

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 575.16

Рег. № ГЗ 0108-2018-0001

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690129-6

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

А.В. Васильев

«27» декабря 2018 г.



ОТЧЕТ

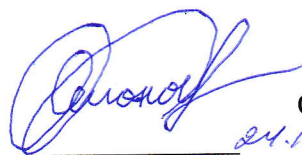
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И МОРФОГЕНЕЗА

по Разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем»
Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 гг.

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научн. сотр.,
д-р биол. наук


О.Б. Симонова
24.12.2018

подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный
сотрудник, доктор биологических наук


подпись, дата

О.Б. Симонова (раздел 1)

24.12.2018

Исполнители:
Старший научный сотрудник, кандидат
биологических наук


подпись, дата

Д.А. Куликова (раздел 2)

24.12.2018

Главный научный сотрудник, доктор
биологических наук, профессор


подпись, дата

А.К. Гапоненко (раздел 4)

26.12.2018

Ведущий научный сотрудник, доктор
биологических наук


подпись, дата

В.А. Краевский (раздел 5)

24.12.2018

Старший научный сотрудник, кандидат
биол. наук


подпись, дата

О.И. Кравчук (раздел 6)

25.12.2018

Ведущий научный сотрудник, доктор
биол. наук


подпись, дата

Е.С. Васецкий (раздел 7)

26.12.2018

Научный сотрудник, кандидат
биологических наук


подпись, дата

А.В. Широкова (раздел 8)

Нормоконтроль, ведущий научный
сотрудник, кандидат биологических наук


подпись, дата

Е.Б. Абрамова

26.12.2018

РЕФЕРАТ

Отчет 70 с., 1 кн., 30 рис., 5 табл., 94 источника, 15 публикаций по теме
МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК,
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД, ГИСТОНЫ, КСЕНОБИОТИКИ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ТРАНСФОРМАЦИЯ, РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, ХРОМАТИН, МИОПАТИЯ,
ЭВОЛЮЦИОННО-КОНСЕРВАТИВНЫЕ ГЕНЫ, СЕЛЕКЦИЯ.

Объектом исследования являются эволюционно-консервативные гены беспозвоночных (дрозофила) и позвоночных животных (мышь, человек), а также сельскохозяйственных растений, позволяющие решать, как теоретически- так практически-значимые задачи.

Основная цель работы состояла в проведении экспериментальных исследований новых функций генов и механизмов их дифференциальной активности в ходе развития, а также создании новых сортов сельскохозяйственных растений с улучшенными характеристиками и разработке принципиально новых подходов генотерапии.

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

В результате изучены сложные взаимоотношения перекрывающихся структур генов и механизм их контроля в регуляции процессов развития в нормальных условиях и в условиях токсического действия болезней и внешней среды. Выдвинуты новые фундаментальные концепции эпигенетического кода и идентифицированы новые функции генов, контролирующих дифференцировку и морфогенез.

Результаты исследований помогут оптимизировать терапевтические схемы применения фармацевтических средств с учётом возможных побочных результатов их действия в различных органах и тканях. Помимо этого, результаты исследований позволят разработать ряд экспериментальных персонифицированных стратегий и фармакологических подходов на генетическом и клеточном уровне с целью восстановления на должном уровне функций генов в условиях *in vivo*. Их разработка повлечёт внесение дополнительных параметров необходимых для персонифицированной паспортизации учёта потенциальных рисков заболеваний граждан РФ. Кроме того, результаты исследований могут быть использованы для создания растений пшеницы и рапса, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам окружающей среды, что имеет важное практическое значение для нужд сельского хозяйства.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
РАЗДЕЛ 1. ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ	9
РАЗДЕЛ 2. РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА <i>D4</i> В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА	17
РАЗДЕЛ 3. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ	23
РАЗДЕЛ 4. КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ	32
РАЗДЕЛ 5. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И ПРОЦЕССЫ ОНТОГЕНЕЗА.....	40
РАЗДЕЛ 6. ПОИСК НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА НАСЕКОМЫХ.....	46
РАЗДЕЛ 7. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ГЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ	51
РАЗДЕЛ 8. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ РЯДА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ (РАПС) И ДЕКОРАТИВНЫХ (ВЕРБЕНА, ПЕТУНИЯ) РАСТЕНИЙ.....	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	66
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ.....	68

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения

а.к. – аминокислотная последовательность

дцРНК – двуцепочечная РНК

кДа – килодальтон

ЖК – жирные кислоты

ЖКС – жирно кислотный состав

п.н. – пара нуклеотидов

п.о. – пара оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ОРС – открытая рамка считывания

ЦНС – центральная нервная система

ЭМС - этилметансульфонат

DAPI – 4',6-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride

FISH – Fluorescence in situ Hybridization

FSHD -плече-лопаточно-лицевая миопатия

GFP - зеленый флуоресцирующий белок

HDAC3 - деацетилаза гистонов 3

HSP90 – белок теплового шока, массой 90 кДа

qtc – быстро ухаживать (*quick-to-court*)

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальной задачей биологии индивидуального развития является выяснение молекулярно-генетических механизмов регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза. В этом аспекте большое значение имеет исследование роли конкретных генов, контролирующих развитие и механизмы регуляции их экспрессии. В последнее время показано, что в молекулярно-генетической регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза участвуют антисмысловые транскрипты. Важным примером антисмысловой регуляции генов у эукариот являются микроРНК. Мутации генов, кодирующих микроРНК и их биогенез, приводит к различным видам патологий: воспалительным и иммунным болезням, неврологическим и сердечно-сосудистым расстройствам, некоторым видам рака. На данный момент идентифицированы сотни микроРНК, и было показано, что они регулируют до 60% белок-кодирующих генов млекопитающих, однако количество их подтвержденных мишеней относительно мало, в частности нет сведений об участии микроРНК в контроле сбалансированной экспрессии перекрывающихся генов. Заполнить этот пробел стала одной из задач текущего этапа.

Обширные данные изучения молекулярно-генетических механизмов дифференцировки клеток в нормальных и опухолевых тканях доказывают важную роль транскрипционного фактора AHR – арил гидрокарбонового рецептора. Важным элементом регуляции активности AHR является его взаимодействие с лигандами (ксенобиотиками). Развитие химической и фармацевтической промышленности создало условия, при которых каждый человек может подвергнуться воздействию ксенобиотиков, которые обладают лигандной активностью по отношению к AHR. Чаще всего результаты воздействия ксенобиотиков на целевые гены AHR изучают на клеточных культурах, что ограничивает понимание последствий эктопической экспрессии AHR на процессы развития системных структур в условиях *in vivo*. Для преодоления этого ограничения нами были созданы гуманизированные линии *Drosophila*, геном которых трансформирован генными конструкциями, содержащими ген *AHR* человека. Поскольку ксенобиотики не способны активировать гомолог AHR беспозвоночных мы использовали этих дрозофил, для изучения эффектов эктопической экспрессии AHR и его экзогенных лигандов *in vivo* и для разработки способа оценки фармакологических и токсических свойств веществ – потенциальных лигандов AHR человека, что позволит сократить время и средства в сравнении с подобными исследованиями, проводимыми на позвоночных.

Проблема роли наследственности в индивидуальном развитии не ограничивается молекулярно-генетическим аспектом. Важное значение в клеточной наследственности имеют эпигенетические (эпигеномные) механизмы, раскрытие которых необходимо для

выяснения природы факторов компетенции, детерминации и их реализации в виде конкретных дифференцировочных программ, осуществляемых за счет «кодирования» (модификации) белков упаковки ДНК в ядрах – гистонов. До сих пор не ясно, как «гистоновый код» «транслируется» в те или иные перестройки нуклеосом - активирующие или репрессирующие работу генов. Предварительно нами показано, что определенные модификации гистонов – убиквитилирование H2B K34-/K120 - способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных неполных интермедиатов нуклеосом – «гексасом». Решение задач текущего этапа позволило выдвинуть принципиально новую концепцию эпигенетического «структурного кода» активности хроматина. Другой задачей было установление структуры нового белка, участвующего в эпигенетической регуляции гормонального контроля метаморфоза насекомых, гомолог которого у позвоночных является корепрессором для ядерного эстрогеноподобного рецептора. Текущий этап также ставил задачу, связанную с исследованием структуры белка QTC, который участвует в формировании памяти и в обработке информации, полученной от различных анализаторов. Познание этих механизмов дает ключ к пониманию таких процессов, как индукция, дифференцировка, морфогенез. Более того, оно открывает и путь к пониманию природы целостности развивающейся особи – высшего уровня механизмов индивидуального развития.

План работ также предполагал проведение исследований генетически обусловленной формы миопатии – FSHD. Учитывая многофакторность миопатии, важно разрабатывать терапевтические подходы, направленные на нормализацию работы всех «испорченных» генов. Было решено использовать подход эпигенетического редактирования, целью которого является восстановление ослабленной функции инсулятора FR-MAR в миобластах FSHD, который в норме контролирует работу сразу нескольких генов, снижение работы которых вызывает FSHD. Результаты планируемых исследований важны для разработки эффективных персонализированных терапевтических подходов для лечения миопатий.

В рамках раздела «Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений» ставилась задача проведения подготовительной работы для редактирования генома пшеницы, и создания новых сортов, иммунных к мучнистой росе. Сорта будут созданы путем внесения направленных изменений в геном пшеницы, приводящих к инактивации гена MLO, необходимого для заражения растений пшеницы патогеном *Blumeria graminis*– возбудителем мучнистой росы. Важнейшей особенностью получаемых сортов будет долговременный мультирасовый характер устойчивости.

Применение созданных сортов позволит с меньшими затратами получать высокие стабильные урожаи пшеницы в нечерноземной зоне России. Конкретной целью текущего этапа была разработка протокола выделения протопластов пшеницы для сравнительной оценки эффективности редактирования генома пшеницы различными генно-инженерными конструкциями.

Наконец, в текущем этапе НИР был охарактеризован жирно-кислотный состав в семенах важного сельскохозяйственного растения - рапса- мутантные линии которого были получены нами ранее в результате селекции. В последние годы селекция рапса развивается в направлении создания сортов с оптимальным содержанием масла. Основная задача при создании сортов пищевого направления — отсутствие в масле эруковой кислоты, нежелательно и высокое содержание линоленовой, придающий ему прогорклый привкус. Для сортов пищевого направления желательно высокое содержание олеиновой (до 70 %) и линоленовой (до 25 %) кислот. Для рапсового масла, используемого в производстве маргарина, для обеспечения твёрдости жиров необходимо повышенное содержание пальмитиновой и стеариновой кислот, а также жидких жиров олеиновой кислоты. Селекция на оптимальный состав жирных кислот затруднена тем, что их синтез обеспечивает сложная полигенная система с множественными аллелями в локусах.

Таким образом, на основе применения новых экспериментальных платформ, были уточнены важные параметры участия различных генетических и эпигенетических факторов регуляции эмбрио-, органо-, гистогенеза и клеточной дифференцировки. Для ряда объектов исследования разработаны новые экспериментально-технологические методы анализа процессов развития и воздействия на него.

РАЗДЕЛ 1 ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

1.1 ВВЕДЕНИЕ

Последние исследования показали, что геномы эукариотических организмов кодируют множество антисмысловых транскриптов, содержащих последовательности, комплементарные другим эндогенным РНК[1-3]. Исследование функциональной значимости антисмысловых транскриптов показало, что они могут контролировать онтогенез, участвуя в регуляции таких клеточных процессов, как геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы, альтернативный сплайсинг, сайленсинг генов и метилирование, редактирование РНК, трансляция [3-8]. На сегодняшний день глобальную роль антисмысловой транскрипции принято исследовать с помощью тотального анализа геномов и создания компьютерных моделей *in silico*. Однако жёсткое ограничение параметров массово обрабатываемых выборок приводит к тому, что часть информации ускользает от анализа, поэтому наличие функциональных естественных антисмысловых транскриптов остро нуждаются в подтверждении *in vivo* на хорошо аннотированных генетических системах. Этот пробел можно восполнить, используя конкретные хорошо аннотированные системы генов дрозофилы, позволяющие изучать феномен антисмысловой транскрипции в конкретных ситуациях *in vivo*. Использование модельных систем 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 [9]. Известно, что у многих генов человека имеются соответствующие гомологии у дрозофилы. К таким генам относится и ген дрозофилы *Trf2* (*TBP related factor 2*), который перекрывается с другим геном *lawc* (*leg-arista-wing complex*). Систему этих генов мы используем в качестве модели для исследования особенностей регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих развитие. Подобных исследований мало, и в основном они касаются исследований пар генов, один из которых является некодирующим. Оба гена в нашей системе кодируют белки, что позволяет получать новые актуальные данные о механизме координированной экспрессии перекрывающихся белок-кодирующих генов, список которых в геномах эукариот постоянно пополняется. Целью этапа в 2018 г стало приблизить понимание механизма тонкой регуляции координированной экспрессии перекрывающихся генов эукариот и

оценить значение антисмысловой транскрипции, и, в частности, микроРНК, как инструмента эволюционной адаптации, способствующей работе генов в условиях их перекрытия.

1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В генетических экспериментах мы использовали трансгенных дрозофил из линий музейных коллекций США (<http://flybase.org/reports/FBti0099694.html>) и Швейцарии (<https://www.flyorfl.ch>), а также полученных самостоятельно. Для проверки, является ли антисмысловой регуляторный транскрипт гена *Trf2* мишенью определённых микроРНК, были созданы трансгенные дрозофилы, контролируемо экспрессирующие конструкции, содержащие тестируемую регуляторную последовательность, маркированную GFP. Дизайн конструкций проводили по новейшей методике, предложенной в лаборатории Баслера [10]. Особенность её заключается в обеспечении направленного встраивания конструкций в определённый район третьей хромосомы (86Fb) и последующей защиты трансгеной экспрессии от супрессирующего влияния соседних областей гетерохроматина («эффекта положения»). В этих же экспериментах мы использовали линии дрозофил с управляемой экспрессией микроРНК под контролем дрожжевого элемента *UAS* (*Upstream Activating Sequence*). Управляли экспрессией *UAS*-микроРНК и оценивали последствия от предпринятых манипуляций *in vivo* с помощью оригинальной методики, предложенной ранее [11], с привлечением линий-драйверов, тканеспецифично экспрессирующих дрожжевой активатор *Gal4*, который способен связываться с *UAS* и включать транскрипцию целевого гена в определённых органах и тканях. Для тканеспецифической экспрессии конструкций в тканях глаза использовали линию-драйвер $P\{w^{+m}=Gal4-pinaE.GMR\}$. Мы тестировали ранее неизвестные микроРНК дрозофилы, комплементарные району регуляторного антисмыслового транскрипта гена *Trf2* - *mir4968* и *mir2491*. Эти эволюционно консервативные микроРНК недавно были обнаружены в геноме дрозофилы [12]. Однако мишени для этих микроРНК остаются неизвестными. Мы применили оригинальный подход, позволяющий *in vivo* демонстрировать ингибирующее воздействие конкретных микроРНК на предполагаемые мРНК-мишени. Этот подход подразумевает совмещение в одном геноме направленную экспрессию определённой микроРНК и участок предполагаемой мишени, маркированный GFP. Результат ингибирующего влияния конкретной микроРНК на экспрессию предполагаемой РНК-мишени оценивали по яркости свечения в экспериментах *in vivo* на органно-тканевом уровне и *in vitro* с помощью Вестерн-блот анализа и ОТ-ПЦР.

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Что сохраняет баланс работы перекрывающихся генов? Мы предположили, что активная антисмысловая транскрипция *Trf2* может инактивироваться комплементарными молекулами микроРНК. С этой целью мы провели поиск предполагаемых сайтов посадки микроРНК, используя базы данных miRBase, DIANA TOOLS, RegRNA2.0. В результате было обнаружено несколько предполагаемых сайтов посадки микроРНК внутри ОРС гена *lawc* (рис. 1.1). Целью текущего этапа было выяснить, может ли экспрессия обратных транскриптов комплекса *lawc/Trf2* находиться под контролем этих микроРНК. Для этого были поставлены эксперименты по одновременной индукции конкретных микроРНК и тестируемого фрагмента, содержащего маркерный белок, деградацию которого легко отслеживать *in vivo*. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.1.

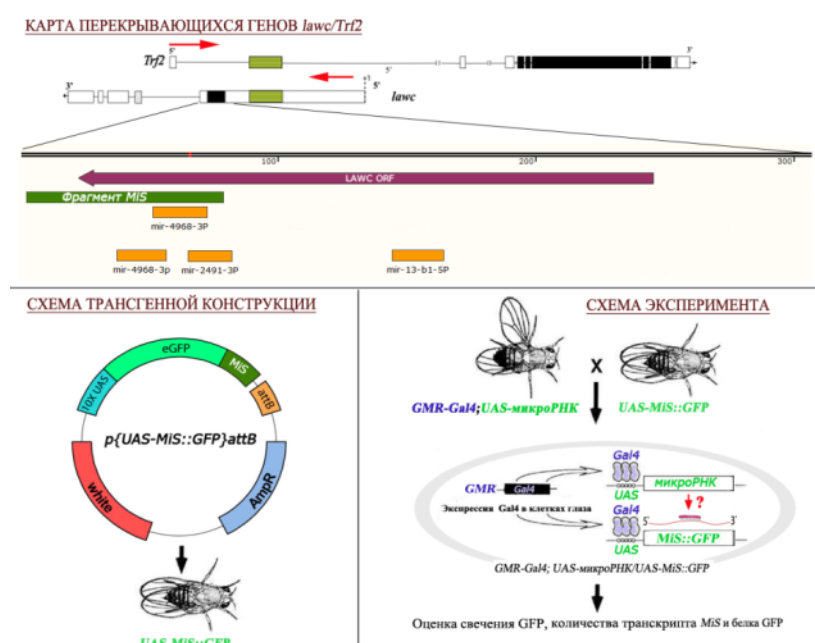


Рисунок 1.1 - ВВЕРХУ: Карта перекрывающихся генов *lawc/Trf2*. Зона перекрытия окрашена зелёным, кодирующие районы - черным. Ниже - увеличенный фрагмент карты: оранжевым цветом показаны предполагаемые сайты посадки микроРНК, бардовым - открытая рамка считывания *lawc*, зелёным - тестируемый фрагмент мРНК гена *lawc* (*MiS*). СЛЕВА: Схема конструкции *p{UAS-MiS::GFP}attB*, содержащей ген GFP и тестируемый фрагмент *MiS* под контролем сайтов UAS, позволяющих управлять их экспрессией *in vivo*, в системе *UAS/Gal4*. Трансгенных дрозофил получали в системе *attB/attP*, позволяющей встраивать одну копию трансгена в свободный от эндогенных единиц район генома, что даёт возможность проводить достоверные количественные оценки экспрессии трансгена. Этих дрозофил далее использовали в генетических экспериментах, схема которых дана СПРАВА. Цель эксперимента - проверить является ли тестируемый фрагмент мишенью микроРНК *mir4968* и *mir2491* - красная стрелка и знак вопроса. Экспрессию тестируемого фрагмента и микроРНК запускали с помощью драйвера *GMR-Gal4*, позволяющего набирать дрожжевой белок Gal4 в глазных имажинальных дисках личинок и глазных структурах имаго. Далее по схеме, белок Gal4 находит свои сайты посадки *UAS* и запускает экспрессию микроРНК и *MiS::GFP*.

Линии, экспрессирующие эти микроРНК, были выписаны ранее нами из музейной коллекции линий Цюриха (<https://flyorf.ch/index.php/mirna-collection>). Мухи, содержащие тестируемый фрагмент и репортерный ген GFP, были созданы нами самостоятельно. Для этого была создана трансгенная конструкция $p\{UAS-MiS::GFP\}attB$, в которой к гену зелёного флуоресцентного белка GFP был пришит тестируемый фрагмент MiS, содержащий сайты, комплементарные двум микроРНК - *mir4968* и *mir2491* (рис. 1.1). Экспрессия гибридного фрагмента MiS::GFP находится под контролем пяти сайтов UAS, что позволяет использовать дрожжевую систему UAS/Gal4 для его активации в экспериментах *in vivo*. Трансгенных дрозофил получали в системе attB/attP, позволяющей встраивать одну копию трансгена в свободный от эндогенных единиц район генома, что даёт возможность проводить достоверные количественные оценки экспрессии трансгена в различных условиях его активации или подавления. Эффективность активации конструкции UAS-MiS::GFP проверяли в генетических экспериментах в системе UAS/Gal4. Для этого использовали линию-драйвер *GMR-Gal4*, в которой белок-активатор Gal4 экспрессируется под промотором гена *eyeless* в клетках глазного имажинального диска личинок и оптических долях мозга имаго. Принцип активации UAS-MiS::GFP представлен на рисунке 1.1. Он заключается в следующем: мух линии драйвера *GMR-Gal4* скрещивали с мухами линии репортера UAS-MiS::GFP. В гетерозиготных особях *GMR-Gal4/+; UAS-MiS::GFP/+* белок Gal4 получал доступ к сайтам UAS и «включал» экспрессию фрагмента MiS::GFP в клетках глаза. Эффективность активации была проверена нами визуально по яркому свечению GFP в области глазо-антенных дисков гибридных личинок (рис. 1.2, контроль). Кроме того эффективность экспрессии фрагмента MiS::GFP была верифицирована с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и с помощью Вестерн-блот анализа голов взрослых дрозофил (рис. 2.3). ОТ-ПЦР ставили с прямым праймером к GFP и обратным праймером к фрагменту MiS, исключив из анализа эндогенные транскрипты. В Вестерн-анализе для оценки концентрации MiS::GFP использовали антитела к GFP. Для контроля загрузки в Вестерн-блот экспериментах и нормализации сигнала при ОТ-ПЦР использовали ген *Act5c*. Далее проводили генетические эксперименты по мисэкспрессии тестируемого регуляторного района MiS::GFP на фоне мисэкспрессии конкретных микроРНК (*mir-13b-1*, *mir-2491*, *mir-4968*) в клетках глазных имажинальных дисков дрозофилы *in vivo*.

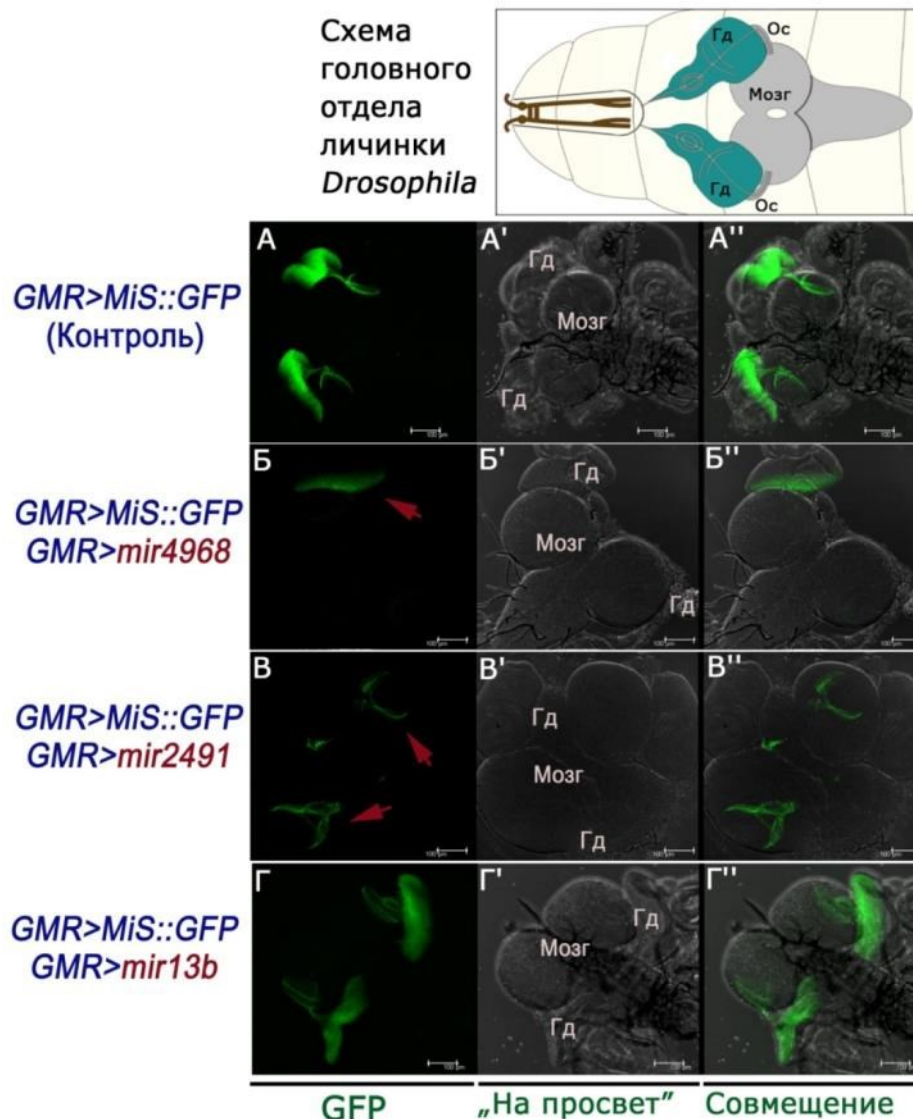


Рисунок 1.2 - Оценка свечения глазных структур в экспериментах по индукции микроРНК и их предполагаемой мишени. Представлены слитые конфокальные срезы препаратов мозга личинок 3-го возраста, снятые на конфокальном флуоресцентном микроскопе, выявляющим свечение GFP, "на просвет" и совмещение.

Вверху - схема строения центральной нервной системы личинки. Обозначены мозг (серый цвет), Гд - глазной имагинальный диск (зелёный цвет), Ос - оптические перемишки.

Панель А-А'-А" - контрольная личинка $GMR-Gal4$; $UAS-MiS::GFP$, в которой тестируемый фрагмент с пришитым GFP экспрессируется в клетках глазного имагинального диска. Видно сильное свечение GFP в нейронах сетчатки и их проекции в оптические доли мозга.

Панель Б-Б'-Б" - личинка $GMR-Gal4/+$; $UAS-MiS::GFP/UAS-mir4968$, в которой экспрессия тестируемого фрагмента с пришитым GFP сопровождается индукцией микроРНК $mir4968$.

Стрелки указывают на снижение уровня свечения GFP.

Панель В-В'-В" - личинка $GMR-Gal4/+$; $UAS-MiS::GFP/UAS-mir2491$, в которой экспрессия тестируемого фрагмента с пришитым GFP сопровождается индукцией микроРНК $mir2491$.

Стрелки указывают на снижение уровня свечения GFP.

Панель Г-Г'-Г" - отрицательный контроль - личинка $GMR-Gal4/+$; $UAS-MiS::GFP/UAS-mir13b$, в которой экспрессия тестируемого фрагмента с пришитым GFP сопровождается индукцией микроРНК $mir13b$. Снижения уровня свечения GFP не наблюдалось, поскольку эта микроРНК не комплементарна последовательности тестируемого фрагмента (Рис 1.1). Масштабная полоска - 100 мкм.

Для этого мух *GMR-Gal4; UAS-MiS::GFP* скрещивали с мухами *UAS-mir4968*, *UAS-mir2491* или *UAS-mir-13b-1*. Затем оценивали изменения уровня свечения зелёного флуоресцентного белка GFP в нервной системе гибридных личинок *in vivo* (рис. 1.2) и с помощью Вестерн-блот анализа и ОТ-ПЦР *in vitro* (рис. 1.3). В качестве контроля использовали особей без индукции экспрессии микроРНК.

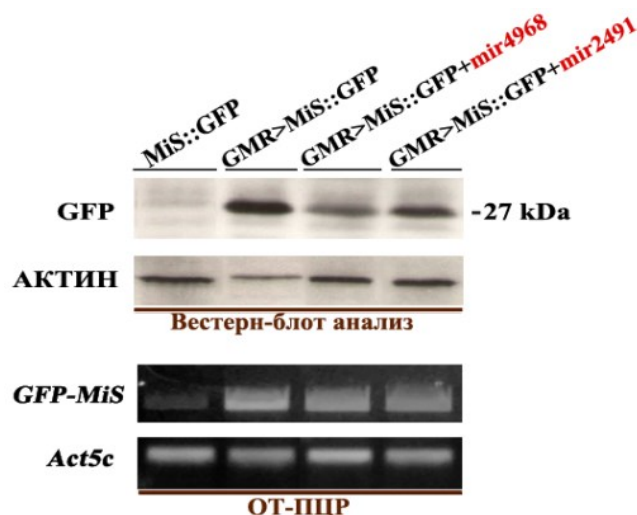


Рисунок 1.3 - Оценка количества белка GFP и количества РНК *GFP-MiS*, до и после индукции двух микроРНК, комплементарных последовательности *MiS*.

2 верхние панели: Вестерн-блот анализ. Белок получали из голов взрослых дрозофил. Красили антителами к GFP.

2 нижние панели: ПЦР с обратной транскрипцией. кДНК получали из голов взрослых дрозофил. ОТ-ПЦР ставили с прямым праймером к *GFP* и обратным к фрагменту *MiS*.

Для нормализации сигнала в Вестерн-блот экспериментах и ОТ-ПЦР использовали ген *Act5c*. Видно, что количество белка GFP и гибридной мРНК *GFP-MiS* падает на фоне дополнительной экспрессии *mir4968* и *mir2491* примерно в 2-5 раз.

Слева направо: колонка 1 - мухи линии *UAS-MiS::GFP* без активации экспрессии тестируемого фрагмента (негативный контроль); колонка 2 - мухи линии *GMR-Gal4; UAS-MiS::GFP* с активной экспрессией тестируемого фрагмента в клетках глаза; колонка 3 - мухи линии *GMR-Gal4/+; UAS-MiS::GFP/UAS-mir4968* с подавленной экспрессией тестируемого фрагмента на фоне активации *mir4968*; колонка 4 - мухи линии *GMR-Gal4/+; UAS-MiS::GFP/UAS-mir2491* с подавленной экспрессией тестируемого фрагмента на фоне активации *mir2491*.

Падение свечения GFP в эксперименте по сравнению с контролем позволило сделать вывод о взаимодействии микроРНК с предполагаемой мишенью и её деградацией по механизму РНК-интерференции.

Таким образом мы доказали, что уровень экспрессии обратных транскриптов *lawc*, перекрывающихся с *Trf2*, контролируется конкретными микроРНК. Снижение концентрации этих микроРНК повышает экспрессию *lawc*, что может негативно отражаться на экспрессии прямых транскриптов. Очевидно, такой механизм регуляции координированной экспрессии перекрывающихся генов мог сложиться в ходе эволюции при формировании общих для двух генов регуляторных районов.

1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2018 году мы исследовали роль двух эволюционно консервативных микроРНК (*mir4968* и *mir2491*) в регуляции экспрессии обратных *lawc*-транскриптов генного комплекса *lawc/Trf2* *in vivo* в клетках имагинального глазоантенного диска и мозге личинок и имаго дрозофилы. Мы впервые показали, что микроРНК могут служить инструментом адаптации работы генов в условиях общего использования ими своих регуляторных элементов. Механизм, направленный на подавление экспрессии антисмысловых *lawc*-транскриптов комплементарными микроРНК, вполне мог сложиться в ходе эволюции. Тем не менее, анализ библиотек коротких РНК (piRNA, siRNA) всех стадиях развития дрозофилы не выявил наличия интермедиатов РНК-интерференции в зоне локализации *lawc/Trf2*. Мы предполагаем, что тестируемые микроРНК могут подавлять экспрессию антисмысловых транскриптов через непосредственную супрессию их промотора. Поэтому поиск скрытых промоторов гена *lawc* будет нашей следующей задачей. Дополнительно необходимо провести эксперименты *in vitro* на культуре клеток, чтобы подтвердить результаты, полученные нами *in vivo*, показывающие роль микроРНК в сбалансированной экспрессии антисмысловых транскриптов двух перекрывающихся генов.

1.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs//Science. - 2001. – Vol. 294. - P. 853 – 858.
2. Lavorgna G., Dahary D., Lehner B., Sorek R., Sanderson C. M. and Casari G. In search of antisense//Trends Biochem. Sci. - 2004. – Vol. 29. - P. 88 – 94.
3. Munroe S. H., Zhu J. Overlapping transcripts, double-stranded RNA and antisense regulation: A genomic perspective//Cell. Mol. Life Sci. – 2006. - Vol. 63. - P. 2102 – 2118.
4. Ogawa Y., Lee J. T. Antisense regulation in X inactivation and autosomal imprinting//Cytogenet. Genome Res. - 2002. - Vol. 99. - P. 59 – 65.
5. Autuoro J.M., Pirnie S.P., Carmichael G.G. Long noncoding RNAs in imprinting and X chromosome inactivation//Biomolecules. - 2014. – Vol. 4. - P. 76-100.
6. Faghihi M.A., Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts//Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2009. – Vol. 10. – P. 637 - 643.
7. Beiter T., Reich E., Williams R.W., Simon P. Antisense transcription: A critical look in both directions//Cell. Mol. LifeSci. - 2009. - Vol. 66. - P. 94 – 112.
8. Черезов Р.О., Симонова О.Б. Перекрывающиеся гены и антисмысловая транскрипция у эукариот//Генетика. - 2014. - Т. 50. - С. 749 – 763.

9. Albert E.A., Puretskaia O.A., Terekhanova N.V., Labudina A., Bökel C. Direct control of somatic stem cell proliferation factors by the *Drosophila* testis stem cell niche // *Development*. 2018. V. 145. Is. 17. dev156315, 12p. DOI: 10.1242/dev.156315.
10. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., Karch F., and Basler K. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases//*PNAS*. - 2007. -Vol. 104. - P. 3312 – 3317.
11. Brand A.H., Perimon N. Targeted Gene as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes//*Development*. - 1993. - Vol. 118. - P. 401 - 415.
12. Schertel C., Rutishauser T., Förstemann K., Basler K. Functional characterization of *Drosophila* microRNAs by a novel in vivo library// *Genetics*. - 2012. – Vol. 192. – P. 1543 - 1552.

РАЗДЕЛ 2. РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА D4 В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами были изучены нарушения развития дрозифилы в ответ на индуцированную эктопическую экспрессию гена семейства *d4* дрозифилы – *tth* (*CG12175*). Были получены данные об увеличении времени развития при суперэкспрессии гена на стадии личинки третьего возраста [1]. Это позволило сделать предположение о том, что белок семейства *d4* возможно регулируется гормонами развития экдизоном и ювенильным гормоном 3. При изучении содержания нативного белка с помощью одного из видов антител против ТТН (антипептидных антител), в ядерных и цитоплазматических экстрактах было обнаружено изменение локализации белка с ядерной на цитоплазматическую. Однако проверка специфичности этих антител на полученных нами нокаутной по гену *tth* линии дрозифилы показала, что данные антитела слабо взаимодействуют с целевым белком и имеют специфичность к неизвестному белку. Целью этапа Госзадания на 2018 год являлось установление структуры неизвестного белка, тотально меняющего внутриклеточную локализацию на важнейшем этапе метаморфоза – стадии предкуколки.

2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммунохимическое окрашивание целых эмбрионов дрозифилы проводили с помощью антител, конъюгированных с пероксидазой хрена по протоколу, изложенному в руководстве [2]. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали диаминобензидин (DAB).

Для обогащения белка были использованы методы иммунопреципитации и изоэлектрофокусировки в гранулированном геле Sephadex G100 [3]. 500 мг цитоплазматического белкового экстракта были смешаны с насыщенным 2% CHAPS, 2% амфолитами pH 3-10 и 8М мочевиной, пастообразный гель был выложен в ячейку для горизонтального изоэлектрофокусирования на иммобилизованных амфолитах и после электрофореза при 100-200-400 вольт в течение 4 часов сконцентрированные в определенных точках фокусирования белки разделялись в SDS-PAGE и анализировали с помощью Вестерн-блот анализа для установления зоны изоэлектрофокусировки искомого белка. Гель из соответствующей зоны переносили на вертикальный трубчатый полиакриламидный гель для более точного разделения белков с помощью изоэлектрофокусирования. После двумерного электрофореза и локализации белка,

узнаваемого антителами, были получены образцы для анализа. С помощью *MALDI*-спектрометрии была получена информация об аминокислотной последовательности белка.

2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе изучения функции генов семейства *d4* дрозофилы нами были получены антитела к белковым доменам и С-концевым последовательностям соответствующих белков. При изучении ядерных и цитоплазматических экстрактов с помощью вестерн-блот анализа с антителами, специфичными против 21 а.к. последовательности белка ТТН дрозофилы мы обнаружили перекрестную активность антител против неизвестного белка, тотально мигрирующего из цитоплазмы в ядро на ключевой стадии метаморфоза мухи-превращения личинки в куколку (рис.2.1, 2.2).

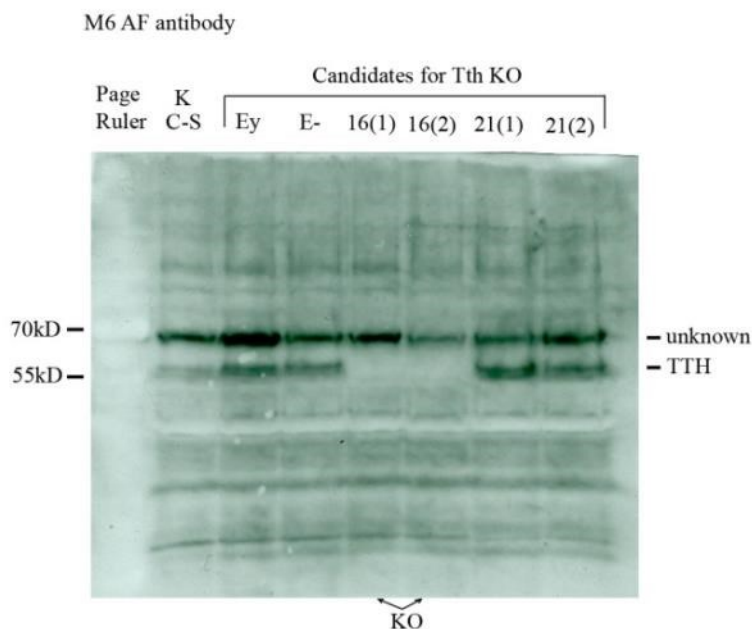


Рисунок 2.1 Специфичность антител, выработанных против белка ТТН. Видна основная активность против неизвестного белка (unknown)
 К (C-S) –белковый экстракт дрозофил линии дикого типа *Canton-S*; 16(1), 16(2) –белковый экстракт дрозофил, нокаутных по гену *tth*.

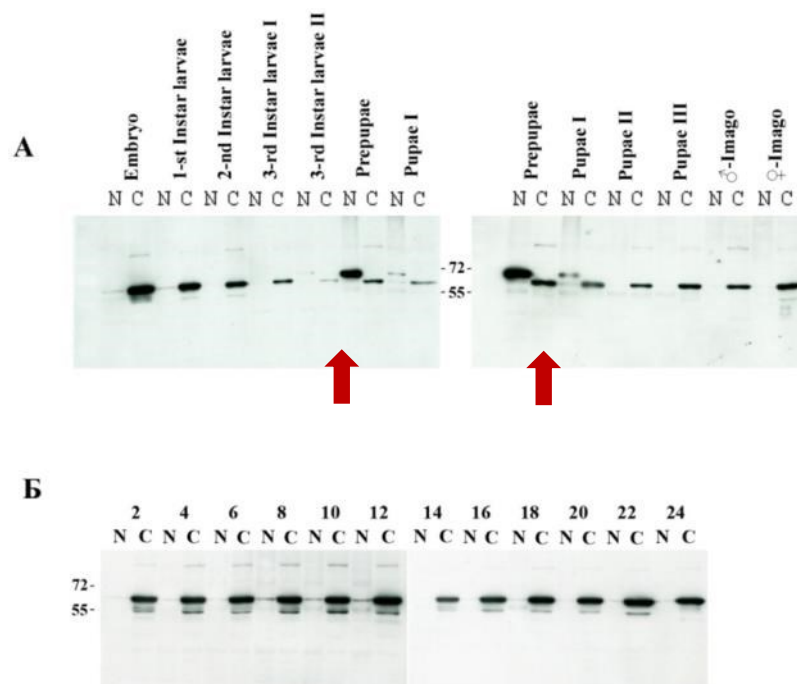


Рисунок 2.2 Вестерн-блот анализ ядерных (N) и цитоплазматических (C) экстрактов, выделенных из дрозофил разных стадий развития, с использованием антител, узнающих новый белковый фактор. А. - Показана резкая смена локализации нового белка (миграция из цитоплазмы в ядро) на стадии предкуколки (Рреpupae), сопровождаемая изменением его электрофоретической подвижности (стрелки). Б. - Стабильная локализация белка в цитоплазме на почасовых стадиях (цифры вверху), охватывающих эмбриональное развитие.

Белок имеет электрофоретическую подвижность в SDS-полиакриламидном геле, соответствующую 60-65 кДа, но после миграции в ядро становится более тяжелым, 65-70 кДа, возможно, вследствие модификации (фосфорилирование, гликозилирование, убиквитинилирование). Такой модифицированный белок связан с ДНК или ядерным белковым матриксом и подвергается экстракции только в высокой соли (450-550 mM KCl). Необычное свойство белка мигрировать из цитоплазмы в ядро в важнейшем периоде метаморфоза дрозофилы позволило сделать предположение, что мы наблюдаем поведение не охарактеризованного транскрипционного фактора, либо сигнальной молекулы, транслирующей внешний сигнал в ядро. Для идентификации данного белкового фактора были получены препаративные количества ядерных и цитоплазматических экстрактов из эмбрионов и предкуколок линии дрозофилы, нокаутной по гену *tth*. Для обогащения белка были использованы методы иммунопреципитации, изоэлектрофокусировки в гранулированном геле Sephadex G100 с последующим разделением белков с помощью двумерного электрофореза. Были получены образцы, содержащие белок, взаимодействующий с соответствующими антителами. С помощью *MALDI*-спектрометрии мы определили состав аминокислотной последовательности и идентифицировали белок. Им

оказался **Chaperoning Containing T-complex protein1 subunit3 isophormA (CCT3/CG8977**, размер 544 а.к.) - компонент мультисубъединичного комплекса **TRiC/CCT (TCP-1 Ring Complex** или **Chaperonin Containing TCP-1**[4]), отвечающего за фолдинг многих белков, в частности корепрессора ядерных рецепторов - деацетилазу гистонов **HDAC3**. Согласно литературным данным [4, 5], комплекс **TRiC** состоит из восьми субъединиц, продуктов генов-паралогов, объединенных в кольцо массой 400кДа. Активный АТФ-зависимый шапероновый комплекс состоит из двух таких колец. Комплекс **TRiC** при посредничестве **HSP90** связывает и инициирует активацию **HDAC3** в цитоплазме. **HDAC3** связывается с корепрессором ядерных гормональных рецепторов **SMRT**, образуя **SMRT-HDAC3** комплекс, который транспортируется в ядро, связывается с ядерными рецепторами гормонов и репрессирует транскрипцию целевых генов через деацетилирование гистонов (Рис. 2.3).

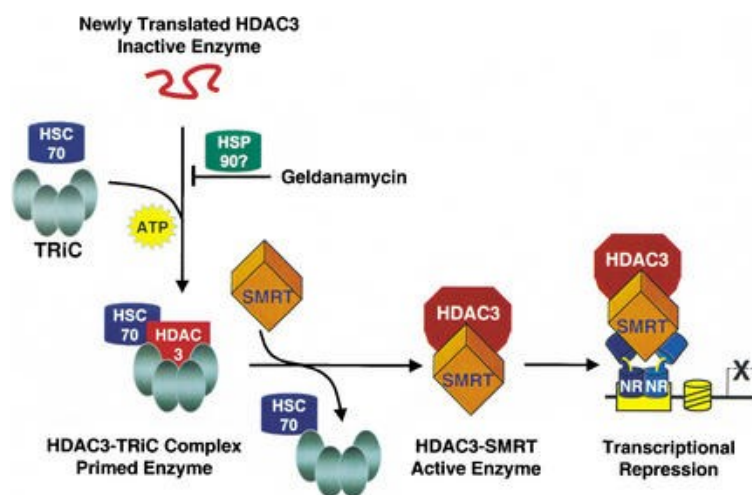


Рисунок 2.3 - Схема участия **HDAC3** в репрессии ядерных рецепторов (по литературным данным [5])

SMRT –корепрессор ядерных гормональных рецепторов; **TRiC**-кольцевой шапероновый T-комплекс белков; **HDAC3**-гистон-деацетилаза 3.

Таким образом, мы показали, что на стадии предкуколки одна из субъединиц **TRiC**-комплекса, **CCT3**, модифицируется с увеличением мол. веса на 5-10кДа и транспортируется в ядро, где связывается с ДНК или ядерным белковым матриксом. Мы предполагаем, что возможные модификации субъединиц (фосфорилирование, гликозилирование, убиквитинирование) могут разрушать комплекс, а транспорт субъединицы (или субъединиц) в ядро может происходить при посредничестве либо **HDAC3**, либо **SMRT**. По многочисленным литературным данным комплекс **TRiC** локализуется и функционирует в цитозоле. Однако наши данные не исключают функционирование отдельных субъединиц в

ядре. Возможно, функцией фактора CCT3 является HDAC3-опосредованная репрессия рецептора ключевого гормона метаморфоза насекомых 20-гидроксиэкдизона на стадии формирования куколки.

С помощью иммунохимического окрашивания целых эмбрионов дрозофилы мы показали избирательную миграцию CCT3 в ядра клеток-предшественниц нейробластов и первичных половых клеток эмбриона (Рис. 2.4).

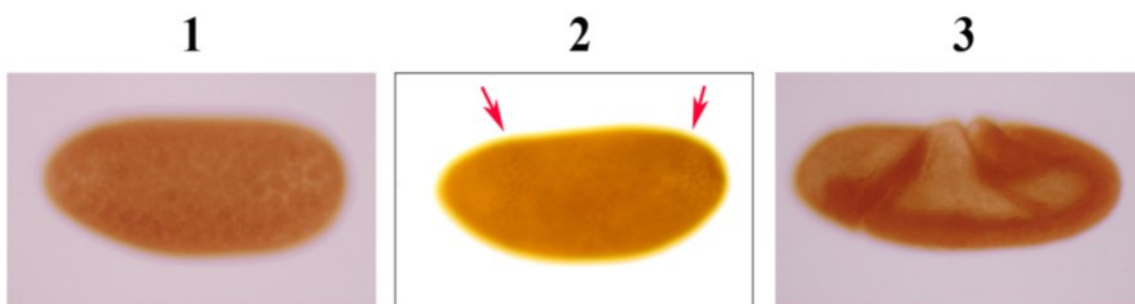


Рисунок 2.4 -Локализация белка CCT3 в ядрах и цитоплазме эмбриона дрозофилы
Иммунохимическое окрашивание антителами к CCT3 эмбрионов дрозофилы стадии: (1) прецеллюлярной бластодермы; (2) целлюлярной бластодермы; (3) 8-9 (по Volker Hartenstein, Atlas of Drosophila Development). Красные стрелки указывают районы с ядерной локализацией CCT3.

2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная задача данного этапа была выполнена: был выделен и идентифицирован белок CCT3, тотально мигрирующий из цитоплазмы в ядро на ключевой стадии метаморфоза дрозофилы - превращения личинки в куколку. Впервые была показана локализация CCT3 в ядре. В дальнейшем необходимо определить природу модификации белка и его цели внутри ядра, с которыми взаимодействует CCT3: с помощью методов ко-иммунопреципитации и хроматин-иммунопреципитации планируется определить области ДНК, с которыми взаимодействуют комплексы, содержащие CCT3 и возможное взаимодействие с гормональным рецептом 20-гидроксиэкдизона. Возможно также показать связь CCT3 с транскрипционными факторами семейства d4 в процессе нейрогенеза. Данное предположение основано на факте избирательной миграции CCT3 в ядра в зонах закладки эмбриональной нервной системы дрозофилы. У млекопитающих было показано, что UBI-D4/REQUIEM/DPF2 является корепрессором для ядерного эстроген-подобного рецептора ER α и связывается с гистон-деацетилазой HDAC1 [6, 7], что говорит о том, что белки семейства d4 и CCT3 могут взаимодействовать, участвуя в репрессии ядерных гормональных рецепторов.

2.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Симонова О.Б., Куликова Д.А., Мерцалов И.Б. и др. Исследование суперэкспрессии нового гена *toothrin* у дрозофилы//Генетика. - 2005. -Т. 41. - С. 196 - 202.
- 2 Patel N.H. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes//Methods in Cell Biology. - 1994. - Vol. 44. - P. 445 - 456, 456a, 456b, 457 - 487.
- 3 Görg A., Lück C., Weiss W. Sample prefractionation in granulated sephadex IEF gels//Methods Mol Biol. – 2008. – Vol. 424, - P. 277- 286.
- 4 Lewis V.A., Hynes G.M., Zheng D., Saibil H., Willison K. T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol//Nature. – 1992. – Vol. 358, P. 249 – 252.
- 5 Guenther M.G., Yu J., Kao G.D., Yen T.J., Lazar M.A. Assembly of the SMRT–histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex//Genes Dev. - 2002.- Vol. 16, P. 3130 – 3135.
- 6 Matsuyama R., Takada I., Yokoyama A., Fujiyama-Nakamura S., Tsuji N., Kitagawa H., Fujiki R., Kim M., Kouzu-Fujita M., Yano T., Kato S. Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1//J Biol Chem. – 2010. – Vol. 285, P. 18166 - 18176.
- 7 Funikov S.Y., Kulikova D.A., Krasnov G.S., Rezvykh A.P., Chuvakova L.N., Shostak N.G., Zelentsova E.S., Blumenstiel J.P., Evgen'ev M.B. Spontaneous gain of susceptibility suggests a novel mechanism of resistance to hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*//PLoS Genet. - 2018. - Vol. 14, N 5. - e1007400.

РАЗДЕЛ 3. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

3.1 ВВЕДЕНИЕ

Транскрипционный фактор Aryl-hydrocarbon receptor (AHR) является одним из ключевых факторов регуляции «адаптивных» и «развитийных» процессов. [1]. Расширение сферы вовлечённости AHR в регуляцию жизненно-важных процессов во многом происходило путём усложнения сигнального пути его активации и поддержания необходимого уровня его экспрессии в ходе эволюции. Важным элементом сигнального пути активации AHR является связывание его с лигандом. У млекопитающих, включая человека, их роль способны выполнять соединения, как эндогенного, так и экзогенного происхождения (ксенобиотики). [2, 3, 4]. При этом у беспозвоночных, по-видимому, роль лигандов AHR выполняют агенты эндогенного происхождения [5]. Для организма важно, чтобы AHR работал в клетках, на нужном уровне. К наиболее тяжёлым последствиям понижения уровня экспрессии AHR можно отнести повышение опасности возникновения онкологических заболеваний и неспособность организма к полноценной защите от токсического действия ксенобиотиков [6]. У позвоночных и человека причиной повышения уровня экспрессии AHR чаще всего бывает воздействие экзогенных лигандов агонистов. При этом по степени аффинности к AHR среди таких ксенобиотиков существует широкий полиморфизм, степень аффинности лиганда определяет способности AHR активировать подконтрольные ему гены-мишени [7].

Многочисленные патологические процессы у человека, связаны с действием ксенобиотиков, обладающих лигандной активностью по отношению к AHR. Изучение таких механизмов сопряжено с неизбежной необходимостью контактировать с высокотоксичными веществами, что накладывает определённые ограничения на выполнение экспериментальных процедур. Чаще всего их выполняют на клеточных культурах, что ограничивает понимание последствий эктопической экспрессии AHR на процессы развития системных структур в условиях *in vivo*. В какой-то мере, эти ограничения можно преодолеть, используя линии *Drosophila*, геном которых трансформирован генными конструкциями, содержащими человеческий ген AHR. В предыдущих исследованиях нами была получена такая линия дрозофил, содержащая ген арил-гидрокарбонового рецептора человека под контролем дрожжевого промотерного элемента UAS [8]. Поскольку ксенобиотики не способны активировать гомолог AHR беспозвоночных мы использовали дрозофил, трансформированных геном *AhR* человека, для изучения эффектов эктопической экспрессии AHR и его экзогенных лигандов *in vivo*.

3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*.

Оценку специфичности активации целевых генов-мишеней АНР в ответ на воздействие различных ксенобиотиков осуществляли в экспериментах с использованием специально созданных, генетически трансформированных линий мух дрозофилы с применением новейших молекулярно-биологических и биохимических методов. Использовали личинок и имаго дрозофилы, трансформированных генными конструкциями, содержащих ген *AhR* человека, поставленный под контроль UAS-последовательности, сигнальной для дрожжевого транскрипционного фактора GAL4. Это позволило активировать его транскрипцию при помощи GAL4-тканеспецифических драйверов, в мозге, ножных, крыловых и глазных структурах дрозофилы. Продукты трансляции трансгенов АНР человека активировали лигандами экзогенного происхождения (индирубин, бета-нафтофлаван и индинол). Синтезированные линии использовались для оценки специфичности действия конструкции *UAS-AhR*. Оценку проводили с помощью ПЦР-анализа. Оценку морфогенетических эффектов влияния исследуемых лигандов выполняли с использованием световой и конфокальной микроскопии.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повсеместная индукция экспрессии *UAS-AhR* при помощи *tubP-GAL4*- и *ACT-GAL4*-драйверов в отсутствие действия экзогенных лигандов вызывала тотальную гибель эмбрионов дрозофилы. Лишь отдельные особи доживали до личиночной стадии развития (рис. 3.1).

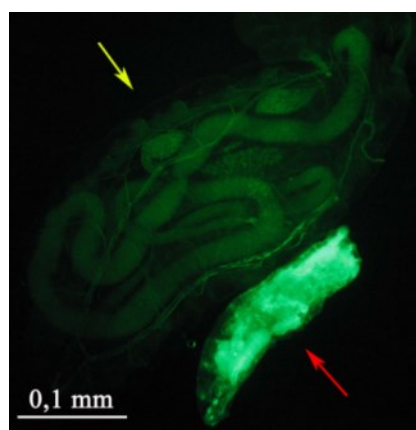


Рисунок 3.1 - Влияние тотальной экспрессии АНР человека на развитие эмбрионов и личинок раннего возраста дрозофилы. Красной стрелкой указана гибнущая личинка генотипа $p\{w^{+m}[UAS-AhR]/+; p\{w^{+m}[UAS-GFP]\}/p\{w^{+m}[tubP-GAL4]\}LL7$, желтой стрелкой - развивающаяся личинка $w^{+m}[UAS-AhR]/+; p\{w^{+m}[UAS-GFP]\}/+$.

Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *Dll-GAL4* в отсутствии действия экзогенных лигандов вызывала тотальную гибель куколок дрозофилы. Анализ ножных структур имаго, неспособных вылупиться из пупария, показал полное блокирование развития дистальных элементов ноги (рис. 3.2).

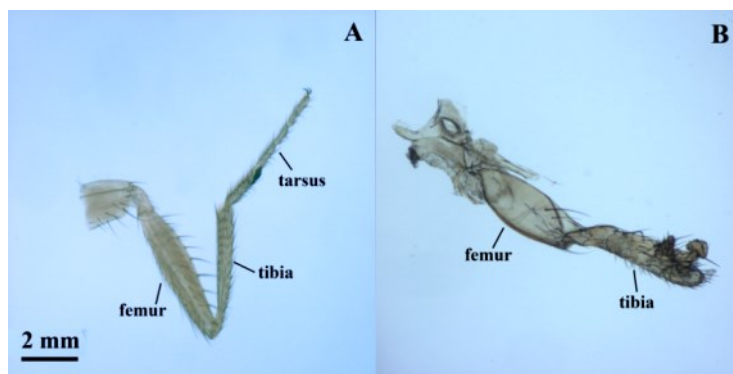


Рисунок 3.2 - Ножные структуры контрольных мух *UAS-AhR*(A) и подопытных *Dll-GAL4 > UAS-AhR*(B), развивавшихся на стандартном корме без добавления экзогенных лигандов.

Эти эксперименты впервые показали, что в организме дрозофилы имеются эндогенные лиганды, способные активировать человеческий AHR в отсутствии его активации экзогенными лигандами.

Индукция экспрессии *UAS-AhR* в крыловых и ножных зачатках при помощи драйвера *adpp-GAL4* в сочетании с действием экзогенных лигандов усиливала нарушения развития не только крыловых, но и ножных структур (рис. 3.3).

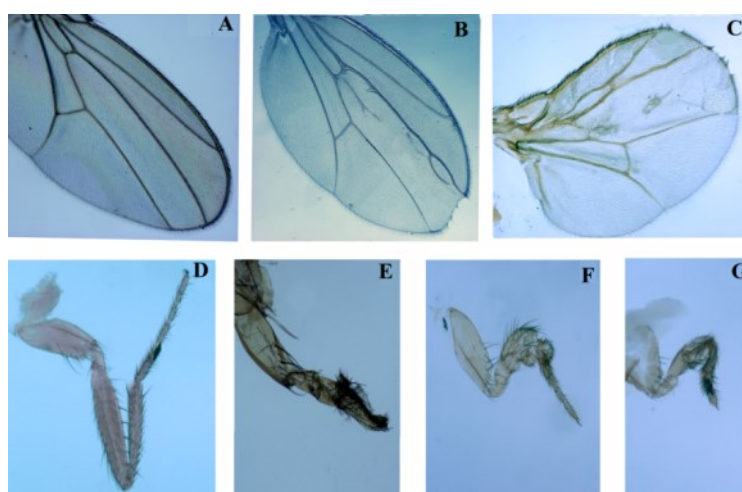


Рисунок 3.3 - Фотографии крыловых (a,b,c) и ножных (d,e,f,g) структур дрозофилы дикого типа (a,d) и дрозофил *Dpp-GAL4 > UAS-AhR^{H2}* (e, f, g), развивавшихся на стандартном корме без лигандов (b, d), на корме с индирубином (e), индинолом (f), бета-нафтофлавоном (g).

Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *Otu-gal4/+;Nos-gal4* (*MTD-gal4*) вызывала нарушения в оогенезе у зрелых самок только в сочетании с добавлением экзогенных лигандов в корм личинкам. Среди нарушений вызванных эктопической экспрессией *UAS-AHR* нужно выделить деградацию яйцевых камер, о чём свидетельствуют пикнотические ядра (рис. 3.4 а); формирование рыхлого слоя эпителиальных фолликулярных клеток (рис. 3.4 b, b', b''), дополнительный раунд митоза, свидетельствующий о нарушении клеточного цикла при формировании герминативной цисты (рис 3.4 d, e).

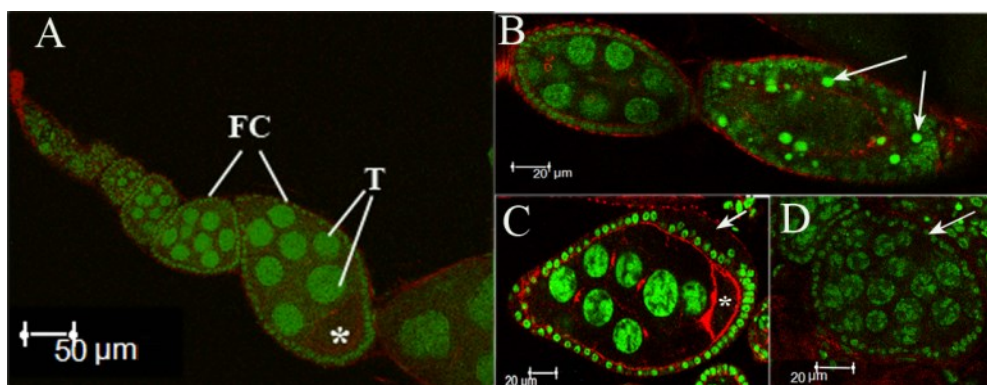


Рисунок 3.4 - Нарушения во время оогенеза у самок *MTD-Gal4>UAS-AHR*, развивавшихся на среде с лигандом.

А - деградация яйцевых камер (красные стрелками указывают на пикнотические ядра). Окраска DNA (SytoxGreen); В, В', В'' - фолликул с нарушением структуры слоя фолликулярных клеток (стрелка). В - Окраска DNA (SytoxGreen - зелёный), В' - окраска цитоскелета (актин - красный), В'' - совмещение. Масштаб, как на В"; С – нормальное количество герминативных клеток в фолликуле: 15 трофоцитов и 1 ооцит; D, E – фолликулы с большим, чем в норме, количеством трофоцитов – 32, что говорит о дополнительном раунде митоза, имевшем место при формировании герминативной цисты. Окраска DNA (SytoxGreen)

Индукция *UAS-AhR* человека в структурах мозга эмбриона при помощи драйвера *Elav-GAL4* в отсутствии экзогенных лигандов не вызывала нарушения в развитии мозга дрозофилы, однако добавление экзогенных лигандов в кормовую среду вызывала нарушения развития структур нервного корда (рис. 3.5) и тотальную гибель личинок.

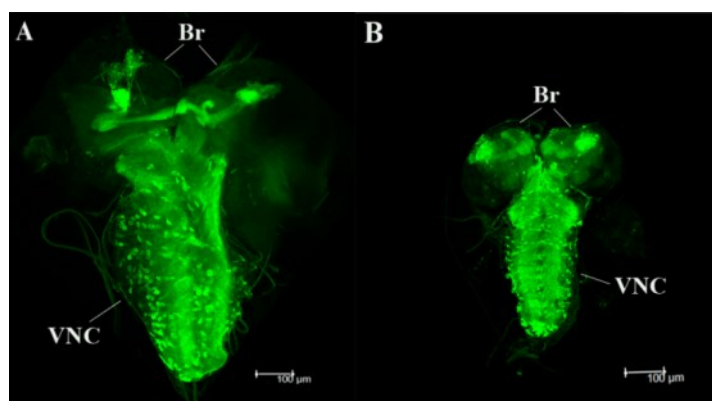


Рисунок 3.5 - Реконструированные конфокальные срезы ЦНС личинок *Elav-GAL4*, *Elav>GFP;UAS-AhR* слитые в единый 3D-образ. А – ЦНС личинок, развивавшихся на стандартном корме. В - ЦНС личинок, развивавшихся на кормовой среде, содержащей лиганд. Видны нарушения сегментации и симметрии абдоминальной области нервного корда.

Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *GMR-GAL4* в отсутствии действия экзогенных лигандов не вызывала нарушения развития глазных структур. Мы видим упорядоченность построения омматидиев и механорецепторов (микрощетинок) (рис. 3.6 а, а'), однако действие экзогенных лигандов вызывало нарушения их развития. Характер нарушений глазных структур отличается в зависимости от использованных лигандов: индинол вызывал наиболее существенные нарушения в построении омматидиев и уменьшенное число механорецепторов, чем бета-нафтофлаван и индирубин (рис. 6 б, б').

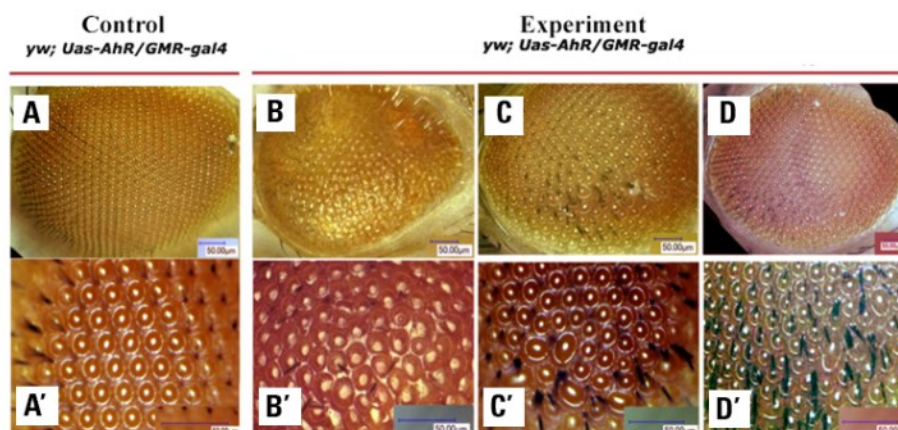


Рисунок 3.6. Фотографии глазных структур мух *GMR-GAL4;UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде без лиганда – А, А', на кормовой среде, содержащей индинол – В, В', бета-нафтофлаван – С, С' и индирубин – D, D'. Видна упорядоченность построения омматидиев и механорецепторов на А, А'. На остальных снимках видны нарушения в построении омматидиев и уменьшение числа механорецепторов.

Результаты эктопической экспрессии АНР человека в различных тканевых структурах дрозофилы демонстрируют его способность взаимодействовать с эндогенными лигандами дрозофилы, продуцируемыми некоторыми тканевыми структурами. Вместе с тем удалось выявить ткани, в которых для активации АНР человека требуются экзогенные – лиганды (Табл. 3.1). Эти результаты позволили выстроить дальнейшие эксперименты нацеленные на изучение влияния лигандов-ксенобиотиков на уровень транскрипции целевых генов АНР человека, исключив при этом влияние эндогенных лигандов.

Таблица 3.1 - Суммарные результаты РТ-ПЦР: «+» повышение уровня транскрипции, «-» снижение, «0» нет влияния.

Лиганд Ген	Индирубин	Бета- Нафтофлавон	Индинол
ЦНС личинки (<i>Elav-GAL4 driver</i>)			
<i>Sox70</i>	0	+	+
<i>St6Gal</i>	+	+	+
<i>Mgat1</i>	-	+	+
<i>GstT4</i>	-	0	+
<i>Cyp6g1</i>	+	+	+
<i>Rel</i>	-	+	+
<i>dl</i>	+	+	+
<i>p53</i>	0	+	+
<i>Myс</i>	0	+	+
<i>dap</i>	0	+	+
<i>Rbf</i>	+	+	+
<i>Jra</i>	-	+	+
<i>Cdc42</i>	+	+	+
Мозг имаго (<i>Elav-GAL4 driver</i>)			
<i>Sox70</i>	+	+	0
<i>St6Gal</i>	+	0	0
<i>Mgat1</i>	0	0	0
<i>GstT4</i>	+	+	0
<i>Cyp6g1</i>	+	+	+
<i>Rel</i>	+	+	+
<i>dl</i>	0	0	-
<i>p53</i>	0	0	-
<i>Myс</i>	+	0	0
<i>dap</i>	+	0	-
<i>Rbf</i>	+	+	+
<i>Jra</i>	0	0	-
<i>Cdc42</i>	0	0	-
Яичники (<i>MTD-GAL4 driver</i>)			

<i>Sox70</i>	0	+	+
<i>St6Gal</i>	0	0	-
<i>Mgat1</i>	0	-	-
<i>GstT4</i>	+	+	0
<i>Cyp6g1</i>	+	+	+
<i>Rel</i>	-	+	-
<i>dl</i>	0	0	-
<i>p53</i>	+	-	0
<i>Myc</i>	0	0	-
<i>dap</i>	+	+	0
<i>Rbf</i>	+	0	0
<i>Jra</i>	+	0	0
<i>Cdc42</i>	0	0	+
Глазные имажинальные диски (<i>GMR-GAL4</i> driver)			
<i>Sox70</i>	-	0	+
<i>St6Gal</i>	+	0	+
<i>Mgat1</i>	-	-	0
<i>GstT4</i>	0	0	+
<i>Cyp6g1</i>	0	0	0
<i>Rel</i>	0	+	+
<i>dl</i>	-	0	+
<i>p53</i>	0	-	+
<i>Myc</i>	-	-	+
<i>dap</i>	-	-	0
<i>Rbf</i>	0	0	+
<i>Jra</i>	0	-	0
<i>Cdc42</i>	-	-	0

Результаты экспериментов показали способность ксенобиотиков как повышать, так и понижать уровень транскрипции целевых генов АНР человека, участвующих в регуляции пролиферации, движения, поляризации и программируемой смерти клеток. Поскольку на практике экзогенные лиганды АНР используются в качестве фармацевтических средств, необходимо учитывать полученные нами данные при построении терапевтических схем лечения онкозаболеваний [9].

3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фенотипический анализ последствий эктопической экспрессии АНР человека в различных органо-тканевых структурах дрозофилы выявил нарушения их развития. Выбранные нами экзогенные лиганды в мировой литературе отнесены к лигандам-агонистам позвоночных. Такое определение они получили в основном в экспериментах с культуральными клетками. В наших экспериментах, выполненных в условиях *in vivo*, мы впервые обнаружили способность лигандов-агонистов АНР в зависимости от вида ткани и стадии развития переключаться в лиганды-антагонисты, то есть активация экспрессии

генов-мишеней АНР ксенобиотиками трансформировалась в их репрессию. Возможно, такое поведение лигандов отражает способность АНР активировать свои целевые гены в зависимости от их эпигенетического статуса, который может отличаться в разных тканях и на разных стадиях онтогенеза. Проверку этого предположения мы планируем выполнить в 2019 году. Для этого будут использованы дрозофилы с мутациями в генах: *Pc*, *E(Z)*, кодирующих ключевые эпигенетические факторы и вещества, ингибирующие их активность (белиностат, UNC1999). Полученные данные расширят представления об участии АНР человека в процессах регуляции развития и биodeградации токсических факторов.

Результаты работы легли в основу патента Российской Федерации № 2664433, (зарегистрирован 17.08.2018 г.) на изобретение "Способ оценки фармакологических и токсических свойств веществ – потенциальных лигандов АНР человека" / *Акишина А.А., Воронцова Ю.Е., Зацепина О.Г., Кузин Б.А., Мерцалов И.Б., Симонова О.Б., Слезингер М.С., Черезов Р.О.* Заявитель Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ge N.L., Elferink C.J. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle//J. Biol. Chem. - 1998. -Vol. 273. - P. 22708 – 22713.
2. Jaronen M., Quintana F. Immunological relevance of the coevolution of IDO1 and AHR//Front. Immunol. - 2014. - Vol. 5. - P. 521.
3. Stegeman J.J., Hahn M.E.//Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC, Ostrander GK. (Eds.). Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. CRC/Lewis. Boca Raton. 1994. - P. 87 – 206.
4. Hahn ME. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective//Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol Toxicol Endocrinol. - 1998. - Vol. 121. - P. 23 - 53.
5. Mark E., Hahn M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution//Chemico-Biological Interactions. - 2002.- V. 141.- P. 131 – 160.
6. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis//Biochem. Pharmacol. – 2000. – Vol. 59, P. 65 – 85.
7. Murray I.A., Morales J.L., Flaveny C.A., Dinatale B.C., Chiaro C., Gowdahalli K., Amin S., Perdew G.H. Evidence for ligand-mediated selective modulation of aryl hydrocarbon receptor activity//Mol Pharmacol. – 2010. – Vol. 77, P. 247 – 254.

8. Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Mertsalov I.B., Zatsepina O.G., Slezingher M.S., Panin V.M., Petruk S., Enikolopov G.N., Mazo A., Simonova O.B., Kuzin B.A. Xenobiotic-induced activation of human Aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers//Oncotarget. - 2017. - Vol. 8, P. 102934 - 102947.

9. Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Кузин Б.А., Симонова О.Б. Арилгидрокарбоновый рецептор как потенциальная мишень для противораковой терапии//Биомедицинская химия. 2018. - Т. 64. - С. 397 - 415.

РАЗДЕЛ 4 КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

4.1 ВВЕДЕНИЕ

Глобальной угрозой для пшеницы является мучнистая роса, вызванная *Blumeria graminis* (Bg), контроль над её распространением осуществляется с использованием фунгицидов и сортов, содержащих R гены, которые обеспечивают изолированную специфическую защиту. В условиях Центра Нечерноземной зоны России практически ежегодно наблюдается поражение яровой пшеницы мучнистой росой в той или иной степени, которое в отдельные годы (один раз в 6-8 лет) достигает эпифитотийного порога. За период с 1995 по 2015 год в 27 % исследуемых лет максимальная степень поражения была выше 70 %, что позволяет сделать вывод об эпифитотийной ситуации в эти годы, в 60 % случаев поражение было на уровне 45-60 %, и только в 13 % случаев поражение было незначительным и составляло менее 40 %. Эта проблема может быть решена путем создания нескольких вариантов генетических конструкций CRISPR/Cas9 приводящих к инактивации гена MLO (ведущая к невосприимчивости к плесени), различающихся между собой определенными параметрами и эффективностью. Наиболее удобным способом оценки эффективности генетических конструкций для редактирования генома является трансфекция протопластов.

Исследование направлено на создание линейки сортов пшеницы, иммунных к мучнистой росе. Сорта будут созданы путем внесения направленных изменений в геном пшеницы, приводящих к инактивации гена *MLO*, необходимого для заражения растений пшеницы патогеном *Blumeria graminis*. Важнейшей особенностью получаемых сортов будет являться долговременный мультирасовый характер устойчивости. Применение созданных сортов позволит с меньшими затратами получать высокие стабильные урожаи пшеницы в нечерноземной зоне России. Для этого необходимо ввести генетический инструментарий для редактирования последовательности гена MLO в отдельную клетку, после чего регенерировать из этой клетки целое растение пшеницы. Генетический инструментарий представляет собой вектор для трансформации растений, кодирующих 2 компонента технологии редактирования генома—нуклеазу и «гидовую» РНК, которая направляет нуклеазу на конкретное место в геноме [1, 2].

Технология инактивации гена MLO состоит из пяти основных этапов:

- 1) идентификация точных нуклеотидных последовательностей всех аллельных вариантов гена MLO в выбранных сортах пшеницы

2) создание генетического инструментария (генно-инженерных конструкций) для редактирования всех обнаруженных аллелей гена *MLO*

3) оптимизация процедур трансформации незрелых зародышей и регенерации из них целых растений для заданных сортов пшеницы

4) трансформация созданными генетическими конструкциями незрелых зародышей пшеницы и регенерация трансгенных растений

5) исследование потомства трансгенных растений с целью отбора линий, содержащих нокаут-мутации во всех аллелях гена *MLO*, и не содержащих при этом вставки Т-ДНК [3].

На данном этапе нами разработан протокол выделения протопластов пшеницы, позволяющий получать суспензию клеток плотностью от 5×10^5 мл⁻¹ до 7×10^6 мл⁻¹. Оптимизация методики трансфекции осуществлялась при помощи генетической конструкции, кодирующей зеленый флюоресцирующий белок GFP, в результате чего удалось достичь эффективности трансформации более 40%. Достигнутый результат позволяет использовать разработанный протокол выделения и трансфекции протопластов для сравнительной оценки эффективности редактирования генома пшеницы различными генно-инженерными конструкциями.

4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для целенаправленного редактирования генома пшеницы необходимо сравнить генетический инструментарий, который представляет собой вектор для трансформации растений, кодирующих 2 компонента технологии редактирования генома – нуклеазу и «гидовую» РНК, которая направляет нуклеазу на конкретное место в геноме. Наиболее удобным способом оценки эффективности генетических конструкций для редактирования генома является трансфекция протопластов [2].

4.2.1 Подготовка исходного материала

Очищенные семена пшеницы стерилизуют с помощью 75% этанолом в течение 1 мин. Эти семена далее стерилизуют 2,5% гипохлоридом натрия, в течение 20 мин, промывали пять раз стерильной водой. Семена инкубируют на среде с 1/2 MS с фотопериодом 12 (16) ч света/темноты при 26 ° С в течение 7-10 дней. Зеленые проростки в количестве 60 штук используются далее.

4.2.2 Изоляция протопластов

Пучок побегов (30 штук) разрезают вместе, используется только средняя часть – от начала гипокотилия до середины побега. Далее побеги разрезают на полоски шириной 0,5 мм с использованием острых бритв в небольшом количестве 0,6 М маннитола (рис. 4.1).

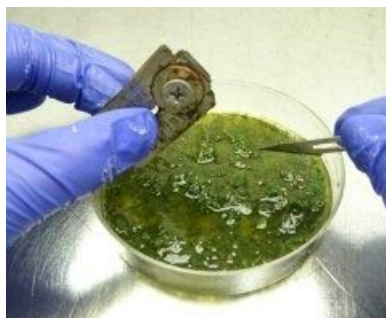


Рисунок 4.1 - Измельчение листовых пластинок пшеницы

Полоски листьев немедленно переносят в 0,6 М раствор маннитола на 10 мин для быстрого плазмолиза. Обычно протопласты в количестве 1×10^7 могут быть изолированы от 100-120 саженцев, и их можно использовать в 20 отдельных трансформациях с 5×10^5 клетками за трансформацию.

После плазмолиза ткани листа фильтруют через нейлоновые сетки, и переносят полоски в коническую колбу емкостью 150 мл, содержащую 50 мл стерилизованного фильтром раствора фермента (1,5% целлюлазы RS, 0,75% мацерозим R-10, 0,6 М маннитол, 10 мМ MES при pH 5,7, 10 мМ CaCl₂ и 0,1% BSA) и оборачивают колбу алюминиевой фольгой (рис.4.2). Затем инкубируют полоски в темноте в течение 5-6 ч при осторожном смешивании (60-80 об/мин) при комнатной температуре.



Рисунок 4.2 - Растворение клеточных стенок тканей пшеницы в ферментативном растворе

После ферментативного расщепления добавляют 50 мл раствора W5 (154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ KCl и 2 мМ MES при pH 5,7) в коническую колбу и затем осторожно встряхивают его вручную в течение 10 секунд для выхода протопластов. Фильтруют смесь через 40мкм нейлоновые сетки и промывают полоски листьев на поверхности нейлоновой сетки 3-5 раз с помощью W5.

Отмытые протопласты собирают в три или четыре круглодончатые центрифужные пробирки объемом 30-50 мл, и центрифугируют при 80g в течение 3 мин при комнатной температуре, и удаляют супернатант с помощью пипетки. Протопласты очень хрупкие, поэтому необходимы нежные манипуляции. Скорость центрифуги должна быть не слишком высокой.

После центрифугирования протопласты повторно суспендируют в 10 мл раствора W5, собирают их в одну круглодонную пробирку объемом 50 мл и держат их на льду в течение 30 мин. Интактные протопласты должны оседать на дно пробирки под действием силы тяжести через 30 мин. После удаляют только супернатант, непосредственно без центрифугирования с помощью пипетки. Ресуспендируют протопласты в 4 мл раствора кальция и магния при конечной концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток на мл. Определяют концентрацию протопластов под микроскопом ($\times 100$) или с помощью гемоцитометра.

4.2.3 ПЭГ-опосредованная трансформация протопластов

Для трансформации пшеницы добавляют 40 мкг плазмиды в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл, а затем добавляют 200 мкл протопластов (5×10^5 клеток) и осторожно смешивают их, постукивая по пробирке или слегка пипетируя. После добавляют 220мкл свежеприготовленного раствора ПЭГ и тщательно перемешивают, осторожно постукивая по пробирке или слегка пипетируя. Затем инкубируют смесь в течение 15-20 мин в темноте.

Добавляют 880мкл раствора W5 в пробирку и хорошо перемешивают, инвертируя чтобы остановить процесс трансформации. Протопласты пшеницы центрифугируют при 80 g в течение 3 мин и удаляют супернатант. Повторно суспендируют протопласты в 2 мл раствора W5. Переносят протопласты в 6-луночные планшеты (рис.4.3), оборачивают планшеты в алюминиевую фольгу и инкубируют их при 23°C не менее 48 часов (максимум 72 ч). Проверяют состояние протопластов под микроскопом, здоровые клетки должны казаться полными и круглыми. Эффективность трансфекции можно узнать, подсчитав количество флуоресцирующих клеток GFP в положительном контроле, используя флуоресцентный микроскоп, должно быть ~ 70-80% GFP-позитивных клеток пшеницы.



Рисунок 4.3 - Инкубация протопластов пшеницы в 6-луночных планшетах после трансфекции

4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были созданы несколько вариантов генетических конструкций (в данном случае, приводящие к инактивации гена *MLO*, необходимого для заражения растений пшеницы патогеном *Blumeria graminis*), различающихся между собой определенными параметрами, и сравнительной оценки их эффективности. Выбор целевых сайтов Cas9 основывался на нескольких параметрах: 20-нитная направляющая последовательность в sgRNA должна направлять Cas9 на желаемый сайт через спаривание оснований Watson-Crick. Целевая последовательность 20 п.о. должна предшествовать 5'-NGG PAM, которая необходима для связывания Cas9 с ДНК-мишенью, следует избегать целевых последовательностей на 3'-конце кодирующих областей или интронов.

Нарушения генов в этих положениях могут незначительно влиять на функционирование генов или вообще не влиять на них. Эффекты вне цели должны быть сведены к минимуму, мы рекомендуем искать геном, используя BLAST-поиск (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) для соответствующей 22-nt -20-nt sgRNA-связывающей последовательности. Только целевая последовательность ~ 20-nt sgRNA должна быть заменена на целевой геномный сайт; остальная часть sgRNA остается прежней и когда выбран целевой сайт, прямые и обратные олигонуклеотиды могут быть сконструированы и синтезированы для вставки в вектор scg sgRNA. Для пшеницы пары олигонуклеотидов должны быть: Wheat-Fwd: 5'-CTTGN -3 ', Wheat -Rev: 5'-AAACN-3 '.

По неизвестным причинам некоторые sgRNAs неэффективны или могут даже не работать. Чтобы получить эффективные sgRNAs и избежать повторных экспериментов, по крайней мере две sgRNAs на целевой локус должны быть сконструированы для пшеницы. Сначала необходимо проверить эффективность sgRNAs в протопластах, так как это наиболее удобный способ оценки эффективности генетических конструкций для редактирования генома, поскольку они лишены клеточной стенки и могут быть легко трансфицированы плазмидной ДНК.

Оценка эффективности редактирования осуществляется посредством выделения тотальной ДНК из суспензии протопластов и таргетного секвенирования участка генома, содержащего сайт редактирования. При этом успешность методики в значительной степени определяется эффективностью трансфекции протопластов. Нами был разработан протокол выделения протопластов мягкой пшеницы, позволяющий получать суспензию клеток плотностью от 5×10^5 мл⁻¹ до 7×10^6 мл⁻¹ (рис.4.4, 4.5).

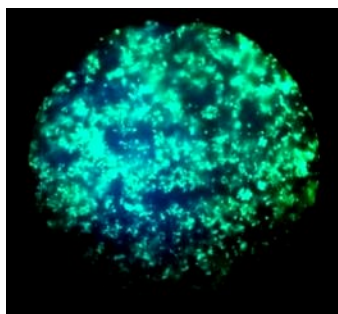


Рисунок 4.4 - GFP-позитивные клетки пшеницы под флуоресцентным микроскопом

Оптимизация методики трансфекции осуществлялась при помощи генетической конструкции, кодирующей зеленый флуоресцирующий белок GFP. В результате нашей работы удалось достичь эффективности трансформации более 40%.

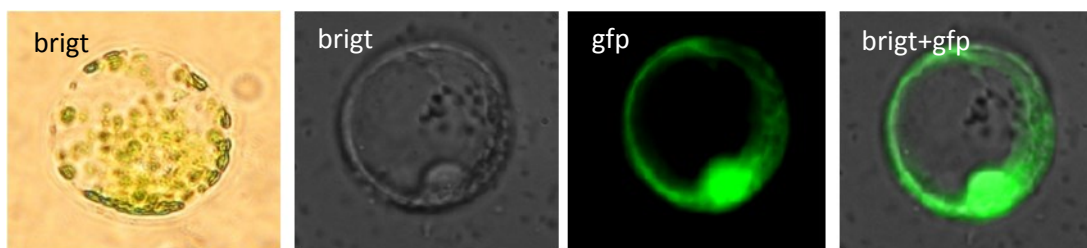


Рисунок 4.5 - Индивидуальные и объединенные изображения протопластов

4.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система CRISPR/Cas9 представляет собой универсальный инструмент геномного редактирования, позволяющий вносить точечные изменения в заданные участки эукариотического генома. Применение технологии CRISPR/Cas9 на растениях со сложным полиплоидным геномом требует высокой эффективности функционирования всех её компонентов [4]. Эта задача может быть решена путем создания нескольких вариантов генетических конструкций (в данном случае, приводящие к инактивации гена *MLO*, способствующего заражению растений пшеницы патогеном *Blumeria graminis*),

различающихся между собой определенными параметрами, и сравнительной оценки их эффективности.

Наиболее удобным способом оценки эффективности генетических конструкций для редактирования генома является трансфекция протопластов, поскольку они лишены клеточной стенки и могут быть легко трансфецированы плазмидной ДНК. При этом успешность методики в значительной степени определяется эффективностью трансфекции протопластов [4].

На данном этапе нами был разработан протокол выделения протопластов мягкой пшеницы, позволяющий получать суспензию клеток плотностью от 5×10^5 мл⁻¹ до 7×10^6 мл⁻¹. Оптимизация методики трансфекции осуществлялась при помощи генетической конструкции, кодирующей зеленый флюоресцирующий белок GFP, в результате чего удалось достичь эффективности трансформации более 40% [5].

Для увеличения урожайности пшеницы в условиях быстро меняющегося климата и экстремальности погодных условий необходимы новые сорта, адаптивные к стрессам среды [6]. Улучшение сортов пшеницы методами трансгенных технологий осуществляется более 20 лет. Продуктивным сортам придаются комплексы устойчивости к экстремальным температурам, засухе, засолению, патогенам и насекомым. Для улучшения продуктивных сортов методами трансгенной технологии необходимо наличие: 1) генов, определяющих устойчивость к стрессам; 2) эффективных систем генетической трансформации; 3) факторов, регулирующих экспрессию большого числа генов ответа на стрессы [7].

Получение сортов сельскохозяйственных культур с применением технологий геномного редактирования в настоящий момент активно ведется основными семеноводческими компаниями мира - Bayer и Du Pont Pioneer, достигнутый результат позволяет использовать разработанный протокол выделения и трансфекции протопластов для сравнительной оценки эффективности редактирования генома отечественных сортов пшеницы различными генно-инженерными конструкциями. Исследование направлено на работу с актуальными сортами отечественной селекции, имеющими большое экономическое значение и выращиваемыми на значительных площадях в РФ.

4.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Sander J. D., Joung J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes//Nature biotechnology. – 2014. – Vol. 32, No. 4. P. 347 - 355.
- 2 Shan Q. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system//Nature biotechnology – 2013. - Vol. 31, No. 8. P. 686 - 688.

3 Wang Y. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew//Nature biotechnology. – 2014. – Vol. 32, No. 9. P. 947 - 951.

4 Злобин Н.Е., Вербицкая А.А., Таранов В.В. Генетический инструментарий Crispr/Cas9 для эффективного редактирования генома растений // В кн.: Редактирование генов и геномов. Т. 2. / Отв. редактор С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. РАН, Сиб. Отд. ФИЦ Ин-т цитологии и генетики. 2-е изд. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2018. – 386 с. – 2018. Т. 2. - С. 67-93. ISBN 978-5-7692-1580-3.

5 Вербицкая А.А., Злобин Н.Е., Таранов В.В., Гапоненко А.К. Эффективный протокол для выделения и трансфекции протопластов *Triticumaestivum* L. //18-я Всероссийская конференция молодых учёных: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии; - Москва: ФГБНУ ВНИИСБ. - 2018. - С.129.

6 Gaponenko A.K., Mishutkina Ya.V. Timoshenko A.A., Shulga O.A. Genetic Transformation of Wheat: State of the Art//Russian Journal of Genetics - 2018. - Vol. 54(3). P.273 - 291. DOI: 10.7868/S0016675818030013). Гапоненко А.К., Мишуткина Я.В., Тимошенко А.А., Шульга О.А. Генетическая трансформация пшеницы. Обзор состояния проблемы//Генетика - 2018. - Т. 54. № 3. С. 273 - 291. DOI: 10.7868/S0016675818030013

7 Gaponenko A.K., Shulga O.A., Mishutkina Y.B., Tsarkova E.A., Timoshenko A.A., Spechenkova N.A. Perspectives of Use of Transcription Factors for Improving Resistance of Wheat Productive Varieties to Abiotic Stresses by Transgenic Technologies//Russian Journal of Genetics. - 2018. - Vol. 54. N 1. P. 27 - 35. DOI: 10.1134/S1022795418010039. Гапоненко А.К., Шульга О.А., Мишуткина Я.В., Царькова Е.А., Тимошенко А.А., Спеченкова Н.А. Перспектива использования факторов транскрипции для улучшения устойчивости продуктивных сортов пшеницы к абиотическим стрессам//Генетика - 2018. - Т. 54. № 1. С. 33 - 42. DOI: 10.7868/S0016675818010034.

РАЗДЕЛ 5. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И ПРОЦЕССЫ ОНТОГЕНЕЗА

5.1. ВВЕДЕНИЕ

Выяснение молекулярных основ регуляции и наследуемости стабильного профиля экспрессии генов является одной из центральных проблем биологии развития. Основным направлением исследований является изучение механизмов возникновения и поддержания дифференциальной активности хроматина - геномной ДНК в комплекс «упаковывающими» ее белками. Первоочередной проблемой является взаимосвязь структуры и функций хроматина. Исследование регуляторной роли модификаций и перестроек хроматина имеет ключевое значение для разработки методов диагностики и лечения генетических заболеваний, а также разработки методов направленной манипуляции активностью генов для приложений генетической инженерии, генетических технологий, включая генетическое редактирование, создания трансгенных организмов.

Базовой единицей упаковки ДНК в хроматине является нуклеосома – октамер гистоновых белков (состоящий из двух димеров гистонов H2A-H2B и одного тетрамера гистонов H3-H4) с дважды «навитым» 147 п.н. фрагментом ДНК [1]. В своей «канонической» конформации, нуклеосома имеет жесткую, статичную структуру, несовместимую с протекающими на ДНК процессами. Соответственно, активация хроматина должна сопровождаться теми либо иными изменениями структуры нуклеосом [2, 3].

Функционирование генов определяется эпигенетической «программой» хроматина, задаваемой посредством модификации гистонов метильными, ацетильными группами, остатками убиквитина и др. («гистоновый код») [4, 5]. До сих пор не ясно, как гистоновый код «транслируется» в те или иные перестройки нуклеосом - активирующие или репрессирующие работу генов. По текущим представлениям модификации гистонов не оказывают какого-либо значительного влияния на структуру нуклеосом, а являются лишь специфическими «метками» для регуляторных белков [4, 6, 7].

В этом контексте убиквитилирование гистонов имеет особую значимость, поскольку объемный остаток убиквитина должен вызывать значительные напряжения в структуре нуклеосомы (например, при убиквитилировании остатка лизина K34 гистона H2B, расположенного между двумя витками нуклеосомной ДНК). Убиквитилирование гистонов играет ключевую роль в поддержании стабильного профиля экспрессии генов клетки. Приобретенные или наследуемые абнормальности профиля убиквитилирования гистонов нарушают корректную экспрессию генов [8, 9] и приводят к различным заболеваниям, включающим онкологические заболевания [10-12], нарушения метаболизма

[13, 14], аутоимунные заболевания [15-16] и др. Исследование регуляторной роли убиквитилирования гистонов в процессах транскрипции и контроля динамики хроматина имеет большое значение для разработки методов диагностики и лечения этих заболеваний.

Действительно, нами впервые показано [17, 18], что H2B K34ub (и, в меньшей степени, H2BK120) могут значительно увеличивать структурную динамику нуклеосомной частицы и способствовать генерированию «гексасом» - функционально-активных интермедиатов нуклеосом, содержащих только один димер H2A-H2B (примечательно, что лабильные гексасомные частицы [19] являются ключевым элементом большинства, если не всех, процессов функционирования хроматина [19-21]. На данный момент это первые данные, что модификации гистонов играют не только роль регуляторных «сигналов», но также способны кардинально изменять характеристики упаковки нуклеосомной ДНК, приводя к образованию функционально-активных интермедиатов нуклеосом (так, влияние модификации H2B K34ub на структуру и динамику нуклеосомы сравнимо с эффектом энзиматических комплексов перестройки хроматина - напр. комплекс FACT [22-26].

5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался комплекс стандартных биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов, такие как реконструкция нуклеосом из рекомбинантных гистонов и ДНК, содержащей последовательности ДНК с повышенной аффинностью к октамеру гистонов, оценка структуры нуклеосом с помощью гидролиза микрококковой нуклеазой, а также посредством изучения профиля миграции образцов нуклеосом в полиакриламидных гелях и другие методы. Для реконструкции модифицированных нуклеосом использовались рекомбинантные гистоны *Xenopus laevis* и «химически» синтезированные аналоги модифицированных гистонов H2BK34ub и H2BK120ub [17, 18]. Для оценки стабильности реконструированных нуклеосом использовался метод «конкуренции» ('competition') нуклеосом с избытком специфических и неспецифических акцепторов гистонов (свободная ДНК, переносчик гистонов Nap1) как мы описали это ранее [17].

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами впервые показано, что некоторые модификации – например убиквитилирование гистонов H2B в позиции 34 и 120 (H2BK34ub и H2BK120ub) - способны непосредственно изменять структуру и динамику нуклеосом, приводя к образованию функционально-активных интермедиатов нуклеосом. Для иллюстрации

приведены данные одного из ключевых экспериментов (Рис. 1). Результаты опубликованы в одном из ведущих международных журналов[17].

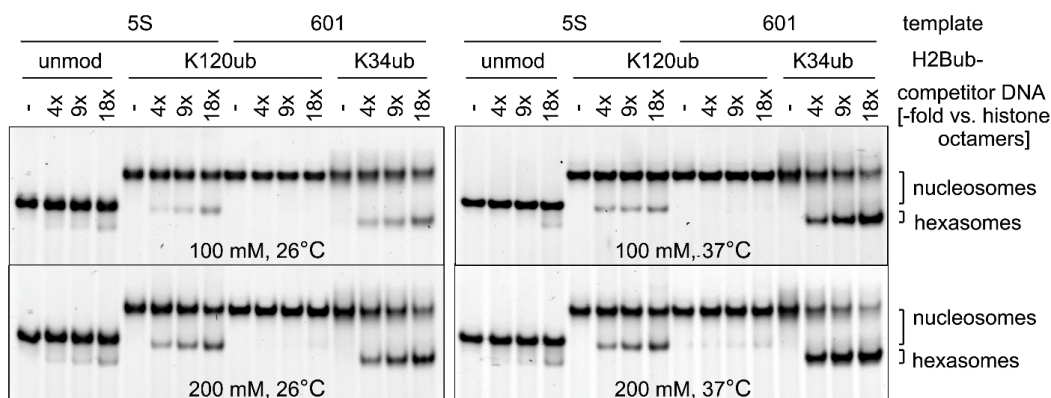


Рисунок 5.1 -H2BK34ub и H2BK120ub дестабилизируют димеры гистонов H2A-H2B нуклеосом и способствуют конверсии нуклеосом в функционально –активные интермедиаты – гексасомы “unmod, K120ub, K34ub” – немодифицированные нуклеосомы, и нуклеосомы с остатком убиквитина по и 120 и 34 гистона H2B, соответственно. Нуклеосомы реконструированы на фрагменте 5S ДНК и высокоафинной ДНК «601», как указано на рисунке. Реконструированные нуклеосомы инкубировали 2 ч при указанной температуре и ионной силе раствора в присутствии избытка плазмидной ДНК-конкурента, как указано на рисунке. Продукты реакции анализировали в 5% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием флуоресцентным красителем (SYBRGold).

Впервые показан кооперативный эффект убиквителирования гистонов и топологии ДНК на структуру и динамику хроматина. Для иллюстрации приведены данные одного из ключевых экспериментов (Рис. 5.2). Результаты опубликованы в одном из ведущих международных журналов [18].

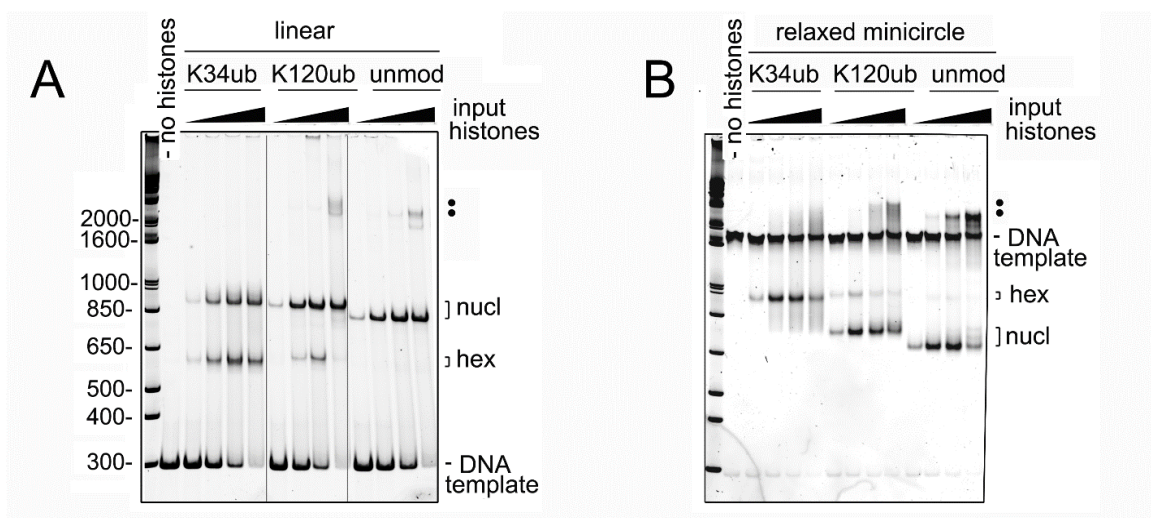


Рисунок 5.2 - Кооперативный эффект убиквителирования гистонов и топологии ДНК на структуру и динамику нуклеосом *in vitro*. Нуклеосомы реконструированы на линейной (А) и кольцевой (В) формах ДНК (размер 290 пн). Обозначения как на рисунке 5.1.

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что H2BK34ub (и, в меньшей степени H2BK120ub) оказывает кардинальное влияние на стабильность и структурную динамику нуклеосом. В присутствии акцепторов гистонов один (только один) из димеров H2B легко диссоциирует от нуклеосом с образованием промежуточной нуклеосомной структуры – «гексасомы». На стабильность и динамику H2BK34ub нуклеосом значительное влияние оказывала топология ДНК («положительные» или «отрицательные» напряжения двойной спирали ДНК). Этим впервые продемонстрирована регуляторная роль топологического статуса ДНК на структуру и динамику модифицированных нуклеосом. Результаты опубликованы в известных международных журналах, что свидетельствует об их удовлетворительном соответствии мировому уровню.

Таким образом, нами впервые показано, что модификации гистонов играют не только роль «сигналов» для регуляторных белков клетки, но также способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных гексамерных интермедиатов нуклеосом. Так, влияние модификации H2B K34ub на структуру и динамику нуклеосомы сравнимо с эффектом энзиматических комплексов перестройки хроматина (напр. комплекс FACT [22-26]. Это позволяет выдвинуть принципиально новую концепцию эпигенетического «структурного кода» активности хроматина, наряду с существующей концепцией «сигнального кода» активности хроматина.

5.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution//Nature - 1997. - Vol. 389, P. 251-260.
2. Krajewski W.A., Razin S.V. DNA-protein interactions and spatial organization of DNA//Mol. Biol. Rep. - 1993. - Vol. 18, P. 167-175.
3. Krajewski W.A. On the role of inter-nucleosomal interactions and intrinsic nucleosome dynamics in chromatin function//Biochem. Biophys. Rep. - 2016. - Vol. 5, P. 492-501.
4. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function//Cell - 2007. - Vol. 128, P. 693-705.
5. Rothbart S.B., Strahl B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications//Biochim. Biophys. Acta - 2014. - Vol. 1839, P. 627-643.

- 8 Suganuma T., Workman J.L. Signals and combinatorial functions of histone modifications//Annu. Rev. Biochem. - 2011. - Vol. 80, P. 473-499.
- 9 Bowman G.D., Poirier M.G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics//Chem. Rev. - 2015. - Vol. 115, P. 2274-2295.
- 10 Bhaumik S.R., Smith E., Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis//Nat. Struct. Mol. Biol. - 2007. - Vol. 14, P. 1008-1016.
- 11 Mirabella A.C., Foster B.M., Bartke T. Chromatin deregulation in disease//Chromosoma - 2016. - Vol. 125, P. 75-93.
- 12 Cao J., Yan Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer//Front Oncol. - 2012. - Vol. 2, P. 26.
- 13 Cole A.J., Clifton-Bligh R., Marsh D.J. Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy//Endocr. Relat Cancer - 2015. - Vol. 22, P. T19-T33.
- 14 Johnsen S.A. The enigmatic role of H2Bub1 in cancer//FEBS Lett. - 2012. - Vol. 586, P. 1592-1601.
- 15 Gluckman P.D., Hanson M.A., Buklijas T., Low F.M., Beedle A.S. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases//Nat. Rev. Endocrinol. - 2009. - Vol. 5, P. 401-408.
- 16 Gao C., Huang W., Kanasaki K., Xu Y. The role of ubiquitination and sumoylation in diabetic nephropathy//Biomed. Res. Int. - 2014. - Vol. 2014, P. 160692.
- 17 Dieker J., Muller S. Epigenetic histone code and autoimmunity//Clin. Rev. Allergy Immunol. - 2010. - Vol. 39, P. 78-84.
- 18 Zou B., Yang D.L., Shi Z., Dong H., Hua J. Monoubiquitination of histone 2B at the disease resistance gene locus regulates its expression and impacts immune responses in Arabidopsis//Plant Physiol - 2014. - Vol. 165, P. 309-318.
- 19 Krajewski W.A., Li J., Dou Y. Effects of histone H2B ubiquitylation on the nucleosome structure and dynamics//Nucleic Acids Res. - 2018. - Vol. 46, P. 7631-7642.
- 20 Krajewski W.A. Effects of DNA superhelical stress on stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes//J. Mol. Biol. - 2018. - Vol. 430, P. 5002-5014.
- 21 Zlatanova J., Bishop T.C., Victor J.M., Jackson V., Van Holde K.E. The nucleosome family: dynamic and growing//Structure. - 2009. - Vol. 17, P. 160-171.
- 22 Rychkov G.N., Ilatovskiy A.V., Nazarov I.B., Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Konev A.Y., Isaev-Ivanov V.V., Onufriev A.V. Partially Assembled Nucleosome Structures at Atomic Detail//Biophys. J. - 2017. - Vol. 112, P. 460-472.
- 23 Venkatesh S., Workman J.L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription//Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2015. - Vol. 16, P. 178-189.

- 24 Formosa T. The role of FACT in making and breaking nucleosomes//*Biochim. Biophys. Acta* - 2013. - Vol. 1819, P. 247-255.
- 25 Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II//*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* - 2013. - Vol. 110, P. 7654-7659.
- 26 Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Experimental analysis of hFACT action during Pol II transcription in vitro//*Methods Mol. Biol.* - 2015. - Vol. 1276, P. 315-326.
- 27 Winkler D.D., Luger K. The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization//*J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286, P. 18369-18374.
- 28 Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement//*Mol. Cell* - 2009. - Vol. 35, P. 365-376.

РАЗДЕЛ 6. ПОИСК НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА НАСЕКОМЫХ

6.1 ВВЕДЕНИЕ

Специфичное брачное поведение является важным изолирующим механизмом, предотвращающим межвидовые скрещивания [1]. К настоящему времени репродуктивное поведение дрозофил подробно описано. В то же время мутаций, которые влияют непосредственно только на половое поведение, известно немного. Одним из таких генов является ген *quick-to-court* (*qtc*). Впервые мутация в гене *qtc* была обнаружена в лабораторной линии *Drosophila melanogaster* с повышенной частотой ухаживания между самцами [2]. Попутным эффектом мутации явилось ускорение процесса ухаживания за самкой. Мутация в гене *qtc* приводила к повышению половой активности, что отличало ее от большинства мутаций, обычно приводящих к ослаблению функций. Молекулярные функции белка QTC до сих пор не известны. Недавно нами была получена делеция, включающая полную последовательность гена *qtc* [3]. Исследование делеционных мутантов является одним из наиболее эффективных способов изучения функции генов. Нашей задачей было исследование поведенческих и морфологических особенностей полученного нами делеционного мутанта, а также структурных и эволюционных характеристик белка QTC. Данное исследование позволит приблизиться к пониманию биологических функций белка QTC.

6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Яичники выделяли у пятидневных самок как описано в протоколе [4], затем окрашивали DAPI. Таким же образом выделяли и окрашивали семенники у самцов.

Для анализа межвидовой изменчивости были использованы последовательности видов *D.melanogaster*, *D.simulans*, *D.erecta*, *D.yakuba*, *D.persimilis*, *D.pseudoobscura*, *D.ananassae*, *D.willistony*, *D.grimshawi*, *D.mojavensis*, *D.virilis*, полученные из музейной коллекции линий дрозофил Flybase. Выравнивание последовательностей QTC и оценку внутри- и межвидового полиморфизма проводили с использованием программы MEGA6. Для анализа доменной организации аминокислотной последовательности сплайс-вариантов использовали инструмент CD-search (база данных консервативных доменов NCBI).

Поведение ухаживания регистрировали методом видеотипирования: все взаимодействия между самкой и самцом записывались на видеокамеру SonyHDR-SR 12E (Япония), а далее анализировались с помощью компьютерной программы VirtualDub

1.10.3. Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программы Statistica v.10.

6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Транскрипты *qtc* обнаружены в грудном и брюшном отделе как у самцов, так и у самок [2]. У самцов транскрипты обнаружены в брюшном сегменте в районе семенников (testis). У самок транскрипты в брюшном сегменте также, видимо, ассоциируются с репродуктивной системой. При том, нами не было обнаружено изменений в оогенезе, морфологии эмбрионов, а также в структуре хроматина. Семенники у дрозофил с делецией также не отличались от дикого типа.

Чтобы понять, в каких биологических процессах участвует белок QTC, мы изучили его эволюционные особенности и нашли функциональные домены в его структуре. Нами была проанализирована структура гена *qtcy* 12 видов из рода дрозофил. QTC относится к суперскрученным белкам. Во всех транскриптах, кроме *qtc-PH* мы обнаружили консервативный GRIP домен (рисунок 6.1), обычный для С-концов различных суперскрученных белков и участвующий в связывании с аппаратом Гольджи. В 8-м экзоне во всех транскриптах и у всех 12 видов дрозофил присутствует участок гомологии с фрагментом домена CDC37 (рисунок 6.2), обеспечивающего специфическое связывание различных протеинкиназ с шапероном HSP90. У всех проанализированных видов дрозофилы присутствует HOOK домен (рисунок 6.2), участвующий в ассоциации с микротрубочками и характерный для суперскрученных белков, и белков, связанных с аппаратом Гольджи. В конце 10 экзона у единственной изоформы белка *qtc-PH* найден высоко-консервативный трансмембранный домен размером 17 аминокислот, выявляемым алгоритмами TMHMM и Tmpred [5], показанный на рисунке 6.3. В соответствии с проведенным анализом доменной организации последовательностей сплайс-вариантов гена *qtc*, можно заключить, что изоформа *qtc-PH* кодирует экспортируемый белок, представленный на внешней мембране клетки и принимающий участие либо в рецепции сигналов в составе гетеродимерных комплексов рецепторов, либо в связывании с межклеточным матриксом. Остальные изоформы, несущие доменGRIP, могут быть связаны с активацией шаперонов в аппарате Гольджи, либо экспортироваться во внеклеточное пространство и выполнять роль сигнальных молекул.

FBgn0028572_Dmel	NSQGHLLQAIESILEFTDAEKQKI
FBgn0185902_Dsim\GD14216	NSQGHLLQAIESILEFTDAEKQKI
FBgn0117178_Dere\GG25049	NSQGHLLQAIESILEFTDAEKQKI
FBgn0229145_Dyak\GE11331	NSQGHLLQAIESILEFTDVEKQKI
FBgn0164133_Dper\GL26551	NSQGHLLQAIESILEFTDEEKQKI
FBgn0072764_Dpse\GA12718	NSQGHLLQAIESILEFTDEEKQKI
FBgn0092745_Dana\GF15721	NSQGHLLQAIESILEFTDAEKQKI
FBgn0118970_Dgri\GH11490	NSQGHLLQAIESILEFTDVEKQKI
FBgn0211189_Dvir\GJ24105	NSQGHLLQAIESILEFTDEEKQKI
FBgn0139731_Dmoj\GI16985	NSQGHLLQAIESILEFTDEEKQKI
FBgn0225844_Dwil\GK23882	NSQGHLLQAIESILEFTDEEKQKI

Рисунок 6.1 - Последовательность GRIP домена у 11 видов дрозофилы

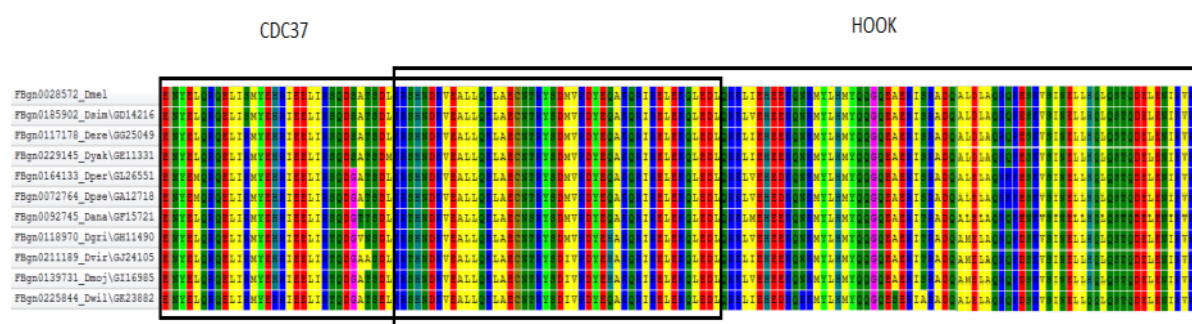


Рисунок 6.2 - Последовательность HOOK и CDC37 доменов у 11 видов дрозофилы

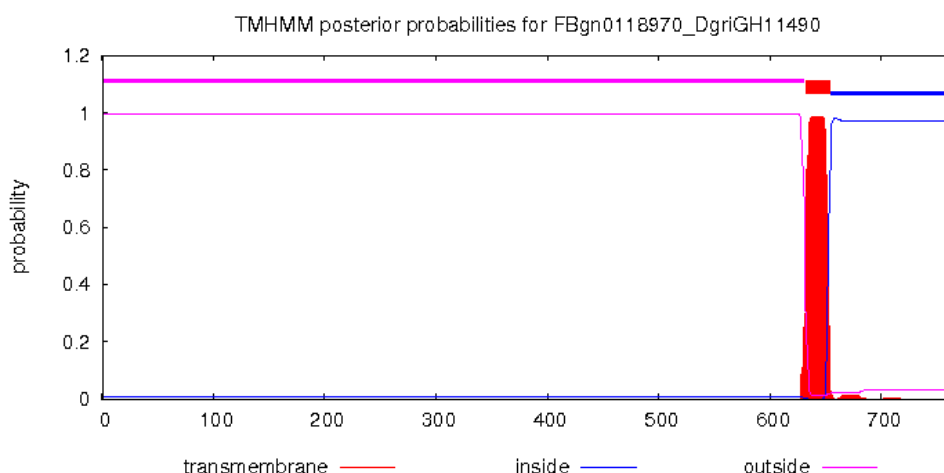


Рисунок 6.3 - Высоко-консервативный трансмембранный домен изоформы qtc-PH

Мы исследовали 8 элементов брачного поведения у мух с делецией гена *qtc*. В целом делеция *qtc* не влияла на частоту элементов брачного ритуала. Латентный период для совокупности элементов ухаживания (преследование, ощупывание, лизание и пение) был меньше в парах с делецией, чем в контрольных (Hotelling $T^2=11.38$, $F(4,40) =$

2.6467, $p < 0.047$). В то время, как длительность латентного периода элементов ухаживания сокращалась, их продолжительность, наоборот, возрастала. Так, средняя длительность преследования, ощупывания, лизания и пения в целом была больше в группе с делецией, чем в контрольных (Hotelling $T^2 = 10.97$, $F(4,56) = 2.60$, $p < 0.045$). Делеция гена *qtc* не оказывала влияния на количество особей, вступивших в копуляцию (таблица 6.1).

Таблица 6.1 - Частота копуляции в парах с делецией и контрольных

	Контроль	Делеция <i>qtc</i>
Объем выборки	30	30
Процент копуляции	26 (86,7%)	27 (90,0%)

6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало, что делеция гена *qtc* не приводит к нарушению структуры брачного поведения. Самыми частыми элементами ухаживания у мух с делецией стали преследование самки самцом, ощупывание самцом конца брюшка самки, «пение» самца и лизание самцом гениталий самки. Такая структура характерна для брачного поведения *D. melanogaster*. Мухи с делецией также показали высокую эффективность копуляции. Однако, делеция *qtc* оказывала некоторое влияние на брачное поведение, латентный период для некоторых элементов ухаживания уменьшался, в то время как длительность самих элементов увеличивалась. Все это может свидетельствовать о трудностях в распознавании партнера, связанных с нарушением гена *qtc*.

Анализ доменной структуры позволил обнаружить домены, говорящие о связи QTC с аппаратом Гольджи и различными мембранными структурами. Ранее было показано, что снижение экспрессии *qtc* при помощи РНК-интерференции в грибовидных телах (структурах, участвующих в процессах памяти и обучения) нарушало способность самцов определять самку с помощью хеморецепции, в то время как снижение экспрессии только во вкусовых и хемосенсорных периферических нейронах не оказывало влияния на этот процесс [6]. Учитывая также факт, что транскрипты *qtc* обнаружены в зонах головы, не связанных с хеморецепцией – втором сегменте антенн, сетчатке и в оптической доле головного мозга [2], можно предположить, что *qtc* входит в состав рецепторных комплексов, участвующих в обработке информации, полученной от различных анализаторов, а не только от хеморецепторов.

6.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Andersson M. Sexual selection. - Princeton: Princeton Univ. Press, 1994. - 624 p.
- 2 Gaines P., Tompkins L., Woodard C.T., Carlson J.R. quick-to-court, a drosophila mutant with elevated levels of sexual behavior, is defective in a predicted coiled-coil protein//Genetics. - 2000. - Vol.154, P. 1627-1637.
- 3 Kravchuk O.I., Mikhailov V.S., Savitsky M.Y. A Simple and Efficient Method of Inducing Targeted Deletions in the Drosophila Genome//Genetika. – 2015. –Vol. 51, P. 1325-1329.
- 4 Parton R.M., Vallés A.M., Dobbie I.M., Davis I. Isolation of Drosophila egg chambers for imaging//Cold Spring Harb Protoc.- 2010. - № 4.pdb.prot5402
- 5 Sonnhammer E.L., von Heijne G., Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences//Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. – 1998. – Vol. 6, P. 175-182.
- 6 Houot B., Fraichard S., Greenspan R.J., Ferveur J.F. Genes involved in sex pheromone discrimination in Drosophila melanogaster and their background-dependent effect//PLoS One. - 2012. - Vol. 7, e30799.

РАЗДЕЛ 7. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ГЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

7.1 ВВЕДЕНИЕ

В ядре существует несколько уровней организации хроматина. ДНК организована в нуклеосомы. Нуклеосомы организованы в фибры диаметром 30 нм, которые в свою очередь образуют домены. Проведенные нами исследования помогли определить структуру доменов и определить белки хроматина, которые регулируют их организацию.

Недавно нам удалось продемонстрировать, что изменения положения генов внутри ядра может приводить к изменению их экспрессии [1] и повышению вероятности возникновения транслокаций [2, 3]. Впоследствии нам удалось показать, почему, несмотря на антиретровирусную терапию, у пациентов с ВИЧ продолжают развиваться лимфомы. Мы продемонстрировали, что Tat-белок, продуцируемый вирусом ВИЧ и циркулирующий в крови ВИЧ-инфицированных пациентов, вызывает изменение общей организации хромосом в ядре В-клеток. Таким образом, значительно увеличивается риск транслокации, приводящих к развитию лимфомы Беркитта.

Ядерная организация играет роль в других болезнях человека, особенно в плече-лопаточно-лицевой миопатии (FSHD) где изменения в организациях хроматина приводит к скоординированной экспрессии генов в локусе 4q. В настоящее время мы работаем над терапией FSHD на основе оригинального подхода с применением химерного белка dCas9-CTCF для восстановления хроматиновой организации локуса, участвующего в FSHD. Мы также продолжим исследование роли организации ядра в дифференцировке клеток и патологических процессах, включающих онкогенез [4, 5].

7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работах исследовали клеточные линии, полученные из АТСС с использованием стандартных методов молекулярной и клеточной биологии.

7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

7.3.1 Сравнительный анализ современных методов исследования активности CRIPR/Cas9 и разработка нового метода [6].

Редактирование генома с использованием нуклеаз (мегануклеаз, Zn finger нуклеаз или CRISPR/Cas9) – одна из самых передовых технологий 21 века. Проверка эффективности и специфичности нуклеаз является обязательным этапом перед использованием любого нового инструмента для редактирования генома для

экспериментальных целей. Существующие стандартные методы скрининга основаны на секвенировании ДНК или использовании чувствительных к рассогласованию эндонуклеаз. Они могут быть трудоемкими, дорогостоящими и / или невоспроизводимыми. Мы оценили и проанализировали стандартные методы с по критериям надежности, времени, стоимости и простоты использования.

Большинство методов основано на поиске мутаций, возникающих в непосредственной близости от участка действия нуклеаз, включая точечные мутации, делеции или вставки, которые являются результатом процесса репарации ДНК. Разработанный нами метод основан на том, что двухцепочечные разрывы в ДНК, возникающие на двух различных хромосомах под действием двух разных нуклеаз, могут провоцировать хромосомные транслокации. Большинство методов основаны на секвенировании ДНК или денатурации ДНК. Также были предложены альтернативные подходы. Различные подходы проиллюстрированы на рисунке 7.1.

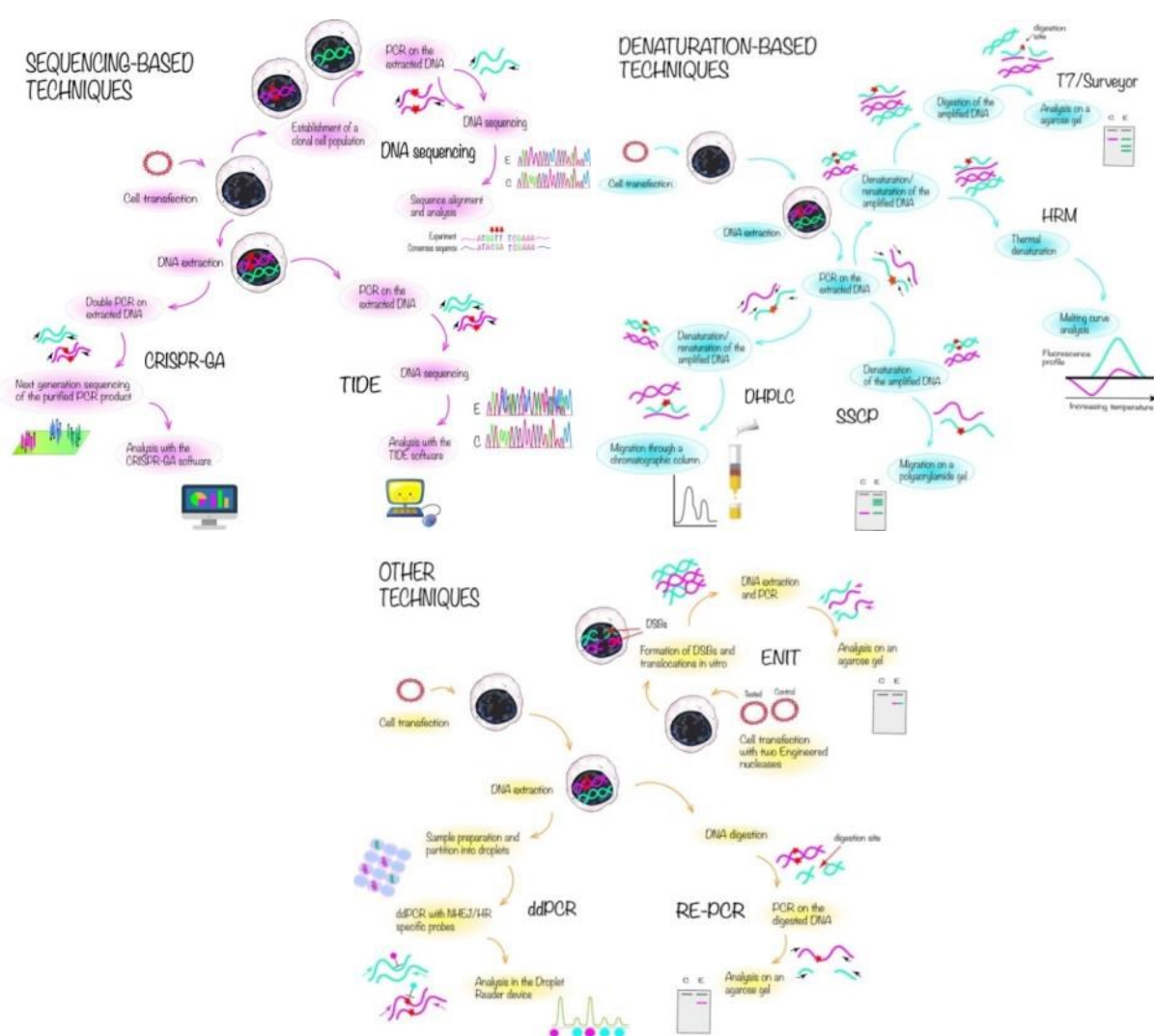


Рисунок 7.1 -Методы анализа эффективности нуклеаз CRISPR/Cas9

7.3.2 Эпигенетическая коррекция миобластов пациентов с дистрофией FSHD с использованием слитого белка CTCF-dCas9-GFP

FSHD является наследственным заболеванием, геномный дефект которого обнаружен во всех клетках организма пациента. Результаты клинического испытания, в ходе которого у 9 пациентов с FSHD была проведена аутологичная трансплантация путем трансплантации их в мышцы с помощью миобластов, взятых из неповрежденной мышцы, были обескураживающими. Провал этой клеточной терапии в значительной степени связан с тем фактом, что трансплантированные миобласты, даже если они удалены из незатронутых мышц, имеют тот же генетический дефект, что миобласты пораженных мышц. Способность миобластов FSHD из неповрежденных мышц оценивалась у мышей с иммунодефицитом, которые не воспроизводят физиологическую мышечную среду, характерную для FSHD, потому что они не несут FSHD и, следовательно, не представляют адекватную модель для проверки аутологичной трансплантации. FSHD является результатом комбинации трех генетических факторов, делеции D4Z4, сопровождаемых полиморфизмами. Ослабление области FR-MAR, на которую воздействует пермиссивный полиморфизм SSLP DF5H, группирует гены области 4q35 в одну петлю хроматина с единицами D4Z4, которые содержат сильный энхансер, тем самым устраняя функцию изоляции, за которую отвечает FR-MAR, таким образом, генерирует генерализованную дерегуляцию экспрессии генов области 4q35. Учитывая многофакторность миопатии, важно оценивать терапевтические подходы, направленные на нормализацию всех нерегулируемых генов, а не только одного. Сначала мы использовали подход эпигенетического редактирования, целью которого является восстановление ослабленной функции изолятора FR-MAR в миобластах FSHD.

В этом подходе мы использовали систему CRISPR (CRISPRi). CRISPRi, основанной на использовании каталитически инактивированной эндонуклеазы Cas9. Потеряв способность индуцировать разрыв двухцепочечных последовательностей ДНК-мишени, dCas9 служит для переноса особого белка, с которым он слит. Исследователи воспользовались такой особенностью dCas9, чтобы объединить его с регуляторами транскрипции, активаторами или репрессорами и, таким образом, контролировать транскрипцию генов-мишеней. CRISPRi использовался в FSHD для подавления транскрипции DUX4, опосредованной репрессором транскрипции KRAB, слитым с dCas9 [7]. Наша цель состоит в том, чтобы через dCas9 вернуть белок CTCF, известный как «белок 11-цинкового пальца» или «CCCTC-связывающий фактор», в последовательность FR-MAR для восстановления его функции. Выбор пал на CTCF по нескольким причинам, связанными с его конкретными свойствами. Действительно, было продемонстрировано,

что CTCF связан с FR-MAR в нормальных миобластах, но не в миобластах FSHD[8]. Кроме того, CTCF является единственным транскрипционным фактором, способным связываться с последовательностями изоляторов генома человека и тем самым блокировать связь между энхансерами и промоторами генов, что приводит к регуляции их экспрессии. Наконец, CTCF также участвует в организации хроматина, включая прикрепление ДНК к ядерному матриксу и образование петель хроматина. Поскольку нашей конечной целью является реорганизация хроматина и нормализация нерегулируемой экспрессии генов, все эти данные делают CTCF лучшим кандидатом для этого подхода.

7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время мы работаем над терапией FSHD на основе оригинального подхода с применением химерного белка dCas9-CTCF для восстановления хроматиновой организации локуса, участвующего в FSHD. Мы также продолжим исследование роли организации ядра при дифференцировке клеток и патологических процессах, включающих онкогенез.

7.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, O., Klibi, M., Barat, A., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Markozashvili, D., Petrova, N., Camara-Clayette, V., Ioudinkova, E., et al. Perinucleolar relocation and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma//Blood. -2014. –Vol. 123.P. 2044–2053.
- 2 Sklyar, I., Iarovaia, O.V., Gavrilov, A.A., Pichugin, A., Germini, D., Tsfasman, T., Caron, G., Fest, T., Lipinski, M., Razin, S.V., et al. Distinct Patterns of Colocalization of the CCND1 and CMYC Genes with Their Potential Translocation Partner IGH at Successive Stages of B-Cell Differentiation//J. Cell. Biochem. -2016. –Vol. 117.P. 1506 - 1510.
- 3 Germini D., Tsfasman T., Zakharova V.V., Sjakste N., Lipinski M., Vassetzky Y.S. A comparison of techniques to evaluate the effectiveness of genome editing//Trends in Biotechnology. - 2018. – Vol. 36, N. 2. P. 147 – 159.
- 4 Syrkina M., Viushkov V., Potashnikova D., Veiko V., Vassetzky Y., Rubtsov M. From an increase in the number of tandem repeats through the decrease of sialylation to the downregulation of MUC1 expression level//Journal of Cellular Biochemistry. - 2018.<https://doi.org/10.1002/jcb.27735>
- 5 Polesskaya O., Kananykhina E., Roy-Engel A.M., Nazarenko O., Kulemzina I., Baranova A., Vassetzky Y., Myakishev-Rempel M. The role of Alu-derived RNAs in

Alzheimer's and other neurodegenerative conditions//Medical Hypotheses. - 2018. - Vol. 115. P. 29 - 34.

6 Sall F.B., Germini D., Kovina A., Ribrag V., Wiels J., Toure A.O., Iarovaia O.V., Lipinski M., Vassetzky Y. Влияние факторов окружающей среды на организацию ядра и трансформацию В-лимфоцитов человека//Биохимия. - 2018. - Т. 83, № 4. С. 556 – 565.

7 Himeda C.L., Jones T.I., Jones P.L. CRISPR/dCas9-mediated transcriptional inhibition ameliorates the epigenetic dysregulation at D4Z4 and represses DUX4-fl in FSH muscular dystrophy//Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther. – 2016. -Vol. 24(3). P. 527 – 535.

8 Kisseljova N.P., Dmitriev P., Katargin A., Kim E., Ezerina D., Markozashvili D., Malysheva D., Planche E., Lemmers R.J.L.F., van der Maarel S.M., et al. DNA polymorphism and epigenetic marks modulate the affinity of a scaffold/matrix attachment region to the nuclear matrix//Eur. J. Hum. Genet. –2014. – Vol. 22.P. 1117 - 1123.

РАЗДЕЛ 8. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ РЯДА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ (РАПС) И ДЕКОРАТИВНЫХ (ВЕРБЕНА, ПЕТУНИЯ) РАСТЕНИЙ

8.1 ВВЕДЕНИЕ

Рапс (*Brassica napus* L.) – это вторая по значимости масличная культура в мире. Для России рапс представляет особый интерес, поскольку может возделываться в условиях умеренного климата с низкой суммой эффективных температур. Рапс – природный аллополиплоид ($2n=38$), признаки которого обусловлены геномами двух родственных видов семейства Brassicaceae: сурепицы (*Brassica rapa*, геном AA) и капусты (*B. oleracea*, геном CC) [1]. Исходные виды имеют четкие морфологические отличия. Масло рапса в зависимости от состава жирных кислот (ЖК) – и как ценное пищевое, и в качестве сырья для парфюмерной промышленности, в медицине и как биодизель. Для пищевых и кормовых целей используют сорта канолы (*Brassica napus* L.), в семенах которой количество эруковой ЖК не превышает 2%, а глюкозинолатов – 1%. В семенах современных сортов содержится от 42 до 49% жира, от 20 до 27% белка, что делает его и одной из основных кормовых культур. В рапсовом белке большое количество незаменимых серосодержащих аминокислот: триптофана, метионина, цистина и лизина, и он значительно дешевле, чем экспортируемый соевый. Масло рапса сбалансировано по составу, содержит более 80% поли- и мононенасыщенных незаменимых ЖК. Десатуразы ЖК являются высокоспецифичными ферментами, обеспечивающими формирование оптимального физического состояния биологических мембран, как в нормальных условиях, так и в условиях температурного стресса. Единичные аминокислотные замены способны конвертировать десатуразную активность в гидроксилазную и наоборот. Одно из направлений исследований в области липидного обмена – изучение структуры и специфичности растительных тиоэстераз и элонгаз жирных кислот, определяющих длину цепи ЖК при синтезе [2]. Эти исследования позволяют получать в промышленных масштабах натуральные растительные липиды, содержащие каприловую (C8:0) кислоту, используемую в добавках к спортивному питанию, лауриловую кислоту (C12:0), применяемую в производстве детергентов, пальмитиновую (C16:0) и стеариновую (C18:0) кислоты для производства маргарина, олеиновую (C18:1), линолевую (C18:2) и линоленовую (C18:3) кислоты для производства пищевого растительного масла, эруковую кислоту (C22:1) для производства полиэтилена, и ранее с трудом получаемые миристиновую (C14:0) и нервоновую (C24:1) кислоты для нужд фармацевтики [3, 4, 5].

Различные цели требуют соответствующих сортов, сочетающих в себе необходимые признаки, например, устойчивость к растрескиванию стручков, к полеганию, холодостойкость, компактность или напротив, мощный рост и ветвление, высокое содержание жира и напротив, высокое содержание белка, среднее - жира и низкое - клетчатки. Наиболее эффективный способ получения столь различных форм – это химический мутагенез [6]. Этот метод, всесторонне изученный И.А. Рапопортом, получил широкое распространение и в нашей стране, и за рубежом благодаря открытым и синтезированным им и его сотрудниками супермутагенам [7]. Супермутагены, такие как этилметансульфонат (ЭМС), позволяют с высокой частотой получать важные в теоретическом смысле, и полезные для практической работы, так называемые «таксономические» мутации, среди которых встречаются как рецессивные, так и доминантные. Использование химических мутагенов для индуцирования изменчивости у аллополиплоидных видов особенно эффективно, так как они не вызывают массовой гибели материала [8], а характерное для полиплоидов, в том числе и рапса, самоопыление позволяет сохранить полученные рецессивные изменения. В мировой практике обычно применяют ЭМС в высоких концентрациях [9], для изменения ЖКС используют растворы ЭМС в концентрациях 0,4; 0,6 и 0,8% [10], или 2%, 5%, 8% [11]. В отечественных исследованиях 1960-1970х годов, проводившихся под руководством И.А. Рапопорта, на различных видах культурных растений, было показано, что для индуцирования изменчивости морфологических признаков эффективно использование ДЭС и ДМС, и низких концентраций мутагенов [12, 13].

Цель исследования – изучение полиморфизма признаков и жирнокислотного состава в семенах растений мутантных линий ярового рапса в ряду мутантных поколений

8.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

8.2.1. Растительный материал

Использовали мутантные формы с измененными морфологическими признаками и созданные на их основе линии, превышающие исходный сорт Викрос по семенной продуктивности, содержанию жира и (или) протеина, более скороспелые, низкорослые и компактные. Работу проводили на опытном участке Кропотовской биостанции ИБР РАН и в ВИК им. В.Р. Вильямса.

8.2.2 Биохимические анализы.

Содержание жира определяли методом обезжиренного остатка; содержание общего азота - фотометрически с последующим пересчетом на белок; клетчатки – методом Геннеберга и Штомана.

8.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

8.3.1 Исследование полиморфизма морфологических признаков в поколениях M_3 - M_8

Исследование полиморфизма морфологических признаков в ряду мутантных поколений показало его высокий уровень. Растения мутантных линий, отобранные по одному или двум контрастным признакам, например, «длинный стручок» (линии, полученные из семьи №555 и «вертикальное расположение стручков» и «компактный габитус» - линии семьи №951 отличаются и по другим признакам (рис. 8.1).

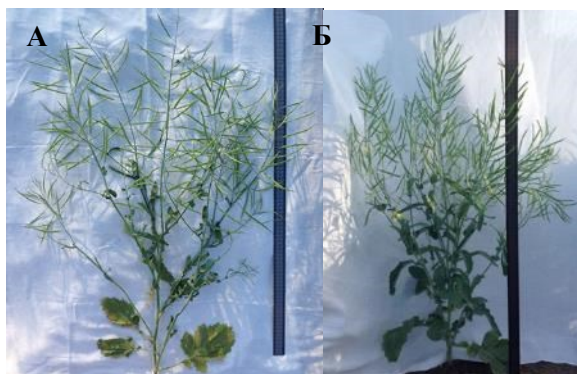


Рисунок 8.1 - Раскидистая (А) и компактная (Б) форма растений с горизонтальным и вертикальным (под острым углом к побегу или параллельно ему) расположением стручков «Вертикальный стручок» характерен для видов *Brassica rapa* L., а горизонтальный – для рапса и *B. oleracea*.

Наиболее изменчивы признаки, характерные для листьев, причем, разнообразие отмечено и в пределах одного и того же растения, и его степень также отлична у растений различных линий (рис. 8.2).

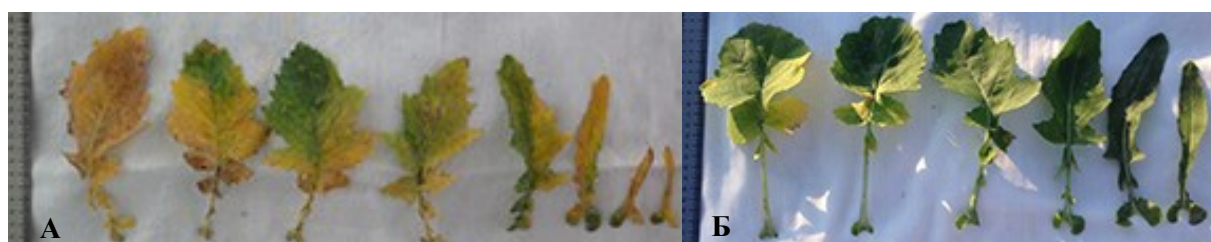


Рисунок 8.2 - Изменчивость листьев из III-VI узлов главного стебля и брактеев соцветия у мутантных растений ярового рапса по форме, длине, ширине, рассеченности, особенностям края листовой пластинки, длине черешка

А- «длинностручковая» линия №555, Б – «вертикалностручковая» линия №951.

Высокий уровень изменчивости отмечен и для окраски семян (рис. 8.3). Причем, если красновато-коричневая окраска семян характерна для растений с антоциановой окраской побегов и сохраняется в ряду поколений на уровне 35-75%, в зависимости от погодных условий вегетационного периода, то светло-коричневая или пятнистая может проявляться через поколение, и как при свободном, так и при самоопылении.

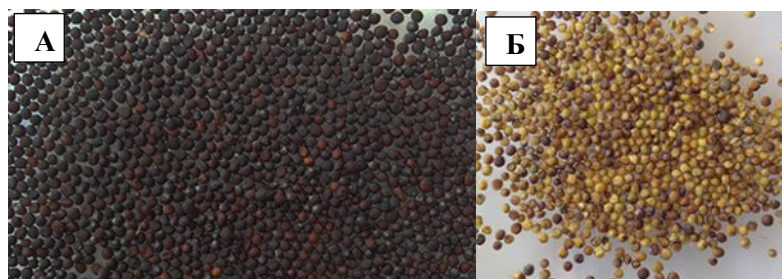


Рисунок 8.3 - Изменчивость по форме, окраске и размеру семян. А – линия №949, Б – линия №999

Данные, полученные в результате биохимического анализа, показывают, что в красных синтезируется меньше фенольных соединений, чем в темноокрашенных семенах. Однако, в наиболее светлых и оранжевых семенах содержание ФС и ФП выше, чем в темноокрашенных образцах [14].

Отмечено также, что отдельные формы в большей степени склонны к перекрестному опылению, а у других семена образуются исключительно от самоопыления, поскольку у них изменились длина столбика и тычиночных нитей, а пыльца созревает и попадает на рыльце еще в стадии окрашенного бутона.

У растений широкостручковых и длинностручковых линий отмечено изменение формы стручков по сравнению со стручками исходного сорта (рис. 8.4). Длинные стручки (9-12 см) веретеновидные, слегка сужающиеся к носику.

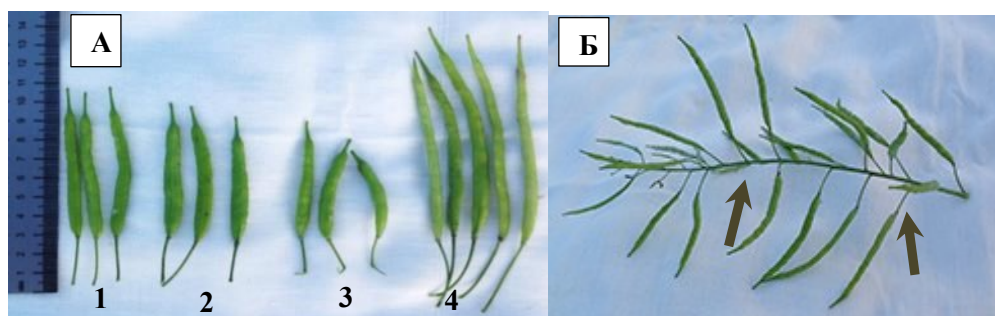


Рисунок 8.4. Особенности стручков и их расположения: А - Изменчивость формы, длины и ширины стручков: 1- исходный сорт, 2-широкий стручок, 3- широкий короткий, 4- длинный стручок; Б – «трехлопастное» расположение, при котором стручки расположены не спирально, а один под другим, в результате чего образуются «лопасти» (линия №964)

В потомстве длинностручковых форм при самоопылении наблюдается стабильность наследования формы и длины стручков, длина обычно не превышает 8,5-9см. Однако, встречаются растения, у которых на отдельных побегах образуются стручки длиной 10,5-12см. Линии различаются наличием таких форм, их количеством и максимальной длиной. Для широких стручков (ширина 8 мм) характерно компактное

расположение семян. Их число также выше (28-32шт.), чем у исходного сорта (24-26 шт.), и они крупнее – диаметр более 2,5мм против 1,8-2мм. При самоопылении признак константно наследуется, при свободном опылении в зависимости от линии количество растений со стручками «дикого типа» составляет от 5 до 50%. Новые формы со стабильно наследующимися характерными признаками, один из которых «вертикальное расположение стручков» были отобраны уже в поколении M_3 в потомстве 6 растений M_2 в вариантах обработки 0,03% ЭМС. Растения линий, полученных из мутантных форм, различаются по высоте, числу семян в стручке, размерам и окраске семян, сроку цветения и созревания и биохимическим особенностям. Здесь приводятся характеристики только двух линий, средних по срокам созревания, наиболее перспективных, и выровненных по основным биохимическим показателям (табл. 8.1).

Таблица 8.1 Содержание жира, белка, клетчатки и основных ненасыщенных ЖК в семенах растений дикого типа (сорт 'Викрос') и эректоидных мутантных линий ярового рапса, полученных в результате обработки семян ЭМС в концентрации 0,03%

Номер линии	Содержание, %					
	Клетчатка	Жир	Белок	C18:1	C18:2	C18:3
Викрос	8,3±0,8	46,4±0,7	26,2±0,6	63,4±1,1	20,5±1,0	8,8±0,2
520	7,1±0,6	39,8±1,6	30,5±1,5	64,8±1,2	20,9±1,1	7,5±0,4
519	7,2±0,8	45,3±1,0	22,6±4,1	64,2±1,6	22,0±1,2	7,6±0,6

8.3.2. Изучение жирнокислотного состава (ЖКС)

Изучение ЖКС в семенах мутантных линий рапса показало, что их разнообразие увеличивается до поколения M_4 за счет нетипичных для рапса коротких C_8 - C_{14} или длинных C_{24} ЖК, а также ЖК с нечетным числом атомов углерода $C_{15:0}$, $C_{17:0}$, $C_{17:1}$ (изменение экспрессии элонгаз) или за счет образования ненасыщенных связей $C_{16:1}$, $C_{16:2}$, $C_{16:3}$, $C_{22:2}$, $C_{24:1}$, $C_{24:2}$ (десатуразы). Подобное разнообразие - 16-20 вместо восьми ЖК - отмечено в линиях с морфологическими изменениями стручков (широкостручковые, длинностручковые) в поколениях M_4 - M_5 . В линиях с другими изменениями характерный для рапса ЖКС восстановился в M_5 .

Как показало изучение, линии, константные по основным морфологическим признакам, можно отобрать уже в M_3 - M_5 , а константность по содержанию жира и белка отмечена только к M_6 - M_7 . Анализ ЖКС показал, что в M_3 - M_5 в морфологически константных линиях были выявлены нетипичные для рапса минорные ЖК, суммарное

содержание которых не превышало 2%: каприловая ($C_{8:0}$), миристиновая ($C_{14:0}$), маргариновая ($C_{17:0}$), лигноцериновая ($C_{24:0}$), нервоновая ($C_{24:1}$). В последующих поколениях большинство этих ЖК обнаруживались только в длинностручковых линиях, причем обычно короткая каприловая ($C_{8:0}$) и длинная нервоновая ($C_{24:1}$).

8.3.3. Оценка и отбор перспективных высокобелковых мутантных линий.

Для использования в селекции кормовых сортов были отобраны формы M_3 - M_4 с повышенным содержанием белка, в том числе, с измененной окраской семян. В результате исследований на основе этих форм были получены линии M_6 - M_8 . Для семян растений более скороспелой и низкорослой линии № 520 характерно высокое содержание белка (Рис. 8.5, табл. 8.1), у отдельных растений до 32%, и пониженное содержание жира (до 38-40%) и клетчатки (около до 6,9% у отдельных растений). В семенах растений поздней созревающей линии №519 отмечено более высокое содержание жира до 46%, и пониженное 19-21% белка.

Таким образом, обе линии компактны, характеризуются морфологическими признаками, позволяющими легко идентифицировать их среди других мутантных форм. Компактный габитус растений в сочетании с высокой урожайностью делает эти формы перспективным материалом для создания новых сортов.



Рисунок 8.5 - Растения вертикальностручковой линии №519 с высокой семенной продуктивностью – в среднем около 30г с 1 растения. В линиях M_6 были выявлены единичные растения, семенная продуктивность которых достигала 50-55 г семян с одного растения.

Другая высокобелковая форма рапса была отобрана в потомстве растения M_3 , обнаруженного в варианте с использованием ЭМС в концентрации 0,2%. Форма представлена растениями двух типов: "сурепичного" и "рапсового", различающимися темпом развития, окраской побегов, листьев и стручков и другими признаками. Характерный признак сурепичной формы - отсутствие сизого налета на побегах, листьях и стручках (рис. 8.6).



Рисунок 8.6 -Растения «сурепичного» слева (линия №1169) и «рапсового» справа (линия №1171) – типов. Хорошо заметно отсутствие сизого налета на листьях растений левого ряда.

Было выявлено, что у мутантной формы «сурепичного типа», в потомстве М₄-М₇ от самоопыления выщепляется до 8% растений с признаками дикого типа (рапс). Для этой формы характерно отсутствие сизого налета на побегах и листьях, повышенное содержание клетчатки и пониженное - лигнина в вегетативных органах и семенах. При этом, содержание белка в семенах выше, чем в исходном сорте 'Викрос', и в семенах поколения М₆ достигает в отдельных линиях 32%, что делает их перспективным материалом для кормового направления. Поскольку семенная продуктивность у линии "сурепичного" типа ниже 10 г с растения (табл. 8.2), ее можно использовать для выведения высокобелковых сортов кормового назначения для получения семян и зеленой массы.

Таблица 8.2 - Морфологические особенности и семенная продуктивность мутантных растений сурепичного и рапсового типов.

Номер линии	Высота, см	Число побегов, шт.			Высота 1-ой ветви, см	Стручок		Число семян, шт.	Масса семян с растения, г
		I	II	III		Длина, см	Ширина, см		
577-987	87,3±6,8	6,3±1,5	3,4±0,7	1±0,8	1,1±2,7*	6,1±0,2	0,46±0,05	24,4±2,9	9,7±3,5
577-876	83,7±3,6	6,0±0,1	1,5±0,2	0,5±0,1	3,9±0,9	6,4±0,3	0,57±0,07	25,7±1,9	21,7±6,9

* базальные побеги I порядка отрастают от подсемядольного колена

Таким образом, полученная форма может быть использована в качестве донора признака повышенного содержания белка, однако более перспективно использование мутантных форм «рапсового» типа, так как они более продуктивны [15, 16]. Повышенное содержание белка в семенах выявлено также у ряда других линий, для которых характерен эректоидный тип прикрепления стручка, уменьшение его толщины и снижение высоты растений. Кроме того, мутантная форма, представляет интерес для изучения эволюции и частной генетики рапса и других видов Brassicaceae. Таксономические мутации,

пригодные для практического использования были получены и описаны для пшеницы мягкой [17].

8.3.4. Сравнительное биохимическое изучение светло- и темносемянных форм.

Как показали биохимические исследования (табл. 8.3), в семенах высокобелковых линий содержание клетчатки было ниже, чем в исходном сорте, причем, в семенах со светлой окраской эта разница значительна: 10,5% и 14,7% соответственно.

Таблица 8.3 - Биохимический состав семян рапса сорта 'Викрос' и мутантных линий

Образец, линия	Содержание в сухом веществе, %				
	Жир	Протеин	Лигнин	Целлюлоза	Гемицеллюлоза
Викрос	47,1	21,0	5,86	5,64	3,23
519-9	46,50	26,30	4,49	5,58	3,60
743-6	34,50	32,46	4,5	6,75	2,37
523-10	41,36	26,85	1,71	5,54	4,22
719-1	37,42	31,52	1,16	6,04	3,31

Сочетание в семенах высокого содержания белка с пониженным содержанием жира и клетчатки созданных в результате исследования новых мутантных линий, позволяет использовать их для получения сортов кормового направления.

8.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химический мутагенез позволяет получить измененные по структуре растения, у которых продуктивные побеги первого порядка, главным образом базальные, что способствует одновременному созреванию в более благоприятных условиях, и повышенному содержанию жира и белка в семенах. Повышение семенной продуктивности отмечено в линиях с увеличенным по сравнению с исходным сортом, числом семян в стручке (32-34 штуки против 25-27 у 'Викроса'). ДМС и ЭМС в низких концентрациях вызывают «полезные» изменения морфологических признаков с высокой частотой, что в свою очередь способствует улучшению биохимических характеристик семян. Большинство признаков, отмеченных в M_2 - M_3 наследуются с высокой частотой.

Изучение влияния высоких и низких концентраций мутагенов на биосинтез и накопление жирных кислот в семенах рапса с целью усовершенствования методики получения технологичных сортов с высоким содержанием $C_{18:1}$ показало, что ДМС, ДЭС и ЭМС в низких концентрациях (0,02; 0,06 и 0,04; 0,03% соответственно, вызывают возвратные мутации, приводящие к образованию в семенах M_3 - M_4 эруковой ЖК, мутагены в высоких концентрациях не вызывают подобного эффекта. Также, формы с

тенденцией к увеличению белка в семенах (24% в М₄ и 32% - М₇) индуцируются с высокой частотой ЭМС, а формы с высоким содержанием жира (до 48-51%) - ЭМС и ДМС.

8.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wu G., Wu Y., Xiao L., Li X., Lu. C. Zero erucic acid trait of rapeseed (*Brassica napus* L.) results from a deletion of four base pairs in the *fatty acid elongase 1* gene // Theor Appl Genet. -2008. - V. 116. - P. 491.–499.
2. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. - Т. 41. - С. 163-198.
3. Lassner M.W. // Lipid Technology. - 1997. - V. 9. - P. 5-9.
4. Murphy D.J. // Curr. Opin. Biotechnol. - 1999. - V. 10. - P. 175-180.
5. Voelker T.A., Worrell A.C., Anderson L., Bleibaum J., Fan C., Hawkins D.J., Radke S.E., Davies H.M. // Science. - 1992. - V. 257. - P. 72-74.
6. Рапопорт И.А. Химические мутагены в селекционных и генетических опытах. Сб. Эффективность химических мутагенов в селекции. М.: Наука, 1976. - С.3-35.
7. Рапопорт И.А. Открытие химического мутагенеза. Избранные труды. // М.: Наука. 1993. - 304с.
8. Swaminathan. M.S. A comparison of mutation induction *in* diploids *and* polyploids //Symposium on the Use of Induced Mutations in Plant Breeding, FAO/IAEA, Rome. – 1965. - P. 619-649.
9. Shu Q.Y., Forster B.P., Nakagawa H., Wallingford // Plant mutation breeding and biotechnology. UK: CABI, 2012, pp. 608. Plant Breeding and Genetic Section. Joint FAO/IAEA Division of nuclear techniques in Food and Agricultural.
10. Wells R., Trick M., Soumpourou E., Clissold L., Morgan C., Werner P., Gibbard C., Clarke M., Jennaway R., Bancroft I. The control of seed oil polyunsaturate content in the polyploid crop species *Brassica napus*. Mol Breed. 2014; Vol.33: P. 349–362.
11. Spasibionek, S. New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) with changed fatty acid composition. PlantBreeding, 2006, V. 125, pp 259-267
12. Рапопорт И.А. Эффективность химических мутагенов в селекции: Сб. статей. М., Наука, 1976, 351с.
13. Зоз Н.Н. Методика использования химических мутагенов в селекции сельскохозяйственных культур. // сб. Мутационная селекция. М.: Наука, 1968. С. 217-230
14. Zagorskina N.V., Kazantseva V.V., Fesenko A.N., **Shirokova A.V.** Accumulation of Phenolic Compounds at the Initial Steps of Ontogenesis of *Fagopyrum esculentum* Plants That Differ in Their Ploidy Levels//Biology Bulletin - 2018. Vol. 45. Is. 2. P. 171 - 178. DOI:

10.1134/S1062359018020140. Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Фесенко А.Н., **Широкова А.В.** Накопление фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений с различным уровнем ploидности (на примере *Fagopyrum esculentum*) // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. - 2018. - № 2.- С. 191 - 199.

15. Воловик В.Т., Прологова Т.В., Широкова А.В., Крутиус О.Н. Оценка перспективных мутантных форм рапса ярового с улучшенной морфологией и семенной продуктивностью // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2018. - № 72. - С. 81-83.

16. Муравенко О.В., Зошук С.А., Саматадзе Т.Е., Широкова А.В., Воловик В.Т., Юркевич О.Ю., Амосова А.В. Исследование кариотипов мутантных форм рапса по хромосомным маркерам // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. 2018. - № 13. С. 419-422.

17. Зоз Н.Н., Морозова И.С., Меренкулова Р.Н. Морфобиологические особенности индуцированных доминантных мутантов мягкой пшеницы Белоцерковская 198 // Сб. Химические супермутагены в селекции. – М.: Наука, 1975. С.133-147.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ТЕМЕ

Задачи этапа 2018 г темы НИР решены полностью.

Впервые показана моделирующая роль микроРНК в регуляции координированной экспрессии двух перекрывающихся белок-кодирующих генов, контролирующих процессы морфогенеза и поляризации клеток. Механизм контроля генной экспрессии с участием микроРНК мог сложиться в эволюции для адаптации совместной работы генов в условиях перекрытия их регуляторных районов.

Был идентифицирован новый белок CCT3, тотально мигрирующий из цитоплазмы в ядро на ключевой стадии метаморфоза дрозофилы. Впервые для CCT3 была показана его ядерная локализация. Высказано предположение об участии белка CCT3 в эпигенетической репрессии ядерных гормональных рецепторов.

Была изучена степень влияния различных ксенобиотиков на компетенцию AHR-гена человека к регуляции экспрессии эволюционно-консервативных целевых генов, вовлеченных в процессы морфогенеза и биodeградации стресс-индуцибельных молекул. Был получен патента изобретение «Способ оценки фармакологических и токсических свойств веществ – потенциальных лигандов AHR человека».

Был разработан новый протокол выделения протопластов мягкой пшеницы, позволяющий получать суспензию клеток с оптимальной плотностью, что позволит в дальнейшем приступить к получению новых сортов сельскохозяйственных культур с применением технологий геномного редактирования.

Впервые показано, что модификации гистонов играют не только роль «сигналов» для регуляторных белков клетки, но также способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных гексамерных интермедиатов нуклеосом. Это открытие позволяет дополнить существующую концепцию «сигнального кода» активности хроматина принципиально новой концепцией эпигенетического «структурного кода» активности хроматина.

Проведён анализ доменной организации и предполагаемых функциональных особенностей белка QTC, важного для поведенческих реакций. Высказано предположение о связи его с аппаратом Гольджи и мембранными структурами в составе рецепторных комплексов, участвующих в обработке информации, полученной от различных анализаторов.

Продолжена разработка метода терапии миопатии FSHD на основе оригинального подхода с применением химерного белка dCas9-CTCF для восстановления хроматиновой организации локуса, участвующего в FSHD. В дальнейшем необходимо продолжить

исследование роли организации ядра в дифференцировке нормальных клеток и при патологических процессах, включающих онкогенез.

Изучено влияние высоких и низких концентраций мутагенов на биосинтез и накопление жирных кислот в семенах рапса с целью усовершенствования методики получения высокопродуктивных технологичных сортов. Сочетание в семенах высокого содержания белка с пониженным содержанием жира и клетчатки, созданных в результате исследования новых мутантных линий, позволяет использовать их для получения сортов кормового направления.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ

*Отчетные по Госзаданию

1 *Funikov S.Y., **Kulikova D.A.**, Krasnov G.S., Rezvykh A.P., Chuvakova L.N., Shostak N.G., Zelentsova E.S., Blumenstiel J.P., Evgen'ev M.B. Spontaneous gain of susceptibility suggests a novel mechanism of resistance to hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*//**PLoS Genet.** 2018. Vol. 14. N 5. e1007400. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007400. (WoS, Scopus).

2 ***Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О., Кузин Б.А., Симонова О.Б.** Арилгидрокарбоновый рецептор как потенциальная мишень для противораковой терапии//Биомедицинская химия. - 2018. - Т. 64. №5. С. 397 - 415. DOI: 10.18097/PBMC20186405397. (РИНЦ, Scopus).

3 ***Gaponenko A.K.**, Mishutkina Ya.V., **Timoshenko A.A.**, Shulga O.A. Genetic Transformation of Wheat: State of the Art//Russian Journal of Genetics - 2018. - Vol. 54(3). P.273 - 291. DOI: 10.7868/S0016675818030013). (WoS, Scopus) – Гапоненко А.К., Мишуткина Я.В., Тимошенко А.А., Шульга О.А. Генетическая трансформация пшеницы. Обзор состояния проблемы//Генетика - 2018. - Т. 54. № 3. С. 273 - 291. DOI: 10.7868/S0016675818030013. (РИНЦ).

4 ***Gaponenko A.K.**, Shulga O.A., Mishutkina Y.B., **Tsarkova E.A.**, **Timoshenko A.A.**, Spechenkova N.A. Perspectives of Use of Transcription Factors for Improving Resistance of Wheat Productive Varieties to Abiotic Stresses by Transgenic Technologies//Russian Journal of Genetics. - 2018. - Vol. 54. N 1. P. 27 - 35. DOI: 10.1134/S1022795418010039. (WoS, Scopus) **Гапоненко А.К., Шульга О.А., Мишуткина Я.В., Царькова Е.А., Тимошенко А.А., Спеченкова Н.А.** Перспектива использования факторов транскрипции для улучшения устойчивости продуктивных сортов пшеницы к абиотическим стрессам//Генетика - 2018. - Т. 54. № 1. С. 33 - 42. DOI: 10.7868/S0016675818010034. (РИНЦ).

5 ***Krajewski W.A.**, Li J.B., Dou Y.L. Effects of histone H2B ubiquitylation on the nucleosome structure and dynamics//Nucleic Acids Research. - 2018. - Vol. 46. Is. 15. P. 7631 - 7642. DOI: 10.1093/nar/gky526. (WoS, Scopus).

6 ***Krajewski W.A.** Effects of DNA superhelical stress on stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes//J. Mol. Biol. - 2018. - Vol. 430, P. 5002 - 5014. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.09.014. (WoS, Scopus).

7 *Syrkina M., Viushkov V., Potashnikova D., Veiko V., **Vassetzky Y.**, Rubtsov M. From an increase in the number of tandem repeats through the decrease of sialylation to the

downregulation of MUC1 expression level//Journal of Cellular Biochemistry - 2018. - DOI: 10.1002/jcb.27735. (WoS, Scopus).

8 *Sall F.B., Germini D., Kovina A.P., Ribrag V., Wiels J., Toure A.O., Iarovaia O.V., Lipinski M., **Vassetzky Y.** Effect of Environmental Factors on Nuclear Organization and Transformation of Human B Lymphocytes//Biochemistry (Moscow) - 2018. - Vol. 83. N 4. P. 402 - 410. DOI: 10.1134/S0006297918040119. (WoS, Scopus) - Sall F.B., Germini D., Kovina A., Ribrag V., Wiels J., Toure A.O., Iarovaia O.V., Lipinski M., Vassetzky Y. Влияние факторов окружающей среды на организацию ядра и трансформацию В-лимфоцитов человека//Биохимия - 2018. -Т. 83. № 4. С. 556 – 565. (РИНЦ).

9 *Poleskaya O., Kananykhina E., Roy-Engel A.M., Nazarenko O., Kulemzina I., Baranova A., **Vassetsky Y.**, Myakishev-Rempel M. The role of Alu-derived RNAs in Alzheimer's and other neurodegenerative conditions//Medical Hypotheses - 2018. - Vol. 115. P. 29 - 34. DOI: 10.1016/j.mehy.2018.03.008. (WoS, Scopus).

10 *Albert E.A., Puretskaia O.A., **Terekhanova N.V.**, Labudina A., Bökel C. Direct control of somatic stem cell proliferation factors by the Drosophila testis stem cell niche//Development. 2018. V. 145. Is. 17. dev156315, 12p. DOI: 10.1242/dev.156315. (WoS, Scopus)

12 *Злобин Н.Е., **Вербицкая А.А.**, Таранов В.В. Генетический инструментарий Ctracr/Cas9 для эффективного редактирования генома растений // В кн.: Редактирование генов и геномов. Т. 2. / Отв. редактор С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. РАН, Сиб. Отд. ФИЦ Ин-т цитологии и генетики. 2-е изд. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2018. – 386 с. – 2018. Т. 2. - С. 67 93. ISBN 978-5-7692-1580-3.

13 *Воловик В.Т., Прологова Т.В., **Широкова А.В.**, Крутиус О.Н. Оценка перспективных мутантных форм рапса ярового с улучшенной морфологией и семенной продуктивностью // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2018. № 72. С. 81-83. DOI: 10.21515/1999-1703-72-81-83. (РИНЦ)

14 *Zagoskina N.V., Kazantseva V.V., Fesenko A.N., **Shirokova A.V.** Accumulation of Phenolic Compounds at the Initial Steps of Ontogenesis of Fagopyrum esculentum Plants That Differ in Their Ploidy Levels//Biology Bulletin - 2018. Vol. 45. Is. 2. P. 171 - 178. DOI: 10.1134/S1062359018020140. (WoS, Scopus) - Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Фесенко А.Н., **Широкова А.В.** Накопление фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений с различным уровнем ploidy (на примере Fagopyrum esculentum)//Известия Российской академии наук. Серия биологическая - 2018. № 2. С. 191 - 199. DOI: 10.7868/S000233291802008X. (РИНЦ).

15 Муравенко О.В., Зошук С.А., Саматадзе Т.Е., **Широкова А.В.**, Воловик В.Т., Юркевич О.Ю., Амосова А.В. Исследование кариотипов мутантных форм рапса по хромосомным маркерам//Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования - 2018. - № 13. С. 419 - 422. (РИНЦ).

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН «27» декабря 2018 г., протокол № 12.