

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

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

УДК 575.16

№ ИНГЗ 0108-2016-0002

№ НИОКТР АААА-А16-116120810084-4

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



«27» декабря 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТочНОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И МОРФОГЕНЕЗА
(заключительный отчет)

Руководитель темы д.б.н., г.н.с.

Б.А. Кузин

подпись, дата 27.12.2017

Руководитель темы д.б.н., зав. лаб.

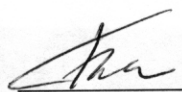
О.Б. Симонова

подпись, дата 27.12.2017

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, д-р биологических наук,
профессор

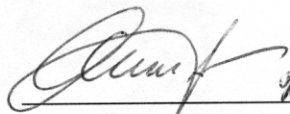


Б.А. Кузин (раздел 3)

подпись, дата

27.12.2017г.

Руководитель, д-р биологических наук



О.Б. Симонова (раздел 1)

подпись, дата

27.12.17

Исполнители:
Кандидат биол. наук




Д.А. Куликова (раздел 2)

подпись, дата

27.12.17

Доктор биол. наук, профессор




А.К. Гапоненко (раздел 4)

подпись, дата

27.12.17

Доктор биол. наук



В.А. Краевский (раздел 5)

подпись, дата

27.12.17

Кандидат биол. наук



О.И. Кравчук (раздел 6)

подпись, дата

27.12.17

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	4
Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Раздел 1. Особенности регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих морфогенетические процессы высших организмов	7
Раздел 2. Роль и значение транскрипционных факторов семейства <i>d4</i> в регуляции нейрогенеза.	14
Раздел 3. Интерференция генетических механизмов регуляции морфогенеза и биодegradации ксенобиотиков.	20
Раздел 4. Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений.	28
Раздел 5. Влияние убиквитилирования гистонов на динамику нуклеосом.	55
Раздел 6. Поиск новых генетических факторов, участвующих в детерминации пола насекомых	66
Раздел 7. Молекулярные механизмы заболеваний человека и разработка методов генной и клеточной терапии.	74
Заключение	79
Список работ, опубликованных по теме	80

РЕФЕРАТ

Отчет 81 с., 7 ч., 94 источника, 0 приложений.

Ключевые слова: МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ОБРАТНЫЕ ТРАНСКРИПТЫ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ, ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, СОРТА ПШЕНИЦЫ, ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ СТРЕСС, СЕЛЕКЦИЯ РАПСА, ПЕТУНЬЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У НАСЕКОМЫХ. *Drosophila melanogaster*, ХРОМАТИН, ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ, ТРАНСГЕННАЯ ПШЕНИЦА, МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ГИСТОНОВ, ДОМЕНЫ, ЭВОЛЮЦИОННО-КОНСЕРВАТИВНЫЕ ГЕНЫ.

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

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

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

В результате была охарактеризована новая система перекрывающихся генов (*lawc* и *Trf2*) с общей регуляторной областью. Получены предварительные результаты, показывающие значимость экспрессии генов семейства *d4* на этапе закладки нервной системы; разработана тест-система для выявления и изучения специфичности действия ксенобиотиков, включая фармакологические средства, способные активировать транскрипционный фактор человека - Арил Гидрокарбонный рецептор, получено более 30 трансгенных событий у продуктивных сортов российской яровой пшеницы сортов Злата и Эстер: введен ген транскрипционного фактора *OsGATA*, индуцируемый засолением, и продуктивных сортов российской озимой пшеницы Дея и Линия 1, введен ген *TaDREB3*, повышающий морозостойкость, под контролем холод индуцибельного промотора *pWRKY71*; проведены опыты с ингибиторами деубиквитираз и выяснен вопрос об относительном вкладе активности 26S и 20S протеасом в регуляцию протеома в клетках насекомых; получены новые данные о молекулярных механизмах перестройках структуры хроматина активных генов «ремоделирующими» комплексами ISWI (в модельной системе *in vitro*); изучено накопление лигнина в клетках побегов устойчивых к

полеганию линий рапса; проведено сортоиспытание 2 сорта ярового рапса, оценено наследование окраски цветка у мутантов М4 сальпиглоссиса; апробирован новый метод сайт-направленного мутагенеза у дрозофилы, основанного на репарации индуцированного двуцепочечного разрыва.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ:

м-РНК – матричная РНК,

РНК-а - РНК-активация

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

я-ДНК – ядерная ДНК,

TADs – Topologically Associated Domains,

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

LINE – Long Interspersed Repeat Sequences,

SINE – Short Interspersed Repeat Sequences,

LADs – Lamina Associated Domains,

scs/scs' – specialized chromatin structures,

FISH – Fluorescence in situ Hybridization.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ЖК – жирные кислоты

FAD2 - fatty acid desaturase 2

FAD3 - fatty acid desaturase 3

тпн – тысяча пар нуклеотидов,

Sxl – *Sex lethal*,

tra – *transformer*,

tra2 – *transformer 2*,

dsx – *doublesex*,

fru – *fruitless*,

м-РНК – матричная РНК,

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

МК - Морфогенный каллус

НМК - неморфогенный каллус

ВВЕДЕНИЕ

Работы связаны общей целью изучения Молекулярно-генетических механизмов регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза. В процессе реализации были изучены следующие следующие процессы:

Изучены новые особенности регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих морфогенетические процессы высших организмов; изучена роль новых нейроспецифических эволюционно-консервативных транскрипционных факторов семейства d4 в сигнальных путях, контролирующих морфогенез; получены новые данные раскрывающие эволюционно-морфогенетический потенциал стресс-индуцибельных систем; получены дополнительные сведения о молекулярно-генетических механизмах пролиферации и дифференцировки клеток в развитии и структурно-функциональной организации эукариотических хромосом.

Регуляция активности генов в процессе онтогенеза включала изучение исследование влияния перестроек хроматина на взаимодействие хроматина с SET доменами метилтрансфераз гистонов; влияния химических мутагенов на морфогенез ряда сельскохозяйственных (рапс) и декоративных (петунья) растений; влияние экспрессии генов Sxl-dsx каскада на детерминацию пола у *Drosophila melanogaster*.

РАЗДЕЛ 1

1.1 Особенности регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих морфогенетические процессы высших организмов.

Перекрывающиеся гены широко распространены среди разных групп организмов. Так, по некоторым оценкам у человека перекрываются 7,9% генов, у мыши – 8,2%, у дрозофилы - 26,2%. Среди них генов, перекрывающихся экзонами, – 26,3% (человек), 21,9% (мышь), 16,8% (дрозофила) [1-2]. Широкое распространение перекрывающихся генов среди разных групп организмов ставит несколько важных вопросов. Один из них - существуют ли цис-регуляторные взаимодействия (прямые или опосредованные) между транскриптами перекрывающихся генов? Ведь в случае прямого взаимодействия между смысловым и антисмысловым транскриптом должны возникать структуры днуцепочечных РНК, которые могут стать субстратом для РНК-интерференционной машины подавления (Dicer/Argonau) и под её воздействием подвергаться деградации с формированием эндогенных малых интерференционных РНК (miРНК).

Использование модельной системы на основе *Drosophila melanogaster* достаточно хорошо отлажено, причём возможность изучения функции генов различными способами – с помощью генетических и трансгенных методик, а также посредством РНК-опосредованной супрессии транскрипционной активности – сделала этот организм мощным биологическим инструментом для учёных. Известно, что у многих генов человека имеются соответствующие гомологии у дрозофилы. К таким генам относится и ген дрозофилы *Trf2*, который перекрывается с другим геном *lawc*. Систему этих генов мы используем в качестве модели для исследования особенностей регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих развитие. Ранее мы продемонстрировали *in vivo* и *in vitro*, что снижение экспрессии антисмысловых белок-кодирующих транскриптов *lawc* по пути РНК-интерференции меняет паттерн *lawc*-экспрессии в сторону формирования мощного пула новых мРНК, т.е. заставляет этот ген экспрессироваться сильнее, вызывая эффект, подобный явлению РНК-активации (РНК-а). РНК-а - процесс усиления экспрессии гена гомологичными промотеру или 3' области гена малыми РНК и длинными не кодирующими РНК (нкРНК). Открытый в 2006 году на культуре клеток человека [3], этот эффект является противоположным явлению РНК-интерференции (РНК-и). РНК-а может быть вызвана как экзогенными, так и эндогенными РНК, однако механизм этого явления полностью не изучен [4-5]. При этом количество публикаций, описывающих активирующее действие малых РНК на экспрессию целевого гена, растёт,

указывая на то, что изучение и понимание данного механизма имеет большую практическую и фундаментальную ценность. РНК-а активно пропагандируется для использования её в качестве инструмента для увеличения активности гена в терапевтических целях [6-8]. В основном все исследования РНК-а проводятся на культуре клеток млекопитающих. Тем не менее, РНК-а считается эволюционно консервативным процессом, однако, это явление не показано для плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, несмотря на то, что это один из самых удобных модельных объектов биологии.

Недавние исследования в клетках млекопитающих показали, что активировать экспрессию гена могут малые РНК комплементарные его промотору [3, 9]. Искусственно вводимые малые РНК подавляли длинную антисмысловую некодирующую РНК, супрессирующую транскрипцию смыслового гена, что приводило к его активации [10]. В нашем случае гиперактивация произошла в ответ на длинные дцРНК, вводимые для направленного подавления белок-кодирующих *lawc*-транскриптов. Поэтому **первой задачей** стала проверка, сохраняется ли эффект РНК-а в ответ на трансфекцию клеток S2 не длинными, а короткими (18-25 п.н.) РНК, полученными с помощью деградации соответствующих длинных дцРНК рибонуклеазой III типа (ShorCut RNase, NEB).

В культуре клеток млекопитающих было показано, что в транскрипционной модуляции генов малыми промоторными РНК, участвует белок семейства Argonaute - Ago2 (РНК-нуклеаза - один из ключевых белков РНК-интерференции), который связывается с некодирующими транскриптами, как в случае РНК-а, так и в случае РНК-и [11]. При этом эффект РНК-а в отличие от РНК-и происходит без участия белка Dicer - основного компонента РНК-и. Подобных исследований на дрозофиле не проводилось. Поэтому **следующей задачей** стало проведение экспериментов по активации гена *lawc* длинными дцРНК на фоне РНК-интерференционного подавления экспрессии генов семейства *Argonaute* и *Dicer* в культуре клеток S2 с последующей оценкой (методом ПЦР-РВ) уровня экспрессии *lawc*.

1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные методы и подходы в области молекулярного и генетического анализа не уступают мировому уровню. Основным методом при сравнительном исследовании уровня экспрессии анализируемых транскриптов была полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением геноспецифичных праймеров. Синтез зондов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Оценку эффекта длинных дцРНК, гомологичным разным районам гена *lawc*, на экспрессию этого

гена проводилась с использованием синтезированных *in vitro* длинных двухцепочечных РНК, которые трансфецировали в клетки S2 *Drosophila melanogaster*. Далее проводили экстракцию тотальной РНК и использовали её для последующей полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) или полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР-РВ). Эксперименты с клетками S2 проводили трижды. В качестве положительного контроля эффективности используемой методики РНК-интерференции в клетках дрозофилы была использована длинная дцРНК, гомологичная гену HP1 *Drosophilamelanogaster*[12]. В качестве отрицательного контроля использована длинная дцРНК, содержащая последовательности гена GFP и не имеющая значительной для данного эксперимента гомологии к мРНК дрозофилы. Также в качестве отрицательного контроля были использованы клетки без воздействия, в культуральную среду которых была добавлена вода в объеме равном объему вносимого водного раствора дцРНК.

РНК-интерференционное подавление генов семейства *Argonaute* и *Dicer* проводили с помощью трансфекции соответствующих длинных дцРНК в клетки S2. Снижение экспрессии соответствующих генов оценивали с помощью ПЦР-РВ. Также для выявления связи наблюдаемого эффекта активации с участниками пути РНК-интерференции был использован новый подход: мы трансфецировали клетки S2 короткими (18-25 п.н.) РНК, полученными с помощью деградации соответствующих длинных дцРНК рибонуклеазой III типа (ShorCut RNase, NEB).

1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение взаимодействия экспрессии перекрывающихся генов комплекса *lawc/Trf2* (рис. 1.1) показал, что ингибирование экспрессии обратных *lawc*-транскриптов по пути РНК-интерференции приводит к активации пула новых *lawc*-мРНК длиной 100-500 н., формирующихся в первом экзоне гена (рис. 1.2 В). Мы показали этот факт *in vitro* в культуре клеток, используя метод трансфекции дц-молекул РНК в цитоплазму клеток, и *in vivo*, используя трансгенных дрозофил, геном которых несёт конструкцию, экспрессирующую РНК-шпильку, направленную на посттрансляционное подавление экспрессии *lawc*.

Обнаруженный эффект был подобен эффекту РНК-активации, описанному у млекопитающих и нематоды. Этот эффект наблюдали при трансфекции клеток не длинными, а короткими двухцепочечными (дц) РНК. Мы предположили, что в наших экспериментах длинные дцРНК, подвергаются деградации до малых siРНК по пути РНК-интерференции, и уже эти короткие РНК способны активировать *lawc*-экспрессию.

Поэтому первой нашей задачей стала проверка, сохраняется ли эффект РНК-а в ответ на трансфекцию клеток S2 дрозифилы не длинными, а короткими (18-25 п.н.) РНК, полученными с помощью деградации соответствующих длинных активирующих дцРНК рибонуклеазой III типа (ShorCut RNase, NEB).



Рисунок 1.1 - Структурная организация *lawc* и *Trf2*. Прямоугольниками обозначены экзоны, чёрным выделены районы, кодирующие белок, зеленым выделена зона перекрытия транскриптов *lawc* и *Trf2*, +1 – сайт старта транскрипции. Бордовым обозначены районы, с которых синтезировали двухцепочечную РНК (дцРНК) *in vitro* в экспериментах по РНК-интерференции в культуре клеток дрозифилы. Красные стрелки - направление транскрипции двух генов. Треугольником обозначена инсерция Р-элемента, вызвавшая мутацию *lawc*^{P1}.

Результаты представлены на рисунке 2.2. Видно, что при трансфекции клеток как длинными, так и короткими дцРНК, гомологичными белок-кодирующему району *lawc*, происходит гиперактивация его экспрессии. Это говорит о том, что длинные дцРНК, очевидно подвергаются деградации ключевыми белками РНК-интерференции, которые индуцируют активацию *lawc*.

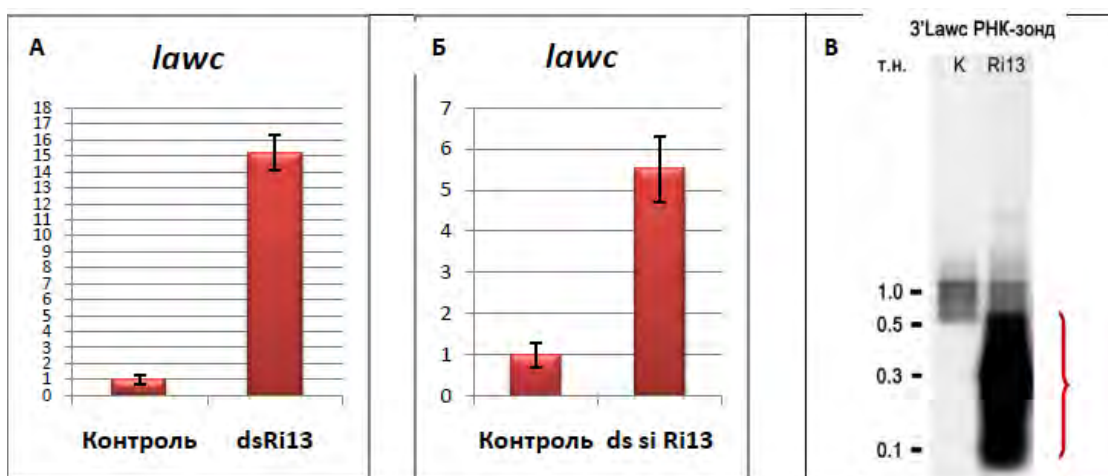


Рисунок 1.2 - Активация пула мРНК гена *lawc* при попытке ингибирования его белок-кодирующих транскриптов по пути РНК-интерференции в культуре клеток.

А – относительный уровень экспрессии обратных *lawc*-транскриптов при введении дцРНК, гомологичной транслируемой зоне *Ri13/dslawc* на рис. 1.1 (*dsRi13*), или *GFP* (контроль). **Б** – относительный уровень экспрессии обратных *lawc*-транскриптов с использованием синтезированных *in vitro* дц-молекул РНК, гомологичных транслируемой зоне *lawc* (*ds si Ri13*) или *GFP* (Контроль). В обоих случаях (А и Б) ПЦР-РВ проводили с применением геноспецифичных праймеров из транслируемого района гена. **В** - Нозерн-блот гибридизация полиА+РНК, выделенной из культуры клеток до (К - контроль) и после (*Ri13*) введения фрагментов двухцепочечной РНК, гомологичной транслируемой зоне *lawc*, с рибо-пробой к 3'*lawc*. Красной скобкой обозначена гиперэкспрессия новых *lawc*-транскриптов.

Ключевыми молекулами, необходимыми для созревания коротких РНК, являются белки семейства Argonaute (Ago) [13]. Белки семейства Ago можно считать эволюционно консервативными, представители данного семейства обнаружены даже у прокариот. У эукариотических организмов, например, у дрозофилы механизмы РНК-интерференции очень сложны и имеют множество специфических особенностей в зависимости от рассматриваемого класса коротких РНК [14-15]. У дрозофилы miРНК и siРНК пути разобщены и регулируются специфическими белками. Так, в образовании и функционировании miРНК участвуют белки Dicer1 и Ago1, тогда как Dicer2 и Ago2 вовлечены в функционирование siРНК [16, 17]. У млекопитающих только один белок Dicer отвечает за процессинг обоих классов коротких РНК [18]. Следующая серия экспериментов была поставлена с целью ответить на вопрос, участвуют ли основные белки РНК-интерференции (семейство Ago и белок Dicer) в активации гена *lawc*. Мы провели активацию гена *lawc* длинными дцРНК, но на фоне РНК-интерференционного подавления экспрессии генов *Argonaute1*, *Argonaute2* и *Dicer* в культуре клеток S2 с последующей оценкой (методом ПЦР-РВ) уровня экспрессии *lawc*. Результаты представлены на рисунке 1.3. Оказалось, что подавление *Ago1* и *Dicer* не влияло на эффект РНК-а гена *lawc* (Рис 1.3, Б-В), однако подавление *Ago2* снизило активацию *lawc* примерно в 2 раза (Рис. 1.3, А).

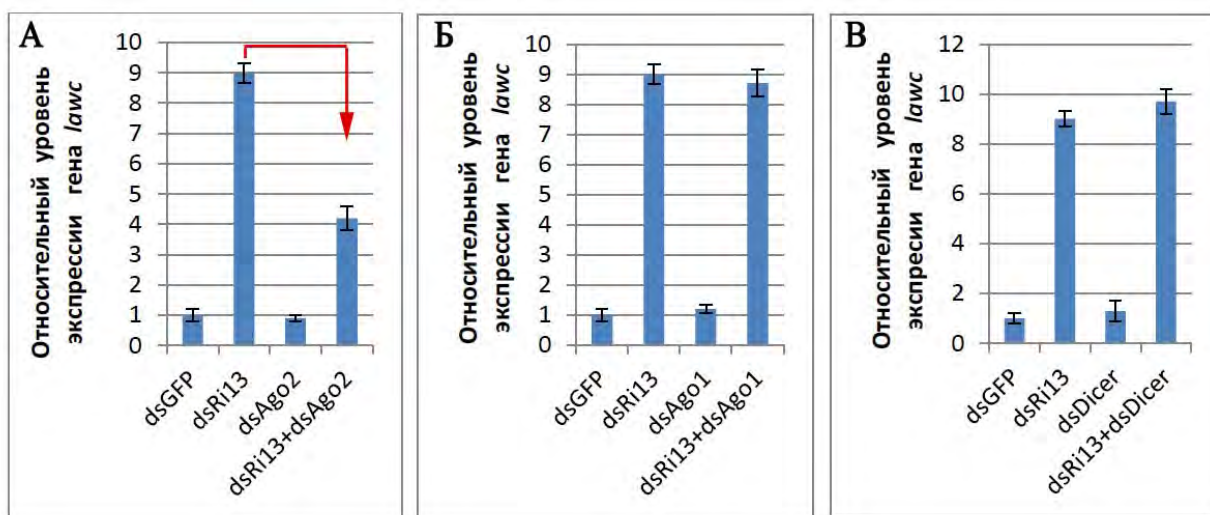


Рисунок 1.3 - Относительный уровень экспрессии обратных *lawc*-транскриптов при подавлении генов *Ago2* (А), *Ago1* (Б) и *Dicer* (В).

А. На оси абсцисс указаны используемые дцРНК: "dsGFP"- гомологичная GFP (контроль), "dsRi13" - гомологичная транскрибируемой зоне *lawc*, "dsAgo2" - гомологичная транскрибируемой зоне *Ago2*, "dsRi13+dsAgo2" - гомологичная *lawc* и *Ago2*. **Б.** На оси абсцисс указаны используемые дцРНК: "dsGFP"- гомологичная GFP (контроль), "dsRi13" - гомологичная транскрибируемой зоне *lawc*, "dsAgo1" - гомологичная транскрибируемой зоне *Ago1*, "dsRi13+dsAgo1" - гомологичная *lawc* и *Ago1*. **В.** На оси абсцисс указаны используемые дцРНК: "dsGFP"- гомологичная GFP (контроль), "dsRi13" - гомологичная транскрибируемой зоне *lawc*, "dsDicer" - гомологичная транскрибируемой зоне *Dicer*, "dsRi13+dsDicer" - гомологичная *lawc* и *Dicer*. Видно, что только в случае с подавлением *Ago2* (А) снижается эффект РНК-активации *lawc* (красная стрелка).

Ago2 - РНК-нуклеаза - один из ключевых белков РНК-интерференции который связывается с некодирующими транскриптами, как в случае РНК-и, так и в случае РНК-а, [11]. На культуре клеток млекопитающих было показано, что именно этот белок участвует в транскрипционной модуляции генов малыми промоторными РНК. При этом эффект РНК-а в отличие от РНК-и происходит без участия белка *Dicer* - основного компонента РНК-и. Мы впервые показали, что у дрозофилы эффект РНК-а может проходить подобным образом, без участия *Dicer* и *Ago1*, однако не в промоторной, а в белок-кодирующей области гена. Дальнейшие эксперименты будут направлены на поиск скрытых регуляторных элементов (энхансеров и промоторов), расположенных в кодирующей области гена *lawc*.

1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом году мы исследовали эффект активации гена *lawc* длинными дцРНК, открытый нами у дрозофилы [19]. Мы преследовали цель выяснить, насколько механизм этого эффекта эволюционно консервативен. Подобный эффект, названный РНК-активация, был показан только для млекопитающих и нематоды. Мы показали, что у дрозофилы, как и у других организмов, активация *lawc* происходит при трансфекции клеток не только длинными, то также и короткими дцРНК. Так как ключевыми белками созревания коротких дцРНК являются белки семейства Ago, мы провели эксперименты по РНК-а гена *lawc* на фоне РНК-и-опосредованной деплеции этих генов в культуре клеток. Оказалось, что, как и у других организмов, в отличие от РНК-и, эффект РНК-а гена *lawc* у дрозофилы зависит только от белка Ago2 и не зависит от Ago1 и Dicer. Таким образом, мы показали эволюционный консерватизм РНК-а, вызываемый длинными и короткими дцРНК. Единственное отличие состоит в том, что у млекопитающих эффект РНК-а индуцируется некодирующими РНК, гомологичными промотеру или 3' области гена, а в нашем случае активирующие дцРНК были гомологичны кодирующей области гена. Мы предположили, что повышение уровня экспрессии гена *lawc* происходит за счет активации скрытого регуляторного элемента, локализуемого в открытой рамке считывания. Поскольку гены *lawc* и *Trf2* перекрываются, активация экспрессии антисмысловых *lawc*-транскриптов может нарушать экспрессию противоположно направленных (смысловых) транскриптов *Trf2*. Чтобы сбалансировать работу противоположно направленных генов в ходе эволюции вполне мог сложиться механизм, направленный на подавление экспрессии антисмысловых *lawc*-транскриптов через супрессию их промотора. Поэтому поиск скрытых регуляторных элементов гена *lawc* будет нашей следующей задачей.

1.5 ССЫЛКИ

1. Zhang Y., Liu X. S., Liu Q.-R. et al. // Nucleic Acids Res. - 2006. - V. 34. - P. 3465–3475.
2. Solda G., Suyama M., Pelucchi P. et al. // BMC Genomics. - 2008. - V. 9. - Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/174>
3. Li L.-C., Okino S.T., Zhao H. et al. // Proc. Natl Acad. Sci. - 2006. - V. 103. - P. 17337–17342.
4. Portnoy V., Huang V., Place R.F. et al. // WIREs RNA. - 2011. - V. 2. - P. 748-760.
5. Zheng J., Yu F., Dong P. et al. // Oncotarget. - 2016. - V. 7. - P. 62886-62897.
6. Wang J., Place R.F., Portnoy V. et al. // Journal of biological methods. - 2015. - V. 2. e14.
7. Place R.F., Wang J., Noonan E.J. et al. // Mol. Ther. Nucleic Acids. - 2012. V. 1. e15.

8. Zhao X.Y., Voutilainen J., Habib N.A. et al. //In:Nakao K,Minato N,Uemoto S,eds.Innovative Medicine: Japan: Springer. 2015. - P. 241-249.
9. Janowski B.A., Younger S.T., Hardy D.B. et al. // Nat. Chem. Biol. - 2007. - V. 3. - P. 166–173.
10. Morris K.V. // Oligonucleotides. - 2009. - V. 19. - P. 299–305.
11. Chu Y., Yue X., Scott T. Y. et al. // Nucleic Acids Research. - 2010. - V. 38. - P. 7736-7748.
12. Schwaiger M., Kohler H., Oakeley E.J. et al. // Genome Research. - 2010. - V. 20. - P.771-780.
13. Meister G. // Nat. Rev. Genet. - 2013. - V. 14. - P. 447-459.
14. Kim V.N., Han J. & Siomi M. C. // Nature. - 2009. - V. 10. - P. 126-139.
15. Siomi M.C., Sato K., Pezic D. et al. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. -2011. - V. 12. - P. 246–258.
16. Lee Y., Kim M., Han J. et al. // The EMBO Journal. - 2004. - V. 23. - P. 4051-4060.
17. Okamura et K., Ishizuka A., Siomi H.,al. // Genes Dev. - 2004. - V. 18. - P. 1655-1666.
18. Czech and Hannon // Nat Rev Genet. - 2011. V. - 12. - P.19-31.
19. Черезов П.О., Воронцова Ю.Е., Симонова О.Б.// Известия РАН. Сер. Биол. - 2013. - С. 133–137.

РАЗДЕЛ 2. Роль и значение транскрипционных факторов семейства *d4* в регуляции нейрогенеза

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Впервые два новых гена, имеющих существенную гомологию с представителями генов семейства *d4* позвоночных животных: *d4* дрозофилы, или *dd4* (*CG2682*) и *tth* (*CG12175*), ранее были обнаружены нами в геноме *D. melanogaster* [1,2]. Гены семейства *d4* отличаются сильным эволюционным консерватизмом. Они обнаружены у человека, крысы, мыши, цыпленка, лягушки *Xenopus laevis*, а также в геноме нематоды (*C. elegans*), насекомых (*D. melanogaster*), асцидии (*C. intestinalis*) и гидры (*H. magnipapillata*), и отсутствуют только у прокариот и у низших эукариот (дрожжей). Нами впервые была показана нейроспецифическая картина экспрессии генов семейства *d4* в эмбриональном периоде развития мыши и дрозофилы. У млекопитающих и птиц семейство генов *d4* представлено тремя генами: *neuro-d4*, *ubi-d4/Requiem* и *cer-d4* (в геномной базе данных *Dpf1*, *Dpf2*, *Dpf3* соответственно). Белки, кодируемые генами этого семейства, имеют общий план строения и высокую гомологию аминокислотных последовательностей структурных доменов. Они имеют в N-концевой области уникальный домен 2/3, который содержит сигнал ядерной локализации и, вероятно, необходим для проникновения белков

в ядро клетки. В центральной части белковой молекулы расположен домен, гомологичный известным ДНК-связывающим последовательностям цинковых пальцев Kruppel-типа и последовательность отрицательно заряженных аминокислот (предполагаемый активатор транскрипции). В С-концевой области находится еще один домен характерный для белков семейства D4, структура которого представляет собой расположенные друг за другом два «цинковые пальца» PHD-типа (double PHD fingers, DPF). Белки семейства D4 позвоночных входят в состав нейрональных SWI/SNF-подобных хроматин-ремоделирующих комплексов pBAF, которые специфичны для дифференцированных постмитотических нейронов [3]. Задача на 2017 год состояла в изучении картины экспрессии нейрогена *d4* дрозофилы, в том числе зависимой от альтернативных промоторов.

2.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие методы: (1) афинная хроматография для обогащения мРНК по специфическим последовательностям, характерным для альтернативных транскриптов гена *d4*; (2) гибридизация *in situ* для определения локализации альтернативных транскриптов; (3) генно-инженерные методы для создания конструкций, экспрессирующих флуоресцентные маркерные белки под контролем альтернативных промоторов.

2.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Альтернативный сплайсинг транскриптов является одной из характерных и важных особенностей нейроспецифических (*neuro-d4* и *Cer-d4*) членов семейства *d4*. Большинство вариантов сплайсинга не приводят к значительным изменениям в размерах мРНК, но влияют, иногда существенно, на структуру кодируемых белков. В 5'-области гена *neuro-d4* были идентифицированы три альтернативных первых экзона со своими внутренними стартом кодонами (экзоны 0, 1, 1'). Другие сплайс-варианты приводили к делециям «цинкового пальца» Крюппель-типа, части или всего домена D4, к изменениям размера петли в «цинковом пальце» и расстояния между доменами (рис. 2.1).

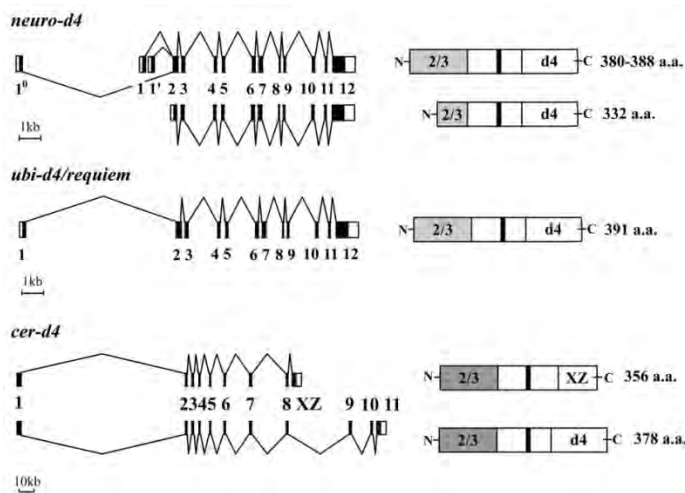
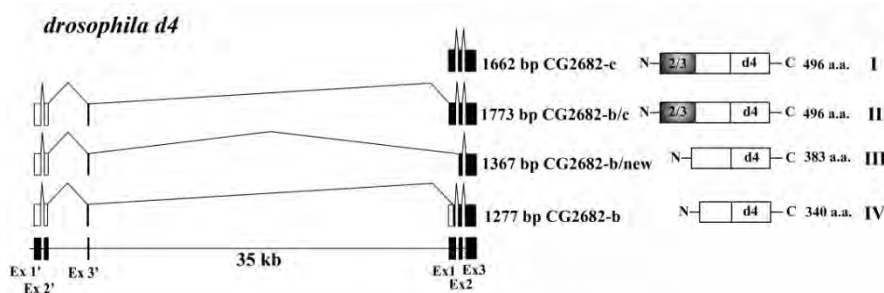


Рисунок 2.1 - Различные сплайс-варианты генов семейства *d4* мыши (*neuro-d4*, *ubi-d4/Requiem* и *cer-d4*).

Очевидно, что такие структурные изменения должны менять функциональные свойства белков, а процессы, их формирующие, должны быть результатом тонкой внутриклеточной регуляции. Следует отметить, что сплайс-варианты мРНК генов семейства *d4* у мыши были обнаружены впервые нами [4-5], в то время как альтернативные транскрипты других модельных животных в основном были внесены в нуклеотидную базу данных исследовательскими группами, занимавшимися реализацией соответствующих геномных проектов. При анализе нуклеотидной базы данных дрозофилы мы обнаружили 2 сплайс-варианта транскриптов гена *dd4* (варианты I, IV на рис. 2.2).



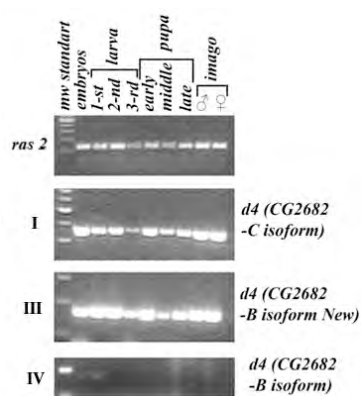


Рисунок 2.2 - Схема сплайсинга альтернативных транскриптов гена *dd4* дрозофилы и уровень экспрессии соответствующих мРНК. Слева прямой линией изображен локус гена *dd4*, черными прямоугольниками обозначены экзоны, некодирующие области изображены в виде незаполненных прямоугольников. Справа прямоугольниками обозначены белковые продукты соответствующих транскриптов I, II, III, IV. Обозначен *d4*-домен, серым цветом выделен 2/3-домен. Внизу RT-PCR РНК различных стадий развития дрозофилы со специфическими для каждого транскрипта праймерами.

С помощью быстрой амплификации концов кДНК (RACE) мы клонировали два новых сплайс-варианта мРНК гена *dd4*: варианты II и III на рисунке 2.2, транскрибирующихся с альтернативного «дальнего» промотора и кодирующие белки 496 а.к. и 383 а.к. соответственно. Данный факт свидетельствует о том, что в рамках геномных проектов не всегда удается установить точное количество альтернативных транскриптов генов, вследствие разного уровня их экспрессии. С помощью RT-PCR мы установили, что уровень экспрессии сплайс-вариантов на эмбриональной стадии развития дрозофилы соответствует формуле: CG2682-c > CG2682-b/new > CG2682-b/c > CG2682-b, причем вариант CG2682-b нигде, кроме эмбриональной стадии не экспрессируется. Таким образом, было показано, что мРНК гена *dd4* транскрибируется с двух альтернативных промоторов и имеет 4 сплайс-варианта, кодирующих белки различной длины. Было показано, что соотношение различных сплайс-вариантов мРНК гена *dd4* меняется в зависимости от стадии индивидуального развития дрозофилы.

С помощью гибридизации *in situ* были поставлены эксперименты по изучению картины экспрессии изоформ мРНК гена *dd4*, синтезирующихся с двух альтернативных промоторов. Полученные результаты не позволили выявить специфические области экспрессии для каждого промотора вследствие низкой чувствительности метода при

использовании небольших уникальных фрагментов РНК. Подбор условий для проведения экспериментов по исследованию тканеспецифической экспрессии изоформ мРНК гена *d4*, продолжается. Гибридизация *in situ* с пробой РНК, специфичной для всех изоформ мРНК гена *d4* показана на рисунке 2.3.

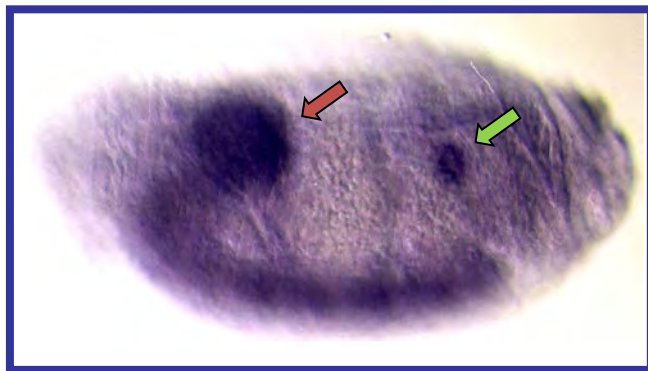


Рисунок 2.3 - Гибридизация *insitu* на целом эмбрионе *D. melanogaster* пробой РНК, специфичной для всех изоформ мРНК гена *d4*. Сигнал гибридизации выявляется в центральной нервной системе (мозг - красная стрелка) и гонадах (зелёная стрелка).

Для изучения картины экспрессии изоформ мРНК гена *d4*, синтезирующихся с двух альтернативных промоторов были созданы 2 конструкции. Конструкции были созданы на основе БАКмиды локуса *d4*, несущие дополнительные репортерные последовательности EGFP и RFP для экспрессии меченых белков D4 под контролем дальнего и ближнего промоторов (рис. 2.4). Для данной работы были использованы геномные клоны, способные встраиваться в сайт attP специальных линий дрозофил. Район встраивания не содержит энхансеров, способных повлиять на экспрессию исследуемых генов. Соответствующие клоны были получены из BACPAC Resources Center (<https://bacpacresources.org>) БАКмида attB-P(acman)-CamR BAC CH321-43B4 несет локус *d4* (35 kb) внутри геномного фрагмента 85 kb. Внесение мутаций и репортерных последовательностей в БАКмиды проводили согласно протоколу [6]. Модифицированные БАКмидные конструкции будут инъецированы в полярную плазму эмбрионов специальной линии дрозофил $u^1M\{vas-int.Dm\}ZH-2Aw^*$; $M\{3xP3-RFP.attP\}ZH-86Fb$, геном которых содержит сайт attP в районе 86Fb и рекомбиназу фага C31, способную интегрировать конструкции в данный район [7].

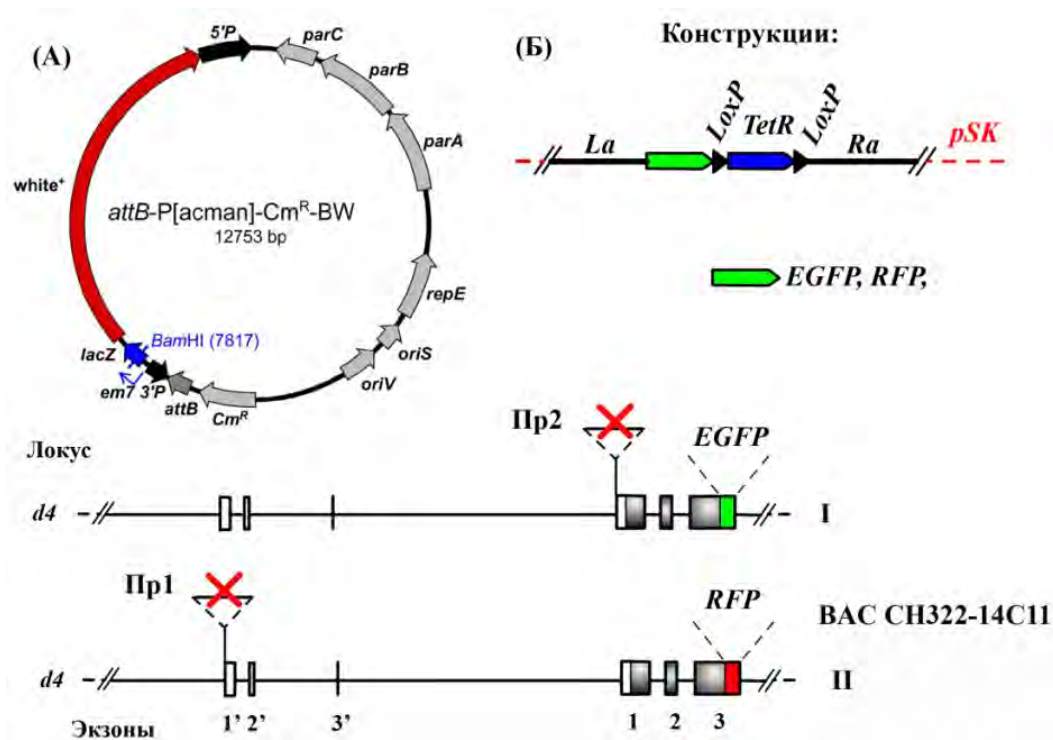


Рисунок 2.4 - Схема создания конструкций для экспрессии ТТН и D4, меченных флуоресцентными белками С-концевой последовательностью 3xFLAG.(А) вектор, в который заклонированы фрагменты геномной ДНК больших размеров; (Б) созданные конструкции для внесения модификаций в геномные фрагменты локусов *d4* и *tth*, заклонированные в БАКмиды (ВАС), с помощью высокоэффективной рекомбинации в штаммах *E.Coli*DY380. Ниже изображены полученные модификации соответствующих клонов *d4* (БАКмида attB-P(acman)-CamRBACCH321-43B4, несущая локус *d4* (35 kb) внутри геномного фрагмента 85 kb).

2.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью быстрой амплификации концов кДНК (RACE) были охарактеризованы два новых сплайс-варианта мРНК гена *d4*. Были обнаружены различия в уровне экспрессии транскриптов, синтезирующихся с альтернативных промоторов. Были созданы конструкции для изучения картины распределения белковых продуктов гена *d4*, зависимых от альтернативных промоторов.

2.5 ССЫЛКИ

1. *Nabirochkina E.N., Simonova O.B., Mertsalov, I.B. et al. // Mech Dev. – 2002. - V. 114. – P. 119-123.*
2. *Simonova O.B., Kulikova D.A., Mertsalov I.B. et al. // Genetika. – 2005. – V. 41 – P. 196-202.*
3. *Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A. et al. // Neuron. 2007. - V. 55. - P. 201-215.*
4. *Mertsalov I.B., Kulikova, D.A., Alimova-Kost, M.V. et al. // Mammalian Genome. – 2000. – V. 11. – P. 72-74.*
5. *Ninkina N.N., Mertsalov, I.B., Kulikova, D.A. et al. // Mamm Genome. – 2001. – V. 12. – P. 862-866.*
6. *Venken K.J., Kasprovicz J., Kuenen S. et al. //Nucleic Acids Res. - 2008. - V. 36. - e114.*
7. *Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al. // PNAS. - 2007. - V. 104. - P. 3312–3317.*

РАЗДЕЛ 3 Интерференция генетических механизмов регуляции морфогенеза и биodeградации ксенобиотиков

3.1 ВВЕДЕНИЕ

Поддержание гомеостаза, регуляция процессов детоксикации, деления клеток, их дифференцировки, поляризации и программируемой смерти, формирование органно-тканевых структур, нервной, иммунной, сердечно-сосудистой, эндокринной, генеративной и выделительных систем у высших многоклеточных организмов в большой степени зависит от активности Aryl hydrocarbon receptor (AHR) [1]. AhR является транскрипционным фактором, имеющим три функциональных домена, включая высоко-консервативный N-концевой (helix-loop-helix) HLH-домен, менее консервативный (Per/Arnt/Sim) PAS-домен и слабо-консервативный C-концевой домен [2]. Посттрансляционные этапы его активации включают пребывание его в цитоплазме в комплексе с chaperonins HSP90 (Heat Shock Protein 90) и XAP2/AIP (X-associated protein 2/AhR-interacting protein), связывание с лигандом, переход в ядро, диссоциация от HSP90, формирование гетеродимера с ARNT, Связывание со специфической последовательностью *Xenobiotic Response Elements (XREs -5'-GCGTG-3')*.

Расширение сферы вовлечённости AHR в регуляцию жизненно-важных процессов во многом происходило путём усложнения сигнального пути его активации и поддержания необходимого уровня его экспрессии в ходе эволюции. Важным элементом

сигнального пути активации АНР является связывание его с лигандом. У млекопитающих, включая человека, их роль способны выполнять соединения, как эндогенного так и экзогенного происхождения (ксенобиотики) [3, 4, 5, 6]. При этом у беспозвоночных, по-видимому, роль лигандов АНР выполняют агенты эндогенного происхождения [7, 8, 18]. Необходимо иметь в виду, что для организма важно, чтобы АНР работал в клетках, на нужном уровне. Для клетки, тканей и организма, в целом, пагубно, как повышенный, так и пониженный уровень экспрессии АНР. Как пониженный, так и повышенный уровни экспрессии АНР, довольно частые явления. Понижение уровня его экспрессии, часто сопутствует старению организма. К наиболее тяжёлым последствиям понижения уровня экспрессии АНР можно отнести повышение опасности возникновения онкологических заболеваний и неспособность организма к полноценной защите от токсического действия ксенобиотиков [14, 15]. Эктопическое повышение уровня экспрессии АНР вызывает нарушения развития, органогенеза, гистогенеза, нервной, иммунной, сердечно-сосудистой, эндокринной и генеративной систем. У позвоночных и человека причиной повышения уровня экспрессии АНР чаще всего бывает воздействие экзогенных лигандов агонистов. При этом по степени аффинности к АНР среди таких ксенобиотиков существует широкий полиморфизм [16]. По-видимому, степень аффинности лиганда определяет способности АНР активировать подконтрольные ему гены-мишени [17].

Многочисленные патологические процессы у человека, связаны с действием ксенобиотиков, обладающих лигандной активностью по отношению к АНР. Изучение таких механизмов сопряжено с неизбежной необходимостью контактировать с высокотоксичными веществами, что накладывает определённые ограничения на выполнение экспериментальных процедур. Чаще всего их выполняют на клеточных культурах, что ограничивает понимание последствий эктопической экспрессии АНР на процессы развития системных структур в условиях *in vivo*. Интерпретация влияния ксенобиотиков на развитие отдельных органов, *in vivo*, у позвоночных затруднена, так как в этих условиях они действуют на все без исключения клетки. При этом нарушается регулирующее взаимодействие между различными органами и тканями. В какой-то мере, эти ограничения можно преодолеть, используя гуманизированные линии *Drosophila*, геном которых трансформирован генными конструкциями, содержащими гены АНР млекопитающих [18]. В нашей работе мы воспользовались технологией генетической трансформации, для создания линии дрозофилы, трансформированной генной конструкцией, в которой ген АНР человека поставлен под индуцибельный контроль UAS последовательности, что позволяет активировать его при помощи GAL4-

тканеспецифических драйверов, в различных тканевых и органных системах дрозофилы [19]. То обстоятельство, что большинство ксенобиотиков, активирующих АНР человека, не способны активировать АНР дрозофилы, позволяет оценить специфичность их действия на целевые гены-мишени АНР человека в условиях *in vivo*, вводя их в кормовую среду дрозофилы. Вместе с тем активация АНР человека при помощи GAL4-тканеспецифических драйверов в различных тканевых и органных системах дрозофилы даёт возможность оценить компетенцию действия лигандов АНР человека в качестве факторов, регулирующих транскрипцию целевых генов АНР человека на различных стадиях развития организмов.

Индукции экспрессии АНР человека в условиях *in vivo*, в различных органо-тканевых структурах дрозофилы, на разных стадиях её развития, поможет выявить специфичность действия на него экзогенных лигандов. В совокупности полученные данные расширят представления об участии АНР человека в процессах регуляции развития и биодegradации токсических факторов.

3.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*.

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

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью микроинъекций в эмбрионы дрозофилы конструкции *pUAS-AhR* нами была получена «гуманизованная» линия дрозофил, содержащей ген арил-гидрокарбонового рецептора человека под контролем дрожжевого промотерного элемента UAS (рис. 3.1).

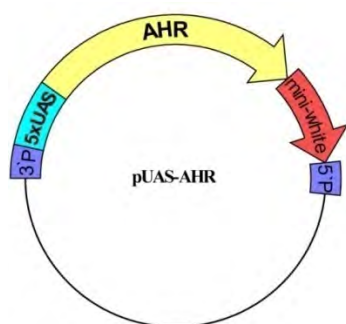


Рисунок 3.1 - Схема трансгенной конструкции pUAS-AHR, содержащей ген арил-гидрокарбонового рецептора (AHR) человека. Обозначения: 5xUAS – дрожжевой промотор, AHR – ген, кодирующий арил-гидрокарбоновый рецептор, mini-white – маркерный ген окраски глаз.

Наличие нуклеотидной последовательности, кодирующей ген *AhR*, в геноме мух мы подтвердили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (рис. 3.2). Для проведения ПЦР мы использовали три отводки линии *w; p{w+ [UAS-AHRh]}*: AHR1, AHR2, AHR3. Для контроля взяли линию анализатор, которая использовалась для микроинъекций - *uw*. Реакция ПЦР ставилась с двумя парами праймеров. Праймеры были подобраны с учетом специфичности гену *AhR* человека, из соответствующей белок-кодирующей области гена *AhR*. Далее, продукты ПЦР-реакции были подвергнуты электрофорезу в акриламидном геле. В случае эффективной вставки конструкции в геном мы ожидали получить полосы, характерные фрагментам ДНК, длиной 444 н.п. (первая пара праймеров) и 156 н.п. (вторая пара праймеров). Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.2 А.

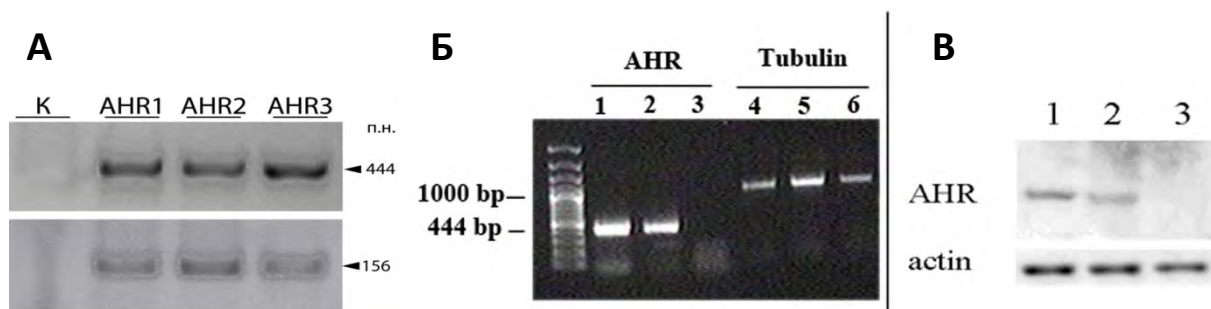


Рисунок 3.2 - Доказательство эффективности активации конструкта pUAS-AHR

А. Снимок электрофореза продуктов ПЦР-реакции, проведенной с двумя парами

праймеров (верхний и нижний ряд). Использовали ДНК сублиний AHR1, AHR2, AHR3 от исходной линии *w*; $p\{w^+ [UAS-AHRH]\}$, содержащих конструкт $pUAS-AHR$ и ДНК контрольной линии *uw*, не несущей анализируемой трансгенной конструкции в геноме (К). Б. ПЦР с обратной транскрипцией мРНК, выделенной из голов мух линии *Elav-GAL4/+*, *UAS-AhR/+*, выросших на среде с индинолом (колонки 1, 4) или на стандартной среде (колонки 2, 5), как негативный контроль использовали линию без индукции *AhR* (*UAS-AhR*), мухи которой развивались на стандартной среде (колонки 3, 6). ОТ-ПЦР проводили со специфическими праймерами, выявляющими экспрессию человеческого *AhR* (1-3) или гена *tubulin*, для контроля сигнала (4-6). В. Вестерн-блот анализ экспрессии АНР человека в головах мух *Elav>hAhR*, выросших на среде с индирубином (1) или на стандартной среде (2), и в головах мух *UAS-AhR*, взятых как негативный контроль (3). В качестве контроля загрузки использовали ген *Act5*.

После подтверждения вставки в геноме дрозофилы мы проверили эффективность её активации в экспериментах по индукции её экспрессии с помощью драйвера *Elav-Gal4* в мозге дрозофилы. Экспрессию РНК человеческого *AhR* мерили с помощью ОТ-ПЦР, к ДНК получали из голов мух. Яркое свечение в колонках 1 и 2 на рис 3.2 Б говорит об обильной экспрессии РНК конструкции в ответ на её активацию в системе UAS/Gal4. В качестве негативного контроля использовали исходную линию *UAS-AhR* (рис. 3.2, Б колонка 3). Наконец, мы проверили эффективность наработки человеческого белка АНР в ответ на добавление ксенобиотика в кормовую среду дрозофилы. Экспрессию белка АНР подтвердили с помощью Вестерн-блоттинга в головах мух *Elav>AhR*, выросших на среде с индирубином. (рис. 3.2, В колонки 1, 2). Как негативный контроль использовали мух исходной линии *UAS-AhR* (рис. 3.2, В колонка 3).

Наличие "инородной" вставки в геноме дрозофилы поставило вопросы, сколько копий этой инсерции встроилось в геном и не нарушает ли инсерция другие гены дрозофилы? Анализ фенотипа и фертильности особей линии *UAS-AhR* позволил дать предварительный отрицательный ответ, поскольку они не отличались от дикого типа. Генетическое картирование показало локализацию вставки *UAS-AhR* во второй хромосоме. Точную локализацию и количество копий определили с помощью метода инвертированной ПЦР с использованием специфического праймера к последовательности конструкции. Секвенирование продуктов реакции показало, что в геноме дрозофилы встроилась только одна копия конструкции *UAS-AhR* в цитологическую область 60E11 между генами *CG30424* и *Rpl19* (40 нп выше неизвестного гена *CG30424* и примерно ниже на 540 нп от гена *Rpl19*) (рис. 3.3). Таким образом, мы показали, что

вставка нарушает экспрессию других генов дрозофилы и имеется в одном экземпляре. Это позволяет проводить достоверные сравнительные эксперименты по её индукции в геноме и по исследованию эффектов, которые могут быть вызваны её индукцией.

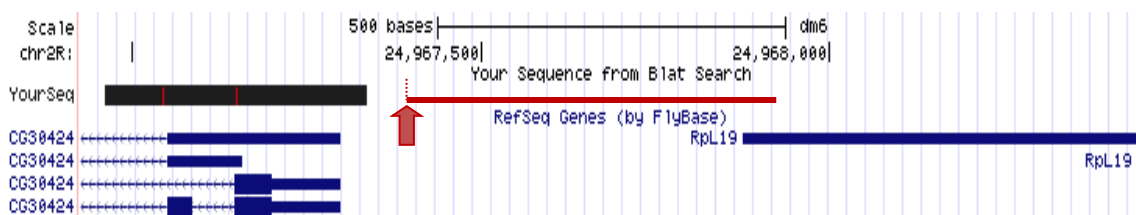


Рисунок 3.3 - Локализация конструкции UAS-AhR в геноме дрозофилы. Картинка построена в программе поиска гомологичных последовательностей в геноме (BlastSearch). Черная широкая полоса - локализация продукта инвертированной ПЦР. Синим обозначены эндогенные последовательности. Красная стрелка показывает место инсерции на карте хромосомы II. Красная полоска показывает расстояние от вставки до вышелокализованного гена *Rpl19*.

Таким образом, впервые была получена «гуманизованная» линия дрозофилы с геном человека *AhR*, который, можно успешно активировать в геноме дрозофилы, используя систему UAS/GAL4. Следующей задачей стало показать, что человеческий АНР в клетках дрозофилы способен воспринимать внешний сигнал, поступающий от ксенобиотиков (в нашем случае индирубин), активироваться в ответ на этот сигнал и связываться со своими генами-мишенями, вызывая их мисэкспрессию, проявляясь в видимых морфологических аномалиях у взрослых особей. Эти эксперименты включали скрещивания мух линии несущей конструкт $p\{w+ [UAS-AHRH]\}$, с мухами драйверной линии w ; $p\{GAL4-GMR\}$, экспрессирующий белок GAL4 в клетках глазного имагинального диска личинок дрозофилы. Далее, в целях активации наработанного белка арил-гидрокарбонного рецептора человека в клетках глазного имагинального диска, личинок от этого скрещивания ($GMR > AHR$) выращивали на среде с индирубином. Это вещество является агонистом АНР человека. Эффект активации мы увидели, анализируя глазные структуры мух, развившихся из личинок, выращенных на среде с индирубином. В качестве контроля использовали также мух $GMR > AHR$, выращенных в стандартных условиях (без индирубина). Кроме того, чтобы доказать специфичность зарегистрированных нарушений, на среде с индирубином выращивали мух дикого типа.

Мухи всех линий, выращенных на среде с индирубином, хорошо выживали, однако отличались по морфологии глазных органов (фенотип «грубые глаза» рис. 3.4). В контрольных экспериментах нарушений развития глаз выявлено не было.



Рисунок 3.4 - Глаза мух линии GMR>AHR, выращенных на среде без индирубина (слева) и на среде, содержащей индирубин (справа).

В случае эктопической экспрессии AhR в глазном имагинальном диске было обнаружено нарушение организации рядов омматидиев, дефекты в структуре омматидия, изменения ориентации омматидиев, их слияние и изменение количества окружающих омматидии клеток, составляющих механо-сенсорные щетинки (рис. 3.5).

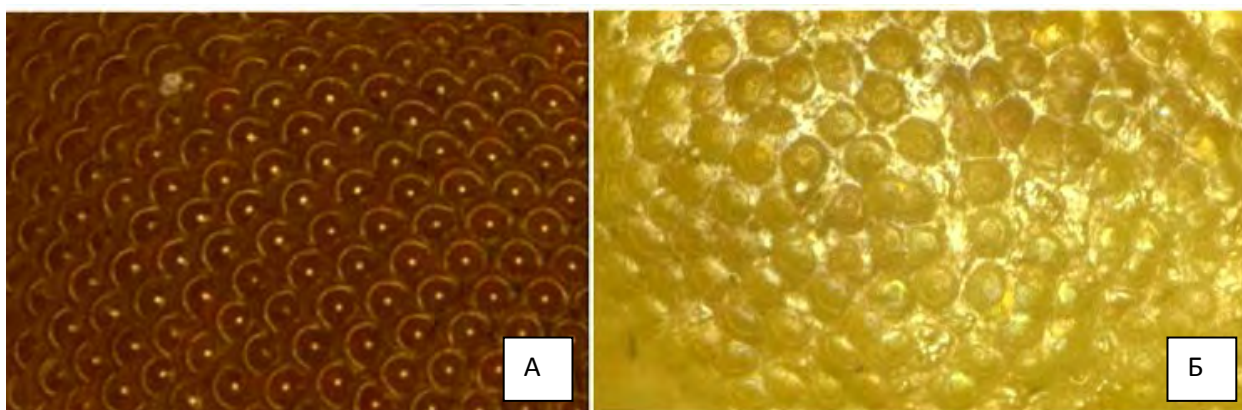


Рисунок 3.5 - Нарушения ориентации омматидиев. Нормальное расположение омматидиев в глазах мух линии GMR>AHR выращенных на стандартной среде (А). Нарушение ориентации омматидиев в глазах мухи линии GMR>AHR выращенных на среде с индирубином (Б).

Морфогенез глаз мух из контрольных групп не нарушался (табл 3.1, рис. 3.4, 3.5). Это позволило сделать вывод о том, что зарегистрированные нами нарушения морфогенеза в подопытном классе мух вызваны активностью человеческого белка AhR.

Таблица 3.1 - Влияние индирубина на морфогенез глазных структур мух дикого типа и мух линии GMR>AHR.

	Опыт: мухи GMR>AHR с индирубином	Контроли	
		Муши GMR>AHR без индирубина	Дикий тип с индирубином
Нормальный глаз	0	78	64
Глаз с нарушенной морфологией	108	0	0

3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За отчетный период была получена уникальная линия дрозофилы, содержащая ген Арил-гидрокарбонowego рецептора человека. Мы показали, что вставка *pUAS-AHR*, кодирующая AhR человека, представлена одной копией и не нарушает экспрессию других генов дрозофилы. Это позволяет проводить достоверные сравнительные эксперименты по её индукции в геноме и по исследованию эффектов, которые могут быть вызваны её индукцией. Мы показали, что вполученной гуманизированной линии дрозофил можно успешно индуцировать экспрессию белка AhR человека. Этот белок функционален, поскольку он активируется в ответ на воздействие своих экзогенных лигандов.

Мы полагаем, что линии с активно работающим трансгеном *pUAS-AHR* вполне достаточно для проведения будущих работ для оценки действия эндогенных и экзогенных лигандов AhR человека на активацию консервативных генов регулирующих развитие органно-тканевых структур в условиях *in vivo*.

3.5 ССЫЛКИ

1. Ge N.L., Elferink C.J. //J. Biol. Chem. - 1998. -V. 273. - P. 22708–22713.
2. Fukunaga B.N., Probst M.R., Reisz-Porszasz S. et al. //J. Biol. Chem. -1995.- V. 270.- P. 29270–29278.

3. *Jaronen M., Quintana F.* // Front. Immunol. - 2014. - V. 5. - P. 521.
4. *Stegeman J.J., Hahn M.E.* // In: Malins DC, Ostrander GK. (Eds.). Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. CRC/Lewis. Boca Raton. 1994. - P. 87–206.
5. *Hahn ME.* // Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998. - V. 121.- P. 23-53.
6. *Hahn M.E.* // Chemico-Biological Interactions. - 2002.- V. 141.- P. 131–160.
7. *Butler R.A., Kelley M.L., Powell W.H., et al.* // Gene. - 2001. - V. 278. - P. 223–234.
8. *Schmidt J.V., Su G.H., Reddy J.K. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996.- V. 93. - P. 6731–6736.
9. *Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D.M. et al.* // Science. - 1995. - V. 268. - P. 722–726.
10. *Mimura J., Yamashita K., Nakamura K. et al.* // Genes Cells. - 1997. - V.10. - P. 645–654.
11. *Benedict J.C., Lin T.M., Loeffler I.K., et al.* // Toxicol. Sci. - 2000. - V. 56. -P. 382–388.
12. *Nebert D.W.* // Crit.Rev. Toxicol. - 1989. - V. 20. - P. 153–174.
13. *Singh K.P., Wyman A., Casado F.L. et all.* // Carcinogenesis. - 2009. - V. 30. - P. 11–19.
14. *Jin U., Lee S., Safe S.* // JPET. - 2012.- V. 343. - P. 333-341.
15. *Murray I.A., Morales J.L., Flaveny C.A., et al.* // Mol. Pharmacol. - 2010. - V. 77. - P. 247–254.
16. *Poland A., Knutson J.C.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 1982. - V. 22. - P. 517-554.
17. *Emmons R.B., Duncan D., Estes P.A. et al.* // Development. - 1999. - V. 126. - P. 3937–3945.
18. *Cespedes M.A., Galindo M.I., Couso J.P.* // PLoS ONE. - 2010. e15382.
19. *Brand A.H., Perrimon N.* // Development. - 1993. - V. 118. - P. 401-415.

РАЗДЕЛ 4 Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений

4.1 ВВЕДЕНИЕ

Повышение интенсивности, продуктивности и конкурентоспособности современного растениеводства требует инновационных технологий. Международная научная инициатива по улучшению пшеницы (IRIWI) направлена на повышение генетического потенциала урожайности пшеницы на 50% в течение следующих 20 лет [1]. Это можно достигнуть только при использовании трансгенных технологий. В программе развития биотехнологий, утвержденной В.В.Путиным в 2012 году сказано: “Наиболее приоритетным является создание новых сортов сельскохозяйственных растений с

использованием постгеномных и биотехнологических методов. Но в настоящее время в Российской Федерации практически не создаются сорта и гибриды нового поколения, устойчивые к засухе, болезням, гербицидам, насекомым-вредителям и неблагоприятным условиям среды, с использованием генетической инженерии [2].

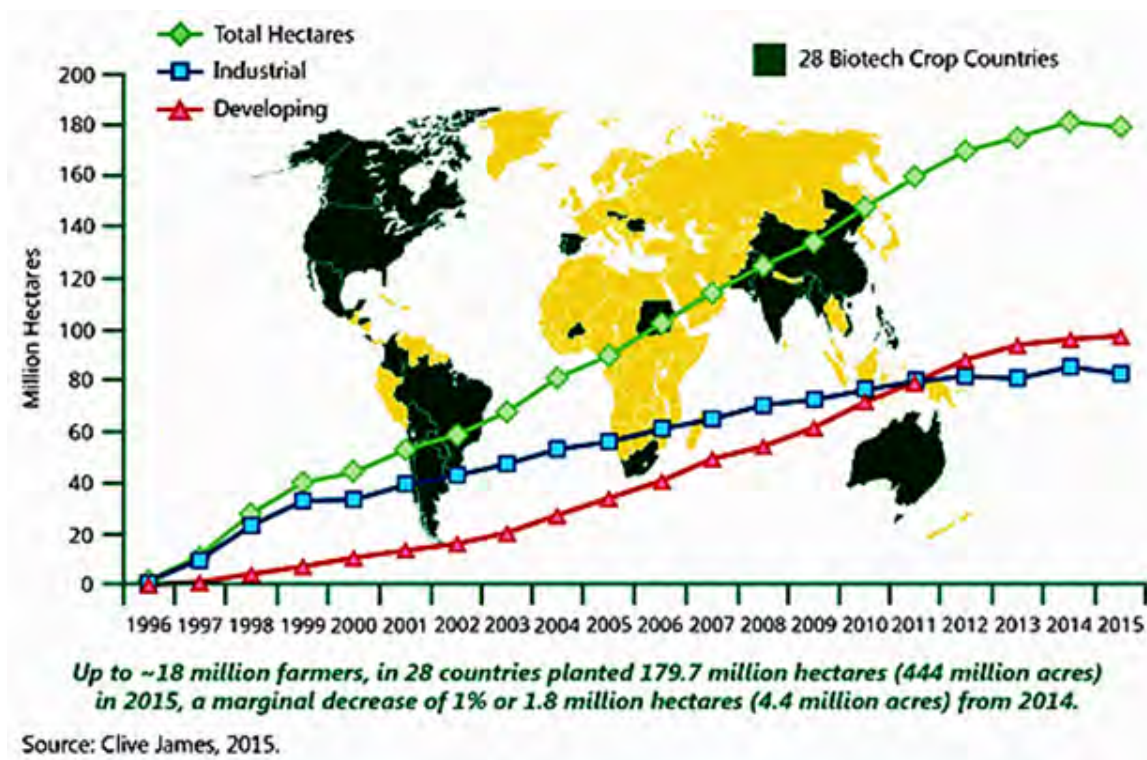


Рисунок 4.1 - Рост посевных площадей в мире под ГМ культурами (1996 – 2015).

За 20 лет коммерческого использования ГМ-культур в 1996 – 2016 г. их общая суммарная площадь составила 2 миллиарда га в 28 странах и была расширена более чем в 100 раз, из них 179,7 млн. га в 2015 г. или 12% от мировой площади пашни (по данным Международной службы по мониторингу о применении агробiotехнологий (ISAAA)) [3] (рис. 4.1). Предполагается, что в ближайшие 10-20 лет около 80% 29-ти основных сельскохозяйственных культур будут высеваться ГМ семенами в большинстве стран мира.

Так в РФ, 22 ГМ культуры разрешены для пищевого/кормового использования в РФ (июнь 2016): Кукуруза – всего 10 линий (Байер -1, Монсанто – 3, Сингента – 6); Соя – всего 8 (Байер -3, БАСФ -1, Монсанто – 3, Сингента – 1); Сахарная свекла - 1 (Монсанто/КВС, только пища); Картофель – 2 сорта (Центр Биоинженерия РАН, только пища).

ГМ рис с 2005 года выращивается в Иране, на очереди и пшеница. Несомненно, рано или поздно ГМ пшеница займет засоленные площади и ареалы с недостаточным увлажнением во всех странах.



Рисунок 4.2 - Свидетельства государственной регистрации ГМ пищи и корма в ТС республики Беларусь, Республики Казахстан и России.

Основание и исходные данные для разработки темы: Основанием для проведения НИР, выполняемой в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», является Соглашение от «11» ноября 2015 г. № 14.613.21.0052.

Сведения о планируемом научно-техническом уровне разработки: В настоящее время модификация регуляторных генов высших организмов является передовой областью зелёной биотехнологии. Для получения живых клеток с направленно модифицированным геном применяют целый ряд высокотехнологических подходов: методы молекулярного клонирования, методы биобаллистики и агробактериальной трансформации и т.д. С целью объективного контроля наследования нужного признака, используют широкий спектр таких методов как иммуноферментный анализ, полимеразно-цепная реакция и т.п. Применение перечисленных методов позволяет прогнозировать получение инновационных результатов в области биотехнологии растений. Полученные результаты находятся на конкурентном уровне относительно аналогичных исследований иностранных

учёных. Использование регуляторных генов высших растений позволит создать сорта с новыми хозяйственно-ценными признаками. Данный подход активно разрабатывается ведущими в этой области странами, такими как США, ЕС и Канада.

Сведения о патентных исследованиях и выводы из них: В ходе выполнения первого этапа исследований проведен патентный поиск в результате которого установлено следующее: на основе отобранных отечественных и зарубежных патентов показано, что каждое из направлений не до конца удовлетворяет требованиям современного развития технологии и, исходя из уровня техники, такие решения не могут обеспечить требуемые показатели. Проведенный патентный поиск показал перспективность разрабатываемых технологий и отсутствие аналогов данной разработки.

Актуальность темы: Для эффективного сохранения и вовлечения засоленных земель в сельскохозяйственный оборот, для увеличения производства зерна пшеницы важным средством является внедрение принципиально новых инновационных решений, в частности специально созданных генно-инженерных солеустойчивых сортов важнейших культур, к которым, безусловно, относится пшеница.

Новизна темы исследования заключается в том, что:

1. Работа ведется не с модельными, легко трансформируемыми сортами, а с высоко урожайными сортами, занесенными в реестр селекционных достижений РФ.
2. Системы трансформации пшеницы оптимизируются под практически важные сорта.
3. Проводится попытка исследовать влияние транскрипционного фактора, выделенного из локуса количественных признака QTL риса Santol, ответственного за толерантность растений к засолению и засухе, ответственного за урожайность в условиях стресса.

Связь данной работы с другими научно-исследовательскими работами: Создание трансгенных растений, которые могут быть использованы в практике, требует наличие нескольких компонентов, интеллектуальная собственность которых должна быть защищена патентами. Это продуктивные сорта или компоненты гибридов, системы генетической трансформации и гены, экспрессия которых улучшает свойства растений. В РФ созданы продуктивные сорта пшеницы, генетический потенциал которых не полностью раскрывается из-за стрессов среды, к которым относится и засоление почв. В ИБР РАН в группе д.б.н. А.К.Гапоненко разработаны методы генетической трансформации важнейших культур - пшеницы, подсолнечника, сахарной свеклы. Недостающий компонент создания трансгенных растений, которые могут быть использованы в практике РФ - это гены, определяющие устойчивость растений к стрессам среды. Этот компонент -

гены транскрипционных факторов (ТФ), повышающие толерантность растений к стрессам, успешно выделяются и изучается индийскими коллегами в лаборатории физиологии и молекулярной биологии стресса Университета Джавахарлала Неру, Нью-Дели, Индия, под руководством профессора Ашвани Парика (Ashwani Pareek). В лаборатории были клонированы несколько ТФ из локуса количественных признаков солеустойчивости SALTOLQTL риса. Предварительные исследования лаборатории физиология и молекулярной биология стресса показали роль ТФ риса OsGATA в повышении толерантности к засолению у арабидопсиса. Полноразмерная копия гена ТФ OsGATA будет выделена индийскими партнерами и будет предоставлена группе А.К.Гапоненко для генетической трансформации продуктивных российских сортов пшеницы. Планируется создание выборки трансгенных растений от независимых трансгенных событий и изучения влияния экспрессии гена ТФ OsGATA на толерантность пшеницы к засолению.

Цель проекта: Повышение толерантности к засолению у продуктивных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) путем введения транскрипционного фактора OsGATA риса, эктопическая экспрессия которого, инициируется избыточным засолением.

Цели и задачи этапа исследований, их место в выполнении НИР в целом:

– должна быть получена коллекция трансгенных линий пшеницы (Т1) с использованием методов агробактериальной и баллистической трансформации. Все работы по созданию трансгенных линий пшеницы должны проводиться в соответствии с общими требованиями безопасности производственного процесса по ГОСТ 12.3.002;

– должны быть подтверждены наличие и экспрессия гена OsGATA в полученных трансгенных линиях (Т1) с использованием стандартных молекулярно-биологических методов.

– должно быть получено потомство (Т2) от трансгенных линий (Т1), экспрессирующих ген OsGATA. Потомство должно быть получено в условиях искусственного климата при оптимальных условиях вегетации – качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха, фитосанитарная обработка;

– должны быть подтверждены наличие и экспрессия гена OsGATA в полученных трансгенных линиях (Т2) с использованием стандартных молекулярно-биологических методов;

– должны быть подготовлены две публикации по результатам проекта в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus или в базе данных "Сеть науки" (WEBofScience).

- должна быть подготовлена заявка на патент, полученная по результатам исследований;
- иностранным партнером должна быть проведена оценка толерантности трансгенных линий (Т2) к засолению с использованием физиологических и биохимических анализов по стандартным протоколам;
- иностранным партнером должен быть проведена оценка продуктивности и степени стабильности признаков запасных белков глиадинов, ответственных за хлебопекарные качества пшеницы у отобранных трансгенных линий пшеницы, устойчивых к засолению по стандартным протоколам.

4.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.2.1. Модификации векторов для агробактериальной и баллистической трансформации пшениц (замена промотора)

Вектор для баллистики. Для оптимизации экспрессии гена OsGATA в растениях пшеницы было проведена замена промотора 35S CaMV на Act1 или Ubi1 промоторы риса. С этой целью сначала было проведено переклонирование HindIII-фрагмента, содержащего каскету экспрессии 35S:OsGATA:pA35, в плазмидный вектор pBluscript, предварительно обработанный рестриктазой HindIII. В полученных клонах была определена ориентация вставки и отобраны клоны, соответствующие карте рис. 4.3.

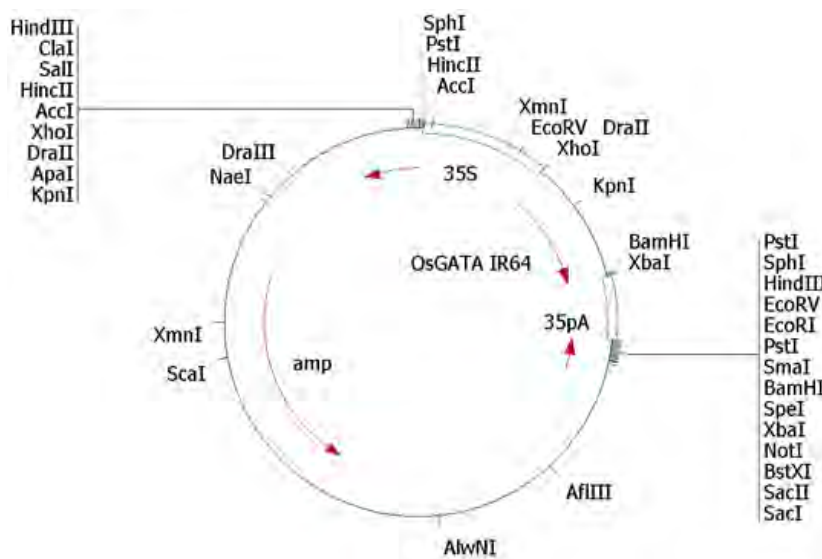


Рисунок 4.3 - Схема плазмидной ДНК pBl-35GATA , использованной для замены промотора.

35S CaMV-промотор был удалён из кассеты экспрессии с помощью рестрикции XhoI, а концы вектора были достроены с помощью T4 ДНК полимеразы.

Промоторы Act1 или Ubi1 выделяли из ДНК psGFP-BAR с помощью двойной рестрикции (HindIII+NcoI) или (HindIII+BamHI), соответственно. После достройки концов с помощью T4 ДНК полимеразы, фрагменты с промоторами были клонированы в выше описанный вектор, несущий конструкцию OsGATA:pA35 (рис. 4.4).

Клоны с правильной ориентацией промоторов отбирали с помощью рестрикции EcoRI (Act1-промотор) или HindIII (Ubi1-промотор), соответственно.

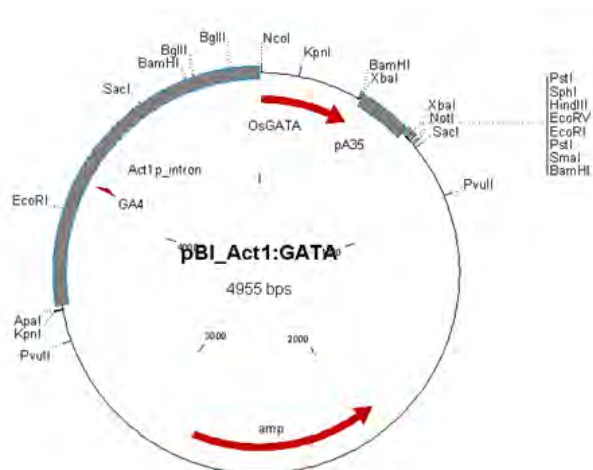


Рисунок 4.4 - Схема плазмидной ДНК pBI-Act1:OsGATA:pA35.

Для селекции трансформантов использовали ген устойчивости к гербициду BASTA. С этой целью из плазмиды psGFP-BAR путем делеции HindIII-фрагмента, содержащего кассету Act1:GFP:Tnos, получили плазмиду pUC-Ubi1:BAR:Tnos.

Из плазмиды pBI-Act1:OsGATA:pA35 двойной рестрикцией (ApaI+HindIII) с последующей модификацией образованных концов до тупых выделяли кассету экспрессии Act1:OsGATA:pA35, которая была затем клонирована в плазмидный вектор pUC-Ubi1:BAR:Tnos, предварительно обработанный (HindIII+T4 ДНК полимеразой). В результате был получен вектор ball для баллистической трансформации, содержащий ген OsGATA под контролем промотора Act1, и кассету экспрессии селективного гена устойчивости к гербициду BASTA (Рис.4.5).

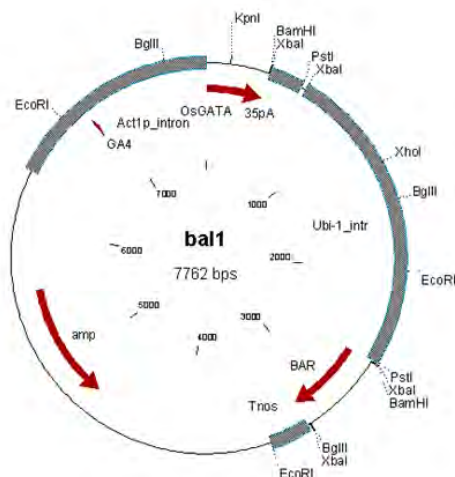


Рисунок 4.5 - Схема плазмидного вектора ball1 , использованного в опытах по баллистической трансформации.

Вектор для агробактериальной трансформации

Для модификации бинарного вектора pCambia1304:OsGATA для агробактериальной трансформации была проведена замена кассеты экспрессии 35S:OsGATA:pA35 на Act1:OsGATA:pA35 . Для этого ДНК pCambia1304:OsGATA была обработана HindIII и T4 ДНК полимеразой, затем CIAP. В полученный вектор клонировали кассету экспрессии Act1:OsGATA:pA35, выделенную из плазмиды pBl-Act1:OsGATA:pA35 двойной рестрикцией (AraI+HindIII) с последующей модификацией образованных концов до тупых. Таким образом был получен бинарный вектор agro1 для агробактериальной трансформации, содержащий ген gus под 35S промотором, ген hygR под усиленным 35S промотором и ген OsGATA под злакоспецифическим промотором Act1 (Рис.4.6).

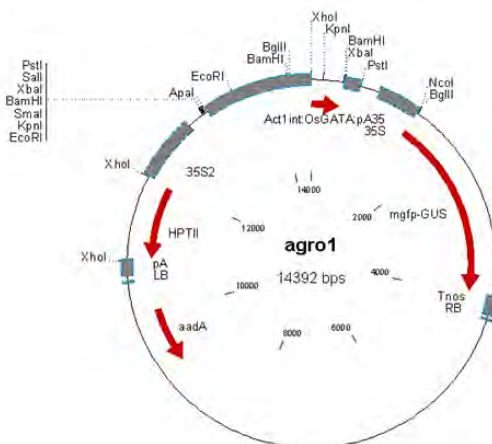


Рисунок 4.6 - Схема бинарного вектора agro1, использованного в опытах по агробактериальной трансформации.

4.2.2. Создание коллекции трансгенных линий пшеницы (Т1)

На данном этапе исследования нами были использованы два способа введения гетерологичных последовательностей в геном пшеницы - это агробактериальная и баллистическая трансформация.

Приготовление питательных сред

В состав всех питательных сред входили макро- и микросоли MS [4], витамины B5 [5], регуляторы роста и углеводы (Таблица 4.1). рН среды доводили до 5,8 перед автоклавированием. Стерилизацию среды осуществляли в автоклаве при давлении 1.2 атмосферы в течение 15 минут.

Таблица 4.1 - Состав дополнительных компонентов сред для трансформации пшеницы

Состав	Среда А	Среда Б	Среда В	Среда Г	Среда Д
2,4-D	0,5 мг	0,5 мг	0,1 мг	-	-
Пиклорам	2 мг	2 мг	-	-	-
НУК	-	-	-	-	0,5 мг
Мальтоза	40 г	120 г	30 г	30 г	15 г
Глютамин	0,5 г	0,5 г	0,5 г	-	-
Гидролизат казеина	0,1 г	0,1 г	0,1 г	-	-
MES	1г	1 г	1 г	0,5 г	0,5 г
Агар-агар	8 г	8 г	8 г	8 г	8 г
Селективный агент (после автоклавирования)	-	-	-	+	+

Холодовой шок для использованных эксплантатов

Незрелые колосья пшеницы собирали на 10–14 день после опыления. Срезанные колосья помещали срезанными концами в воду в холодильную камеру при $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ на 48 ч.

Стерилизация растительного материала

Незрелые зерновки обработанные холодом вышелушивали из колосков и стерилизовали 70% этиловым спиртом 6 мин. Промывали стерильной дистиллированной водой 3 раза по 5 мин. Зародыши размером 0,7-1,5 мм изолировали и помещали на среду А щитком вверх, по 50 шт. на чашку Петри (9 см), и культивировали 14-18 дней в темноте $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ до образования каллуса. Затем проводили визуальную оценку образовавшегося каллуса. Морфогенный каллус (МК) - плотный, желтоватый, медленно увеличивающийся в массе каллус, представленный плотно сцепленными между собой меристемными глобулами, неморфогенный каллус (НМК) - представляет собой рыхлые, белые, сильно обводненные массы клеток, характеризующиеся высокой скоростью обводнения и увеличения массы и отсутствием морфогенеза. Отселектированный визуально МК вместе с зародышем использовали для трансформации (зародыш от морфогенного каллуса не отделяли, а оставляли вместе), а НМК отсекали и изымали из культуры *in vitro*.

Осмотическая обработка эксплантов перед трансформацией.

Перед трансформацией зародыши с каллусом выкладывают на осмотическую среду (Б), содержащую в качестве осмотического агента мальтозу (120 г/л). Экспланты располагают в центре чашки Петри, в виде кольца диаметром 40 мм по 30-40 шт./чашку и выдерживают 4–6 часов до трансформации и 20–24 часа после (осмотическую обработку после трансформации проводили только для баллистики).

Баллистическая трансформация эксплантов

Стерилизация микрочастиц: Для бомбардировки использовали вольфрамовые микрочастицы M10 (Sylvania Chemical/Metals), размер частиц в смеси варьировал 0,1-7 мкм, наибольшее количество частиц 80% имело размер 0,4-2 мкм. Навеску микрочастиц весом 50 мг стерилизовали спиртом (500 мкл 96% спирта) в течение 15 мин. Осаждение частиц проводили на центрифуге при 14000 об./мин. в течение 6–8 мин. Промывание частиц проводили три раза стерильной водой. Конечный объем смеси частиц в воде составил 500 мкл.

Преципитация ДНК:

1. В стерильный эппендорф помещали 25 мкл смеси частиц, предварительно смесь ресуспендировали и отбирали брать из нижней части эппендорфа;
2. Добавляли 5 мкл ДНК, ресуспендировали;
3. Добавляли 25 мкл 2,5 М CaCl_2 и ресуспендировали;
4. Немедленно добавля 5-10 мкл 0,1 М спермидина, ресуспендировали до стадии выпадения смеси частиц в осадок;
5. Эппендорф поместили на лёд на 5 мин;
6. Отобрали пипеткой 50 мкл смеси, из надосадка не затронув частицы;

7. Для выстрела использовали 2,5 мкл смеси;

Исходные параметры баллистической трансформации:

1. Объем используемого газа при выстреле - 6 см³;
2. Сечение ячейки рассекающего фильтра - 500 мкм;
3. Отрицательное давление вакуума в камере при выстреле - 30 мм ртутного столба;
4. Расстояние от источника частиц до ткани мишени 12 -17 см;
5. Давление гелия – 0,6-0,7 МПа=6-7 атм (1 мегапаскаль [МПа] = 9.869 физическая атмосфера [атм]);
6. Каждая чашка дважды подвергалась бомбардировке микро частицами, с нанесенными на них векторами экспрессии целевых генов. После первого выстрела каллусы переворачивали и снова выкладывали по кругу диаметром 40 мм.

Агробактериальная трансформация

Ночную культуру *A. tumefaciens* линии AGL1 выращивали в 50 мл жидкой среде LB (с селективными антибиотиками) при 28°C. Затем центрифугировали при 4,5-5 тыс.об/мин 5 минут. Осадок ресуспендировали в 50 мл среды АВ [6] (рН 5,6, без антибиотиков) с ацетосирингоном (200 мкМ). Ставили на шейкер на 2-4 ч при 28°C и 100-150 оборотов/мин. Непосредственно перед трансформацией бактериальную культуру смешивали в пропорции 1/1 с жидкой осмотической средой В (Таблица 4.1) и добавляли 0,02 % Silwet L-77 (Lehle seeds, USA), (2 мл 1%- стокового раствора на 100 мл готовой бактериальной суспензии).

Для трансформации использовали зародыши с каллусами после осмотической обработки. Часть зародышей переносили в колбу (фалкон) и создавали отрицательное давление вакуума в камере (около 30 мм.рт.ст.) на 5-10 минут, а часть зародышей оставляли оставляли в колбах без вакуумного воздействия. После инокуляции экспланты переносили на среду В (без агробактериальной суспензии) для сокультивирования на 2 дня.

Анализ экспрессии гена *uidA* в трансгенных тканях

Через 7 дней после сокультивации проводили оценку транзientной экспрессии гена *uidA* в трансформированных зародышах. Для этого часть эксплантов помещали в 1,5 мл пробирки, содержащие 500 мкл GUS-окрашивающего раствора X-Gluc и инкубировали при 37°C 20–24 ч. Оценку эффективности доставки генов проводили с помощью выявления синих участков – мест экспрессии гена *uidA*.

Селективный отбор трансгенных побегов T0

После трансформации (для баллистики через 20-24 часа) экспланты (зародыши с каллусом) переносили на среду В (цефотаксим 400 мг/л) без селективного агента для

пролиферации каллуса на 3 недели, в темноте при $25\pm 2^\circ\text{C}$ (если в течение этих трёх недель наблюдалось начало побегообразования, то экспланты переносили на среду для регенерации с селективным агентом раньше истечения срока пролиферации).

Затем зародыши с каллусом (не разделяя) помещали на селективную среду Г для регенерации и селекции побегов на 3 недели, при освещении 5000 люкс и температуре $23\pm 2^\circ\text{C}$.

В качестве селективного агента использовали (в зависимости от трансформирующей конструкции) - фосфинотрицин (ppt) в концентрации 5 мг/л или гигромицин (hpt) в концентрации 15 мг/л.

Укоренение и адаптация побегов

Образующиеся в процессе селекции зеленые побеги, помещали в пробирки со средой Д для укоренения при освещении 5000-10000 люкс и температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$. Для селекции на этапе укоренения использовали гигромицин в концентрации 13 мг/л или фосфинотрицин в концентрации 3 мг/л. Укоренившиеся побеги пересаживали в перлит во влажную среду для адаптации на 1-2 недели при $15-17^\circ\text{C}$.

Получение семенного потомства в условия искусственного климата

Адаптированные растения переносили в почву до полного созревания в условиях теплицы. Перед высадкой побегов проводили подготовку почвенного грунта:

- автоклавирование почвенного грунта;
- выравнивание pH до значения 6,5-7 (солевая вытяжка, доломитовая мука);
- внесение микро- и макроэлементов (удобрений).

Для подготовки почвенного грунта использовали оборудование ЦКП (ИБР РАН).

В первые дни акклиматизации к условиям теплицы, растения накрывали контейнерами или полиэтиленовой пленкой с перфорацией для создания повышенной влажности.

Растения культивировали при тех же условиях, что и исходная коллекция (Отчет о НИР за 1 этап) до полной зрелости семян (T1).

Культивирование коллекции растений T1

Чтобы повысить всхожесть полученных семян (T1), перед этапом проращивания выдерживали при температуре 40°C не менее 4-х недель. Затем семена высаживали и культивировали в почве при тех же условиях, что и исходная коллекция (Отчет о НИР за 1 этап).

4.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для агробактериальной трансформации была использована генетическая конструкция, содержащая маркерный ген *uidA*, детекция экспрессии которого позволяет оценить эффективность трансформации. Через 7 дней после сокультивации проводили оценку транзientной экспрессии гена *uidA* в трансформированных эксплантах с помощью выявления синих участков (мест экспрессии гена *uidA*). Было выявлена высокая транзientная экспрессия гена *uidA*, при этом достоверного отличия между необработанными и обработанными вакуумом зародышами не наблюдалось (рис. 4.7).

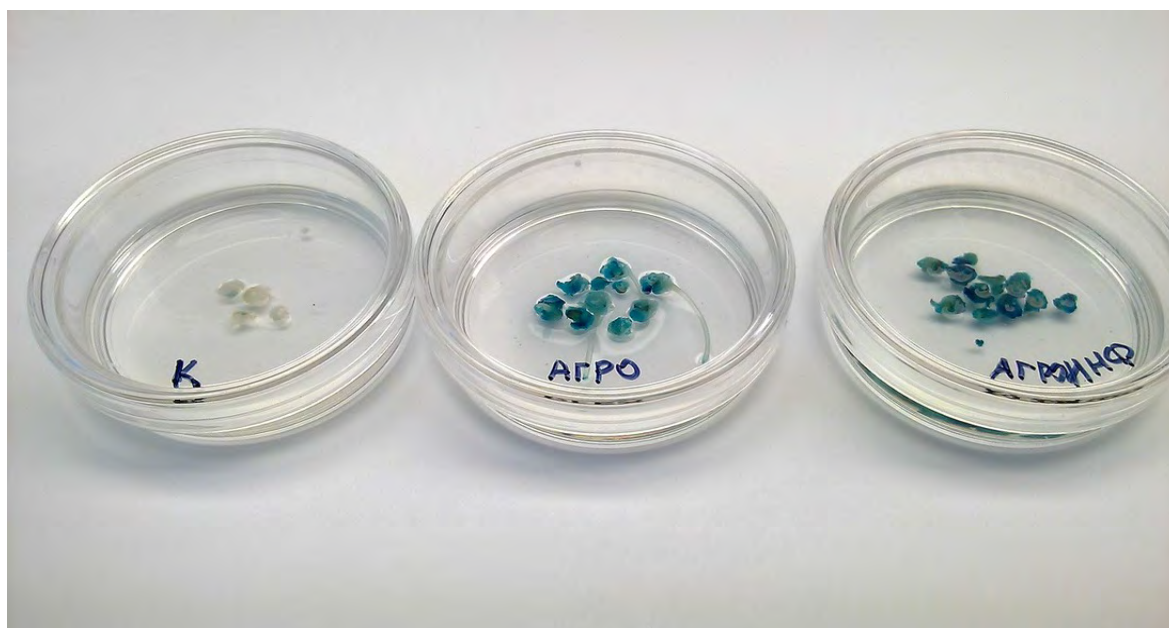


Рисунок 4.7 - Транзientная экспрессия гена *uidA*

В результате проведенной работы была получена коллекция трансгенных растений T0 с использованием баллистической и агробактериальной трансформации (Табл. 4.2, 4.3). Растения-регенеранты отбирали на селективной среде содержащей гигромицин в концентрации 15 мг/л или фосфинотрицин 5 мг/л, в зависимости от используемой конструкции. В процессе культивирования экспланты, обработанные вакуумом не пролиферировали и не регенерировали, что вероятно связано с сильным повреждением клеток в процессе обработки.

Таблица 4.2 - Результаты баллистической трансформации

Сорт	Кол-во эксплантов	Кол-во регенерантов,	Количество побегов	Количество побегов,
------	-------------------	----------------------	--------------------	---------------------

		прошедших селекцию (шт.)	адаптированных к условиям теплицы	завязавших семена/количество семян, шт.
Злата	486	43	38	18/24
Амир	256	8	5	2/6
Агата	367	25	22	9/11
Эстер	365	9	7	1/4

Таблица 4.3 - Результаты агробактериальной трансформации пшеницы

Сорт	Тип инокуляции	Кол-во эксплантов, шт.	Кол-во регенерантов, прошедших селекцию, шт.	Количество побегов адаптированных к условиям теплицы, шт.	Количество побегов, завязавших семена/количество семян, шт.
Эстер	с вакуумом	337	0	0	0
	без вакуума	500	29	21	6/21
Агата	с вакуумом	443	0	0	0
	без вакуума	550	17	12	3/16

Получена коллекция трансгенных растений T1. Акт создания трансгенных линий пшеницы представлен в отчетных документах. При получении растений использовали оборудование Центра коллективного пользования - ЦКП (ИБР РАН).

Для анализа наличия и экспрессии целевых генов *gata* и *uidA* использовали растения поколения T1. Анализ экспрессии целевого гена *OsGATA* в растениях пшеницы проводили методом ОТ-ПЦР вместо ИФА, т.к. в растениях пшеницы присутствуют собственные гены, кодирующие белки GATA с похожей аминокислотной последовательностью, что может сильно усложнить получение высокоспецифичных антител, необходимых для проведения ИФА.

Оценку стабильной экспрессии гена *uidA* проводили на проростках T1. Для этого сегменты листьев помещали в 1,5 мл пробирки, содержащие 500 мкл GUS-окрашивающего раствора X-Gluc и инкубировали при 37°C 20–24 ч. Оценку эффективности доставки генов проводили с помощью выявления синих участков – мест экспрессии гена *uidA*.

Растения поколения T1, полученные от трансформированных *in vitro* линий были высажены на чашки Петри с селективными агентами - *rpt* (баллистическая

трансформация) или *hug* (агробактериальная трансформация) для подтверждения экспрессии селективных генов (Табл. 4.4). Растения, показавшие устойчивость к селективным агентам (*prpt*, *hug*) были использованы для анализа наличия и экспрессии гена ТФ OsGATA (рис. 4.8).

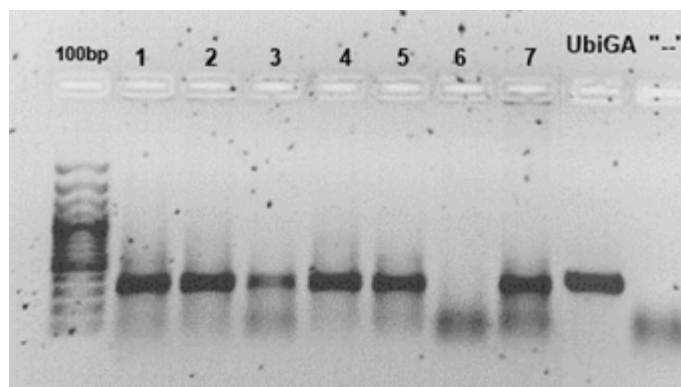


Рисунок 4.8. - Электрофореграмма ПЦР анализа наличия гена OsGATA в T1-регенерантах пшеницы. 1-7 – ДНК из регенерантов пшеницы, w/o – реакционная смесь без добавления ДНК, плазмидная ДНК pUbi:OsGATA#7. Условия ПЦР анализа наличия гена OsGATA: Праймеры GA2(5' TCGAGATGGGCTCCACCGATC-3') и GA3(5' CTCAGCCATGTAGCAATTG-3').

Таблица 4.4 - Анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий T1

Сорт	Общее кол-во растений T1, шт.	Кол-во устойчивых растений, шт.	<i>gata</i> + (ПЦР), шт.	<i>gata</i> + (OT-ПЦР) шт.	Количество растений с высоким уровнем экспрессии ТФ OsGATA
Злата баллист	24	18	18	11	5
Амир баллист	6	4	4	3	1
Агата баллист	11	9	8	4	2
Эстер баллист	4	3	3	2	1
Агата агро	16	12	12	11	2
Эстер	21	16	16	13	3

агро					
------	--	--	--	--	--

Проведён анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий Т1. Акт о проведении анализов на наличие и экспрессию гена OsGATA в коллекции трансгенных линий Т1 представлен в отчетной документации. При проведении анализов была использована УНУ - Комплекс для проведения междисциплинарных исследований в области сравнительной и функциональной геномики растений (РГАУ-МСХА им.Тимирязева) и Центр коллективного пользования ИБР РАН.

Растения Т1, показавшие наибольший уровень экспрессии гена ТФ OsGATA (табл. 4.4) были использованы для получения потомства Т2. От растений Т1 было получено семенное потомство Т2 (Табл. 4.5). Все растения Т1 были пронумерованы, потомству Т2 были присвоены номера, согласно происхождению (Табл. 4.5).

Таблица 4.5 - Семенное потомство Т2

Сорт	Кол-во растений Т1, шт.	Номера образцов	Кол-во семян Т2, шт.
Злата баллист	5	Z1.01	103
		Z1.02	121
		Z1.03	96
		Z1.04	107
		Z1.05	99
Амир баллист	1	Am.01	114
Агата баллист	2	Ag.01	94
		Ag.02	138
Эстер баллист	1	Es.01	127
Агата агро	2	Ag.04	75
		Ag.05	78
Эстер агро	3	Es.02	106
		Es.03	93
		Es.04	129

Трансгенные линии поколения T2 были получены от трансгенных линий T1, с наибольшим уровнем экспрессии ТФ OsGATA, в теплице при тех же условиях, что выращивались исходные растения. Далее провели анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий T2 (Табл. 4.6).

Таблица 4.6 - Анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий T2

Номера образцов	gata + (ПЦР), шт.	gata + (ОТ-ПЦР) шт.
Zl.01	+	+
Zl.02	+	+
Zl.03	+	+
Zl.04	+	+
Zl.05	+	+
Am.01	+	+
Ag.01	+	+
Ag.02	+	+
Es.01	+	+
Ag.04	+	+
Ag.05	+	+
Es.02	+	+
Es.03	+	+
Es.04	+	+

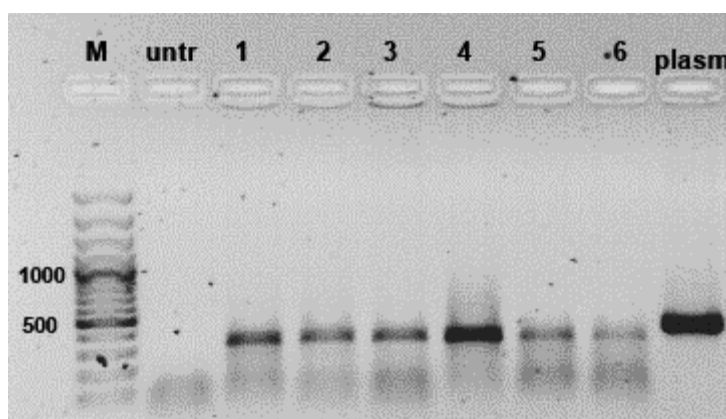


Рисунок 4.9 - Электрофореграмма ПЦР анализа наличия гена OsGATA в растениях T2 (семенное потомство) пшеницы. 1-6 – ДНК из трансгенных растений пшеницы поколения T2, untr – ДНК контрольного нетрансгенного растения пшеницы, плазмидная ДНК pUbi:OsGATA#7.

Таким образом, проведён анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий T2. Акт о проведении анализов на наличие и экспрессию гена OsGATA в коллекции трансгенных линий T2 представлен в отчетной документации. При проведении анализов была использован Центр коллективного пользования ВНИИСБ «Биотехнология».

Были сделаны следующие выводы:

1. Разработан прототип действий для создания ГМ сортов мягкой яровой пшеницы, толерантной к стрессам среды (засолению);
2. Подтверждены на практике принципы создания сельскохозяйственных культур, толерантных к засолению методами прямой и обратной генетики. Для улучшения продуктивных сортов методами трансгенной технологии для снятия «эффекта стрессов среды на снижение потенциальной урожайности» необходимо наличие: 1) Генов, определяющих устойчивость к стрессам; 2) Эффективных систем генетической трансформации; 3) Факторов регулирующих экспрессию большого генов ответа на стрессы.
3. Гены, кодирующие транскрипционные факторы (ТФ) интересны тем, что являются регуляторами процессов активности генов, вовлекая сотни генов ответа на стрессы, поэтому они являются отличными кандидатами для модификации сложных полигенно контролируемых признаков у сельскохозяйственных растений.

Использование результатов проведенных НИР в реальном секторе экономики

- 1) Создание и хозяйственное использование инновационных ГМ сортов (более урожайных и более маргинальных) на рынке пшеницы вызовет ускоренные темпы сортосмены и кардинальное повышение рентабельности аграрного производства и конкурентоспособности производимой продукции.
- 2) Планируемая рыночная стоимость подобной системы. На основе лицензионных договоров масштабирование результатов проекта может быть произведено в кратчайшие сроки. Зернопроизводящие предприятия СНГ представляют свыше 20 000 целевых предприятий. Если оценить платежеспособный спрос в данном сегменте в денежном выражении, емкость данного сегмента свыше 2 млрд. руб.

3) Имея отечественные ГМ-культуры, обладающие реальными преимуществами в урожайности, рентабельности производства и конкурентоспособности, можно и необходимо ставить вопрос об изменении закона об использовании ГМ-культур в практике сельского хозяйства РФ = ставить вопрос о допуске отечественных ГМ-сортов в производство..

Было проведено обобщение и оценка полученных результатов, в том числе разработка рекомендаций по использованию результатов проведенных НИР в реальном секторе экономики, а также в дальнейших исследованиях и разработках. В отчетной документации представлен документ «Рекомендации и предложения по использованию результатов НИР в реальном секторе экономики, а также в дальнейших исследованиях и разработках».

4.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время выполнения работ, в соответствии с календарным планом и поставленными задачами:

- с использованием методов агробактериальной и баллистической трансформации получена коллекция трансгенных линий пшеницы (T0), состоящая из 122 растений. От данных растений получено потомство T1 в количестве 82 шт. В отчетной документации представлен «Акт о создании коллекции трансгенных растений».

- с использованием стандартных молекулярно-биологических методов подтверждено наличие и экспрессия гена OsGATA в полученных трансгенных линиях (T1). По результатам анализов из 82 растений отобрано 14 с наибольшим уровнем экспрессии целевого гена. В отчетной документации представлен «Акт о о проведении анализов на наличие и экспрессию гена OsGATA в коллекции трансгенных линий T1».

от трансгенных линий (T1) с наибольшим уровнем экспрессии гена OsGATA получено потомство (T2). Потомство получено в условиях искусственного климата при оптимальных условиях вегетации – качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха, фитосанитарная обработка.

- с использованием стандартных молекулярно-биологических методов подтверждено наличие и экспрессия гена OsGATA в полученных трансгенных линиях (T2). В отчетной документации представлен «Акт о о проведении анализов на наличие и экспрессию гена OsGATA в коллекции трансгенных линий T1».

- иностранным партнером подготовлен аннотационный отчет, содержащий результаты оценки толерантности трансгенных линий (T2) к засолению и оценки продуктивности и

степени стабильности признаков запасных белков глиадинов, ответственных за хлебопекарные качества пшеницы у отобранных трансгенных линий пшеницы, устойчивых к засолению по стандартным протоколам.

- подготовлены две публикации по результатам проекта в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus или в базе данных "Сеть науки" (WEB of Science).

подготовлена заявка на патент, полученная по результатам исследований.

Исходя из полученных результатов НИР, можно сделать вывод о полном решении поставленных задач, которые находятся на конкурентном уровне относительно аналогичных исследований иностранных учёных.

4.5 ССЫЛКИ

1. IRWI - <https://www.wheatgenome.org/News/Press-releases/G20-Ministers-approve-IRIWI>
2. ВП-П8-2322. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года" (утв. Правительством РФ 24.04.2012 N 1853п-П8) http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_130043/
3. ISAAA Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, Clive James, 2015.
4. *Murashige T., Skoog F.* // *Physiologia plantarum.* - 1962. - Т. 15. - № 3. - С. 473-497.
5. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* // *Experimental cell research.* - 1968.- V. 50. - № 1. -P. 151-158.
6. *Chilton M.D., Currier T.C., Farrand S.K. et al.* // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 1974. - V. 71. - № 9. - P. 3672-3676.

РАЗДЕЛ 4.1 Влияние химических мутагенов на морфогенез ряда сельскохозяйственных (рапс) и декоративных (петуния) растений

4.1.1 ВВЕДЕНИЕ

Рапс (*BrassicanapusL.*) сельскохозяйственная культура, с широким спектром использования. В его семенах содержится 40-45% жира, причем более 80% составляют ненасыщенные жирные кислоты, оказывающие положительное влияние на воспроизводительные функции животных [1, 2]. По суммарному содержанию жира и белка рапс превосходит кормовые виды бобовых, в том числе сою. Качество масла выше

у скороспелых форм, поскольку незрелые семена содержат много хлорофилла, свободных жирных кислот, что снижает товарные качества масличного сырья.

В семенах современных сортов этой культуры количество таких «антипитательных» веществ как эруковая кислота и глюкозинолаты – минимальное [3]. Индекс качества белка из семян рапса значительно выше, чем из бобовых или зерновых. Однако обычные темные (бурые, черно-коричневые) оболочки семян рапса содержат клетчатку и фенольные соединения – проантоцианидины (ПА) и лигнин, которые снижают питательную ценность семян [4]. Особенности образования полимеризованных ПА, синтезирующихся по одной из ветвей фенилпропаноидного пути, достаточно хорошо изучены у *Arabidopsis thaliana*, ближайшего сородича рапса, [5, 6, 7]. Известно, что у желтых семян рапса содержание клетчатки ниже, оболочка тоньше, чем у темноокрашенных, а (ПА) в них отсутствуют [8,9]. Считается также, что содержание запасных триглицеридов и белков в светлых семенах выше, чем в темных [10]. С другой стороны, проантоцианидины выполняют защитную функцию. Они предохраняют эмбрион от воздействия влаги и препятствуют преждевременному прорастанию, обеспечивая период покоя, защищают от патогенов и ультрафиолета [11], Токсичность ПА для грибов, бактерий и насекомых хорошо известна и их действие подробно описано. Кроме того, флавоноиды защищают семена при хранении от окислительного стресса [12, 13]. Попытки получить желтосемянные сорта ведутся давно, но они безуспешны, поскольку признак окраски семян обычный полигенный количественный признак, который зависит также от условий среды [14, 15].

Для получения сортов с пониженным содержанием «антипитательных» веществ и высоким содержанием белка и жира ведется изучение линий поколения М₆-М₇ и форм, отобранных в 2013-2015 годах из мутантной популяции, полученной в результате обработки семян отечественного сорта «Викрос» химическими мутагенами, синтезированными в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова. В данном исследовании были изучены биохимические особенности семян у растений с усиленным ветвлением в базальной части и морфологические особенности разноокрашенных семян.

4.1.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения выращивали рассадным способом и посевом семян в открытый грунт по общепринятой методике. В поколении М₅, полученном в результате воздействия ЭМС в концентрации 0,03% было отобрано 17 линий с базальным ветвлением. Для изучения

взаимосвязи между типом ветвления и содержанием жира в семенах использовали шесть выровненных линий.

Для сравнительного изучения окраски семян, толщины их оболочки, содержания клетчатки, жира и белка использовали семена 10 линий с желто-оранжевой, темно-красной, коричнево-красной, пурпурной, светло-коричневой, коричневой, бурой и черно-бурой окрасками. Семена каждого из 3 растений 3 светлосемянных и 4 «красnoseмянных» линий М₄ и М₅, различающиеся по окраске, сеяли по фракциям – желтые с оранжевыми пятнами, оранжевые, коричневые. Окраску семян описывали с помощью цветовой шкалы RHS.



Рисунок 4.1.1. Окраски семян дикого типа: черная ('Викрос', А), пурпурно-красная, линия №79-4-23 (Б), желто-оранжевая (В) и желтая с коричневыми крапинками (Г) линия №80-8-21

Реципрокные скрещивания между сибсами из одной и разных фракций, а также возвратные скрещивания и гибридизацию светлосемянных, красnoseмянных и коричневосемянных форм проводили в начале цветения в прохладную погоду и в период массового цветения. Кроме того, по 3 соцветия на 6-10 растениях одного образца (каждой фракции, каждой линии) помещали в изоляторы. В период работы отмечали температуру воздуха и влажность.

Семена для определения окраски оболочек просматривали и фотографировали с помощью бинокулярного микроскопа NIKONSMZ-1500. Объективы 0,5x и 1,0x Трансфокатор 0,7 – 11x. Толщину оболочки и особенности поверхности семян изучали с помощью сканирующего аналитического электронного микроскопа JEOL, JSM-6380LA. Ускоряющее напряжение 20 кВ. Режим регистрации вторичных электронов. Ионно-распылительная установка ИВ-3 IonCoaterEIKO: На плоских образцах со слабовыраженным микрорельефом толщина покрытия 20 нм. (4 мин). Ионный ток 6 мА. Распыление золота в атмосфере аргона при давлении 0,1 мм рт.ст. На рабочий столик наклеивали 20-25 частей оболочек вверх срезами.

Содержание жира определено методом обезжиренного остатка. ЖКС масла установлен газохроматографическим методом (ГОСТ Р 51483-99) на газовом

хроматографе Кристалл 2000 М с использованием капиллярной колонки ZBFFAP длиной 25м, содержание общего азота определяли фотоколориметрически с последующим пересчетом на белок, сырой клетчатки – по методу Ганниберга и Штомана.

4.1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наблюдения, одно из значительных отличий между мутантными формами и растениями дикого типа – это скорость развития и характер ветвления. Мутантные растения, выросшие как из рассады, так и от прямого посева, зацветали на 5-7 дней раньше, чем растения дикого типа. У 50% растений мутантных линий соцветия на главных побегах зацветали через 52-55 дней (от всходов) при выращивании из рассады, и через 44-46 дней при прямом посеве. Вместе с тем, из пазух первой пары и второго – третьего настоящих листьев развивались мощные боковые побеги 1 порядка (4-5шт.), которые зацветали одновременно через 62-64 дня (из рассады) и через 53-55 дней при прямом посеве.



Рисунок 4.1.2 - Растения дикого типа (слева) и мутантная форма линии 834-7 с усилением ветвления (справа).

В то же время, у растений дикого типа цветение нижних боковых побегов начиналось только через 14-20 дней после зацветания главного соцветия. Для контрольных растений рапса характерно акротонное ветвление, при котором образование боковых побегов I порядка происходит сверху вниз, то есть начинается в пазухах листьев,

расположенных ближе к главному соцветию, а позднее - побеги из нижних узлов. В то же время для мутантных форм с ускоренным развитием характерно базитонное ветвление (в направлении снизу вверх). Отрастание боковых побегов начинается от основания главного стебля. Было отмечено, что изменение архитектуры растения способствует большей устойчивости растений рапса к полеганию. При дружном зацветании нескольких побегов почти одновременно с главным сокращаются сроки созревания основной массы семян.

Биохимический анализ показал, что в трех из отобранных мутантных линий семена содержат жира на 3-5,5% больше чем в исходном сорте (табл.1). Было выявлено, что в составе жира из семян 5 линий количество олеиновой кислоты (C 18:1) увеличено на 6-7,5% по сравнению с исходным сортом, а линолевой (18:2) и линоленовой (18:3) ЖК снизилось на 2-5% и 1,4-2,5% соответственно. Также семена полученных линий содержат значительно меньше, на 1,6-3%, клетчатки. Однако в линиях в семенах которых отмечено повышение жирности, наблюдалось снижение содержания белка.

Таблица 4.1.1 - Биохимический состав семян мутантных линий с измененным типом ветвления

Линия, №	Основные жирные кислоты, % в жире							Содержание в семенах, %		
	C16:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	клетчатка	жир	протеин
Викрос	3,95	64,12	19,86	9,82	0,62	1,51	0,34	9,8	46,5	21,5
834-7	3,86	70,3	15,54	7,72	0,57	1,13	0,25	7,68	49,18	21,06
834-10	3,63	71,51	14,84	7,47	0,61	1,13	0,26	7,13	51,15	20,19
834-14	3,82	67,17	17,46	7,88	0,55	1,12	0,26	7,24	46,76	23,81
834-16	3,89	71,27	15,18	7,24	0,58	1,17	0,26	8,21	47,43	19,69
834-13	4,01	69,42	15,61	8,49	0,53	1,22	0,23	6,72	49,89	19,31
834-17	3,72	71,58	14,57	7,41	0,58	1,09	0,26	8,19	47,23	19,88

Таким образом, скороспелые линии с ускоренным развитием базальных побегов, отобранные в варианте «0.03% ЭМС» обладают рядом преимуществ по сравнению с исходным сортом (диким типом). Основная масса стручков образуется на мощных хорошо развитых нижних побегах, цветение и созревание семян происходит в равных погодных условиях, не растянуто по времени, что исключает матрикальную разнокачественность семян, причиной которой является асинхронность органообразовательных процессов [11]. Семена отличаются повышенным содержанием жира, улучшенным ЖКС и пониженным содержанием клетчатки. Ранее подобные изменения ветвления и развития были отмечены у мутантов *Verbenacandensis* Britt., *Petuniahybrida* Voss., *Salpiglossissinuate* L.

Как показали наблюдения, окраска семян в потомстве растений желтосемянных мутантных линий зависит от температуры воздуха. Так, если их формирование и созревание происходит при среднесуточной температуре 15-18°C, окраска семени будет темной или пятнистой за счет накопления проантоцианидинов, а при температуре выше +24°C количество светлоокрашенных семян возрастает. Первые семена всех растений одной линии из светлой или темной фракций, завязавшиеся на соцветиях, начавших цвести 10-12 июля, были темными. Семена, образовавшиеся в период с 25 по 10 августа, были с желтыми пятнами разной площади. У растения линии 998-9 семена с одного из изолированных соцветий были полностью желтыми и проросшими. В то же время, у растений из коричневосемянной фракции светлосемянной линии, образовались семена с зеленоватой оболочкой. При этом у красnoseмянных родительских форм первые семена были темными, а более поздние – с красноватыми пятнами. В то же время, количество клетчатки, жира и белка у семян сходной окраски различалось в зависимости от исходной линии.

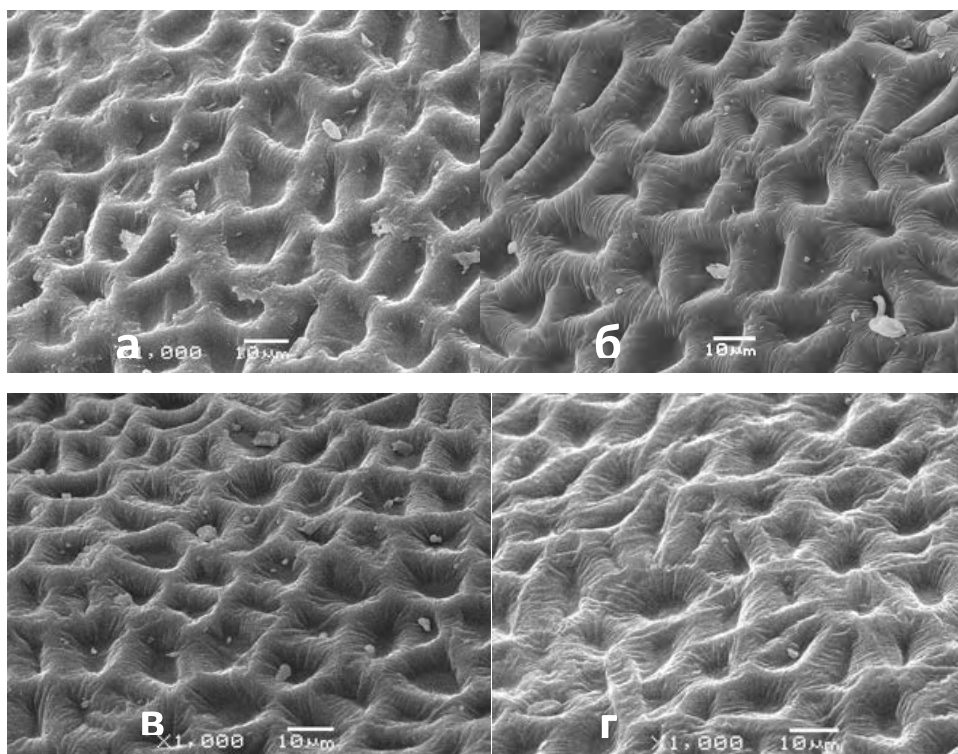


Рисунок 4.1.3. Особенности поверхности семян дикого типа и мутантных форм с измененной окраской. Ваг = 10µк. а) Викрос', б) линия №79-4-23, в) желто-оранжевая (В) г) желтая с коричневыми крапинками, линия №80-8-21. Видно, что ячейки «желтой» оболочки мельче и с более широкими краями.

Было установлено, что у темноокрашенных семян дикого типа толщина оболочек варьировала от 70 до 80 мкм, а содержание сырой клетчатки (СК) было 8,5-9,5%. У желтых и зеленых семян толщина оболочки не превышала 12 – 25 мкм, а содержание СК - 6,0-7,5%. В то же время, в семенах со светло-коричневыми и коричневыми пятнами толщина оболочки варьировала в среднем от 18 до 42 мкм, была тоньше на участках со светло-коричневой окраской, а содержание СК также было ниже, чем у дикого типа - около 7,0-7,5%. При этом, у темноокрашенных семян при равном содержании СК 8-8,5% содержание жира варьировало от 39 до 48%. В тоже время, при содержании жира около 45% содержание клетчатки в семенах было 4,6% (линия №808-77-13), 6,2% (линия №808-21-50), 7,2% (80-8-21-5), 9,35% (линия 79-20-36-6).

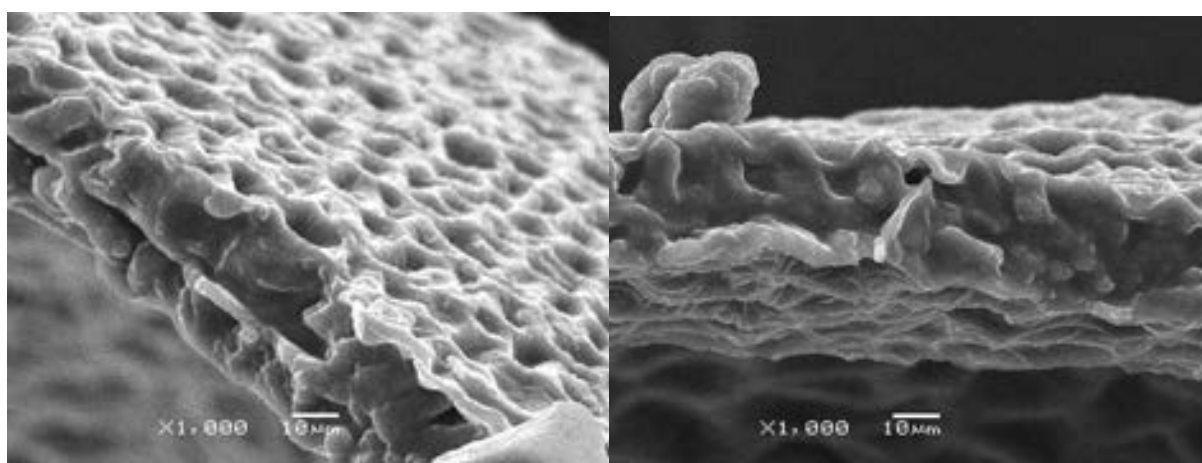


Рисунок 4.1.4 Толщина оболочки семян дикого типа и мутантной формы с желто-оранжевой окраской. Bar =10μк. Слева ‘Викрос’, справа фрагмент желто-оранжевой оболочки семени линии №80-8-21. На левом фото отчетливо видны 2 слоя, из которых состоит оболочка.

4.1.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее [16] было показано, что повышение экспрессии фактора WRINKLE1 (WR11) из семейства транскрипционных факторов APETALA2 вызывает усиленное развитие боковых побегов и ускорение их цветения, способствует повышенному накоплению в листьях и семенах растворимых углеводов, которые активно преобразуются в запасные триглицериды, препятствует образованию эруковой кислоты и улучшает композицию ЖК в семенах озимого рапса. Фенотипическое сходство и особенности развития полученных нами мутантных форм, и трансгенных растений, созданных для изучения роли WR11,

позволяют предположить, что в нашем случае фенотипические изменения также могут быть обусловлены фактором WR11.

Таким образом, сравнительный анализ содержания сырой клетчатки, жира и белка в семенах с оболочками желто-оранжевого, и различными оттенками коричневого тонов, у мутантных линий ярового рапса показало слабую зависимость этих признаков. Семена не только желтой, но и коричневой окраски могут иметь достаточно тонкую семенную оболочку при высоком содержании запасных жиров и белка. Кроме того, предварительные наблюдения показали, что сильная зависимость окраски семян рапса от температуры воздуха препятствует получению стабильных по этому признаку форм. В условиях холодной сырой погоды семена, в оболочках которых не содержится достаточно проантоцианидинов будут прорасти в стручках или погибнуть в результате инфицирования микроорганизмами. Таким образом, целесообразнее для данных условий получить стабильные линии с пониженным содержанием клетчатки и лигнина, высоким содержанием белка и жира.

4.1.5 ССЫЛКИ

1. Singer S.D., Weselake R.J., Habibur R. // BMC Genetics. -2014. - V. 15. - P. 94-104.
2. Широкова А., Воловик В., Коровина Л. и др. // науч. ред. В. Романюк. Фаленты-Варшава : Ин-т технол. и естеств. наук. - 2016. - Т. XXII. - С. 222-225.
3. Wu G., Wu Y., Xiao L. et al. // Theor Appl Genet. - 2008. - V. 116. - P. 491–499.
4. Badani, A. G., Snowdon, R. G., Wittkop, B. et al. // Genome. - 2006. - V. 49. - P.1499–1509.
5. Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M. et al. // Annu. Rev. Plant Biol. - 2006. - V. 57. - P. 405–430.
6. Qu, C., Fu, F., Lu, K. et al. // J. Exp. Bot. - 2013. - V. 64. - P. 2885–2898.
7. Debeaujon I., Peeters A. J. M., Léon-Kloosterziel et al. // Plant Cell. - 2001. - V. 13. - P. 853.
8. Qu C., Zhao H., Fu F. et al. // Front. Plant Sci. - 2016. - V. 7. - P. 1755-1772.
9. Tang Z., Li J., Zhang X. et al. // Plant Breed. - 1997. - V.116. - P. 471–474.
10. Meng, J., Shi, S., Gan, L. et al. // Euphytica. - 1998. - V. 103. - P. 329–333.
11. Winkel-Shirly B. // Seed Sci. Res. 1998. - V. 8. - P. 415-422.
12. Scalbert A. // Phytochemistry. - 1991.- V.30. - P. 3875-3883.
13. Rice-Evans C.A. Miller N.J., Paganga G. // Trends Plants Sci. - 1997. - V. 2. - P.152-159.
14. Rahman M. // Plant Breed. -2001. -V.120. -P. 463–472.
15. Deynze, A. V., Beversdorf, W., and Pauls, K. // Can. J. Plant Sci. - 1993. - V. 73. - P. 383–387.

РАЗДЕЛ 5. Влияние убиквитилирования гистонов на динамику нуклеосом

5.1. ВВЕДЕНИЕ

Убиквитилирование гистонов играет важную роль в поддержании стабильного профиля экспрессии генов клетки, и, соответственно, в поддержании здоровья человека. Приобретенные или наследуемые абнормальности профиля убиквитилирования гистонов нарушают корректную экспрессию генов [1, 2] и приводят к различным заболеваниям включающим онкологические заболевания [3-5], нарушения метаболизма [6, 7], аутоиммунные заболевания [8, 9] и др. Исследование регуляторной роли убиквитилирования гистонов в процессах транскрипции и контроля динамики хроматина имеет ключевое значение для разработки методов диагностики и лечения этих заболеваний.

Как известно, базовой единицей упаковки хроматина является нуклеосома – состоящая из двух димеров гистоновых белков H2A-H2B и одного тетрамера гистонов (H3-H4)₂, с дважды «навитым» фрагментом ДНК размером ~147 пар нуклеотидов [10]. Нуклеосома, в своей «канонической» конформации, имеет жесткую, статичную структуру, несовместимую с протекающими на ДНК процессами. При этом, в активном хроматине нуклеосомы высокодинамичны, практически не препятствуют транскрипции ДНК, способны обмениваться димерами H2A-H2B и т.п. [11-13] Это означает, что для активация хроматина должна сопровождаться теми либо иными изменениями структуры нуклеосом [12, 14].

Функционирование генома зависит от т.н. эпигенетической «программы» активности генов, которая осуществляется за счет «кодирования» (модификации) гистонов (т.н. «гистоновый код»). До сих пор не ясно, как гистоновый код «транслируется» в те или иные перестройки нуклеосом - активирующие или репрессирующие работу генов. По современным представлениям модификации гистонов служат, в основном, только регуляторными «сигналами» распознаваемыми энзиматическими механизмами клетки. Как предполагается, модификации гистонов не оказывают какого-либо значительного влияния на структуру упаковки ДНК, а являются лишь специфическими «метками» для систем экспрессии генов. В этом контексте убиквитилирование гистонов представляет особый интерес, поскольку объемный остаток убиквитина должен вызывать значительные напряжения в структуре нуклеосомы. Однако,

влияние убиквитилирования гистонов на структуру и динамику нуклеосом во многом неясно, ряд опубликованных данных зачастую противоречат друг другу.

Убиквитилирование гистонов играет критическую роль в регуляции ряда основных процессов функционирования хроматина, включая как регуляцию взаимодействия хроматина с клеточными системами транскрипции и репликации [15-19], так и непосредственно модулируя вторичную («наднуклеосомную») структуру хроматина [20-21]. Наша основная гипотеза предполагает что убиквитилирование гистонов непосредственно регулирует структурную динамику нуклеосом, что является биофизической основой регуляции активности хроматина. Целью данного исследования являлось использование новейших биохимических и биофизических подходов для комплексного исследования роли убиквитилирования гистонов в молекулярных механизмах регуляции структуры и динамики нуклеосом, и, соответственно, генерировании «гексасом» - функционально-активных интермедиатов нуклеосомных частиц, играющих критическую роль в процессе транскрипции.

Исследование сфокусировано на исследовании роли убиквитилирования гистонов H2B по остаткам лизина K34 and K120 (H2BK34ub and H2BK120ub).. Эти

модификации гистонов играют важную роль в процессе элонгации транскрипции и регуляции ассоциированных с транскрипцией модификаций хроматина [22-24]. В частности, H2BK34ub вносимое комплексом MOF-MSL, является первичным регулятором H2BK120ub; кроме того, MOF-MSL также осуществляет ацетилирование гистонов H4 по остатку лизина K16 [22-23]. Мы предполагаем, что убиквитилирование H2BK34 and H2BK120 существенно увеличивает мобильность димеров гистонов H2A-H2B и приводит к диссоциации одного из димеров с образованием «гексасом» - функционально-активных интермедиатов нуклеосом, содержащих только один димер H2A-H2B.

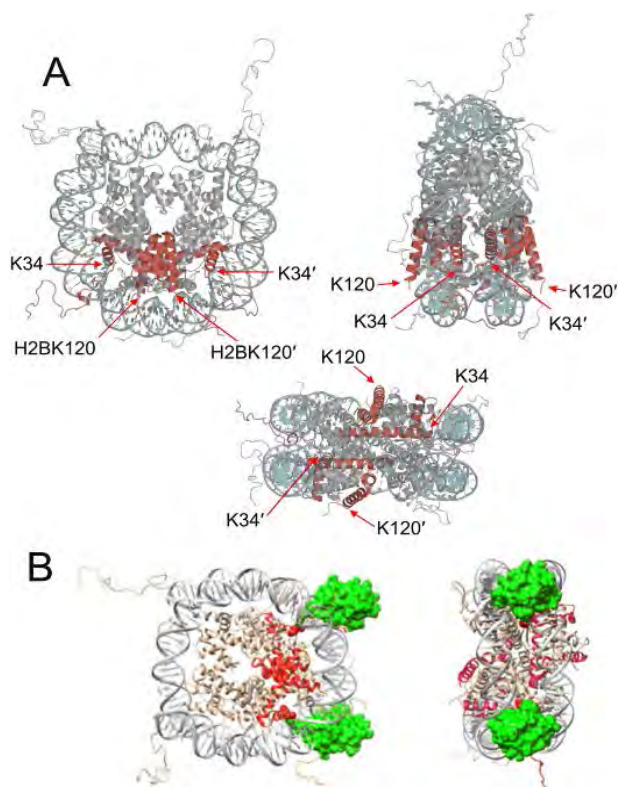


Рисунок 5.1 - (А) Структура нуклеосомы (PDBID 1jux5) в трех проекциях, гистон H2B выделен красным цветом. Показано расположение H2BK34 и K120. (В) Структурная модель H2BK34ub нуклеосомы, (адаптировано: Li et al. (2017) *ChemBiochem*, 18, 176–180). Остаток убиквитина выделен зеленым цветом.

В ряде недавних работ было показано, что лабильные гексасомные частицы [25] являются

ключевым элементом большинства, если не всех, процессов функционирования хроматина [25-27].

Участок лизина K34 гистона H2B в нуклеосоме расположен в ограниченном пространстве между двумя сверхвитками ДНК [10, 28] (рис. 5.1), и следовательно, убиквитилирование H2BK34 может приводить к значительной деформации нуклеосомы вследствие значительных напряжений структуры возникающих при присоединении объемного (76 аминокислот) фрагмента убиквитина. Эти структурные напряжения могут значительно увеличивать динамику нуклеосомной частицы и способствовать генерированию гексасом. Примечательно, что лизин K34 гистона H2B расположен в высококонсервативном «HBR» домене гистона (H2B_{repression domain} [29-31]), мутации в котором нарушают репрессию генов в дрожжах, вероятно вследствие изменения стабильности нуклеосом [29-31]. В случае H2BK120ub, несмотря на то, что остаток K120 H2B предположительно расположен на периферии нуклеосомы, присоединение объемного фрагмента убиквитина также может приводить к значительным «механическим» напряжениям в структуре нуклеосом, влияющим на стабильность димеров H2B.

5.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали комплекс стандартных биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов. Использовались в основном, стандартные биохимические и генно-инженерные методы, такие как реконструкция нуклеосом из рекомбинантных гистонов и ДНК, содержащей последовательности ДНК с повышенной аффинностью к октамеру гистонов, оценка структуры нуклеосом с помощью гидролиза микрококковой нуклеазой, а также посредством изучения профиля миграции образцов нуклеосом в полиакриламидных гелях и другие схожие методы. Для реконструкции модифицированных нуклеосом использовали рекомбинантные гистоны *Xenopus laevis* и «химически» синтезированные аналоги модифицированных гистонов H2BK34ub и H2BK120ub [34].

5.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5.3.1 Модифицированные (H2BK34ub) нуклеосомы имеют «нестандартный» профиль сборки *in vitro*. Убиквитилированные гистоны были приготовлены методом пептидного лигирования (34) (рис. 5.2А). левая панель).

Для сборки нуклеосом, смесь гистонов и ДНК (147-нуклеотидная последовательность «601» с высокой аффинностью к октамерам гистонов (35)) в 2MNaCl последовательно разбавляли до 100-200 mMNaCl(36). Продукты сборки анализировали в нативном 5% полиакриламидном геле (рис. 2А) с последующей окраской SYBRCold. По сравнению с немодифицированными гистонами, реконструкция H2BK34ub октамеров приводила к значительному количеству частиц с повышенной электрофоретической подвижностью.

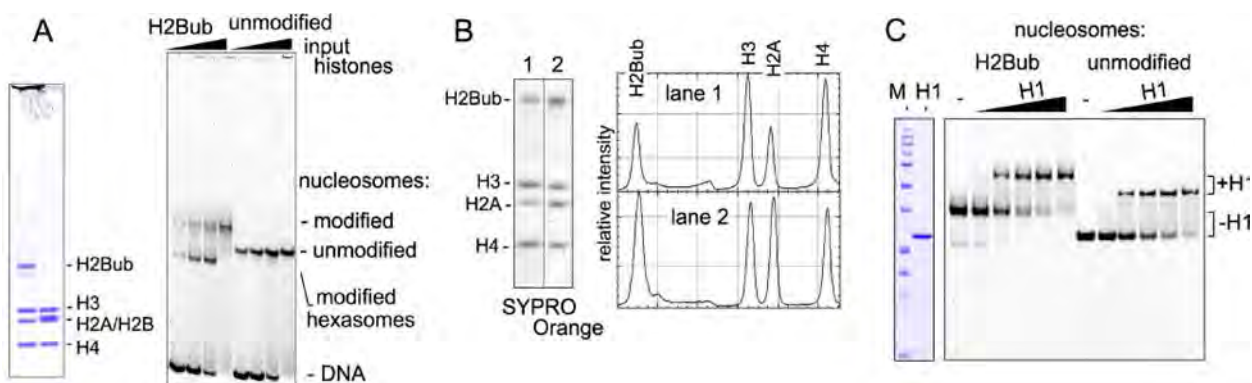


Рисунок 5.2 - Реконструкция нуклеосом с использованием модифицированных гистонов H2BK34ub. (А) Левая панель: денатурирующий электрофорез модифицированных и немодифицированных гистонов. Правая панель: – нативный электрофорез нуклеосом реконструированных на 147 п.н. 601 ДНК с использованием увеличивающихся количеств модифицированных и немодифицированных гистонов (В) Денатурирующий электрофорез модифицированных гексасом (дорожка 1) и нуклеосом (дорожка 2); гель окрашен SyproOrange. (С) H2BK34ub и немодифицированные нуклеосомы реконструировали на 177 п.н. 601 ДНК и далее инкубировали в течение 2 ч в присутствии увеличивающихся количеств гистона H1. По завершении электрофореза гели окрашивали SYBRGold.

Эти частицы были экстрагированы из нативного геля и, далее, анализированы в денатурирующем геле, что выявило вдвое уменьшенное содержание димеров гистонов H2B (рис. 5.2В, дорожка 1) по сравнению с более медленно мигрирующими нуклеосомами (рис. 5.2Б, дорожка 2), подтверждая, что более быстро мигрирующие частицы являются гексасомами. Такой профиль сборки нуклеосом свидетельствует о нарушенной «кооперативности» между модифицированными димерами гистонов H2A-H2B, очевидно вследствие структурных напряжений в нуклеосоме из-за включения остатков убиквитина. Однако, модификация H2BK34ub практически не сказывалась на эффективности включения гистонов H1, свидетельствуя, что H2BK34ub не нарушает базовые принципы нуклеосомной организации (рис. 5.2С).

5.3.2 Упругие напряжения ДНК влияют на стабильность H2BK34ub нуклеосом. Модифицированные и немодифицированные нуклеосомы реконструировали на отрицательно или положительно сверхспирализованной, или «никованной» (содержащей одноцепочечный разрыв) плазмидной ДНК (рис. 5.3А). Положительно сверхспирализованную плазмидную ДНК получали лигированием никованной ДНК в присутствии антибиотика нетропсина [27, 38]. Используемая плазида (p601-177x12) содержала 12 копий 177-нуклеотидных последовательностей ДНК 601, разделенных сайтами эндонуклеазы *ScaI*. Реконструированный хроматин обрабатывали *ScaI* для «разделения» нуклеосом, и анализировали полученные индивидуальные нуклеосомы в нативном геле. По сравнению с «никованной» ДНК, образование гексасом было существенно более выражено в случае отрицательно сверхспирализованной ДНК, и менее выражено – в случае положительно сверхспирализованной ДНК (рис. 5.3А). Наиболее вероятно, этот эффект объясняется тем, что энергия положительной сверхспирализации ДНК (дестабилизирующая, «разворачивающая» нуклеосомы [11, 39, 40] компенсирует напряжение структуры H2BK34ub нуклеосом, вызванное ассоциацией H2В с остатком убиквитина, и тем самым способствует встраиванию второго димера H2А-H2Вubв нуклеосомы. Аналогично, отрицательная сверхспирализация ДНК, способствующая компактной структуре нуклеосом [11, 39, 40], увеличивает напряжение структуры H2BK34ub нуклеосом, тем самым ингибируя встраивание второго димера H2А-H2Вub в нуклеосомы.

5.3.3. Симметрично и асимметрично модифицированные H2BK34ub нуклеосомы легко диссоциируют с образованием гексасом. При реконструкции нуклеосом с использованием смеси немодифицированных и H2BK34ub гистонов происходит эффективная сборка «асимметрично» модифицированных нуклеосом (- т.е. содержащих один модифицированный, и один немодифицированный димер H2А-H2В). Асимметрично-модифицированные нуклеосомы мигрируют на геле между немодифицированными и полностью модифицированными нуклеосомами (рис. 5.3В). Влияние симметричного или асимметричного H2BK34-убиквитиления на стабильность нуклеосом (рис. 5.3В) оценивали при инкубации реконструированных нуклеосом в присутствии избытка плазмидной ДНК как сравнительного «неспецифического» акцептора гистонов. В полностью модифицированных нуклеосомах один (и только один) из димеров H2А-H2В эффективно диссоциировал с образованием гексасом. Асимметрично-модифицированные H2BK34ub нуклеосомы были более стабильны, но тем не менее один из димеров H2А-H2В также достаточно легко диссоциировал в присутствии акцептора гистонов.

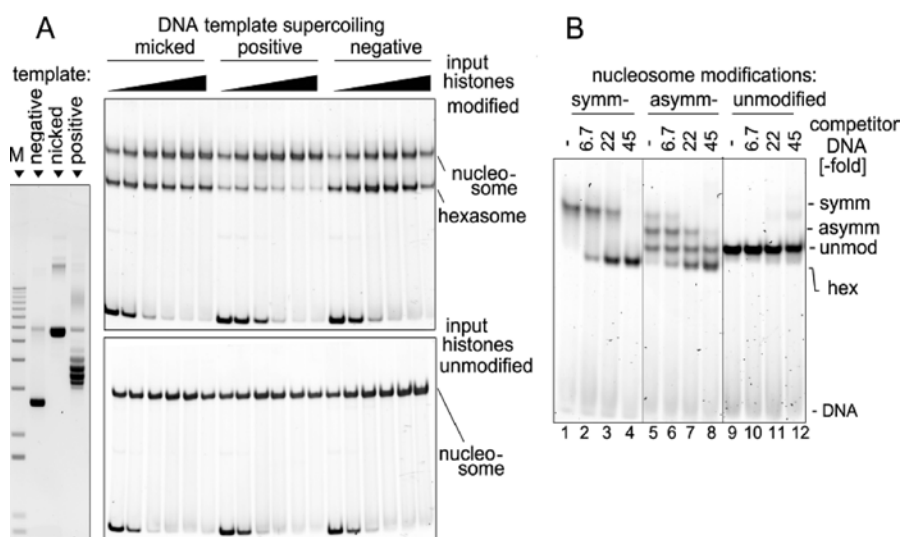


Рисунок 5.3 - Эффект сверхспирализации ДНК и акцептора гистонов на стабильность модифицированных (H2BK34ub) нуклеосом. (А) *Левая панель:* электрофоретический анализ положительно- и отрицательно сверхспирализованных плазмид в 1.2% геле агарозы. *Правая панель:* анализ H2BK34ub (*верх*) и немодифицированных (*нижняя панель*) нуклеосом реконструированных на положительно и отрицательно сверхспирализованной и «никованной» ДНК. (В) Нуклеосомы реконструированные на 147 п.н. 601 DNA с использованием модифицированных (дорожки 1-4) и немодифицированных (9-12) гистонов, или их 1:1.78 смеси (5-8), инкубировали (при 200мМ NaCl) в течение 2 ч с «конкурентной» ДНК (указаны массовые соотношения конкурентной ДНК и октамера гистонов), после нуклеосомы чего анализировали в нативном геле.

5.3.4. Образование симметрично-модифицированных H2BK34ub термодинамически менее выгодно чем асимметрично-модифицированных или немодифицированных.

Модифицированные и немодифицированные гистоны смешивали в различных пропорциях и использовали для сборки нуклеосом на 147 п.н. 601 DNA (рис. 5.4) методом ступенчатого разбавления из 2М NaCl. Как симметрично, так и асимметрично модифицированные нуклеосомы формировались со значительно меньшей эффективностью, чем можно было предположить исходя из соотношения гистонов. Следует отметить, что различие между предполагаемой и наблюдаемой эффективностью сборки было значительно более выражено для полностью модифицированных гистонов, по сравнению с асимметрично-модифицированными гистонами. Асимметрично-модифицированные нуклеосомы также формировались с меньшей эффективностью, чем немодифицированные нуклеосомы. Это свидетельствует, что H2BK34ub ингибирует субсборку немодифицированных гексасом до асимметрично-модифицированных нуклеосом.

Сходные результаты были получены и в случае когда сборку нуклеосом производили при физиологической ионной силе (100 мМ) с использованием переносчика гистонов Nap1 (не показано).

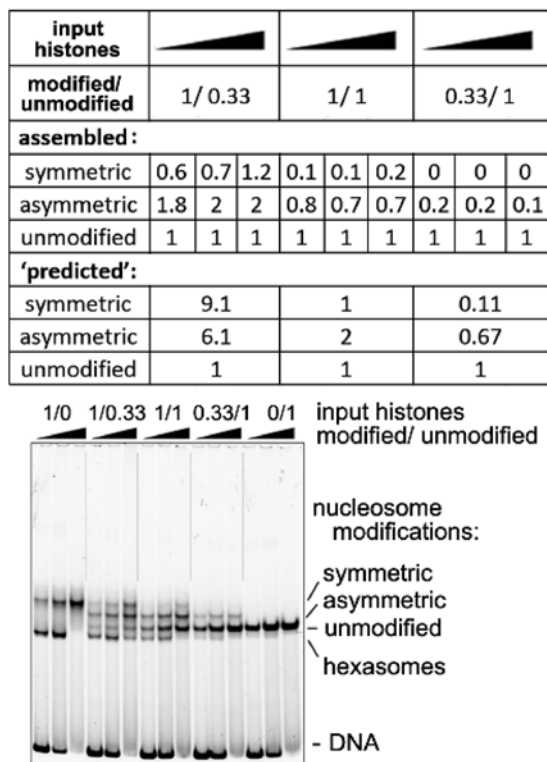


Рисунок 5.4 - Сравнительная стабильность симметрично- и асимметрично модифицированных нуклеосом. Нуклеосомы реконструировали на 147 п.н. 601 ДНК используя смесь модифицированных и немодифицированных гистонов, что приводило к образованию немодифицированных, полностью модифицированных и асимметрично модифицированных нуклеосом. Анализ продуктов сборки в нативном геле показан на нижней панели. Таблица показывает соотношение различно модифицированных продуктов. Ожидаемые ('predicted') значения предполагают что H2BK34ub не влияет на сборку H2A-H2B димеров гистонов.

5.3.5. Модифицированные (H2BK34ub) нуклеосомы проявляют повышенную структурную динамику. При проведении электрофореза при повышенной температуре (35-37°C) модифицированные нуклеосомы формировали весьма диффузный электрофоретический профиль (рис. 5.5A). Повышение температуры геля достигалось незначительным увеличением ионной силы буфера (2xTAE, 20 mM NaCl). При понижении

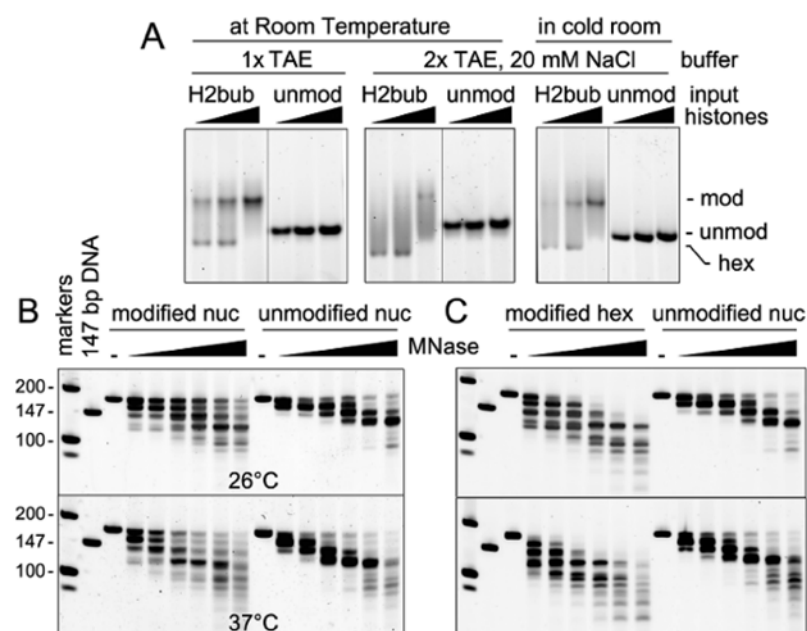
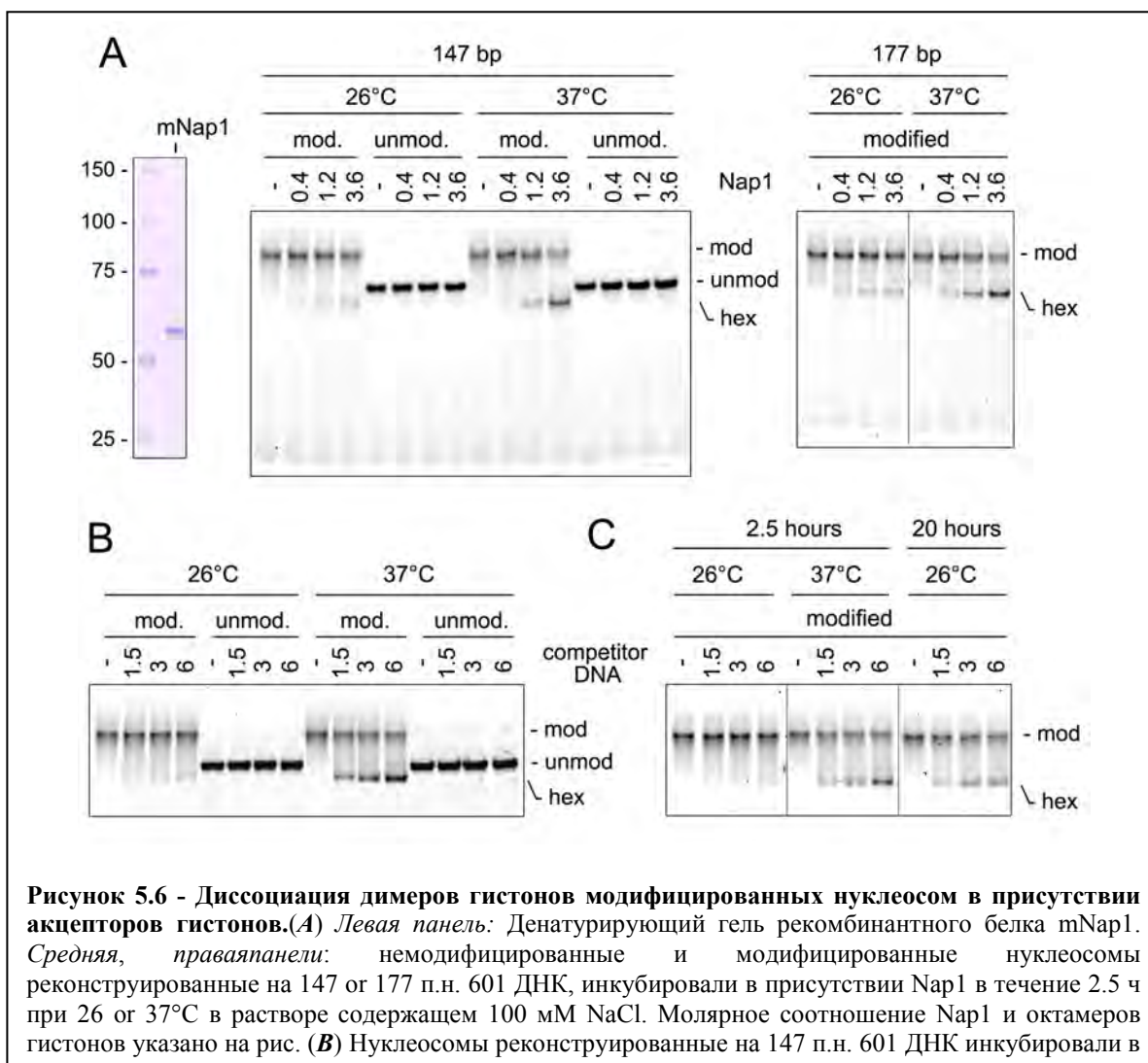


Рисунок 5.5 - H2BK34ub нуклеосомы обладают повышенной структурной динамикой. (A) Модифицированный и немодифицированные нуклеосомы реконструировали на 177 п.н. 601 ДНК в присутствии увеличивающихся количеств гистонов, после чего нуклеосомы анализировали в нативном полиакриламидном геле при указанных условиях. В случае когда электрофорез в буфере содержащем 2xTAE-20mMNaCl проводили при комнатной температуре, температура геля была ~35-37°C. (B) Модифицированные и немодифицированные нуклеосомы и (C) модифицированные гексасомы и немодифицированные нуклеосомы гидролизовали микрококковой нуклеазой 20 мин при 26 или 37°C, после чего очищенную ДНК анализировали в 6.5% полиакриламидном геле.

температуры (электрофорез проводили в холодной комнате) наблюдалось восстановление профиля миграции модифицированных нуклеосом (рис. 5.5A). Диффузный профиль миграции модифицированных нуклеосом наиболее вероятно отражает повышенную структурную динамику нуклеосомной структуры вследствие увеличения транзитного «разворачивания» ('unwrapping'(25)) нуклеосомной структуры ДНК без сопутствующей диссоциации нуклеосомы до гексасомы. Это согласуется с более «протяженным» профилем гидролиза H2BK34ub нуклеосом микрококковой нуклеазой, которая эффективно расщепляет ДНК слабо ассоциированную с октамером гистонов, в то время как ДНК в составе компактного нуклеосомного кора для нуклеазы значительно менее доступна. Примечательно, что различие профиля расщепления H2BK34ub и немодифицированных нуклеосом было более выражено при 37°C чем при 26°C (рис. 5.5B). Наблюдаемые эффекты не были обусловлены диссоциацией димеров H2A-H2B при гидролизе нуклеазой, поскольку профили нуклеазного гидролиза нуклеосом и гексасом

заметно различались (рис. 5C). Вместе взятые, эти результаты свидетельствуют о гетерогенности структуры H2BK34ub нуклеосом – одновременно присутствии более компактных и менее компактных интермедиатных конформаций нуклеосомной частицы. При увеличении температуры динамика нуклеосомной структуры заметно возрасла.

5.3.6. Диссоциация гистонов модифицированных нуклеосом в присутствии белка Nap1. Переносчик гистонов Nap1, играющий ключевую роль в *in vivo* процессах обмена димеров гистонов нуклеосом и генерировании гексасом, способствовал эффективной диссоциации



одного из димеров H2A-H2B модифицированных нуклеосом, приводя к образованию стабильных гексасомных частиц (рис. 5.6). Примечательно, что Nap1 генерировал значительное количество гексасом в случае модифицированных нуклеосом, но практически не вызывал конверсии немодифицированных нуклеосом. В соответствии с приведенными выше результатами, диссоциация модифицированных нуклеосом была

значительно более эффективна при 37°C по сравнению с 25°C. Конверсия модифицированных нуклеосом в гексасомы также происходила в присутствии «неспецифического» акцептора гистонов – избытка плазмидной ДНК (рис. 5В, С), причем в этом случае также была значительно выражена зависимость образования гексасом от температуры. Это свидетельствует, что при повышенной температуре структурная динамика модифицированных нуклеосом значительно увеличивается. Инкубация модифицированных нуклеосом с избытком акцептора гистонов при 26°C в течение 20 часов приводила к сравнимой с наблюдаемой при 37°C в течение 2,5 часов. Это означает, что перенос димера гистонов H2A-H2B на конкурентную ДНК ограничен при пониженной температуре за счет более низкой кинетики диссоциации димера H2A-H2B, которая значительно возрастает при увеличении температуры до 37°C.

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проведено детальное изучение влияния H2BK34ub на структурно-функциональные характеристики нуклеосом *in vitro*. Для реконструкции модифицированных нуклеосом были использованы «химически» модифицированные гистоны H2B. Нами было показано, что H2BK34ub оказывает значительное влияние на стабильность нуклеосом. В присутствии специфических (белок Nap1) или неспецифических (ДНК) акцепторов гистонов один (и только один) из димеров H2B легко диссоциирует от нуклеосом с образованием промежуточной структур – «гексасом». Примечательно, что гексасомы предполагают функционально-активной формой нуклеосом *in vivo*. Кроме того, H2B K34ub резко повышала структурную динамику нуклеосом.

Примечательно, что на стабильность H2BK34ub нуклеосом значительное влияние оказывала топология ДНК («положительные» или «отрицательные» напряжения двойной спирали ДНК). Этим впервые продемонстрирована регуляторная роль топологического статуса ДНК на структуру и динамику модифицированных нуклеосом.

Таким образом, нами впервые было показано, что модификации гистонов играют не только роль «сигналов» для регуляторных белков клетки, но также способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных интермедиатов нуклеосом. Так, влияние модификации H2BK34ub на структуру и динамику нуклеосомы сравнимо с эффектом энзиматических комплексов перестройки хроматина (напр. комплекс FACT [32, 33]). Это позволяет

выдвинуть концепцию эпигенетического «структурного кода» активности хроматина, наряду с существующей концепцией «сигнального кода» активности хроматина.

5.5 ССЫЛКИ

1. *Bhaumik S.R., Smith E., Shilatifard A.* // Nat. Struct. Mol. Biol. - 2007. V. 14. - P. 1008-1016.
2. *Mirabella A.C., Foster B.M., Bartke T.* // Chromosoma - 2016. V. 125. - P. 75-93.
3. *Cao J., Yan Q.* // Front Oncol. - 2012. V. 2. - P. 26.
4. *Cole A.J., Clifton-Bligh R., Marsh D.J.* // Endocr. Relat Cancer - 2015. V. 22. - P. T19-T33.
5. *Johnsen S.A.* // FEBS Lett. - 2012. V. 586. - P. 1592-1601.
6. *Gluckman P.D., Hanson M.A., Buklijas T., Low F.M., Beedle A.S.* // Nat. Rev. Endocrinol. - 2009. V. 5. - P. 401-408.
7. *Gao C., Huang W., Kanasaki K., Xu Y.* // Biomed. Res. Int. - 2014. V. 2014. - P. 160692.
8. *Dieker J., Muller S.* // Clin. Rev. Allergy Immunol. - 2010. V. 39. - P. 78-84.
9. *Zou B., Yang D.L., Shi Z., Dong H., Hua J.* // Plant Physiol - 2014. V. 165. - P. 309-318.
10. *Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J.* // Nature - 1997. V. 389. - P. 251-260.
11. *Esposito F., Sinden R.R.* // Oxf Surv. Eukaryot. Genes - 1988. V. 5. - P. 1-50.
12. *Krajewski W.A., Razin S.V.* // Mol. Biol. Rep. - 1993. V. 18. - P. 167-175.
13. *Saavedra R.A.* // Bioessays - 1990. V. 12. - P. 125-128.
14. *Krajewski W.A.* // Biochem. Biophys. Rep. - 2016. V. 5. - P. 492-501.
15. *Trujillo K.M., Osley M.A.* // Mol. Cell - 2012. V. 48. - P. 734-746.
16. *Weake V.M., Workman J.L.* // Mol. Cell - 2008. V. 29. - P. 653-663.
17. *Werner M., Ruthenburg A.J.* // Mol. Cell - 2011. V. 43. - P. 5-7.
18. *Zhou W., Wang X., Rosenfeld M.G.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. - 2009. V. 41. - P. 12-15.
19. *Whitcomb S.J., Fierz B., McGinty R.K., Holt M., Ito T., Muir T.W., Allis C.D.* // J. Biol. Chem. - 2012. V. 287. - P. 23718-23725.
20. *Fierz B., Chatterjee C., McGinty R.K., Bar-Dagan M., Raleigh D.P., Muir T.W.* // Nat. Chem. Biol. - 2011. V. 7. - P. 113-119.
21. *Machida S., Sekine S., Nishiyama Y., Horikoshi N., Kurumizaka H.* // Open. Biol. - 2016. V. 6. - P. 1-9.
22. *Wu L., Zee B.M., Wang Y., Garcia B.A., Dou Y.* // Mol. Cell - 2011. V. 43. - P. 132-144.
23. *Wu L., Lee S.Y., Zhou B., Nguyen U.T., Muir T.W., Tan S., Dou Y.* // Mol. Cell - 2013. V. 49. - P. 1108-1120.
24. *Wu L., Li L., Zhou B., Qin Z., Dou Y.* // Mol. Cell - 2014. V. 54. - P. 920-931.

25. Zlatanova J., Bishop T.C., Victor J.M., Jackson V., Van Holde K.E. // *Structure*. - 2009. V. 17. - P. 160-171.
26. 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. // *Biophys. J.* - 2017. V. 112. - P. 460-472.
27. Venkatesh S., Workman J.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2015. V. 16. - P. 178-189.
28. Harp J.M., Hanson B.L., Timm D.E., Bunick G.J. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 2000. V. 56. - P. 1513-1534.
29. Wyrick J.J., Parra M.A. // *Biochim. Biophys. Acta* - 2009. V. 1789. - P. 37-44.
30. Wyrick J.J., Kyriass M.N., Davis W.B. // *Biochim. Biophys. Acta* - 2012. V. 1819. - P. 892-901.
31. Zheng S., Crickard J.B., Srikanth A., Reese J.C. // *Mol. Cell Biol.* - 2014. V. 34. - P. 303-314.
32. Reinberg D., Sims R.J., III // *J. Biol. Chem.* - 2006. V. 281. - P. 23297-23301.
33. Winkler D.D., Luger K. // *J. Biol. Chem.* - 2011. V. 286. - P. 18369-18374.
34. Li J., He Q., Liu Y., Liu S., Tang S., Li C., Sun D., Li X., Zhou M., Zhu P., Bi G., Zhou Z., Zheng J.S., Tian C. // *Chembiochem.* - 2017. V. 18. - P. 176-180.
35. Thastrom A., Bingham L.M., Widom J. // *J. Mol. Biol.* - 2004. V. 338. - P. 695-709.
36. Krajewski W.A., Vassiliev O.L. // *Biochemistry* - 2010. V. 49. - P. 6531-6540.
37. Prunell A., Alilat M., De L.F. // *Methods Mol. Biol.* - 1999. V. 119. - P. 79-101.
38. Snounou G., Malcom A.D. // *J. Mol. Biol.* - 1983. V. 167. - P. 211-216.
39. Jackson V. // *Biochemistry* - 1993. V. 32. - P. 5901-5912.
40. Pfaffle P., Gerlach V., Bunzel L., Jackson V. // *J. Biol. Chem.* - 1990. V. 265. - P. 16830-16840.
41. Chen X., D'Arcy S., Radebaugh C.A., Krzizike D.D., Giebler H.A., Huang L., Nyborg J.K., Luger K., Stargell L.A. // *Mol. Cell Biol.* - 2016. V. 36. - P. 1287-1296.
42. Park Y.J., Luger K. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2008. V. 18. - P. 282-289.

5.6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

Krajewski, W., Li, J., Dou, Y. Effects of histone H2B ubiquitylation on the nucleosome structure and dynamics. submitted (NAR-00215-2018)

РАЗДЕЛ 6. Поиск новых генетических факторов, участвующих в детерминации пола насекомых

6.1 ВВЕДЕНИЕ

Дрозофила является традиционным модельным объектом генетических исследований. Данные, полученные при исследовании дрозофилы, могут объяснить биологические процессы, происходящие в организме других многоклеточных и даже человека. Известно, что 61% известных заболеваний человека имеют аналоги у дрозофилы, а 50% белковых последовательностей дрозофилы имеют сходство с последовательностями млекопитающих.

Половое поведение животных является важным фактором, влияющим на выживаемость и половую изоляцию видов. В настоящее время накоплено много данных о генах, участвующих в определении пола и формировании полового поведения дрозофилы. Однако общая картина взаимодействия между отдельными факторами далека от завершения. Ключевыми факторами, определяющими пол у дрозофилы являются *Sxl*, *tra*, *tra2*, *dsx*, *fru*. Многие гены, участвующие в определении пола, кодируют факторы транскрипции. Различия в их активности у самцов и самок определяют формирование морфологических и поведенческих половых признаков. Исследование новых генов с неизвестными функциями может дополнить картину формирования полового поведения.

Дрозофила имеет сложно организованное половое поведение [1, 2]. Спариванию предшествует процесс ухаживания, включающий несколько стадий: преследование самцом самки, ощупывание самцом брюшка самки, лизание самцом гениталий самки, пение самца и пение самки, кружение самца вокруг самки, попытку копуляции (к попыткам копуляции можно отнести те активные действия самца, которые не заканчиваются копуляцией). Во время ухаживания между самцом и самкой происходит обмен сигналами разной природы: химическими, акустическими, зрительными и тактильными.

В настоящее время у *Drosophila melanogaster* известно около 100 генов, мутации в которых приводят к изменению полового поведения. Косвенно влиять на половое поведение могут любые мутации, ослабляющие организм, или мутации, имеющие сильное фенотипическое проявление. Накоплены данные о плеiotропных генах, снижающих способность к ухаживанию. Например, мутация в гене *yellow* определяющего окраску кутикулярных структур дрозофилы, приводит также к укорачиванию стадии вибрации крылом у самцов [3]. Мутация в гене *enoby*, изменяющая окраску кутикулярных структур, также влияет на поведение. Эта мутация сопровождается изменением количества дофамина в мозге мух, что приводит к изменению в двигательной активности [4]. В то же время мутаций, которые приводят к дефектам только полового поведения, известно немного. Одним из относительно недавно открытых генов, влияющим на некоторые аспекты полового поведения самцов, является *quick-to-court (qtc)* [5]. Проявление гена *qtc*

отличается специфичностью - многие аспекты полового поведения у самцов не меняются на фоне мутации. Не обнаружено морфологических изменений у мух с мутацией. Фенотипически мутация проявлялась в укорачивании процесса ухаживания. Самцы с мутацией *qtc*, помещенные к вергильной самке, начинают спаривание слишком быстро. Кроме того, увеличивается число попыток спаривания самцов с самцами, что может быть следствием повышенной сексуальной активности в целом. Нет данных о влиянии *qtc* на поведение самок, хотя транскрипты *qtc* обнаружены как у самцов, так и у самок, при этом различия в уровне транскрипции невелики. Обнаружено несколько м-РНК *qtc*, образующихся благодаря альтернативному сплайсингу. 2,4 тпн транскрипт *qtc* обнаружен примерно в одинаковом количестве в головах и антеннах самцов и самок. Также в головах обнаружено присутствие в небольшом количестве 4,4 тпн транскрипта. В небольшом количестве 2,4 тпн транскрипты обнаружены в теле самцов и самок в зонах, связанных с генеративными органами. Есть данные о том, что снижение экспрессии *qtc* влияет на способность самцов определять полового партнера с помощью феромонов. Снижение экспрессии *qtc* при помощи РНК интерференции в грибовидных телах (структурах, участвующих в процессах памяти и обучения) нарушало способность самцов определять самку с помощью хеморецепции, в то время как снижение экспрессии только в во вкусовых и хемосенсорных периферических нейронах не оказывало влияния на этот процесс [6]. Вероятно, этот ген связан не только с восприятием феромонов, поскольку транскрипты *qtc* обнаружены в зонах головы, не связанных с хеморецепцией – втором сегменте антенн, сетчатке и в оптической доле головного мозга [5].

Основной задачей исследования являлось выяснение механизма действия гена *qtc* в формировании полового поведения у дрозофилы. Анализ делеционных мутантов остается одними из самых популярных и эффективных методов в изучении функции генов. В работе нами был использован делеционный мутант по гену *qtc*, полученные в нашей лаборатории с помощью оригинального метода с использованием репарации индуцированного двухцепочечного разрыва [7]. Для исследования различных стадий ухаживания применялись современные методы видеотипирования с последующей компьютерной обработкой (программное обеспечение VirtualDub 1.10.3.). Поскольку эффекты мутаций *qtc* на половое поведение самок ранее не были изучены, мы проанализировали как самцов, так и самок с разными уровнями экспрессии *qtc*.

Исследование гена *qtc*, мутации в котором приводят к повышению половой активности самцов актуально, учитывая популярность современных методов контроля насекомых, вредителей сельского хозяйства и переносчиков заболеваний млекопитающих и человека.

6.2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перед постановкой поведенческих тестов мухи содержались на стандартной питательной среде (агар, манная крупа, дрожжи, сахар, изюм) в стандартных пробирках (высота 100 мм, диаметр 25 мм) с поддержанием постоянной температуры 21-22°C и двенадцатичасового светового дня. После вылета из куколок имаго отбирались по полу с использованием холода. Аристы удалялись при помощи микрохирургических ножниц на следующий день после отбора. Виргинные самки и неспарившиеся самцы содержались в отдельных пробирках, после чего рассаживались попарно в пробирки с кормом. Эксперименты проводили в стандартных пробирках. Каждая муха в тестах использовалась только один раз. Предварительно в пробирки со свежим кормом с помощью аспиратора рассаживались самки, к которым затем через фиксированные интервалы времени подсаживались самцы также с помощью аспиратора. С момента образования пары в пробирке для теста фиксировались следующие показатели: латентное время ухаживания (время от заброса самца к самке до начала ухаживания), длительность ухаживания (время от начала ухаживания до копуляции) и количество мух, вступивших в копуляцию. Проводилось три варианта экспериментов: с интактными самкой и самцом, с интактной самкой и самцом, у которого за сутки до теста удалялись аристы, с самкой, у которой за сутки до теста удалялись аристы и интактным самцом.

Яичники выделяли у 10 пятидневных самок с делецией *qtc*, контрольных со сходным генетическим фоном и *Oregon* как описано в протоколе [8], затем окрашивали по DAPI. Таким же образом выделяли и окрашивали семенники у самцов. Далее препарат были проанализированы методом флуоресцентной микроскопии.

6.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученная нами делеция является летальной, поэтому все исследования проводили на гетерозиготных особях. Для постановки поведенческих тестов мух с делецией скрещивали с особями линии *Oregon*, получая таким образом мух дикого типа по гену *yellow* и *white*, которые важны для нормального полового поведения.

Делеция гена *qtc* не оказывала значительного влияния на количество дрозофил, вступавших в копуляцию (табл. 6.1).

Таблица 6.1 - Число (доля, %) тестов, в которых произошла копуляция.

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

У особей, несущих делецию гена *qtc*, средняя длительность латентного периода практически не изменялась, зато среднее время ухаживания значительно уменьшалось по сравнению с контролем (рис. 6.1).

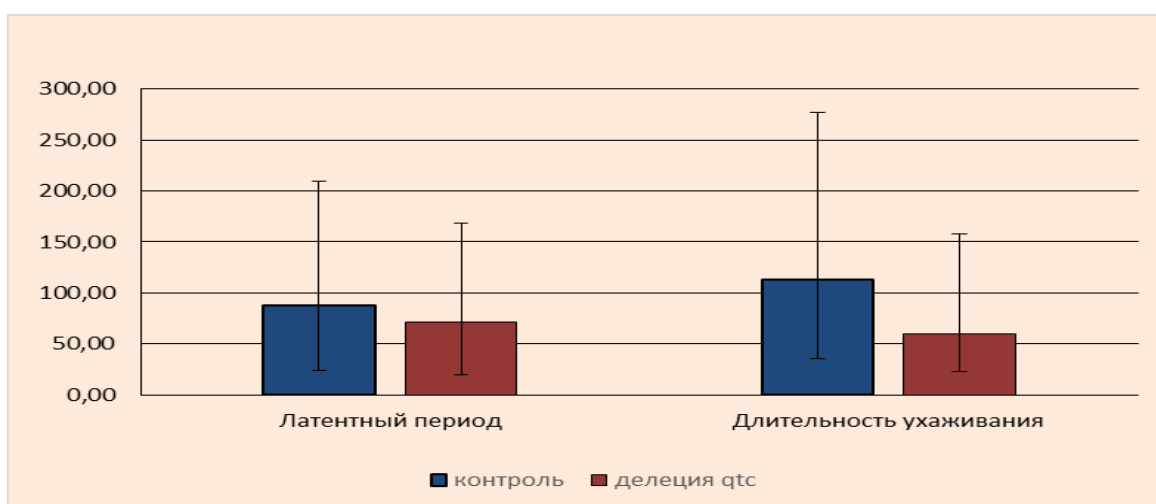


Рисунок 6.1 - Латентный период и длительность элементов брачного поведения *D. melanogaster* в различных вариантах тестирования.

Было установлено, что у мух с делецией по сравнению с контрольными достоверно дольше длится лизание брюшка самки (0.94 сек у контрольных и 2.16 сек у делеционных мух, соответственно), а также достоверно раньше начинается преследование (2.10 и 0.44 сек, соответственно) и лизание (56.08 и 11.67 сек, соответственно) (рис. 6.2).

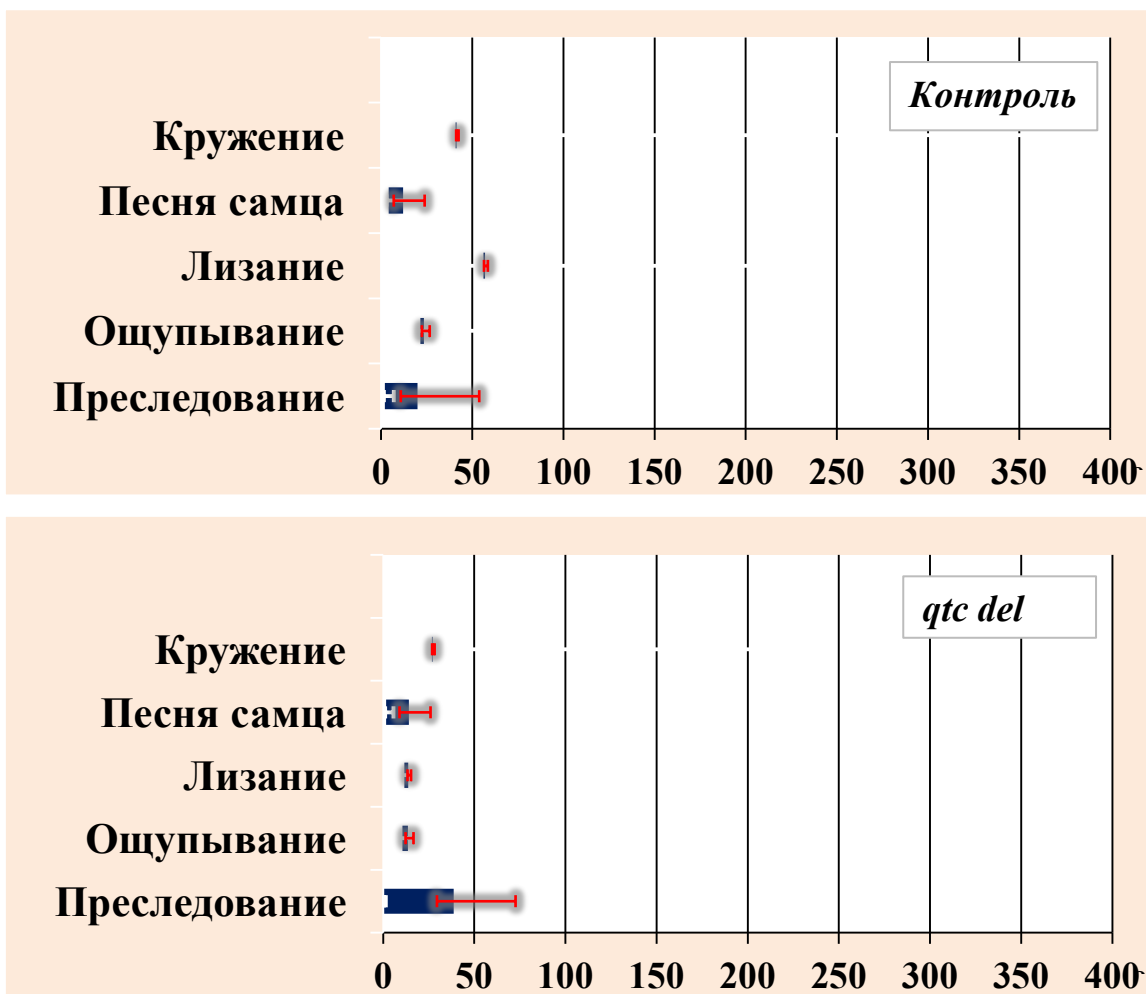


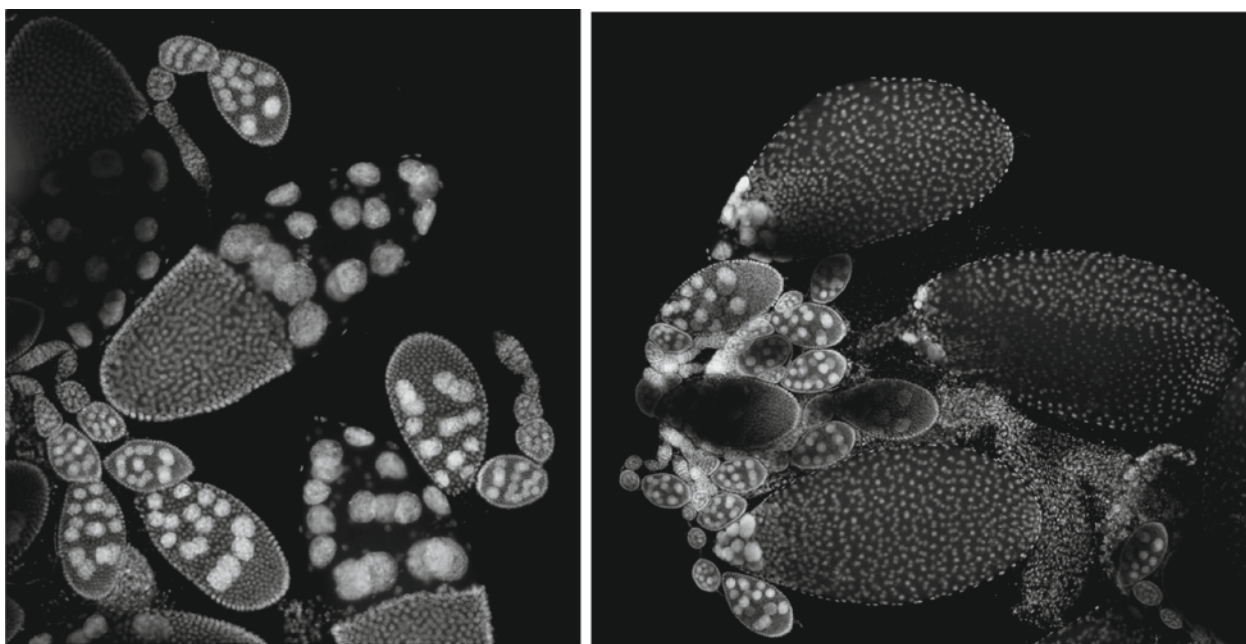
Рисунок 6.2 - Латентный период и длительность элементов брачного поведения контрольных имаго и делеционных мутантов.

1 – средняя продолжительность элемента, 2 – 95%-ный доверительный интервал.

Во второй серии экспериментов поведенческие тесты проводились с участием мух с удаленными аристами – субапикальными сложными щетинками, расположенными на третьем сегменте антенн. В аристах дрозофилы присутствует специфический орган чувств. В них обнаружены гидрорецепторы и доказано участие арист в определении влажности. Детальное исследование арист исключило их участие в обонянии, поскольку в кутикуле арист отсутствуют поры, специфичные для хеморецепторных органов. Также аристы имеют слуховые функции [9, 10]: они участвуют в трансформации акустической энергии в механическую и передаче ее слуховому рецептору, расположенному в основании антенн. Наряду с восприятием феромонов, акустический канал связи играет важную роль в брачном поведении дрозофилы. Удаление арист у контрольных самок увеличивало продолжительность латентного периода более, чем в 2 раза, тогда как удаление арист у самцов или у самок с делецией *qtc* практически не влияло на

продолжительность латентного периода. Ухаживания удлинялись при удалении арист у самцов или самок как в контроле, так и у мух с делецией. Таким образом, быстрое вступление в копуляцию, характерное для мух с мутантным *qtc*, наблюдалось только у мух с интактными аристами. При удалении арист уменьшалось количество мух, вступивших в копуляцию как в контроле, так и у мух с делецией.

Транскрипты *qtc* обнаружены в грудном и брюшном отделе как у самцов, так и у самок. У самцов транскрипты обнаружены в брюшном сегменте в районе тестиса. У самок транскрипты в брюшном сегменте также, видимо, ассоциируются с репродуктивной системой. Чтобы определить, какое влияние оказывает снижение уровня белка на морфологию гонад, мы выделили яичники у контрольных мух и мух с делецией и окрасили их DAPI (рис. 6.3). Не было обнаружено изменений в оогенезе, морфологии эмбрионов, а также в структуре хроматина. Семенники у мух с делецией также не отличались от дикого типа (рис. 6.4).



А

Б

Рисунок 6.3 -Фотографии препаратов яичников контрольных самок (А) и самок с делецией *qtc*(Б).



А

Б

Рисунок 6.4 - Фотографии препаратов семенников контрольных самцов (А) и самцов с делецией *qtc*(Б).

6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы не выявили изменений в морфологии гонад у мух с делецией *qtc*. Остается неясным, почему транскрипты *qtc* обнаружены в области семенников и яичников. Ускоренное вступление в копуляцию мутантных мух происходило за счет сокращения периода ухаживания. Делеция *qtc* не влияла на латентный период и на количество мух, вступивших в копуляцию. Эксперименты с удалением арист показали, что *qtc* может участвовать в определении полового партнера с помощью звука. При этом делеция *qtc* по-разному влияла на самцов и самок с удаленными аристами. Таким образом, снижение экспрессии *qtc* изменяла только некоторые аспекты полового поведения, многие этапы ухаживания, а также морфология гонад не отличалась от дикого типа. Непонятно, каким образом ген *qtc* регулирует половое поведение, но вполне возможно, что функции белка QTC могут быть связаны с обработкой информации, полученной от различных анализаторов (звукового, зрительного, обонятельного).

6.1.5 ССЫЛКИ

1. Sawamura K., Tomaru M. // Popul. Ecol. - 2002. - V. 44. - P. 209–219.
2. Lasbleiz C., Ferveur J.-F., Everaerts C. // Anim. Behav. - 2006. - V. 72. - P. 1001–1012.

3. *Drapeau, M.D., Radovic, A., Wittkopp, P.J., Long, A.D.* // *J. Neurobiol.* 2003. - 55. - P. 53–72.
4. *Pérez, M.M., Schachter, J., Berni, J., Quesada-Allué, L.A.* // *J. Insect Physiol.* - 2010. - 56. - P. 8–13.
5. *Gaines P., Tompkins L., Woodard C.T., Carlson J.R.* // *Genetics.* 2000. - V.154.- P. 1627-37.
6. *Houot B., Fraichard S., Greenspan R.J., Ferveur J.F.* // *PLoS One.* - 2012. - V.7. e30799.
7. *Кравчук О.И., Михайлов В.С., Савицкий М.Ю.* // *Генетика.* - 2015. - Т. 51. - С. 1325–1329.
8. *Parton R.M., Vallés A.M., Dobbie I.M., Davis I* // *Cold Spring Harb Protoc.* - 2010. № 4.
9. *Foelix R. F., Stocker R. F., Steinbrecht R.A.* // *Cell Tissue Research.* - 1989. - V. 258. - P. 277–287.
10. *Sayeed O., Benzer S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1996. - V. 93. - P. 6079-6084.

РАЗДЕЛ 7. Молекулярные механизмы заболеваний человека и разработка методов генной и клеточной терапии

7.1 ВВЕДЕНИЕ

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

Недавно нам удалось продемонстрировать, что изменения положения генов внутри ядра может приводить к изменению их экспрессии (Allinne et al., 2014) и повышению вероятности возникновения транслокаций (Sklyar et al., 2016). Впоследствии нам удалось показать, почему, несмотря на антиретровирусную терапию, у пациентов с ВИЧ продолжают развиваться лимфомы. Мы продемонстрировали, что Tat, белок, продуцируемый вирусом ВИЧ и циркулирующий в крови ВИЧ-инфицированных пациентов, вызывает изменение общей организации хромосом в ядре В-клеток. Таким образом, значительно увеличивается риск транслокации приводящих к развитию лимфомы Беркитта.

Ядерная организация играет роль в других болезнях человека, особенно в плечелопаточно-лицевой миопатии (FSHD) где изменениях в организациях хроматина приводит к скоординированной экспрессии генов в локусе 4q. Недавно мы продемонстрировали наличие повреждений ДНК в клетках больных и установили их роль в патогенезе FSHD (Bou Saada et al., 2016, 2017a; Dmitriev et al., 2016).

7.2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

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

7.3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

7.3.1 Сравнительный анализ современных методов исследования активности CRIPR/Cas9 и разработка нового метода (Germini et al., 2017)

Редактирование генома с использованием нуклеаз (мегануклеаз, Zn finger нуклеаз или CRISPR/Cas9) – одна из самых передовых технологий 21 века. Проверка эффективности и специфичности нуклеаз является обязательным этапом перед использованием любого нового инструмента для редактирования генома для экспериментальных целей. Существующие стандартные методы скрининга основаны на секвенировании ДНК или использовании чувствительных к рассогласованию эндонуклеаз. Они могут быть трудоемкими, дорогостоящими и / или невозпроизводимыми. Мы оценили и проанализировали стандартные методы с по критериям надежности, времени, стоимости и простоты использования.

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

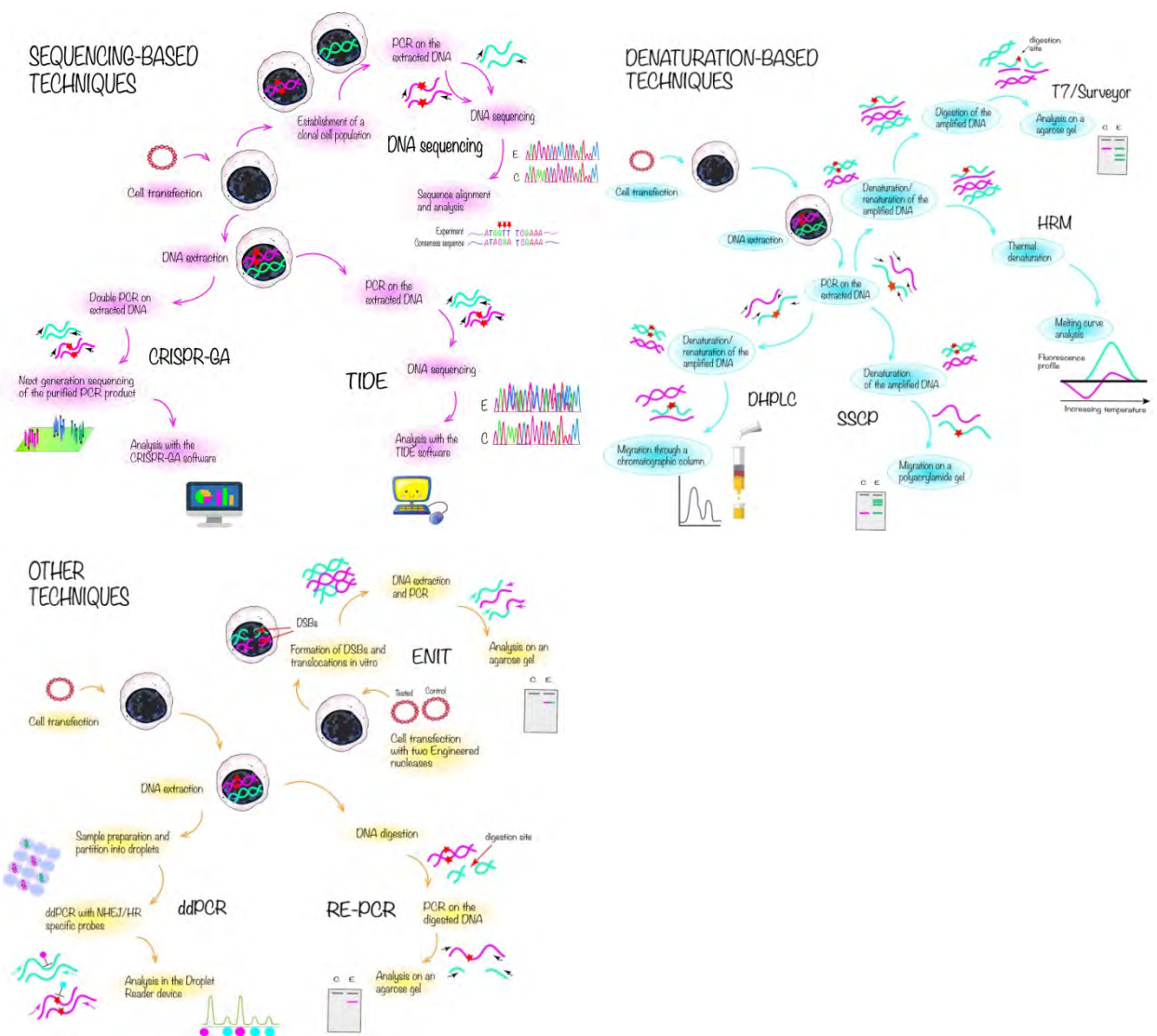


Рисунок 7.1 - Методы анализа эффективности нуклеаз CRISPR/Cas9.

7.3.2. Окислительный стресс и повреждения ДНК в скелетных мышцах в норме и патологии (Bou Saada et al., 2017b)

Скелетные мышцы активно потребляют кислород, обеспечивая движение, а также регуляцию питательных веществ и температуры. Повреждения ДНК, вызванные активными формами кислорода, присутствует в мышцах и имеет тенденцию накапливаться с возрастом. Мы изучили повреждения ДНК их роль в мышечном гомеостазе, миогенной дифференцировке и мышечных дистрофиях на примере лице-лопаточная мышечная дистрофии Ландузи-Дежерина - заболевания, выражающемся в слабости мышц лица: лицо больных становится словно маска, возникают трудности с мимикой, иногда наблюдается неполное смыкание глаз во время сна. Мы обнаружили конститутивные повреждения ДНК в культуре миобластов больных лице-лопаточной

мышечной дистрофией Ландузи-Дежерина. Ген DUX4 индуцирует повреждение ДНК. При экспрессии в нормальных человеческих миобластах ингибирование гена DUX4 снижает уровень повреждений ДНК в миобластах больных МДЛД. Повреждения ДНК способствуют aberrantной дифференцировке миобластов больных. Повреждения ДНК, инициированные белком DUX4, влияют на миогенную дифференцировку миобластах из больных МДЛД. Обработка антиоксидантами снижает уровень морфологических дефектов при формировании миотрубочек у больных МДЛД. Результаты исследования обобщены в рисунке 7.2.

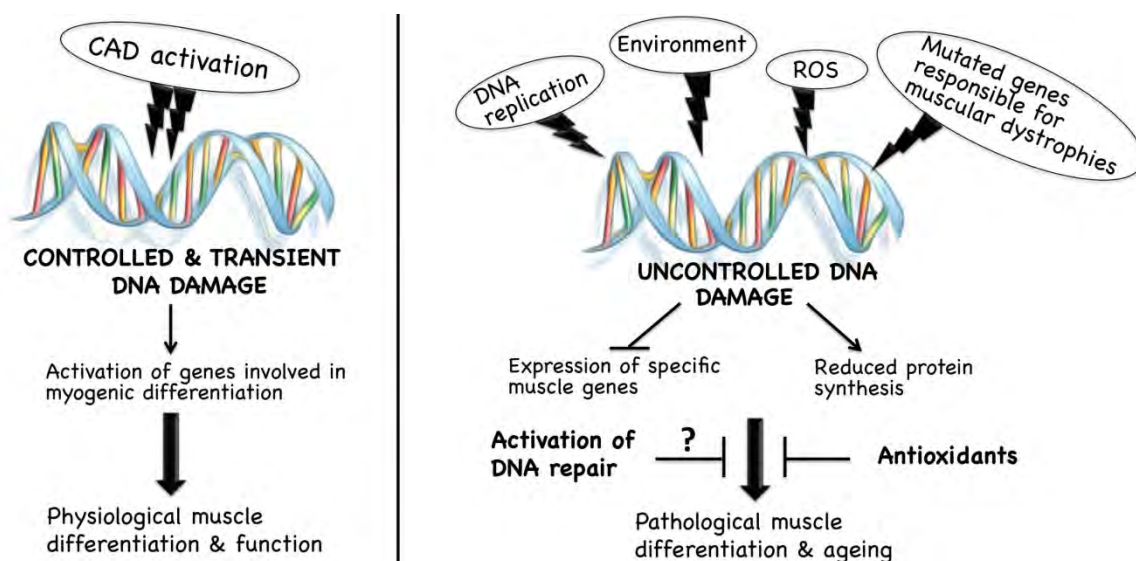


Рисунок 7.2 .Влияние активных форм кислорода и окислительного стресса на нормальную и патологическую дифференцировку мышц человека.

7.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

7.5 ССЫЛКИ

1. Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, et al // Blood. 2014. V. 123. P. 2044–2053.
2. B, Saada, Y., Dib, C., Dmitriev et al // Histochem. Cell Biol. 2016. V.145.

3. Bou Saada, Y., Zakharova, V., Chernyak, B., et al // (2017a). *Cell. Mol. Life Sci.*
4. Bou Saada, Y., Zakharova, V., Chernyak, B., et al // (2017b). *Cell. Mol. Life Sci.*
5. Dmitriev, P., Bou Saada, Y., Dib, C., et al. // (2016). *Free Radic. Biol. Med.* 99.
6. Germini, D., Tsfasman, T., Zakharova, V.V., et al // (2017). *Trends Biotechnol.*
7. Sklyar, I., Iarovaia, O.V., Gavrilov, A.A., et al. // (2016). *J. Cell. Biochem.* 117.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение особенностей регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролируемых морфогенетические процессы высших организмов, показало эволюционный консерватизм РНК-а, вызываемый длинными и короткими дцРНК. РНК-а индуцируется некодирующими РНК, гомологичными промотеру или 3'области гена. Активирующие дцРНК гомологичны кодирующей области гена.

С помощью быстрой амплификации концов кДНК (RACE) были охарактеризованы два новых сплайс-варианта мРНК гена d4. Были обнаружены различия в уровне экспрессии транскриптов, синтезирующихся с альтернативных промоторов. Созданы конструкции для изучения картины распределения белковых продуктов гена d4, зависящих от альтернативных промоторов.

За отчетный период была получена дрозофила, содержащая ген Арил-гидрокарбонового рецептора человека. Это позволяет проводить достоверные сравнительные эксперименты по её индукции в геноме и по исследованию эффектов, которые могут быть вызваны её индукцией. Показано, что в полученной гуманизированной линии дрозофил можно успешно тестировать фармакокинетический потенциал экзогенных лигандов и изучать их действие на консервативные гены регулирующие развитие органно-тканевых структур в условиях *in vivo*.

Результаты проведённых работ, впервые было показали, что модификации гистонов играют не только роль «сигналов» для регуляторных белков клетки, но также способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных интермедиатов нуклеосом.

В отчётный период получена коллекция трансгенных линий пшеницы (T0), состоящая из 122 растений. От данных растений получено потомство T1 в количестве 82 шт, по результатам анализов из 82 растений отобрано 14 с наибольшим уровнем экспрессии целевого гена.

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27» декабря 2017 г.,
Протокол № 10

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. Germini D., Tsfasman T., Zakharova V.V., Sjakste N., Lipinski M., **Vassetzky Y.S.** A comparison of techniques to evaluate the effectiveness of genome editing // Trends in Biotechnology. 2017. pii: S0167-7799(17)30272-X. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.008. (WoS, Scopus)
2. Kiprowska M.J., **Stepanova A.**, Todaro D.R., Galkin A., Haas A., Wilson S.M., Figueiredo-Pereira M.E. Neurotoxic mechanisms by which the USP14 inhibitor IU1 depletes ubiquitinated proteins and Tau in rat cerebral cortical neurons: Relevance to Alzheimer's disease // Biochimica et BiophysicaActa - Molecular Basis of Disease. 2017. V. 1863. N 6. P. 1157-1170. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.03.017. (WoS, Scopus)
3. **Kravchuk O.**, Kim M., Klepikov P., Parshikov A., Georgiev P., **Savitsky M.** Transvection in Drosophila: trans-interaction between yellow enhancers and promoter is strongly suppressed by a cis-promoter only in certain genomic regions // Chromosoma. 2017. V. 126. № 3. P. 431-441. DOI: 10.1007/s00412-016-0605-6. (WoS, Scopus)
4. Savvateeva-Popova E.V., Zhuravlev A.V., Brázda V., Zakharov G.A., Kaminskaya A.N., Medvedeva A.V., Nikitina E.A., Tokmatcheva E.V., Dolgaya J.F., **Kulikova D.A.**, Zatsepina O.G., Funikov S.Y., Ryazansky S.S., Evgen'ev M.B. Drosophila model for the analysis of genesis of LIM-kinase 1-dependent williams-beuren syndrome cognitive phenotypes: INDELS, transposable elements of the Tc1/Mariner superfamily and MicroRNAs // Frontiers in Genetics. 2017. V. 8. DOI: 10.3389/fgene.2017.00123. (WoS, Scopus)
5. Stankevicius L., Barat A., Dessen P., **Vassetzky Y.**, De Moura Gallo C.V. The microRNA-205-5p is correlated to metastatic potential of 21T series: A breast cancer progression model // PLOS ONE. 2017. V. 12. No. 3:e0173756. DOI: 10.1371/journal.pone.0173756. (WoS, Scopus)
6. Syrkina M.S., Maslakova A.A., Potashnikova D.M., Veiko V.P., **Vassetzky Y.S.**, Rubtsov M.A. Dual Role of the Extracellular Domain of Human Mucin MUC1 in Metastasis // J. Cell. Biochem. 2017. V. 118. No. 11. P. 4002–4011. DOI: 10.1002/jcb.26056. (WoS, Scopus)
7. Syrkina M.S., **Vassetzky Y.S.**, Rubtsov M.A. MUC1 Story: great expectations, disappointments and the renaissance // Current Med. Chem. 2017. Aug 17. DOI: 10.2174/0929867324666170817151954. (WoS, Scopus)
8. Bou Saada Y., Zakharova V., Chernyak B., Dib C., Carnac G., Dokudovskaya S., **Vassetzky Y.S.** Control of DNA integrity in skeletal muscle under physiological and

pathological conditions // Cellular and Molecular Life Sciences. 2017. V. 74. N 19. P. 3439-3449. DOI: 10.1007/s00018-017-2530-0. (WoS, Scopus)

9. Morozov A.V., **Astakhova T.M.**, Garbuz D.G., Krasnov G.S., Bobkova N.V., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Evgen'ev M.B. Interplay between recombinant Hsp70 and proteasomes: proteasome activity modulation and ubiquitin-independent cleavage of Hsp70 // Cell Stress Chaperones. 2017. V. 22. N 5. P. 687–697. DOI: 10.1007/s12192-017-0792-y. (WoS, Scopus)