой для таких исследований.

Работа ведется в актуальной в последнее десятилетие области изучения роли консервативных молекулярных механизмов, направляющих развитие глаза в сравнении представителей разных систематических групп.

Исследования значения процесса ассоциации (взаимодействия) интерфазных хромосом с ядерной оболочкой через специфические участки хромосомной ДНК (я-ДНК), в частности «барьерных» элементов хроматина востребованы в области изучения структурно-функциональной организации эукариотических хромосом.

Создание коллекции независимых трансгенных растений под контролем определенных стресс-индуцибельных промоторов, обеспечивающих изменение паттерна экспрессии генов, контролирующей формирование и развитие репродуктивных органов, является перспективным направлением современной биотехнологии как хозяйственно значимых, так и декоративных растений.

Использование бакуловирусов в биотехнологии, сельском хозяйстве и перспективы их применения в генной терапии определяют значимость изучения макромолекулярных процессов, которые активируются в клетках в результате вирусной инфекции. Полученные приоритетные результаты того, что бакуловирусы являются стресс-фактором для клеток, позволяют активно исследовать системы контроля протеома клеток, которые включают белки-шапероны и протеолитические комплексы, протеасомы, что в настоящее время является актуальной задачей исследования инфицированных клеток.

Изучение метилтрансфераз гистонов, ключевых факторов поддержания наследуемого профиля активности генов на современном этапе является новаторским, поисковым. Обнаруженный факт избирательного и прочного связывания домена SET с нуклеосомными интермедиатами активного хроматина показал, что SET-содержащие белки могут непосредственно узнавать запрограммированное (активное или неактивное) состояние хроматина. Изучение структуры хроматина и механизмов его перестройки «ремоделирующими» белковыми комплексами, которые необходимы для направленного влияния на работу генома, позволят вскрыть дополнительные механизмы функционирования генетического материала.

Комплексные исследования по оптимизации использования мутагенов востребованы для получения сортов растений, имеющих народно-хозяйственное или декоративное значение с необходимыми эффективными и устойчивыми свойствами.

РАЗДЕЛ 1 Особенности регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих морфогенетические процессы высших организмов

1.1. ВВЕДЕНИЕ

Тотальное секвенирование геномов с последующей компьютерной обработкой полученных данных позволило обнаружить огромное количество не-генных элементов в эукариотических геномах. Оказалось, что ДНК, ранее считавшаяся «мусорной», транскрибируется, а количество этих транскриптов составляет более 90% от количества всех транскриптов в геноме человека и представлено фракцией, не кодирующей белок РНК у которых нет кодонов и открытых рамок считывания (non-coding RNAs - ncRNAs). В результате исследований, направленных на выявление функциональной значимости ncRNAs, выяснилось, что они потенциально могут контролировать онтогенез, участвуя в регуляции таких клеточных процессов, как геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы, альтернативный сплайсинг, сайленсинг генов и метилирование, редактирование РНК, трансляция. Имеются данные, что ncRNAs играют определённую роль в детерминации судьбы стволовых герминативных клеток и в поляризации ооцита многих позвоночных и беспозвоночных животных, контролируя правильную локализацию материнских продуктов (белков и кодирующих их транскриптов) в яйце. Недавно было показано, что часть некодирующих белки генов у млекопитающих производят большие регуляторные РНК (они получили название large intervening non-coding RNAs, lincRNAs) которые, как предполагают, выполняют в клетках широкий круг задач от регуляции клеточных делений до управления свойствами стволовых клеток. Эти гены достаточно консервативны, а их транскрипты имеют размер более 5 тн. Накапливаются сведения, что регуляция экспрессии гомеобокс-содержащих селекторных генов (Hox), которые производят ключевые регуляторы эмбрионального развития, осуществляется по механизму транскрипционной интерференции, в которой участвуют антисмысловые (перекрывающиеся) транскрипты NATs. Кроме того, по последним данным обнаружилось, что в геномах эукариотических организмов также встречается перекрывание кодирующих белки генов, (до 7,9% у человека; 8,2% у мыши; 26,2% у дрозофилы; 4,6% у нематоды). Как происходит регуляция экспрессии таких генов изучено слабо. С другой стороны некоторые авторы обращают внимание, что ориентация 10-20% аннотированных в UniGene последовательностей EST (expressed sequence tag) представлена ошибочно, а технологии microarrays и tiling arrays склонны давать ложные позитивные артефактные сигналы из-за геномных контаминаций РНК-проб, кросс-гибридизации или случайных мечений двухцепочечной РНК и т.д.. Другие авторы обращают внимание на то, что количество аннотированных транскриптов, представленных в компьютерных базах данных, гораздо меньше, реально существующих. Например, район локализации генного комплекса дрозофилы lawc-Trf2 по данным FlyBase формирует четыре мРНК – 2 длинных транскрипта принадлежат гену Trf2 и 2 коротких

противоположно направленных транскрипта принадлежат гену CG32711/lawc. Оба гена дивергентно перекрываются, при этом область первого экзона одного гена расположена в интроне другого и наоборот. Однако, эти сведения и различные модели транскриптов предсказанные modENCODE не отражают реально существующей картины. Наши данные, полученные после клонирования гена lawc, показали, что его транскрибируемая 5'-область гораздо длиннее и пересекается со вторым экзоном гена Trf2, а Нозерн-блот гибридизация polyA+РНК с фрагментом зоны перекрытия показала, что этот район входит в состав, по крайней мере, 11 транскриптов. Критические статьи в купе с нашими предварительными данными ставят под сомнение результаты тотального анализа геномов и созданные на их основе компьютерные модели, выявляющие глобальную роль антисмысловой транскрипции *in silico*. В связи с этим актуально исследовать феномены ncRNAs и NATs с использованием конкретных генетических систем и в конкретных ситуациях *in vivo* на хорошо аннотированных генетических системах. Для этого необходимо получить достоверные данные о структурной организации исследуемых генов и их транскриптов. По литературным данным таких работ чрезвычайно мало. Например, известно лишь несколько публикаций, где была убедительно доказана регуляция экспрессии с участием антисмысловых транскриптов генов человека. Это гены p15, Zeb2, KCNQ1, NOS3, svPINK1. Экспрессия лишь одного из этих генов (NOS3) контролируется другим конвергентно перекрывающимся с ним геном, кодирующим предполагаемый белковый продукт (sONE/NOS3AS). NATs остальных генов являются не кодирующими транскриптами - ncRNA.

Использование модельной системы на основе *Drosophila melanogaster* достаточно хорошо отлажено, причём возможность изучения функции генов различными способами – с помощью генетических и трансгенных методик, а также посредством РНК-опосредованной супрессии транскрипционной активности – сделала этот организм мощным биологическим инструментом для учёных. Известно, что у многих генов человека имеются соответствующие гомологии у дрозофилы. К таким генам относится и ген дрозофилы Trf2, который перекрывается с другим геном lawc. До последнего времени границы локализации гена Trf2 до конца не были установлены. В частности, не был известен район локализации начала его транскрипции (5'область). В первую очередь эти трудности были обусловлены отсутствием достаточного набора удобных мутаций в области гена Trf2. Открытие жизнеспособной инсерционной мутации гена lawc в неизученной "летальной зоне" генома, расположенной вблизи гена Trf2, явилось важным событием в исследовании молекулярной структуры локуса. Мы показали, что мутации генного комплекса lawc/Trf2 нарушают эмбриогенез, нейрогенез и формирование гонад у дрозофилы. Систему этих генов мы предлагаем использовать в качестве модели для исследования особенностей регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих развитие.

Теоретический уровень ожидаемых результатов сопоставим с мировым, а по ряду позиций будет опережать зарубежные разработки в данной области науки.

1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные методы и подходы в области молекулярного и генетического анализа не уступают мировому уровню. Основными методами при сравнительном исследовании уровня экспрессии анализируемых транскриптов были Нозерн-блот гибридизация и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением геноспецифичных праймеров. Синтез зондов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полноразмерная кДНК транскрипта гена *lawc* была получена методом быстрой амплификации 5'-концевых фрагментов кДНК (5'-RACE) с помощью технологии Step-Out RACE (Evrogen). Новые полоспецифичные сплайс-варианты мРНК гена *lawc* были клонированы с помощью технологии RACE (метод 5'-RLM-RACE и 3'-RACE) кДНК, выделенной отдельно из самцов и самок. Анализ экспрессии транскриптов *lawc/Trf2* у различных видов дрозофил группы *melanogaster* и у особей различных стадий развития проводили при помощи Нозерн-блот гибридизации РНК, выделенной из разных видов дрозофил с зондом из района перекрывания генов *lawc/Trf2* у *D. melanogaster*. Для избегания ошибки при использовании видов-близнецов (*D. melanogaster*, *D. simulans*) и для определения видоспецифичности остальных взятых в анализ видов мы провели их генотипирование на молекулярном уровне с помощью ПЦР по гену цитохромоксидазы. Для подавления (нокдауна) *in vivo* экспрессии разнонаправленных транскриптов генного комплекса *lawc/Trf2* проводили геноспецифическую РНК-интерференцию, используя линии с UAS-конструкциями, активация которых в системе Gal4/UAS способствует формированию шпильки, запускающей процесс РНК-интерференции. Эффективность драйверных Gal4-линий предварительно проверяли, используя репортерную линию UAS-GFP. В эксперименте использовались две UAS-содержащие трансгенные линии, полученные нами самостоятельно. Эти линии содержат конструкции, экспрессирующие шпилечную РНК, комплементарную либо регуляторной зоне гена *lawc/Trf2* (линия P{w+UAS-Ri}13), либо району, кодирующему TRF2 (линия P{y+UAS-TRFi}). Для тканеспецифического подавления прямых и обратных транскриптов в тканях глаза была использована линия-драйвер P{w+m=GAL4-ninaE.GMR}; в тканях антенны - P{GawB}DII/CyO; в репродуктивных клетках самок - P{w+mC=UAS-Dcr-2.D}1,w1118; P{w+mC=GAL4-pos.NGT}40/CyO; в клетках слюнных желёз личинок - P{Sgs3- GAL4.PD}TP1. Давленные препараты политенных хромосом изготавливали стандартным способом, окрашивали 5% раствором Гимзы. Личинок и мух выращивали при оптимальной для активации драйверной конструкции температуре 27°C. Для фотографирования морфологических структур (глаза и антенны) использовали цифровой микроскоп Keyence VHX 1000E, предоставленный сотрудниками ИМБ

РАН. Для фотографирования политенных хромосом использовали световой микроскоп с фотонасадкой Olympus.

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были установлены реальные точки старта транскрипции известных ранее сплайс-вариантов мРНК гена *lawc* – isoform A, B, C (рис. 1). Впервые показано, что эти сплайс-варианты мРНК *lawc* перекрываются с транскриптами гена *Trf2*. Впервые было показано наличие в локусе *lawc/Trf2* кластера новых, не описанных ранее транскриптов, размером до 1.2 т.н. (рис. 1). Впервые выявлены новые экзоны и новые полоспецифичные транскрипты обоих генов. Новые последовательности транскриптов (смысловых и антисмысловых) были депонированы в базу данных GenBank.

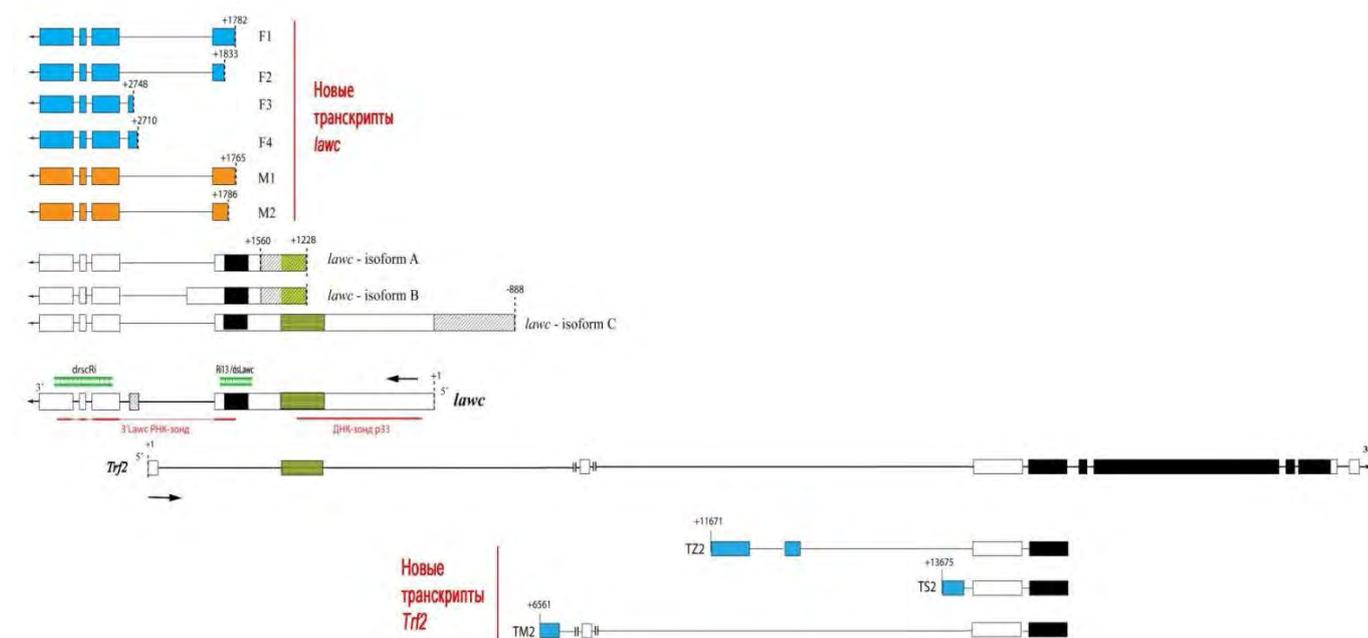


Рисунок 1.1 - Структурная организация новых транскриптов *lawc* и *Trf2*. Прямоугольниками обозначены экзоны, чёрным выделены районы, кодирующие белок, зеленым выделена зона перекрытия транскриптов *lawc* и *Trf2*, синим (вверху) обозначены новые *lawc*-транскрипты, обнаруженные у самок (F1-4), оранжевым – у самцов (M1-2). Синим (внизу) обозначены 5'-районы новых *Trf2*-транскриптов (TM2, TS2, TZ2). Штриховкой обозначены установленные нами новые границы 5'-районов *lawc*-транскриптов и новый экзон. +1 – сайт старта транскрипции. Красным обозначены зонды, использованные для Нозерн-блот гибридизации. Зелёной двойной линией обозначены районы (*drscRi* и *Ri13/dslawc*), с которых синтезировали двухцепочечную РНК (дцРНК) *in vitro* в экспериментах по РНК-интерференции в культуре клеток дрозофилы.

Впервые был изолирован полноразмерный транскрипт *lawc*. Три новых *Trf2*-транскрипта и два новых (включая полноразмерный) *lawc*-транскрипта внесены в мировую базу данных GenBank. В результате установили, что ряд разнонаправленных белок-кодирующих м-РНК *lawc* и *Trf2* частично перекрываются в районе 5'-некодирующей области. Наличие перекрывающихся *lawc/Trf2*-транскриптов предполагает активацию механизма РНК-интерференции и формирование коротких двуцепочечных молекул РНК. Однако анализ библиотек малых РНК из данного района таких молекул не выявил. Было показано, что зона перекрытия экзонов генов *lawc* и *Trf2* обладает эволюционным консерватизмом, сохраняясь у видов дрозофил подгруппы *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. erecta*, *D. yakuba*) (рис. 2).

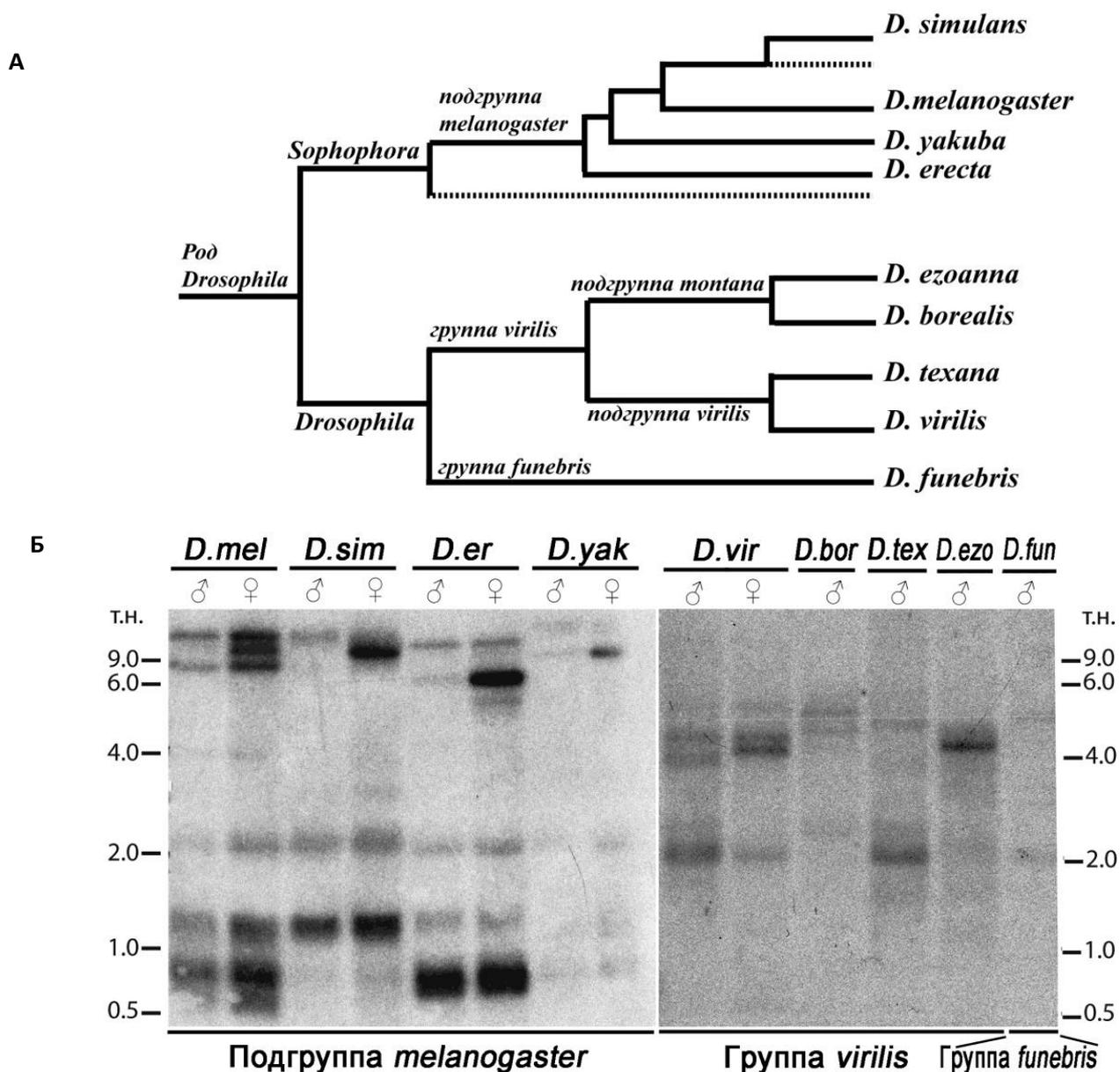


Рисунок 1.2 - Анализ экспрессии транскриптов *lawc/Trf2* у различных видов дрозофил группы *melanogaster* с зондом из района, общего для перекрывающихся транскриптов.

А. Упрощенная схема эволюционного дерева рода *Drosophila*.

Б. Нозерн-блот гибридизация поли(А)+РНК, выделенной из разных видов дрозофил, с зондом р3.3 из района перекрытия генов *lawc* и *Trf2* у *D. melanogaster*. Обозначения: *D.mel* – *D. melanogaster*, *D.sim* – *D. simulans*, *D. er* – *D. erecta*, *D.yak* – *D. yakuba*, *D. vir* – *D. virilis*, *D.bor* – *D. borealis*, *D. tex* – *D. texana*, *D. ezo* – *D. ezoanna*, *D.fun* – *D. funebris*

Этот факт уникален, поскольку считается, что зоны перекрытия генов редко сохраняются в процессе эволюции. Эволюционный консерватизм зоны перекрытия говорит о том, что, вероятно, существует механизм адаптации координированной работы генов в условиях использования ими общих регуляторных районов, который нуждается в исследовании.

Мы обнаружили, что ингибирование экспрессии обратных *lawc*-транскриптов по пути РНК-интерференции приводит к активации пула новых *lawc*-мРНК длиной 100-500 н, формирующихся в первом экзоне гена (рис. 3 а,б). Мы показали этот факт *in vitro* в культуре клеток, используя метод трансфекции дц-молекул РНК в цитоплазму клеток, и *in vivo*, используя трансгенных дрозофил, геном которых несёт конструкцию, экспрессирующую РНК-шпильку, направленную на посттрансляционное подавление экспрессии *lawc*. Гиперактивация транскрипции новых *lawc*-мРНК негативно подействовало на экспрессию перекрывающегося с ним гена *Trf2* (рис. 3 в, г).

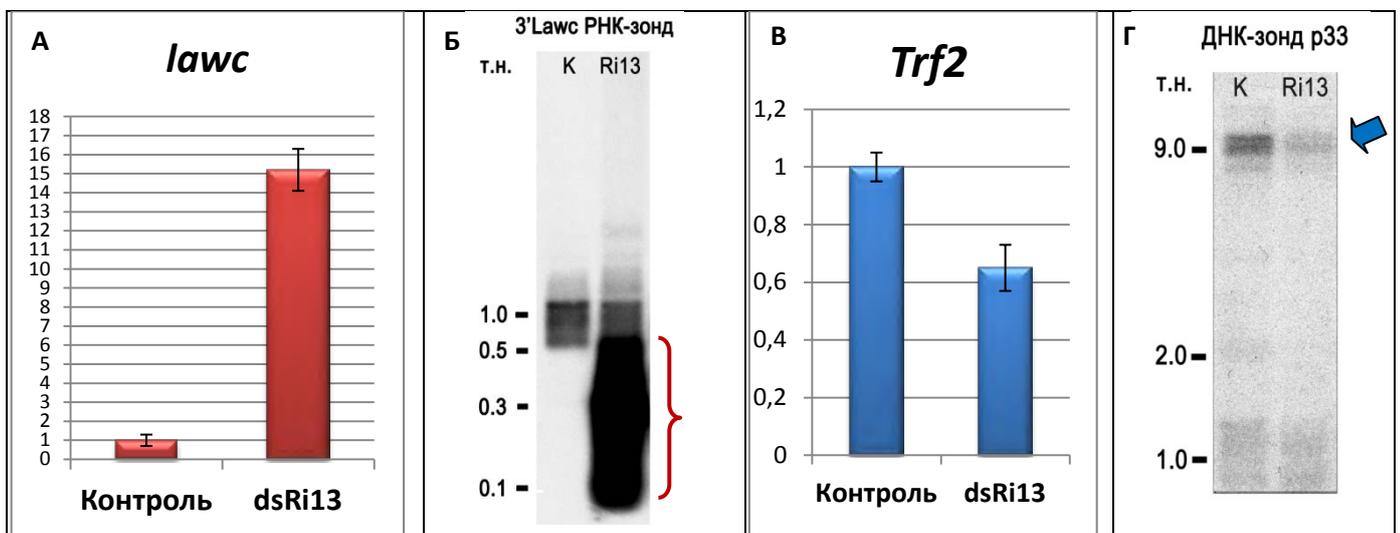


Рисунок 1.3 - Активация пула новых антисмысловых *lawc*-транскриптов и подавление экспрессии прямых белок-кодирующих транскриптов гена *Trf2* при ингибировании по пути РНК-интерференции мРНК *lawc* в культуре клеток S2.

А. Относительный уровень экспрессии обратных *lawc*-транскриптов (праймеры из белок-кодирующей области гена) при введении дцРНК, гомологичной транслируемой зоне *lawc* - Ri13/dsLawc на рис. 1 (dsRi13), или GFP (контроль).

Б. Нозерн-блот гибридизация полиА+РНК, выделенной из культуры клеток до (К) и после (Ri13) введения фрагментов двухцепочечной РНК, гомологичной транслируемой зоне *lawc*, с рибопробой 3'LAWS (рис. 1). Красной скобкой обозначена гиперэкспрессия новых *lawc*-транскриптов.

В. Относительный уровень экспрессии прямых Trf2-транскриптов (праймеры из белок-кодирующей области гена) при введении дцРНК, гомологичной транслируемой зоне *lawc* - Ri13/dsLawc на рис. 1 (dsRi13), или GFP (контроль).

Г. Нозерн-блот гибридизация полиА+РНК, выделенной из культуры клеток до (К) и после (Ri13) введения фрагментов дцРНК, гомологичных транслируемой зоне *lawc*, с ДНК-зондом из района перекрытия (зонд p 33, рис. 1). Синяя стрелка указывает уменьшение количества кодирующих Trf2-транскриптов. Новые оверэкспрессирующиеся транскрипты *lawc* данный зонд не выявляет поскольку не затрагивает область их локализации.

В целях оценить силу этого влияния на развитие живого организма мы решили провести РНК-интерференционное подавление прямых и обратных транскриптов комплекса *lawc/Trf2* *in vivo* в разных органах и тканях у *D. melanogaster* и сравнить последствия экспериментов анализом фенотипа подопытных дрозофил. Для воплощения наших целей мы создали трансгенных дрозофил, геном которых содержал конструкции, способные синтезировать РНК-шпильку, направленную на посттранскрипционное подавление экспрессии только прямых Trf2- (UAS-TRFi), либо только обратных *lawc*- (UAS-Ri) транскриптов. Синтез ингибирующей РНК-шпильки в конструкциях находился под управлением дрожжевого промоторного элемента UAS, который легко можно активировать в двухкомпонентной системе UAS/Gal4 с помощью тканеспецифической экспрессии дрожжевого белка Gal4. Для этого просто нужно скрестить мух наших линий UAS-TRFi (UAS-Ri) с мухами драйверных линий GAL4. Мы использовали драйверные линии для тотальной инактивации экспрессии прямых и обратных транскриптов во всех клетках организма на всех стадиях развития дрозофилы и специфической инактивации: в тканях глаза, антенны, слюнных желёз и в половых клетках самок дрозофилы. Тотальная активация каждой из конструкций привела к гибели организма на ранних стадиях развития – в эмбриогенезе – демонстрируя одинаковые нарушения у погибших эмбрионов. Иначе говоря, гиперактивация новых транскриптов гена *lawc*, вызванная РНК-инактивацией этого гена, нарушила экспрессию противоположно направленных транскриптов Trf2, вызывая те же эффекты, как и при простом подавлении экспрессии Trf2. Гибель дрозофил, вызванная гиперактивацией *lawc* «спасалась» на фоне эктопической экспрессии белка TRF2, подтверждая наш вывод (рис. 4).

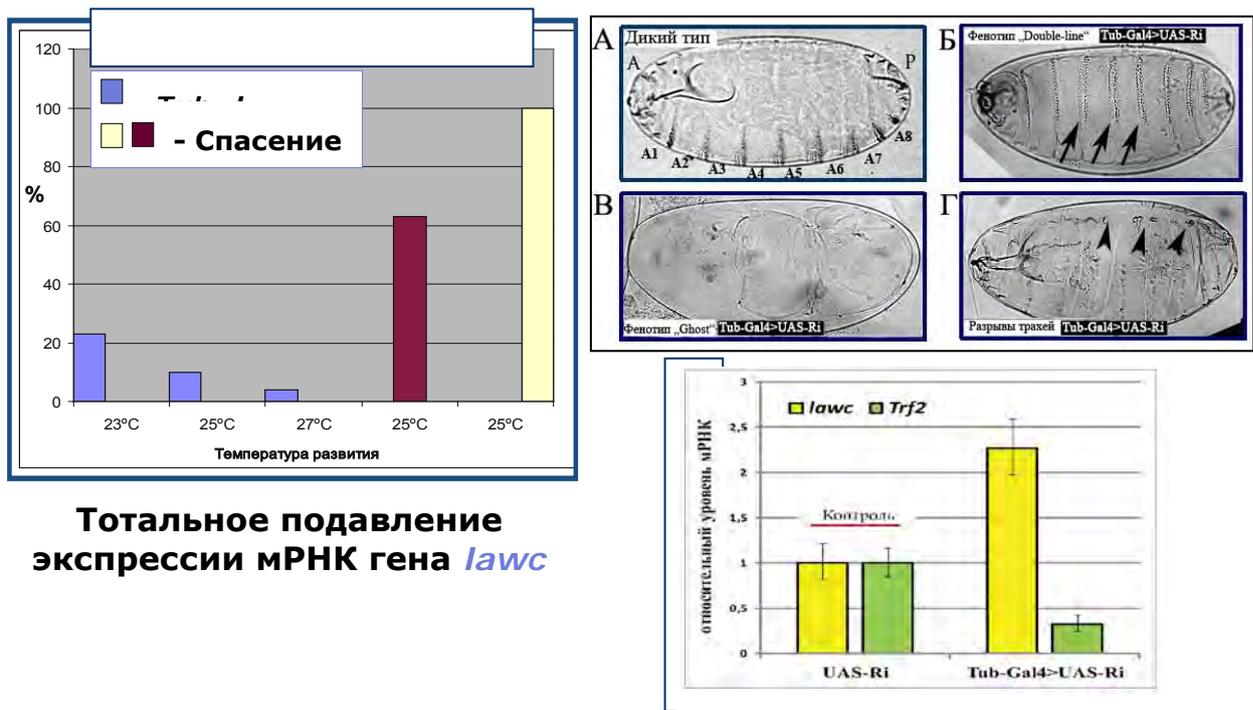


Рисунок 1.4 - Тотальное подавление обратных *lawc*-транскриптов у дрозофил *Tub-Gal4>UAS-Ri* нарушает экспрессию прямых транскриптов *Trf2*. Описание в тексте.

Инактивация как *lawc*, так и *Trf2* в тканях глаза также дала одинаковый эффект – «грубые глаза»: нарушения организации рядов омматидиев, дефекты в их структуре, изменения ориентации, их слияние и уменьшение количества пигментных клеток и механо-сенсорных щетинок. Регистрируемые нарушения свидетельствуют об образовавшемся в процессе развития глазных имагинальных дисков дефиците клеток вследствие активации генов – негативных регуляторов клеточного цикла. Морфогенез глаз мух из контрольных групп не нарушался. Это позволило сделать вывод о том, что зарегистрированные нами нарушения морфогенеза в подопытном классе мух вызваны снижением активности *lawc/Trf2*. По силе проявления эти нарушения были одинаковы. Инактивация как *lawc*, так и *Trf2* в тканях антенны также продемонстрировала одинаковый эффект: у всех тестируемых особей (N = 59) мы наблюдали слабую трансформацию антенны в лапку и редукцию аристы, характерную *lawc*-мутантам с пониженной экспрессией транскриптов *Trf2*. Подавление экспрессии прямых и обратных транскриптов гена *lawc/Trf2* в соматических клетках ткани слюнных желёз личинок дрозофилы тоже дали одинаковый результат (рис. 5). Анализ образцов политенных хромосом, полученных из клеток слюнных желёз личинок *Sgs3-GAL4<UAS-Ri* и *Sgs3-GAL4<UAS-TRFi*, выявил ряд структурных дефектов в морфологической организации политенных хромосом (отсутствие ряда пучков и изменение характерного «полосатого» рисунка, асинапсис гомологов, плохо сформированный хромоцентр).

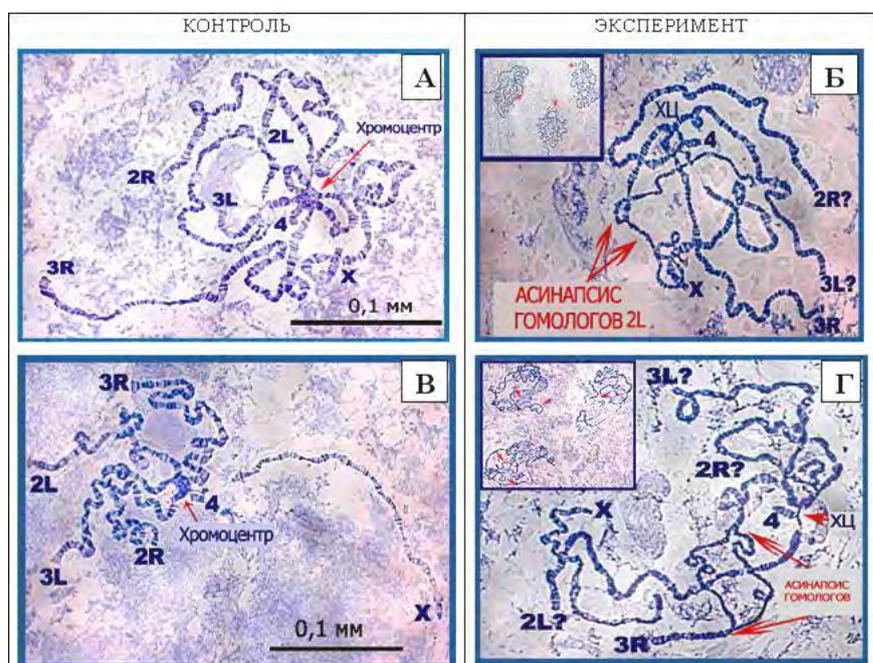


Рисунок 1.5 - Одинаковый эффект подавления прямых и обратных транскриптов *lawc/Trf2* в слюнных железах личинок дрозофилы. Представлены давленные препараты политенных хромосом до и после подавления экспрессии прямых и обратных транскриптов *lawc/Trf2*.

Контрольные линии: драйвер *Sgs3-GAL4* (А) и линия, содержащая не активированную конструкцию (в данном случае *UAS-Ri*). Хромосомы имеют нормальную морфологию и компактный хромоцентр. (В). Обозначены: хромоцентр, X-хромосома (X), левые (2L) и правые (2R) плечи второй, левые (3L) и правые (3R) третьей аутосом и четвёртая (4) хромосома.

Линии, содержащие активированные конструкции: *UAS-TRFi* (Б) и *UAS-Ri* (Г). В рамках - общие снимки политенных хромосом. Видно нарушение компактизации хромосом, структуры хромоцентра и асинапсис гомологов. Обозначены: ХЦ – хромоцентр, X, 2L, 2R, 3L, 3R, 4: X-хромосома, левые и правые плечи второй и третьей аутосом и четвёртая хромосома, соответственно. Асинаптированные участки хромосом указаны стрелками.

Для подавления прямых и обратных транскриптов в репродуктивной системе самок была использована линия {*Nos-Gal4*}, в которой белок *GAL4* накапливается в зоне гермария – районе, где локализованы стволовые репродуктивные клетки и формируются новые яйцевые камеры. Эффект подавления прямых и обратных транскриптов оценивали после тестирования гибридных самок *NOS-Gal4>UAS-Ri13* и *NOS-Gal4>UAS-TRFi* на фертильность. Для этого каждую самку индивидуально скрещивали с самцом дикого типа и проверяли наличие потомков. Эксперимент по подавлению разнонаправленных транскриптов *lawc/Trf2* в репродуктивной системе самок привёл к разным результатам. Подавление прямых *Trf2*-транскриптов в клетках полового пути сильно

снизило фертильность самок: примерно половина от общего количества тестируемых самок была стерильна. Подавление обратных *lawc*-транскриптов на фертильность не повлияло.

Таким образом, в соматических тканях гиперактивация транскрипции новых *lawc*-мРНК (при инактивации гена *lawc*) и инактивация *Trf2*-транскриптов вызывало одинаковые по силе морфологические дефекты развития. Однако, в репродуктивных тканях эффект (стерильность самок) наблюдался лишь при подавлении прямых транскриптов *Trf2*, т.е. гиперактивация *lawc* не мешала транскрипции *Trf2*. Различие результатов при подавлении разнонаправленных транскриптов комплекса *lawc/Trf2* в генеративных тканях, возможно, связано с тем, что в этих тканях полоспецифическая транскрипция *Trf2* не конкурирует с антисмысловой транскрипцией *lawc*.

Ранее для *Trf2* были описаны только четыре транскрипта с большим молекулярным весом, для *lawc* - три. В ходе выполнения проекта мы показали, что, как для *Trf2*, так и для *lawc* характерны новые короткие сплайс-варианты транскриптов, активно экспрессирующиеся на эмбриональной и куколочной стадиях развития. Мы обнаружили новый экзон в составе гена *lawc* и показали, что некоторые транскрипты имеют альтернативные сайты старта транскрипции. Ряд транскриптов этих генов не кодируют белки и являются полоспецифическими. Анализ базы UCSC Genome Browser показал, что регуляторная область *lawc/Trf2* насыщена сайтами связывания важных белковых факторов, контролирующих эмбриогенез, поэтому одна из вероятных функций некодирующих РНК генов *lawc* и *Trf2* – обеспечение доступности хроматина для этих регуляторных факторов, путём привлечения хроматин-ремоделирующих комплексов. Регуляция экспрессии смыслового гена антисмысловыми длинными некодирующими РНК на уровне хроматина описана для гена человека *CDKN2B* [1], генов крысы *Nefl* и *Vim* [2] и генов *Evx1* и *Нохb5/6* мыши [3] в культуре клеток *in vitro*. Обнаруженная нами система длинных некодирующих транскриптов *lawc/Trf2* может служить удобной моделью для изучения функций антисмысловых длинных некодирующих РНК у высших организмов *in vivo* при помощи трансгенных дрозофил, экспрессирующих РНК-шпильку, направленную на подавление мРНК по пути РНК-интерференции.

В ряде работ показано, что перекрывающиеся гены обладают малой эволюционной консервативностью между разными видами и подвергаются отрицательному отбору. Однако мы показали, что зона перекрытия экзонов генов *lawc* и *Trf2* обладает эволюционным консерватизмом, сохраняясь у видов дрозофил подгруппы *melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. erecta*, *D. yakuba*).

Изучая комплекс перекрывающихся транскриптов генного комплекса *lawc/Trf2* мы продемонстрировали *in vivo* и *in vitro*, что снижение экспрессии антисмысловых белок-кодирующих транскриптов *lawc* меняет паттерн его экспрессии в сторону формирования мощного

пула мРНК. Мы показали, что новые транскрипты формируются в области первого экзона *lawc* и имеют размер от 100 до 500 нуклеотидов. Активация экспрессии новых антисмысловых *lawc*-транскриптов нарушает экспрессию противоположно направленных (смысловых) транскриптов *Trf2*, что критически сказывается на развитии органов, тканей и жизнеспособности организма.

В настоящее время описана экспрессия различных типов РНК в районе промоторов активно транскрибирующихся генов. Было предположено, что наличие этой экспрессии может быть связано с локальными РНК-опосредованными модификациями хроматина. Недавние исследования показали прямую связь некодирующих РНК длиной более 200 н (*promoter-associated ncRNAs* - *pancRNAs*), транскрибируемых в смысловом и антисмысловом направлении в промоторной области, с метилированием ДНК и модуляцией активности генов [2]. Особый интерес представляют недавние исследования, в которых показано, что комплиментарные промотору РНК могут, как подавлять, так и активировать [4-5] экспрессию генов в клетках млекопитающих. При этом отмечается, что малые РНК, комплиментарные промоторам, влияют на процесс транскрипции, не взаимодействуя напрямую с промоторами, а связываются с некодирующими РНК, транскрибируемыми в промоторной области. Малые РНК связываются, как со смысловыми [6], так и с антисмысловыми некодирующими транскриптами [7]. Искусственно вводимые малые РНК подавляли длинную антисмысловую некодирующую РНК, супрессирующую транскрипцию смыслового гена, что приводило к его активации [8]. Последние исследования показали, что в транскрипционной модуляции генов малыми промоторными РНК, участвует белок Ago2, который связывается с некодирующими транскриптами, как в случае активации, так и в случае супрессии [9]. В отличие от этих исследований мы показали гиперактивацию альтернативных длинных (100-500 н) некодирующих мРНК *lawc* (рис. 3б), которые происходят не из области промоторов, а из области первого экзона. Гиперактивация произошла в ответ на вводимые дцРНК, направленные на подавление белок кодирующих *lawc*-транскриптов. Поэтому, скорее всего, новый пул транскриптов сформировался в ответ на снижение экспрессии белка *Lawc* и, возможно, в ответ на снижение неких комплементарных микроРНК, в норме подавляющей активацию альтернативных транскриптов. Формирование мощной транскрипции в области первого экзона *lawc* негативно сказалось на экспрессии перекрывающегося с ним гена *Trf2*. Возможно, подавление экспрессии *Trf2* произошло на транскрипционном уровне по механизму транскрипционной интерференции [10]. Поскольку оба гена участвуют в регуляции базовой транскрипции, т.е, функционально родственны, то логично предположить, что снижение экспрессии продукта одного гена должно приводить к снижению экспрессии другого. Иными словами, активация антисмысловой транскрипции на сигнал нехватки одного из белковых продуктов (*Lawc*) может служить механизмом контролирующим транскрипцию смыслового транскрипта, кодирующего другой белковый продукт (*TRF2*),

координируя экспрессию обоих генов в клетке. Так как район перекрытия генов *lawc* и *Trf2* эволюционно консервативен, то такая регуляция работы обоих генов может быть оптимальной для точного контроля уровня экспрессии обоих генов в процессе развития.

1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы мы исследовали тонкую структуру перекрывающихся разнонаправленных генов локуса *lawc/Trf2*. Были изолированы и депонированы в базу данных GenBank неописанные ранее *lawc*- и *Trf2*-транскрипты, формирующиеся с альтернативных промоторов. Было установлено, что перекрытие в исследуемой зоне между генами *lawc* и *Trf2* обладает эволюционным консерватизмом, не подвергаясь отрицательному отбору, что говорит об эволюционной значимости данного района, возможно, приспособленного для тонкой регуляции транскрипционного процесса обоих генов. Оказалось, что разнонаправленные перекрывающиеся транскрипты обоих генов в культуре клеток детектируются одновременно, однако дуплекс не формируют. Тем не менее, нарушение концентрации противоположно направленных транскриптов негативно влияет на экспрессию прямых, приводя к последствиям, несовместимым с жизнью особей.

В ходе работы нами впервые описан феномен РНК-активации у дрозофилы: продемонстрировано формирование мощного пула новых мРНК в первом экзоне гена *lawc* длиной 100-500 н в ответ на РНК-интерференционное подавление экспрессии его белок-кодирующих транскриптов. Новые транскрипты были клонированы и картированы. Оказалось, что они имеют альтернативные сигналы стартов и терминации транскрипции. Индуцибельная активация альтернативных *lawc*-транскриптов негативно повлияло на экспрессию перекрывающегося с ним гена *Trf2*. Мы показали этот факт принципиально разными способами: *in vitro* в культуре клеток, используя метод трансфекции дц-молекул РНК в цитоплазму клеток, и *in vivo*, используя трансгенных дрозофил, геном которых экспрессирует инактивирующую РНК-шпильку, направленную на посттрансляционное подавление экспрессии *lawc*. Возможно, в норме альтернативная активация *lawc*-транскриптов подавляется комплементарными микроРНК, концентрация которых была нарушена в ходе наших экспериментов. Утверждение, являются ли альтернативные *lawc*-транскрипты мишенями микроРНК, нуждается в дальнейшей проверке. В целом, такой механизм вполне мог сложиться в ходе эволюционного процесса для координирования уровня экспрессии перекрывающихся генов в процессе развития.

1.5 ССЫЛКИ

1. *Yu W., Gius D., Onyango P., Muldoon-Jacobs K. et al. // Nature. - 2008. - V. 451. - P. 202–206.*
2. *Tomikawa J., Shimokawa H., Uesaka M. et al. // J. Biol. Chem. - 2011. - V. 286. - P. 3478-34799.*
3. *Dinger M.E., Amaral P.P., Mercer T.R. et al. // Genome research. - 2008. - V.18. - P. 1433-1445.*

4. Li L-C., Okino S.T., Zhao H. et al. // Proc. Natl Acad. Sci. - 2006. - V.103. - P. 17337–17342.
5. Janowski B.A., Younger S.T., Hardy D.B. et al. // Nat. Chem. Biol. - 2007. - V. 3. - P. 166–173.
6. Hawkins P.G., Santoso S., Adams C. et al. // Nucleic Acids Res. - 2009. - V. 37. - P. 2984–2995.
7. Schwartz J.C., Younger S.T., Nguyen N.B. et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. - 2008. - V. 15. - P. 842–848.
8. Morris K.V. // Oligonucleotides. - 2009. - V. 19. - P. 299–305.
9. Chu Y., Yue X., Scott T. Y. et al. // Nucleic Acids Research. - 2010. - V. 38. - P. 7736-7748.
10. Mazo A., Hodgson J.W., Petruk S. et al. // Journal of cell science. - 2007. - V.120. - P. 2755-2761.

1.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Симонова О.Б. Влияние мутаций гена *lawc/Trf2* на формирование хромосомы и расхождение хромосом у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2013. Т. 49. №6. С. 669-680.
2. Черезов Р.О., Воронцова Ю.Е., Мерцалов И.Б., Куликова Д.А., Симонова О.Б. Влияние РНК-шпильки, специфичной к гену *lawc*, на экспрессию перекрывающихся генов комплекса *lawc/Trf2* у *D. melanogaster* // Известия РАН. Сер. Биол. 2013. №2. 133–137.
3. Simonova O.B., Cherezov R.O., Vorontsova J.E., Mertsalov I.B., Kulikova D.A. The influence of hairpin RNA against *lawc* on the expression of overlapping *lawc* and *Trf2* genes in *D. melanogaster* // 54th Annual Drosophila Research Conference. Washington. USA. 2013. April 3-7. P. 832 B.
4. Simonova O., Cherezov R., Vorontsova Ju., Mertsalov I., Kulikova D. The effect of hairpin RNA against *lawc* on the expression of overlapping genes *lawc/Trf2* in *Drosophila* // The 23rd European Drosophila Research Conference. Barselona. Spain. 16th-19th October. 2013. № 281. P. 257.
5. Симонова О.Б., Кузин Б.А. Модуляция экспрессии генов – эволюционный резерв адаптационных изменений морфогенеза // Сборник трудов "Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция". Ст-П., 2013. С. 87-89 (Тезисы Всероссийской конференции с международным участием "ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ, МОРФОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИЯ" к 135-летию со дня рождения П.П. Иванова. Санкт-Петербург, 22 - 24 октября 2013 г.)
6. Черезов Р.О., Симонова О.Б. Перекрывающиеся гены и антисмысловая транскрипция у эукариот // Генетика. 2014. Т. 50. №. 7. С. 749–763.
7. Симонова О.Б. Предполагаемые направления участия фактора базовой транскрипции Trf2 в эволюции билатерально-симметричных животных // Материалы Конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: устойчивость и вариабельность». Москва, 21 – 23 апреля 2015 г. С. 63-64.
8. Tcherezov R.O. and Simonova O.B. New splice variant of leg-arista-wing complex gene mRNA. EMBL-ENA: AKD44222.1 (28-NOV-2014). Электронная публикация на интернет-ресурсе

European Molecular Biology Laboratory – European Nucleotide Archive (EMBL-ENA). <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AKD44222>

9. *Tcherezov R.O. and Simonova O.B.* *Drosophila melanogaster* leg-arista-wing complex variant (*lawc*) mRNA, complete cds, alternatively spliced. GenBank: KP215644.1 (26-APR-2015). Электронная публикация на интернет-ресурсе The National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP215644>
10. *Tcherezov R.O. and Simonova O.B.* *Drosophila melanogaster* isolate TS2 TATA box binding protein-related factor 2 (TRF2) mRNA, partial sequence. GenBank: KP226597.1 (06-MAY-2015). Электронная публикация на интернет-ресурсе The National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP226597>
11. *Tcherezov R.O. and Simonova O.B.* *Drosophila melanogaster* isolate TM2 TATA box binding protein-related factor 2 (TRF2) mRNA, 5' UTR and partial cds, alternatively spliced. GenBank: KP226598.1 (06-MAY-2015). Электронная публикация на интернет-ресурсе The National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP226598>
12. *Tcherezov R.O. and Simonova O.B.* *Drosophila melanogaster* isolate TZ2 TATA box binding protein-related factor 2 (TRF2) mRNA, 5' UTR and partial cds, alternatively spliced. GenBank: KP226599.1 (06-MAY-2015). Электронная публикация на интернет-ресурсе The National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP226599>
13. *Simonova O., Cherezov R., Vorontsova J., Mertsalov I., Kulikova D.* The activation of new *lawc* transcripts after the homologous long double-stranded RNA treatment in *Drosophila* // THE ALLIED GENETICS CONFERENCE (57th Annual *Drosophila* Research Conference). USA. Orlando. July 13-17. 2016. FULL ABSTRACTS BOOK. #D1508A. P. 415.
14. *Cherezov R., Vorontsova J., Simonova O.* The activation of cryptic *lawc* gene promoter by small dsRNA in *Drosophila* S2 cells // the 58th Annual *Drosophila* Research Conference. FULL ABSTRACTS BOOK. USA. San Diedo. In press.
15. *Vorontsova J., Cherezov R. and Simonova O.* The effect of TBP related factor 2 on chromocenter formation and chromosome segregation in *Drosophila melanogaster* // глава в книге "Chromosomal Abnormalities", изд: InTechOpen. Book edited by M.L. Larramendy and S. Soloneski. In press. ISBN 978-953-51-5223-1.

РАЗДЕЛ 2 Роль новых нейроспецифических эволюционно-консервативных транскрипционных факторов семейства *d4* в сигнальных путях, контролирующих морфогенез.

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Группа новых нейроспецифических генов, относящихся к эволюционно-консервативному семейству *d4* впервые была выявлена и охарактеризована нами. У всех изученных видов позвоночных животных это семейство представлено тремя генами: *neuro -d4/DPF1*, *ubid4/Requiem/DPF2* и *cer-d4/DPF3*. Все гены этого семейства экспрессируются в зародышевой ЦНС у высших позвоночных и беспозвоночных животных и кодируют уникальные структурные домены (2/3 и *d4*), характерные только для данной группы генов. Нами впервые была показана нейроспецифическая картина экспрессии генов семейства *d4* в эмбриональном периоде развития мыши и дрозофилы [1-3]. Гены семейства *d4* кодируют транскрипционные факторы, которые взаимодействуют с SWI/SNF хроматин-ремоделлирующими комплексами позвоночных [4]. Экспрессия генов семейства *d4* чрезвычайно сложна: различные транскрипты мРНК синтезируются с нескольких альтернативных промоторов и кодируют белки как с двумя характерными доменами, так и только с одним из них. Нами была выбрана дрозофила как основное модельное животное для изучения функции генов семейства *d4*, был получен нокаут по гену *dd4* – единственного гомолога генов семейства *d4* позвоночных, кодирующего белок с характерным доменом *d4*. Другой ген семейства, *tth* дрозофилы [5], кодирует белок без С-концевого домена и возможно является гомологом единственного сплайс-варианта мРНК гена *Cer-d4/DPF3* позвоночных, кодирующего белок без С-концевого домена *d4*. Нами было показано, что этот белок может локализоваться в цитоплазме, и в определенные периоды индивидуального развития транспортироваться в ядро, возможно гормонально-зависимым путем. Был получен нокаут гена *tth* и изучены последствия дисфункции данного гена семейства *d4*, его влияние на развитие и функционирование нервной системы дрозофилы. Возможным результатом данной работы будет открытие нового сигнального пути регуляции развития насекомых и позвоночных или установление места данных белковых факторов в каскаде известных сигнальных путей.

2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе мы использовали метод индуцированной в герминативных клетках дрозофилы гомологичной рекомбинации, разработанный К. Golic [6]. Данный метод был успешно опробован в нашей лаборатории при получении нокаута гена *d4* дрозофилы. На нынешнем этапе мы успешно получили нокаут гена *tth*. Эффективность составила 1 случай на 2000 опытов. С целью уменьшения количества опытных скрещиваний нами были использованы генетические маркеры для отслеживания транслокации нокаутной конструкции на целевую хромосому. Это позволило

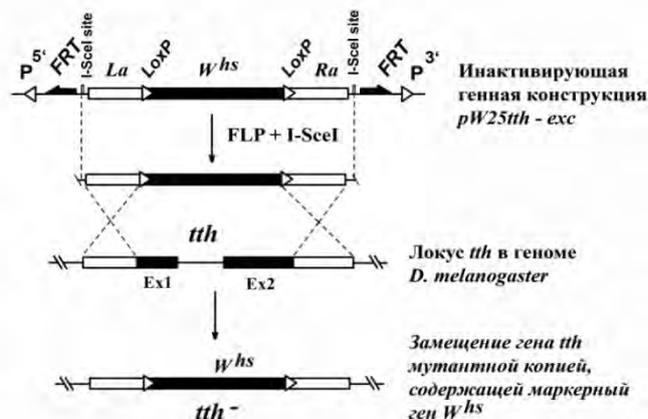
анализировать опытные особи не индивидуально, а в массовых скрещиваниях (по 10-20 особей). Результатом нашего нововведения является снижение трудоемкости метода на порядок. В настоящее время существует 4 вида производства нокаутов или нулевых мутаций у эукариот: (1) гомологичная рекомбинация с конструкцией, имеющей делецию целевого гена, (2) высокоэффективная гомологичная рекомбинация вызываемая разрывом мДНК в заданном месте искусственно-созданными химерными рестриктазами zinc-finger nucleases (ZFNs) или (3) transcription activator-like effector nucleases (TALENs), (4) CRISPR/Cas9 система редактирования ДНК. Простой нокаут с помощью гомологичной рекомбинации имеет разную степень эффективности, которая зависит от структуры ДНК в заданном районе. Три другие метода, особенно CRISPR/Cas9 на несколько порядков эффективнее [7], однако имеют побочный эффект в виде негомологичного соединения концов (non homologous end-joining), сопровождающийся небольшими инсерциями или делециями. Из-за использования небольших участков гомологии, необходимых для CRISPR/Cas9 метода, трудно подобрать целевую последовательность, которая не имеет гомологии в других участках генома. Результатом неправильного выбора последовательности может стать множественное нецелевое редактирование генома.

Использованы современные методы иммуногистохимии, ПЦР в реальном времени, конфокальной микроскопии, Вестерн-блот анализ, Нозерн-блот анализ. Поликлональные антитела против белка ТТН были получены с помощью иммунизации кроликов рекомбинантным белком. Рекомбинантный белок, представляющий из себя последовательность 71 С-концевых а.к. остатков ТТН дрозофилы был получен в бактериальной системе экспрессии E.coli. Антитела были афинно-очищены с помощью колонки, синтезированной на основе эпокси-активированной сефарозы 4В (GE healthcare) и конъюгированного с ней рекомбинантного белка ТТН.

2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение направленной мутации гена *tth* дрозофилы. С помощью метода микроинъекций плаزمиды pW25*tth-exc*, содержащая маркерный ген *mini-white* была встроена в геном дрозофил линии w1118 и были получены трансгенные линии, содержащие данный конструкт. Встроенная конструкция содержит сайты FRT и I-SceI. Для того чтобы активировать вырезание конструкции из генома по этим сайтам было поставлено скрещивание: 10 пробирок, в каждой 5 самцов генотипа: w1118; p{w⁺; tth-exc}/+ скрещиваем с 15 самками: w1118; {70FLP}{70I-SceI}/TM3, Ser потомство было подвергнуто тепловому шоку на 3-й день развития для активизации экспрессии ферментов FLP и I-SceI. 2000 особей генотипа w1118; {70FLP}{70I-SceI}/ p{w⁺; tth-exc} с мозаичным окрашиванием глаз были скрещены с особями линии w1118. Отобранные по маркеру w⁺ 200 особей в потомстве были исследованы с помощью анализирующих скрещиваний для определения хромосомной локализации маркера w⁺. В результате были отобраны 4 клона, в

геноме которых произошло изменение хромосомной локализации маркера *w+*. С помощью ПЦР анализа геномной ДНК со специфическими праймерами мы обнаружили правильно прошедшую гомологичную рекомбинацию. В результате рекомбинации нормальная копии гена *tth* была



заменена на мутантную, несущую маркер *w+* (рис. 1).

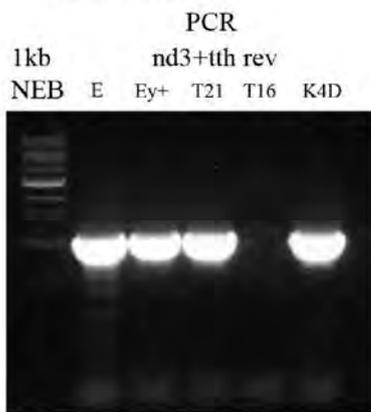
Рисунок 1.1 Генетическая конструкция для направленного мутагенеза гена *tth* и принцип ее работы.

Генетическая конструкция на основе вектора *pW25* (*pW25tth-exc*) после Р-элемент-зависимой трансформации встраивается случайным образом в геном реципиентов, дефектных по гену

white.

После успешного перевода в гомозиготное состояние, с помощью ПЦР была доказана делеция кодирующей области *tth* (рис. 2). Анализ фенотипа нокаутных особей показал отсутствие внешних морфологических изменений. Поведенческие реакции и реакции на раздражители основательно не исследовались. Однако было обнаружено, что на эмбриональной стадии происходит высокая смертность, которая достигает 50%. Локус гена *tth* расположен на X-хромосоме в месте скопления большого количества генов: на участке ДНК в 10 т.п.о. помимо *tth* располагается еще 5 генов. Соседние гены: *BthD* перекрывается с 3' конца в противоположном направлении, расстояние до гена *CG11176* с 5' конца составляет 0,5 т.п.н. (рис. 3).

primers: nd3 570-580
nd2 380-390
nd1 180-190
Tth rev 1640-1650



Candidates for *tth* KO

Рисунок 2.2 - Доказательство отсутствия кодирующей последовательности *tth* в линии T16 (ПЦР праймеры *nd3* и *tth rev*).

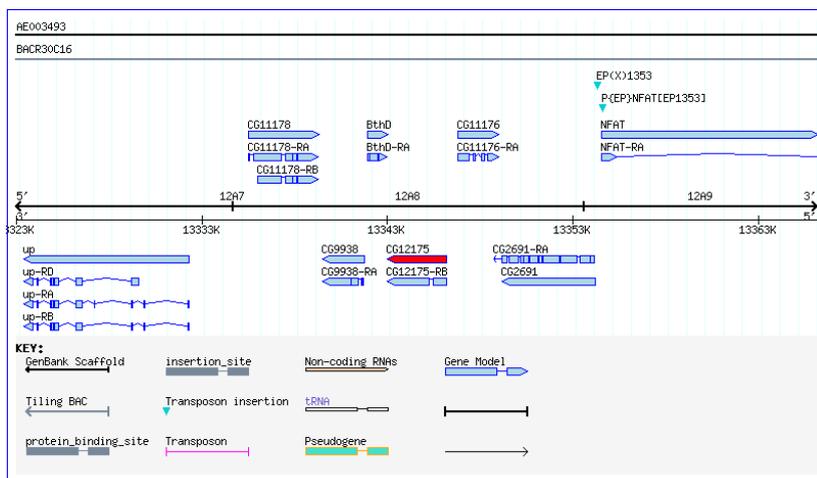


Рисунок 2.3 - Локус гена *tth* (CG12175). Кодирующая область выделена красным.

С помощью ПЦР в реальном времени мы показали, что экспрессия соседних генов в исходной линии $w^{1118}; p\{w+; tth\text{-exc}\}/+$ и мутантной по *tth* линии T16 происходит на одинаковом уровне. Таким образом мы доказали, что замещение *tth* на *miniwhite* не нарушает регуляторные области локуса.

Для исследования функций гена *tth* в нервной системе *Drosophila melanogaster*, необходимо было сделать эту ткань доступной для визуального анализа. Мы использовали технику двухкомпонентной системы GAL4/UAS. Данная система позволяет экспрессировать любой ген, находящийся под контролем элемента UAS, в любой клетке или ткани организма через подбор драйверов, тканеспецифически экспрессирующих белок GAL4. Если совместить в одном геноме GAL4-драйвер, экспрессирующийся в нервной системе, и респондер UAS-GFP, то зелёный флуоресцентный белок GFP будет нарабатываться в нервных клетках, обеспечивая визуализацию нервной системы дрозофил любой стадии развития под флуоресцентном микроскопом.

Поскольку целью нашей работы было исследовать нервную систему мутантных мух, несущих нулевой аллель интересующего гена (*tth*), возникла необходимость совместить ген-респондер UAS-GFP и конструкцию, экспрессирующую белок GAL4 в нервной системе, в геноме мух *tth*-. В лаборатории эти три линии (драйвер, респондер и *tth*-мутанты) поддерживались отдельно. В качестве линии-драйвера мы использовали линию, экспрессирующую белок GAL4 под промотором гена *Elav brain* (*Elav-GAL4*). Следующей задачей стало совмещение трёх генетических компонентов (драйвер, респондер и мутация) в одном геноме.

Дрозофилы линии-драйвера несли драйвер *Elav-GAL4* во второй хромосоме в балансированном виде, поскольку гомозиготные по *Elav-GAL4* особи не выживают. Дрозофилы

линии-респондера несли конструкцию UAS-GFP в третьей хромосоме. Мутация $tth\{w+\}$ локализуется в первой (половой) X-хромосоме. Получить совмещение трёх компонентов в одном геноме ($tth\{w+\}$; $Elav-GAL4/+$; $UAS-GFP/+$) путём одного скрещивания невозможно. Поэтому для получения желаемой линии мы решили разбить нашу задачу на 2 подзадачи:

1) синтезировать линию, гомозиготную по $tth\{w+\}$ и несущую драйвер $Elav-GAL4/+$ - линию $tth\{w+\}$; $Elav-GAL4/+$.

2) синтезировать линию, гомозиготную по $tth\{w+\}$ и несущую респондер $UAS-GFP$ - линию $tth\{w+\}$; $UAS-GFP$.

В результате проделанной работы были получены линии следующего генотипа:

1. tth^- ; $Elav-GAL4/Cy$
2. tth^- ; $TM6B, Tb, Nu/UAS-GFP$

Чтобы получить окончательный вариант с желаемым генотипом tth^- ; $Elav-GAL4/+$; $UAS-GFP/+$, было проведено скрещивание особей двух линий между собой (рис. 4).

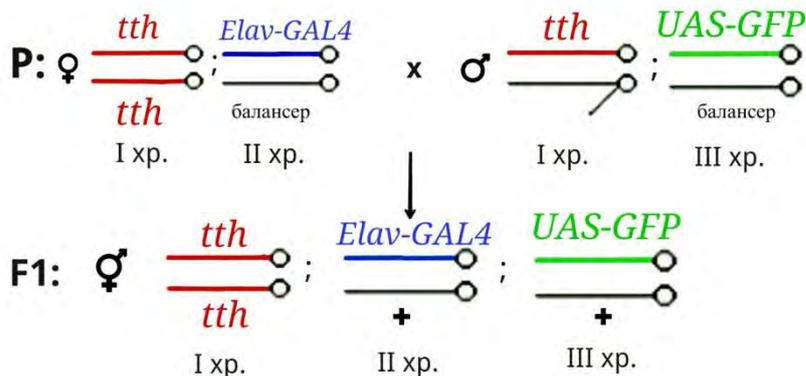


Рисунок 2.4 - Схема скрещивания для финального совмещения мутации tth с драйвером и репортером

Поскольку предварительные данные показали высокую смертность мутантных эмбрионов, мы исследовали полученное поколение с генотипом tth^- ; $Elav-GAL4/+$; $UAS-GFP/+$ на эмбриональной стадии развития. На рисунке 5 представлена нервная система эмбриона дрозофилы контрольной линии с активированной экспрессией GFP в нервной системе.

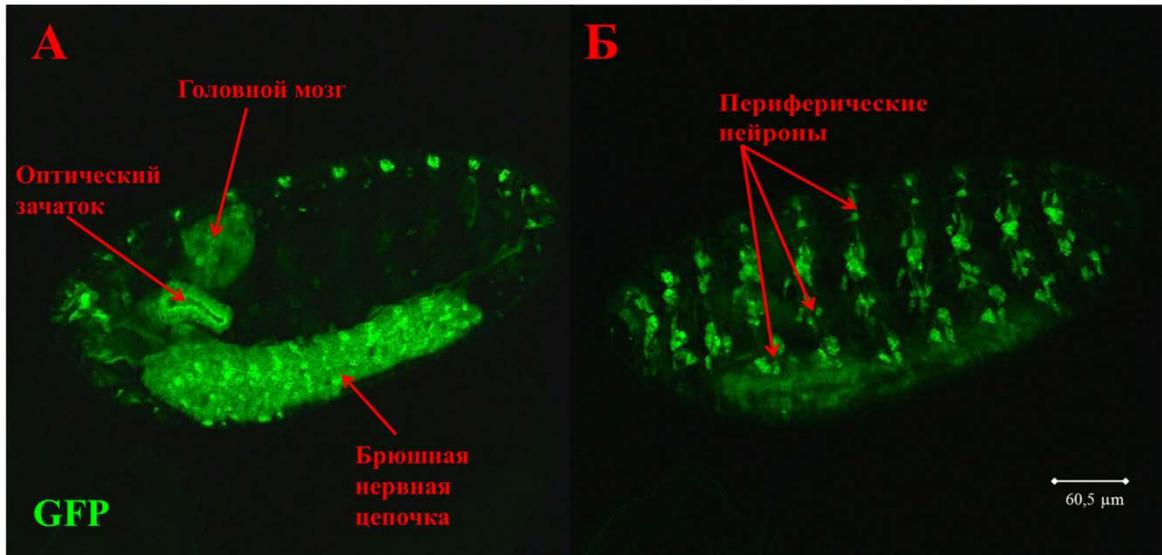


Рисунок 2.5 - Конфокальные срезы эмбриона дрозофилы под флуоресцентным микроскопом, выявляющие: А – центральную нервную систему; Б – периферическую нервную систему. Свечение GFP визуализировали «вживую».

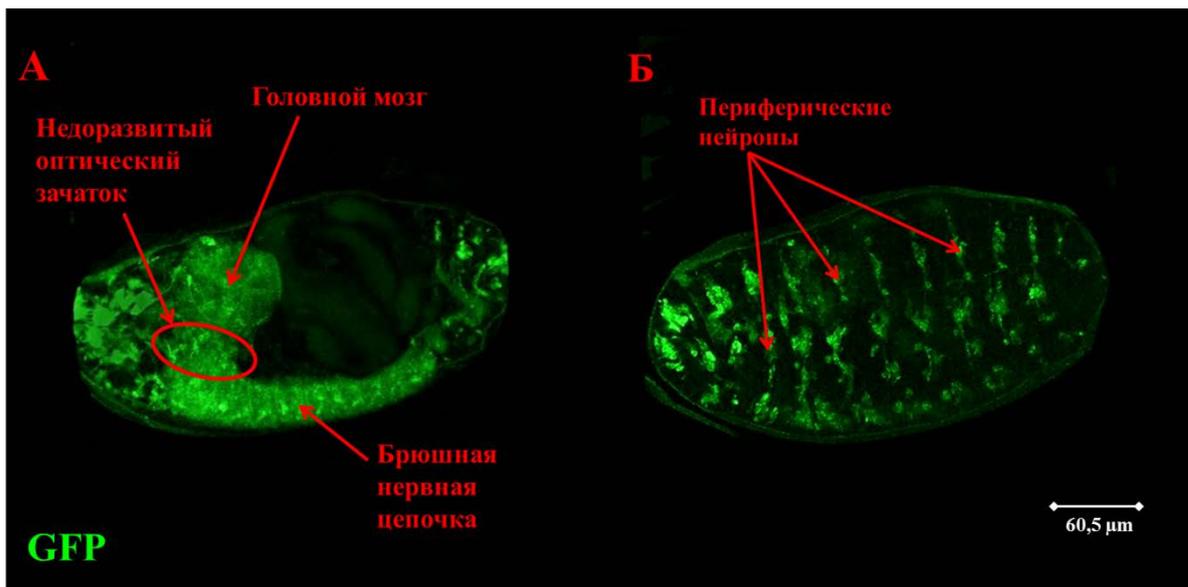


Рисунок 2.6 - Конфокальные срезы мутантного эмбриона дрозофилы под флуоресцентным микроскопом, выявляющие: А – центральную нервную систему; Б – периферическую нервную систему.

Эмбрион имеет нормальную копию гена *tth* и совмещённые в её геноме конструкции драйвера и репортера: *uw+*; *Elav-GAL4/+*; *UAS-GFP*. Нервная система эмбриона имеет нормальную морфологию. Видны нормальные структуры мозга. Хорошо виден оптический зачаток, из которого впоследствии развиваются оптические доли мозга, ответственные за зрительные функции глаза, а также брюшная нервная цепочка.

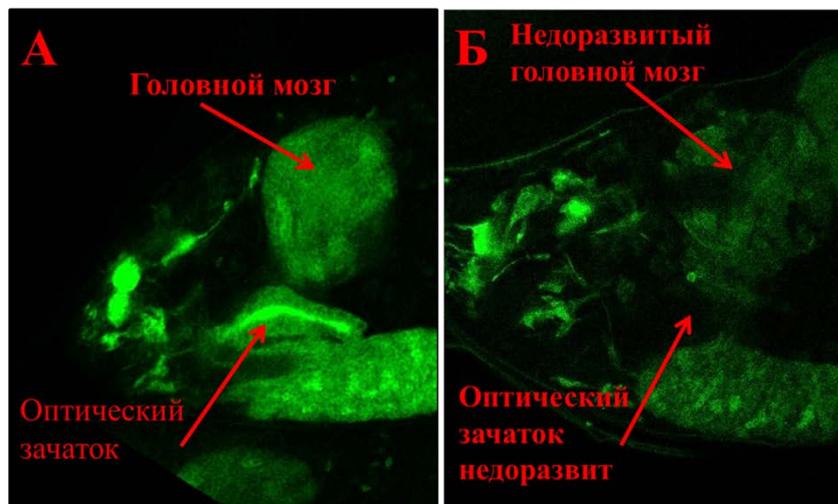


Рисунок 2.7 - Конфокальные срезы эмбрионов дрозофилы под флуоресцентным микроскопом, показывающие: А - головной мозг и оптический зачаток мух дикого типа; Б - головной мозг и оптический зачаток мутантных особей.

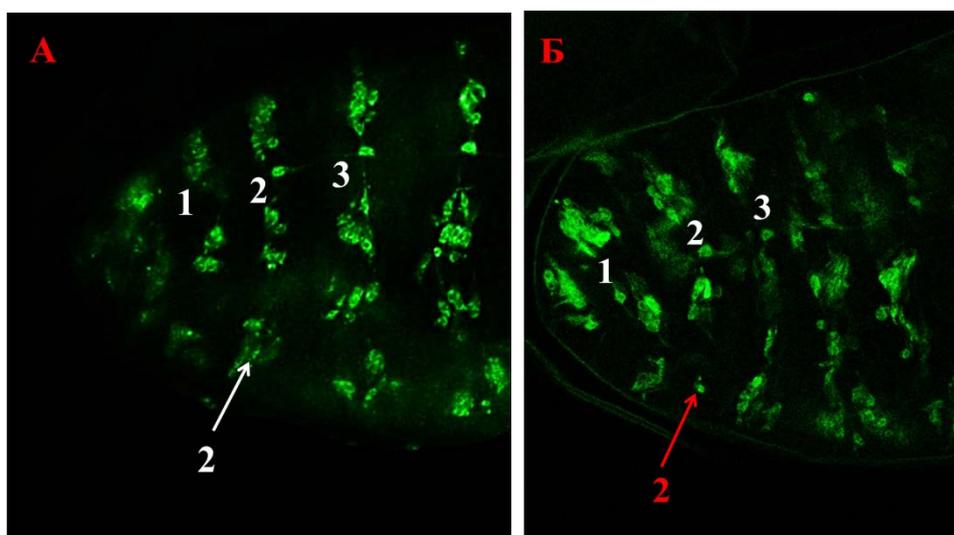


Рисунок 2.8 - Конфокальные срезы эмбрионов дрозофилы под флуоресцентным микроскопом, показывающие: А - периферическую систему мух дикого типа; Б - периферическую систему мутантных особей с нарушением. (Цифрами обозначены цепочки нейронов отдельных сегментов, красной стрелкой – недоразвитая группа нейронов).

Периферические нейроны также имеют нормальную морфологию. После получения необходимых линий, мы скрестили мух этих линий между собой (Рис. 4) и провели сбор суточных эмбрионов *tth⁻; Elav-GAL4/+; UAS-GFP/+*. Далее сделали сканирование нервной системы с помощью конфокального микроскопа. На photographs видно, что структуры мозга эмбриона имеют нарушения (Рис. 6., 7). Оптический зачаток недоразвит, возможно, имеет однослойную структуру. Периферическая нервная система дезорганизована (Рис. 8). Видно недоразвитие

отдельных групп нейронов второго сегмента (стрелка на рисунке 8 Б). Таким образом, мы получили предварительные данные, позволяющие сказать, что функция гена *tth* связана с развитием нервной системы на эмбриональной стадии. Так как ген *tth* кодирует только домен 2/3, характерный для белков семейства d4, то можно предположить, что именно этот домен определяет функцию генов семейства d4 в нервной системе.

Ранее нами были получены два типа поликлональных антител кролика к белку ТТН: анти-белковые Ab71 и анти-пептидные M6 AF. С помощью сравнительного Вестерн-блот анализа белковых экстрактов из мутантных по *tth* линий и линии «дикого типа» Oregon-R были отобраны специфические антитела Ab71 для анализа картины экспрессии ТТН (рис. 9)

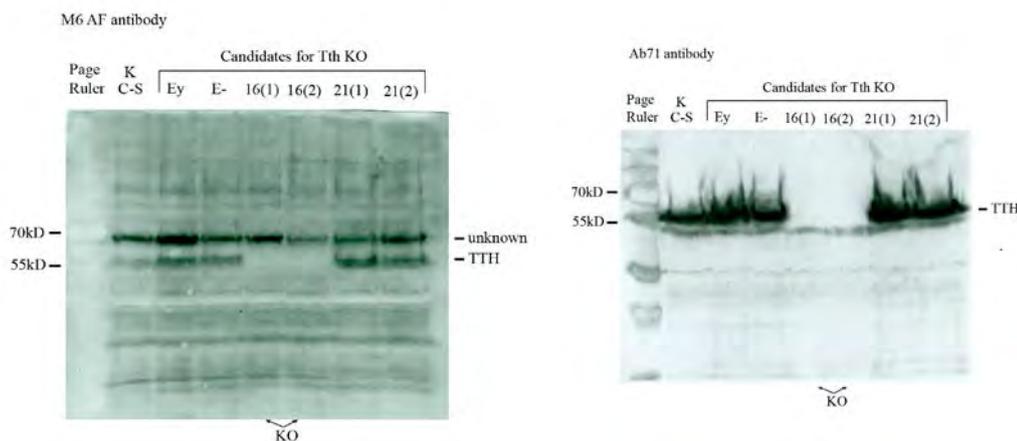


Рисунок 2.9 - Определение специфичности антител к ТТН. Левый рисунок – вестерн блот анализ нокаутных линий 16(1) и 16(2), и также линий-кандидатов на нокаут с анти-пептидными антителами M6 AF. Правый рисунок – вестерн блот анализ тех же линий с анти-белковыми антителами Ab71.

Антитела Ab71 обладают высокой специфичностью к белку ТТН, низким фоном и способностью окрашивать белок в иммунофлюоресцентных экспериментах (рис. 10). Как оказалось, другие антитела, M6 AF, узнают наряду с ТТН и другой, неизвестный белок. На рисунке 10 представлено иммунофлюоресцентное окрашивание эмбрионов и имагинальных дисков и мозга личинок Oregon-R. Оказалось, что ТТН локализуется в ядрах, экспрессия белка обнаружена на всех стадиях развития эмбриона, начиная со стадии прецеллюлярной бластодермы, стадии гаструляции и до 17 стадии формирования зародышевых органов (анализ структур проводили по: [8]).

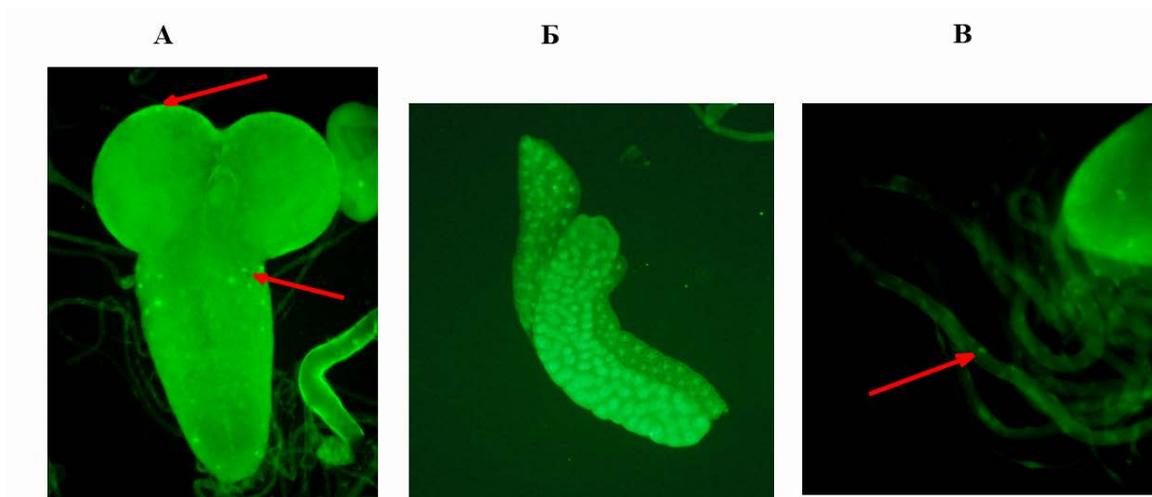


Рисунок 2.10 - Анализ картины экспрессии ТТН в тканях личинок дрозофилы. А-мозг, Б- слюнные железы, В-аксональные пучки. Стрелками показано окрашивание ТТН в ядрах. (Alexa fluor 488)

Предварительный анализ картины экспрессии ТТН в тканях личинок дрозофилы показал, что белок локализован в ядрах преимущественно глиальных клеток, а также слюнных желез и оптических долей мозга

Анализ мРНК различных стадий развития дрозофилы с помощью ПЦР с праймерами, специфичными для транскриптов синтезируемых с двух альтернативных промоторов показал, что один транскрипт «дальнего промотора» характерен только для эмбриональной стадии, два другие представлены на всех стадиях развития дрозофилы. мРНК, синтезируемые с «ближнего» промотора, экспрессируются на всех стадиях развития.

2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы получили предварительные данные, позволяющие охарактеризовать функцию гена *toothrin*. Эта функция связана с развитием нервной системы на эмбриональной стадии. Так как ген *toothrin* кодирует домен 2/3, характерный для белков семейства *d4*, то логично предположить, что этот именно домен отвечает за функционирование генов семейства *d4* в нервной системе. В заключение стоит отметить, что в недавних зарубежных исследованиях было показано, что белки семейства D4 могут входить в состав BAF-комплексов (SWI/SNF хроматин-ремоделирующих комплексов позвоночных) и выступают в качестве регуляторов транскрипции [4].

Было также показано, что d4-изоформа *Cer-d4/Dpf3* участвует в развитии сердечной мышцы и скелетной мускулатуры. Дисфункция гена приводит к морфологическим нарушениям в сердце, а также дезорганизации миофибрилл сердечной мышцы и скелетной мускулатуры [9].

Ранее в нашей лаборатории были выполнены эксперименты по нокдауну 2-х генов-ортологов (*drosophila-d4* и *toothrin*) дрозофилы с помощью РНК-интерференции, и были получены доминантно-негативные фенотипы исследованных особей, характерные при нарушениях функции генов, вовлеченных в Notch- и EGFR-сигнальные пути развития. Было обнаружено, что нокдаун по генам *dd4* и *tth* по-разному влияет на проявление тестовой мутации с нарушениями, характерными для Notch-сигнального пути: недостаток экспрессии *tth* снижает проявление мутации, т.е. супрессирует ее, в то время как недостаток экспрессии *dd4* усиливает проявление мутации (О.Б. Симонова, И.Б. Мерцалов, неопубл.). Эти факты, возможно, свидетельствуют о том, что гены *dd4* и *tth* являются антагонистами и вовлечены в процессы, контролируемые Notch-сигнальным путем. Хорошо известно, что Notch-путь контролирует дифференцировку клеток по нейральному типу развития. Возможно, нарушения в нервной системе, выявленные в нашей работе, отражают нарушения этого сигнального пути.

Все эти данные свидетельствуют о несомненной важности изучаемой нами группы генов для функционирования определенных клеток, однако роль этих генов в индивидуальном развитии организма и отдельных его органов и тканей, в частности нервной ткани, до сих пор остается неясной. Однако, исходя из сравнения, сделанного нами, паттернов экспрессии белка GFP мух дикого типа и мутантных мух, можно сказать, что гены семейства *d4* играют важную роль в формировании центральной и периферической нервной системы эмбриона дрозофилы.

2.5 ССЫЛКИ

1. *Mertsalov, I.B., Kulikova, D.A., Alimova-Kost, M.V. et al. // Mammalian Genome. – 2000. – V. 11(1). – P. 72-74.*
2. *Ninkina, N.N., Mertsalov, I.B., Kulikova, D.A. et al. // Mamm Genome. – 2001. – V. 12(11). – P. 862-866.*
3. *Nabirochkina, E.N., Simonova, O.B., Mertsalov, I.B. et al. // Mech Dev. – 2002. - V. 114. – P. 119-123.*
5. *Simonova, O.B., Kulikova, D.A., Mertsalov, I.B. et al. // Genetika. – 2005. – V. 41 – P. 196-202.*
4. *Lessard J., Wu J. et al. // Neuron. – 2007. - V. 55. - P. 201-215.*
6. *Gong W.J.I., Golic K.G. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2003. - V. 100 - P. 2556-2561.*
7. *Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL. // Cell Rep. - 2013. - V. 4 – P. 220-228.*
8. *Atlas of Drosophila Development by Volker Hartenstein, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.*
9. *Lange M., Kaynak B., Forster U.B. Tonjes M. et al. // Genes Dev. – 2008. - V. 22. - P. 2370-2384.*

2.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

- 1 *Куликова Д.А., Мерцалов И.Б., Симонова О.Б. Гены семейства *d4* позвоночных животных: структурная организация и экспрессия // Онтогенез. 2013. Т.44. №1 С. 3-9.*

- 2 Куликова Д.А., Мерцалов И.Б., Симонова О.Б. Особенности локализации белка ТТН в эмбрионах дрозофилы и клеточной линии Шнайдер S2 // XXV-я Российская конференция по электронной микроскопии. Черноголовка. 2-6 июня. 2014. Тезисы докладов. Т.2. С. 604-605.
- 3 Mertsalov I.B., Novikov B.N., Scott H., Dangott L., Panin V.M. Characterization of Drosophila CMP-sialic acid synthetase activity reveals unusual enzymatic properties // Biochem J. 2016. V. 473(13). P. 1905-1916. doi: 10.1042/BCJ20160347. Epub 2016 Apr 25
- 4 Mertsalov I., Kulikova D., Cherezov R., **Simonova O.** Expression of *d4* and *tth* genes during *Drosophila* development // the 58th Annual Drosophila Research Conference. FULL ABSTRACTS BOOK. USA. San Diedo. In press.

РАЗДЕЛ 3 Эволюционно-морфогенетический потенциал стресс-индуцибельных систем

3.1 ВВЕДЕНИЕ

Стресс, как совокупность всех неспецифических изменений, возникающих под влиянием сильных воздействий, является важным инструментом эволюции, совершающейся в экстремальной среде, выступая в роли, как фактора отбора, так и своеобразного генератора изменчивости, что способствует созданию более совершенных организмов, обладающих новыми адаптивными возможностями. Однако, механизмы, определяющие зависимость морфогенетических процессов от уровня экспрессии генов, вовлеченных в системы реагирования организмов на воздействия различных видов стресса, изучено недостаточно. В нашей работе мы использовали гипоморфные мутации высоко консервативных генов дрозофилы, контролирующих морфогенетические процессы и системы реагирования на воздействия токсических и температурных факторов. В первую очередь использовали линии мух, мутантных по генам транскрипционных факторов *spineless(ss)*, *Distal-less (Dll)*, *lawc/Trf2* и шаперонов *CG5017* и *hsp70*. Ген – *ss* является гомологом диоксинового рецептора (AHR) млекопитающих, играющего ключевую роль в реакциях на воздействие различных токсинов. Ген – *Dll* определяет развитие конечностей насекомых. Ген – *lawc* кодирует базовый транскрипционный фактор *Trf2*. Ген - *hsp70* кодирует важный белок теплового шока. Ген -*CG5017* кодирует нуклеотропный шаперон. Эти гены эволюционно консервативны, их мутации в своём фенотипическом проявлении в значительной степени перекрываются. Это позволяет предполагать их широкое взаимодействие в процессе развития, а их полиморфизм содержит важный адаптационный и эволюционный потенциал. Уровень экспрессии изучаемых генов модулировался оригинальными генетическими методиками, специально созданными для работы с дрозофилой, позволяющими тканеспецифично манипулировать генной экспрессией. Изменение уровня экспрессии изучаемых генов при их взаимодействии и степень их влияния на морфогенез внутренних органов, нервных структур и экзоскелета регистрировался современными иммуногистологическими и оптическими методами. Учитывая то, что используемые нами гены высоко консервативны, а модуляция их экспрессии приводит к формированию структур характерных для организмов, адаптированных к различным экологическим нишам и уровням эволюционной организации, то понимание механизмов их взаимодействия имеет дополнительное эволюционно историческое значение.

3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*. В работе использовали мутантные (*ssaSc*, *ssa40a*, *milkah-1*, *ssa40a*) и дикую (Canton S) линии мух *Drosophila melanogaster*. Совмещение в одном геноме мутаций по исследуемым генам проводили

генетическими методами с использованием уникальных линий с балансерными хромосомами и с помощью генетической рекомбинации. Специфическую инактивацию экспрессии TRF2 в клетках антенных и ножных имагинальных дисков проводили, используя механизм РНК-интерференции [1]. Оценку токсического действия ионизирующего излучения на развитие дистальных структур конечностей *Drosophila melanogaster* осуществляли при помощи рентгеновского облучения. В качестве источника облучения была использована рентгеновская установка РУМ-17. В экспериментах по изучению токсического действия ионизирующего излучения на развитие дистальных структур конечностей мух, сочетающих в своём геноме мутации в локусах – *ss-* и *CG5017*-генов использовали среду (Carolina Biological Supply – Formula 4-24). Личинки и мухи содержались при комнатной температуре ~ 23°C. Личинок облучали рентгеновскими лучами во второй половине третьего личиночного возраста. После прохождения метаморфоза, всех имаго собрали, фиксировали в этиловом спирте и анализировали структуры конечностей, оценивая степень трансформации аристы в тарзус и количество тарзальных сегментов на ногах. Влияние ионизирующего излучения на уровень транскрипции *CYP6 G1-* и *CG1681*-генов оценивали на стадии имаго *Drosophila melanogaster*. Для этого ~60 самцов на второй день после вылета из пупария облучали на рентгеновской установке РУМ-17. Доза облучения на используемой нами установке зависит от времени облучения и расстояния от излучателя до облучаемого объекта. Её точность вполне удовлетворяет условиям эксперимента, когда необходимая доза исчисляется сотнями R. При необходимости использования малых доз, возникают сомнения в их воспроизводимости и правильной оценке. Основанием для них послужили так же результаты оценки действия излучения на развитие конечностей имаго.

Облучение дозами 1R и 10R имели сходные последствия, при их визуальной оценке. Поэтому в целях получения универсальной оценки влияния облучения на уровень транскрипции *CYP6 G1-* и *CG1681*-генов, при его инструментальной оценке, мы посчитали более правильным использовать два режима облучения. При первом режиме мух облучали 15 секунд, на расстоянии 47 см. при втором -60 секунд на расстоянии 74 см. Через 6-7 часов после облучения их замораживали в жидком азоте и выделяли тотальную РНК (тотРНК) при помощи реактива TRI® Reagent («Sigma», США) согласно протоколу фирмы-производителя. Для исключения контаминации образцов геномной ДНК, тотальную РНК подвергали ферментативной обработке ферментом ДНКазы I («Ambion», США). Синтез кДНК проводили на 1-5 мкг тотальной РНК, используя набор реактивов для синтеза кДНК с олиго-dT праймером («Thermo scientific», США). Уровень экспрессии *CYP6 G1-* и *CG1681*-генов оценивали методом ПЦР в реальном времени (ДНК-амплификатор ABI Prizm 7500, «AppliedBiosystem», США), используя набор реактивов («Синтол», Россия), специфических праймеров и зондов TaqMan® («Синтол», Россия). Реакции

проводили в режиме относительных измерений (программное обеспечение RQ-relative quantification, Applied Biosystems, США).

Результаты PCR в реальном времени анализировали с помощью программного обеспечения ABI Prism 7500 SDS Software Version 2.0.3 (Applied Biosystems, США). Статистическую значимость различий между экспериментальными и контрольными пробами оценивали при помощи программного обеспечения REST software (Qiagen, США). Для нормализации ПЦР в качестве эндогенного контроля использовали ген RpL32. Для амплификации использовали следующие пары праймеров и зонды: для гена RpL32 праймеры RpL32dir 5'-CCAGCATACAGGCCCAAGATC-3', RpL32rev 5'-ACGCACTCTGTTGTCGATACC-3', зонд - FAM-CGCACCAAGCACTTCATCCGCCAC-BHQ1; для гена Cyp6g1 праймеры Cyp6g1f 5'-GCGATCCATTGGGCTATAAT-3', Cyp6g1r 5'-CCAATCTCCTGCATAAGGGT-3', зонд - FAMTCGCACCAAGCTGACTCCCG-BHQ1; для гена CG1681 (GST-theta) праймеры CG1681f 5'-TTCGCACCCACTCTAGTCAC-3', CG1681r 5'-GCTCGATTGGTTCAGGAAAT-3', зонд - FAM-TCAACGAGATGTCGCAGCCACTC. Сравнительный анализ экспрессии исследуемых генов проводили методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR) с использованием зондов, меченных флуоресцентными красителями (зонды TaqMan®). Праймеры подбирались из транскрибуемых областей исследуемых генов. В качестве эндогенного контроля использовался ген рибосомального белка RpL19. Для каждого образца и эндогенного контроля осуществлялась амплификация трех репликатов.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что усиленный мутантный фенотип мух линии - ssaSc определяется наличием в ней мутантных ss- и CG5017-локусов [2-3]. Вместе с тем происхождение мух линии ssaSc оставляло возможным участие в формировании мутантного фенотипа и других мутантных генов, ускользающих от выявления используемыми в работе методами. Для снятия такого рода сомнений, необходимо было независимым путём получить мух, сочетающих в своём геноме мутации в ss- и CG5017-локусах. Для этого мы воспользовались независимо полученной мутантной по CG5017-локусу линией мух milkah-1 (D0283), не имеющих морфологического выражения, но отличающихся нарушенной долговременной памятью [4]. Мутантный аллель этой линии был введён нами в специально отобранную, гипоморфную линию мух ssa40ahm (рис. 1). Мухи линии ssa40ahm отличаются от мух исходной линии ssa40a менее выраженной трансформацией дистальных частей антенны в тарзус. В результате скрещиваний мы получили гибридных мух ssa40ahm-milkah-1. Полученные гибридные мухи ssa40ah-milkah-1 отличаются от исходной линии ssa40ahm резко усиленным проявлением мутантного ss-фенотипа, полностью совпадающим с фенотипом мух

ssaSc. Это подтверждает предположение о взаимодействии ss- и CG5017-генов в процессе регуляции морфогенеза конечностей у дрозофилы.

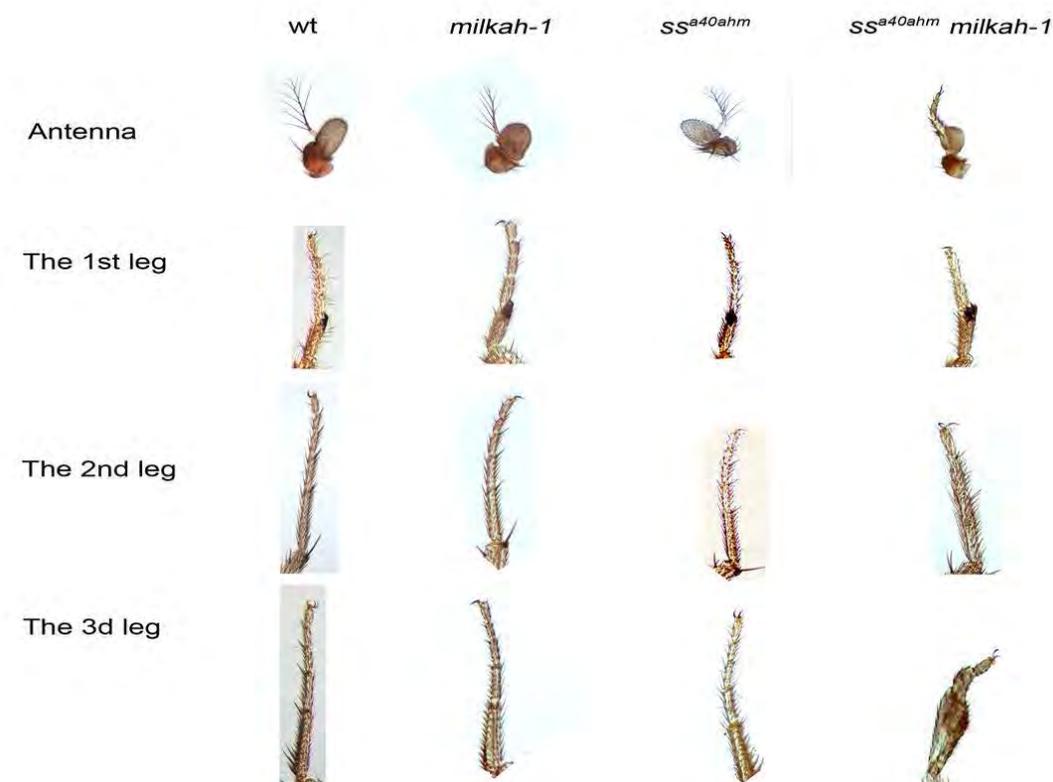


Рисунок 3.1 -Фенотип антенны и конечностей. Фотографии показывают нормальную морфологию тарзальных структур мух дикого типа *type Canton S* и мутантов *ssa40ahm* и *milkah-1*. Дистальные сегменты антенны – ариста мух *ssa40ahm* – увеличены в проксимальном сегменте. Ариста мух *ssa40ahmmilkah-1* сильно трансформирована в тарзус. Тарзальные структуры конечностей мух *ssa40ahmmilkah-1* демонстрируют слияние сегментов.

Результаты исследований продемонстрировали синергические взаимодействия гипоморфных мутаций ss- и CG5017-генов. Это подтверждает предположение о взаимодействии ss- и CG5017-генов в процессе регуляции морфогенеза у дрозофилы. Учитывая молекулярно-функциональные особенности продуктов генов ss и CG5017 (белок SS - транскрипционный фактор, а белок гена CG5017 - нуклеотропный шаперон), проявление их взаимодействия вполне логично. Вместе с тем возникает вопрос о возможности их синергического взаимодействия по двум другим направлениям, связанным с формированием памяти и регуляцией метаболического ответа на токсические воздействия. Изучение этих вопросов важно прежде всего для понимания степени опасности воздействия малых доз ионизирующего облучения и фармацевтических веществ, способных его модифицировать, для людей обременённых гипоморфными мутациями AHR-гена.

Для оценки влияния малых доз ионизирующего облучения на морфогенез мух, носителей гипоморфных мутаций по локусам *spineless* и CG5017 мы использовали линии: Canton S (линия дикого типа); *ssa40a* (содержит мутацию в локусе *spineless*); *milkah-1* (содержит мутацию в локусе CG5017) и *ssaSc* (содержит мутации в локусах *spineless* и CG5017). При оценке влияния ионизирующего облучения нас в первую очередь интересовали малые дозы радиации. Рентгеновскому облучению подвергались личинки 3-го возраста. Была применена доза 1R - 10R и в качестве положительного контроля 500R (рис. 2).

Необходимо отметить, что ножные и антенные структуры мух мутантной линии *milkah-1* и мух дикого типа Canton S не отличаются. Анализ ножных и антенных структур имаго дикого типа Canton S и мутантов *milkah-1*, *ssa40a*, облученных в 3-ем личиночном возрасте, не обнаружил какого-либо влияния рентгеновского облучения на морфогенез их конечностей. Но облучение личинок, сочетающих в своём геноме гипоморфные мутации *ssa40a* и CG5017-гена, вызывает нарушение развития даже в малых дозах – 1-10R (рис. 2).

Учитывая высокую степень генетической гетерогенности человеческих популяций, можно предположить большую вероятность наличия в них индивидуумов сочетающих в своём геноме двух и более гипоморфных мутаций генов, вовлеченных в ответ на воздействие ионизирующего облучения. Представленные нами результаты свидетельствуют об ощутимой опасности для таких индивидуумов даже малых доз радиации, получаемых в результате флюорографического или томографического обследования, при длительных перелётах или пребывании в подвальных помещениях с повышенной концентрацией радонового газа. Вместе с тем не менее важно знать и о действии, на таких индивидуумов, радио модифицирующих фармакологических средств, зачастую применяемых параллельно или совместно с облучением. Можно ожидать, что такие организмы будут более чувствительны к фармацевтическим модификаторам действия рентгеновских лучей. В качестве примера влияния фармацевтических модификаторов действия рентгеновских лучей мы испытали производное нитрофурана – фуразидин и 5-гидрокситриптамиин (серотонин). Производные нитрофуранов можно отнести к радиосенсибилизирующим агентам, серотонин к радиопротекторам. Добавление этих веществ в кормовую среду не повлияло на морфогенез конечностей мух линий Canton S, *milkah-1* и *ssa40a*, как необлучённых, так и облучённых. Добавление в кормовую среду личинкам, сочетающим в своём геноме гипоморфные мутации генов *ssa40a* и CG5017, серотонина улучшало сегментацию их конечностей. Особенно убедительно это выглядело в сочетании с облучением. Добавление в кормовую среду личинкам, сочетающим в своём геноме гипоморфные мутации генов *ssa40a* и CG5017, фуразидина также улучшало сегментацию их конечностей. Однако, в сочетании с облучением, это вызывало гибель до 70% особей.

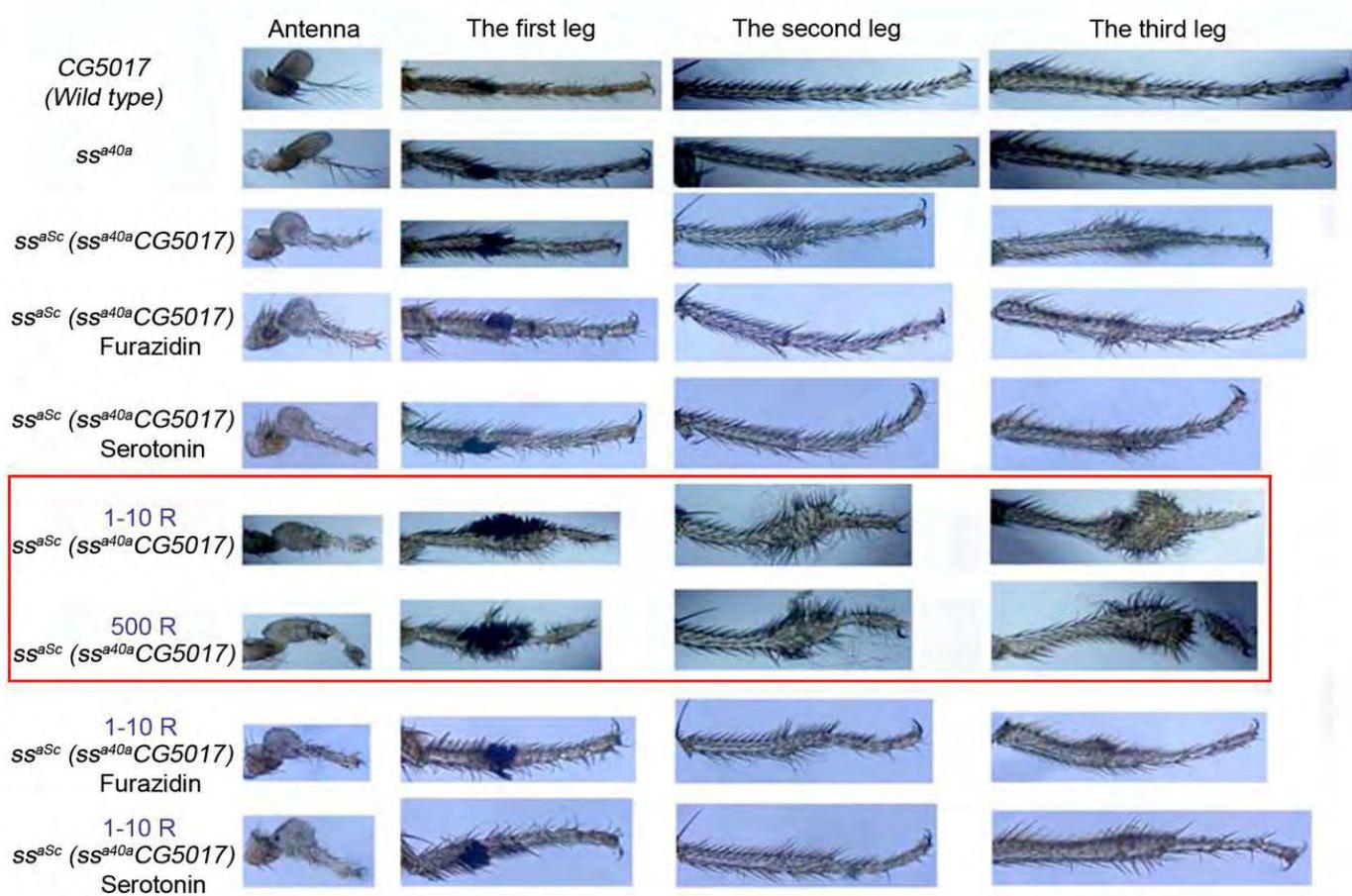


Рисунок 3.2 - Антенна и конечности мух в нормальных условиях и после облучения. Комбинация мутаций генов *ss* and *CG5017* усиливает чувствительность даже к малым дозам радиации (1-10 Рентген), что проявляется в усилении мутантного фенотипа (фотографии в красной рамке).

Другим важным показателем токсического влияния ионизирующего излучения и модифицирующих его действие фармацевтических веществ, на регулируемые АНР процессы, может служить оценка уровня экспрессии генов CYP (кодируют белки цитохром P450) и GST (кодируют белки глутатион S трансферазы). Эти гены участвуют в метаболическом ответе клеток на токсические воздействия супероксидных соединений, повышение уровня которых является основой метаболического ответа клеток на действие ионизирующего облучения. Влияние гипоморфных мутаций в локусах генов *ss* и *CG5017* на метаболический ответ мух, облучённых малыми дозами ионизирующего облучения, мы оценили при помощи метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (рис. 3).

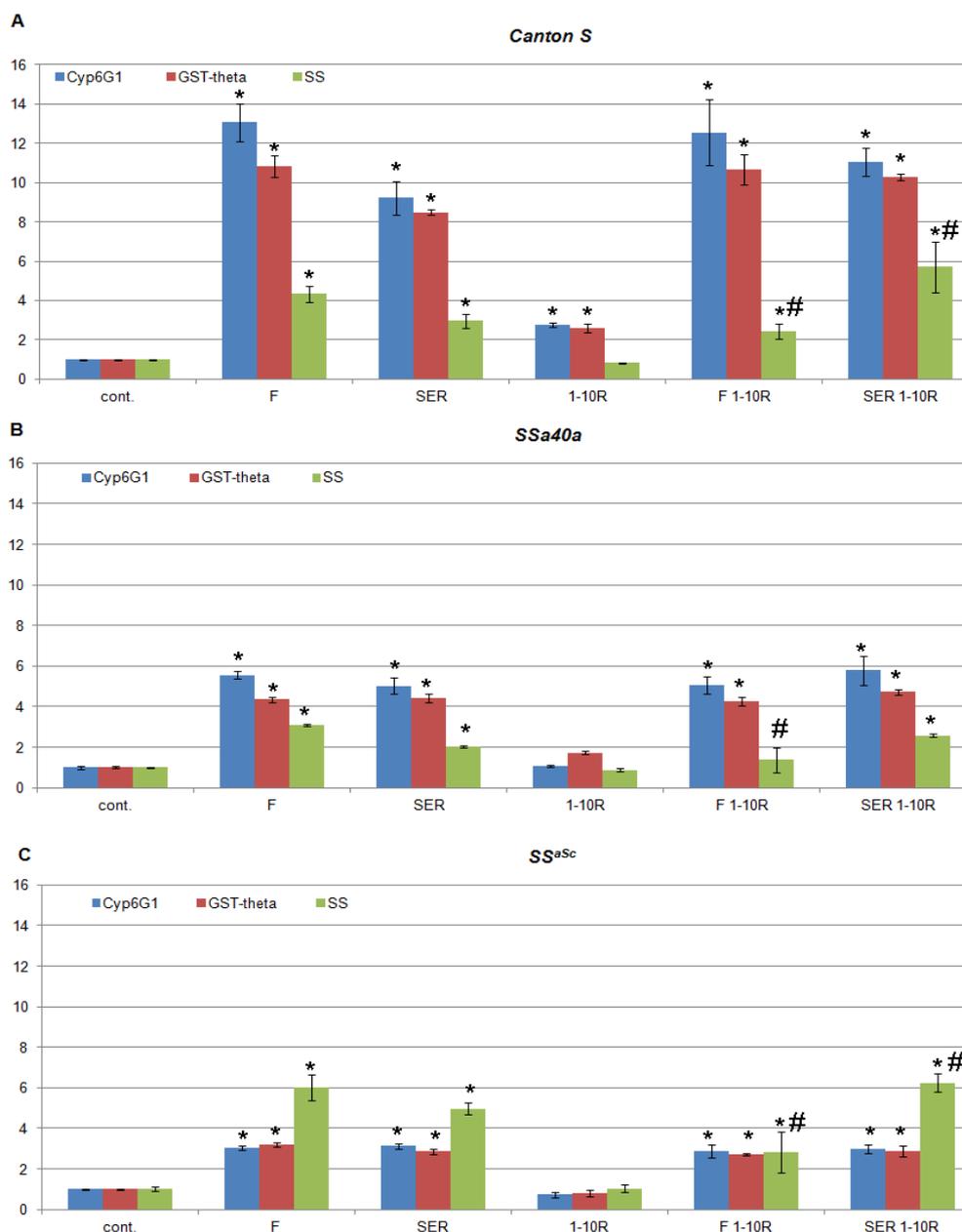


Рисунок 3.3 - Эффект радиации и фармакологических агентов на экспрессию мРНК генов *Cyp6g1*, *GST-theta* (*CG1681*) и *ss*. Относительный уровень экспрессии мРНК, измеренный ПЦР в реальном времени. А, В, С – уровень экспрессии мРНК в мухах линий *Canton S*, *ssa40a* и *ssaSc* соответственно. R - доза радиации в Рентгенах. F1-10R, SER1-10R – уровень экспрессии мРНК исследуемых генов выросших на среде с добавлением фуразидина, или серотонина и облученных 1-10 Рентген соответственно.

* - $P < 0.05$, по сравнению с контролем, # - $p < 0.05$, в сравнении с группой F или Ser .

Были оценены уровни транскрипции генов *CG1681* (относится к семейству GST) и *CYP6G1*, у взрослых самцов *Canton S*, *ssa40a*, *milkah-1* и *ssaSc*, облучённых рентгеновскими лучами. В структуре генов *CG1681* и *CYP6G1* имеются целевые, 5-и нуклеотидные мотивы

Xenobiotic Response Element (XRE) для узнавания AHR, что предполагает их зависимость от экспрессии гена *ss*. Ген *ss* также содержит в своей структуре XRE, что предполагает возможность его авторегуляции. Для оценки уровня транскрипции генов *CG1681*, *CYP6G1* и *ss* облучали мух, содержащихся на обычной среде и с добавлением фармацевтических веществ, корректирующих действие радиации, – фуразидин и серотонин. Результаты измерений уровня экспрессии *CG1681*, *CYP6G1* и *ss* у мух нормального генотипа и обремененных мутациями в локусах *ss* и *CG5017* продемонстрировали изменения уровня транскрипции *CG1681*, *CYP6 G1* и *ss* у *D. melanogaster* в ответ на рентгеновское облучение и на добавление в кормовую среду фармацевтических веществ – фуразидина и серотонина (рис. 3).

Наибольшую чувствительность продемонстрировали, мухи дикого типа Canton S (CS). У них многократно повышается уровень транскрипции генов *CYP6G1*, *CG1681* при добавлении в кормовую среду фуразидина и серотонина и в меньшей степени в ответ на рентгеновское облучение. У мух линий *ssa40a* и *ssaSc*, сочетающей в своём геноме мутации в локусах *ss* и *CG5017*, в ответ на добавление в кормовую среду фуразидина и серотонина, также повышается уровень транскрипции генов *CYP6G1* и *CG1681*, хотя и в меньшей степени, чем у CS. Мухи *ssa40a* в ответ на облучение реагируют незначительным повышением уровня транскрипции *CG1681*, но при этом практически не меняется уровень транскрипции *CYP6G1*. Облучение мух *ssaSc* приводит к некоторому падению уровня транскрипции *CYP6G1* и *CG1681*. Рассматривая результаты измерения уровня транскрипции генов *CYP6G1* и *CG1681* и *ss* в совокупности, обращает внимание отсутствие существенных изменений в уровне транскрипции гена *ss* в ответ на рентгеновское облучение и его повышение при добавлении в кормовую среду фуразидина и серотонина. При этом сочетание действия фуразидина и серотонина с облучением приводит к разным реакциям. Добавление облучения к действию фуразидина, в разной степени у разных линий, понижает уровень транскрипции *ss*-гена, в то время как совмещение действия серотонина повышает уровень его транскрипции. Ген *ss*, в отличие от его гомологов у высших позвоночных, не имеет способности связывания с ксенобиотическими лигандами, такими как 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), это давало основания для сомнений в его участии в ответе на действия токсинов. Однако демонстрируемые нами изменения уровня транскрипции генов *CYP*, *GST* и *ss*, в ответ на воздействия фуразидина и серотонина, скорее свидетельствуют об обратном. Мы не можем утверждать, что они сами являются лигандами, активирующими белок SS, но возможно в результате их токсического действия появляется эндогенный лиганд, способный активировать этот белок. Такую роль может выполнять один из эндогенных лигандов AHR – токсичное производное триптофана - формил-индол-карбазол (FICZ). Уровень концентрации FICZ в клетках существенно повышается в ответ на ионизирующее излучение, что в свою очередь стимулирует повышение экспрессии AHR-гена [5].

Изначально мутация в CG5017-гене была обнаружена в связи с вызванной ею нарушением памяти, важно было оценить её взаимодействие с мутацией в *ss*-гене не только в процессах регуляции развития и ответа на действие токсинов, но и при формировании памяти. Исследование памяти у мух *ssa40a*, *milkah* и *ssaSc* мы производили в парадигме условнорефлекторного подавления ухаживания, использующего естественный для насекомого условный рефлекс – подавление половой активности при накоплении негативного опыта ухаживания (рис. 4).

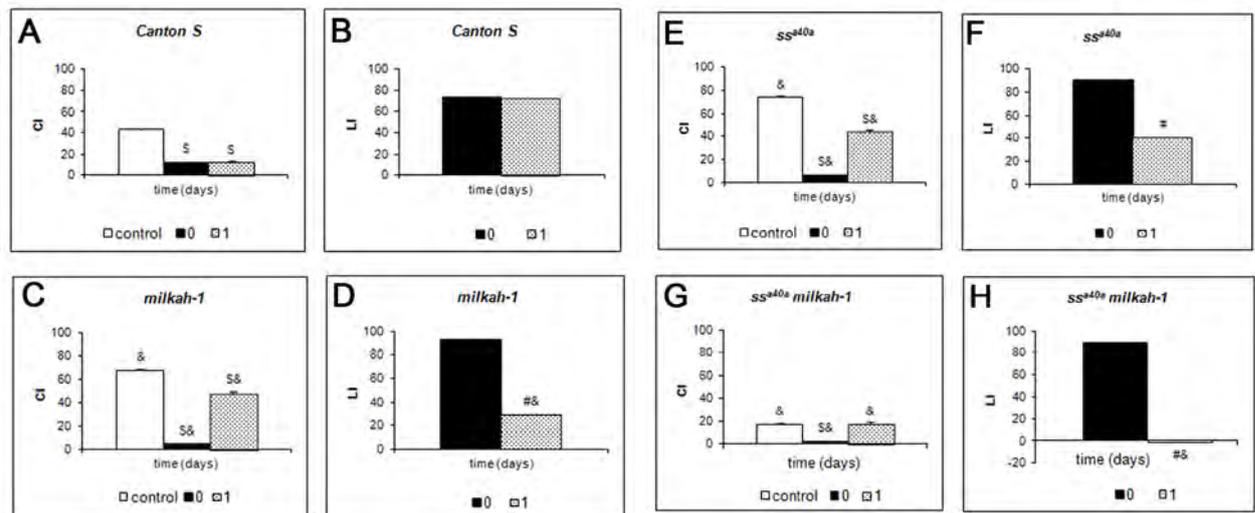


Рисунок 3.4 - Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания у *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс - время после завершения тренировки, дни; по оси ординат: CI - индекс ухаживания, LI - индекс обучения, у.е.

Светлые столбики – CI наивных самцов, заштрихованные – CI (LI) обученных самцов. Размер выборок для каждой точки 20 самцов.

& - CI или LI достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$) в аналогичных условиях;

\$ - CI в тесте сразу после тренировки или в отсроченном тесте достоверно ниже, чем CI наивных самцов (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$);

- LI в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки (двусторонний тест рандомизации, $p < 0,05$);

- LI in the deferred test significantly lower than in test immediately following training (double randomization test, $p < 0.05$).

Результаты выполненных экспериментов продемонстрировали наличие вполне высокого уровня обучения и нарушение, в разной степени, долговременной памяти у мух всех трёх исследованных линий. При этом очевиден синергический эффект нарушения долговременной памяти у мух, сочетающих в своём геноме гипоморфные мутации в локусах *spineless* и *CG5017*.

Сопоставляя представленные результаты исследования мух, обременённых мутациями генов *spineless* и *CG5017*, можно сделать вывод об их взаимодействии в регуляции процессов морфогенеза, формирования долговременной памяти и ответа клеток на токсические воздействия внешних факторов. Судя по всему, это взаимодействие было выработано в результате эволюции многоклеточных организмов для избегания токсических воздействий окружающей среды и используется клетками и организмами на всех стадиях развития и жизнедеятельности.

И последнее, хотя выявленные нами нарушения развития вызванные малыми дозами рентгеновского облучения, у организмов, сочетающих в своём геноме гипоморфные мутации в локусах генов высоко консервативных генов, относящихся к семействам AHR- и NAP-генов, выполнены на дрозофиле они свидетельствуют о повышенном риске реализации сценариев развития патологий у людей с сочетанием в своём геноме подобных мутаций. Это необходимо будет учитывать, оценивая риски людей, индивидуальный геном которых, предстоит расшифровать.

3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены результаты по изучению взаимодействия *spineless*- и *CG5017*-генов в процессе в регуляции процессов морфогенеза, формирования долговременной памяти и ответа клеток на токсические воздействия внешних факторов. В результате, нами впервые сформировано представление о том, что их взаимодействие было выработано в ходе эволюции многоклеточных организмов для избегания токсических воздействий окружающей среды и используется клетками и организмами на всех стадиях развития и жизнедеятельности.

Выявленные нами нарушения развития, вызванные малыми дозами рентгеновского облучения у организмов, сочетающих в своём геноме гипоморфные мутации в локусах высоко консервативных генов, относящихся к семействам AHR- и NAP-генов, свидетельствуют о повышенном риске реализации сценариев развития патологий у людей, сочетающих в своём геноме подобные мутации. Это необходимо учитывать, оценивая риски людей при расшифровке их индивидуальных геномов.

3.5 ССЫЛКИ

1. *Brand A.H., Perrimon N. // Development. 1993. V. 118. P. 401-415.*
2. *Кузин Б.А., Досжанов К.Т., Симонова О.Б. и др. // Онтогенез. 1991. Т. 22. С. 212-217.*
3. *Кузин Б.А., Модестова Е.А., Воронцова Ю.Е. и др. Онтогенез. 2010. Т. 41. № 5. С. 364-370.*
4. *Dubnau J., Chiang A., Grady L. et al. // Curr. Biol. 2003. V. 13. P. 286-296.*
5. *Jux B., Kadow S., Luecke S. et al. // 2011. J Invest Dermatol. V. 131. P. 203–210.*

3.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. Симонова О.Б., Кузин Б.А. Модуляция экспрессии генов – эволюционный резерв адаптационных изменений морфогенеза // Сборник трудов "ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ, МОРФОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИЯ". Ст-П., 2013. С. 87-89.
2. Kuzin B.A., Nikitina E.A., Cherezov R.O., Vorontsova J.E., Slezinger M.S., Zatsepina O.G., Simonova O.B., Enikolopov G.N., Savvateeva-Popova E.V. Combination of hypomorphic mutations of the *Drosophila* homologues of *Aryl hydrocarbon receptor* and *Nucleosome assembly protein* family genes disrupts morphogenesis, memory and detoxification // PloS One. 2014. V.9. №4: e94975. doi:10.1371/journal.pone.0094975
3. Кузин Б.А., Акишина А.А., Мерцалов Б.И., Куликова Д.А., Симонова О.Б. Тест-система для поиска *in vivo* фармакологических агентов, способных влиять на экспрессию диоксинового рецептора человека // XXV-я Российская конференция по электронной микроскопии. Черногоровка. 2-6 июня. 2014. Тезисы докладов. Т.2. С. 600-601.
4. Kuzin B.A., Nikitina E.A., Cherezov R.O., Vorontsova J.E., Slezinger M.S., Zatsepina O.G., Simonova O.B., Enikolopov G.N., Savvateeva-Popova E.V. Interaction of *Drosophila* homologues of *Aryl hydrocarbon receptor* and *Nucleosome assembly protein* family genes is necessary for detoxification, morphogenesis and memory // 14th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox States & Antioxidants 12-13 June 2014. Paris. France. Abstract book.
5. пат. Российской Федерации № 2534822, зарегистрирован 07.10.2014 г., на изобретение "Способ оценки фармакологических и токсикологических свойств веществ – радио-, токсикопротекторов и – радио-, токсикосенсибилизаторов"/ Кузин Б.А., Ениколопов Г.Н., Слезингер М.С., Симонова О.Б., Черезов Р.О., Зацепина О.Г. Воронцова Ю.Е. Заявитель Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.
6. Кузин Б.А., Никитина Е.А., Черезов Р.О., Воронцова Ю.Е., Слезингер М.С., Зацепина О.Г., Ениколопов Г.Н., Савватеева-Попова Е.В., Симонова О.Б. Оценка опасности малых доз радиации для организмов, обременённых гипоморфными мутациями генов, участвующих в ответе клеток на оксидативный стресс // Сборник Материалов отчётной конференции по Программе фундаментальных исследований РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития». М.:ИОГен, 2014. — 122с. С. 111-113.
7. заявка на патент «Тест-система для направленного поиска ксенобиотиков, обладающих свойствами лигандов АНР человека, и способ оценки фармакологических и токсических свойств веществ – потенциальных лигандов АНР человека». Кузин Б.А., Акишина А.А. Воронцова Ю.Е., Мерцалов И.Б, Слезингер М.С., Симонова О.Б., Черезов Р.О., Зацепина О.Г. заявитель Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Регистрационный номер заявки: № 2016140174, дата подачи 12.10.2016.

РАЗДЕЛ 4 Исследования молекулярно-генетических механизмов пролиферации и дифференцировки клеток глаза в развитии

4.1. Экспрессия регуляторных генов в дифференцированных и малодифференцированных клетках тканей глаза человека

4.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Всем типам клеток в ходе онтогенетического развития организма свойственна индивидуальная программа дифференцировки, характеризующаяся избирательной активностью определенного набора генов. Сбой в молекулярных механизмах на любом уровне регуляции приводит к нарушениям процессов дифференцировки клеток, морфогенеза тканей и органов, отражаясь не только на структуре, но и на выполняемых функциях на разных этапах онтогенеза. Обнаружение в тканях глаза клеток со свойствами СК открыло перспективы разработки основанных на их применении методов лечения травм и заболеваний тканей глаза [1-5]. В поиске источника для восстановления тканей глаза большие надежды возлагаются на возможность использования тканеспецифических СК и совершенствования технологий iPS-клеток. В настоящее время трансплантация СК и индуцированных соматических клеток является одним из подходов для восстановления зрения у пациентов с врожденными или приобретенными в результате заболеваний дефектами глаза, затрагивающими, например, роговицу. Существуют примеры создания и успешного применения в медицине «искусственных тканей», полученных методами клеточных технологий и тканевой инженерии [6-7]. Прогресс в лечении патологий глаза неразрывно связан с изучением молекулярных механизмов клеточных процессов формирования и функционирования тканей глаза.

Цель работы. Для понимания молекулярно-генетических механизмов дифференцировки клеток глаза, самообновления мультипотентных клеток, обнаруженных в различных отделах эмбрионального глаза и глаза взрослых млекопитающих, огромное значение имеет идентификация и изучение характера экспрессии генов-маркеров прогениторных клеток, генов, управляющих клеточными процессами на разных этапах онтогенеза. Цель работы состоит в проведении структурно-функционального анализа и изучении характера экспрессии регуляторных генов в тканях глаза человека: *PAX6*, *TGFbeta2*, *PITX2*, *FOXC1*, *PROX1*, *SIX3*, *OCT4*, *OCT4-PG1*, *NANOG*, *GNL3*.

4.1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Глаза для исследования получали из лицензированных медицинских учреждений. Анализировали следующие ткани глаза взрослого человека (постмортально) – центральную, периферическую область сетчатки, зону зрительного нерва, радужную оболочку, цилиарное тело (ЦТ), пигментный эпителий (РПЭ). Использовали молекулярно-генетические, иммунохимические

методы. ОТ-ПЦР проводили на матрице нормализованной кДНК, синтезируемой из РНК анализируемых тканей. Праймеры к изучаемым генам конструировали на основе нуклеотидных последовательностей, аннотированных в базе данных NCBI. Принадлежность полученных нами фрагментов ПЦР к изучаемым генам определяли секвенированием, с использованием баз данных NCBI. Локализацию белков определяли с помощью методов флуоресцентной и нефлуоресцентной иммунохимии на замороженных срезах глаза, приготовленных с помощью криостата Leica M1900 (Германия).

4.1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была обнаружена мРНК мастер-гена *PAX6* и кодируемый белок во всех анализируемых тканях глаза взрослого человека. мРНК гена *PROX1* выявлена в центральной и периферической сетчатке, локализация белкового продукта определена в горизонтальных и амакриновых клетках, в контроле дифференцировки которых кодируемый фактор транскрипции принимает участие. Идентификация транскрипта гена *PROX1* и белка в пролиферирующих клетках-предшественниках и дифференцирующихся нейронах сетчатки, а также в эпителии и эндотелии формирующейся роговицы человека, подтверждают роль *PROX1/Prox1* в регуляции клеточных процессов формирования этих тканей глаза у позвоночных. мРНК генов *PITX2* и *FOXC1*, кодирующие факторы транскрипции, обнаружены в радужной оболочке, ЦТ, сетчатке, РПЭ. мРНК гена *TGFbeta2*, кодирующего сигнальный белок, была идентифицирована во всех анализируемых нами тканях. Экспрессия регуляторных генов *SIX3*, *SOX2*, кодирующих транскрипционные факторы, выявлена нами в центральной области и периферической сетчатки глаза человека. На моделях глаза показано, что мутации в генах *TGFbeta2*, *PAX6*, *PITX2*, *FOXC1*, связаны с многочисленными патологиями тканей глаза – аниридии, аномалии Петерса, синдрома Ригера и другими. Пространственно-временной характер экспрессии *PAX6*, *PITX2*, *FOXC1*, *TGFbeta2*, *SIX3*, *PROX1* в дифференцирующихся клетках глаза человека отражает участие изучаемых генов в регуляции клеточных процессов глаза. мРНК гена *GNL3* (нуклеостемин) обнаружена в ЦТ, РПЭ, сетчатке, с преимущественной транскрипционной активностью в периферической и центральной области сетчатки человека. Локализация белка GNL определена в ганглиозных, амакриновых клетках, биполярах сетчатки человека. На других моделях показано, что функции белка ядрышка GNL3 связаны с участием в биогенезе рибосом, контроле клеточного цикла, поддержании целостности генома, в том числе делящихся клеток при регенерации тканей. Экспрессия гена *GNL3* была выявлена в нейробластах и в дифференцирующихся нейронах сетчатки, а также в РПЭ формирующегося глаза человека. мРНК гена *NANOG* выявлена в эпителии радужной оболочки, ЦТ, сетчатке, РПЭ глаза человека. В цилиарном теле, сетчатке и РПЭ выявлена мРНК изоформы нативного гена *OCT4 – OCT4B* и процессированного псевдогена (ретрогена) *OCT4-PG1*. Белки

OCT4 и NANOG обнаружены в ЦТ и сетчатке. Известно, что некоторые псевдогены транскрипционно активны, контролируют экспрессию своих генов-предшественников. Предполагается, что транскрипты ретрогена Pou5F1B/Oct4-pg1 могут принимать участие в регуляции экспрессии гена-предшественника, в процессах дифференцировки и самообновления мультипотентных клеток глаза. Ранее мы обнаружили экспрессию гена *NANOG*, *OCT4-PG1/POU5F1B* – псевдогена гена *OCT4*, в тканях глаза человека в пренатальном развитии. Показано участие генов-маркеров ЭСК – *OCT4*, *NANOG*, *GNL3* в поддержании плюрипотентного состояния клеток в эмбриогенезе млекопитающих, и, кроме того – в перепрограммировании соматических клеток в плюрипотентное состояние.

4.1.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия генов *PAX6*, *PITX2*, *FOXC1*, *TGFbeta2*, *SIX3*, *PROX1*, *NANOG*, *OCT4/4B*, *GNL3* сохраняется в тканях взрослого глаза, и необходима не только для нормального морфогенеза, но также для правильного функционирования глаза. Паттерн экспрессии маркеров плюрипотентного статуса клеток – *OCT4/4B*, *NANOG*, *GNL3* оказался шире, чем предполагалось. Они выявлены как в пролиферирующих клетках, способных к самообновлению, так и в дифференцированных клетках глаза человека. Экспрессия в дифференцированных клетках глаза человека генов *NANOG*, *OCT4B*, *OCT4-PG1*, *GNL3* является интересным биологическим фактом, поскольку их функции в соматических клетках не изучены. Предполагается участие этих генов в механизмах контроля дифференцировки и мультипотентности клеток глаза. Понимание генетических механизмов дифференцировки клеток и нормального функционирования глаза является базой, необходимой для осуществления направленной дифференцировки, разработки эффективных методов стимуляции восстановительных процессов в тканях глаза, в случае патологий и повреждения.

4.1.5 ССЫЛКИ

1. Ahmad S. et al. // Drug Discov. Today. 2010. V.15 (7-8). P. 306–313.
2. Rowland T.J. et al. // J. Cell Physiol. 2012. V.227 (2). P. 457–466.
3. Al-Shamekh S., Goldberg J.L. // Transl Res. 2014. (4). P. 377–386.
4. Mead B. et al. // Stem Cell Res. 2015. V.14 (3). P. 243–257.
5. Schwartz S.D. et al. // Lancet. 2015. V.385 (9967). P. 509–516.
6. Rama P. et al. // N. Engl. J. Med. 2010. V.363. P. 147–155.
7. Борзенок и др. // Вестник трансплант. и искусственных органов. 2011. №3. С.67–72.

4.2. Экспрессия транскрипционных факторов семейства *v_{sx}* в ходе морфогенеза сетчатки кур *Gallus domesticus*

4.2.1. ВВЕДЕНИЕ

Сетчатка позвоночных является удобным объектом для изучения молекулярно-генетических механизмов морфогенеза, она содержит ограниченное число высокоспециализированных клеточных типов. Сетчатка формируется из нейробластического слоя, который дает начало всем ядерным и сетчатым слоям. Из мультипотентных прогениторных клеток образуются основные типы клеток: ганглиозные, амакриновые, биполярные, горизонтальные, фоторецепторные и клетки Мюллеровской глии [1].

Продолжительность нейрогенеза сетчатки у представителей различных систематических групп существенно различается, однако дифференцировка клеток у всех изученных животных от дрозофилы до человека происходит в строгой последовательности и регулируется согласованной работой каскада селективно экспрессирующихся транскрипционных факторов [2]. Для специализации клеток сетчатки, необходима экспрессия транскрипционных факторов нескольких семейств: Pax, Six, Prox, Rx, V_{sx} и др.

Целью работы является пространственно-временная характеристика экспрессии гомеобоксных транскрипционных факторов семейства V_{sx} (Visual system homeobox), V_{sx1}/Chx10-1 и V_{sx2}/Chx10, в сетчатке кур (*Gallus domesticus*) на последовательных стадиях эмбриогенеза.

Ортологи V_{sx1} и V_{sx2} идентифицированы у рыб [3], кур [4], мышей [5-6]; и человека [7-8].

Установлено, что гены, кодирующие эти факторы, начинают экспрессироваться на ранних этапах развития глаза у всех изученных видов животных и принимают участие в регуляции дифференцировки клеток сетчатки. С мутациями генов семейства *V_{sx}/V_{SX}* позвоночных, в том числе человека, связывают некоторые аномалии развития глаз и заболевания сетчатки [9]. Однако функции генов семейства *V_{sx}/V_{SX}* до сих пор остаются не достаточно изучены.

4.2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является сетчатка кур породы белый леггорн с 4 по 14 сутки эмбрионального развития. Оплодотворенные яйца инкубировали при 37.5 °C и 60% влажности. Стадии развития эмбрионов определялись в соответствие с таблицей Гамильтона и Гамбургера [10].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на матрице кДНК с помощью Tag-полимеразы. Синтез первой цепи кДНК на матрице тотальной РНК выполняли с помощью обратной транскриптазы SuperScript (GIBCOBRL, США). Для оценки уровня экспрессии исследуемых генов, кДНК были предварительно отнормированы по глицеральдегид-3-

фосфатдегидрогеназе (Gapdh). Для конструирования специфических праймеров использовали программу DNASTar.

Сравнительный анализ уровней экспрессии генов проводили методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green с помощью наборов реагентов qPCRmix-HSSubr+Rox (Evrogen, Россия) на приборе 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Секвенирование ДНК ПЦР-продуктов, полученных со специфическими праймерами к Vsx1 и Vsx2, проводили по стандартному протоколу метода Сэнгера на приборе GeneticAnalyzes 3500.

Препарирование не фиксированных глазных яблок проводилось под микроскопом, разрезали по кругу лимба глаза и далее последовательно отделяли роговицу, радужную оболочку, хрусталик и цилиарное тело. Затем делали четыре разреза, формируя лепестки из склеры, пигментного эпителия и сетчатки. Фиксирования формальдегидом (4% ПАФ) и отделяли сетчатку.

Имуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике для конфокальной микроскопии. Для усиления сигнала использовали процедуру antigen retrieval: фиксированную ткань (4% ПАФ) выдерживали 20 мин при +95 °С в 1х буфере (250мМ Tris-HCl pH8.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS), первичные антитела в PBS выдерживали 2 суток при +4°С, отмывали 3 раза PBS по 10 мин, вторичные антитела в PBS на 1 сутки при +4°С, отмывали 3 раза PBS по 10 мин. Использовали антитела: первичные - к Vsx1 (polyclonalrabbit, GenWayBiotech, 1:100), к Prox1 (monoclonalmouse, NovusBiologicals, 1:50) и к Vsx2 (polyclonalsheep, ThermoFisher, 1:200); вторичные - Alexa 488 (Goatanti-rabbit, Lifetechnologies, 1:1000), Alexa 546 (Goatanti-mouse, Lifetechnologies, 1:1000) и Alexa 546 (Goatanti-sheep, Lifetechnologies, 1:1000); ядерный краситель - PropidiumI (1:1000).

Таблица 4.2.1 - Праймеры для амплификации

Ген	Структура праймеров
Vsx1	5' – tcgcagatcaagaggaagaagc-3' 5'-gtccatcatcaactctgccaag - 3'
Vsx2	5' – accgcaaatgtccaatc- 3' 5' – gtgatggctgagtatgggct- 3'
Vsx1 PT	5' – agggagatgctggcggtgaag- 3' 5' – cactccatccctctgcccga- 3'
Vsx2 PT	5' – gaggcggcacaggacaatct- 3' 5' – catgaaaacagagctgccagaagac- 3'
Pax6	5' – cagaagatcgtggaactcgc – 3' 5' – ggaggactctgtttatcgacgac – 3'
Prox1	5' – agcctgaggaccaagatgtcgt – 3' 5' – cctcactgtccagettacagat – 3'
Rho	5' – acacgctgaagccggagatcaa - 3' 5' – ttcttgccgcagcagaggtgt- 3'

Gapdh	5' – agggtagtgaaggctgctgctga – 3' 5' – atgcagaactgagcgggtgt – 3'
Gapdh PT	5'- ccgtgttggacttgatggt- 3' 5' – gtgggggagacagaagggaacaga- 3'

4.2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс ретиногенеза у кур осуществляются в течение раннего эмбриогенеза, в первые 14 дней инкубации. Уже на четвертый день эмбрионального развития в формирующемся глазу присутствуют зачатки всех основных структур, внутренние сегменты фоторецепторов начинают развиваться после 10 дня, а к 14 суткам развития происходит терминальная дифференцировка всех клеточных типов сетчатки. Поэтому в период E4-E14 можно анализировать экспрессию генов-регуляторов морфогенеза сетчатки, их участие в пролиферации и дифференцировке. Для изучения экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы семейства *Vsx* в сетчатке у кур, мы использовали эти стадии развития. Методом ПЦР мы провели постадийный анализ наличия в сетчатке транскриптов *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10*. Для контроля дифференцировки клеток сетчатки использовали гены-маркеры: *Prox1* - для амакриновых и горизонтальных, *Pax6* – для ганглиозных, *Rho* – для фоторецепторных клеток.

Экспрессия гена *Vsx2/Chx10* наблюдается на всех исследованных стадиях, но имеет максимум на 9-10 и 14 дни инкубации, в то время как *Vsx1/Chx10-1* детектируется с 6 по 11 и на 14 дни (Рис.1).

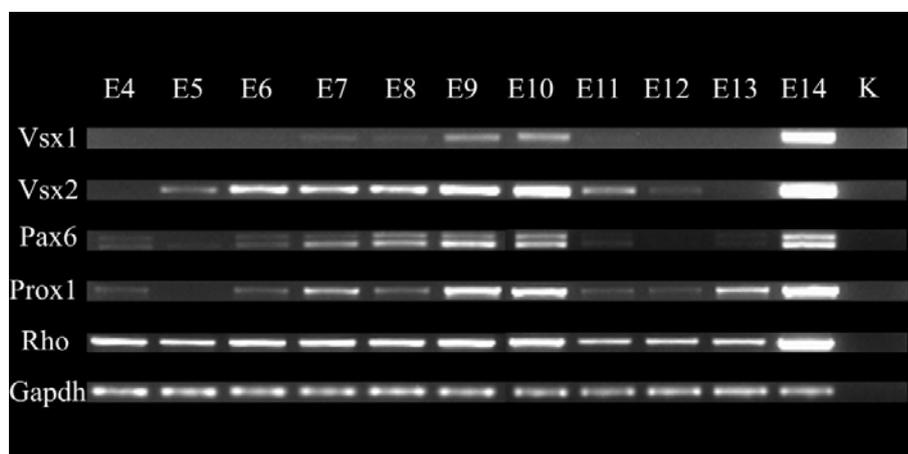


Рисунок 4.2.1 - Пцр-анализ транскрипционных факторов *Vsx1/Chx10-1*, *Vsx2/Chx10*, *Pax6*, *Prox1*, *Rho* и *Gapdh* с специфическими праймерами на последовательных стадиях развития сетчатки кур, в сутках. К – ПЦР без кДНК.

Для исключения некорректной трактовки результатов анализа структурно родственных генов семейства *Vsx*, ДНК ПЦР-фрагментов, полученных с специфическими праймерами к *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10*, были секвенированы. Установлена 100% гомология с нуклеотидной последовательностью соответствующих генов.

Количественную оценку мРНК *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10* проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии оценивался относительно эндогенного контроля, мРНК гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gargh*). Полученные результаты согласуются с данными ПЦР (Рис. 2).

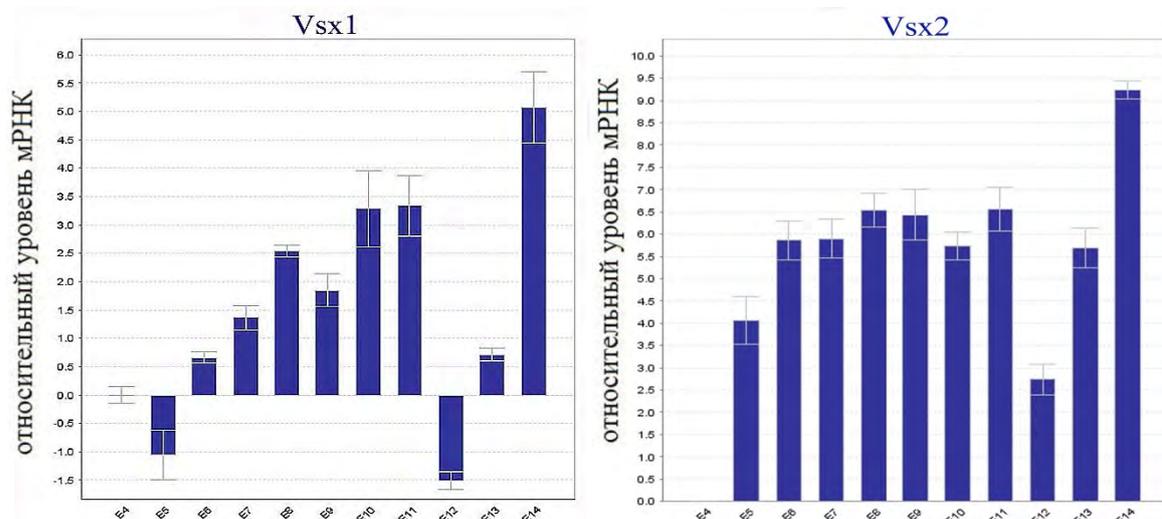


Рисунок 4.2.2 - ПЦР-РВ-анализ экспрессии транскриптов *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10* на стадиях E4-E14 развития сетчатки кур, в сутках. По оси ординат — уровень эспрессии исследуемых генов по отношению к уровню экспрессии на стадии E4.

Основным результатом экспериментов по сравнительным исследованиям уровня экспрессии генов семейства *Vsx* является наблюдение, что транскрипты генов *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10* имеют максимальный уровень экспрессии на стадиях E6-E11, когда в сетчатке активно идет дифференцировка клеток и формируются ядерные слои, а также на стадии E14, когда слои сетчатки в основном уже сформированы. Следует отметить, что на стадии E12 происходит существенное уменьшение количества транскриптов как *Vsx1/Chx10-1*, так и *Vsx2/Chx10*, что совпадает с данными ПЦР анализа других генов-регуляторов дифференцировки клеток сетчатки *Prox1* и *Pax6*. Это позволяет предположить, что именно на этой стадий, когда уже представлены все слои сетчатки, происходят важные события, приводящие к переключению функции этих факторов транскрипции от участия в дифференцировке к выполнению новых функций в зрелой сетчатке.

Локализация белкового продукта *Vsx1/Chx10-1*. Клеточная локализация экспрессии исследуемого гена проводилась с помощью иммуногистохимии, анализируя результаты на конфокальном микроскопе.

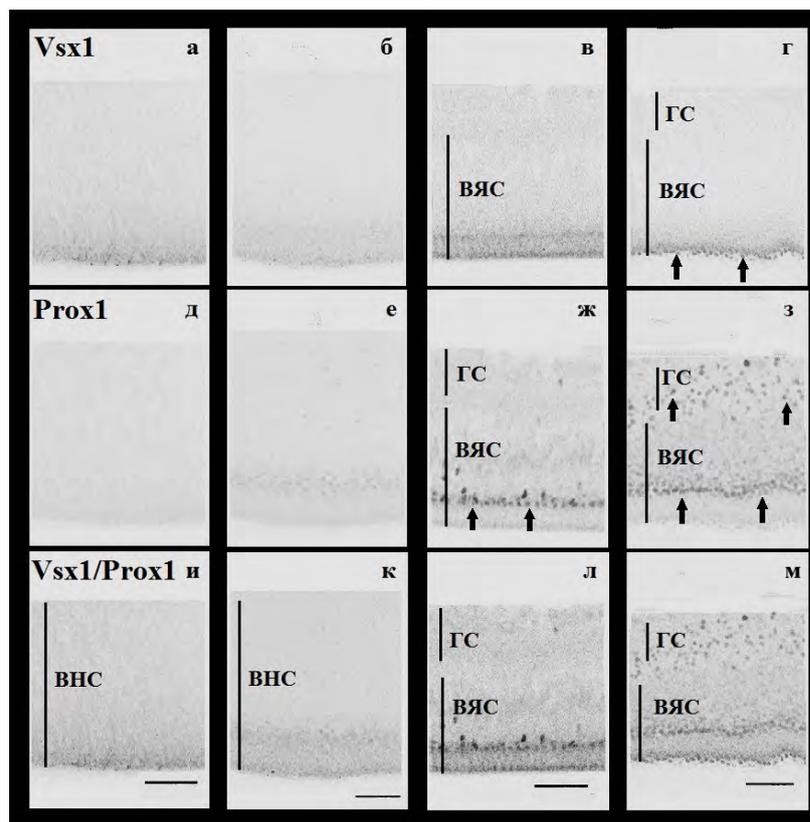


Рисунок 4.2.3 - Иммуногистохимическое окрашивание сетчатки кур на разных стадиях развития: E6 (а, д, и); E8 (б, е, к); E12 (в, ж, л); E14 (г, з, м). Антитела к Vsxl (а, б, в, г); антитела к Prox1 (д, е, ж, з); совмещение Vsxl/Prox1 (и, к, л, м). ВНС – внутренний нейробластический слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; (увеличение 50 мкм). Стрелками показано (г) — ВЯС биполярные кл; (ж) — ВЯС горизонтальные кл; (з) — ГС амакриновые кл, ВЯС горизонтальные кл.

В качестве маркера дифференцировки амакриновых и горизонтальных использовали Prox1, иммунохимический сигнал которого детектируется во внутреннем ядерном слое, где находятся интернейроны (амакриновые, горизонтальные и биполярные клетки) (Рис. 3 д, е, ж, з).

Белковый продукт Vsxl/Chx10-1, ядерной локализации, уверенно детектируется, начиная с 6 по 14 день инкубации зародышей: сначала, E6-E8, во внутреннем нейробластическом слое, позже, E12-E14, в наружной части внутреннего ядерного слоя (Рис. 3 в, г), который содержит ядра биполярных нейронов. Это согласуется с данными полученными ранее с помощью insituhybridization о локализации транскриптов Vsxl/Chx10-1 во внутреннем ядерном слое формирующейся сетчатки эмбрионов кур.

У мышей Vsxl/Chx10-1 впервые детектируется во внутреннем ядерном слое на 5 постнатальный день, причем экспрессия ограничивается биполярными клетками. Более поздние данные, полученные на Vsxl-ноль мышях на нокаутных мышях, указывают на то, что Vsxl принимает участие в терминальной дифференцировке ON-, но не OFF-, биполяров. Таким

образом, наши результаты и данные литературы свидетельствуют, что транскрипционный фактор *Vsx1/Chx10-1* принимает участие в регуляции дифференцировки биполярных клеток сетчатки.

Локализация белкового продукта *Vsx2/Chx10*. Локализация белка *Vsx2/Chx10* наблюдается во внутреннем ядерном слое на более поздних стадиях формирования сетчатки, 10 - 14 сутки (Рис. 4 а, б, в). Для контроля локализации белкового продукта *Vsx2/Chx10* в ядре был использован ядерный краситель Propidium Iodide (PrI). Таким образом, мы показали, что гены, кодирующие факторы *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10*, на уровне мРНК начинают экспрессироваться на ранних этапах ретиногенеза у кур, а на уровне белка на поздних с 6 и 10 дня соответственно. Кроме того, исследуемые транскрипционные факторы детектируются во внутреннем ядерном слое сетчатки, но *Vsx2/Chx10* начинает экспрессироваться раньше и уровень экспрессии существенно выше, чем у *Vsx1/Chx10-1*. Что согласуется с данными полученными на млекопитающих: экспрессия *Vsx2* у мышей впервые детектируется в прогениторных клетках в раннем морфогенезе глаза, а *Vsx1* преимущественно экспрессируется в постнатальной сетчатке. Как и многие факторы транскрипции *Vsx1/Chx10-1* и *Vsx2/Chx10* полифункциональны и участвуют как в дифференцировке клеток сетчатки, так и в дальнейшем их функционировании. Экспрессия *Chx10* у кур продолжается и в зрелой сетчатке в биполярных клетках и Мюллеровской глие. Показано, что *Vsx2* участвует в регуляции экспрессии *Vsx1*. У мышей и рыб, дефицит экспрессии *Vsx2* приводит к существенному повышению уровня мРНК *Vsx1*. Многие заболевания глаз человека связаны с аномалиями дифференцировки различных типов клеток из-за нарушения экспрессии генов, понимание молекулярно-генетических механизмов клеточной дифференцировки важно для будущего регенеративной медицины.

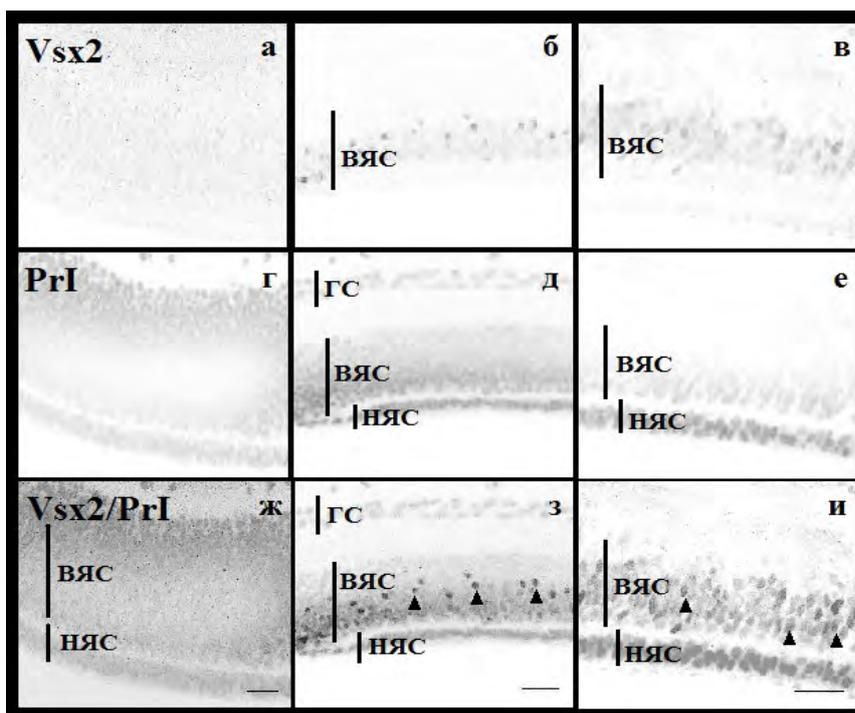


Рисунок 4.2.4 - Иммуногистохимическое окрашивание сетчатки кур на разных стадиях развития: E10 (а,г,ж); E13 (б,д,з); E14 (в,е,и). Антитела к Vsx2 (а,б,в); PrI (г,д,е); совмещение-Vsx2/ PrI (ж,з,и). ВЯС — внутренний ядерный слой; НЯС — наружный ядерный слой; ГС — ганглиозный слой (увеличение 25 мкм). Стрелками показано (з, и) — ВЯС биполярные клетки.

Очевидно, что оба исследуемых гена играют важную, но отличающуюся роль в дифференцировке клеток сетчатки. Эти транскрипционные факторы регулируют уникальные аспекты морфогенеза сетчатки и могут быть маркерами определенного типа клеток сетчатки. Несмотря на это их роль в механизмах возникновения патологий сетчатки у человека изучена мало. Известно, что следствием нарушения экспрессии VSX2 у человека, а также у мутантных мышей (Chx10^{ог-J/ог-J}) - ocular retardation, является множественные дефекты развития глаз, включая микрофтальмию. Показано, что CHX10/VSX2 регулирует дифференцировку фоторецепторов через активацию экспрессии RdCVF – фактора жизнеспособности колбочек, нарушение экспрессии которого связывают с пигментным ретинитом, часто приводящим к слепоте. Для VSX1 описаны мутации, приводящие к утрате центрального зрения из-за макулярной дегенерацией сетчатки.

4.2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что гены, кодирующие транскрипционные факторы Vsx1/Chx10-1 и Vsx2/Chx10, на уровне мРНК начинают экспрессироваться на ранних этапах ретиногенеза, а на уровне белка на поздних с 6 и 10 дня соответственно в биполярных клетках внутреннего ядерного слоя сетчатки. Полифункциональные факторы транскрипции Vsx1/Chx10-1 и Vsx2/Chx10 участвуют в регуляции как дифференцировки, так и в функционировании биполярных клеток сетчатки. Так как оба исследованных гена обладают терапевтическим потенциалом, необходимы дальнейшие детальные исследования, которые не только расширят представления о механизмах возникновения патологий, но и позволят найти эффективные подходы к их лечению.

4.2.5 ССЫЛКИ

1. *Young R.W.* Cell differentiation in the retina of the mouse // *Anat. Rec.*, 212 (1985), P. 199–205.
2. *Harada T., Harada C., Parada L.F.* // *Genes Dev.*, 21 (2007), P. 367-378.
3. *Passini M.A., Levine E.M., Canger A.K., et al.* // *Comp Neurol.* 1997. V. 24. P. 495-505.
4. *Chen C.M., Cepko C.L.* // *Mechanisms of Development.* 2000. V.90. P. 293-297.
5. *Liu I.S., J.D. Chen, L. Ploder, et al.* // *Neuron*, 13 (1994), P. 377–393.
6. *Chow R.L., Snow B., Novak J. et al.* // *Mechanisms of Development.* 2001. V.109. P. 315–322.
7. *Percin F.E., Ploder L.A., Yu J.J., et al.* // *Nat. Genet.*, 25 (2000), P. 397–401.

8. *Semina E.V., Mintz-Hittner H.A., Murray J.C.* // *Genomics* 2000. V.63. P. 289–293.
9. *Reis L.M., Khan A., Kariminejad A., et al.* // *Mol Vis.* 2011. V.17. P.2527-2532.
10. *Hamburger V. and Hamilton H.* // *Morphol.*, 88 (1951), P. 49-92.

4.2.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. *Маркитантова Ю.В., Зиновьева Р.Д.* Исследование внутриклеточной локализации транскрипционного фактора PROX1 в сетчатке глаза человека в онтогенезе // *Известия РАН, Серия биологическая* № 2. 2014. С. 117-122.
2. *Болмазова И.Н. Зиновьева Р.Д.* Экспрессия транскрипционного фактора Vsx1 в сетчатке глаза позвоночных в онтогенезе// *Статья в сборнике XI Международная конференция «Проблемы современной биологии».* Москва. 15.01.2014. С. 64-68.
3. *Маркитантова Ю.В., Панова И.Г., Смирнова Ю.А., Сухих Г.Т., Зиновьева Р.Д.* Изучение молекулярных механизмов дифференцировки клеток роговицы – основа для разработки методов регенеративной медицины // *Статья в сборнике I Российский Конгресс с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине»* Москва, 27-28 ноября 2014 года. 2014, - 224 с. С.17-22.
4. *Панова И.Г., Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д.* Молекулярно-генетические механизмы морфогенеза роговицы// *Известия РАН. Серия биологическая.* 2015. № 2. - С. 117-126.
5. *Markitantova Yu.V., Smirnova Yu. A., Zinovieva R.D.* Study of the molecular-genetic mechanisms of human eye cells differentiation – the basis for development of regenerative medicine strategies // *Regenerative Medicine.* 2015. V.10. N 07s. P. 179-180.
6. *Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д.* Исследование особенностей экспрессии регуляторных генов в тканях глаза человека// *Статья в сборнике РОССИЙСКИЙ ОБЩЕНАЦИОНАЛЬНЫЙ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ.* Москва, 22-24 сентября, 2015. С. 852-857.
7. *Андрейченко И.Н., Зиновьева Р.Д.* Экспрессия факторов транскрипции семейства Vsx в ходе ретиногенеза у кур // *Медицинский академический журнал, издание северо-западного отделения медицинских наук.* 2016. Т.16. №3. С. 99-101.
8. *Панова И.Г., Татиколов А.С., Смирнова Ю.А., Полтавцева Р.А., Сухих Г.Т.* Альбумин в стекловидном теле, сетчатке и хрусталике глаза плодов человека // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016. Т. 162. № 11. С. 578-581.
9. *Панова И.Г., Татиколов А.С., Смирнова Ю.А., Полтавцева Р.А., Зиновьева Р.Д., Сухих Г.Т.* Альбумин и тканях глаза плодов человека // *Сборник трудов II-го международного конгресса "Пролиферативный синдром в биологии и медицине"* Москва, 2016. С.54-57.

10. Андрейченко И.Н., Зиновьева Р.Д. Экспрессия транскрипционных факторов семейства Vsx в ходе морфогенеза сетчатки кур *Gallus Domesticus*. Известия РАН. Серия биологическая. 2016. Принята в печать.

Тезисы.

1. Болмазова И.Н. Зиновьева Р.Д. Экспрессия транскрипционного фактора Vsx1 в сетчатке глаза позвоночных в онтогенезе// Тезисы XI Международной конференции «Проблемы современной биологии». Москва. 15.01.2014.

2. Маркитантова Ю.В., Панова И.Г., Смирнова Ю.А., Сухих Г.Т., Зиновьева Р.Д. Изучение молекулярных механизмов дифференцировки клеток роговицы – основа для разработки методов регенеративной медицины// Тезисы I Российского Конгресса с международным участием «Пролиферативный синдром в биологии и медицине». Москва, 27-28 ноября 2014 года.

3. Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д. Регуляция дифференцировки клеток глаза человека// Международная конференция «ХРОМОСОМА 2015», Новосибирск, 24 - 28 августа 2015. С.124-125.

4. Панова И.Г., Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д. TGFbeta2 в развитии глаза человека// II Всероссийская конференция "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет". Санкт-Петербург, 20-22 октября 2015 г. С. 645-646.

5. Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Сухих Г.Т., Зиновьева Р.Д. Молекулярные механизмы , определяющие мультипотентность клеток глаза // X Международный междисциплинарный Конгресс «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ». Судак, Крым. 2015. С. 272.

6. Markitantova Y.V., Smirnova Y.A., Zinovieva R.D. STUDY THE EXPRESSION OF REGULATORY GENES IN THE HUMAN EYES TISSUES. WORLD CONFERENCE ON REGENERATIVE MEDICINE. Leipzig, Germany, October 23-25, 2015.

7. Маркитантова Ю.В., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д. Экспрессия генов-регуляторов морфогенеза в тканях глаза взрослого человека // Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МОРФОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ», Москва, 6-7 апреля 2016 г. С.109-110.

8. Андрейченко И.Н., Зиновьева Р.Д. Экспрессия факторов транскрипции семейства Vsx при ретиногенезе у кур// Тезисы III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 12–14 сентября 2016 г.

9. Панова И.Г., Татиколов А.С., Смирнова Ю.А., Полтавцева Р.А., Зиновьева Р.Д., Сухих Г.Т. Альбумин и тканях глаза плодов человека // Тезисы II-го международного конгресса "Пролиферативный синдром в биологии и медицине" Москва, 2016.

РАЗДЕЛ 5 Структурно-функциональная организация эукариотических хромосом

5.1 ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большой интерес проявляется к взаимодействиям различных геномных участков интерфазных хромосом, располагающихся на больших расстояниях (исходя из линейных размеров хромосомной ДНК) друг от друга [1-5]. Следует отметить, что физически разделенные хромосомные локусы чаще взаимодействуют друг с другом (с выпетливанием участка хроматина, расположенного между ними) в пределах определенных доменов, получивших название «топологические домены» [2] или «топологически ассоциированные домены» – TADs [6]. Эти домены сохраняются в интерфазных хромосомах разных типов клеток, эволюционно консервативны в синтенных участках хромосом разных организмов. В хромосомах эмбриональных стволовых клеток мыши и человека средний размер топологических доменов первоначально был определен в 800 т.п.н. [2]. Позднее [4] при использовании Hi-C метода с более высоким разрешением (1 т.п.н.) средний размер таких доменов в хромосомах человека был уменьшен до 185 т.п.н. Сходные домены со средней длиной в 60 т.п.н. идентифицированы в хромосомах *D. melanogaster* [3].

Вопрос о том, как организованы «границы» между соседними TADs (включая нуклеотидные последовательности этих участков хромосом), в настоящее время остается открытым [5]. Однако исходя из определения TADs (см. выше), «границы» должны обеспечивать взаимодействия между геномными участками внутри доменов и препятствовать (уменьшать вероятность) междоменным взаимодействиям. Это предположение относится и к «работе» инсуляторов.

Ранее [6,7], используя дигенную (yellow и white) трансгенную систему *D. melanogaster* мы показали, что участки связывания хромосомной ДНК с ядерной оболочкой (яДНК) способны защищать репортерные гены от эффекта положения в присутствии инсулятора Wari лучше, чем без него. Более того, если только один из трансгенов (white + Wari) фланкирован яДНК, то именно он оказывается лучше защищенным от эффекта положения. Другими словами, инсулятор «хорошо работает» между двумя фрагментами яДНК, и его действие через фрагмент яДНК затруднено. Интересно, что яДНК обладают эволюционной консервативностью [8,9]. Эти «точечные» сайты прикрепления хромосом к ядерной оболочке также могут формировать петельные структуры хроматина [10-11]. В использованном нами в трансгенных экспериментах фрагменте яДНК (EnvM4), выявлен необычайно консервативный мотив (AAAGA)_n. В составе LADs (Lamina Associated Domains) выявлены мотивы ДНК (GAGA), обуславливающие их прикрепление к ядерной оболочке [12]. Однако следует отметить, что в представленном Зулло и

соавторами консенсусе присутствуют также и мотивы AAAGA. Наиболее общим свойством этих двух типов мотивов ДНК является наличие тандемных копий полипуринов.

Несмотря на выявление TADs у многих организмов и многочисленные исследования в этой области, многое остается неясным. Сами по себе данные о TADs дают только общее представление о взаимодействиях между различными участками ДНК. Подробное изучение нуклеотидных последовательностей, транскрипции, эпигенетического статуса, а также высших уровней организации хроматина может помочь составить более полную картину процессов, происходящих в геноме.

Объектом данного исследования является локус генов теплового шока (hsp70) *D. melanogaster*. Эти гены кодируют белки семейства БТШ70, выполняющие в клетке защитные функции, препятствуя денатурации и агрегации белков. Известно, что гены теплового шока экспрессируются независимо от окружающего хроматина [13]. Мы исследовали вопрос о возможном механизме становления домена независимой экспрессии генов теплового шока на уровне петельной организации хроматина, в формировании которой могут принимать участие: яоДНК (нуклеотидные мотивы-«маркеры» прикрепления хромосом к ядерной оболочке (AAAGA)_n и (GAGA)_n), короткие «комплементарные» треки полипуринов/ полипиримидинов, а также инсуляторы этого локуса (scs/scs'-элементы) и их белки (BEAF32 и Zw5). В работе представлен анализ нуклеотидных последовательностей данного локуса, а также проведена попытка сопоставления его с имеющимися экспериментальными данными.

5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализировали локус 87A7 хромосомы, содержащий гены hsp70Aa и hsp70Ab *D. melanogaster* (3R: 11,904,163 .. 12,006,544) длиной 102382 п.н. (FlyBase, release 6,0).

Поиск нуклеотидных последовательностей, способных образовывать 3-х цепочечные структуры ДНК проведен согласно следующим критериям: полипуриновые и полипиримидиновые треки должны быть потенциально способны формировать T(A.T), A(A.T), C(G.C) и G(G.C) триплексы длиной не менее 9 п.н. Для упрощения моделирования, проводили поиск "комплементарных" треков полипуринов и полипиримидинов на одной и той же нити ДНК. В работе использовали ресурсы NCBI, flybase.org, программу Vector NTI, а также конвертер разных версий flybase (http://flybase.org/static_pages/downloads/COORD.html). Анализ данных Hi-C проводили с помощью программы Juicebox.

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализировали хромосомный сегмент хромосомы 3 *D. melanogaster* (3R: 11,904,163 .. 12,006,544) длиной 102382 п.н., в котором локализируются 17 генов (от гена CG14731 до гена Ect3) (рис. 1). В этой области выявлено 152 трека полипиримидинов (Y) и 186 треков полипуринов (R) длиной не менее 9 п.н. (максимальный размер выявленных в данной хромосомной области треков

– 27 п.н.). Из них 120 треков полипиримидинов и 135 треков полипуринов потенциально способны взаимодействовать друг с другом с выпетливанием участка ДНК, расположенного между ними. Следует отметить, что большинство треков полипиримидинов и полипуринов потенциально могут взаимодействовать с несколькими «комплементарными» им треками, располагающимися в разных сайтах анализируемой области хромосомы 3.

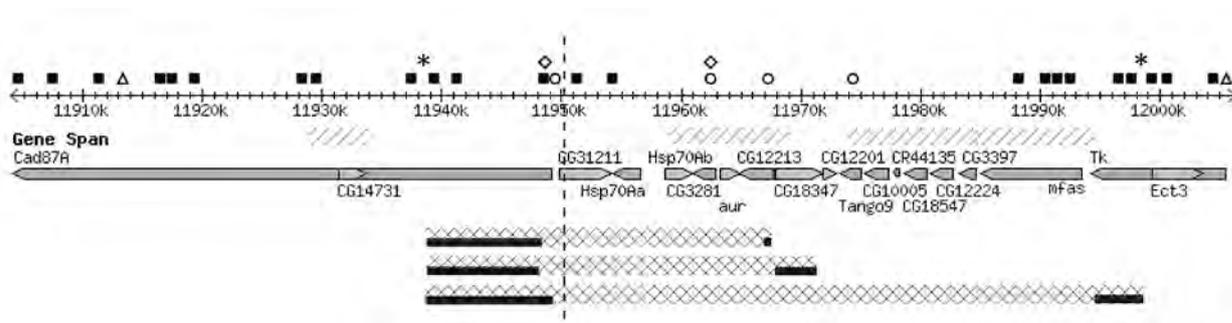


Рисунок 5.1 - Схема анализируемого локуса.

В этой области локализуются инсуляторы локуса генов *hsp70*: *scs*-элемент локализуется в области, перекрывающейся с промотором гена CG31211 (3R: 11,948,272..11,950,063) и включает в свой состав треки Y82-Y84 и R108-R110, которые имеют в исследуемой области 31 «комплементарный» им трек; *scs'*-элемент локализуется в области (3R: 11,962,738..11,963,832), перекрывающейся с промоторами генов CG3281 и *aur*. Эта область включает в свой состав треки R123, R124. На ресурсе flybase.org приведены данные о локализации в анализируемой области двух типов сайтов узнавания инсуляторными белками. Первый тип сайтов – инсуляторы класса II.mE01 (содержат сайты узнавания белком Su(Hw)): инсулятор_II_2339 и инсулятор_II_2340. Второй тип сайтов – инсуляторы класса I.mE01 (содержат сайты узнавания двумя из трех инсуляторных белков – CP190, BEAF32 и CTCF): инсулятор_I_3071, инсулятор_I_3072, инсулятор_I_3073, инсулятор_I_3074 (рис. 1).

В анализируемой нами области хромосомы 3R *D.melanogaster* выявлено большое количество одиночных треков GAGA и AAAGA, но их димеров выявлено только 10 и 2, соответственно (рис. 1). Размер хромосомной области, фланкированной димерами консервативного трека AAAGA, составляет около 60 т.п.н. (рис. 1). Следует отметить, что область локуса, ограниченная с обеих сторон треками (AAAGA)₂, находится внутри области, ограниченной с обеих сторон сайтами связывания инсуляторным белком Su(Hw). В свою очередь, сайты связывания инсуляторными белками CP190, BEAF32 и CTCF локализуются внутри области, ограниченной треками (AAAGA)₂. При этом большая часть треков (GAGA)₂ располагается внутри области, ограниченной с обеих сторон треками (AAAGA)₂.

Первый вопрос, который нас интересовал, – может ли вся хромосомная область, расположенная между двумя консервативными димерами AAAGA, образовать петлю при участии

3-х цепочечных структур ДНК? Оказалось, что потенциально это возможно, причем вариантов таких петель – 11. Между генами CG14731 и CG31211 располагается участок длиной около 10,5 т.п.н. (3R: 11,938,828..11,949,416), в котором локализуются 4 трека полипиримидинов и 14 треков полипуринов, имеющих «комплементарные» им треки полипуринов (4) и полипиримидинов (7) в области между генами *mfas* и *Ect 3* длиной около 4 т.п.н. (3R: 11,994,767..11,998,654). Размер таких потенциальных петельных структур около 60 т.п.н. Интересно, что области, потенциально способные формировать такие петельные структуры, фланкируются консервативными (AAAGA)₂ треками, а также обогащены треками поли-А и поли-Т (рис. 1).

Гены *hsp70Aa* и *hsp70Ab* могут оказаться в петле и меньшего размера (около 30 т.п.н.). При этом потенциально могут образоваться две петельные структуры. Первая петля: 6 треков, локализующихся между генами CG14731 и CG31211 (область 11,938,916..11,948,717), имеют 4 «комплементарных» трека в гене CG12213 (область 11,967,091..11,967,605). В этом случае в петле оказываются гены CG31211, *hsp70Aa*, *hsp70Ab*, CG3281, *aurora*. Вторая петля: 11 треков, локализующихся между генами CG14731 и CG31211 (область 11,938,828..11,948,218), имеют 5 «комплементарных» треков в гене CG18347 (область 11,968,206..11,971,622). При этом в петле оказываются гены CG31211, *hsp70Aa*, *hsp70Ab*, CG3281, *aurora*, CG12213. Поскольку треки между генами CG14731 и CG31211 во многом перекрываются, то реализоваться потенциально, очевидно, может либо одна, либо другая петля (рис. 1).

Интересно, что треки полипуринов/полипиримидинов, расположенные в 5'-области локуса, при формировании единой петли анализируемого хромосомного участка и петли меньшего размера также перекрываются друг с другом (рис. 1). Это означает, что при формировании петли меньшего размера (обособление генов *hsp70Aa* и *hsp70Ab*) должно происходить разрушение петли большего размера, и наоборот, формирование «большой» петли может сопровождаться разрушением петли меньшего размера. Возможно, разрушение петли большего размера проявляется на цитологическом уровне в виде пуффинга. При этом *scs*- и *scs'*-элементы физически оказываются внутри деконденсированной области хроматина. Это следствие из нашего моделирования соответствует некоторым экспериментальным данным. Во-первых, при тепловом шоке *scs*- и *scs'*-элементы выявляются внутри пуффа, а не на границах деконденсированного и конденсированного хроматина. Во-вторых, консервативные треки AAAGA выявлены на границе диск/междиск при FISH-анализе политенных хромосом *D. melanogaster* (неопубликованные данные). Можно предполагать, что формирование домена активных генов *hsp70* осуществляется в два этапа. На первом этапе формируется петля при участии треков полипуринов/полипиримидинов (возможно образование двух типов петель), а на втором этапе принимают участие белки *scs/scs'*-элементов BEAF32 и Zw5 (рис. 2). Этап 1. При формировании первой петли (см. выше) в ней оказываются гены CG31211, *hsp70Aa*, *hsp70Ab*, CG3281, *aurora*. При

формировании второй петли (см. выше) в ней оказываются гены CG31211, hsp70Aa, hsp70Ab, CG3281, aurora, CG12213. Поскольку треки между генами CG14731 и CG31211 во многом перекрываются, то реализоваться потенциально может либо одна, либо другая петля.

Этап 2. При формировании петельной структуры на этапе 1, scs- и scs'-элементы оказываются на достаточно небольшом расстоянии друг от друга (сближены в объеме ядра). Возможно, это улучшает условия для взаимодействия белков BEAF32 и Zw5, которое показано *in vitro* и *vivo* [14]. Формируется петля в петле (рис. 2). При этом происходит инактивация генов CG31211, CG3281 и aurora. Это связано с тем, что сайт связывания белка BEAF32, который специфически связывается с scs'-элементом, перекрывается с сайтом связывания транскрипционного фактора DREF в промоторах генов CG3281 и aurora [15]. Вероятно, что-то похожее может лежать в основе инактивации гена CG31211, поскольку scs-элемент, с которым специфически связывается белок Zw5, перекрывается с промотором этого гена. Таким образом, в первой петле, образованной при участии треков полипуринов/ полипиримидинов, в активном состоянии могут быть только гены hsp70Aa и hsp70Ab. Во второй петле, образованной при участии треков полипуринов/ полипиримидинов, инактивация генов CG31211, CG3281 и aurora может осуществляться таким же образом. Изоляция гена CG12213 от генов hsp70Aa и hsp70Ab может осуществляться благодаря тому, что он оказывается между основаниями петель, образованными триплексными структурами ДНК и белком BEAF32 (рис. 2).

Для анализа данных о TADs дрозофила мы воспользовались материалами, полученными Секстоном и соавт. [3]. Оказалось, что исследуемый локус входит в состав двух физических доменов, граница между которыми локализуется перед генами hsp70Aa и hsp70Ab. При этом она оказывается внутри как «малых», так и «большой» петель хроматина, образованных ДНК-ДНК взаимодействиями. Данные Hi-C (TADs) говорят о том, что области частых внутридоменных взаимодействий локализуются внутри петли генов hsp70Aa и hsp70Ab (независимо от варианта образования петли), в районе инсуляторов класса ImE01 и scs'. Еще один участок, характеризующийся повышенной частотой контактов, локализуется в большой петле, в формирование которой вовлекаются консервативные треки (AAAGA)₂.

Результаты нашего моделирования свидетельствуют о том, что короткие треки полипуринов/полипиримидинов могут вовлекаться в петельную организацию хромосомного локуса генов hsp70 *D. melanogaster*. Наиболее значимыми нуклеотидными последовательностями для определения домена в локусе 87A7 оказались треки (AAAGA)₂. Эти тандемные треки обладают необычайно высокой эволюционной консервативностью, в геномах разных организмов (включая *D. melanogaster*) локализуются, в основном, в межгенных участках и на границах диск/междиск в политенных хромосомах дрозофила.

Вся область локуса, расположенная между двумя треками (AAAGA)₂, может быть организована в петли при участии «комплементарных» треков полипуринов/ полипиримидинов (рис. 1, 2). Более того, внутри этой области потенциально может формироваться большое количество петель меньшего размера при участии «комплементарных» треков полипуринов и полипиримидинов. По своим размерам (около 60 т.п.н.) и большому количеству внутридоменных потенциальных взаимодействий (из 186 треков полипуринов 135 треков имеют «комплементарные» треки полипиримидинов (72,6%); в свою очередь, из 152 треков полипиримидинов 120 треков имеют «комплементарные» треки полипуринов (78,9%)) эти домены могут соответствовать TADs хромосом дрозофилы. Мы предполагаем, что TAD может соответствовать области интерфазной хромосомы, расположенной между двумя участками «заякоревания» интерфазной хромосомы на ядерной оболочке (в данном конкретном случае – между двумя эволюционно консервативными димерами AAAGA).

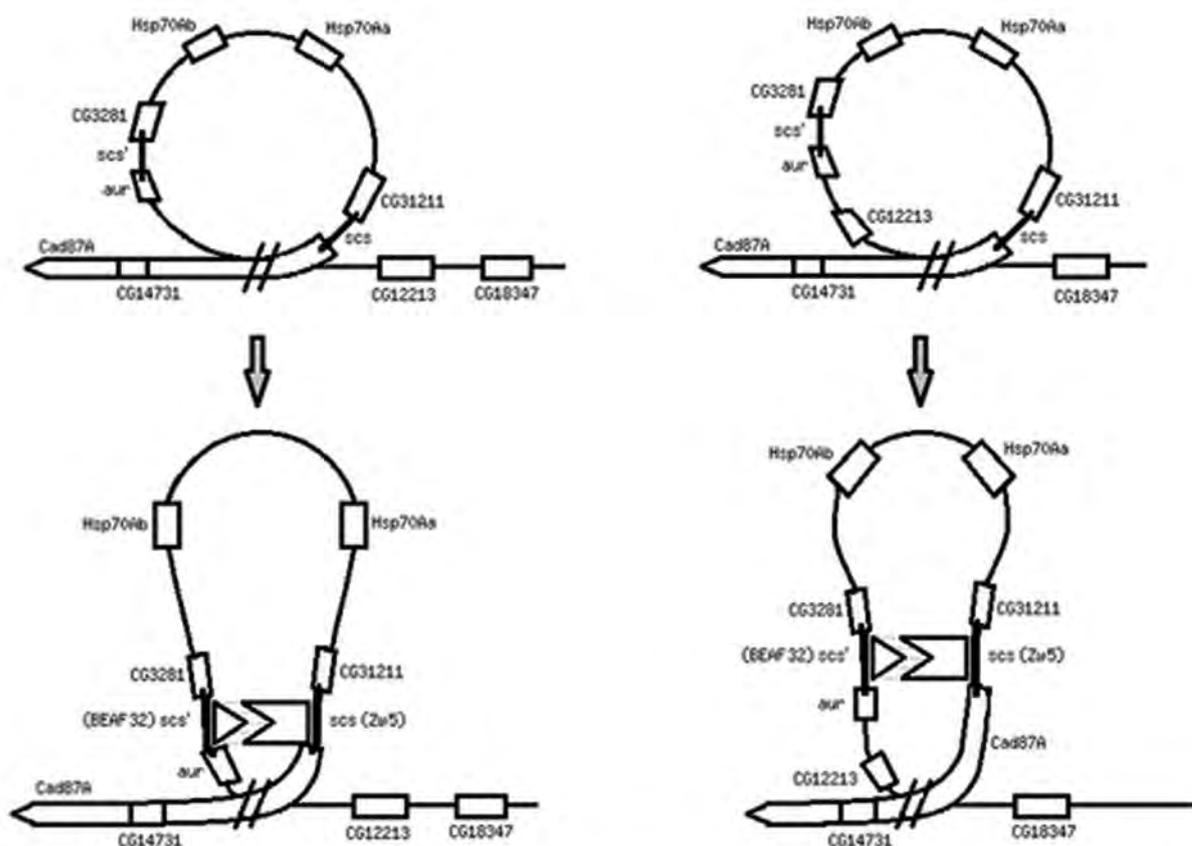


Рисунок 5.2 - Два варианта петлевых структур, включающих гены *hsp70*, формирующихся с участием трёхцепочечной ДНК которые могут.

Сопоставление наших данных и данных Секстона с соавторами [3] (рис. 1) показывает, что в исследуемом локусе располагаются два физических домена, граница между которыми локализуется внутри области «малых» петель («функциональный» домен генов *hsp70*). Оба физических домена, включающих в себя локус 87A7, имеют статус «неактивный домен». Это

объясняется тем, что в клетках эмбрионов дрозофилы, которые были использованы в [3], гены теплового шока неактивны, то есть находятся в компактном состоянии, что может ограничивать их взаимодействие с соседними областями. Кроме того, компактное состояние этой области может препятствовать взаимодействиям флакирующих их областей. Следует отметить, что архитектура хроматина конкретного локуса, как и его функциональное состояние, могут быть ткане- и стадияспецифичными, поэтому при интерпретации результатов необходимо учитывать эти особенности.

По данным Hi-C [3] две области частых внутридоменных взаимодействий (TADs) из трех исследуемом локусе локализуются внутри участка, ограниченного с обеих сторон консервативными треками (AAAGA)₂. При этом более частые взаимодействия происходят между участками, которые могут быть вовлечены в формирование как «большой», так и «малых» петель хроматина в локусе 87A7, при участии прямых ДНК-ДНК взаимодействий. То есть повышенная частота контактов наблюдается в участках хроматина, организованных в виде петель. Эти данные также согласуются с тем, что TAD может соответствовать области интерфазной хромосомы, расположенной между двумя участками «заякоревания» интерфазной хромосомы на ядерной оболочке.

В локусе 87A7 между консервативными треками (AAAGA)₂ локализуется большое количество дифференциально экспрессирующихся генов (рис. 1). В формировании функционального домена генов hsp70 (длиной около 30 т.п.н.) могут участвовать короткие треки полипуринов и полипиримидинов, а также инсуляторы (scs/scs'-элементы) и их белки (BEAF32, Zw5). Возможно, «большая» петля (60 т.п.н.) и «малая» петля (30 т.п.н.) являются альтернативными состояниями хроматина в локусе 87A7, т.к. в 5'- области локуса треки полипуринов/ полипиримидинов, участвующие в формировании «большой» и «малой» петель, перекрываются друг с другом.

Не исключено, что инсуляторы наиболее полно выполняют функцию формирования функционального домена генов hsp70 в пределах таких хромосомных доменов, а их «работа» за пределами таких доменов может быть затруднена. В пользу этого предположения свидетельствуют наши экспериментальные данные с использованием дигенной трансгенной системы (гены yellow и white дрозофилы). Мы показали, что фрагменты яДНК (EnvM4), фланкирующие два репортерных гена, способны защищать их от эффекта положения в «хозяйских» хромосомах *D. melanogaster*. Максимальный защитный эффект мы наблюдали в присутствии инсулятора Wari (расположенного в 3'- области гена white). В том случае, когда яДНК фланкируют только один из репортерных генов (white + Wari), именно этот ген оказывается защищен от эффекта положения в большей степени, чем другой ген (yellow), не фланкированный фрагментами яДНК [6, 16].

Результаты моделирования петельной организации хроматина локуса 87A7 позволяют логично объяснить некоторые экспериментальные факты. Во-первых, *scs/scs'*-элементы не способны защитить трансген от эффекта положения при его интеграции в гетерохроматин [17]. Это может быть обусловлено тем, что трансгенные системы являются искусственными и могут не содержать в своем составе необходимый набор хромосомных элементов, обеспечивающих формирование домена независимой экспрессии трансгена. Кроме того, области, в которые интегрирует трансген, являются «чужими» и могут не содержать, например, «комплементарных» треков полипуринов/полипиримидинов, необходимых для формирования петельных структур. Так, согласно результатам моделирования петельной организации хроматина локуса 87A7, в формирование домена независимой экспрессии генов *hsp70* могут вовлекаться участки связывания хромосомы с ядерной оболочкой, короткие «комплементарные» треки полипуринов/полипиримидинов, а также *scs/scs'*-инсуляторы и их белки (*Zw5*, *BEAF32*) – всего 3 элемента. В случае экспериментальной трансгенной системы (гены *yellow* и *white*), в формирование домена независимой экспрессии трансгенов вовлекаются участки связывания хромосомы с ядерной оболочкой и инсулятор *Wari* – всего 2 элемента [6, 7, 16].

Во-вторых, *scs/scs'*-элементы локализуются не на границах пуффа, а внутри него при активации генов теплового шока. Результаты нашего моделирования говорят о том, что при активации генов теплового шока формируется «малая» петля (гены *hsp70*) внутри «большой» развернутой петли (пуффа??). В пользу этого предположения свидетельствует то, что в политенных хромосомах *D. melanogaster* консервативный трек $(AAAGA)_n$ выявляется по данным FISH на границах диск/ междиск. Барьерная функция *scs/scs'*-элементов ставится под сомнение также в связи с тем, что *scs/scs'*-элементы перекрываются с промоторами соседних генов: в состав *scs*-элемента входит промотор гена *CG31211*, в состав *scs'*-элемента – промоторы генов *CG3281* и *auroga* (FlyBase database). В частности, белки *BEAF32* (инсуляторный белок) и *DREF* (белок-активатор транскрипции) имеют множество сайтов взаимодействия в хромосоме дрозофилы, и примерно в 50% случаев они перекрываются [17, 18]. Показаны их конкурентные взаимоотношения за сайты «посадки» на ДНК [15]. Возможно, перекрывание сайтов белка инсулятора и белка-активатора транскрипции соседних генов является одним из механизмов функционального обособления генов *hsp70*, в основе которого могут быть отношения между инсуляторным белком и белком-активатором транскрипции наподобие взаимоотношений репрессор – активатор.

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ *in silico* функциональной роли разных типов петельных структур интерфазного хроматина локуса генов теплового шока (*hsp70*) *D. melanogaster*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что формирование домена независимой экспрессии генов теплового шока *hsp70* может быть двух этапным процессом, в который вовлечены как специфические участки хромосомной ДНК, так и инсуляторные белки, а также внутриядерные структуры (ядерная оболочка). Комбинаторика взаимодействия этих элементов может определять то или иное состояние хромосомного локуса и генов, входящих в этот локус. Более того, одно и то же структурное и функциональное состояние хромосомного локуса может быть реализовано несколькими вариантами ДНК-ДНКовых взаимодействий, что может лежать в основе саморегуляции локуса, а в более широком смысле – «устойчивости» генетического аппарата.

5.1.5 ССЫЛКИ

1. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. // *Science*. 2002. V. 295. P. 1306-1311.
2. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. // *Nature*. 2012. V. 485. P. 376-380.
3. Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E. et al. // *Cell*. 2012. V. 148. P. 458-472.
4. Rao S.S.P., Huntley M.H., Durand N.C. et al. // *Cell*. 2014. V. 159. P. 1665-1680.
5. Dekker J., Heard E. // *FEBS Letters*. 2015. V. 589. P. 2877-2884.
6. Шабарина А.Н., Шостак Н.Г., Глазков М.В. // *Генетика*. 2010. Т.46. № 9. С. 1175-1177.
7. Шабарина А.Н., Глазков М.В. // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 8. С. 1012-1016.
8. Глазков М.В., Дрозд С.Ф., Полтараус А.Б. // *Генетика*. 1999. Т. 35. № 2. С. 266-270.
9. Шабарина А.Н., Прилепа Е.И., Глазков М.В. // *Генетика*. 2006. Т. 42. № 7. С. 879-886.
10. Onishchenko G.E., Chentsov Iu.S. // *Tsitologiya*. (Moscow). 1974. V. 16. № 6. P. 675-678.
11. Tsanev R., Tsaneva I. // *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 1986. V. 12. P. 63-104.
12. Zullo J.M., Demarco I.A., Piqué-Regi R. et al. // *Cell*. 2012. V. 149. P. 1474-1487.
13. Naumova N., Imakaev M., Fudenberg G. et al // *Science*. 2013. V. 342. P. 948-953.
14. Blanton J., Gaszner M., Schedl P. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 664-675.
15. Hart C.M., Cuvier O., Laemmli U.K. // *Chromosoma*. 1999. V. 108. P. 375-383.
16. Шабарина А.Н., Глазков М.В. // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 1. С.30-36.
17. Jiang N., Emberly E., Cuvier O., Hart C.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 3556-3568.
18. Negre N., Brown C.D., Shah P.K. et al. // *PLoS Genetics*. 2010. V. 6(1): e1000814. doi:10.1371/journal.pgen.1000814.

5.1.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

- 1 Шабарина А. Н., Глазков М. В. Барьерные элементы хроматиновых доменов генов и ядерная оболочка // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 1. С.30-36.

- 2 *Глазков М.В., Шабарина А.Н.* Петельные структуры хроматина и функциональная единица генов HSP70 локуса 87A7 *D.melanogaster* // Abstr. of the International Conference «Chromosoma 2015». Новосибирск. August 24-28, 2015. С. 78-79.
- 3 *Дрозд С.Ф., Сурков С.А., Глазков М.В.* Некоторые характеристики трансгенных клонов ЭСК (R1) мыши // Известия РАН. Серия биол. 2016. No. 4. С. 341–347.
- 4 *Glazkov M.V., Shabarina A.N.* Loop structures and barrier elements from *D. melanogaster* 87A7 heat shock locus // Computational Molecular Bioscience. 2016. V. 6. P. 53-65. DOI: 10.4236/cmb.2016.64005.

РАЗДЕЛ 6 Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений

6.1 ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на многолетнее широкое использование глифосата в растениеводстве, природная устойчивость к нему встречается достаточно редко [1-3]. Поэтому необходимо получить растение, устойчивое к действию этого гербицида.

Планируется клонировать ген *epsps* из бактерии *A. tumefaciens* линии CP4, определяющий устойчивость растений к гербициду глифосат. Глифосат ингибирует 5-енолпирувиллицикат-3-фосфат синтазу (EPSPS) растений. EPSPS - фермент шикиматного пути, локализованного в хлоропластах, в результате которого происходит биосинтез ароматических аминокислот. В настоящее время гербицид глифосат широко используется во всем мире. Это обусловлено его высокой эффективностью, дешевизной и низкой токсичностью.

6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали различные методы трансформации пшеницы. Оптимизированы протоколы трансформации мягкой пшеницы посредством *Agrobacterium tumefaciens*, а также разработаны и используются с 2006 года собственные методы биобаллистической трансформации пшеницы. Определены и оптимизированы ключевые факторы, влияющие на эффективность (частоту) трансформации. Незрелые зародыши, выделенные из растений, выращенных в поле и теплице, были предварительно подвергнуты холодовому и осмотическому шокам, прекультивированию и совместному культивированию со штаммом *A. tumefaciens* AGL1, несущим вектор pCAMBIA1304:OsGATA. В качестве селективного гена использовали ген *hptII*, определяющий устойчивость к гигромицину, в качестве маркерного использовали ген *uidA* (*gus*) (рис. 1).



Рисунок 6.1 - Транзиентная экспрессия маркерного гена *uidA* при трансформации незрелых зародыше пшеницы.

Селекцию трансгенных проростков проводим на стадии регенерации. Достигнутая частота трансформации составила 2-3,2%. Впервые получены трансгенные растения продуктивных сортов пшеницы российской селекции методом агробактериальной трансформации.

6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена серия экспериментов по трансформации сортов мягкой озимой пшеницы Донская Лира, Юнона и Дея. Используются конструкции *WRKY71/TaDREB3* и *psGFP/BAR*. Генетическая конструкция *WRKY71/TaDREB3* содержит ген *TaDREB3*, обуславливающий повышение морозостойкости растений, под контролем холод индуцибельного промотора *WRKY71*, конструкция *psGFP/BAR* содержит ген *bar*, обуславливающий устойчивость к фосфинотрицину - действующему компоненту гербицида БАСТА (рис. 2).

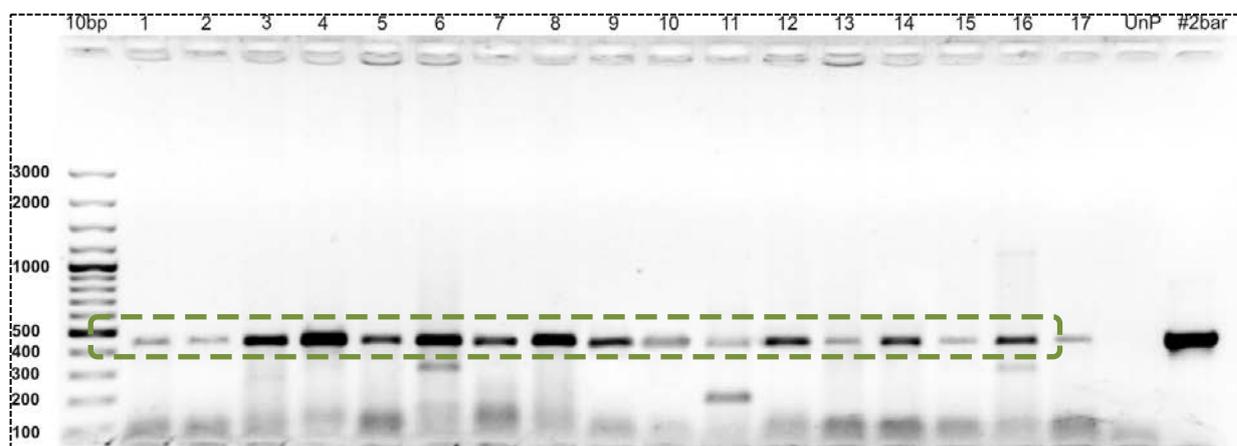


Рисунок 6.2 - Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов на наличие гена *bar* в побегах пшеницы сорта Злата, трансформированных ДНК с геном *bar*.

Дорожки: 1-17 - ПЦР на препаратах ДНК из трансформированных линий; #2bar - положительный контроль, продукт ПЦР на плазмидной ДНК (0,1 нг/реакцию), использованной для трансформации растений; UnP - отрицательный контроль ПЦР на препаратах ДНК из нетрансформированных растений; 100 bp - маркер размера (GeneRuler 100 bp, ThermoScientific).

Получены трансгенные линии клеток, растущие на селективной среде для регенерации растений, содержащей 13 мг/л гигромицина В. Впервые получено более 30 трансгенных событий у продуктивных сортов российской яровой пшеницы сортов Злата и Эстер: введен ген транскрипционного фактора *OsGATA*, индуцируемый засолением, и продуктивных сортов российской озимой пшеницы Дея и Линия 1, введен ген *TaDREB3*, повышающий морозостойкость, под контролем холод индуцибельного промотора *pWRKY71*.

Полученные линии яровой пшеницы исследуются на повышение устойчивости к засолению и засухе, а озимые пшеницы на повышения морозоустойчивости (рис. 3).

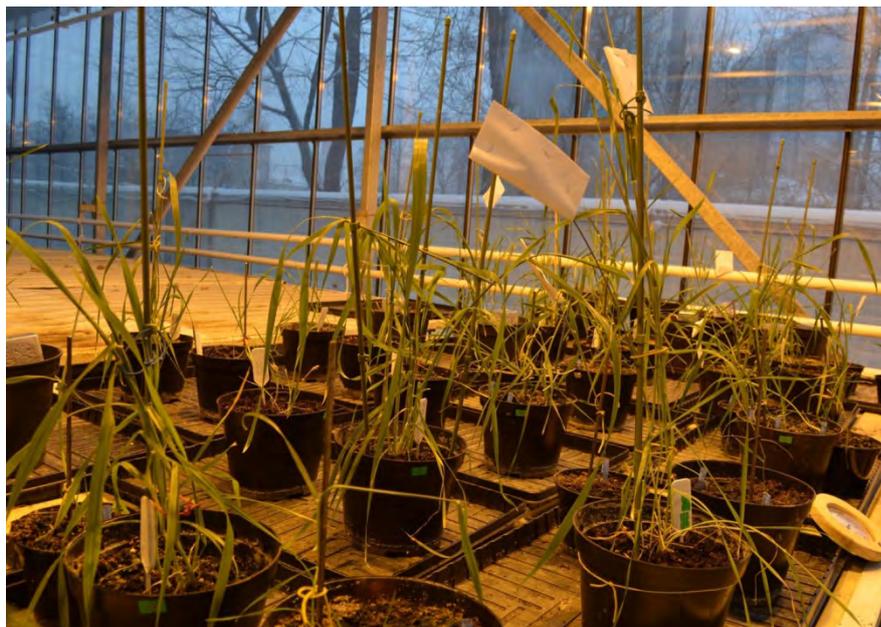


Рисунок 6.3 - Растения-трансформанты в теплице

6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получено более 30 трансгенных событий у продуктивных сортов российской яровой пшеницы сортов Злата и Эстер: введен ген транскрипционного фактора OsGATA, индуцируемый засолением, и продуктивных сортов российской озимой пшеницы Дея и Линия 1, введен ген TaDREB3, повышающий морозостойкость, под контролем холод индуцибельного промотора pWRKY71.

Полученные линии яровой пшеницы исследуются на повышение устойчивости к засолению и засухе, а озимые пшеницы на повышения морозоустойчивости.

6.5 ССЫЛКИ

1. Wang J.W., Lu H. et al. // Zhejiang. Environ. Sci. (Chinese).2003. V.1. P.40-41.
2. Castle L. A., Daniel L. S., Gorton R. et al. // Science. 2004. V. 304. P. 1151–1154.
3. Pedotti M., Rosini E., Molla G. et al. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 36415–36423.

6.6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. Шульга О.А., Нескородов Я.Б., Щенникова А.В., Гапоненко А.К., Скрыбин К.Г. Эктопическая экспрессия гена NAM59 в подсолнечнике (*Helianthus annuus* L.) вызывает гомеозисные изменения репродуктивных органов цветка // Доклады Академии наук, в печати.
2. Gaponenko A.K. Necessity of the new technologies for sustainable agriculture and biosynthesis of pharmaceutically and industrially valuable materials and polymers in plants // V International Conference on Biotechnology and Pharmaceuticals FiztehBio - 2015, 29-30 April 2015, Moscow.
3. Gaponenko A.K. and A.A. Solovyov. Genetically modified wheat - Status and Prospects // VIII Moscow International Congress on Biotechnology: State and Prospects for Development 17-20 March 2015.

РАЗДЕЛ 7 Регуляция активности генов и процессы онтогенеза

7.1. Изучение репликации бакуловирусов в клетках эукариот

7.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Бакуловирусы применяются в биотехнологии для получения рекомбинантных белков, в медицине для получения вакцин и в сельском хозяйстве для борьбы с насекомыми вредителями. В последние годы бакуловирусы рассматриваются как перспективные векторы для генной терапии. Изучение биологии бакуловирусов имеет значение для фундаментальной науки и необходимо для практического применения вирусных препаратов. Современный уровень исследования бакуловирусов наиболее полно отражен в монографии Rohrmann G.F. [1]. В проводимых в лаборатории биохимии ИБР РАН исследованиях основное внимание уделяли анализу влияния вирусов на системы контроля клеточного протеома – белки-шапероны и убиквитин-протеасомную протеолитическую систему клеток. Ранее нами показано, что вирусы вызывают в клетках защитную реакцию, подобную реакции на тепловой шок, которая сопровождается индукцией синтеза шаперонов (белков теплового шока) семейства HSP/HSC70. В течение 2013-2016 гг. исследовали функцию шаперонов HSP/HSC70 и убиквитин-протеасомной системы на разных этапах инфекционного цикла бакуловирусов.

7.1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на классической экспериментальной модели клеток листовой кукурузной совки *Spodoptera frugiperda* (Sf9), инфицированных вирусом ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV). В ходе выполнения работы использовали современные методы биохимии, молекулярной биологии и цитологии: 1. Методы культивирования клеток насекомых и пассирования бакуловирусов; 2. Методы протеомного анализа (2D-электрофорез белков, масс-спектрометрия, MASCOT анализ пептидов); 3. Методы определения количества вирусной ДНК с помощью ПЦР в реальном времени (Real-time PCR); 4. Методы фракционирования белков с помощью ПААГ-электрофореза и их идентификации с помощью Вестерн-блоттинга; 5. Методы цитоиммунохимии с применением конфокальной микроскопии и флуоресцирующих антител; 6. Метод выделения протеасом из клеток насекомых с использованием аффинных сорбентов; 7. Методы ингибиторного анализа с использованием фармакологических препаратов; 8. Метод высокоразрешающей электронной микроскопии (Single particle electron microscopy); 9. Методы статистической обработки результатов (t-критерий Стьюдента и др.). В ходе работы применяли модификации известных методов и препараты антител, в том числе полученные исполнителями проекта.

7.1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период 2013-2016 гг. получены следующие важнейшие результаты:

1. Показано, что инфицирование вирусом AcMNPV вызывает накопление в клетках Sf9 белков, модифицированных убиквитином, что свидетельствует об индукции протеотоксичного стресса в результате вирусной инфекции. Убиквитинированные белки формируют в цитоплазме инфицированных клеток комплексы с БТШ семейства HSP/HSC70. Эти комплексы подобны агресомам (aggresomes), которые формируются в клетках эукариот в ответ на стрессовые воздействия. Ингибирование активности протеасом в инфицированных клетках с помощью лактоцистина приводит к задержке инициации репликации вирусного генома и значительному увеличению содержания убиквитинированных белков в клетках. Сделан вывод о том, что функция клеточных протеасом важна на ранних стадиях инфекционного цикла. Протеасомы играют важную роль в гидролизе убиквитинированных белков в инфицированных клетках и противодействуют протеотоксичному стрессу. Опыты с ингибиторами лизосом показали вспомогательную роль этих органелл в гидролизе убиквитинированных белков в инфицированных клетках. По результатам работы опубликована статья в журнале *Virology* (Lyupina et al., *Virology* 2013, 436, 49).

2. Показано, что VER-155008, специфический ингибитор АТФазной и шаперонной активности белков семейства HSP/HSC70, эффективно подавляет репликацию вирусного генома и продукцию зрелых вирионов BV (BuddedVirions) в клетках Sf9, если добавлен на ранней фазе инфекционного цикла (0 или 6 ч после инфицирования). Ингибитор подавлял также клеточный ответ на вирусную инфекцию типа HSR (Heat Shock Response), который сопровождается индукцией белков теплового шока. Однако, если VER-155008 добавлен к инфицированным клеткам до окончания фазы репликации вирусного генома (16 или 24 ч), то продукция зрелых вирионов BV и их выход из клеток (32-48 ч) одинаковы как в присутствии VER-155008, так и в отсутствие ингибитора.

Эти опыты позволили сделать важный вывод о роли шаперонов семейства HSP/HSC70 в инфекционном цикле бакуловирусов - активность белков HSP/HSC70 необходима на ранних стадиях инфекционного цикла, однако созревание вирусных частиц и их выход из инфицированных клеток не требуют активности этих шаперонов. Данные наблюдения и выводы послужили основой для статьи в журнале *VirusResearch* (Lyupina et al., *Virus Res.* 2014, 192, 1).

3. Из клеток Sf9 выделен с помощью иммунного аффинного метода препарат очищенных 26S протеасом. Проведена физико-химическая характеристика 26S протеасом клеток Sf9 с помощью электронной микроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле в нативных условиях (рис. 1). Показано сохранение протеолитической активности в препарате очищенных 26S протеасом. Определен субъединичный состав 26S протеасом клеток Sf9 методами протеомного анализа (двумерный электрофорез в полиакриламидном геле, масс-спектрометрия MALDI-TOF, идентификация белков с помощью поиска гомологов в биоинформационных базах программой

Mascot Search). Идентифицированы 14 белков составляющих «коровую» 20S протеасому (7 субъединиц альфа-типа и 7 субъединиц бета-типа) и 20 субъединиц регуляторной 19S частицы RP (11 субъединиц RPN-типа, 6 субъединиц RPT-типа, 2 деубиквитиназы и тиоредоксин). Аналогичные двумерные карты белков 26S протеасом из контрольных и инфицированных вирусом AcMNPV клеток (48 ч после инфицирования) свидетельствуют о сохранении структуры клеточных 26S протеасом в ходе инфекционного цикла вируса. При этом отмечено появление новых минорных форм у нескольких субъединиц.

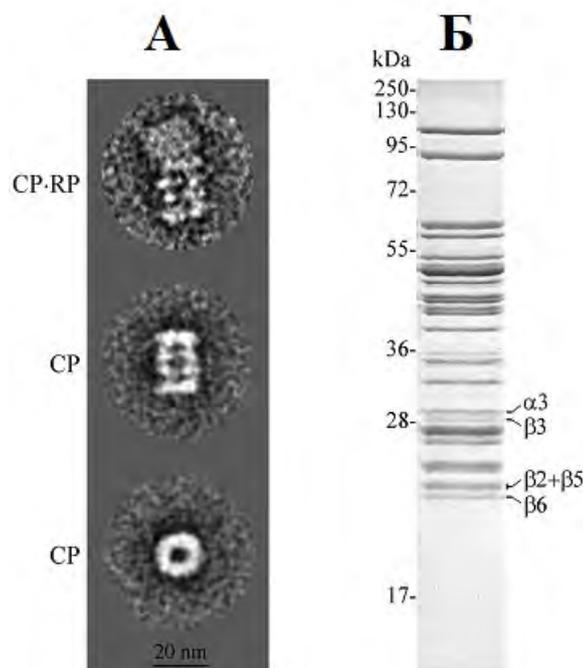


Рисунок 7.1.1 - (А) Электронная микрофотография протеасом клеток Sf9: 26S-протеасома (CP-RP) и 20S-протеасома (CP – вид сбоку и сверху). (Б) Разделение субъединиц 26S протеасом в полиакриламидном геле в присутствии SDS.

Существенная порция клеточного фонда субъединицы альфа5(zeta), предположительно не связанная с протеасомами, претерпевает протеолиз на поздних стадиях инфекционного цикла. По результатам работы опубликована статья в журнале *BiochimBiophysActa* (Lyupina et al., *BiochimBiophysActa*. 2016; 1864(6):738).

7.1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы получены оригинальные данные о влиянии бакуловирусов на системы контроля клеточного протеома, белки-шапероны и убиквитин-протеасомную протеолитическую систему клеток. Полученные результаты отвечают мировому уровню и имеют приоритетный характер. Установлена роль шаперонов и протеасом на разных стадиях инфекционного цикла бакуловирусов. Из клеток насекомых впервые выделены и охарактеризованы 26S протеасомы.

Впервые построена двумерная карта белков 26S протеасом насекомых в полиакриламидном геле и проведена идентификация субъединиц протеасом методами протеомного анализа. Впервые проведен протеомный анализ протеасом в клетках насекомых, инфицированных бакуловирусом. Проведенное исследование приближает уровень исследования убиквитин-протеасомной системы насекомых к наиболее исследованным моделям – клеткам дрожжей и млекопитающих.

7.1.5 ССЫЛКИ

1. *Rohrmann G.F.* Baculovirus // *Molecular Biology*, third ed. -2013 [Internet] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24479205>).

7.1.6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. *Lyupina Y.V., Abaturova S.B., Erokhov P.A., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Mikhailov V.S.* Proteotoxic stress induced by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells // *Virology*. – 2013. - V. 436. - P. 49-58.
2. *Lyupina Y.V., Orlova O.V., Abaturova S.B., Beljelarskaya S.N., Lavrov A.N., Mikhailov V.S.* Egress of budded virions of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus does not require activity of *Spodoptera frugiperda* HSP/HSC70 chaperones // *Virus Res*. – 2014. - V. 192 - P. 1-5.
3. *Lyupina Y.V., Zatsepina O.G., Serebryakova M.V., Erokhov P.A., Abaturova S.B., Kravchuk O.I., Orlova O.V., Beljelarskaya S.N., Lavrov A.I., Sokolova O.S., Mikhailov V.S.* Proteomics of the 26S proteasome in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the nucleopolyhedrovirus, AcMNPV // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – V. 1864. - P. 738-746.
4. *Люпина Ю.В., Ерохов П.А., Становова М.В., Абатурова С.Б., Косевич И.А., Шарова Н.П., Михайлов В.С.* Особенности функционирования протеасом в клетках насекомых и полихет при инфицировании вирусами и патогенами // *Acta Naturae*. - 2016. - Спецвыпуск Т. 1. - С. 208-209.

7.2.1 Исследование влияния перестроек хроматина на взаимодействие хроматина с SET доменами метилтрансфераз гистонов

Метилтрансферазы гистонов являются ключевыми факторами поддержания стабильно наследуемого профиля активности генов, сформированного при дифференциации клетки. Специфически модифицируя гистоны за счет метилтрансферазного домена «SET», метилтрансферазы размечают хроматин на «активный» и «неактивный» - этот «метильный код» активности генов далее считывается системой транскрипции клетки. Не вполне ясно, однако, как при этом метилтрансферазы гистонов определяют каким же должен быть требуемый статус активности гена. Мы обнаружили, что домен SET способен избирательно и прочно связываться с нуклеосомными интермедиатами активного хроматина. Это позволяет предположить, что наряду с другими регуляторными цепочками, SET-содержащие белки могут непосредственно узнавать ранее запрограммированное (активное или неактивное) состояние хроматина.

7.2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали комплекс стандартных биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов. Использовались в основном, стандартные биохимические и генно-инженерные методы, такие как: (1) реконструкция нуклеосом из очищенных (в т.ч. модифицированных) гистонов и ДНК, содержащей один или несколько различно расположенных участков связывания нуклеосом (последовательности ДНК с повышенной аффинностью к октамеру гистонов); (2) оценка структуры нуклеосом с помощью гидролиза ДНКазой I, микрококковой нуклеазой и эндонуклеазами рестрикции а также посредством изучения профиля миграции образцов нуклеосом в полиакриламидных гелях (3) оценка связывания нуклеосом с метилтрансферазным доменом SET используя иммобилизованные SET полипептиды ассоциированные с остатком глутатион-трансферазы («GST-pull down assay»), и другие схожие методы. Для проведения перестроек нуклеосом использовали изолированные из дрожжей АТФ-зависимые факторы перестроек хроматина Isw1a/ Isw1b и др. Комплексы перестроек хроматина дрожжей функционируют по механизмам, схожим с механизмами функционирования их ортологов из высших эукариот, однако комплексы дрожжей, благодаря введенным аффинным лигандам, существенно проще приготовить в значимых количествах из экстрактов ядер *S. cerevisiae*. Как модель метилтрансфераз гистонов использовали экспрессированные в *E.coli* полноразмерный белок SET7 (366 аминокислот) и С-концевой фрагмент фактора ALL-1. Чтобы изучить влияние ацетилирования гистонов на связывание нуклеосом с SET доменом, для сборки нуклеосом использовали высокоацетилированные гистоны, изолированные из клеток CV1, обработанных ингибитором деацетилаз – антибиотиком Трикостатином А.

7.2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что взаимодействия между нуклеосомами могут обуславливать формирование динамического «активного» состояния хроматина. Предложен принципиально новый механизм формирования активной структуры хроматина. Разработана технология для недорогого и высокочувствительного твердофазного способа количественной оценки содержания белка в растворах (до 1 нг белка в пробе). Разработаны (а) технология «Способ активации генетических конструкций, внедренных в живые системы» (б) образец «Вектор для эффективной экспрессии клонированных генов». Изобретение относится к методам генной инженерии, биотехнологии, генотерапии, генной фармакологии.

7.2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены новые данные о молекулярных механизмах перестройках структуры хроматина активных генов «ремоделирующими» комплексами ISWI (в модельной системе *in vitro*), что оказалось критическим фактором регуляции активности генов эукариот. Оптимизирован метод твердофазного определения нанокolicеств белка в растворе с использованием прозрачного матрикса в качестве жесткой подложки (метод, играющий важную роль во внедрении биомедицинских нанотехнологий в практическую деятельность).

7.2.5 ССЫЛКИ

7.2.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

- 1 *Krajewski W.A.* Comparison of the Isw1a, Isw1b, and Isw2 nucleosome disrupting activities // *Biochemistry*. – 2013. - V. 52. – P.6940-6949.
- 2 *Krajewski W.A.* Isw1a does not have strict limitations on the length of extranucleosomal DNAs for mobilization of nucleosomes assembled with HeLa cell histones // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2014. – V. 32. - P. 523-531.
- 3 *Krajewski W.A.* Yeast Isw1a and Isw1b exhibit similar nucleosome mobilization capacities for mononucleosomes, but differently mobilize dinucleosome templates // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – V. 546. – P. 72-80.
- 4 *Krajewski W.A.* A simple and cost-effective solid-phase protein nano-assay using polyacrylamide-coated glass plates // *Analytical Biochemistry*. - 2015. - V.470. - P. 78–83.
- 5 *Krajewski W.A.* A composite agarose-polyacrylamide matrix as 2D hard support for solidphase protein assays // *Analytical Biochemistry*. - 2016. - V. 497. - P. 57–59.
- 6 *Krajewski W.A.* Mobilization of hyperacetylated mononucleosomes by purified yeast ISW2 *in vitro* // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 2016. - V. 591. - P. 1-6.
- 7 *Krajewski W.A.* On the role of internucleosomal interactions and intrinsic nucleosome dynamics in chromatin function // *Biochemistry and Biophysics Reports*. - 2016. - V. 5. - P. 492–501.

РАЗДЕЛ 8 Влияние химических мутагенов на морфогенез ряда сельскохозяйственных (рапс) и декоративных (петунья) растений

8.1. Влияние химических мутагенов на морфогенез рапса

8.1.1. ВВЕДЕНИЕ

Объекты исследования – мутантные растения рапса, петунии, сальпиглоссиса, полученные методом химического мутагенеза.

Рапс (*Brassica napus* L.) - важнейшая сельскохозяйственная культура, повсеместно возделываемая в условиях умеренного климата. Это важнейший источник растительного масла, содержащего более 60% C₁₈ ненасыщенных жирных кислот (олеиновой C18:1, линолевой C18:2, линоленовой C18:3), что делает его ценным продуктом питания. Стандартное рапсовое масло содержит 50—60% олеиновой, 18—22% линолевой и 12—15% линоленовой кислот. Высокое содержание C_{18:1} способствует его длительному хранению и устойчивости к высокой температуре при сильном нагревании. [1, 2] Жмых, который остается после отжима масла, используют на корм сельскохозяйственных животных и птицы, поскольку он сбалансирован по составу аминокислот, в том числе незаменимых и серосодержащих [3,4]. Кроме того, высокоолеиновые сорта (более 75%) используют в медицине, а также это идеальный материал для биодизеля. С другой стороны, линоленовая кислота с 3-мя ненасыщенными связями, быстро окисляется на воздухе и нестабильна при нагревании. Таким образом, основная задача селекции – увеличение содержания олеиновой кислоты до 75% и более и снижение количества линоленовой ЖК до 3% и менее [5]. Гены жирнокислотных десатураз FAD2 и FAD3 - основные гены контроля содержания олеиновой и линоленовой ЖК. Однако, геномная структура и распределение локусов двух генных семейств в амфидиплоиде *Brassica napus* еще не полностью изучены. Известно, что однонуклеотидная мутация (замена С на Т) по гену FAD2 генома А приводит к увеличению содержания олеиновой кислоты. В результате мутации формируется стоп-кодон (TAG), вследствие чего наступает преждевременная терминация синтеза пептидной цепи. Предполагается, что такой укороченный полипептид не функционирует, и дегидрирование олеиновой кислоты не происходит, что приводит к ее накоплению в мутантных линиях. Идентификация генотипов с высоким содержанием олеиновой и низким — линоленовой ненасыщенных жирных кислот в масле семян является одной из задач современной селекции рапса [6].

Кроме того, для промышленного выращивания требуются урожайные неполегающие компактные сорта с устойчивыми к растрескиванию стручками, поскольку вследствие полегания растений и растрескивания стручков теряется значительная часть - до 25-50% урожая [7]. Скороспелость также важна в связи с тем, что уборка таких сортов, как правило, приходится на сухой период, в то время как урожай сортов, созревающих во второй половине августа может

пострадать от дождей, нередких в это время. Устойчивость к растрескиванию стручков у рапса, как было установлено ранее – это рецессивный признак, обусловленный аддитивным действием генов [8]. Между тем, сам рапс не обладает достаточным потенциалом изменчивости [9], поэтому в селекционных программах часто используют химический мутагенез, который открывает новые возможности для улучшения морфологических признаков, состава жирных кислот и масличности семян. В мировой практике, как правило, для повышения масличности семян и увеличения содержания основных ненасыщенных ЖК (олеиновой C_{18:1}, линолевой C_{18:2} применяют этилметансульфонат (ЭМС) в высоких концентрациях - 2%, 5%, 8% [10, 11]. В то же время методика, которую на основании многочисленных данных предлагал Институт химической физики [12, 13] включала средние и низкие концентрации. В нашей работе были также использованы еще два супермутагена - ДЭС и ДМС.

Целью настоящей работы был сравнительный анализ эффективности мутагенов и их концентраций, изучение наследования морфологических признаков, выявление возможной связи между составом жирных кислот и морфологическими особенностями, выделение перспективных линий для создания устойчивых к растрескиванию, неполегающих, скороспелых сортов с оптимальным соотношением основных жирных кислот и повышенной масличностью семян.

8.1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы был выбран урожайный безэруковый слаборастрескивающийся урожайный отечественный сорт Викрос (патент №3038) селекции ВИК им. В.Р. Вильямса. В семенах дикого типа, в зависимости от условий года, содержится 60-62% олеиновой, 19-20 линолевой и 8-9% линоленовой ЖК. Количество жира в составляет 40-44%, а белка 22-23%.

Семена были обработаны растворами мутагенов в течение 16ч в следующих концентрациях: этилметансульфонат (ЭМС) 0.3; 0.2; 0.04; 0.03; 0.02; диметилсульфат (ДМС) 0.08, 0.06, 0.02%; диэтилсульфат (ДЭС) 0.06, 0.05%. Семена контрольного варианта замачивали в воде. В каждом варианте обрабатывали по 120 семян в 2х повторностях. Растения поколений M₁-M₅ выращивали на опытном участке Кропотовской биостанции ИБР РАН из рассады. Семена M₂-M₆ собирали отдельно с каждого растения с изолированных в начале цветения соцветий. Мутантные формы описывали и определяли частоту изменений по стандартной методике. Начиная с 2014 года, кроме следующего поколения (M₄-M₅) продолжали изучение новых семей M₃ для более точного определения частоты изменений, и выделения новых мутантных форм. Также линии с высоким содержанием олеиновой ЖК пересевали повторно, чтобы избежать возможного влияния погодных условий на развитие признаков и биосинтез ЖК. Ежегодно высаживали около 150 линий по 70-120 растений в каждой. Состав жирных кислот и жир определяли в семенах поколений M₃-M₆ (в целом на 360 образцах), с учетом вариантов и поколений.

Для количественного определения жира 0.2 г измельченных семян заливали 2 мл гексана и экстрагировали 3ч. По общепринятой методике для получения метиловых эфиров жирных кислот в отфильтрованный экстракт добавляли метилат натрия. Жирнокислотный состав масла определяли газохроматографическим методом (ГОСТ Р 51483-99) на газовом хроматографе Кристалл 2000М с использованием капиллярной колонки ZB FFAP длиной 25мм.

8.1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее широкий спектр морфологических изменений был выявлен в поколении М₃, а в отдельных линиях такие признаки как «густое ветвление», «длинный стручок», «широкий стручок», «антоциановая окраска побегов» были более ярко выражены в поколении М₄. Всего было выявлено 35 различных изменений габитуса, формы, числа, размеров и окраски побегов, листьев, цветков, стручков, семян. Важно, что с высокой частотой (до 30%) в разных вариантах были выделены формы с нерастрескивающимися стручками. Для создания линий были отобраны формы у которых нерастрескиваемость стручков сочеталась с другими важными признаками: скороспелые, неполегающие, многосемянные. Самый широкий спектр - 30 изменений признаков, в том числе и благоприятных, отвечающих практическим задачам исследования, индуцировал ЭМС, особенно в варианте с концентрацией 0,03%. Следует отметить, что именно при этой концентрации частота «отрицательных» изменений – замещение цветков мелкими побегами, стерильность, была самой высокой - более 50%. В то же время 0.05% ДЭС был эффективен (частота 36%) в индуцировании низкорослых, скороспелых, компактных форм, но в сочетании с пониженной (до 35-37%) жирностью семян. При этом, наблюдалось сходство по частоте и спектру изменений, вызванных ЭМС в концентрациях 0,3 и 0,03%. Самый широкий спектр изменений по составу ЖК и наибольшее варьирование по количеству отдельных жирных кислот отмечено в поколении М₄ в вариантах с использованием ЭМС в концентрации 0,02% и ДЭС в концентрации 0,06%. Кроме того, в этих вариантах были выявлены в М₃ и М₄ единичные растения (8 шт.) с «риверсиями» по жирнокислотному составу – в их семенах синтезировалось 16- 25% эруковой примерно такое же - эйкозеновой жирных кислот, что вызвано вероятно, усилением экспрессии элонгазы, отвечающей за присоединение к исходной цепи новых атомов углерода.

В фенотипически сходных линиях, выделенных по одному основному признаку, например, длинностручковых, широкостручковых и с вертикальным прикреплением стручка в М₄ также было отмечено сходство в композиции ЖК (рис. 1, 2, 3).

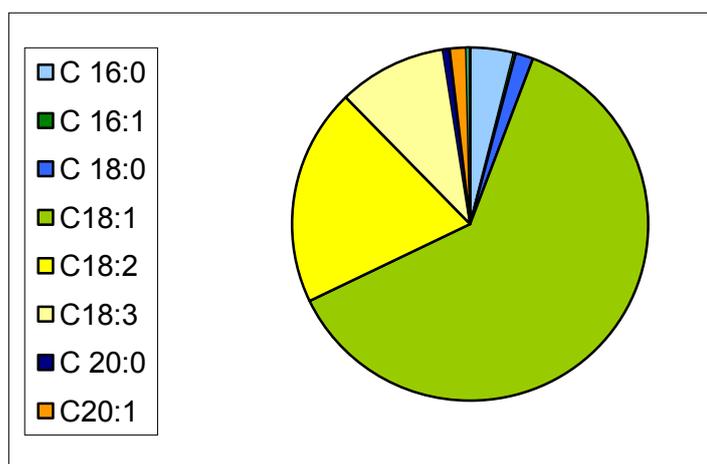


Рисунок 8.8.1 - Состав ЖК в семена растений дикого типа сорта 'Викрос'.

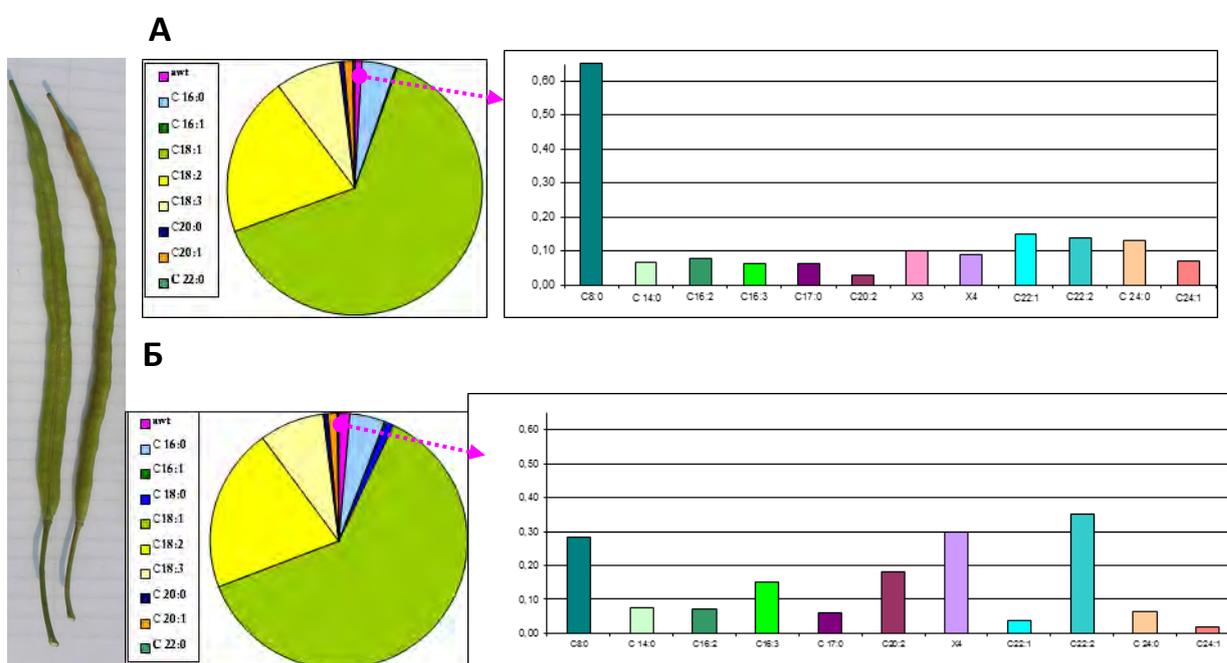


Рисунок 8.1.2 - Состав обычных (круговая диаграмма слева) и нетипичных (столбики справа) ЖК в семенах длинностручковых мутантных линий (А - №836-23-24, 0,02% ДМДМСС; ББ - №782-2-27; 0,04% ЭЭМС)

При этом, в потомстве M_5 число и количество «нетипичных» ЖК в одних линиях снижалось, а в других сохранялось.

Также было обнаружено, что в потомстве растений M_3 , семена которых содержали более 65% олеиновой ЖК, ее количество в поколении M_5 выросло до 73%, а количество линоленовой ЖК не превышает 6%. В то же время, при низком содержании олеиновой кислоты (<60%) в семенах растений M_3 , в семенах их потомков M_4 ее содержание было ниже на 15% и более. Такие формы были исключены из исследования.

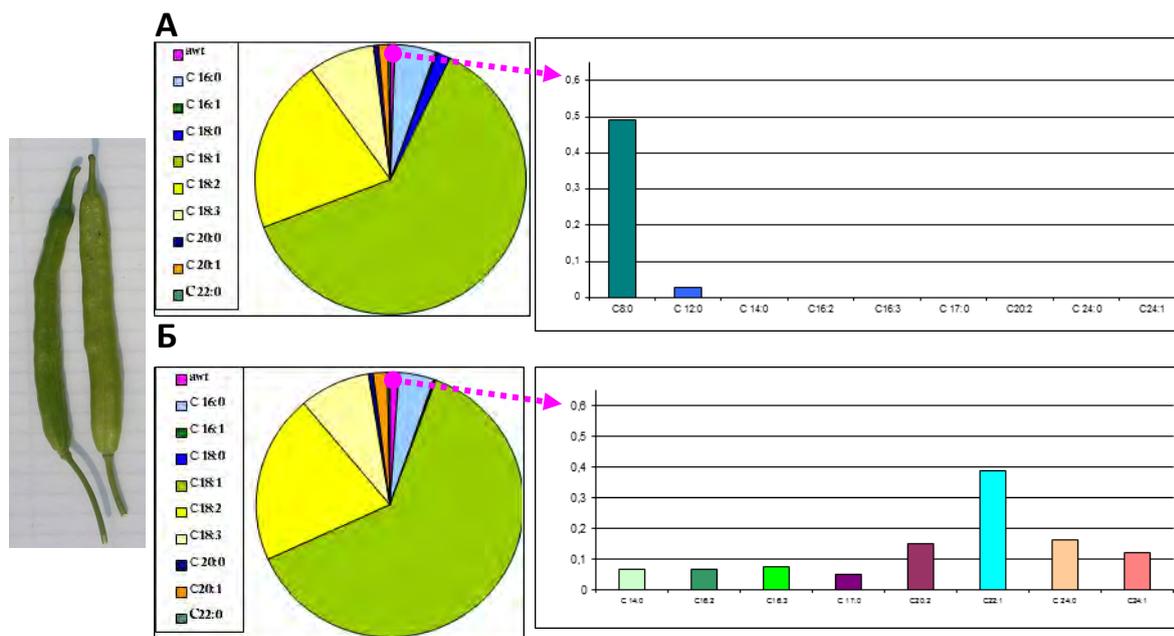


Рисунок 8.1.3 - Состав обычных (круговая диаграмма слева) и нетипичных (стлбики справа) ЖК в семенах широкостручковых мутантных линий (А - 805-35-47; 0,02% ЭМС. БГ - №7915-17-2; 0,03% ЭМС).

Таким образом, отбор на композицию ЖК следует начинать не ранее M_5 и даже M_6 , когда увеличится однородность и стабильность мутантных линий. Количество жира в семенах увеличилось в большинстве линий на 2-3%, а содержание белка – только в тех линиях, где жирность по сравнению с содержанием его в семенах дикого типа, не изменилась. В то же время в отдельных линиях, полученных в вариантах с ЭМС в концентрации 0,02% отмечены значительные различия между отдельными растениями одной морфологически стабильной линии: от 35 до 55%.

Таким образом, можно отметить, что линии, отобранные по комплексу морфологических признаков, отличаются между собой и по составу ЖК, например, по наличию и количественному содержанию коротких (C_8-C_{12}) и длинных (C_{24}), и жирных кислот с нечетным числом атомов углерода (C_{15} , C_{17}). При этом, у растений морфологически однородных линий с незначительными различиями в интенсивности воскового налета, антоциановой полосы на стручках количество отдельных ЖК и жира в семенах могут отличаться.

8.1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделены новые линии рапса ярового с изменённым составом жирных кислот, отсутствующих в семенах исходного сорта Викрос. Обнаружены формы рапса с повышенным содержанием наиболее ценных жирных кислот: олеиновой и линолевой. Среди них выделены линии рапса, удобные для использования в сельском хозяйстве, а также линии с сочетанием

селекционно ценных признаков: компактные низкорослые скороспелые крупносемянные, с устойчивыми к растрескиванию стручками.

Изучено накопление лигнина в клетках побегов устойчивых к полеганию линий рапса. Проведено сортоиспытание 2 сорта ярового рапса с крупными, устойчивыми к растрескиванию стручками, сильным ветвлением и высокой биопродуктивностью, а также с улучшенным составом жирных кислот в семенах.

8.1.5 ССЫЛКИ

1. Warner K., Knowlton S. // J Am Oil Chem Soc. 1997. V. 74. P. 1317–1322.
2. Matthäus B. // Eur J Lipid Sci Technol. 2006. V. 108. P. 200–211.
3. Haar D. Von Der, Müller K., Bader-Mittermaier S. et al. // Oilseeds & fats Crops and Lipids. 2014. V. 21. D104. P. 2-8.
4. Sarwar G. // World Rev. Nutr. Diet. 1987. V. 54. P. 26-70.
5. Лемеш В.А., Мозгова Г.В., Грушецкая З.Е. и др. // Генетика. 2015. Т. 51. № 8. С. 895-904.
6. Yang Q., Fan C., Guo Z. et al. // Theor Appl Genet. 2012. V. 125. P. 715.
7. Hossain S., Kadkol G.P., Raman R. // World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher, Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding>
8. Morgan C.L., Ladbroke Z.L., Bruce D.M. et al. // Journal of Agricultural Science. 2000. V. 135. P. 347-359.
9. Wu G., Wu Y., Xiao L. et al. // Theor Appl Genet. 2008. V. 116. P. 491–499.
10. Singer S.D., Weselake R.J., Habibur R. // BMC Genetics. 2014. V. 15. P. 94-104.
11. Spasibionek S. // Plant Breeding. 2006. V. 125. P. 259-267.
12. Панопорт И.А. // М.: Наука. 1993. 304с.
13. Панопорт И.А. // М., Наука. 1976. 351с.

8.1.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. Жуков А.В., Широкова А.В., Сидоров Р.А., Пчёлкин В.П., Воловик В.Т., Костяновский Р.Г., Цыдендамбаев В.Д. Содержание этерифицированных жирных кислот в семенах мутантных линий ярового рапса (*Brassica napus* L.) // В сборнике: Современные тенденции в сельском хозяйстве III Международная научная Интернет-конференция: Материалы. ИП Синяев Д. Н. Казань, 2014. С. 15-27.
2. Воловик В.Т., Широкова А., Докудовская Н. Мутагенез в селекции ярового рапса // В сборнике: Проблемы интенсификации животноводства с учетом охраны окружающей среды и производства альтернативных источников энергии, в том числе биогаза. XX Международная научная конференция. Институт технологических и естественных наук в Фалентах, Отделение в Варшаве; под научной редакцией профессора, доктора Вацлава Романюка. 2014. С. 368-370.

3. Широкова А.В., Воловик В.Т., Коровина Л.М., Никитина Г.В., Крутиус О.Н. Использование химического мутагенеза для изменения содержания жира и белка в семенах ярового рапса. В сборнике: Проблемы интенсификации животноводства с учетом охраны окружающей среды и производства альтернативных источников энергии, в том числе биогаза. Институт технологических и естественных наук в Фалентах, Отделение в Варшаве; под науч. ред. проф., доктора Вацлава Романюка. 2016. Т. 22. С. 222-225.
4. Воловик В.Т., Широкова А.В., Докудовская Н.А. Оценка селекционного материала ярового рапса, созданного методом мутагенеза // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство. Сборник научных трудов под ред. В.М. Косолапова, Н.И. Георгиади. Выпуск 5(53), ФГБНУ ВНИИ кормов им.В.Р. Вильямса.- М.: Угрешская типография, 2015. С. 220-225.

8.2. Влияние химических мутагенов на морфогенез петунии и сальпиглоссиса

8.2.1. ВВЕДЕНИЕ

Химические мутагены служат эффективным инструментом изучения процессов развития, несмотря на то, что между индукцией мутаций и ее визуальным определением лежит длинная цепь регуляторных звеньев.

Петуния гибридная – широко известное декоративное растение, межвидовой гибрид, чей геном содержит хромосомы двух видов: *P. violacea* и *P. nuytaginifolia*, что увеличивает изменчивость морфологических и биохимических особенностей. Это качество послужило одной из причин, по которой петунию стали использовать как модельное растение в генетических исследованиях при изучении окраски и морфогенеза цветка. Для петунии характерна однотонная окраска, хотя встречаются сорта с сочетанием белого центра с цветным краем или яркого цветка с белой каймой [2]. Эти изменения вызваны блокировкой биосинтеза антоцианов на разных его этапах. Однако, новые приемы позволяют получить не просто другую окраску, а сочетание нескольких, зачастую, контрастных оттенков в одном цветке. Обычно этого эффекта достигают с помощью трансгенных технологий [3]. Однако, как оказалось, эти изменения не всегда устойчивы и могут исчезать после ряда поколений [4]. В то же время, существует родственный петунии вид, отличающийся необыкновенным сочетанием окрасок в пределах одного цветка – сальпиглоссис выемчатый (*Salpiglossis sinuata*). Это растение малоизвестно, поскольку имеет ряд недостатков, которые возможно, удастся устранить с помощью химического мутагенеза.

8.2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для индуцирования изменчивости окраски цветка и других признаков у петунии белоцветкового сорта ‘Snowball’ и сальпиглоссиса с алыми цветками ‘Royal Red’ (семена приобретены у фирмы Агбина, РФ) были использованы следующие концентрации мутагенов: ЭМС: 0,02; 0,03; 0,04%; ДМС: 0,02; 0,04; 0,08%; ДЭС: 0,025; 0,05%. Растения M₂-M₆ выращивали в теплице из семян, рассаду (по 20-50 шт. каждой семьи (линии)) высаживали на участок Кропотовской биостанции ИБР РАН. В период массового цветения на 10-15 типичных растениях бутоны опыляли вручную (по 2-3 цветка/растение), венчики помещали в изоляторы из нетканого материала. Семена собирали отдельно с каждого растения. Для предотвращения инбредной депрессии на тех же растениях по 2 бутона кастрировали и опыляли пыльцой с фенотипически сходных растений из этой же или из сестринской линий.

В период массового цветения лепестки растений фиксировали в стандартной смеси 97% этанола и концентрированной соляной кислоты (99:1). Через 3 недели надосадочную жидкость отделяли, переносили в эпендорфы, хранили в холодильнике и анализировали.

Анализ флавоноидов был осуществлен на хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100), с флуоресцентным детектором G1315B. Для проведения анализа была использована хроматографическая колонка размером 2,1 × 150 мм, заполненная октадецилсилильным сорбентом, зернением 3,5 мкм, «ZORBAX» SB-C18.

Элюент А – 0,6% водный раствор трифторуксусной кислоты, В – метанол, С- 0,6 % раствор трифторуксусной кислоты в 70 % водном метаноле.

8.2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее значительные изменения по окраске и морфологическим признакам были выявлены в поколении М₃ в вариантах с обработкой 0,08% ДМС, 0,02% ЭМС, 0,05% ДЭС. Причем, в варианте с 0.08% ДМС были получены формы с яркоокрашенными венчиками со светлым пятном в центре, а в результате воздействия ЭМС 0,02% и 0,05% ДЭС цветки окрашены, главным образом, в сереневые и розовые тона разной степени интенсивности. Кроме того, были получены формы с двойной окраской цветка (рис. 1а, б), отогнутыми наружу или внутрь краями долей венчика, с избыточным числом долей цветка (шесть долей венчика, 6-8 чашелистиков, 3 плодолистика), с несросшимися долями венчика, где только 2 чашелистика, а 3 остальных заменены петалоидами, венчиком, «стянутым» от трубки к краю за счет выросшей тычиночной нити (рис. 3а,б, в) и другие.

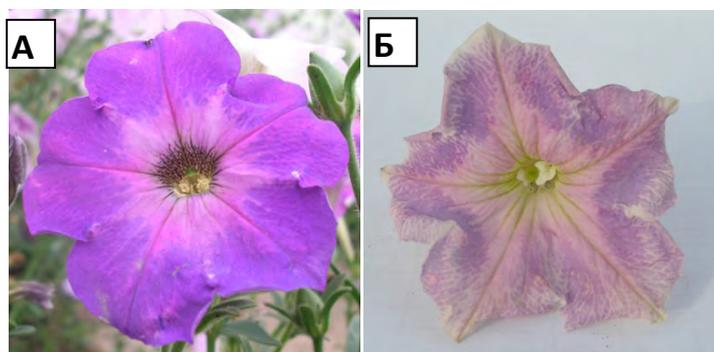


Рисунок 8.2.1 - Цветки с двойной окраской (А-линия №33-7-9 ; Б- линия №33-5-12)

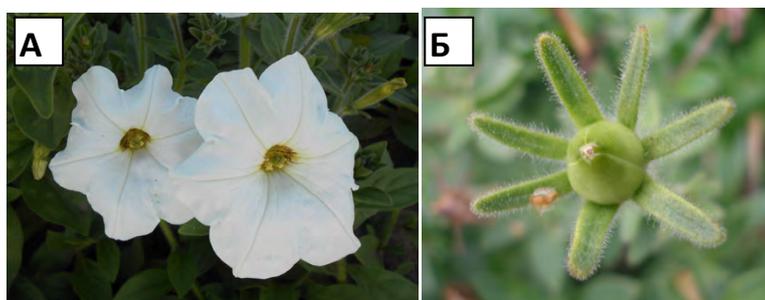


Рисунок 8.2.2 Цветки с шестью лепестками (А), 7-ю чашелистиками и трехстворчатой коробочкой (Б).



Рисунок 8.2.3 - Температурочувствительные мутации: А- цветок с пыльниками, сросшимися с венчиком; Б - цветок с двумя чашелистиками и несросшимся венчиком. Семена легко завязываются в реципрокных скрещиваниях, то есть стерильность не наблюдается. В – каждый новый цветок образуется не в пазухе листа, а в пазухе чашелистика.

Отдельные формы с выростами на трубке венчика, деформированными долями (лепестками) были также обнаружены в вариантах обработки теми же мутагенами у вербены канадской и рапса, что возможно, позволит получать целенаправленные изменения.

Биохимический анализ состава флавоноидных пигментов в цветках петунии дикого типа и двуцветных мутантных форм показал, что у исходного белоцветкового сорта антоцианов нет, а из флавонолов образуются кемпферол и кверцетин. В то же время в цветках мутантных растений содержатся дельфинидин и его производные петунидин и мальвидин. Синяя окраска, обусловленная наличием дельфинидина в обоих случаях наблюдается в местах срастания долей венчика и переходит на сами доли. По данным Tsuda S. с коллегами [5], у трансгенных растений петунии отмечена связь между деформацией края цветка (мятый, завернутый, сморщенный) и синтезом дельфинидина. Подобный вывод можно сделать и в данном случае, поскольку у растений с завернутыми краями долей венчиков в этих частях содержится дельфинидина больше, чем во всех других частях.

Биохимический анализ показал, что в венчиках сальпиглоссиса, в отличие от петунии синтезируются все 6 агликонов антоцианов: пеларгонидин, цианидин, пеонидин, дельфинидин, петунидин и мальвидин. Кроме того, в его венчиках содержатся 2 флавонола -не только кверцетин, но кемпферол, окрашивающий желтым штрихи и пятна на верхних и боковых долях венчика. Однако, как оказалось, и у сальпиглоссиса в результате обработки 0,04% и 0,03% ЭМС растения с венчиками «синих» и пурпурных оттенков стали преобладать. То есть и у сальпиглоссиса, вероятно, восстановилось действие 3'5'-дигидрофлавонолредуктазы, в результате чего образуются антоцианидины с большим числом гидроксильных групп в кольце «Б».

8.2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основе форм, выявленных в М₃, были созданы 12 линий мутантных растений с морфологическими изменениями цветков и новыми окрасками венчиков; разработана методика получения исходного материала для селекции декоративных растений, получены и запатентованы 2 новых сорта петунии (*Petunia Juss.*) со стабильно наследующимися оригинальными декоративными признаками и высокой семенной продуктивностью. Оценено наследование окраски цветка у мутантов М₄ сальпиглоссиса (*Salpiglossis sinuata*), проведен начальный сравнительный цитоморфологический анализ эпидермиса у растений дикого типа и мутантов петунии.

Изучение мутантных линий М₃-М₆ рапса, М₂-М₆ петунии и сальпиглоссиса, полученных в результате этой работы, показало, что выбранные концентрации мутагенов можно успешно использовать на других объектах для индуцирования различных изменений габитуса, композиции ЖК, окраски цветка и других особенностей. В будущем разработанная методика позволит получать уникальные мутантные формы для фундаментальных исследований исходного материала в целях применения его для селекции различных видов растений.

8.2.5 ССЫЛКИ

1. *Panonopt I.A.* // М.: Наука. 1993. 304с.
2. *Saito H., Kuchitsu K., Ozeki Y., Nakayama M.* // J Plant Res. 2007. V. 120. P. 563-568.
3. *Harborne J.B., Williams C.A.* // Natural Prod. Reports. 1995. V. 12. P. 639-657.
4. *Forkmann G., Martens S.* // Current Opinion in Biotechnology. 2001. V. 12. P. 155-160.
5. *Tsuda S., Fukui Y., Nakamura N. et al.* // Plant Biotechnology, 2004, V. 21. P. 377-386.

8.2.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. *Shirokova A, Zaitsev G., Nikolayeva T., Zagoskina N., Kostyanovskiy R., Krutius O., Kadorkina G.* *Petunia × hybrida* (Hook.) Vilm. with Bicolor Flowers, Obtained by Chemical Mutagenesis // Acta Hort. 2015. V.1087. P. 141-146 in Proc. XXV International Eucarpia Symp. Section Ornamentals Crossing Borgers. Eds. J. van Huylbroeck and E. Dhooghe.
2. *Широкова А.В., Зайцев Г.П., Костяновский Р.Г., Крутиус О.Н., Кадоркина Г.К.* Химический мутагенез и изменения в биосинтезе флавоноидов в цветках петунии / Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / Сборник материалов IX Международного симпозиума. Москва, 20-25 апреля 2015 г. / отв. ред. Н.В. Загоскина. - М.: ИФР РАН, 2015. С. 477-482.

3. Широкова А.В., Новохатская А.И. и Кадоркина Г.К. Сорт петунии "Звезды Большого Кропотова". Патент №6941. Зарегистрирован 13.06.2013 г.
4. Широкова А.В., Кузьмина А.В. и Костяновский Р.Г. Сорт петунии "Русский Ситец". Патент на селекционное достижение №6940. Зарегистрирован 13.06.2013 г.
5. Алтухов А.С., Крутиус О.Н., Кузьмина А.В., Никитина Г.В., Широкова А.В. Сорт петунии "Чудеса Большого Кропотова" Патент на селекционное достижение №7505. Зарегистрирован 08.09.2014 г.
6. Алтухов А.С., Кадоркина Г.К. Костяновский Р.Г., Кузьмина А.В., Никитина Г.В., Широкова А.В. Сорт петунии "Темный Крепдешин Ночи". Патент на селекционное достижение № 7504. Зарегистрирован 08.09.2014 г.

РАЗДЕЛ 9 Влияние экспрессии генов *Sxl-dsx*-каскада на детерминацию пола у *Drosophila melanogaster*

9.1 ВВЕДЕНИЕ

Изучение влияния генов, контролирующих детерминацию пола у *D. melanogaster*, требует получения делеционных мутаций этих генов. Мутанты, несущие делеции последовательностей, являются важным инструментом при работах, связанных с генетическими манипуляциями на *Drosophila*. Первые методы создания искусственных делеций у дрозофилы разработаны давно. Наиболее хорошо охарактеризованным мутагеном, индуцирующим хромосомные перестройки, является ионизирующее излучение. Облучение позволило получить множество геномных перестроек, в том числе делеций. Описание таких делеций требует кропотливой работы и обычно не позволяет точно определить места разрывов. Кроме того часто возникали множественные перестройки - транслокации, дупликации и инверсии. С помощью комбинации двух аутосомных транслокаций Y-хромосомы получены неперекрывающиеся делеции на протяжении всего генома [1]. Полученные таким способом делеции были слишком протяженные, и этот метод в настоящее время не применяется. Предложенный позже метод использовал сайт-специфическую рекомбинацию между FRT-сайтами конструкций, сделанных на базе *P-element* [2]. Другой метод также использовал *P-element*, но содержащий внутренний транспозон *hobo* [3]. Эти методы позволяют охарактеризовать точки разрывов делеции с точностью до одного нуклеотида с помощью инверс-ПЦР. Серьезным недостатком методов с использованием мобильных элементов является то, что они интегрируются в геном случайным образом, что позволяет получать только ограниченный набор делеций между ними. Методы создания направленных делеций появились в связи с использованием мегануклеаз I-SceI и I-CreI в качестве инструмента для внесения двухцепочечных разрывов в геномную ДНК [4]. Gao и Rong с соавторами создали серию мутаций гена *nbs*, в том числе и делецию [5], поместив рядом с геном attP сайт с помощью донор-зависимой гомологичной рекомбинации. Родин и Георгиев использовали мегануклеазу I-SceI для удаления части генетических конструкций для исследования структурных элементов транскрипционного комплекса в *yellow-white* системе *D. melanogaster* [6]. Нами ранее предложен метод стабилизации трансгенов в геноме, позволяющий при помощи внесения двухцепочечных разрывов удалить все последовательности транспозона, включая маркерный ген и инвертированные повторы, оставив только ген интереса [7]. Недавно осуществлена попытка создания эффективного метода мутации любого гена дрозофилы с помощью системы CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated) [8]. Однако эффективность получения делеций протяженных генов этим методом невысока. Кроме того, его использование осложняется отсутствием маркеров для селекции мутантов.

Наша задача заключалась в упрощении процесса получения делеций и создании универсальной кассеты, которую можно использовать для мутирования различных генов, находящихся на небольшом расстоянии от attP сайтов.

9.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все скрещивания и генетический анализ линий *D. melanogaster* проводили при температуре 25°C на стандартной питательной среде [9]. Генетические маркеры описаны в flybase (flybase.bio.indiana.edu).

В плазмиду pW-attB, содержащую ген *white* и attB сайты, был клонирован энхансер глаз En(E). Далее в плазмиду pW-attBEn(E) встраивали сайты I-SceI и I-CreI. Для этого отжигали олигонуклеотиды Sce-cre (5' TAG CTA TAG TTC TAG GGA TAA CAG GGT AAT GCG GCC GCA TAC AGT CTG CAG CAA AAC GTC GTG AGA CAG TTT GCT GGC GCC ATC GAT 3') и Sce-cre^{rev} (5' ATC GAT GGC GCC AGC AAA CTG TCT CAC GAC GTT TTG CTG CAG ACT GTA TGC GGC CGC ATTACC CTG TTA TCC CTA GAA CTA TAG CTA 3'), и встраивали в плазмиду при помощи технологии In-Fusion [10]. Обе мегануклеазы I-SceI и I-CreI можно использовать в нашей системе для создания двухцепочечного разрыва ДНК. В данной работе использовали только I-SceI. Кроме сайтов I-SceI и I-CreI олигонуклеотиды несли уникальные сайты PstI и NotI, с помощью которых в дальнейшем можно встраивать в кассету необходимые последовательности. Последовательности также можно встраивать в кассету при помощи технологии In-Fusion.

Конструкцию pDEL-qtc получали на базе кассеты pWattB-SC, в которую вставляли два участка из гена *qtc*: один находится перед ATG кодоном, второй – после стоп кодона TGA. Для этого с помощью праймеров qtc1S (5' CAGGGTAATGCGGCCAAAAACGTGGCAAATAAGCACAT 3'), qtc1/7rev (5' TAAGTGTGCAAATCCCAAATGAAAAGTGAA 3'), qtc2/8 (5' GGATTTGCACACTTAGATTGCACGCCAAAAT 3'), qtc2revC2 (5' CTCACGACGTTTTGCGTGTTAGACACGGGAAAGATTTCG 3') получены два ПЦР-продукта (*qtc1* и *qtc2*), размером 799 и 792 пн соответственно (использовали два фрагмента из начала и конца гена, так как в дальнейших исследованиях планировали восстановить участок между геном и attP встройкой, чтобы получить делецию только гена *qtc*). Праймеры имели дополнительные нуклеотиды на 3' конце, что позволяло применить технологию In-Fusion для одношагового встраивания ПЦР-продуктов в кассету. Длина гомологичного фрагмента важна, поскольку она влияет на эффективность метода, однако, чем длиннее фрагмент, тем сложнее создавать конструкцию.

ДНК конструкции инъецировали в эмбрионы линии $y^1v^1 P\{y[+7.7]=nos-phiC31\int.NLS\}X; P\{y[+7.7]=CaryP\}attP40$. Эта линия несет маркер *yellow*, но не имеет маркера *white*. Выживших

мух скрещивали с линией y^1w^{1118} . В потомстве отбирали трансгенных мух с появившимся маркером *white*.

ТрансгенI-SceI вводили скрещиванием: ♂ $y^1w^{1118}; pDEL-qtc$ × ♀ $y^1w^1; I-SceI$.

Индукцию экспрессии гена мегануклеазы I-SceI проводили с помощью теплового шока при 37°C в течение двух часов два дня подряд. Вылетевших мух скрещивали с линией $y^1w^1, CyO/IF$. В F2 отбирали мух, потерявших маркер *yellow*, но сохранивших маркер *white*.

9.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Новый метод получения направленных делеций был апробирован в процессе получения делеции гена *quick-to-court (qtc)*. Ген *qtc* хорошо изучен и определяет некоторые аспекты полового поведения у самцов. Делеция в этом гене была получена ранее путем вырезания *P-element* [11]. Предложенный нами метод основан на введении двухцепочечного разрыва в области выбранного гена и последующей репарации его по участкам гомологии. Сайты узнавания мегануклеазами и участки гомологии вводили рядом с геном *qtc* с помощью attB-содержащей конструкции.

Кассету pWattB-SC получили с учетом того, что она будет основой всех последующих конструкций, которые будут использованы для мутирования различных генов (рис. 1). Кассета включает в себя сайты узнавания для мегануклеаз I-SceI и I-CreI, последовательность attB, необходимую для встраивания в геном, и маркерный ген *white*, определяющий окраску глаз дрозофилы, с помощью которого можно отбирать трансформантов. Чтобы экспрессия гена *white* была стабильна в разных местах генома, в кассету встроен также энхансер этого гена (En(E)).

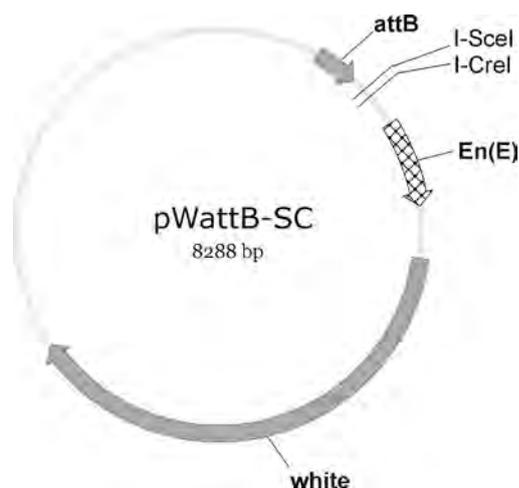
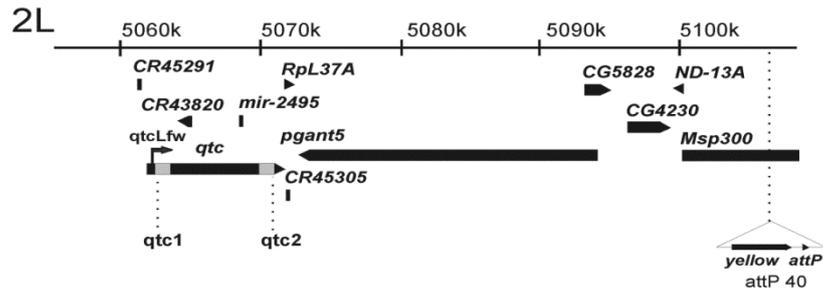
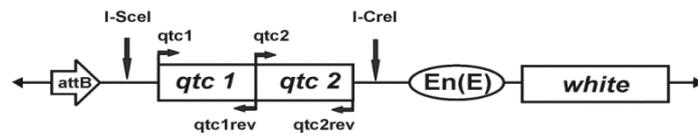


Рисунок 9.1 - Схема строения кассеты pWattB-SC. En(E) – энхансер гена *white*.

A



Б



В

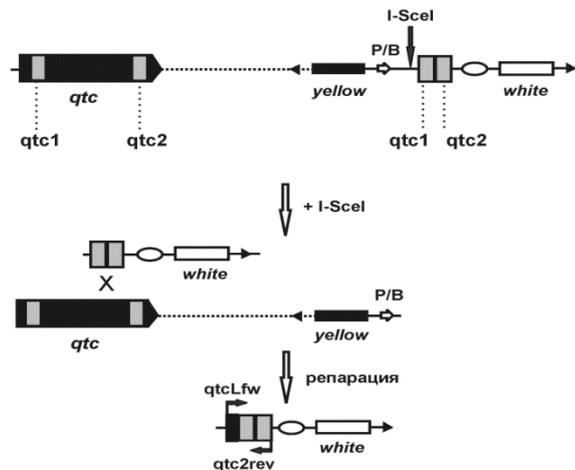


Рисунок 9.2 - Карта гена *qtc*, конструкции pDEL-*qtc* и схема метода получения хромосомных делеций. А. Ген *qtc* и его окружение. На схеме показано место встройки P{CaryP} attP40 трансгена и его ориентация. *qtc1* и *qtc2* – соответствующие ПЦР-продукты, стрелкой обозначен праймер *qtcLfw*. Б. Схема строения pDEL-*qtc* конструкции. Овалом обозначен энхансер гена *white*. Прямоугольниками обозначены ПЦР-продукты *qtc1* и *qtc2*. Стрелками обозначены праймеры:

qtc1 (AAAAACGTGGCAAATAAGCACAT),
qtc1rev (GCAAATCCCAAATGAAAAGTGAA),
qtc2 (ACAСТTAGATTGCACGCCAAAAT),
qtc2rev (GTGTTAGACACGGGAAAGATTTCG).

В. Схема получения хромосомы с делецией. Показана встройка pDEL-*qtc* конструкции на расстоянии 47,5 тпн от гена *qtc*. Конструкция содержит гомологичную геномной последовательности *qtc*

(*qtc1* и *qtc2*). Вносится разрыв с помощью I-SceI, после чего происходит репарация с образованием делеции. Обозначены праймеры *qtcLfw* и *qtc2rev*, которые использовали для получения 1,6-тпн ПЦР-продукта для дальнейшего секвенирования.

Кассета pWattB-SC несет сайты I-SceI и I-CreI. Любой из них можно использовать для внесения двухцепочечного разрыва ДНК, но сайт мегануклеазы должен находиться между геном интереса и гомологичной областью в конструкции. Для получения делеции гена *qtc* использовали только сайт I-SceI. Между сайтами I-SceI и I-CreI вводили уникальные сайты PstI и NotI, которые могут быть полезными, если при создании последующих конструкций будут использованы стандартные методы клонирования с помощью эндонуклеаз рестрикции и лигирования. Кассету pWattB-SC можно встраивать в любые attP-содержащие платформы с помощью attB-attP рекомбинации. Этот метод основан на способности сайт-специфической интегразы бактериофага phiC31 индуцировать рекомбинацию между сайтом attB и attP [12]. Большая коллекция мух с attP сайтами существует в Bloomington Drosophila Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) и Drosophila Genetic Resource Center (<http://www.dgrc.kit.ac.jp/>). Благодаря высокой эффективности данный метод широко используется в настоящее время [13].

На базе созданной кассеты с применением современной технологии клонирования In-Fusion в один шаг сделана конструкция pDEL-*qtc* (рис 2Б) для получения делеции гена *qtc*. Технология In-Fusion использует 3'-5'- экзонуклеазную активность ДНК полимеразы поксвируса и позволяет эффективно объединять три и более фрагмента ДНК одновременно. Для этого требуется, чтобы соединяемые вместе фрагменты имели 15- нуклеотидные гомологичные последовательности на концах [10].

Для встраивания конструкции pDEL-*qtc* в геном выбрана платформа P{CaryP} attP40 (рис. 2А), расположенная на расстоянии 47.5 тпн от гена *qtc*. Платформа P{CaryP} attP40 несет маркерный ген *yellow*, который определяет темную окраску тела и крыльев мух. Известно, что рекомбинация между attP и attB последовательно происходит в определенной ориентации, что обеспечивает предсказуемое расположение встроившихся последовательностей внутри landing-платформы. Наш метод предполагает встраивание трансгена таким образом, чтобы последовательности конструкции, гомологичные локусу, который будет мутирован, оказались сонаправлены с ним. Поскольку в линии attP40 не была известна ориентация attP сайтов, мы определили ориентацию с помощью ПЦР. Далее конструкцию инъецировали и получили трансформанты. Трансформанты несли два маркера – *yellow* из landing-платформы и *white* из конструкции (2В). Эффективность интеграции была высокой - трансформанты получены в потомстве в среднем у 21% инъецированных мух. Таким образом, получили дублированную последовательность из гена-мишени на расстоянии 47 тпн от гена *qtc*.

тпн от attP встроок. Преимуществом этого метода является простота, возможность получать делеции с заведомо известными точками разрывов, что может быть востребовано, например, для делеции протяженных генов. Метод позволяет также сделать основной скрининг репарационных событий, используя легко детектируемые маркерные гены, избежав массивированного скрининга потомков при помощи ПЦР «в слепую». Ограничением метода является зависимость от расположения attP сайта, куда интегрируется базовая конструкция. Удаленность мишени от ближайшего attP-сайта от гена-мишени снижает эффективность мутагенеза. Однако созданная в последние годы обширная коллекция линий с attP платформами делает многие гены доступными для нашего метода. Данная работа является первым этапом проекта по исследованию генов, участвующих в регуляции пола и полового поведения у дрозофилы. В дальнейшем планируется получить мутации в нескольких генах *Sxl-dsx* каскада, являющихся ключевыми регуляторами, детерминирующими пол у насекомых.

9.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ по созданию нового метода сайт-направленного мутагенеза, основанного на индукции двухцепочечного разрыва и последующей репарации, получена делеция гена *qtc* (quick-to-court), участвующего в формировании полового поведения у *Drosophila melanogaster*. Созданы конструкции, которые позволят получить делеции гена *tra2* (*transformer 2*), являющегося ключевым регулятором, детерминирующим пол у разнообразных насекомых, а также генов *da* (*daughterless*) и *her* (*hermaphrodite*).

Апробирован новый метод сайт-направленного мутагенеза у дрозофилы, основанного на репарации индуцированного двухцепочечного разрыва. С помощью нового метода получены делеционные мутанты некоторых генов, участвующих в регуляции пола и полового поведения. Фенотипическая и генетическая характеристика полученных мутантов уточняется.

9.5 ССЫЛКИ

1. Lindsley D.L., Sandler L., Baker B.S. et al. // Genetics. 1972. V. 71. P. 157–184.
2. Golic K.G., Golic M.M. // Genetics. 1996. V. 144. P. 1693–1711.
3. Huet F., Lu J.T., Myrick K.V. et al. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. N 15. P. 9948–9953.
4. Moure C.M., Gimble F.S., Quijcho F.A. // Nucleic Acids Research. 2008. V. 36. №.10. P. 3287–3296.
5. Gao G., McMahon C., Chen J., Rong Y.S. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2008. V. 105. P. 13999–4004.
6. Rodin S., Georgiev P. // BioTechniques. 2005. V.39. P. 871–876.
7. Tkachuk A., Kim M., Kravchuk O. Savitsky M. // PLoS One. 2011. V. 6. e26422.
8. Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N. et al. // Genetics. 2013. V. 194. P. 1029–1035.

9. *Hawley S.W., Golic K., Ashburner M.* Drosophila: A Lab Handbook 2nd Ed (C). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004. P.1409.
10. *Evans, D.H., D.O. Willer, X.-D. Yao.* 2003. DNA joining method, p. 1-52. In patent application 20030162265, USA.
11. *Gaines P., Tompkins L., Woodard C.T., Carlson J.R.* //Genetics. 2000. V. 154. P. 1627-1637.
12. *Thorpe H.M., Smith M.C.* // Proc. Natl Acad. Sci. USA.1998. V.95. P.5505–5510.
13. *Groth A.C., Fish M., Nusse R., Calos M.P.* // Genetics. V. 2004. V. 166. № 4. P. 1775-1782.

9.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ:

1. *Кравчук О.И., Михайлов В.С., Савицкий М.Ю.* Простой и эффективный метод получения направленных делеций в геноме дрозофилы // Генетика. 2015. Т. 51, С. 1325–1329.
2. *Кравчук О.И., Михайлов В.С., Соколов В.В., Савицкий М.Ю.* Простой и эффективный метод получения направленных делеций в геноме дрозофилы. Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе», Минск, 2015.
3. *Kravchuk O., Kim M., Klepikov P. Parshikov A., Georgiev P., Savitsky M.* Transvection in *Drosophila*: *trans*-interaction between *yellow* enhancers and promoter is strongly suppressed by a *cis*-promoter only in certain genomic regions // Chromosoma. 2016. DOI:10.1007/s00412-016-0605-6.
4. *Savitsky M., Kim M., Kravchuk O., Schwartz Y.B.* Distinct Roles of Chromatin Insulator Proteins in Control of the *Drosophila* Bithorax Complex // Genetics. 2016. V. 202. P. 601–617.
5. *Кравчук О.И., Белкина Е.Г., Михайлов В.С., Лазебный О.Е., Савицкий М.Ю.* Изменение полового поведения самцов дрозофилы при делеции гена *qtc* с помощью нового метода направленного мутагенеза // Acta Naturae. 2016. Спецвыпуск. Т. 2. С. 28.

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27» декабря 2016 г.,

Протокол № 14