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 0108-2019-0001
Рег. № НИОКТР АААА-А19-119032190095-6

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

_____ А.В. Васильев

«29» декабря 2020 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 научный сотрудник
доктор биологических наук

_____ 29.12.2020
подпись, дата

О.Б. Симонова

Москва 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук	подпись, дата 29.12.2020	О.Б. Симонова (раздел 1)
Исполнители: Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	подпись, дата 29.12.2020	Д.А. Куликова (раздел 2)
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	подпись, дата 29.12.2020	Ю.Е. Воронцова (раздел 3)
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	29.12.20 подпись, дата	А.К. Гапоненко (раздел 4)
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	29.12.20 подпись, дата	В.А. Краевский (раздел 5)
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	О.И. Кравчук (раздел 6)
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	Е.С. Васецкий (раздел 7)
Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук	29.12.2020 подпись, дата	Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчет 63 с., 7 разделов, 25 рис., 5 табл., 67 источников, 10 публикаций по теме, 0 прил.

ХРОМОСОМНЫЕ ТРАНСЛОКАЦИИ, ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД, НУКЛЕОСОМЫ, ХРОМАТИН, КСЕНОБИОТИКИ, ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ, НЕЙРОГЕНЫ, РАК, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, СЕЛЕКЦИЯ

Объектом исследования являются механизмы молекулярно-генетических процессов и эпигенетической регуляции в онтогенезе и эволюции, позволяющие решать теоретические и практически значимые задачи.

Основная цель работы состояла в проведении экспериментального исследования новых механизмов дифференциальной активности генов в ходе развития, поиска альтернативных путей редактирования генома, разработке моделей генетически наследуемых синдромов человека, создании новых сортов сельскохозяйственных растений с улучшенными характеристиками.

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

Изучены сложные взаимоотношения продуктов экспрессии генов и механизмы регуляции процессов развития в нормальных условиях и при патологии. Детализированы новые фундаментальные концепции эпигенетического кода, выдвинуты новые принципы регулирования структурой и функцией хроматина, включая роль конкретных генов в создании новых кариотипов и видообразовании.

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ ……..……5
ВВЕДЕНИЕ ……..……6
РАЗДЕЛ 1 ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ ……..…….. 8
РАЗДЕЛ 2 РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА *D4* В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА ……..….. 16
РАЗДЕЛ 3 ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ …….….... 21
РАЗДЕЛ 4 КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ……...…..27
ПОДРАЗДЕЛ 4.1 РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КОК-САГЫЗА ……....…..…..27
ПОДРАЗДЕЛ 4.2 ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ РЯДА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ (РАПС) И ДЕКОРАТИВНЫХ (ВЕРБЕНА, ПЕТУНИЯ) РАСТЕНИЙ…….… 34
РАЗДЕЛ 5 РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И ПРОЦЕССЫ ОНТОГЕНЕЗА……41
РАЗДЕЛ 6 ПОИСК НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА НАСЕКОМЫХ ……...……..... 47
РАЗДЕЛ 7 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ГЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ …….……...……. 53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ……...……... 58
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ……..……..61

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения

а.к. – аминокислотная последовательность

дцРНК – двуцепочечная РНК

ЖК – жирные кислоты

ЖКС – жирно кислотный состав

кДа – килодальтон

НК - натуральный каучук

НС – нервная система

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ОРС – открытая рамка считывания

п.н. – пара нуклеотидов

п.о. – пара оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНКи – РНК-интерференция

ЭМС - этилметансульфонат

AHR - Aryl Hydrocarbon Receptor

BAC - бактериальные искусственные хромосомы

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

GFP - зеленый флуоресцирующий белок

NAP - Nucleosome Assembly Protein

Trf2 – фактор базовой транскрипции **T**BP-**r**elated **F**actor **2**

UAS - Upstream Activating Sequence

qtc – ген *quick-to-court*

XRE - **x**enobiotic **r**esponse **e**lement

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальной задачей биологии развития является выяснение молекулярно-генетических механизмов регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза. В этом аспекте большое значение имеет исследование роли конкретных генов, контролирующих развитие. Одной из задач текущего этапа стало изучение новой функции базового фактора транскрипции Trf2, связанной с центрическим слиянием хромосом, которое часто сопровождает патологические генетически наследуемые синдромы человека (например, синдром Дауна, синдром Патау). Такие хромосомные перестройки могут быть вызваны неблагоприятными условиями среды (радиацией или химическими канцерогенами). Мы предположили, что центрическое слияние может быть также вызвано мутациями генов, способных влиять на структуру хроматина прицентромерных районов. Кроме патологических синдромов, мутации этих генов должны вызывать изменение количества хромосом в кариотипе вида и таким образом влиять на видообразование и ход эволюции, поэтому их поиск имеет фундаментальное биологическое значение.

Другая задача на 2020 г. предполагала разработку уникальной системы, которая будет моделировать онкозаболевания, вызванные хромосомными аберрациями: транслокацию t(8;14) (лимфома Беркитта), делецию 3p21 (рак легких) и инактивацию гена TP53 (рак яичников). Молекулярно-генетические события на ранних стадиях рака до сих пор плохо изучены, и в большинстве случаев отсутствуют надежные биомаркеры для его ранней диагностики. Наша модельная система, будет не только имитировать связанные с раком хромосомные аберрации, но также позволит выявить и выделить несущие их клетки сразу после их появления. Последующий анализ таких клеток позволит исследовать ранние молекулярных механизмы, приводящие к раку.

Обширные данные изучения молекулярно-генетических механизмов дифференцировки клеток в нормальных и опухолевых тканях доказывают важную роль арил-гидрокарбонового рецептора - AHR. Важным элементом регуляции активности AHR является его взаимодействие с лигандами-ксенобиотиками. Развитие химической и фармацевтической промышленности создало условия, при которых каждый человек может подвергнутся воздействию ксенобиотиков, которые являются лигандами, активирующими AHR. Для понимания последствий эктопической экспрессии AHR на процессы развития системных структур в условиях *in vivo* нами были созданы гуманизированные линии *Drosophila*, содержащие ген *AHR* человека. Поскольку ксенобиотики не способны активировать гомолог AHR беспозвоночных, мы использовали эти линии дрозофил для изучения эффектов эктопической экспрессии AHR и действия экзогенных лигандов на активацию AHR-зависимых генов *in vivo*.

Изучение роли наследственности в индивидуальном развитии не ограничивается молекулярно-генетическим аспектом. Важное значение приобретают 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) гистонов - белков упаковки ДНК в ядрах. До сих пор не ясно, как «гистоновый код» «транслируется» в перестройки нуклеосом, активирующих или репрессирующих работу генов. Предварительно нами показано, что определенные модификации гистонов способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию интермедиатов нуклеосом – «гексасом». Решение задач текущего этапа позволило детализировать принципиально новую концепцию эпигенетического «структурного кода» активности хроматина.

Текущий этап также ставил задачу, связанную с исследованием мутации гена *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 способствует пониманию природы целостности развивающейся особи – высшего уровня организации.

В рамках раздела «Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений» ставилась задача проведения работы по редактированию генома кок-сагыза – перспективного растения-продуцента отечественного натурального каучука, альтернативного южноамериканской гевее. Конкретной целью текущего этапа было использование ранее разработанного нами протокола регенерации и трансформации кок-сагыза для получения первых трансгенных растений. Другой задачей этого раздела стало изучение морфологических признаков мутантных форм ярового рапса и поиск их связи с ценными биохимическими особенностями: пониженным содержанием лигнина и синапина в семенах.

Таким образом, на основе применения новых экспериментальных платформ, планировали уточнить важные параметры участия различных генетических и эпигенетических факторов регуляции эмбрио-, органо-, гистогенеза и клеточной дифференцировки. Для ряда объектов исследования ставилась задача разработки новых экспериментально-технологических методов анализа процессов развития и воздействия на них.

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

1.1 ВВЕДЕНИЕ

Центрическое слияние хромосом (Робертсоновские транслокации) – вид хромосомных перестроек, при которых происходит слияние двух акроцентрических хромосом с образованием одной метацентрической [1]. Изучение причин центрического слияния хромосом, которое часто сопровождает патологические генетически наследуемые синдромы человека (например, синдром Дауна, синдром Патау), имеет фундаментальное и прикладное значение. Такие хромосомные перестройки могут быть вызваны неблагоприятными условиями среды (например, радиацией или химическими канцерогенами). Мы предположили, что центрическое слияние может быть вызвано мутациями определённых генов, способных влиять на структуру хроматина прицентромерных районов. Кроме того, мутации таких генов, могут менять количество хромосом в кариотипе вида, и таким образом играть роль в видообразовании и влиять на ход эволюции в целом [2-3]. Поэтому поиск генов, мутации которых способны влиять на ход эволюционного процесса через изменение хромосомного набора, имеет фундаментальное биологическое значение. Мутации таких генов должны создавать условия, при которых увеличивается вероятность возникновения центрических слияний хромосом, а значит, они должны влиять на структуру гетерохроматина прицентромерных районов хромосом. Очевидно, у мутантов этих генов будет высокая частота нерасхождения хромосом.

TBP-related factor 2 (*Trf2*) кодирует консервативный фактор базовой транскрипции. Снижение экспрессии TRF2 нарушает формирование хроматина перицентромерных областей и предотвращает их ассоциацию в хромоцентр. Участие Trf2 в инициации транскрипции неоспорима, но мало известно о его генах-мишенях, особенно о тех, которые ответственны за формирование хромоцентра. Кроме того, было интересно оценить возможный вклад этого фактора в индукцию Робертсоновских транслокаций, потому что эти перестройки не только вызывают патологические генетически наследуемые человеческие синдромы, но также важны для видообразования.

1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Частоту центрического слияния хромосом оценивали в генетических экспериментах на дрозофиле в линиях со сниженной экспрессией *Trf2*. Результаты верифицировали с помощью цитологического анализа препаратов пластинок метафазных

хромосом нейробластов из мозга личинок. Основным методом при сравнительном исследовании уровня экспрессии транскриптов *D1* и *Trf2* была полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением геноспецифичных праймеров и зондов, меченных флуоресцентными красителями. В качестве эндогенного контроля использован ген рибосомального белка Rpl32. Для индукции РНК-интерференции *Trf2* использовали дрозофил, экспрессирующих РНК-шпильку, коплементарную *Trf2*-транскриптам, под индуцибельным промотором UAS. Параллельно проводили РНК-интерференцию *Trf2* в культуре клеток S2 с помощью искусственно синтезированных молекул двухцепочечной РНК. Иммуноокрашивание культуральных клеток S2 проводили, используя антитела к ламину (anti-lamin Dm, разведёнными 1:40 в PBS). В качестве вторичных использовали антитела против мыши, конъюгированные с Cy5 (1:100). ДНК визуализировали SytoxGreen (1:500).

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.3.1 ЧАСТОТА НЕРАСХОЖДЕНИЯ И НАЛИЧИЕ СЦЕПЛЕННЫХ Х-ХРОМОСОМ В ЛИНИЯХ С ЛЕТАЛЬНЫМИ МУТАЦИЯМИ ГЕНА *TRF2*

Мы использовали генетическую модель дрозофилы для изучения эффектов *Trf2* на нестабильность генома и установили несколько событий центрического слияния. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.1.

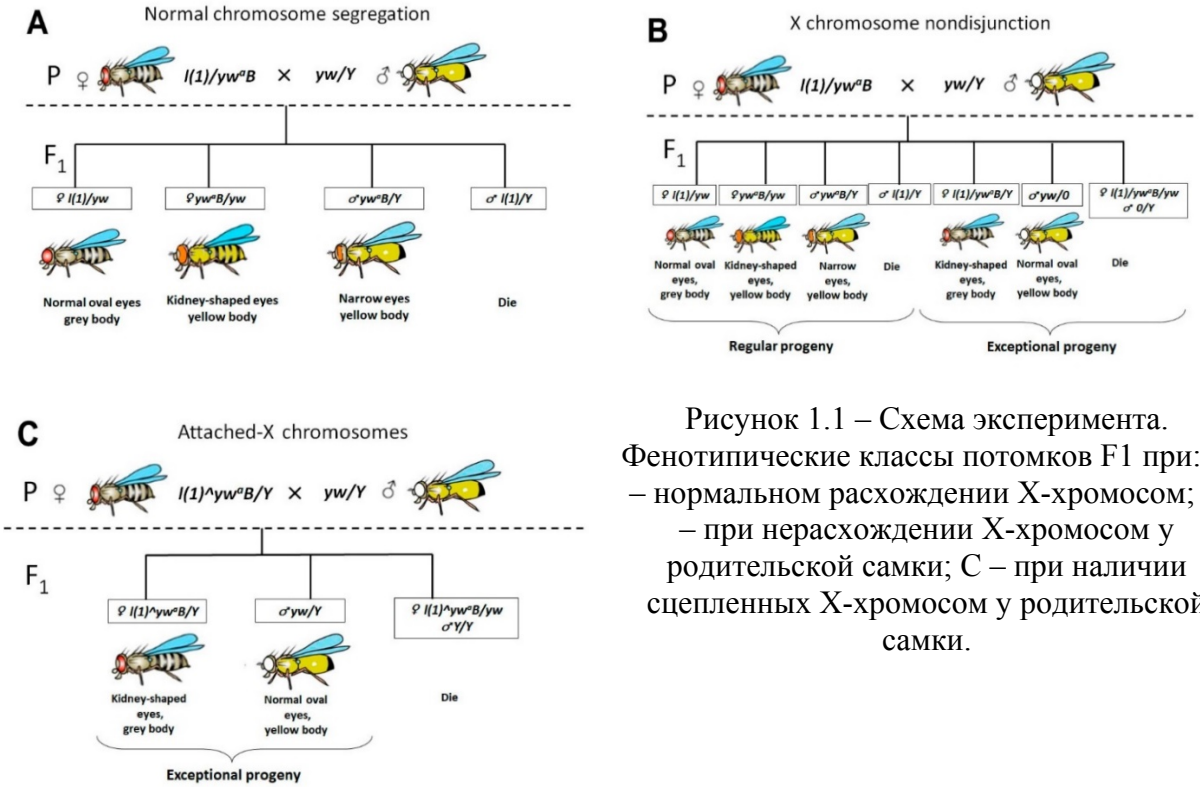

Рисунок 1.1 – Схема эксперимента. Фенотипические классы потомков F1 при: A – нормальном расхождении Х-хромосом; B – при нерасхождении Х-хромосом у родительской самки; C – при наличии сцепленных Х-хромосом у родительской самки.

Мы исследовали частоту нерасхождения и наличие сцепленных Х-хромосом в семи линиях с пониженной экспрессией *Trf2*. Далее был проведён фенотипический анализ потомков первого поколения (F1) для определения их принадлежности к нормальным или аномальным классам. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.1. Оказалось, что в двух (*l(1)G0425* и *l(1)G0356*) из семи протестированных линиях были самки со сцепленными Х-хромосомами.

Таблица 1.1. - Нерасхождение Х-хромосом и наличие сцепленных Х-хромосом у самок с летальными мутациями *Trf2*
Первая колонка показывает аллели *Trf2* и контрольные линии: линия-балансер FM и линия с нормальной экспрессией *Trf2* - *l(1)G0071*. Вторая колонка показывает наличие (“+”) или отсутствие (“-“) самок со сцепленными хромосомами. Третья колонка показывает частоту нерасхождения Х-хромосом Qn. Количество (N) проанализированных мух дано в скобках. Четвертая колонка показывает частоту встречаемости самок с нерасхождением Х-хромосомы Qf. В пятой колонке отображено количество проанализированных родительских самок.

Линии	**Сцепленные Х-хромосомы**	**Qn, % (N)**	**Qf, %**	**Total**
l(1)G0425/In(1)FM	+	7.17 (779)	40	25
l(1)G0356/In(1)FM	+	11.59 (845)	46.15	26
l(1)G0424/In(1)FM	-	17.39 (777)	40	25
l(1)G0295/In(1)FM	-	14,51 (1201)	48.15	27
l(1)G0166/In(1)FM	-	29.6 (236)	20	30
l(1)G0152/In(1)FM	-	28.25 (370)	26.66	30
l(1)EF520/In(1)FM	-	29.12 (88)	6.67	30
Контрольные линии				
In(1)FM	-	1.4 (2445)	1.54	65
l(1)G0071/In(1)FM	-	1.5 (650)	1.43	70

Чтобы продемонстрировать наличие сцепленных Х-хромосом у родительских самок из линий *l(1)G0425* и *l(1)G0356,* мы приготовили давленные препараты метафазных пластинок нейробластов мозга личинок (рисунок 1.2). На препаратах ясно видно, что у самок этих линий Х-хромосомы формируют не V-подобные структуры, как в норме, а Х-подобные структуры, дополнительно такие самки несут Y-хромосому.

Таким образом мы впервые продемонстрировали, что снижение экспрессии *Trf2* может действительно приводить к хромосомным аберрациям, в частности к Робертсоновским транслокациям.

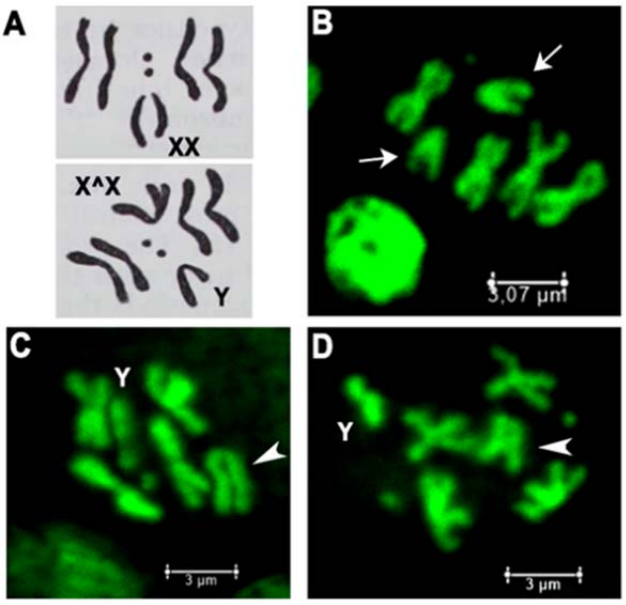

Рисунок 1.2 – Самки с летальными мутациями *Trf2* имеют сцепленные Х-хромосомы

А - схемы метафазных пластинок с нормальными Х-хромосомами (сверху) и сцепленными Х-хромосомами (снизу). B-D - метафазные пластинки нейробластов из мозга личинок: B - самка дикого типа; C - *l(1)G0425^FM7a/*Y; D - *l(1)G0356^FM7a*/Y. Стрелка показывают нормальные Х-хромосомы, треугольники – сцепленные Х-хромосомы.

Далее мы рассчитали частоту нерасхождения Х-хромосом и частоту встречаемости самок с нерасхождением Х-хромосом в этих линиях. Результаты представлены на рисунке 1.3. Оказалось, что эти линии можно разбить на 2 класса: слабые (1) и сильные (2) аллели *Trf2* - линии с низкой и линии с высокой частотой нерасхождения Х-хромосом соответственно. При этом частота встречаемости родительских самок с нерасхождением в линиях первой группы оказалась в два-три раза выше, чем во второй (рисунок 1.3). Обратную корреляцию мы объяснили тем, что высокая частота хромосомных аберраций в линиях второй группы приводит к гибели гамет, поэтому самки с нерасхождением из этой группы линий встречаются реже. Мы заметили, что сцепление Х-хромосом возникало только в линиях со слабыми аллелями *Trf2,* у которых была низкая частота нерасхождения Х-хромосом. Это означает, что даже небольшое снижение экспрессии *Trf2* может создавать риск хромосомного дисбаланса и Робертсоновских транслокаций.

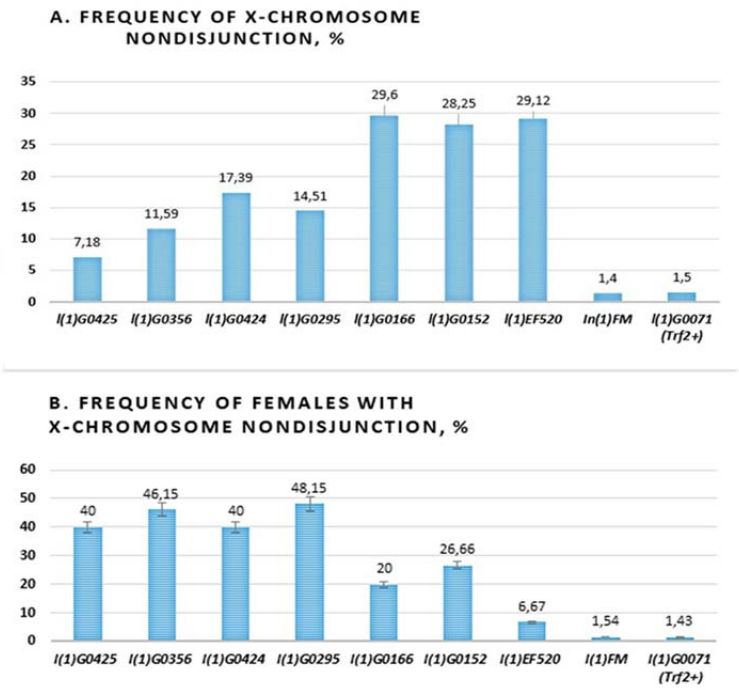

Рисунок 1.3 – Уровни нерасхождения X-хромосом в линиях с разными аллелями *Trf2*
A - частота нерасхождения X-хромосом. B - частота встречаемости родительских самок с нерасхождением X-хромосомы. Планки погрешностей: стандартное отклонение (SD).

1.3.2 СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ TRF2 ПОДАВЛЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНА *D1 CHROMOSOMAL PROTEIN*

Ранее мы показали, что снижение экспрессии *Trf2* ведет к нарушению формирования хромоцентров и конденсации хроматина [4]. С другой стороны, расщепление хромоцентра предполагает нарушение межхромосомных эктопических контактов в прицентромерной области гетерохроматина. *D1 chromosomal protein* (*D1*) кодирует связывающийся с сателлитной ДНК белок, который отвечает за упаковку прицентромерной ДНК из гетерологичных хромосомы в хромоцентры. Истощение D1 приводит к нарушению целостности ядра клетки и образованию микроядер [2]. Поскольку *Trf2* кодирует базовый фактор транскрипции, мы предположили, что он может управлять инициацией транскрипции гена *D1*. Мы сконструировали мух с индуцибельной экспрессией шпилечной РНК для тканеспецифической инактивации *Trf2* и установили ранее неизвестную связь между *Trf2* и *D1*. Мы проанализировали промоторную зону этого гена и показали наличие TRF2-зависимого промотора [5]. Далее мы исследовали корреляцию сниженной экспрессии *Trf2* с уровнем экспрессии гена *D1*. Оказалось, что снижение экспрессии *Trf2* приводит к снижению уровня мРНК гена *D1* (рисунок 1.4).

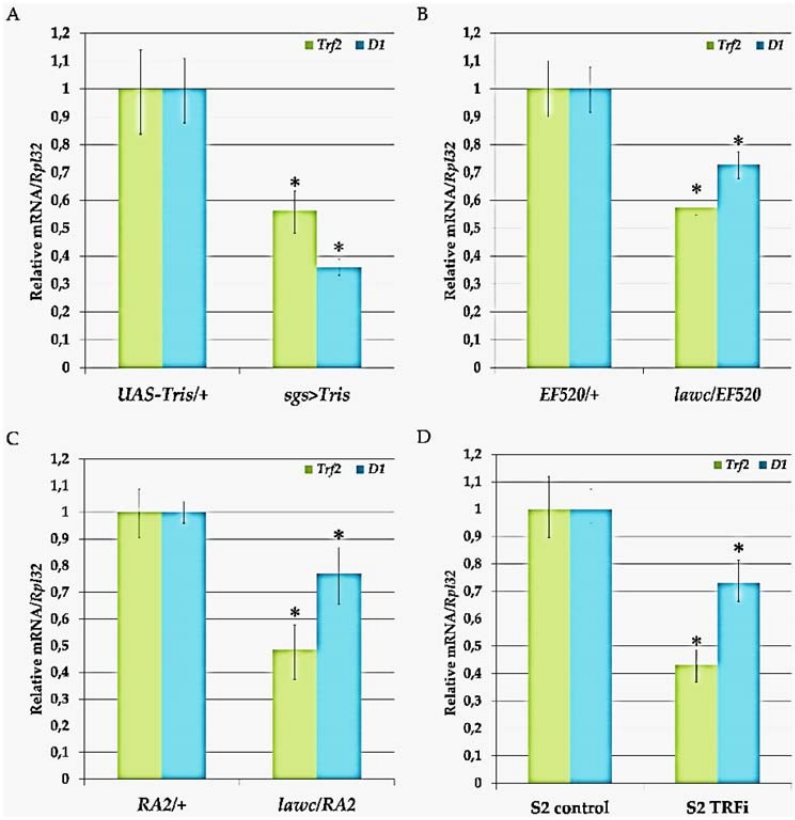

Рисунок 1.4 – Анализ относительного уровня экспрессии мРНК генов *Trf2* и *D1* в слюнных железах личинок, имаго и культуральных клетках S2, измеренного qRT-PCR Уровень экспрессии *Trf2* и *D1*: (a) в слюнных железах контрольных личинок *UAS-Tris*/+ и личинок с нокдауном *Trf2* (sgs>Tris); (b) в мухах со сниженной экспрессией *Trf2* - $lawc^{p1}$/*EF520* по сравнению с контролем - *EF520*/+; (c) в мухах с делецией *Trf2* - $lawc^{p1}$/*Df(1)RA2* по сравнению с контролем *Df(1)RA2*/+; (d) в клетках S2 после РНКи-опосредованного сайленсинга *Trf2* (S2-TRFi) по сравнению с контролем (клетки S2 обработаны дцРНК, комплементарной к гену *eGFP*).* - P<0.05.

Наконец, мы обнаружили, что РНКи-опосредованное подавление *Trf2* в клетках S2 дрозофилы ведет к заметному нарушению ядерной структуры - образованию микроядер (рисунок 1.5). Этот дефект может быть следствием неправильной сегрегации хромосом, вызванной различными хромосомными перестройками (в основном транслокациями). С другой стороны, ошибки сегрегации хромосом в митозе нарушают построение *de novo* ядерной оболочки. Действительно, мы наблюдали Lamin-отрицательные ядра в клетках, истощенных по TRF2 (рисунок 1.5). Клетки с потерей функции D1 демонстрируют сходную аномалию [2], подтверждающую наше предположение о том, что Trf2 является преобладающим общим фактором транскрипции, контролирующим экспрессию гена *D1*.

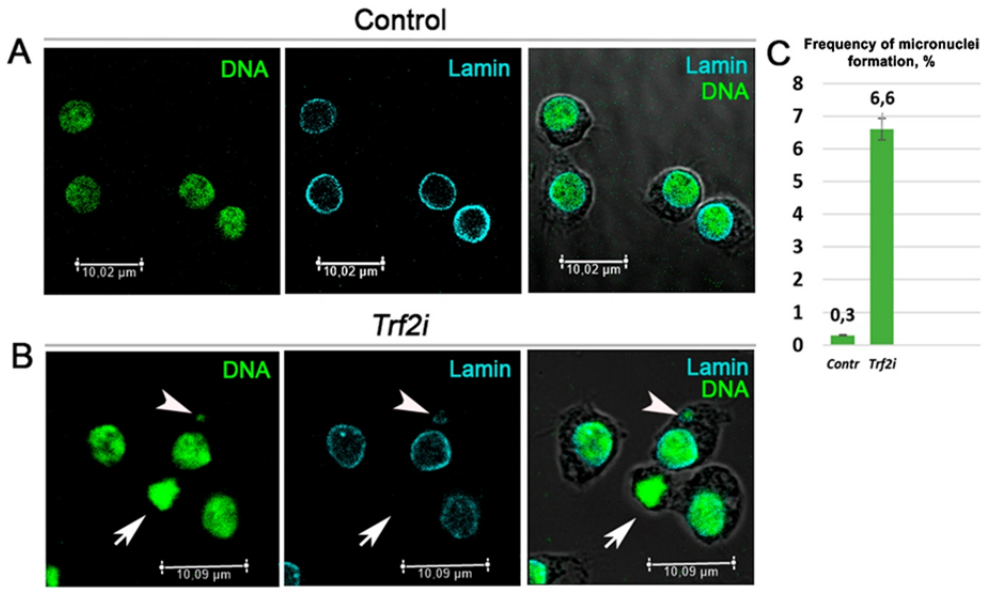

Рисунок 1.5 – РНКи-опосредованный сайленсинг Trf2 вызывает формирование микроядер и нарушает ядерную оболочку

Конфокальные иммунофлуоресцентные снимки клеток *Drosophila* S2: A - до и B - после сайленсинга *Trf2*. ДНК окрашена SytoxGreen (зелёный), оболочка ядра - anti-Lamin Dm (циановый). Треугольники показывают микроядро, стрелки – Lamin-негативные ядра. C - Количество клеток с микроядрами в контрольных клетках (Contr, n = 350) и клетках, трансфецированных dsRNA *TRF2* (*Trf2i*, n = 229), взятое из трёх независимых экспериментов. p-значение по *t*-критерию Стьюдента равно 0.0047. Планки погрешностей: стандартное отклонение (SD).

Недавние открытия показали участие TRF2 в специализированных программах транскрипции в ходе развития. Существует предположение, что *Trf2* способствовал эволюции третьего зародышевого листка (мезодермы) и билатериев, контролируя транскрипцию гомейозисных генов и генов мезодермы [6]. Наши данные впервые указывают на то, что *Trf2* может также создавать транскрипционную программу, ответственную за структурирование прицентромерных областей и может способствовать образованию новых кариотипов, в частности, за счет содействия центрическому слиянию хромосом. Поиск новых генов-мишеней *Trf2* в различных органно-тканевых структурах у разных организмов будет способствовать нашему пониманию этого феномена.

1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате этапа 2020 г., мы показали, что снижение экспрессии *Trf2* может приводить к слиянию хромосом. Ниже приведены основные выводы этого исследования:

1. Центрические слияния хромосом чаще происходят в мейозе самок со слабыми аллелями *Trf2*. Это важное открытие, оно означает, что даже небольшое снижение экспрессии *Trf2* может создавать риск хромосомного дисбаланса и Робертсоновских транслокаций.

2. Другой ключевой результат состоит в том, что *D1 chromosomal protein* является целевым геном Trf2. Учитывая, что D1 является основным белком для сборки хромоцентра, мы пришли к выводу, что эффекты действия Trf2 на хроматин опосредуются снижением экспрессии D1.

3. Наши данные впервые указывают на то, что фактор Trf2 может контролировать генную сеть, отвечающую за структурирование прицентромерных регионов, и играть ключевую роль в формировании новых кариотипов, в частности, способствуя центрическому слиянию хромосом.

Эти неожиданные открытия имеют два основных значения:

1. Несмотря на то, что работа была проведена на дрозофиле, ее результаты демонстрируют возможные риски для людей, несущих слабые гипоморфные аллели *Trf2*. Другими словами, снижение экспрессии Trf2 может потенциально привести к риску бесплодия или патологических генетически наследуемых синдромов человека (синдром Патау и синдром Дауна) даже при небольшом снижении экспрессии этого фактора.

2. Важным аспектом работы является демонстрация того, что Робертсоновские транслокации могут быть вызваны не только химическими мутагенами или радиацией, они также могут стимулироваться мутациями, дестабилизирующими компактную структуру хроматина в прицентромерных областях.

1.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Mack H., Swisshelm K. Robertsonian translocations // Brenner’s Encycl Genet. 2nd Ed; 2013. – P.301–305.

2 Jagannathan M., Cummings R., Yamashita Y.M. A conserved function for pericentromeric satellite DNA // eLife. – 2018. – V.7. - e34122

3 Matveevsky S., Kolomiets O., Bogdanov A., Alpeeva E., Bakloushinskaya I. Meiotic chromosome contacts as a plausible prelude for Robertsonian translocations // Genes (Basel). - 2020. – V.11. – 386.

4 Vorontsova, Y.E.; Cherezov, R.O.; Simonova, O.B. Effect of mutations in lawc/Trf2 gene on development of chromocenter and chromosome disjunction in Drosophila melanogaster// Genetika. – 2013. – V.49. – P. 669–680.

5 **Cherezov R.O., Vorontsova J.E., Simonova O.B.** TBP-related Factor 2 as a trigger for Robertsonian translocations and speciation // Int. J. Mol. Sci. - 2020. - V.21. 8871. doi:10.3390/ijms21228871 (WoS, Scopus) **Q1** – отчетная публикация.

6 Duttke S.H.C., Doolittle R.F., Wang Y.-L., Kadonaga J.T. TRF2 and the evolution of the bilateria // Genes Dev. – 2014. – V.28. – P. 2071–2076.

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

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Ранее с помощью индуцированной гомологичной рекомбинации был получен нокаут нейроспецифического гена транскрипционного фактора дрозофилы *tth* (*CG12175*). Было обнаружено, что на эмбриональной стадии выживаемость мутантов составляет 50%. Предварительные данные свидетельствовали о том, что смертность эмбрионов вероятно вызвана нарушением развития мозга и оптического зачатка, а также дефектами организации периферической нервной системы. Целью этапа госзадания на 2020 год являлось изучение картины экспрессии TTH в имагинальных дисках, мозге и периферической НС личинок линии дрозофилы дикого типа *Oregon R* с использованием антител и получение трансгенных линий дрозофилы, экспрессирующих белки D4, меченные маркерным GFP, для визуализации экспрессии генов семейства *d4 in vivo* на всех стадиях развития.

2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.2.1 ВЫВЕДЕНИЕ НУЛЕВОЙ МУТАЦИИ *TTH* НА ЧИСТЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФОН

Поскольку для получения целевой мутации нами была использована линия дрозофилы, содержащая мутации в генах *white* и *yellow,* расположенных, как и *tth,* в X хромосоме, для корректного изучения мутантного фенотипа необходимо было вывести нулевую мутацию *tth* на чистый генетический фон. Сначала мух линии $tth^{-}\{w+\}$ скрестили с мухами вспомогательной линии *y'w'; [Cre-w+] CyO/Sco*, несущими ген рекомбиназы *Cre* для удаления последовательности маркера *miniwhite*, окруженного *LoxP* сайтами. Белоглазых особей w^{-} генотипировали с помощью ПЦР для контроля сохранения мутации по гену *tth*. Далее для выведения на чистый генетический фон белоглазые самцы $w^{-}tth^{-}$ были скрещены с самками дикого типа *Oregon R* с целью получения рекомбинантных самцов w^{+} tth^{-}/Y. Далее проводили отбор и индивидуальное скрещивание красноглазых самцов с самками со сцепленными X-хромосомами ♀♀X^X/Y. В потомстве генотипировали самцов ПЦР с праймерами на ген *tth* для подтверждения наличия мутации.

2.2.2 ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В ОРГАНИЗМЕ *D. MELANOGASTER* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИЙ ГЕНА *TTH* В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Поскольку целью нашей работы было исследовать нервную систему мутантных мух, несущих нулевой аллель гена *tth*, возникла необходимость совместить ген-респондер *UAS-GFP* и конструкцию, экспрессирующую белок GAL4 в нервной системе, в геноме мух tth^-. Были использованы три линии: драйвер, респондер и *tth*-мутанты. В качестве линии драйвера мы использовали линию, экспрессирующую белок GAL4 под промотором гена *Elav brain* (*Elav-GAL4*). С помощью генетических скрещиваний мух линий драйвера *Elav-GAL4*, мутантов tth^- и респондера *UAS-GFP*, мы получили: (1) гомозиготную по tth^- и несущую драйвер линию $tth^-\{w^+\}$; *Elav-GAL4/+*; (2) гомозиготную по tth^- и несущую респондер *UAS-GFP* линию $tth^-\{w+\}$; *UAS-GFP*. После скрещивания мух этих линий между собой, мы получили три генетических компонента (драйвер, респондер и мутация) в одном геноме (tth^-*; Elav-GAL4/+; UAS-GFP/+*).

2.2.3 ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ ДРОЗОФИЛЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ *IN VIVO* ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *D4*

Гены-репортеры *Gal4* и *GFP* встраивали в плазмидный вектор, сдержащий ген устойчивости к канамицину, окруженный сайтами для Cre-рекомбиназы LoxP. Далее в полученную плазмиду клонировали фрагменты геномной ДНК, амплифицированной из соответствующих локусов генов *d4* и *tth* таким образом, чтобы при встраивании в кодирующую область целевого гена, ген-репортер попадал в рамку считывания и, в случае с GFP вносил флуоресцентную метку с С-конца белка, а в случае с Gal4 экспрессировался со старт-кодона целевого гена. Полученные плазмидные конструкции встраивали в бактериальные искусственные хромосомы (BAC), содержащие локусы генов *d4* и *tth*. Клоны BAC были получены из BACPAC Resources Center (https://bacpacresources.org). Внесение мутаций и репортерных последовательностей в БАКмиды проводили согласно протоколу [1]. С помощью электропорации БАКмиды трансфецировали в клетки DY380, Трансформированные БАКмидой клетки инкубировали при 37° С для индукции высокой рекомбинантной активности и трансфецировали их еще раз специфическими для каждого гена конструкциями для внесения в соответствующие локусы мутаций и последовательностей репортерных генов. Встраивание контролировалось по появлению устойчивости к Канамицину. Далее ген устойчивости к Канамицину, окруженный LoxP сайтами удаляли с помощью штамма, экспрессирующего Cre-рекомбиназу. Правильно прошедшую рекомбинацию подтверждали с помощью ПЦР соответствующей области и сиквенса ПЦР-фрагмента. Полученные конструкции несли сайт *attB* для сайт-специфической рекомбинации, и маркер *miniwhite* для отбора трансформированных дрозофил. ДНК конструкции инъецировали в полярную плазму эмбрионов дрозофилы линии *attp2*, мутантной по гену *white* и содержащей сайт для встраивания *attP* с помощью

рекомбиназы phic31. Трансформантов отбирали по окрашенным глазам.

2.2.4 ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ ЦЕЛЫХ ЭМБРИОНОВ ДРОЗОФИЛЫ

Окраску проводили с помощью антител, коньюгированных с пероксидазой хрена по протоколу, изложенному в руководстве [2]. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали диаминобензидин.

2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что нокаут по гену *tth* снижает выживаемость эмбрионов в 2 раза. Было обнаружено, что высокая смертность эмбрионов, вероятно, вызвана нарушениями развития головного мозга и оптического зачатка, а также нарушениями организации периферической нервной системы. Однако при переводе мутантной по гену *tth* линии на «чистый» генетический фон, эффект эмбриональной летальности исчез. Мы связали этот эффект с проявлением накопленных мутаций на первой хромосоме линии y'w', которая на первом этапе использовалась для получения трансформированных нокаутной конструкцией дрозофил. После выведения нулевой мутации *tth* на чистый генетический фон была проведена повторная визуализация структуры, маркированной GFP нервной системы *tth*-нокаутных эмбрионов. Сильных нарушений обнаружено не было. В этой связи возникла необходимость получения дрозофил, экспрессирующих гибридный белок TTH:GFP для точной локализации зон экспрессии TTH в нервной системе дрозофилы с помощью конфокальной микроскопии, что в дальнейшем облегчит прицельный поиск и анализ специфики нарушений у нулевых мутантов с визуализированной нервной системой.

Анализ картины экспрессии TTH в имагинальных дисках, мозге и органах личинок *Oregon R* с помощью специфических антител и световой микроскопии показал, что белок локализован в ядрах нейронов, но не глиальных клеток, а также в глазо-антенном имагинальном диске, в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез (рисунок 2.1).

При изучении локализации белков с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания эмбрионов было обнаружено, что белок TTH локализуется в цитоплазме и ядрах (рисунок 2.2 А). Экспрессия белка обнаружена на всех стадиях развития эмбриона, начиная со стадии прецеллюлярной бластодермы, гаструляции и до поздних стадий формирования зародышевых органов. Экспрессия носит убиквитарный характер. На ранней эмбриональной стадии целлюлярной бластодермы TTH не ассоциирован с

метафазными хромосомами и находится в цитозоле делящихся клеток. В ядрах клеток S2 белок TTH локализован в активном хроматине (рисунок 2.2 B) и отсутствует в гетерохроматине, поскольку мало колокализуется с белком гетерохроматина HP1 [3].

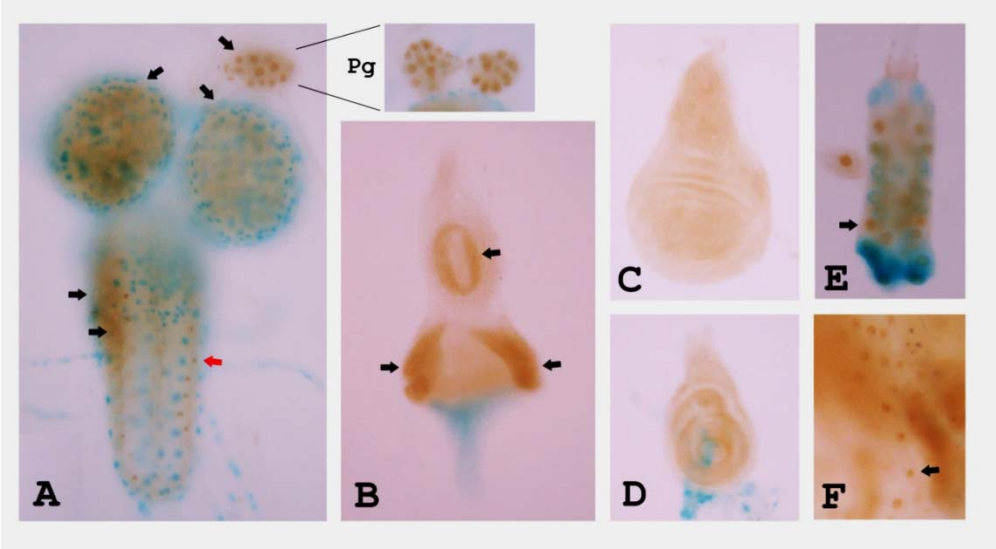

Рисунок 2.1 - Картина экспрессии TTH на стадии личинки дрозофилы (иммуногистохимическое окрашивание)

A – мозг, B - глазо-антеннальный имагинальный диск, C - крыловой диск, D - ножной диск, E – слюнная железа, F – кутикулярно-эпидермальный препарат, Pg – кольцевая железа (Prothoracic gland). Черными стрелками показаны зоны экспрессии TTH (коричневая окраска). Голубое окрашивание-экспрессия *LacZ* в глиальных клетках под промотором гена *repo.* Красная стрелка-неспецифическое окрашивание ядер клеток мозга.

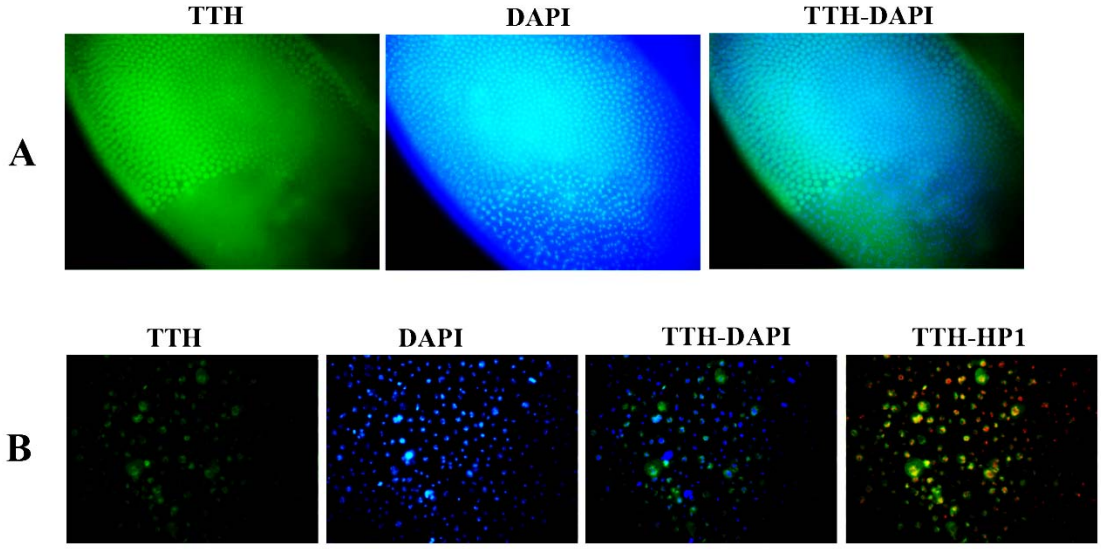

Рисунок 2.2 - Иммунофлуоресцентное исследование локализации TTH в ранних эмбрионах дрозофилы

Стадии целлюлярной бластодермы (A), клетках Шнайдера S2 (B), Обозначения: DAPI - окрашивание ДНК; TTH - окрашивание антителами против TTH дрозофилы,

флуоресцентная метка Cy-2; HP1-окрашивание антителами против белка гетерохроматина HP1, флуоресцентная метка Texas red - красная.

В настоящее время проводится получение трансгенных линий, которые будут специфически экспрессировать меченные флуоресцентными маркерами целевые белки и дрожжевой транскрипционный фактор Gal4. Необходимость данной работы связана с проявлением неспецифических взаимодействий поликлональныех антител, полученных нами против белков семейства D4, что затрудняет изучение картины их экспрессии в мозге, где было обнаружено неспецифическое взаимодействие (рисунок 2.1, красная стрелка). Новые эксперименты позволят локализовать отдельные нейроны, экспрессирующие белки D4.

2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ картины экспрессии TTH в имагинальных дисках, мозге личинок *Oregon R* и органах личинок дрозофилы показал, что белок локализован в ядрах нейронов мозга, но не глиальных клеток, а также в ядрах клеток кольцевой и слюнных желез. Локализация TTH в тканях кольцевой железы может свидетельствовать о вовлеченности гена в процесс гормональной регуляции развития дрозофилы, что согласуется с нашими ранними данными о влиянии экспрессии *tth* на скорость развития [4]. Было показано, что TTH не ассоциирован с метафазными хромосомами и в зоне деления клеток находится в цитозоле. Эти данные позволяют предположить возможную сигнальную роль TTH, который может менять внутриклеточную локализацию в ответ на сигналы, связанные с регуляцией согласованного деления клеток эмбриона. Высокая консервативность белковых доменов семейства D4 дрозофилы позволит экстраполировать их функцию на человека [5].

2.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Venken K.J., Kasprowicz J., Kuenen S., Yan J., Hassan B.A., Verstreken P. Recombineering-mediated tagging of Drosophila genomic constructs for in vivo localization and acute protein inactivation // Nucleic Acids Res. - 2008. - V. 36. - e114.

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, Drosophila melanogaster: Practical Uses in Cell Biology. 1994. V. 44 Academic Press, New York.

3 Funikov S., Rezvykh A., **Kulikova D.**, et al. Adaptation of gene loci to heterochromatin in the course of Drosophila evolution is associated with insulator protein // Scientific Reports. – 2020. – V. 10. - Art. no. 11893. DOI: 10.1038/s41598-020-68879-2. - **Q1** – отчетная публикация

4 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.

5 Yurinskaya M.M., Krasnov G.S., **Kulikova D.A.** et al. H2S counteracts proinflammatory effects of LPS through modulation of multiple pathways in human cells // Inflamm. Res. – 2020. - V. 69. - P. 481–495 https://doi.org/10.1007/s00011-020-01329-x **Q3** - отчетная публикация.

РАЗДЕЛ 3 ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

3.1 ВВЕДЕНИЕ

Арил-гидрокарбоновый рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR), является важным лиганд-зависимым транскрипционным фактором, сохранившим в процессе эволюции свои структурные и функциональные особенности. Белок AHR в неактивном состоянии существует в цитоплазме в мультипептидном комплексе с димером белка теплового шока HSP90, кошапероном p23 и молекулой AIP. После связывания с лигандом-ксенобиотиком AHR перемещается в ядро и формирует гетеродимер с ядерным переносчиком арил-гидрокарбонового рецептора (ARNT). Образованный гетеродимер AHR:ARNT взаимодействует с регуляторными элементами *XRE* (***x****enobiotic* ***r****esponse* ***e****lement*) генов-мишеней, что приводит к инициации их транскрипции. [1-3]. В отличие от гомолога AHR дрозофилы, не способного активироваться под влиянием экзогенных лигандов, AHR человека можно тканеспецифически активировать в организме мухи, несущей его трансгенную копию, добавлением лигандов в кормовую среду [4]. Предварительные эксперименты на дрозофиле *in vivo* показали отсутствие активации экспрессии некоторых целевых генов AHR человека в ответ на действие экзогенных лигандов-агонистов ксенобиотиков. Мы предположили, что отсутствие ожидаемого увеличения уровня транскрипции этих генов вызвано эпигенетическим сайленсингом, за который отвечают продукты генов семейства *Polycomb*. Целью данного этапа 2020 года стала проверка этой гипотезы в генетических экспериментах на фоне нулевой мутации гена *Polycomb* и при использовании ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрасферазы.

3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали созданную нами ранее линию дрозофил *UAS-AHR*, трансформированную геном *AHR* человека, поставленным под контроль индуцибельного дрожжевого промотора *UAS*, позволяющего активировать его при помощи GAL4-тканеспецифических драйверов [4]. Для активации транскрипции гена *AHR* человека в геноме дрозофилы использовали линию-драйвер, обеспечивающую его тканеспецифическую экспрессию в глазных структурах: *GMR-GAL4 (*генотип w^{*}*; P{GAL4-ninaE.GMR}12)*. Линия дрозофил, содержащая нулевую мутацию гена *Polycomb,* генотипом $Pc^4p^1e^5/TM6C$, применялась в генетических экспериментах для получения комбинации *GMR-GAL4/UAS-AHR;* $Pc^4/+$. Для это скрещивали предварительно полученные особи *UAS-AHR;* $Pc^4p^1e^5/TM6C$ с особями *GMR-GAL4/Cy0* и анализировали

дрозофил генотипа *GMR-GAL4/UAS-AHR;* $Pc^4p^1e^5$/+. Все скрещивания проводили при температуре 25°C на стандартной среде Formula 4-24 medium (Carolina Biological Supply, USA).

В качестве экзогенных лигандов AHR человека мы использовали индирубин (2′Z-Indirubin, SML0280, Sigma-Aldrich, USA) и бета-нафтофлавон (A18543, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, UK), в качестве ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрасферазы - UNC1999 (SML0778, Sigma-Aldrich, USA). Лиганды и ингибитор разводили согласно протоколам производителям и добавляли в кормовую среду для дрозофил Formula 4-24 medium в конечные концентрации: индирубин - 25 мкг/г среды, бета-нафтофлавон - 200 мкг/г среды, UNC1999 - 20 мкг/г среды.

Для экспериментов отбирали личиночные особи второй стадии развития и переносили их на кормовую среду с лигандом или ингибитором, далее держали при комнатной температуре (25ºC) до взрослой стадии. В качестве контроля использовали дрозофил с тем же генотипом, развивавшихся на стандартной среде. Для ПЦР в реальном времени использовали головы взрослых особей возраста 3 - 5 дней.

Тотальную РНК выделяли с помощью RNAzol (Molecular Research Center, США) согласно протоколу фирмы производителя, обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT Kit (Евроген, Россия), ПЦР в реальном времени - с помощью набора реактивов qPCRmix-HS-HighRox (Евроген, Россия) и TaqMan® проб (Синтол, Россия). Реакцию ставили в ампликаторе Applied Biosystems 7500 (Applied BioSystems, Life Technologies, USA). Нормализацию результатов проводили по экспрессии гена *Rpl32*.

Уровень экспрессии генов оценивали по значению $R = 2\Delta Ct$, т.е. через отношение экспрессии целевого гена к гену домашнего хозяйства *Rpl32*. Последовательности праймеров и TaqMan проб можно найти в статье [4]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью REST program software (Qiagen, USA). Статистически достоверными считали различия при $p<0,05$.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора генов-мишеней AHR человека в геноме *D. melanogaster* был выполнен поиск генов, участвующих в процессах регуляции биодеградации токсических факторов (*Cyp6g1, GstT4, Mgat1, ST6Gal)*, пролиферации клеток и их дифференцировки (*Myc, Rbf, Cdc42, p53, dap)* и в процессах развития *(dl, Rel, Sox70, Jra).* Все гены содержат в своей структуре последовательность *XRE*. Поиск был основан на анализе литературных данных [5-6] и последовательностей промоторных областей генов.

Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *GMR-GAL4* в отсутствии действия экзогенных лигандов не вызывала нарушения развития глазных структур. Индукция экспрессии *UAS-AHR* при помощи драйвера *GMR-GAL4* в сочетании с действием экзогенных лигандов вызывала нарушения развития глазных структур (рисунок 3.1 А-Г). Фотографии глазных структур мух дрозофилы, *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде без лиганда, демонстрируют упорядоченность построения омматидиев и механорецепторов (микрощетинок). Глазные структуры мух *GMR-GAL4*; *UAS-AHR,* развивавшихся на кормовой среде, содержащей бета-нафтофлавон или индирубин, имеют существенные нарушения в построении омматидиев и меньшее количество механорецепторов.

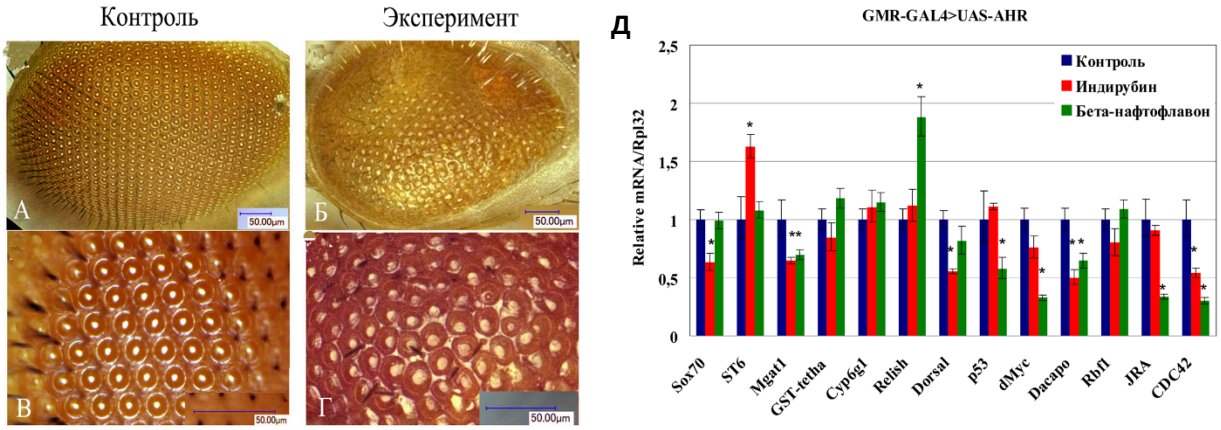

Рисунок 3.1 – Активация AHR человека ксенобиотиком в глазном диске личинок дрозофилы нарушает развитие глазных структур
А, В - фотографии глазных структур дрозофил *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде без лиганда (контроль) Б, Г - фотографии глазных структур дрозофил *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*, развивавшихся на кормовой среде, содержащей бета-нафтофлавон или индирубин (эксперимент). Д - уровень экспрессии генов-мишеней AHR человека в головах дрозофил этого же генотипа.

С помощью ПЦР в реальном времени был проанализирован уровень транскрипционной активности генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора человека в геноме дрозофил *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*. Выявлено, повышение уровня транскрипции только у двух из 13 проанализированных генов - *St6* и *Relish* (рисунок 3.1 Д). Выбранные нами экзогенные лиганды в мировой литературе отнесены к лигандам-агонистам AHR позвоночных. Такое определение они получили на основе результатов, полученных в экспериментах с культуральными клетками *in vitro* [7]. Их действие обычно приводит к повышению уровня транскрипции целевых генов AHR. Наше исследование на *Drosophila melanogaster* позволило поставить эксперименты в условиях *in vivo*.

Неожиданным результатом оказалось обнаружение способности лигандов-агонистов как повышать, так и понижать уровень транскрипции целевых генов AHR. Мы предположили, что отсутствие ожидаемого увеличения транскрипции большинства генов-мишеней AHR вызвано эпигенетическим сайленсингом, за который отвечают продукты генов семейства *Polycomb*. Чтобы проверить эту гипотезу мы проанализировали уровень экспрессии генов-мишеней AHR на фоне нуль-мутации Pc^4 и при использовании ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрасферазы (UNC1999).

Сравнение графиков уровня транскрипции целевых генов AHR человека в глазных структурах мутантных по гену *Polycomb* мух *GMR-GAL4*; *UAS-AHR*; Pc^{4-} выявило повышение уровней транскрипции целевых генов AHR у особей, развивавшихся на кормовой среде с лигандами, в сравнении с мухами, росшими на стандартной кормовой среде (рисунок 3.2 А).

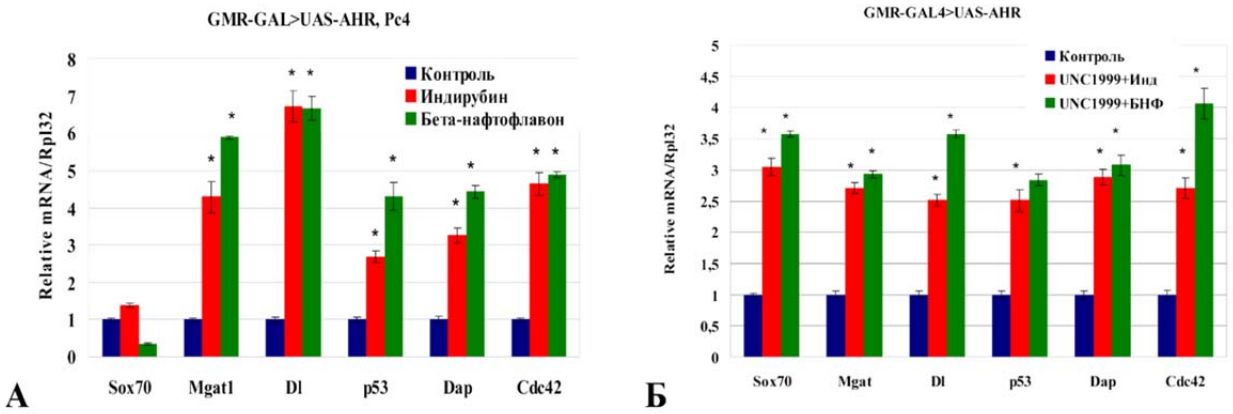

Рисунок 3.2 – Дерепрессия целевых генов AHR человека
А - уровень экспрессии генов-мишеней AHR человека в головах дрозофил *GMR-GAL4*; *UAS-AHR* на фоне мутации Pc^4, развивавшихся на кормовой среде без лиганда (контроль) и с лигандами. Б - уровень экспрессии генов-мишеней AHR человека в головах дрозофил *GMR-GAL4*; *UAS-AHR* развивавшихся на кормовой среде с добавлением ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрасферазы UNC1999, но без лигандов (контроль) и с лигандами.

Сходные результаты были получены в экспериментах, сочетающих действие экзогенных лигандов и ингибитора гистоновой лизин-N-метилтрасферазы - UNC1999. Уровень транскрипции целевых генов AHR в глазных структурах мух *GMR-GAL4*; *UAS-AHR,* в этих экспериментах повышался в сравнении с мухами, развивавшимися на кормовой среде с экзогенными лигандами, но без UNC1999 (рисунок 3.2 Б).

3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы по исследованию особенностей функционирования AHR человека, выполненной в 2020 году, показали, что разнообразие уровней транскрипции его генов-мишеней, в основном, обусловлено структурой хроматина каждого из них. Это наблюдение подтвердило нашу гипотезу, выдвинутую при демонстрации участия гистонового шаперона семейства NAP1 [8] в формировании дифференциальной доступности AHR человека к некоторым целевым генам в тканях семенников дрозофилы. Очевидно, эпигенетические репрессивные комплексы, меняя упаковку хроматина, ограничивают доступ AHR к своим сайтам связывания у подконтрольных ему генов. При их отсутствии доступность регуляторной зоны целевых генов AHR "открывается" и транскрипционный комплекс AHR:ARNT начинает активно функционировать (рисунок 3.3).

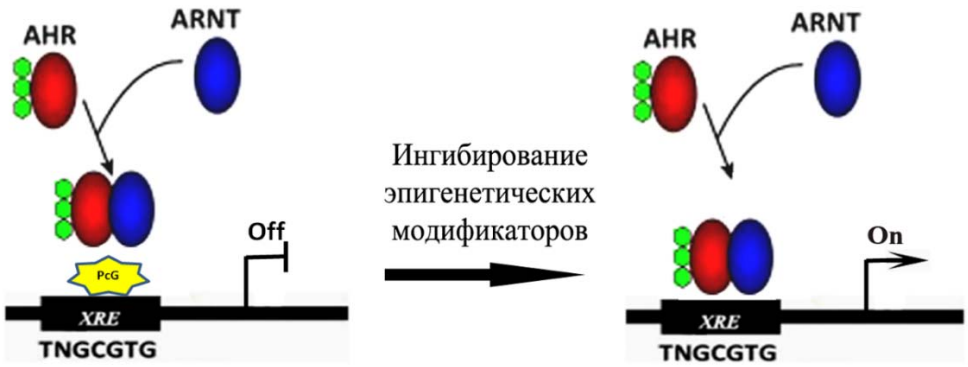

Рисунок 3.3 - Схема возможного механизма эпигенетической регуляции транскрипции генов-мишеней AHR человека

Зелёным обозначены лиганды-ксенобиотики, желтым –комплекс, ответственный за упаковку хроматина.

Таким образом, был открыт новый механизм эпигенетического контроля экспрессии генов-мишеней AHR. Это открытие служит основанием для коррекции существующих концепций о механизме активации целевых генов AHR, большинство из которых является онкогенами. Поскольку экзогенные лиганды AHR и ингибиторы эпигенетических модификаторов часто используются в качестве фармацевтических противоопухолевых препаратов, результаты нашей работы необходимо учитывать при разработке новых комбинаций терапевтических схем лечения онкологических заболеваний. Полученные данные расширят представления об участии AHR человека в процессах регуляции развития и биодеградации токсических факторов.

3.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Duncan D.M., Burgess E.A., Duncan I. Control of distal antennal identity and tarsal development in Drosophila by spineless-aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor // Genes Dev. - 1998. - V. 12. - P. 1290–1303.

2 Hahn M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution // Chem. Biol. Interact. -2002. - V. 141. - P. 131–160.

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

4 Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Mertsalov I.B., Zatsepina O.G., Slezinger 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. - V. 8, - P. 102934–102947.

5 Lo R., Celius T., Forgacs A.L., Dere E., MacPherson L. et al. Identification of aryl hydrocarbon receptor binding targets in mouse hepatic tissue treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2011. - V. 257. - P. 38–47.

6 Busbee P.B., Rouse M., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders // Nutr. Rev. - 2013. - V. 71. - P. 353–369.

7 **Vorontsova Yu.E., Akishina A.A., Cherezov R.O., Simonova O.B.** Functional activity of aryl hydrocarbon receptor in human osteosarcoma cell cultures // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2020. - Vol. 75. – No 4. – P. 247–251. DOI: 10.3103/S0096392520040136) - **S** – отчетная публикация

8 **Akishina A.A., Kuvaeva E.E., Vorontsova Y.E., Simonova O.B.** NAP family histone chaperones: characterization and role in ontogenesis // Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. - Vol. 51. - No. 6. - P. 343–355. DOI: 10.1134/S1062360420060028 - **Q4**-отчетная публикация

РАЗДЕЛ 4 КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

ПОДРАЗДЕЛ 4.1 РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КОК-САГЫЗА

4.1.1 Введение

Натуральный каучук (НК) является уникальным продуктом на базе уникального сырья, созданного природой, с уникальными свойствами, и не один из выпускаемых в мире синтетических каучуков не способен его заменить. Несмотря на интенсивно проводившиеся у нас в стране и за рубежом в течение почти 50 лет научно-исследовательские работы, достичь с помощью синтетического полиизопрена комплекса технологических и эксплуатационных свойств резин на основе НК так и не удалось. Прежде всего, это относится в конфекционной клейкости сырых резиновых смесей, их физико-механическим и адгезионным характеристикам.

Taraxacum kok-saghyz, также известный как русский или казахский одуванчик, является диплоидным (n = 16), размножающимся половым путем и самонесовместимым видом, принадлежащим к роду *Taraxacum* [1]. После его открытия в 1931 году Л. Родиным и в связи с определением высокого содержания каучука в корнях, потенциал этого многолетнего растения был исследован для использования в качестве стратегического источника натурального каучука (НК). В последнее время *Taraxacum kok-saghyz* вновь получил популярность и многие страны начали исследовательскую деятельность с целью повышения продуктивности *Taraxacum kok-saghyz.* Борьба с сорняками является самой большой проблемой. В отличие от других видов *Taraxacum*, *Taraxacum kok-saghyz* демонстрирует слабую конкурентоспособность по отношению к сорнякам. Более половины всех затрат при возделывании приходится на борьбу с сорной растительностью. Засоренность посевов может доходить до 99%, из них 60% показывают засоренность в средней и сильной степени. Потери от сорняков в среднем оцениваются в 25-30% от урожая, но в реальных условиях они могут быть выше. В связи с этим, необходимым условием сохранения урожая корней является борьба с сорной растительностью. Такими методами по защите *Taraxacum kok-saghyz* от сорняков как севообороты, системы удобрений, механизированная обработка, ручная прополка и др., невозможно полностью очистить поля от сорняков. Один из основных путей решения данной проблемы является химическая обработка посевов с помощью гербицидов. В связи с тем, что *Taraxacum kok-saghyz* обладает высокой чувствительностью к фитотоксическому эффекту многих гербицидов, обработку проводят большой дозой однократно (до прорастания семян), что

негативно сказывается на всхожести семян. Многократные обработки часто оказывают неблагоприятное воздействие, как на сами проростки, так и на окружающую среду. Методы генной инженерии отрывают возможность вводить в *Taraxacum kok-saghyz* гетерологичные гены, улучшаюшие агротехнические свойства данной культуры, которые раннее невозможно было использовать в традиционной селекции. Создание устойчивых к гербицидам линий позволит решить проблему сорных растений, уменьшить время и частоту обработки полей и, тем самым, снизить экологическую нагрузку на окружающую среду.

Целью работы является создание устойчивых к гербициду трансгенных растений для исследовательских работ, связанных с увеличением выхода НК у этого растения [3]. Таким образом растения *Taraxacum kok-saghy* будут более экономически конкурентоспособными и ускорят получение сортов с высоким содержанием НК.

Для достижения поставленной цели мы использовали ранее разработанный нами протокол генетической трансформации корней кок-сагыза. На данном этапе были получены первые трансгенные растения двух популяций *Taraxacum kok-saghyz* с устойчивостью к гербициду глифосат [3].

4.1.2 Материалы и методы

В работе в качестве эксплантов использовали растения и семена кок-сагыза (*in vitro*), полученные из ВИР им. Вавилова.

4.1.2.1 Подготовка исходного материала

Полученные образцы побегов *Taraxacum kok-saghys* выращивали в асептических условиях (*in vitro*) на среде Мурасиге и Скуга (МС). Очищенные семена кок-сагыза стерилизуют с помощью 70% этанола в течение 3 мин. Эти семена далее стерилизуют 2,5% гипохлоридом натрия, в течение 11 мин, промывают пять раз стерильной водой. Семена инкубируют на среде с 1/2 MS на фильтровальной бумаге в темноте при 24° С в течение 14-20 дней до прорастания. Зеленые проростки пересаживаются в контейнеры и пробирки для размножение корневыми сегментами и используются далее.

Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGLO с вектором pCamGRGGUSi (рисунок 4.1.1). Вектор pCamGRGGUSi содержит селективный ген *epSPs* устойчивости к глифосату и маркерный ген *uidA*, кодирующий β-глюкуронидазу. Бактерии выращивали на средах LB и AB с добавлением антибиотиков.

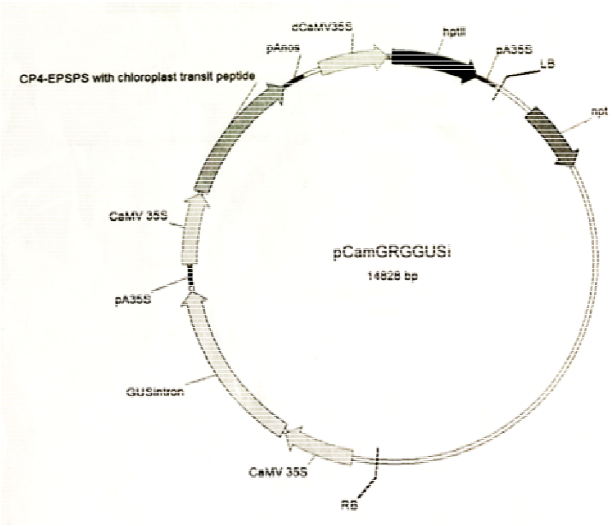

Рисунок 4.1.1 – Схема конструкции на основе вектора pCamGRGGUSi

4.1.2.2 Микроклональное размножение *Taraxacum kok-saghyz*

Для культивирования кок-сагыза за основу брали питательную среду Мурасиге-Скуга, дополненную сахарозой 20 г/л, витаминами В5 1мг/л, а также содержащую агар 5,5 г/л. Значение pH=5,7. Для микроразмножения *Taraxacum kok-saghys* брали сегменты корней. Корни растений из пробирок разрезали на сегменты 1-2 см и переносили на чашки Петри с МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л+ цефотаксим 300 мг/л. Для индукции регенерации растений в среду были добавлены регуляторы роста ауксины и цитокинины.

4.1.2.3 Генетическая трансформация *Taraxacum kok-saghyz*, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens*

Для подготовки растительных эксплантов к трансформации была использована среда: МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л с 20 г/л сахароза. Для подготовки агробактерии к трансформации ночную культуру агробактерии культивировали на среде АВ. Подготовленную агробактерию по стандартной методике разбавляли ½ средой МС. В эту колбу поместили заранее порезанные по 1 см корневые экспланты. И поставили на шейкер 100 об/мин, 28°С, 30 мин. Через 30 минут вынули корни и промыли средой 50/50 АВ+МС. Высадили корни на заранее подготовленные чашки Петри с двумя вариантами сред. Экспланты совместно с агробактерией культивировались в темноте, в течение трех дней, при 28°С. Через 3 дня корни пересаживали на среду МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л с цефотаксимом 600 мг/л для иллюминации бактерии.

После трансформации, при появлении побегов во время регенерации из сегментов корня экспланты переносили на селективную среду с глифосатом и культивировали в течение четырех недель. Для селекции была подобрана среда с содержанием оптимальной

концентрации глифосата. Для этого сегменты корней, не подвергавшихся трансформации высаживали на среду МС в чашки Петри с концентрациями глифосата: 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mM. А также сегменты корней помещались на контрольную среду без антибиотика. Далее экспланты культивировали с фотопериодом 12 (16) ч света/темноты при 24°С в течение четырех недель. Учитывали появление участков регенерации и дальнейшее развитие из них побегов, а также количество погибших эксплантов.

4.1.3 Результаты и обсуждение

4.1.3.1 Регенерация из эксплантов и определение селективной концентрации глифосата

Образовавшийся каллус был светло-зеленой окраски с плотной структурой. В дальнейшем из каллуса развивались зачатки листьев и корней, формировались полноценные побеги. Побеги имеют светло-зеленую окраску, распложены группой. В большинстве случаев побеги образуются на ткани корня, минуя стадию каллуса (рисунок 4.1.2).

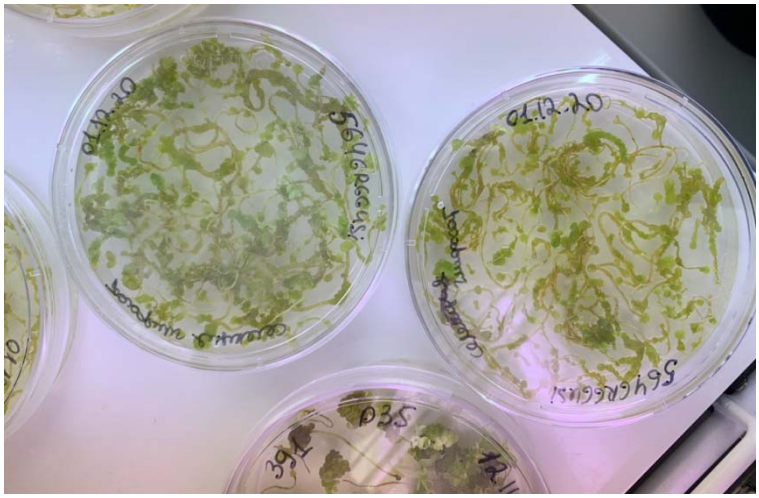

Рисунок 4.1.2 - Получение каллуса из корней и регенерация побега из корня на селективной среде

Мы получили прямую регенерацию побегов из корневых эксплантов на среде с содержанием БАП-6 и ИУК с концентрациями 1 мг/л и 0,2 мг/л соответственно. У побегов, полученных на данной среде, спустя время появлялись зачатки корней и далее наблюдалось развитие мощного, длинного корня.

В контрольном варианте среды без добавления гербицида из корневых эксплантов во всех повторностях наблюдалась регенерация и последующее развитие побегов. На селективной среде с концентрацией глифосата 0,01 mM на 8 день наблюдалась регенерация эксплантов с низким процентом образования побегов по сравнению с контрольным вариантом. В этом варианте среднее число погибших эксплантов составляло

более 40% от всего количества эксплантов исследуемых в данном варианте среды. С концентрацией глифосата 0,05 mM процент регенерации был гораздо ниже - на уровне 3-4%. На всех эксплантах, помещенных на среды с концентрациями выше 0,1 mM и 0,15 mM, очаги регенерации не наблюдались. В течение двух недель культивирования такие экспланты приобретали черный цвет.

По полученным данным составлен график «доза-эффект» и найдена концентрация глифосата, оказывающая летальное воздействие на корневые экспланты. В данном случае, эффект – это ответ клеток или ткани кок-сагыза на концентрацию глифосата в селективной среде. При концентрации 0,01 mM эффект слишком мал для измерения и оценки, он стал заметным при более высоких концентрациях и при увеличении концентрации наблюдался его рост. После того как концентрация стала достаточно высокой, эффект прекратил расти и достиг своего максимума (рисунок 4.1.3).

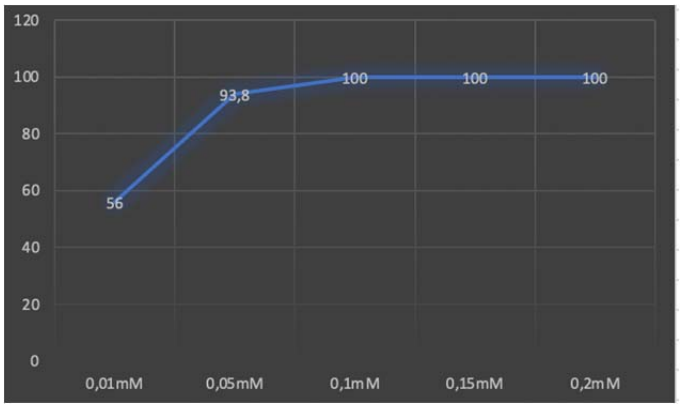

Рисунок 4.1.3 - Влияние концентраций глифосата на гибель корневых эксплантов

Для дальнейшего отбора трансформированных клеток была выбрана селективная среда с концентрацией глифосата 0,1 mM.

4.1.3.2 Результаты генетической трансформации

На корневых эксплантах на 6-7 день после трансформации стали заметны очаги регенерации. На 14 день культивирования эксплантов на среде наблюдался высокий процент регенерации, составляющий 90,7%. Был отмечен каллусогенез и органогенез.

4.1.3.3 Результаты гистохимического окрашивания

В качестве целевого гена, который позволил оценить эффективность данной методики трансформации, был выбран маркерный ген *uidA,* кодирующий синтез β-глюкуронидазы. Этот ген является удобным при оценке экспрессии, так как при

взаимодействии реактива X-Gluc с его продуктом наблюдается окрашивание в ярко синий цвет (рисунок 4.1.4)

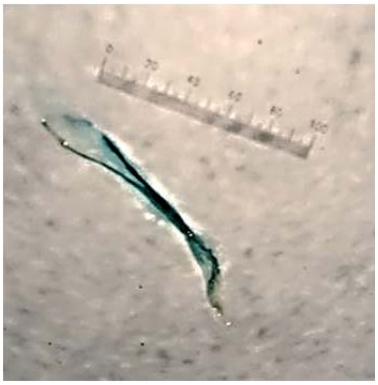

Рисунок 4.1.4 - Экспрессия маркерного гена в листе кок-сагыза

Гистохимический метод дал возможность определить локализацию трансформированных тканей и областей, в которых произошли генетические модификации клеток. Подтверждением эффективности использованной методики трансформации корней кок-сагыза стала наблюдаемая экспрессия маркерного гена *uidA,* которая проявилась в виде синего окрашивания тканей растения, после инкубации в растворе с X-Gluc (таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1 - Экспрессия маркерного гена в побегах *Taraxacumkok-saghy.*

Популяция	Кол-во побегов (от каждого эксплантa), шт.	Кол-во окрашенных побегов, шт.
564	100	12
391	100	4

4.1.4 Заключение

Перспективным для возделывания в средней полосе РФ является кок-сагыз. В течение последних 2-х десятилетий с помощью генной инженерии были получены различные сельскохозяйственные виды растений, устойчивые к гербицидам. Однако создание трансгенных линий до сих пор под силу только крупным международным биотехнологическим компаниям, инвестирующим большие средства в изучение молекулярно-генетических основ данного процесса. В настоящее время существует ряд факторов, сильно ограничивающих возможности генетической трансформации этой культуры. Прежде всего, регенерация и трансформация *Taraxacum kok-saghys* является в

значительной степени генотип-зависимым процессом. В предыдущей работе из корневых эксплантов кок-сагыза была разработана эффективная система регенерации растений *in vitro* для дальнейшей генетической трансформации. В ходе этапа 2020 г. мы показали, что можно получить трансгенные растения *Taraxacum kok-saghyz,* устойчивые к гербициду, посредством генетической трансформации. Предполагаемые трансгенные проростки, полученные в течение 10 недель, были устойчивы к гербициду и экспрессировали маркерный ген *uidA*. Побеги укоренялись на питательной среде и развивали мощные корни. Это важно для исследовательских работ, связанных с увеличением выхода НК у этого растения, так как включение гербицид-устойчивых *Taraxacum kok-saghyz* растений в селекционный процесс приведет к созданию гербицид-устойчивых сортов и гибридов и увеличит конкурентоспособность этой культуры в агроценозе.

В дальнейшем будет проведено микроклональное размножение полученных модифицированных растений кок-сагыза и исследование устойчивости в полевых условиях, а также улучшение их продуктивности НК методами генной инженерии.

Поданы в печать следующие работы:

1. Иванова А.С., **Вербицкая А.А., Гапоненко А.К.** Повышение продуктивности и улучшение агротехнических свойств растений кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz*) для производства натурального каучука // Каучук и резина. – 2021. (РИНЦ)

2. **Verbitskaya A.A.**, Ivanova A.S., Konkova N.G., **Gaponenko A.K.** Creation of a hi-frequency regeneration system of *Russian Taraxacum kok-saghyz* // IOP: Earth and Environmental Science. – 2021. (Scopus и Web of Science)

4.1.5 Список использованных источников

1 Krotkov G. A review of literature on *Taraxacum koksaghyz* Rod // The Botanical Review – 1945. – Vol. 11. – P. 417 - 461.

2 Гапоненко А.К., Вербицкая А.А., Гаврилова В.А., Таранов В.В., Шульга О.А. Улучшение продуктивности и качества натурального каучука у альтернативных гевее растений // Последние достижения: Сб. Мат. – М., 2018. - С. 34.

3 Иванова А.С., Вербицкая А.А., Гапоненко А.К.: Разработка методов микроклонального размножения и генетической трансформации кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) // Биология - наука 21 века: 23-я Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых: Сб. Мат. – М., 2019. - С. 434.

ПОДРАЗДЕЛ 4.2. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ РЯДА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

4.2.1 Введение

Rapeseed (*Brassica napus* subsp. *oleifera* (Moench) DC.) - вторая по значимости масличная культура в мире. Для России он представляет особый интерес, поскольку может возделываться в условиях умеренного климата с низкой суммой эффективных температур. В семенах современных сортов ярового рапса содержится 24–27% сырого протеина, что делает его также одной из основных кормовых культур. Рапс - природный аллополиплоид (2n=38), признаки которого обусловлены геномами двух родственных видов: *Brassica rapa* subsp. *oleifera* (DC.) Metzg. - геном A и *Brassica oleracea* subsp. *capitata* (L.) Metzg. - геном C. Эти два генома *Brassica* произошли от родственного *Arabidopsis* древнего предка [1].

Для индуцирования изменчивости у аллополиплоидных видов, в том числе и рапса, используют химический мутагенез. Этот метод, всесторонне изученный И.А. Рапопортом, получил широкое распространение в России [2]. И кроме прикладного значения – получения селекционного материала, химический мутагенез позволяет выявлять биохимические связи между различными морфологическими признаками, а также находить морфологические маркеры для выявления ценных по биохимическим особенностям форм уже на ранних этапах развития.

В результате обработки семян рапса сорта ‘Викрос’ были получены формы с различными изменениями морфологических признаков (всего 42 типа изменений). На основе этих форм была создана коллекция линий растений, в том числе с разноокрашенными семенами, желтовато-зелеными вегетативными органами и стручками без сизого налета и другими признаками. У одной из «безналетных» форм, и полученных на ее основе линий, было отмечено повышенное содержание белка и низкое – жира в семенах, что позволяет использовать их в качестве кормовой добавки.

Сизый восковой налет на побегах и листьях *B. napus*, разновидностей *Brassica oleracea L.* и *Arabidopsis thaliana* защищает растения от патогенов, насекомых, а также избыточного испарения и ультрафиолетового излучения [3-4]. Биосинтез кутикулярного воска запускается обычно в ответ на засуху, чтобы снизить потери воды. Химический состав воска может варьировать в зависимости от органа, стадии развития, физиологического состояния растения и условий окружающей среды [5-7]. Лигнин, с которым связана лигнификация – другой важный компонент клеточных стенок растений, основа которых представлена целлюлозой и гемицеллюлозой [8]. С накоплением и

структурой лигнина в клеточной стенке связаны высота и диаметр побегов растений, поскольку между морфологическими изменениями и модификациями состава вторичных клеточных стенок существует четкая корреляция. А это, в свою очередь, обусловливает устойчивость растений к полеганию и урожайность сельскохозяйственных культур [9].

Лигнин - это природный фенольный полимер с высокой молекулярной массой, сложным составом и структурой, который заполняет поры между полисахаридами, и на его долю приходится приблизительно 20% от общей массы вторичной клеточной стенки [10]. У двудольных растений ряд ферментативных реакций приводит к образованию монометилированных звеньев гваяцила (G) из кониферил-спиртов, и диметилированных звеньев сирингила (S) из синапилового спирта [11]. Большая часть мутаций в генах биосинтеза лигнина вызывает деформацию элементов сосудистой системы, что приводит к затрудненному поступлению питательных веществ в органы растения и, как результат, к замедлению и ухудшению их роста вплоть до карликовости [12-14]. С другой стороны, избыток лигнина в оболочках семян снижает питательную ценность кормов, поскольку затрудняет их переваривание. Кроме лигнина, отрицательно влияет на качество кормов синапин - эфир синапата холина, который ухудшает усвоение белка [15]. Синапин преобладает в семенах масличных культур семейства *Brassicaceae*, и в том числе, в семенах *B. napus* [16].

Цель настоящей работы - изучение морфологических признаков мутантных форм ярового рапса и поиск возможных взаимосвязей с ценными биохимическими особенностями: пониженным содержанием в семенах лигнина и синапина.

4.2.2 Материалы и методы

Работу проводили на Кропотовской биостанции ИБР РАН и в ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса». Использовали коллекцию мутантных форм и линий с измененными морфологическими и биохимическими признаками, созданную в 2010-2015г. на Кропотовской биостанции ИБР РАН.

Содержание общего азота определяли фотометрически с пересчетом на белок по коэффициенту 6,25 [17]. Содержание сырого протеина определяли методом Геннеберга–Штомана. Содержание лигнина, целлюлозы и геммицеллюлозы определяли по стандартной методике ВИК им. В.Р. Вильямса [17]. Фенилпропаноиды извлекали из размолотых семян 96%-ным C_2H_5OH подкисленным HCl (97:3). Пробы (2мкл) анализировали на хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100). Параметры детектирования: длина волны 330 нм; время сканирования 0,5 сек.; standart - sinapic acid (Sigma-Aldrich D7927).

Для статистической обработки данных использовали компьютерную программу Microsoft Office Excel 2007.

4.2.3 Результаты и обсуждение

4.2.3.1 Изучение морфологических и биохимических особенностей «блестящих» мутантных линий ярового рапса без сизого налета на вегетативных органах и стручках

Мутантные растения были выявлены в варианте с обработкой 0,2% EMS в потомстве M_2 одного растения. Изучение морфологических особенностей «блестящих» мутантных растений 8 линий показало, что кроме отсутствия сизого налета мутантные формы резко отличаются от растений дикого типа желтовато-зеленой окраской вегетативных органов и стручков (рисунок 4.2.1).

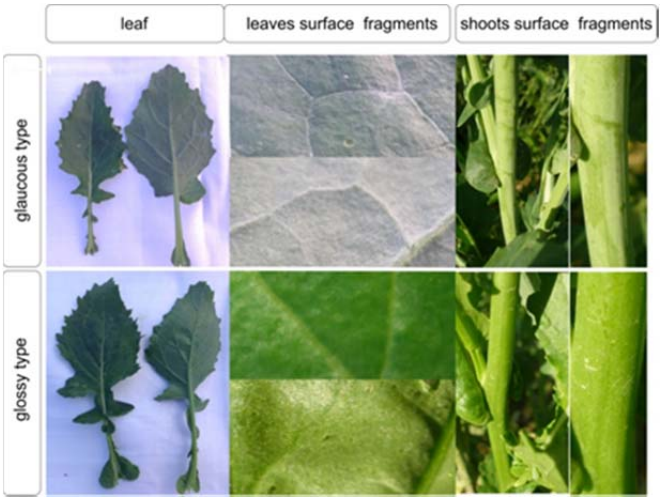

Рисунок 4.2.1 - Поверхность блестящих и сизых листьев и побегов мутантных растений линии №1169

Как показали наблюдения, количество блестящих растений зависит от условий развития сеянцев в период от прорастания семян до развития первых четырех настоящих листьев, при повышенной влажности выживаемость блестящих сеянцев выше.

Внешних признаков, которые позволили разделить сизые и блестящие формы по семенам, не наблюдалось. Однако у растений с восковым налетом семенная продуктивность выше (таблица 4.2.1).

Таблица 4.2.1 - Количественные признаки мутантных блестящих (Gs) и сизых (Gl) растений и дикого типа

№линии, форма	Высота, см	Диаметр, см	Число побегов, шт. порядок ветвления,		Длина стручка/ носика, см	Число семян/ стручок, шт.	Seed production, g /plant
			I	II; *III			

Дикий тип	93,9±4,3	28,3±5,1	4,5±0,8	6,3±0,5	7,3±0,4/ 0,9±0,2	25±3,8	20,9±1,7
1159 (Gs)	75,4±8,4	31,7±10,7	5,6±1,4	18,7±3,2; *10,1±0,6	5,4±0,5/ 0,8±0,2	13±2,1	3,6±1,0
1169 (Gs)	80,1±6,6	19,3±5,6	8,8±1,9	15,2±2,2 *13,5±2,0	6,2±0,5/ 0,8±0,1	21,8±3,3	3,9±1,0
1171(Gs)	85,7±9,1	37,9±9,1	6,8±1,7	16,3±2,5 12,4±3,5	6,0±0,9/ 0,9±0,3	20,0±5,0	6,7±1,9
1171 (Gl)	88,3±5,7	28,8±7,3	6,4±1,4	12,2±1,1; *2,6±0,7	7,4±0,5/ 1,1±0,4	25,2±3,1	11,6±3,5
1175 (Gl)	91,2±6,3	27,8±3,3	5,2±0,9	10,3±1,5 *6,2±1,4	7,5±0,5/ 1,0±0,3	24,6±2,2	14,6±2,4

В экстрактах семян растений дикого типа было обнаружено 25 фенилпропаноидных соединений, а в коричнево-красных семенах растений без сизого налета – 24 (рисунок 4.2.2).

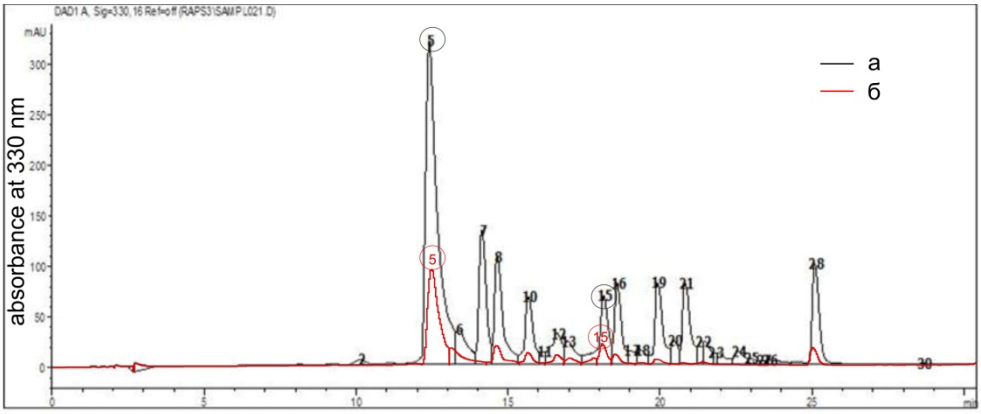

Рисунок 4.2.2 - HPLC – хроматограммы спиртовых экстрактов семян дикого типа (*а*) и красных семян растений без воскового налета, линия №1169 (*б*) Длина волны 330 нм; пики: 5– синапин, 15– синаповая кислота.

Изучение биохимических особенностей показало, что в семенах блестящих мутантных форм содержание лигнина ниже на 35%, а гемицеллюлозы на 40% выше, чем в семенах дикого типа, что вероятно «компенсирует» отсутствие лигнина. Содержание синапина в семенах блестящих растений в три раза ниже, чем в семенах дикого типа, что делает эти мутантные формы ценным источником для создания низкосинапиновых линий. Ранее было показано, что в семенах мутантов арабидопсиса может незначительно снизится количество минорных компонентов, коньюгатов синопата, но снижения в содержании синапина не наблюдается [16]. Это придает нашим «блестящим» мутантам большую практическую ценность. Отсутствие у них сизого налета сопровождается нарушением апикального доминирования и деформацией главного стебля. Отмечена устойчивость к растрескиванию стручков, «эластичность», уменьшение толщины створок

и оболочек семян, деформация семяножек и семян. Также отмечено низкое содержание в семенах триглицеридов в целом, и повышенное содержание стеариновой и пальмитиновой ЖК, предшественников длинноцепочечных ЖК - основы воска, что связано, с изменениями в синтезе жирных кислот у блестящих растений.

Таким образом, отсутствие сизого налета может служить маркерным признаком при отборе ценных низкосинапиновых форм для включения их в селекционные программы. В селекционных целях блестящие мутанты могут быть полезны для получения линий с пониженным содержанием в семенах антипитательных синапина и лигнина.

4.2.3.2. Сравнительное изучение содержания низкомолекулярных фенольных соединений и предшественников мономеров лигнина в светлых и темных семенах мутантных растений линий M_6-M_8 ярового рапса

Изучение жирнокислотного состава (ЖКС) мутантных линий рапса с антоциановыми побегами и стручками, отличающихся формой стручков, показало изменение ЖКС в масле их семян. Так, в нескольких линиях было обнаружено 2-15% вредной эруковой кислоты. Определение и использование сочетания признаков в качестве «маркера» на эруковую ЖК, позволит на ранних этапах развития (до начала цветения) выявлять и удалять такие формы. Это позволит предотвратить засорение безэруковых линий и сортов пищевого и кормового направлений, поскольку повышенное содержание эруковой ЖК – доминантный признак [18]. Для мутантных растений с измененной формой стручка и его расположением характерно антоциановая окраска побегов и самих стручков.

Изучение биохимических особенностей семян с тонкой (до 30 мкм) слаболигнифицированной оболочкой из линий, полученных в разных вариантах обработки, показало, что в них содержится в 2-3 раза больше сиреневой и розмариновой кислот, чем у дикого типа. Эти кислоты легко определяются органолептически. Признак сохраняется в ряду поколений, и его можно использовать в качестве маркера для отбора и светло-, и темно-семянных низколигниновых форм в потомствах M_2-M_4.

4.2.4 Заключение

Как показали исследования, выполненные на этапе 2020 г., различные морфологические признаки мутантных растений, такие как расположение побегов и стручков, желтоватая или пурпурная окраска вегетативных органов, отсутствие сизого налета или его усиленное образование, могут служить маркерами таких ценных

биохимических особенностей, как пониженное содержание антипитательных фенольных соединений, повышенного содержания белка или жира, устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам и других ценных свойств [19].

4.2.5 Список использованных источников

1 Rahman H., Singer S.D., Weselake R.J. Development of low-linolenic acid Brassica oleracea lines through seed mutagenesis and molecular characterization of mutants // Theor Appl Genet. 2013. V. 126. № 6. P. 1587-1598.

2 Рапопорт И.А. Химические мутагены в селекционных и генетических опытах // Эффективность химических мутагенов в селекции. М.: Наука, 1976. С.3-35.

3 Samuels L, Kunst L, Jetter R: Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells // Annu Rev Plant Biol. 2008. V. 59. P. 683-707.

4 Yeats T. H. and Rose J. K.C. The Formation and function of plant cuticles //Plant Physiology. 2013. V. 163. №1. P. 5-20.

5 Shepherd T, Wynne G. D. The effects of stress on plant cuticular waxes // New Phytol. 2006. V. 171. №3. P. 469–499.

6 Jetter R, Kunst L, Samuels A.L: Composition of plant cuticular waxes. In: Biology of the plant cuticle. Edited by Riederer M, Müller C. Oxford: Blackwell; 2006. P. 145–181.

7 Fernández V, Guzmán-Delgado P, Graça J. et al. Cuticle structure in relation to chemical composition: re-assessing the prevailing model //Front. Plant Sci. 2016. V.7. P. 427.

8 Zhong R., Ye Z.H. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis // Plant Sci. 2014. V. 229. P. 193–207.

9 Vanholme R., De Meester B., Ralph J., Boerjan W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism // Curr Opin Biotechnol. 2019. V.56. P. 230-239.

10 Yoon J, Choi H, An G. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development// J. Integr Plant Biol. 2015. V. 57. №11. P. 902–912.

11 Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure // Plant Physiol 2010. V.153. P. 895–905.

12 Barros J., Serk H., Granlund I. et al. The cell biology of lignification in higher plants // Annals of Botany. 2015. V. 115. P.1053–1074.

13 Kim J.I., Ciesielski P.N., Donohoe B.S. et al. Chemically induced conditional rescue of the reduced epidermal fluorescence8 mutant of Arabidopsis reveals rapid restoration of growth and selective turnover of secondary metabolite pools // Plant Physiol. 2014. V. 164. № 2. P. 584-95.

14 Ruel K., Berrio-Sierra J., Derikvand M.M. et al. Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in Arabidopsis thaliana // New Phytol. 2009. V. 184. №1. P. 99-113.

15 Hannoufa A., Pillai B. V. S., Chellamma S. Genetic enhancement of Brassica napus seed quality // Transgenic Res. 2014. V. 23. № 1. P. 39-52

16 Milkowski C., Strack D. Sinapate esters in brassicaceous plants: biochemistry, molecular biology, evolution and metabolic engineering // Planta. 2010. V.232. №1. P.19-35.

17 Косолапов В.М., Драганов Н.Ф., Чуйков В.А. и др. Методы анализа кормов, М. 2011, С. 177-187, 212с

18 Rahman M. H. Fatty acid composition of resynthesized Brassica napus and trigenomic Brassica void of genes for erucic acid in their A genomes // Plant Breed. 2002. V.121. №4. P. 357–359.

19 **Shirokova A.V.**, Volovik V.T., Zagoskina N.V., Zaitsev G.P., Khydyakova H.K., Korovina L.M., Krutius O.N., Nikolaeva T.N., **Simonova O.B.**, Alekseev A.A. Baranova E.N. From Dimness to Gloss – Characteristics of the spring rapeseed mutant form without glaucous bloom (Brassica napus L.) // Agronomy-Basel. – 2020. – Vol. 10. – Art. No 1563. DOI: 10.3390/agronomy10101563. - **Q1** – отчётная публикация.

РАЗДЕЛ 5. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И ПРОЦЕССЫ ОНТОГЕНЕЗА

5.1 ВВЕДЕНИЕ

Многие заболевания человека имеют в своей основе нарушение работы генов. Функционирование генома определяется его эпигенетической «программой», задаваемой посредством «кодирования» (модификации) гистонов нуклеосом. Структура нуклеосомы ограничивает доступность и динамику ДНК и репрессирует протекающие на ДНК процессы. Пока не вполне ясно, как «гистоновый код» «транслируется» в те или иные перестройки нуклеосом - активирующие или репрессирующие работу генов. По текущим представлениям, модификации гистонов не оказывают значительного влияния на структуру нуклеосом, а являются лишь специфическими «сигналами» для систем экспрессии генов [1]. Исследование регуляторной роли модификаций гистонов при экспрессии генов имеет ключевое значение для разработки методов диагностики и лечения генетических заболеваний, а также разработки методов направленной манипуляции активности генов для приложений генетической инженерии, создания трансгенных организмов, генетического редактирования.

Ранее нами было впервые показано, что убиквитилирование гистонов H2B по остаткам лизина K34 (H2BK34ub) и K120 (H2BK120ub) способно непосредственно перестраивать структуру нуклеосом, резко увеличивая структурную динамику нуклеосомы и способствует конверсии нуклеосом в функционально-активные интермедиаты – «гексасомы» (содержащие только один димер гистонов H2A-H2B).

Целью текущего этапа стало исследование влияния модификаций гистонов на структурно-функциональные характеристики хроматина. Задачей являлось исследование влияния убиквитилирования гистонов H2B по остаткам лизина K34/K120 на структуру и динамику нуклеосом в системе чистых компонент *in vitro*. Следует отметить, что это достаточно новая обширная область исследований, и полученные результаты являются лишь начальным попытками изучить принципы регулирования структуры и функций хроматина за счет «объемных» модификаций (‘bulky’ modifications) гистонов (рисунок 5.1).

5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался комплекс стандартных биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов, таких как реконструкция нуклеосом из рекомбинантных гистонов и ДНК, содержащей последовательности ДНК с повышенной

афинностью 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 [2-3]. 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 [2].

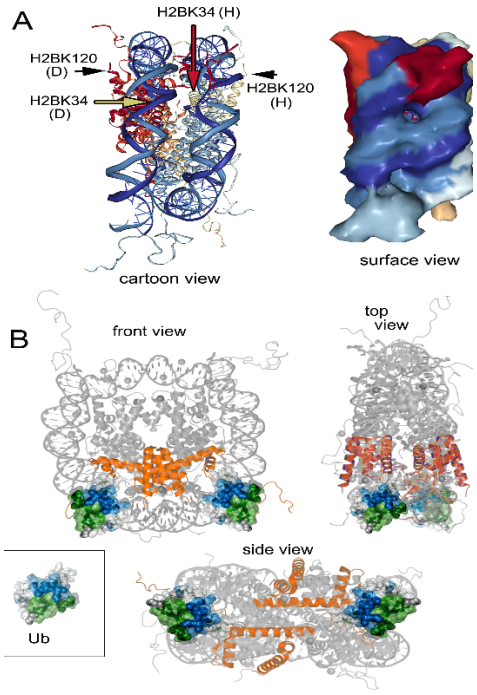

Рисунок 5.1 - A - Структура нуклеосомы (PDB ID: 1kx5), показывающая положения остатков лизинов K34 в составе гистона H2B. B - Схема, иллюстрирующая нуклеосому с молекулами убиквитина (PDB ID: 1ubq), прикрепленными по сайту гистона H2BK34

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы ранее показали, что дестабилизация нуклеосом за счет убиквитилирования гистонов H2B по лизину K34 (рисунок 5.1) в присутствии акцептора гистонов приводит, к диссоциации одного из нуклеосомных димеров H2A-H2B. Образующаяся «гексасомная» частица далее является стабильной. Мы изучили насколько дестабилизация H2BK34ub нуклеосом является их «базовым» (‘inherent’) свойством, и насколько генерирование гексасом определяется /индуцируется наличием акцептора гистонов. Это значимый

аспект, который может прояснить условия конверсии нуклеосом в более функционально-активные гексасомные частицы [4-8]. Мы показали, что H2BK34-убиквитилирование повышает также базовую динамику нуклеосом (и их диссоциацию до гексасом) вне зависимости от наличия акцепторов гистонов (рисунок 5.2) (которые хотя и значительно ускоряют диссоциацию нуклеосом).

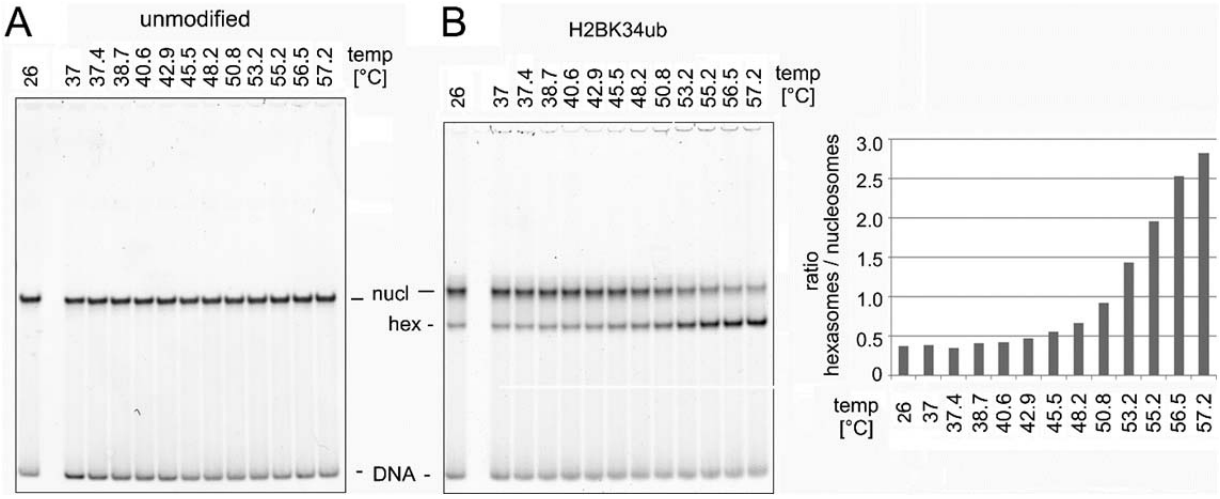

Рисунок 5.2 - Температурная зависимость стабильности реконструированных H2BK34ub нуклеосом

Немодифицированные (A) и H2BK34ub (B) нуклеосомы инкубировали 2 ч при указанных постоянных температурах; и затем анализировали в нативном ПАА геле. График (справа) иллюстрирует соотношения модифицированных нуклеосом и гексасом при разных температурах

Мы ранее показали, что акцептор/переносчик гистонов Nap1 способен вызывать диссоциацию одного из димеров гистонов H2A-H2B в H2BK34ub нуклеосомах, тем самым способствуя конверсии нуклеосом в гексасомы [2]. Однако *in vivo* Nap1 [9] участвует в процессах сборки нуклеосом, а также обмена димеров гистонов H2A-H2B в функционально-активных областях хроматина [2, 9]. Мы изучили, способны ли Nap1 обеспечивать не только частичную диссоциацию нуклеосом, но и встраивание димеров H2A-H2BK34ub в нуклеосомы. Это особенно актуально, учитывая, что H2BK34ub-специфичная E3 убиквитин лигаза Msl1/Msl2 способна специфически модифицировать димеры H2A-H2B только в составе нуклеосом [11]. Мы показали, что NAP1 способен поддерживать не только диссоциацию, но и сборку как асимметрично-, так и симметрично-модифицированных нуклеосом при «физиологических» ионных условиях *in vitro* (рисунок 5.3).

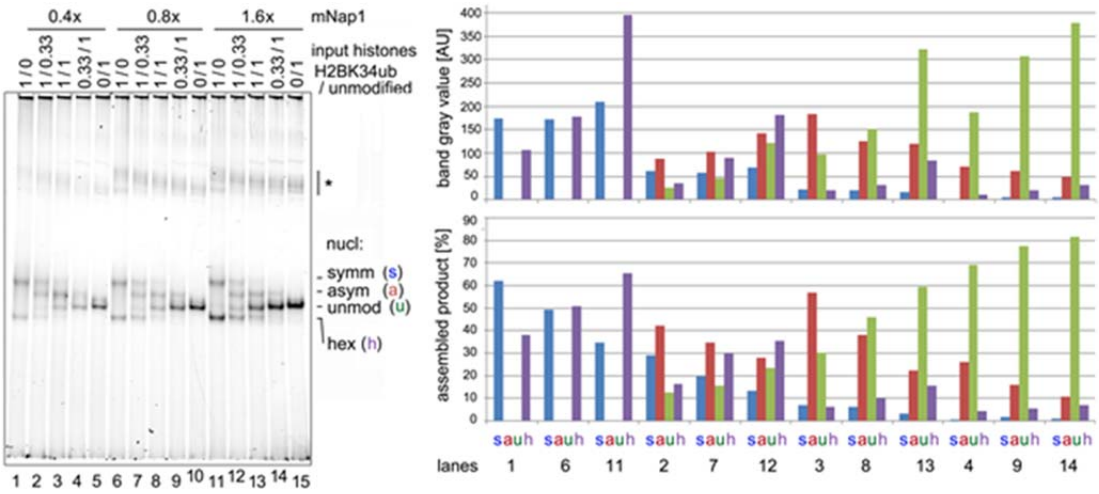

Рисунок 5.3 - Сборка симметрично и асимметрично убиквитилированных нуклеосом в присутствии Nap1

Нуклеосомы были реконструированы на 177 п.н. 601 ДНК с использованием модифицированных и немодифицированных гистонов и их смеси, как указано. Смесь гистонов и ДНК инкубировали в течение ночи при 25 ° C с указанным избытком Nap1 (молярный избыток к добавленным октамерам гистонов), а затем анализировали в нативном ПАА геле. Агрегаты ДНК и гистонов обозначены звездочкой.

Вышеизложенное дает основания предполагать, что димеры H2A-H2BK34ub способны участвовать в обмене гистонов в активных областях хроматина (рисунок 5.4).

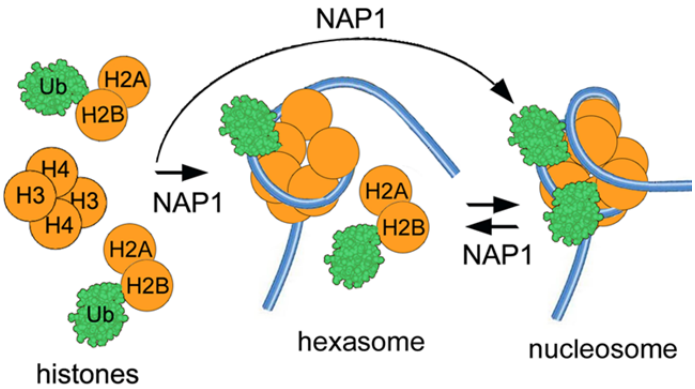

Рисунок 5.4 - Модификация H2BK34ub является важным регуляторным «сигналом» Возможность «встраивания» димеров H2A-H2BK34ub в нуклеосомы может играть роль при переносе и поддержании эпигенетического кода хроматина

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения этапа в 2020 г. мы провели исследование молекулярных механизмов повышенной динамики и лабильности H2Bub-нуклеосом, а также механизмов сборки-разборки модифицированных нуклеосом переносчиком гистонов шапероном NAP1.

Нами показано, что H2BK34ub (и, в меньшей степени H2BK120ub) оказывает значительное влияние на стабильность и динамику хроматина. Повышенная лабильность одного из димеров убиквитилированных нуклеосом является «базовым» (“intrinsic”) свойством убиквитилированных нуклеосом и, как таковая, не зависит полностью от присутствия акцепторов гстонов. Мы также показали, что NAP1 поддерживает сборку полностью и частично модифицированных нуклеосом при «физиологических» условиях *in vitro*. Это предполагает, что димеры H2A-H2BK34ub способны участвовать в обмене гистонов в активных областях хроматина. Способность NAP достаточно эффективно собирать H2BK34-убиквитилированные нуклеосомы предполагает потенциальный механизм внесения образом независимым от MOF-MSL (например, во время обмена димеров гистонов в ходе транскрипции).

Таким образом, модификации гистонов способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально- активных структур хроматина Предлагаемая нами концепция эпигенетического «структурного кода» активности хроматина более детально рассмотрена в опубликованной работе [12].

5.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Rothbart S.B., Strahl B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications // Biochim. Biophys. Acta - 2014. - Vol. 1839, P. 627-643.

2 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.

3 Krajewski W.A. Effects of DNA superhelical stress on stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes // J. Mol. Biol. - 2018. - Vol. 430, P. 5002-5014.

4 Armeev G.A., Gribkova A.K., Pospelova I., Komarova G.A., Shaytan A.K. Linking chromatin composition and structural dynamics at the nucleosome level // Curr. Opin. Struct. Biol - 2018. - Vol. 56, P. 46-55.

5 Wang H., Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage // Mol. Cell - 2006. - Vol. 22, P. 383-394.

6 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.

7 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.

8 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.

9 Chen X., D'Arcy S., Radebaugh C.A., Krzizike D.D., Giebler H.A., Huang L., Nyborg J.K., Luger K., Stargell L.A. Histone Chaperone Nap1 Is a Major Regulator of Histone H2A-H2B Dynamics at the Inducible GAL Locus // Mol. Cell Biol. - 2016. - Vol. 36, P. 1287-1296.

10 Kundu T.K., Wang Z., Roeder R.G. Human TFIIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity // Mol. Cell Biol. - 1999. - Vol. 19, P. 1605-1615.

11 Wu L., Zee B.M., Wang Y., Garcia B.A., Dou Y. The RING finger protein MSL2 in the MOF complex is an E3 ubiquitin ligase for H2B K34 and is involved in crosstalk with H3 K4 and K79 methylation // Mol. Cell - 2011. - Vol. 43, P. 132-144.

12 **Krajewski W.A.** The intrinsic stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes and their in vitro assembly/disassembly by histone chaperone NAP1//Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects. – 2020. – Vol. 1864(3). – Art. no 129497. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.129497. – **Q2** - отчётная публикация.

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

6.1 ВВЕДЕНИЕ

Брачное поведение является важным изолирующим механизмом, предотвращающим межвидовые скрещивания и поддерживающим целостность вида. Успешное ухаживание, заканчивающееся спариванием и появлением потомства, у *Drosophila* зависит от множества факторов. Например, самец и самка в ходе ритуала обмениваются различными сигналами: визуальными, тактильными, обонятельными, акустическими. Блокирование некоторых стимулов не приводит к полному прекращению брачного ритуала. Для *D. melanogaster* характерна относительно строгая последовательность поведенческих элементов в процессе ухаживания. Самым длительным из них является брачная песня самца, представляющая собой видоспецифический акустический сигнал, который самец генерирует, вибрируя отставленным в сторону крылом. Считается, что звуковая стимуляция нужна для усиления рецептивности самки и демонстрации готовности к спариванию. Однако стимулирующий эффект брачной песни не является критичным для распознавания партнера, поскольку бескрылые самцы и самцы с аномальной песней могут спариваться, хотя времени, необходимого для перехода к копуляции, нужно больше, по сравнению с контрольными самцами. Звуковой сигнал представляет собой воздушную волну, заставляющее вибрировать аристы, находящиеся на антеннах, которые превращают звуковую энергию в механический сигнал. Считается, что антенны служат в качестве рецепторов, инициирующих преобразование механического сигнала в электрохимический ответ в периферической нервной системе. Удаление антенн у самок приводит к снижению их рецептивности [1]. Самки с удаленными антеннами не способны различать нормальных и бескрылых самцов между собой [2].

За столетнюю историю генетики такого сложного признака, как репродуктивное поведение дрозофил исследователям удалось выявить порядка сотни генов, мутации в которых, влияя на множественные биологические процессы, воздействуют и на брачное поведение. Это гены, связанные с морфологией, определением пола, дофаминергической и серотонинергической системами, синтезом ферромонов, обучением и памятью, циркадным ритмом. В 2000 году у *D. melanogaster* был открыт новый ген *quick-to-court* (*qtc*), влияющий на половое поведение самцов. Впервые мутация в гене *qtc* была обнаружена в лабораторной линии с повышенной частотой ухаживания между самцами [3]. Еще одним проявлением мутации было ускорение процесса ухаживания самцов за

самками. Кроме того, есть данные об участии *qtc* в процессе узнавания самок с помощью хеморецепции [4]. Транскрипты *qtc* присутствуют в основном в голове мух как у самцов, так и у самок. Несмотря на это, мутации *qtc* приводят к изменениям только полового поведения самцов. Белок QTC был обнаружен в мембранной фракции головы [5]. Молекулярные функции белка QTC остаются до сих пор неизвестными. Чтобы понять, в каких биологических процессах участвует этот белок, мы получили делецию *qtc*, включающую полную последовательность этого гена [6]. Далее мы исследуем некоторые поведенческие особенности нового делеционного мутанта.

6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии дрозофил содержались на манно-дрожжевом корме при суточном цикле 12 ч света / 12 ч темноты и температуре 21±1°C. Имаго обездвиживали с помощью холода и сортировались по полу. Аристы у самок и самцов удаляли при помощи микрохирургических ножниц. Удаление арист производилось за 1-2 суток до постановки экспериментов. Обездвиживание холодом и оперативное вмешательство не оказали влияния на активность имаго. Тест начинался с внесения самца в пробирку с самкой. В случае начала ухаживания регистрировалось время вплоть до копуляции или до истечения 10 мин от начала теста. Такая продолжительность теста используется в исследованиях брачного поведения *D. melanogaster*. Данные были обработаны с помощью программ Microsoft Excel и Statistica. Частота копуляций сравнивалась с помощью точного критерия Фишера. В связи с тем, что исходные распределения длительности ухаживания и латентных периодов характеризовались правосторонней асимметрией, мы использовали логарифмическое преобразование ($y = \lg(x + 1)$) для их нормализации. Средние по латентным периодам и длительностям ухаживания сравнивали с помощью критерия Стьюдента. Для учета множественных сравнений использовался критерий Бенджамини-Хочберга.

6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

6.3.1 Изменение брачного поведения при частичной блокировке акустического канала

Для того, чтобы частично блокировать акустический канал, мы удаляли аристы у самцов и самок за 1-2 суток до постановки экспериментов. Далее мы формировали по 35 пары интактных самок и самцов с удаленными аристами или интактных самцов и самок с удаленными аристами (рисунок 6.1 A, B). Пары, у которых в течении 10 мин не начиналось ухаживание, в расчетах не учитывались. Мы фиксировали три показателя: латентное время (время от внесения самца к самке до начала ухаживания), длительность

ухаживания (время от начала ухаживания до наступления копуляции или истечения отведенного времени на тест) и число копуляций.

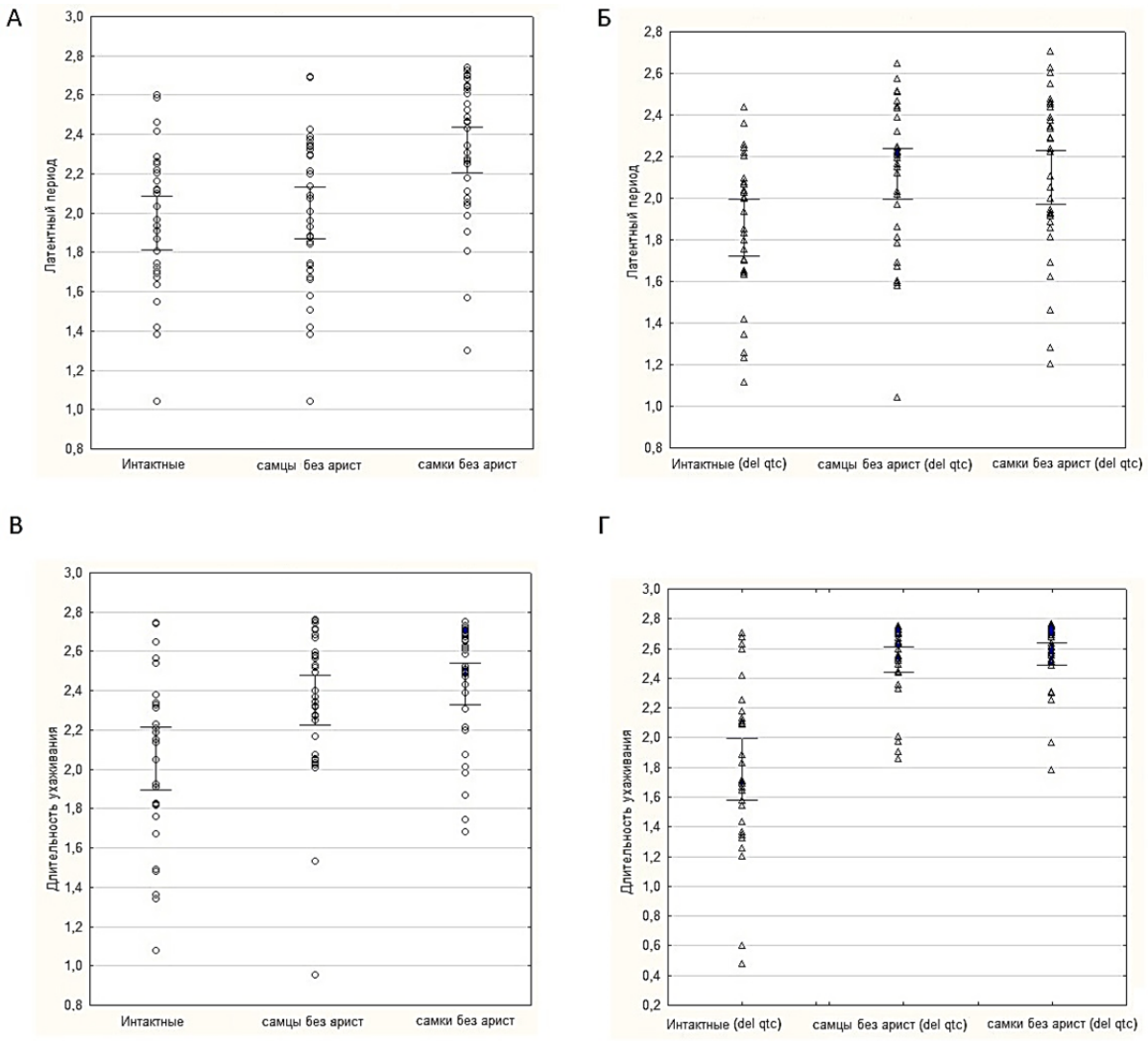

Рисунок 6.1 - Латентный период и длительность ухаживания
В скрещиваниях интактных самок и самцов с удаленными аристами (самцы без арист) или интактных самцов и самок с удаленными аристами (самки без арист) по сравнению с интактными. Трансформированные данные. Вертикальные линии представляют собой 95% доверительный интервал. А и В – контрольные мухи. Б и Г – мухи с делецией *qtc*.

Мы обнаружили значимое увеличение длительности ухаживания по сравнению с контрольными (интактными) мухами (критерий Стьюдента: p = 0,0042 для самцов без арист, p = 0,00011 для самок без арист). Латентный период увеличивался только при удалении арист у самок (критерий Стьюдента: p = 0,00009). Удаление арист как у самцов, так и у самок приводило к снижению числа пар, вступивших в копуляцию (таблица 6.1).

Присутствие арист у самок в большей степени влияло на частоту копуляции, чем у самцов (точный тест Фишера: $p = 0{,}00001$).

Таблица 6.1 - Количество мух, вступивших в копуляцию

Показатель	Интактные	♂ без арист	♀ без арист
Объём выборки	30	35	35
Вступившие в копуляцию	26 (86,7%)	20 (57,1%)	3 (8,6%)
P		0,0087	0,00001

Увеличение времени, необходимого для вступления в копуляцию и снижение частоты копуляций являлись показателем снижения успешности ухаживания. Известно, что длительность ухаживания возрастает при нарушениях или отсутствии брачной песни, видимо, из-за возникающих сложностей в определении брачного партнера. В нашем случае, также могли иметь место затруднения в определении брачного партнера из-за того, что самка с удаленными аристами не могла нормально воспринимать брачную песню самца. Таким образом, частичная блокировка акустического канала приводила к снижению успешности ухаживания, что выражалось в увеличении времени от начала теста до копуляции и снижении процента копуляции. Удаление арист у самок влияло на брачное поведение и процент копуляции сильнее, чем удаление арист у самцов.

6.3.2 Частичная блокировка акустического канала у мух с делецией *qtc*

Мутация *qtc* была впервые была описана, как ускоряющая процесс ухаживания [3]. Мы также обнаружили, что длительность ухаживания у интактных мух с делецией меньше, чем у интактных контрольных (рисунок 6.1). Далее мы повторили эксперимент по удалению арист с дрозофилами, несущими делецию *qtc* и обнаружили, что частичная блокировка акустического канала у них также приводит к увеличению времени, необходимого для наступления копуляции, а частота копуляций уменьшается. Но в отличие от контрольной линии, латентный период и длительность ухаживания (рисунок 6.1 Б, В) одинаково возрастала, как при удалении арист у самцов (критерий Стьюдента: $p = 0{,}00527$ и 0,00001 для латентного периода и длительности ухаживания соответственно), так и у самок ($p = 0{,}0107$ и 0,00004). Снижение процента копуляции (таблица 6.2) не зависело от того, у самцов или у самок удалялись аристы. Нормальное восприятие звука самкой у дрозофилы важнее для брачного ритуала, чем «слух» самца. Как правило, в паре *D. melanogaster* самец исполняет песню, в то время как самка принимает решение о

спаривании, основываясь на получаемых сигналах от ухаживающего самца и ее рецептивности. Мы наблюдали различные реакции на нарушение акустического канала у нормальных самцов и самок. У делеционных мутантов различия между полами отсутствовали: удаление арист у самцов и самок одинаково снижало частоту копуляций. Также, в отличие от контроля, удаление арист у самцов или самок с делецией одинаково влияло на латентный период и длительность ухаживания.

Таблица 6.2 - Количество мух с делецией *qtc*, вступивших в копуляцию

Показатель	Интактные	♂ без арист	♀ без арист
Объём выборки	30	35	35
Вступившие в копуляцию	27 (90,0%)	11 (31,4%)	7 (20,0%)
P		0,00001	0,00001

6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ген *qtc* экспрессируется как у самцов, так и у самок, различия в уровне транскрипции между полами невелики [3]. Известно 12 мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Мы наблюдали, что делеция *qtc* приводит к исчезновению некоторых поведенческих особенностей, характерных для самцов и самок [7]. Можно предположить, что у самцов и самок могут присутствовать разные сплайсварианты *qtc*, которые участвуют в формировании поведенческого полового диморфизма. Пока это остается предположением, поскольку нет данных о распределении изоформ белка QTC у самцов и самок, а также о молекулярных механизмах его действия.

6.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Mayr E. The role of the antennae in the mating behavior of female Drosophila // Evolution. - 1950. - V.4. - P. 149–154.

2 Bastock M.A. A gene mutation which changes a behavior pattern // Evolution. -1956. - V. 10. - P. 421–439.

3 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. - V. 154. - P. 1627–1637.

4 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. - 7:e30799.

5 Aradska J., Bulat T., Sialana F.J., Birner-Gruenberger R. et al. Gel-free mass spectrometry analysis of *Drosophila melanogaster* heads // Proteomics. - 2015. - V.15. - P. 3356—3360.

6 Кравчук О.И., Михайлов В.С., Савицкий М.Ю. Простой и эффективный метод получения направленных делеций в геноме дрозофилы // Генетика. - 2015. - Т. 51. - С. 1325–1329.

7 **Belkina E.G., Lazebny O.E., Kravchuk O.I.** The influence of *quick-to-court* gene on some aspects of mating behavior in *Drosophila melanogaster* // Russian Journal of Genetics. – 2020. – Vol. 56. – Is. 2. – P. 177-182. DOI: 10.1134/S1022795420020027. - **Q4 –** отчётная публикация

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

7.1 ВВЕДЕНИЕ

Хромосомные аберрации часто приводят к онкологическим заболеваниям. Молекулярно-генетические события на ранних стадиях рака до сих пор в значительной степени неизвестны, и в большинстве случаев отсутствуют надежные биомаркеры для раннего выявления заболевания [1]. Поскольку большинство онкологических заболеваний диагностируется на относительно продвинутой стадии, доступность ранних образцов раковой ткани для молекулярных анализов ограничена. Мы предложили разработать уникальную систему, которая будет не только имитировать связанные с раком хромосомные аберрации, такие как транслокация t(8;14) (лимфома Беркитта), делеция 3p21 (рак легких) и инактивация гена TP53 (рак яичников). Наша система также позволит выявить и выделить клетки, несущие хромосомные аберрации сразу после их появления. Последующий анализ таких клеток позволит исследовать ранние молекулярных механизмы, приводящие к раку.

7.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили с использованием стандартных методов молекулярной и клеточной биологии.

Наш подход основан на восстановлении химерного гена EGFP, две части которого размещены в разных местах в одной хромосоме (для изучения делеций) или на двух разных хромосомах (для изучения транслокаций). Эти искусственные "экзоны EGFP" примыкают к модифицированному бета-глобиновому интрону, несущему сайт узнавания дрожжевой рестриктазы I-SceI (рисунок 7.1A). После расщепления SceI и репарации ДНК при помощи NHEJ, химерный ген EGFP будет восстановлен, а белок EGFP будет экспрессироваться только в клетках с хромосомными аберрациями (рисунок 7.1 B).

7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами был разработан метод индукции хромосомных транслокаций при помощи программируемых нуклеаз [2-3].

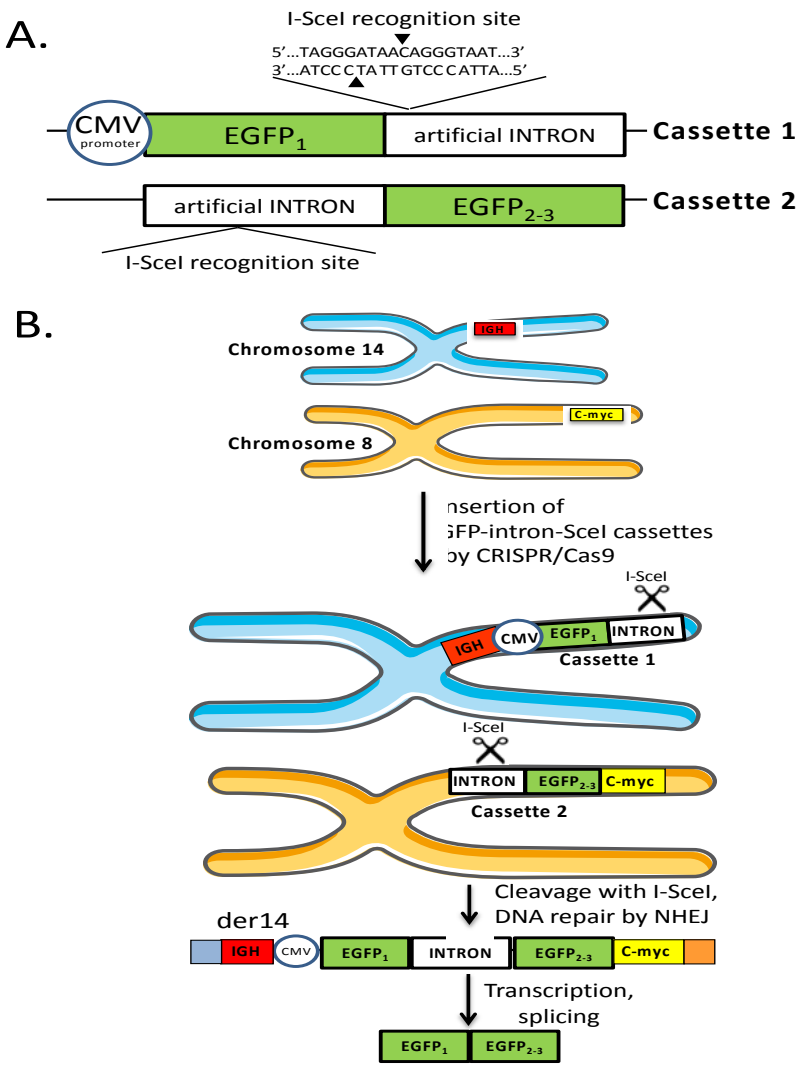

Рисунок 7.1 - Схема разработанной нами системы для раннего выявления хромосомных аберраций

А - Состав кассет, которые будут использоваться для вставки в геном человека. Последовательность EGFP разделена на две части. 5'-EGFP-1, примыкающий к CMV-промотору, кодируется кассетами 1, а 3'-EGFP-2 - кассетами 2. Части EGFP на обеих кассетах соседствуют с универсальным искусственным интроном с сайтом распознавания I-SceI.

В - Кассеты 1 и 2 будут вставлены в дистальную область гена IGH на хромосоме 14 и проксимальную область промотора гена MYC на хромосоме 8. Транслокация, вызванная эндонуклеазой I-SceI, воссоздает функциональный EGFP, который будет экспрессирован только в клетках, содержащих транслокацию.

На этапе 2020 г. мы создали две кассеты для репортеров EGFP на основе плазмиды, разработанной ранее для изучения сплайсинга мРНК [4], модифицировав эту систему таким образом, что кодирующая последовательность гена репортера EGFP разбивается на два искусственных "экзона" путем вставки искусственного интрона, содержащего сайт узнавания дрожжевой рестриктазой I-SceI, отсутствующий в геноме человека [5]. Каждая из этих кассет заклонирована в отдельных плазмидах. Первая кассета (1ASce) несет первый "экзон" гена

EGFP под контролем CMV-промотора и интрона с сайтом узнавания I-SceI. Вторая кассета (Sce23) содержит тот же интрон с I-SceI и второй "экзон" EGFP (рисунок 7.2).

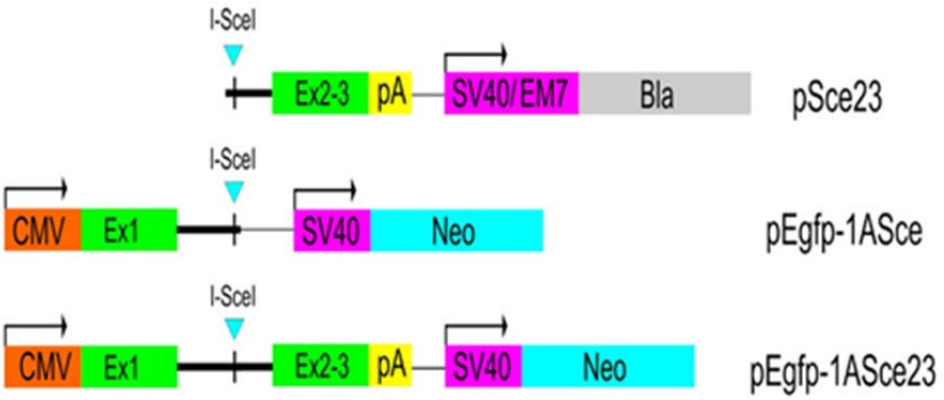

Рисунок 7.2 – Кассеты для валидации системы *in vitro* для раннего выявления хромосомных транслокаций

Промотор CMV обозначен оранжевым цветом, EGFP - зеленым цветом, сайт полиаденилирования - желтым цветом, промотор SV40 - пурпурным цветом, гены бластоцидина и неомицина - серым и голубым цветом коробками соответственно. Универсальный искусственный экзон обозначен жирной черной полосой.

Направленная интеграция кассет в соответствующие локусы на хромосомах 8 и 14 может вызвать при обработке дрожжевой рестриктазой I-SceI транслокацию (8;14), характерную для лимфомы Беркитта (рисунок 7.1 B).

7.3.1 Экспериментальная проверка системы генерации хромосомных транслокаций

Для проверки разработанного метода мы интегрировали кассеты 1ASce и Sce23 случайным образом в клетки HEK293. Был проведен отбор клеток, содержащих обе кассеты и при этом не экспрессирующих EGFP (за счет совместной интеграции обеих кассет в один сайт). Эти клетки были затем трансфецированы плазмидой, экспрессирующей I-Sce. Через 48 часов после экспрессии были детектированы зеленые клетки, экспрессирующие EGFP и свидетельствующие о возникновении хромосомных транслокаций или делеций в части клеток (рисунок 7.3). При трансфекции стабильных клонов содержащих только одну кассету (1ASce или Sce23) плазмидой, экспрессирующей I-Sce, EGFP не детектировался, как и ожидалось. Частота хромосомных транслокаций в нашей системе составляет примерно $3x10^{-4}$.

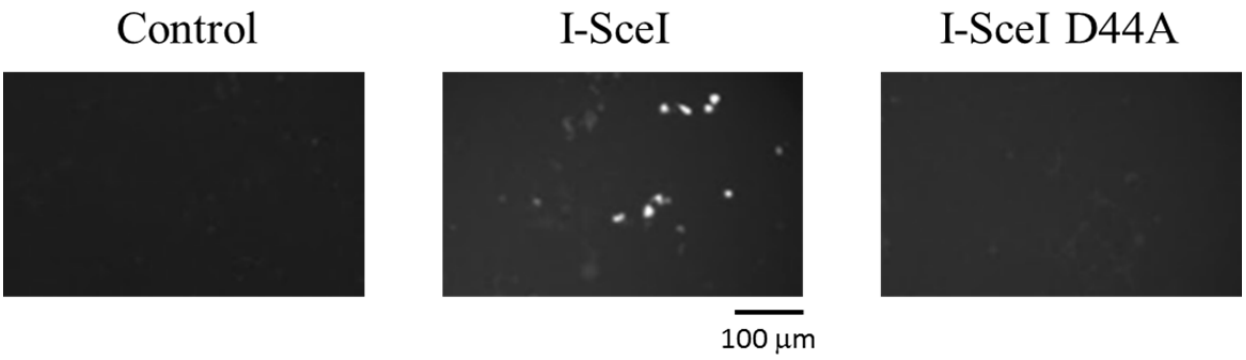

Рисунок 7.3 – Клетки HEK293 с индуцированными I-SceI транслокациями экспрессируют EGFP

Клетки HEK293 с плазмидами pEGFP-1ASce и pSce23, случайно интегрированными в различных хромосомных локациях. Трансформация клеток плазмидой, экспрессирующей I-SceI, приводит к хромосомным транслокациям в некоторых клетках, и восстановлению экспрессии функционального белка EGFP. Контрольные клетки подвергались трансфекции плазмидой, экспрессирующей каталитически неактивный I-SceI.

7.3.2 Конструкция плазмиды для целевой установки кассет для генерации t(8;14) транслокации, типичной для эндемической лимфомы Беркитта

Для моделирования транслокации t(8;14) специфичной для лимфомы Беркитта, нами были сконструированы плазмиды для целевой интеграции кассет 1ASce и pSce23 в локус *IGH* на хромосоме 14 и локус *MYC* на хромосоме 8 (рисунок 7.4).

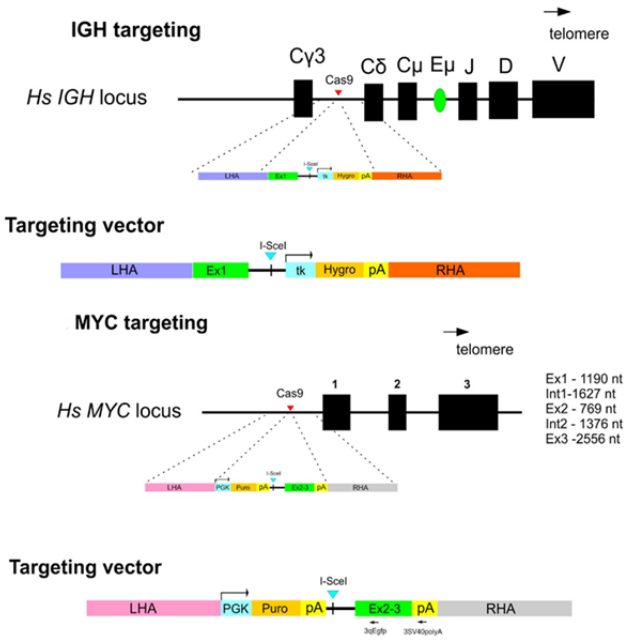

Рисунок 7.4 – Кассеты для интеграции конструкций *EGFP* в локусы *IGH* на хромосоме 14 и *MYC* на хромосоме 8

Кассета для интеграции в локус *IGH* содержит экзон *Egfp* (зеленый цвет), за которым следуют искусственный экзон с сайтом I-SceI (жирная линия с голубым треугольником), ген гигромицина (темно-желтый цвет) под контролем промотора тирозинкиназы (*tk*) (синий цвет); сайт полиаденилирования (pA) отмечен желтым цветом. Левая

гомологическая последовательность (LHA обозначена фиолетовым цветом, правая гомологическая последовательность (RHA) - оранжевым. В *MYC*-локусе планируется вставка второго экзона *Egfp.* Маркером селекции для кассеты *MYC* является пуромицин, который находится под контролем промотора *PGK*

7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2020 г. разработана система для генерации хромосомных аберраций. Клетки с EGFP, несущие транслокации или делеции, будут проанализированы с использованием single-cell RNA-seq, HiC и ChIP для определения ранних эффектов хромосомных аберраций на экспрессию генов и ядерную организацию. Наши данные также позволят выявить биомаркеры ранних стадий лимфомы Беркитта, рака легких и яичников. Далее мы проследим за их клональной эволюцией во время пассажей культивирования *in vivo* и *in vitro*, чтобы определить вторичные события, которые увеличивают онкогенный потенциал этих клеток. Знания о молекулярно-генетических событиях, связанных с ранними стадиями онкогенеза, полученные в результате этой работы, позволят разработать новые подходы для раннего выявления и лечения рака.

7.5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 **Karpukhina A., Vassetzky Y.** DUX4, a zygotic genome activator, is involved in oncogenesis and genetic diseases // Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Vol. 51. – Is. 3. – P. 176-182. DOI: 10.1134/S1062360420030078. (WoS) – **Q4** – отчетная публикация

2 Germini D., Saada, Y.B., Tsfasman, T., Osina, K., Robin, C.C., Lomov, N., Rubtsov, M., Sjakste, N., Lipinski, M., Vassetzky, Y. A One-step PCR-based assay to evaluate the efficiency and precision of genomic DNA-editing tools // Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 2017. – V.5. – P. 43–50.

3 Germini D., Tsfasman, T., Zakharova, V.V., Sjakste, N., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. A Comparison of Techniques to Evaluate the Effectiveness of Genome Editing // Trends Biotechnol. – 2018. - V.36. – P. 147–159.

4 Shepelev M.V., Tikhonov, M.V., Kalinichenko, S.V., and Korobko, I.V. Insertion of multiple artificial introns of universal design into cDNA during minigene construction assures correct transgene splicing // Mol. Biol. (Mosk.). – 2018. – V.*52.* – P. 501–507.

5 Canoy R.J., André F., Shmakova A., Wiels J., Lipinski M., **Vassetzky Y**., Germini D. Easy and robust electrotransfection protocol for efficient ectopic gene expression and genome editing in human B cells // Gene Therapy. – 2020. DOI: 10.1038/s41434-020-00194-x. – **Q1** – отчетная публикация.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи этапа 2020 г темы НИР решены полностью.

Основные результаты работы, полученные в 2020 году, затрагивали разные аспекты нестабильности генома, вызванные перестройками хромосом и связанными с ними патологиями развития.

Мы показали ключевую роль консервативного фактора базовой транскрипции Trf2 в индукции центрического слияния хромосом с образованием Робертсоновских транслокаций. Несмотря на то, что работа была проведена на дрозофиле, ее результаты демонстрируют возможные риски для людей, несущих слабые гипоморфные аллели *Trf2*, поскольку даже небольшое снижение его экспрессии в репродуктивных клетках может потенциально привести к патологическим генетически наследуемым синдромам человека (синдром Патау и синдром Дауна). Важным аспектом работы является первая демонстрация того, что Робертсоновские транслокации могут быть вызваны не только химическими мутагенами или радиацией, но также мутациями, дестабилизирующими компактную структуру хроматина прицентромерных регионов.

Упаковка хроматина зависит от структуры нуклеосом, в состав которых входят модифицированные гистоны. В 2020 г. мы провели исследование молекулярных механизмов повышенной динамики и лабильности модифицированных убиквитином H2Bub-нуклеосом, а также механизмов их сборки-разборки переносчиком гистонов шапероном NAP1. В результате была детализирована предлагаемая нами концепция эпигенетического «структурного кода» активности хроматина. Мы показали, что модификации гистонов способны самостоятельно (без дополнительных белковых комплексов) менять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально активных структур хроматина.

Хромосомные транслокации в соматических клетках часто сопровождают некоторые виды рака (лимфома Беркитта, рак легких и яичников). С целью моделирования этих онкозаболеваний в 2020 г. была разработана и опробована система для генерации хромосомных аберраций в культуре клеток человека. Наши данные также позволят выявить биомаркеры ранних стадий этих онкозаболеваний. Дальнейшее исследование клональной эволюции во время культивирования модифицированных клеток *in vivo* и *in vitro* позволят определить вторичные события, которые увеличивают онкогенный потенциал этих клеток. Знания о молекулярно-генетических событиях, связанных с ранними стадиями онкогенеза, полученные в результате этой работы, позволят разработать новые подходы для раннего выявления и лечения рака.

Изучение причин отсутствия активации ряда целевых генов AHR на фоне его активной, опосредованной токсичными лигандами экспрессии у взрослого организма установило ранее неизвестный механизм контроля их экспрессии, зависимый от эпигенетического статуса регуляторных областей. Это наблюдение подтвердило нашу гипотезу о формировании дифференциальной доступности AHR человека к целевым генам, зависимое от вида ткани, статуса клеток (делящиеся или в состоянии покоя) и стадии развития организма. Таким образом, был открыт новый механизм эпигенетического контроля экспрессии генов-мишеней AHR. Это открытие служит основанием для коррекции представлений о механизме активации целевых генов AHR, большинство из которых является онкогенами. Поскольку экзогенные лиганды AHR и ингибиторы эпигенетических модификаторов часто используются в качестве фармацевтических противоопухолевых препаратов, результаты нашей работы необходимо учитывать при разработке новых терапевтических схем лечения онкологических заболеваний. Полученные данные расширят представления об участии AHR человека в процессах регуляции развития и биодеградации токсических факторов.

Ряд полученных в 2020 г. результатов касался исследований функционирования нейрогенов, открытых нами ранее. Было показано, что продукт гена *tth* локализован в ядрах нейронов, но не в глиальных клетках, и находится в активном хроматине интерфазного ядра. Были получены данные о связи этого белка с гормональной регуляцией развития организма. Проводятся работы по созданию конструкций, экспрессирующих белок TTH, слитый с флуоресцентной меткой, для более детального анализа его тканеспецифической экспрессии. Другой ген *quick-to-court* (*qtc*) контролирует поведенческие реакции дрозофилы. Исследование брачного ритуала у дрозофил с делецией этого гена показало, что он принимает участие в формировании поведенческого полового диморфизма.

Отдельная серия работ проводилась в рамках раздела «Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений» на растениях-продуцентах натурального каучука (кок-сагыза) и растительного масла (рапс). В предыдущей работе была разработана эффективная система регенерации растений *Taraxacum kok-saghyz* (кок-сагыза) *in vitro* из корневых эксплантов для их дальнейшей генетической трансформации. В 2020 г. мы провели генетическую трансформацию и получили первые трансгенные растения, устойчивые к гербициду. Предполагаемые трансгенные проростки, полученные в течение 10 недель, были устойчивы к гербициду и экспрессировали маркерный ген *uidA*. Побеги укоренялись на питательной среде и развивали мощные корни. Это важно для исследовательских работ, связанных с увеличением выхода натурального каучука у этого

растения, так как включение гербицид-устойчивых растений *Taraxacum kok-saghyz* в селекционный процесс приведет к созданию гербицид-устойчивых сортов и гибридов и увеличит конкурентоспособность этой культуры в агроценозе.

Исследования, выполненные на этапе 2020 г. по исследованию морфологических особенностей сортов рапса, показали, что они могут служить маркерами его ценных биохимических особенностей. В результате были выявлены новые маркерные фенотипические признаки мутантных линий ярового рапса, облегчающие отбор ценных растений с низким содержанием лигнина и синапина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. **Akishina A.A., Kuvaeva E.E., Vorontsova Y.E., Simonova O.B.** NAP family histone chaperones: characterization and role in ontogenesis // Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. - Vol. 51. - No. 6. - P. 343–355. DOI: 10.1134/S1062360420060028. – **Q4**

2. **Belkina E. G., Lazebny O. E.1, Kravchuk O. I..** The Influence of quick-to-court Gene on Some Aspects of Mating Behavior in Drosophila melanogaster // Russian Journal of Genetics. – 2020.– Vol. 56. – Is. 2. – P. 177-182. DOI: 10.1134/S1022795420020027. - **Q4**

3. Canoy R.J., André F., Shmakova A., Wiels J., Lipinski M., **Vassetzky Y.,** Germini D. Easy and robust electrotransfection protocol for efficient ectopic gene expression and genome editing in human B cells // Gene Therapy. – 2020. DOI: 10.1038/s41434-020-00194-x. – **Q1**

4. **Cherezov R.O., Vorontsova J.E., Simonova O.B.** TBP-related Factor 2 as a trigger for Robertsonian translocations and speciation // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – Art. No 8871. DOI:10.3390/ijms21228871 - **Q1**

5. Funikov S., Rezvykh A., **Kulikova D.**, Zelentsova E., Protsenko L., Chuvakova L, Tyukmaeva V., Arkhipova I., Evgen'ev E. Adaptation of gene loci to heterochromatin in the course of Drosophila evolution is associated with insulator protein // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10(1). Art. no. 11893. DOI: 10.1038/s41598-020-68879-2 **- Q1**

6. **Karpukhina A., Vassetzky Y.** DUX4, a Zygotic Genome Activator, Is Involved in Oncogenesis and Genetic Diseases // Russian Journal of Developmental Biology. – 2020. – Vol. 51. – Is. 3. – P. 176-182. DOI: 10.1134/S1062360420030078. (WoS) – **Q4**

7. **Krajewski W.A.** The intrinsic stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes and their in vitro assembly/disassembly by histone chaperone NAP1 // Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects. – 2020. – Vol. 1864(3). – Art. no 129497. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.129497. – **Q2**.

8. **Shirokova A.V.**, Volovik V.T., Zagoskina N.V., Zaitsev G.P., Khydyakova H.K., Korovina L.M., Krutius O.N., Nikolaeva T.N., **Simonova O.B**., Alekseev A.A. Baranova E.N. From Dimness to Gloss – Characteristics of the Spring Rapeseed Mutant Form without Glaucous Bloom (Brassica napus L.)//Agronomy-Basel. – 2020. – Vol. 10. – Art. No 1563. DOI: 10.3390/agronomy10101563. – **Q1**

9. **Vorontsova Yu.E., Akishina A.A., Cherezov R.O.**, **Simonova O.B**. Functional activity of aryl hydrocarbon receptor in human osteosarcoma cell cultures//Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2020. - Vol. 75. – No 4. – P. 247–251. DOI: 10.3103/S0096392520040136. **- S**

10. Yurinskaya M.M., Krasnov G.S., **Kulikova D.A.**, Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Chuvakova L.N., Rezvykh A.P., Funikov S.Y., Morozov A.V., M. B. Evgen'ev. H2S counteracts proinflammatory effects of LPS through modulation of multiple pathways in human cells//Inflamm. Res. – 2020. - V. 69. - P. 481–495. DOI: 10.1007/s00011-020-01329-x. - **Q3**

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН «29» декабря 2020 г., протокол № 10.