



Форма направления реферативно-библиографических сведений
о результатах научно-исследовательской, опытно-конструкторской и
технологической работы

I. Сведения о НИОКТР

Номер государственного учета НИОКТР

Дата постановки НИОКТР на учет

AAAA-A19-119032190095-6	21/03/2019
-------------------------	------------

Наименование НИОКТР

Молекулярно-генетические механизмы регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза
--

Руководитель НИОКТР

Фамилия, Инициалы

Ученая степень

Ученое звание

Симонова О.Б.	Доктор биологических наук	Не указано
---------------	---------------------------	------------

II. Сведения об отчете

Номер государственного учета отчета

Дата постановки отчета на учет

AAAA-B20-220032090126-3	20/03/2020
-------------------------	------------

Наименование отчета

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И МОРФОГЕНЕЗА по разделу № 50 «Биология развития и эволюция живых систем» Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. (заключительный отчет)

Тематическая(-ие) рубрика(-и)

Индекс УДК

34.23.29; 34.15.25; 62.37.29; 34.15.27	575.16
--	--------

Коды международной классификации отраслей наук

01.00.00

Дата утверждения отчета

27/12/2019

Кол-во книг (томов)

1

Общее кол-во страниц

79

Номера книг (томов)/Кол-во страниц

1/79	2/0	3/0	4/0	5/0	6/0	7/0	8/0	9/0	10/0	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0
------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Приложений

0

Таблиц

4

Иллюстраций

38

Библиография

96

Публикаций по результатам НИОКТР

10

Фамилия, инициалы

Должность

СНИЛС

Подпись

Руководитель организации-исполнителя

Васильев А. В.	Директор	00133521977	
----------------	----------	-------------	--

Место для печати

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 575.16

Рег. № ГЗ 0108-2019-0001

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119032190095-6

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН



А.В. Васильев

«27» декабря 2019 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТочНОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И МОРФОГЕНЕЗА

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

(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
главный научный сотрудник
доктор биологических наук

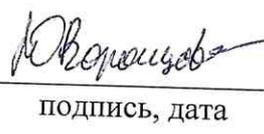
О.Б. Симонова

26.12.2019

подпись, дата

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, главный научный сотрудник, доктор биологических наук	 подпись, дата	О.Б. Симонова (раздел 1) 25.12.19
Исполнители: Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Д.А. Куликова (раздел 2) 25.12.19
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Ю.Е. Воронцова (раздел 3) 25.12.19
Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор	 подпись, дата	А.К. Гапоненко (раздел 4) 26.12.19
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 подпись, дата	В.А. Краевский (раздел 5) 26.12.19
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	О.И. Кравчук (раздел 6) 26.12.2019
Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 подпись, дата	Е.С. Васецкий (раздел 7) 25.12.2019
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Е.Б. Абрамова 26.12.2019

РЕФЕРАТ

Отчет 79 с., 7 разделов, 38 рис., 4 табл., 96 источников, 10 публикаций по теме, 0 прил.

Ключевые слова: МОРФОГЕНЕЗ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК, ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД, ГИСТОНЫ, КСЕНОБИОТИКИ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА, ХРОМАТИН, МИОПАТИЯ, ЭВОЛЮЦИОННО-КОНСЕРВАТИВНЫЕ ГЕНЫ, СЕЛЕКЦИЯ.

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

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

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

Изучены сложные взаимоотношения продуктов экспрессии генов и механизмы регуляции процессов развития в нормальных условиях и в условиях токсического действия болезней и внешней среды. Выдвинуты новые фундаментальные концепции эпигенетического кода и идентифицированы новые функции генов, контролирующих дифференцировку и морфогенез.

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

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень сокращений и обозначений	5
Введение	6
Раздел 1. Особенности регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующих морфогенетические процессы высших организмов	9
Раздел 2. Роль и значение транскрипционных факторов семейства <i>d4</i> в регуляции нейрогенеза	16
Раздел 3. Интерференция генетических механизмов регуляции морфогенеза и биodeградации ксенобиотиков	23
Раздел 4. Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений	
Подраздел 4.1. Редактирование генома кок-сагыза	33
Подраздел 4.2. Влияние химических мутагенов на морфогенез ряда сельскохозяйственных (рапс) и декоративных (вербена, петуния) растений.....	41
Подраздел 4.3. Изучение системы размножения и связанных с ней особенностей морфологической структуры цветка календулы лекарственной как индикаторов содержания биологически активных веществ	50
Раздел 5. Регуляция активности генов и процессы онтогенеза	57
Раздел 6. Поиск новых генетических факторов, участвующих в детерминации пола насекомых	65
Раздел 7. Молекулярные механизмы заболеваний человека и разработка методов генной и клеточной терапии	68
Заключение	76
Список работ, опубликованных по теме	78

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяются следующие сокращения и обозначения

АФК - активные формы кислорода

а.к. – аминокислотная последовательность

дцРНК – двуцепочечная РНК

ЖК – жирные кислоты

ЖКС – жирно кислотный состав

кДа – килодальтон

МДЛД - Мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина

НК - натуральный каучук

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ОРС – открытая рамка считывания

п.н. – пара нуклеотидов

п.о. – пара оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

скс - соматические клетки семенников

ЭМС - этилметансульфонат

AHR - Aryl Hydrocarbon Receptor

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

FISH – Fluorescence in situ Hybridization

FSHD - плече-лопаточно-лицевая миопатия

GFP - зеленый флуоресцирующий белок

NAP - Nucleosome Assembly Protein

Tj - Traffic jam

UAS - Upstream Activating Sequence

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

ВВЕДЕНИЕ

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

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

Проблема роли наследственности в индивидуальном развитии не ограничивается молекулярно-генетическим аспектом. Важное значение в клеточной наследственности

приобретают эпигенетические (эпигеномные) механизмы, раскрытие которых необходимо для выяснения природы факторов компетенции, детерминации и их реализации в виде конкретных дифференцировочных программ, осуществляемых за счет «кодирования» (модификации) белков упаковки ДНК в ядрах – гистонов. До сих пор не ясно, как «гистоновый код» «транслируется» в те или иные перестройки нуклеосом - активирующие или репрессирующие работу генов. Предварительно нами показано, что определенные модификации гистонов – убиквитилирование H2B K34-/K120 - способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных неполных интермедиатов нуклеосом – «гексасом». Решение задач текущего этапа позволило детализировать принципиально новую концепцию эпигенетического «структурного кода» активности хроматина. Текущий этап также ставил задачу, связанную с исследованием мутации гена *qtc*, который участвует в формировании памяти и в обработке информации, полученной от различных анализаторов. Познавание этих механизмов дает ключ к пониманию таких процессов, как индукция, дифференцировка, морфогенез. Более того, оно открывает и путь к пониманию природы целостности развивающейся особи – высшего уровня механизмов индивидуального развития.

План работ также предполагал проведение исследований генетически обусловленной формы миопатии – FSHD. Учитывая многофакторность миопатии, важно разрабатывать терапевтические подходы, направленные на нормализацию работы всех «испорченных» генов. В этом аспекте важно проводить поиск таких генов и исследовать причины их нарушенной экспрессии. Текущий этап работ посвятили разработке модельной системы FSHD на основе клеточных линий миобластов с повышенным содержанием активных молекул кислорода и поиску генов, меняющих свою активность в условиях окислительного стресса, возникающего при FSHD. Результаты планируемых исследований важны для разработки эффективных персонализированных терапевтических подходов для лечения миопатий с применением известных антиоксидантов.

В рамках раздела «Клеточные и генетические основы биологии развития и биотехнологии растений» ставилась задача проведения подготовительной работы для редактирования генома кок-сагыза – перспективного растения-производителя отечественного натурального каучука, альтернативного гевее, произрастающей в Южной Америке. Конкретной целью текущего этапа была разработка протокола регенерации и трансформации кок-сагыза. Другой задачей этого раздела стала морфологическая и биохимическая характеристика новых сортов важного сельскохозяйственного растения - рапса - мутантные линии которого были получены нами ранее в результате селекции, и элитного сорта лекарственного растения календулы, цветки которой являются важным

сырьём в фармакологии и косметологии. Ценность календулы заключается в том, что лекарственные средства на основе биологически активных веществ этих растений действуют более щадяще, чем препараты химического и микробного происхождения, хорошо переносятся организмом, малотоксичные и редко оказывают побочное действие на организм.

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

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

1.1 Введение

Последние исследования показали, что геномы эукариотических организмов кодируют множество антисмысловых транскриптов, содержащих последовательности, комплементарные другим эндогенным РНК [1-3]. Исследование функциональной значимости антисмысловых транскриптов показало, что они могут контролировать онтогенез, участвуя в регуляции таких клеточных процессов, как геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы, альтернативный сплайсинг, сайленсинг генов и метилирование, редактирование РНК, трансляция [3-8]. Использование модельных систем на основе *Drosophila melanogaster* достаточно хорошо отлажено, причём возможность изучения функции генов различными способами – с помощью генетических и трансгенных методик, а также посредством РНК-опосредованной супрессии транскрипционной активности – сделала этот объект мощным биологическим инструментом для учёных [9-10]. Известно, что у многих генов человека имеются соответствующие гомологии у дрозофилы. К таким генам относится и ген дрозофилы *Trf2* (*TBP related factor 2*), который перекрывается с другим геном *lawc* (*leg-arista-wing complex*). Систему этих генов мы используем в качестве модели для исследования особенностей регуляции экспрессии перекрывающихся генов, контролирующей развитие. Подобных исследований мало, и в основном они касаются исследований пар генов, один из которых является некодирующим. Оба гена в нашей системе кодируют белки, что позволяет получать новые актуальные данные о механизме координированной экспрессии перекрывающихся белок-кодирующих генов, список которых в геномах эукариот постоянно пополняется. В 2018 году мы исследовали роль двух эволюционно консервативных микроРНК (*mir4968* и *mir2491*) в регуляции экспрессии обратных *lawc*-транскриптов генного комплекса *lawc/Trf2 in vivo* в клетках имагинального глазоантенного диска и мозге личинок и имаго дрозофилы. Мы впервые показали, что микроРНК могут служить инструментом адаптации работы генов в условиях общего использования ими своих регуляторных элементов. Механизм, направленный на подавление экспрессии антисмысловых *lawc*-транскриптов комплементарными микроРНК, вполне мог сложиться в ходе эволюции. Тем не менее, анализ библиотек коротких РНК (piRNA, siRNA) всех стадиях развития дрозофилы не выявил наличия интермедиатов РНК-интерференции в зоне локализации *lawc/Trf2*. Мы предположили, что тестируемые микроРНК могут

подавлять экспрессию антисмысловых транскриптов через непосредственную супрессию их промотора. Поэтому поиск скрытых промоторов гена *lawc* стал нашей следующей задачей на 2019 г.

1.2 Материалы и методы

Основным методом при сравнительном исследовании уровня экспрессии анализируемых транскриптов была полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением геноспецифичных праймеров и зондов, меченных флуоресцентными красителями (зонды TaqMan®). В качестве эндогенного контроля использован ген рибосомального белка Rpl32.

Для доказательства функциональной значимости промотора использовали метод люциферазной детекции (люциферазный тест) в культурах клеток дрозофилы Schneider 2 (S2) и человека cells Human embryonic kidney 293 (HEK293). В качестве вектора использовали плазмиду pGl4.10 Luc2 (Promega). Новый старт-сайт транскрипции определяли методом 5'RLM-RACE.

Для проверки, являются ли антисмысловые *lawc*-транскрипты мишенями определённых микроРНК, были созданы специфические вектора для трансфекции культуры клеток дрозофилы, экспрессирующие конструкции, содержащие тестируемую регуляторную последовательность и ген люциферазы. Клетки котрансфецировали вектором для конститутивной оверэкспрессии pre-mir-2491, либо вектором для конститутивной экспрессии pre-mir-13b-1. Относительная активность люциферазы измерялась с помощью люминометра и реактива ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega). Измерения проводились трижды.

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Поиск и тестирование регуляторных элементов в составе гена *lawc*.

Мы протестировали кодирующая область *lawc*, используя программы BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) и ElemeNT [11], созданные для поиска предполагаемых промоторов и других регуляторных элементов. В результате были обнаружены две комбинации регуляторных элементов, соответствующие предполагаемому промотору для РНК-полимеразы II: Initiator + Bridge-Bridge, а выше него – предполагаемый сайт инициации транскрипции TSS (transcription start site) (рисунок 1.1).

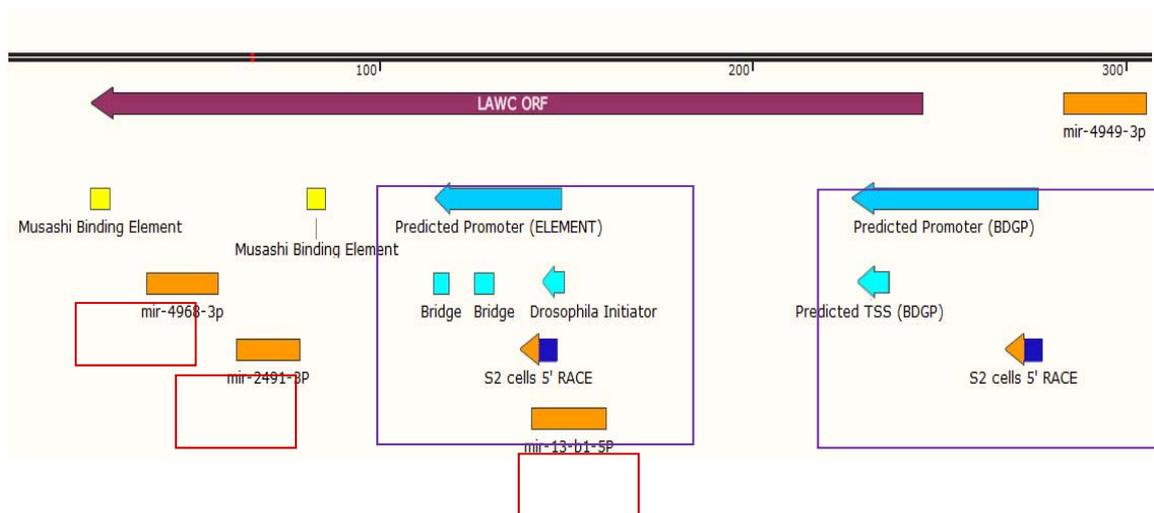


Рисунок 1.1 - Открытая рамка считывания *lawc* содержит предполагаемые промоторы и места посадки микроРНК. **Обозначения:** пурпурной стрелкой обозначена кодирующая область гена *lawc*, голубыми стрелками обозначены области предполагаемых промоторов, оранжевыми прямоугольниками обозначены предполагаемые области посадки микроРНК. В рамку заключены микроРНК и области промоторов, выбранные нами для дальнейших экспериментов

Для доказательства функциональной значимости предсказанного промотора мы провели люциферазный тест на культуре клеток человека и дрозофилы (рисунок 1.2). В результате была показана способность тестируемых фрагментов активировать экспрессию гена люциферазы. Контрольный эксперимент (пустая плаزمида и плазмида с фрагментом, не содержащим тестируемых промоторов) не показал всплеска люциферазной активности (рисунок 1.2).

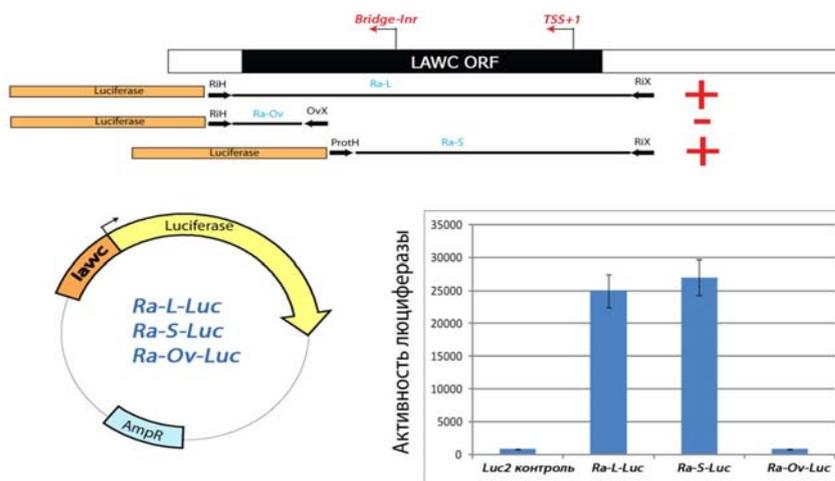


Рисунок 1.2 - Определение промоторной активности методом люциферазной детекции (люциферазный тест) в культурах клеток дрозофилы и человека. Вверху представлены области (*RA-L*, *RA-S*, *RA-Ov*), соответствующие разным регионам открытой рамки считывания гена *lawc*, клонированные в плазмиду с геном люциферазы без промотора (карта внизу слева). Внизу справа – результат измерения активности люциферазы. Видно, что те области, которые содержат предполагаемую зону промотора успешно активируют ген люциферазы

Способность активировать ген люциферазы в клетках разных организмов (дрозофилы и человека) говорит о высокой эволюционной консервативности тестируемых промоторных последовательностей. Далее, используя 5'RLM-RACE мы также доказали функциональную значимость нового предсказанного сайта инициации транскрипции TSS, гена *lawc* (рисунок 1.1).

1.3.2. Антисмысловые для *Trf2 lawc*-транскрипты являются мишенями микроРНК.

Мы предположили, что антисмысловая *lawc*-транскрипция может находиться под контролем комплементарных молекул микроРНК. С этой целью мы провели поиск предполагаемых сайтов посадки микроРНК, используя базы данных miRBase, DIANA TOOLS, RegRNA2.0. В результате было обнаружено несколько предполагаемых сайтов посадки микроРНК внутри ОРС гена *lawc* (рисунок 1.1). Чтобы проверить, являются ли транскрипты гена *lawc* мишенью для этих микроРНК, мы использовали культуру клеток дрозодилы S2 и вектор с репортерным геном люциферазы. Мы наблюдали снижение активности люциферазы в три раза на фоне оверэкспрессии соответствующих микроРНК (рисунок 1.3).

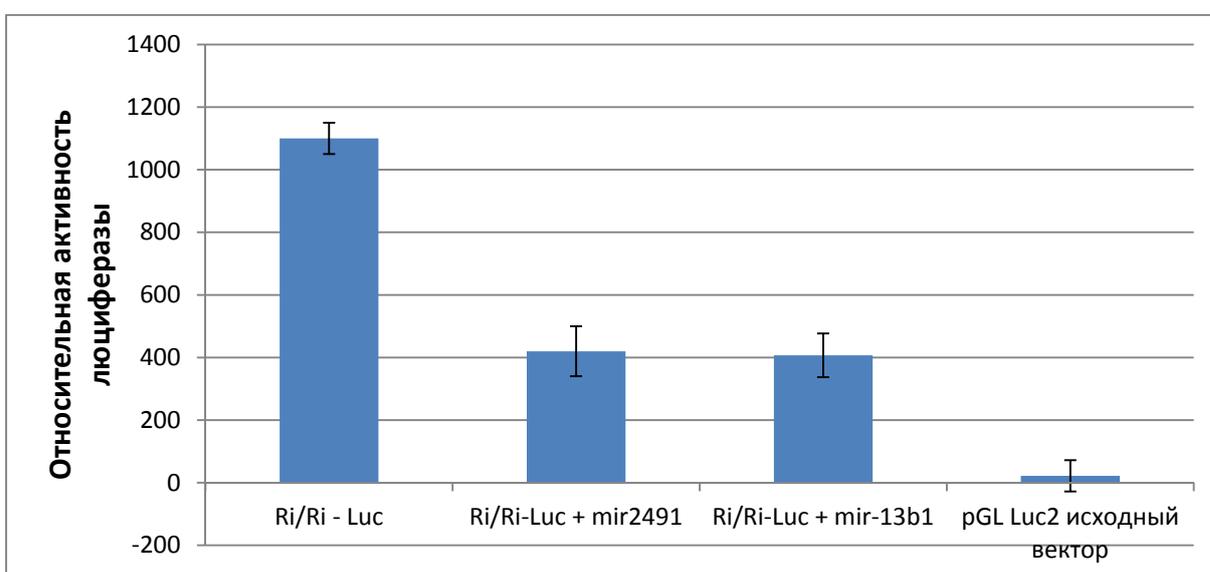


Рисунок 1.3 - Оверэкспрессия микроРНК *mir-2491* и *mir-13b1* подавляет экспрессию гена люциферазы, поставленного под регуляцию области гена *lawc*.

Ri/Ri-Luc – ген люциферазы шитый с промотором гена *lawc* как указано на рис. 1.2; Ri/Ri-Luc + *mir2491* и Ri/Ri-Luc + *mir-13b1* – ген люциферазы на фоне оверэкспрессии соответствующих микроРНК; pGL Luc2 – ген люциферазы без промотора

Таким образом, нами было показано *in vitro*, что транскрипты гена *lawc* является мишенью для микроРНК *mir-13b1* и микроРНК *mir-2491*. Отметим, что снижение активности люциферазы не могло быть вызвано посттранскрипционным влиянием

тестируемых микроРНК на сам ген люциферазы, т.к. при анализе базы данных микроРНК (www.mirbase.org) не было найдено ни одной микроРНК, имеющей гомологию к гену люциферазы использованном в нашем эксперименте.

Из литературных данных известно, что тестируемая нами *mir-13-b1* [12] является кластерной микроРНК, экспрессия которой связана с нервной системой эмбриона. Эта микроРНК принадлежит высоко консервативному широко распространённому семейству микроРНК - *mir-2*, роль которого в развитии связывают, прежде всего, с контролем экспрессии генов апоптоза и обеспечением выживания клеток на эмбриональной стадии развития [13]. Роль конкретной *mir-13-b1* никем не исследовалась. Другая тестируемая нами микроРНК, *mir-2491*, была недавно открыта и впервые упомянута (наряду с сотней других открытых микроРНК) в статье [14]. Она не является кластерной и её мишени пока также не известны.

Известны единичные случаи, когда микроРНК могут выступать не только в роли малых интерференционных РНК (miRNA), подавляющих экспрессию генов, но также в роли малых активирующих РНК (saRNA) [15]. Активирующая роль была показана для miR-373, которая комплементарна промотору гена E-кадгерина и связана с его индукцией [16]. Другая микроРНК - miR-205 – также связана с активацией транскрипции через комплементарные взаимодействия с промоторами генов IL-24 and IL-32 [17]. Третий случай, когда показали микроРНК-опосредованную активацию транскрипции связан с miR-744, которая, как оказалось, активирует экспрессию циклина Cyclin B1 через промотор кодирующего его гена. Тем не менее, механизм участия микроРНК в активации генов почти не изучен и является в настоящее время актуальной проблемой.

1.4 Заключение

Ранее, в 2018 году, в экспериментах *in vivo* в клетках имагинального глазоантенного диска и мозге дрозофилы, мы показали, что обратные *lawc*-транскрипты генного комплекса *lawc/Trf2* являются мишенями для двух эволюционно консервативных микроРНК (*mir4968* и *mir2491*). В 2019 году мы продолжили начатую работу, в результате чего показали, что кроме этих двух микроРНК активность гена *lawc* контролируется третьей микроРНК - *mir-13b1*. Дополнительно в составе гена *lawc* были обнаружены скрытые промоторы, функциональность которых была доказана в тестах по индукции репортерного гена люциферазы в культуральных клетках дрозофилы и человека.

Наше исследование пополнило список микроРНК, координирующих экспрессию перекрывающихся генов, которые имеют общие регуляторные области, сложившиеся в ходе эволюционного процесса. Снижение концентрации этих микроРНК может повышать

экспрессию *lawc*, что негативно отражается на экспрессии прямых транскриптов. Очевидно, такой механизм регуляции координированной экспрессии перекрывающихся генов мог сложиться в ходе эволюции при формировании общих для двух генов регуляторных районов.

Интересно, что по нашим данным перекрывающиеся гены *lawc* и *Trf2* экспрессируются одновременно, однако формируют ли дуплекс их противоположно направленные транскрипты остаётся неизвестным. Дальнейшие эксперименты будут направлены на разработку методики и выяснение этого вопроса.

1.5 Список использованных источников

- 1 Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs // *Science*. 2001. – Vol. 294. - P. 853 – 858.
- 2 Lavorgna G., Dahary D., Lehner B., Sorek R., Sanderson C. M. and Casari G. In search of antisense // *Trends Biochem. Sci.* - 2004. – Vol. 29. - P. 88 – 94.
- 3 Munroe S. H., Zhu J. Overlapping transcripts, double-stranded RNA and antisense regulation: A genomic perspective // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. - Vol. 63. - P. 2102 – 2118.
- 4 Ogawa Y., Lee J. T. Antisense regulation in X inactivation and autosomal imprinting // *Cytogenet. Genome Res.* - 2002. - Vol. 99. - P. 59 – 65.
- 5 Autuoro J.M., Pirnie S.P., Carmichael G.G. Long noncoding RNAs in imprinting and X chromosome inactivation // *Biomolecules*. - 2014. – Vol. 4. - P. 76 - 100.
- 6 Faghihi M.A., Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 637 - 643.
- 7 Beiter T., Reich E., Williams R.W., Simon P. Antisense transcription: A critical look in both directions // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2009. - Vol. 66. - P. 94 – 112.
- 8 Черезов Р.О., Симонова О.Б. Перекрывающиеся гены и антисмысловая транскрипция у эукариот // *Генетика*. 2014. - Т. 50. - С. 749 – 763.
- 9 Vorontsova J.E., Zavoloka E. L., Tcherezov R.O., Simonova O.B. Drosophila as a model system used for searching the genes, signaling pathways, and mechanisms controlling cytoskeleton formation // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2019. Vol. 50. - P. 1 - 8. – Воронцова Ю.Е., Заволока Е.Л., Черезов Р.О., Симонова О.Б. Дрозофила, как модельная система для поиска генов, сигнальных путей и механизмов, контролирующих формирование цитоскелета // *Онтогенез*. - 2019. - Т. 50. - С. 3 - 11.
- 10 Vorontsova J.E., Zavoloka E. L., Tcherezov R.O., Simonova O.B. Three important discoveries in the field of the cytoskeleton's proteins functioning on the *Drosophila melanogaster* model // *Molecular Biology*. - 2019. - Vol. 53. - P. 1 - 12. – Воронцова Ю.Е.,

Заволока Е.Л., Черезов Р.О., Симонова О.Б. Три важнейших открытия из области функционирования белков цитоскелета, сделанные на модели *Drosophila melanogaster* // Молекулярная биология. - 2019. - Т. 53. - С. 3 - 15.

11 Sloutskin A., Danino Y.M., Orenstein Y., Zehavi Y., Doniger T., Shamir R., Juven-Gershon T. ElemeNT: a computational tool for detecting core promoter elements // Transcription. – 2015. – Vol. 6. - P. 41 – 50.

12 Z.Wang. MicroRNA interference technologies. 2009. Springer. P. 59 - 73.

13 Leaman D., Chen P.Y., Fak J., Yalcin A., Pearce M., Unnerstall U., Marks D.S., Sander C., Tuschl T., Gaul U. Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development // Cell. – 2005. - Vol. 121. - P. 1097 - 1108.

14 Schertel C., Rutishauser T., Förstemann K., Basler K. Functional characterization of *Drosophila* microRNAs by a novel in vivo library // Genetics. - 2012. – Vol. 192. – P. 1543 - 1552.

15 Jiao A.L., Slack F.J. RNA-mediated gene activation // Epigenetics. - 2014. – Vol. 9. – P. 27 - 36.

16 Place RF, Li L.C., Pookot D., Noonan E.J., Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – Vol. 105. – P. 1608 - 1613.

17 Majid S., Dar A.A., Saini S., Yamamura S., Hirata H., Tanaka Y., Deng G., Dahiya R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer // Cancer. – 2010. – Vol. 116. – P. 5637 - 5649.

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

2.1 Введение

Ранее белки семейства d4 были обнаружены в составе нейроспецифических SWI/SNF-подобных ремоделирующих комплексов хроматина мыши, основным компонентом которых является SWI2/SNF2-подобная АТФ-аза Brg, либо Brgm [1]. Белки TTH и D4 дрозофилы, подобно белковым продуктам генов семейства d4 млекопитающих, вероятно, входят в состав АТФ-зависимых SWI/SNF-подобных ремоделирующих комплексов хроматина, однако на *D. melanogaster* до сих пор не было показано связи белков семейства d4 с хроматин-ремоделирующим комплексом SWI/SNF, и его отдельными компонентами. С целью выяснения, являются ли белки TTH и D4 компонентами SWI/SNF-подобных ремоделирующих комплексов хроматина дрозофилы нами были запланированы эксперименты по коиммунопреципитации с помощью антител к белкам семейства D4 и некоторым компонентам хроматин-ремоделирующего комплекса Brahma дрозофилы.

2.2 Материалы и методы

Вестерн-блот анализ белков проводили согласно протоколу фирмы Cell Signalling Technology (www.cellsignal.com), используя для переноса белков мембрану Hybond ECL, связавшиеся с иммобилизованными белками антитела кролика выявляли с помощью системы хемилюминесцентной иммунодетекции ECL (Amersham Biosciences, Великобритания).

Для **получения антител** пептиды, соответствующие 15-ти С-концевым а.к. остаткам белков семейства d4 дрозофилы, были созданы с помощью химического синтеза и конъюгированы для иммунизации с белком KLN на фирме «Русбиолинк» (Россия).

Рекомбинантные белки были получены с помощью экспрессионной системы pET (Novagen, США). Фрагменты кДНК были клонированы в экспрессионные вектора, имеющие в составе лидерной последовательности полигистидиновые регионы: pET30a и pET32a. Для экспрессии использовали бактериальные штаммы BL21(DE3) и Rosetta (DE3) pLacI (Novagen, США). Рекомбинантные белки были очищены с помощью аффинной колонки на основе Ni-сефарозы по протоколу фирмы-производителя (Amersham Biosciences, Великобритания). Иммунизация кроликов проводилась по стандартному протоколу. Титр антител определяли с помощью тест-системы ELISA. Полученные сыворотки подвергали аффинной хроматографии на носителях, конъюгированных с

соответствующими белками и пептидами: белки конъюгировали с эпокси-активированной сефарозой, пептиды конъюгировали с тиол-активированной сефарозой малеимид-активированной сефарозой по протоколу фирмы-производителя (Amersham Biosciences, Великобритания).

Для **коиммунопреципитации** выделение ядерных экстрактов из эмбрионов дрозофилы проводили согласно протоколу, изложенному в статье [2]. Иммунопреципитацию проводили с использованием Protein-A сефарозы (Amersham Biosciences, Великобритания) согласно протоколу фирмы-производителя.

Создание генетических конструкций для экспрессии генов-репортеров и меченых белков под контролем регуляторных элементов исследуемых генов проходило следующим образом. Фрагмент гибридного транскрипционного фактора GAL4-DBD_VP16 длиной 684 пн амплифицировали из вектора *pBPGAL4-VP16.4* [3]. Фрагмент, кодирующий эпитоп 3xFLAG, 66 пн (Sigma-Aldrich), собирали из двух комплементарных синтетических одноцепочечных зондов и кинировали. Далее фрагменты лигировали в плазмиду *pSK-Kan-LoxP*, содержащую ген устойчивости к Канамицину, окруженный сайтами *LoxP*, амплифицировали фрагменты ДНК плечей (900 пн) из области Бакмиды, в которую предполагалась встройка репортерных последовательностей. Плечи последовательно лигировали в плазмиды *pSK-Kan-LoxP-EGFP/RFP*. Клоны ВАС, содержащие локусы генов *d4* и *tth* дрозофилы были получены из ВАСРАС Resources Center (<https://bacpacresources.org>). (1) БАКмида *attB-P(acman)-CamR ВАС CH321-43B4* несущую локус *d4* (35 kb) внутри геномного фрагмента 85 kb; (2) БАКмида *attB-P(acman)-CamR ВАС CH322-14C11* несущую локус *tth* (3kb) внутри геномного фрагмента 22 kb. Внесение мутаций и репортерных последовательностей в БАКмиды проводили согласно протоколу [4]. С помощью электропорации БАКмиды трансфецировали в клетки DУ380, Трансформированные БАКмидой клетки индуцировали при 37°C для получения высокой рекомбинантной активности и трансфецировали их еще раз специфическими для каждого гена конструкциями для внесения в соответствующие локусы мутаций и последовательностей репортерных генов. Встраивание контролировалось по появлению устойчивости к Канамицину. Далее ген устойчивости к Канамицину, окруженный *LoxP* сайтами удаляли с помощью штамма, экспрессирующего Сте-рекомбиназу. Правильно прошедшую рекомбинацию подтверждали с помощью ПЦР соответствующей области и сиквенса ПЦР-фрагмента.

Иммунохимическое окрашивание целых эмбрионов дрозофилы проводили с помощью антител, конъюгированных с пероксидазой хрена по протоколу, изложенному в

руководстве [5]. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали диаминобензидин (DAB).

2.3 Результаты и обсуждение

Нейроспецифические SWI/SNF-подобные ремоделирующие комплексы относятся к отдельной группе nBAF (нейрональных Brg1/Brm-ассоциированных факторов), в составе которых содержится субъединица BAF250, в отличие от другой группы PBAF (Polybromo Brg1/Brm-ассоциированных факторов), в составе которых отсутствует субъединица BAF250 и содержится субъединица Polybromo (BAF180) [1]. У дрозофилы охарактеризованы два SWI/SNF-подобных комплекса, основным компонентом которых является SWI2/SNF2-подобная АТФаза Brahma: ремоделирующий комплекс BAP (Brahma-associated proteins) и ремоделирующий комплекс PBAP (Polybromo-BAP-ассоциированные белки). SWI/SNF-подобные комплексы дрозофилы BAP и PBAP имеют в своем составе 7 общих субъединиц и различающие их дополнительные субъединицы: OSA в BAP-комплексе и Polybromo (PB) или BAP170 в PBAP-комплексе (рисунок 2.1) [6].

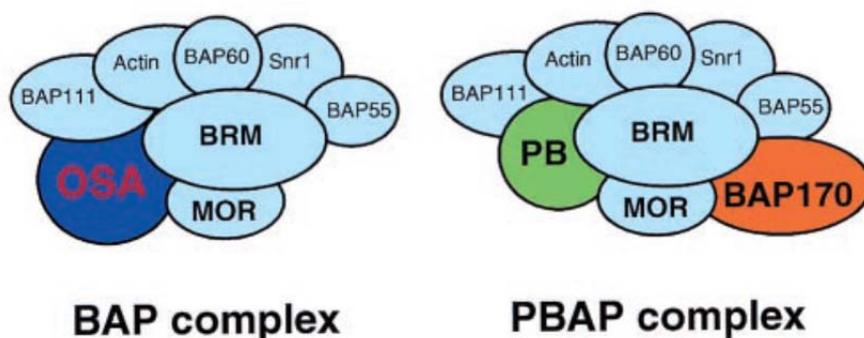


Рисунок 2.1 - Субъединичный состав двух типов хроматин-ремоделирующих комплексов Brahma дрозофилы по литературным данным [6]. Голубым выделены общие субъединицы, синим, оранжевым и зеленым-дополнительные, определяющие различия

Белок BAP-комплекса дрозофилы OSA является гомологом субъединицы nBAF-комплекса млекопитающих BAF250, с которым ассоциированы белки семейства d4, поэтому наиболее вероятным является участие белков дрозофилы TTH и D4 в функционировании SWI/SNF-подобных ремоделирующих BAP-комплексов дрозофилы (но не PBAP).

Нами были самостоятельно получены антитела к фрагментам белков семейства d4 и также к белку Snr1, который является общим для VAP и PVAP комплексов. Были получены коммерческие антитела к белкам VAP170 и OSA для идентификации комплексов VAP и PVAP соответственно. С помощью ко-иммунопреципитации с антителами против белка TTH и Вестерн-блот анализа с антителами против белков Snr1, VAP170 и OSA нами было обнаружено, что в составе преципитата из белковых экстрактов эмбрионов дрозофилы присутствует белок OSA (рисунок 2.2) Однако реципрокная преципитация (с антителами против OSA и Snr1) не выявила присутствия белка TTH, по всей видимости из-за недостаточно качественных антител против OSA. Также недостаточно качественными для иммунопреципитации оказались антитела против белка D4. Нами был сделан вывод о возможном вхождении TTH в состав Brahma-комплекса, содержащего субъединицу OSA. Данный белковый комплекс гомологичен комплексу млекопитающих pBAF, который характерен для всех типов нервных клеток.

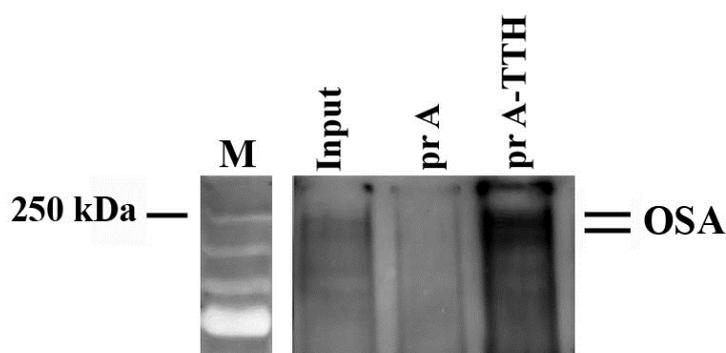


Рисунок 2.2 - Коиммунопреципитация белка OSA с помощью антител к белку TTH. Вестерн-блот анализ продуктов иммунопреципитации с антителами к белку OSA. Обозначения: M - маркер молекулярного веса; Input - 20 мкг тотального ядерного белкового экстракта из эмбрионов дрозофилы; prA-контроль (протеин-A сефароза, инкубированная с тотальным ядерным экстрактом); prA-TTH - эксперимент (протеин-A сефароза с антителами против TTH, инкубированная с тотальным ядерным экстрактом)

Экспрессия модифицированных белков TTH и D4. Для того, чтобы верифицировать результат с помощью высокоэффективной коиммунопреципитации с коммерческими высокоафинными антителами, были созданы конструкции для экспрессии белков d4, меченых пептидом FLAG в организме дрозофилы. С этой целью были получены два вида конструкций: (1) для стабильной экспрессии модифицированных белков и (2) для индуцированной экспрессии модифицированных белков в бинарной системе *GAL4-UAS*. Для стабильной экспрессии в кДНК вносились изменения в область перед стоп-кодоном так, чтобы последовательность считываемого белка удлинялась с C-конца на 22 а.к. остатка, соответствующие 3xFLAG эпитопу (Sigma). Для индуцированной

экспрессии в область первого ATG-кодона встраивали последовательность гибридного транскрипционного фактора *GAL4-DBD_VP16* со своим стоп-кодоном, кодирующего белок 228 а.к. Преимущество системы для стабильной экспрессии меченых белков в том, что в локусы генов вносятся минимальные изменения, что исключает влияние мутации на экспрессию изучаемого гена. Преимущество бинарной *GAL4-UAS* системы экспрессии в том, что можно получать специфическую экспрессию меченых различными эпитопами белков, используя основную конструкцию, специфически экспрессирующую драйвер *GAL4* под промоторами генов *d4*, и вспомогательные конструкции, экспрессирующие белки с различными модификациями под *GAL4*-зависимым дрожжевым промотором *UAS* [7].

Для данной работы были использованы геномные клоны ВАС (bacterial artificial chromosome) или БАКмиды, способные встраиваться в сайт *attP* специальных линий дрозофил. Внесение мутаций и репортерных последовательностей в БАКмиды проводили согласно методике, приведенной в разделе «материалы и методы» (рисунок 2.3). БАКмиды были выбраны так, чтобы исследуемые гены располагались как можно ближе к центральной области геномных фрагментов. Район встраивания не содержит энхансеров, способных повлиять на экспрессию исследуемых генов.

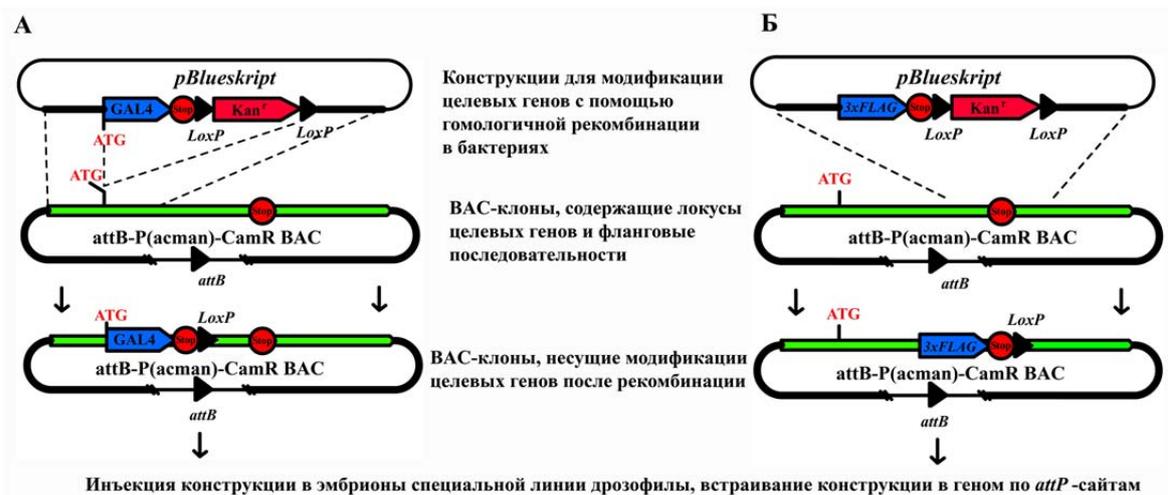


Рисунок 2.3 - Схема создания конструкций для эктопической экспрессии модифицированных белков под контролем их собственных регуляторных элементов. (А) получение конструкции для ген-специфической экспрессии транскрипционного фактора *GAL4*; (Б) получение конструкции для экспрессии белков, несущих С-концевую модификацию *FLAG*-эпитопом

Модифицированные БАКмидные конструкции инъецировали в полярную плазму эмбрионов специальной линии дрозофил *y[1] M{vas-int.Dm}ZH-2A w[*]; M{3xP3-*

RFP.attP}ZH-86Fb, геном которых содержит сайт *attP* в районе 86Fb и рекомбиназу фага C31, способную интегрировать конструкции в данный район [8].

2.4 Заключение

Основная задача данного этапа была выполнена. С помощью коиммунопреципитации были исследованы возможные взаимодействия белков семейства *d4* с хроматин-ремоделлирующим комплексом Brahma дрозофилы. Получен предварительный результат о возможном взаимодействии ТТН с белковым комплексом, содержащим белок OSA - компонент хроматин-ремоделлирующего комплекса. Для верификации результата с помощью высокоэффективной коиммунопреципитации и поиска новых взаимодействий белков семейства *d4* были сделаны две конструкции *d4* и *tth* с модификацией белков 3xFLAG с С-конца и 2 конструкции для экспрессии транскрипционного фактора GAL4 со стартовых ATG-кодонов генов *d4* и *tth*, проведена трансформация эмбрионов специальной линии дрозофилы 86Fb и начат вывод линий с интегрированными в геном фрагментами. На следующем этапе работы планируется эксперимент по ко-иммунопреципитации с анти-FLAG сефарозой (Sigma). Будет изучен состав белковых партнеров, с которыми взаимодействуют белки семейства *d4* дрозофилы. Преципитаты будут проанализированы с помощью Вестерн-блот анализа с антителами против белков-компонентов Brahma-комплекса, и с помощью MALDI-спектрометрии, которая поможет определить белковые партнеры, не связанные с хроматин-ремоделлирующим комплексом.

2.5 Список использованных источников

- 1 Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., Wan M., Winslow M.M., Staahl B.T., Wu H., Aebersold R., Graef I.A., Crabtree G.R. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // *Neuron*. - 2007. - Vol. 55. - P. 201-215.
- 2 Wampler S.L., Tyree C.M., Kadonaga J.T. Fractionation of the general RNA polymerase II transcription factors from *Drosophila* embryos // *J Biol Chem*. - 1990. – Vol. 265. - P. 21223-21231.
- 3 Budzynski M.A., Puustinen M.C., Joutsen J., Sistonen L. Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation // *Mol Cell Biol*. - 2015. - Vol. 35. – P. 2530-2540.

- 4 Venken K.J., Kasrowicz J., Kuenen S., Yan J., Hassan B.A., Verstreken P. Recombineering-mediated tagging of Drosophila genomic constructs for in vivo localization and acute protein inactivation // *Nucleic Acids Res.* - 2008. – Vol. 36 – P. e114.
- 5 Patel N.H. // *Methods in Cell Biology, Drosophila melanogaster: Practical Uses in Cell Biolog.* - 1994. - Vol. 44. - Academic Press, New York. - 207 p.
- 6 Mohrmann L., Langenberg K., Krijgsveld J., Kal A.J., Heck A.J., Verrijzer C.P. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-remodelling complex // *Mol. Cell. Biology.* - 2004. - Vol. 24. - P. 3077 - 3088.
- 7 Baumann A.A., Texada M.J., Chen H.M., Etheredge J.N., Miller D.L., Picard S., Warner R., Truman J.W., Riddiford L.M. Genetic tools to study juvenile hormone action in Drosophila // *Sci Rep.* - 2017. – Vol. 18. – P. 21 - 32.
- 8 J. Bischof, R. K. Maeda, M. Hediger, F. Karch, and K. Basler. An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific C31 integrases // *PNAS.* - 2007. - Vol. 104. – P. 3312 – 3317.

РАЗДЕЛ 3. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

3.1 Введение

Арил-гидрокарбонный (диоксиновый) рецептор, АНР – это лиганд-активируемый транскрипционный фактор, регулирующий работу множества генов, участвующих в жизненно важных для организма процессах [1]. Активность АНР позвоночных животных зависит от экзогенных лигандов - ксенобиотиков [2-4]. При этом у беспозвоночных роль лигандов АНР выполняют агенты эндогенного происхождения [5]. Связавшись с лигандом, АНР становится фактором транскрипции своих генов-мишеней. Изучение механизмов регуляции целевых генов АНР важно для понимания процессов развития и патогенеза [6-7].

Важным условием успешного существования вида является его репродуктивный потенциал, который во многом зависит от уровня транскрипции генов, обеспечивающих развитие гонад и созревание половых клеток. Некоторые из этих генов являются целевыми генами АНР. Загрязнение окружающей среды ксенобиотиками - потенциальными лигандами АНР – способствует эктопической экспрессии этого рецептора, создавая угрозу успешному созреванию репродуктивных клеток, что может сказываться на репродуктивном потенциале многих видов, включая человека.

Для оценки степени возможных негативных последствий действия ксенобиотиков на сперматогенез человека мы использовали дрозофил, трансформированных человеческим геном *AhR*. Линия *UAS-AhR*, где ген арил-гидрокарбонного рецептора человека находился под контролем индуцибельного промотора дрожжей *UAS*, была получена нами в предыдущих экспериментах [8]. Для активации АНР человека в соматических клетках семенников (скс), гомологичных клеткам Сертоли млекопитающих, выполняющих трофическую функцию использовали систему *UAS-GAL4* и линию-драйвер *Tj-GAL4*.

3.2 Материалы и методы

3.2.1 Линии мух, условия содержания и выращивания, реагенты и скрещивания

Ранее в нашей лаборатории была получена линия *UAS-AhR* содержащая человеческий ген *AhR* под контролем индуцибельного промотора *UAS* в геноме *D. melanogaster* [8]. Линия дикого типа *Oregon R* и линия *Tj-GAL4/Cy* были получены из мировой коллекции (Блумингтон, США). Так же в работе использовали линию *ss^{aSc}* содержащую гипоморфную мутацию генов *CG5017* и *spineless*.

Для выращивания дрозофил использовали кормовую среду Formula 4-24 (Carolina Biological Supply, Берлингтон, Северная Каролина, США). В ходе работы использовали следующие лиганды: 2'Z-Индирубин (SML0280, Sigma-Aldrich, США), бета-Нафтофлавон (A18543, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Соединенное королевство), Индол-3-Карбинол (indinol, Mirax Biopharma, Россия), растворы лигандов готовили в соответствии с протоколом производителя. Конечные концентрации бета-Нафтофлавона, Индирубина и Индол-3-карбинола составляли 200 мкг на г среды, 25 мкг на г среды, 10 мкг на г среды соответственно.

Лиганды добавляли в кормовую среду имаго поколения F1, полученных от скрещивания самцов *Tj-GAL4* с самками *UAS-AhR*. Родителей содержали на стандартной среде Formula 4-24. Для экспериментов по кормлению были отобраны особи не старше суток после вылета. Мух содержали при комнатной температуре (25 °C).

Для получения мух генотипа *UAS-AhR/Tj-GAL4; ss^{aSc}* скрещивали самок *UAS-AhR/Cy; ss^{aSc}/D* с самцами *Tj-GAL4/Cy; ss^{aSc}/D*. В потомстве F1 отбирали особей, не несущих балансерные хромосомы. Мух содержали при температуре 22 °C.

3.2.2 Подсчет частоты неразвившихся яиц

Эксперимент проводился при комнатной температуре (25 °C). Самцов имаго *Tj-GAL4/UAS-AhR* (n = 7) кормили растворами лигандов в течение 2 дней, после чего их помещали в пробирки со свежей кормовой средой, и подсаживали к ним девственных самок линии *Oregon R* (n = 7). Каждые 24 часа, в течение четырех дней, самцов *Tj-GAL4/UAS-AhR* пересаживали на свежую среду, заменяя оплодотворенных самок *Oregon R* на девственных. Далее производили подсчет яиц, отложенных в течении суток. Неоплодотворенными считались яйца, которые не развивались в течение 24-25 часов. Эксперимент проводился трижды. Долю суточных неразвившихся яиц в пересчете на одну самку рассчитывали по следующей формуле: [(Количество неразвившихся яиц / Общее количество яиц) x 100%] / [Количество протестированных самок].

3.2.3 Анализ ПЦР в реальном времени

Каждый эксперимент был проведен в трёх повторностях, по протоколу, описанному в статье [8]. Праймеры и зонды TaqMan®, которые использовали в экспериментах, представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Описание праймеров и зондов, использованных в работе.

Ген	Обозначение	Праймеры (5'-3')
<i>Csas</i>	CSASst1	GAAATTGGTGGCTCATCGCT
	CSASst2	GGAACCTCCGAAATGGCATGA
	CSASTAQ	FAM-CGTCTCTGGCGAATTTCAGGCCG-BHQ1
<i>Nans</i>	NANSt1	TGCCCTGCCGAAATAAACTG
	NANSt2	TCCAAGAAATCCTCCGCTGT
	NANSTAQ	FAM-AGTCAGTGAACCCAGCGGCCT-BHQ1
<i>Mgat1</i>	mgat1f	TGATTTCAAGAGCGGTGTC
	mgat1r	GCGGTACTCTGTCTTAGC
	mgataq	FAM-TACAACAAACGGCGCGTGCA-BHQ1
<i>GstT4</i>	cg1681f	TTCGCACCCACTCTAGTCAC
	cg1681r	GCTCGATTGGTTCAGGAAAT
	cg1681taq	FAM- TCAACGAGATGTCGCAGCCACTC- BHQ1
<i>Cyp6g1</i>	Cyp6g1f	GCGATCCATTGGGCTATAAT
	Cyp6g1r	CCAATCTCCTGCATAAGGGT
	Cyp6g1taq	FAM- TCGCACCAAGCTGACTCCCG-BHQ1
<i>Rel</i>	Relf	GAAAGTAGCGATGCTGGTCA
	Relr	TGTTGTCCATTTCCGGTGTCT
	Reltaq	FAM-TCCAACCTCCACGGAATCCTCGTC-BHQ1
<i>p53</i>	p53f	GTA CTGATTCCGCTGAACA
	p53r	CACGCAAATTAAGTGGTTGG
	p53taq	FAM-CTGAACGTCCACGTTGAAGGCC-BHQ1
<i>Myc</i>	dmf	CCGCGCTACAATAACTTCAA
	dmr	GCAGTTCTGATACGGTGTGC
	dmtaq	FAM-TCGGTGGCCAACCTCGCGTTA-BHQ1
<i>dap</i>	dacf	CAGAGATGTACACCCTAA
	dacr	GGAGTCGTAACAAGATTC
	dactaq	FAM-TTATCCGTGTTCGACTCTAGCG-BHQ1
<i>Jra</i>	jraf	TTCACACTAACTCCCAGGCA
	jrar	CTCGTTCATGTTGGTGTAGG
	jrataq	FAM-CAACTGCGGCAGCCATGACA-BHQ1
<i>Rbf</i>	Rbf	CTGGCGAAGAGGTAATAGCC
	Rbr	GGA CTTCGCTAGTTGGAAGC
	Rbtaq	FAM-CTTCGCCCTCCGTTGACGGGT-BHQ1
<i>Cdc42</i>	cdc42f	CGAGATTACACACCATTGCC
	cdc42r	ATGGGCTTCTGCTTGTCTT
	cdc42taq	FAM-TGCTGTTCTCGTCGCGCAAA-BHQ1
<i>Rpl32</i>	Rpl32dir	CCAGCATAACAGGCCCAAGATC
	Rpl32rev	ACGCACTCTGTTGTCGATACC
	Rpl32probe	FAM-CGCACCAAGCACTTCATCCGCCAC-BHQ1

3.2.4 Иммуногистохимия

Эксперименты были проведены по протоколу, описанному в статье [8]. В работе использовали первичные поликлональные антитела (морская свинка) к белку дрозофилы Traffic jam - Tj (в разведении 1:5000). Вторичные антитела (1:200) были конъюгированы с Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Уолтем, Массачусетс, США). ДНК окрашивали SytoxGreen (1:500, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

3.2.5 Микроскопический анализ

Полученные иммуноокрашенные препараты фотографировали с использованием конфокального микроскопа Leica TCS SP5 в мультисканальном режиме с применением 40× иммерсионного масляного объектива. Изображения записывали с z-разрешением 0,7–0,8 мкм.

3.2.6. Анализ изображений

Полученные изображения импортировали в программу Imaris® 5.0.1 (Bitplane AG, Белфаст, Соединенное королевство) для последующей обработки.

Оценку количества соматических клеток на конфокальных изображениях проводили путем подсчета количества Tj-окрашенных клеток. Для подтверждения достоверности результатов использовали статистический тест *t*-критерий Стьюдента. Порог статистической значимости составлял $p \leq 0,01$ для бета-Нафтофлавона и $p \leq 0,001$ для Индирубина и Индинола.

3.3 Результаты и обсуждение

Индукция ксенобиотиками AHR человека в соматических клетках семенников (скс) дрозофилы вызывало снижение плодовитости самцов (рисунок 3.1;).

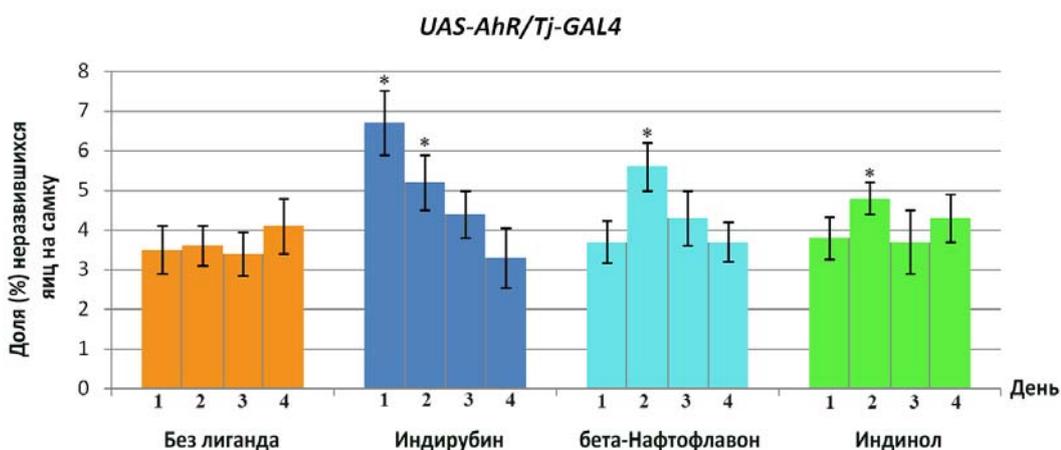


Рисунок 3.1 – Снижение плодовитости самцов $Tj > AhR$, росших на среде с индирубином (синий), бета-Нафтофлавоном (голубой) и индинолом (зелёный). Отсутствие лиганда в корме служило контролем (оранжевый). Данные получены в трёх независимых экспериментах, звездочка означает значимую разницу по сравнению с контрольной группой (* $p \leq 0.05$)

Этот эффект имел обратимый характер: плодовитость восстанавливалась спустя время после отмены действия ксенобиотика.

По-видимому, причиной понижения фертильности самцов в ответ на действие экзогенных лигандов, является нарушение процесса формирования соматических клеток в

районе хаба стволовых клеток семенников. Основанием для этого предположения являются результаты количественной, иммуно-гистологической оценки соматических клеток в районе хаба семенников (рисунок 3.2).

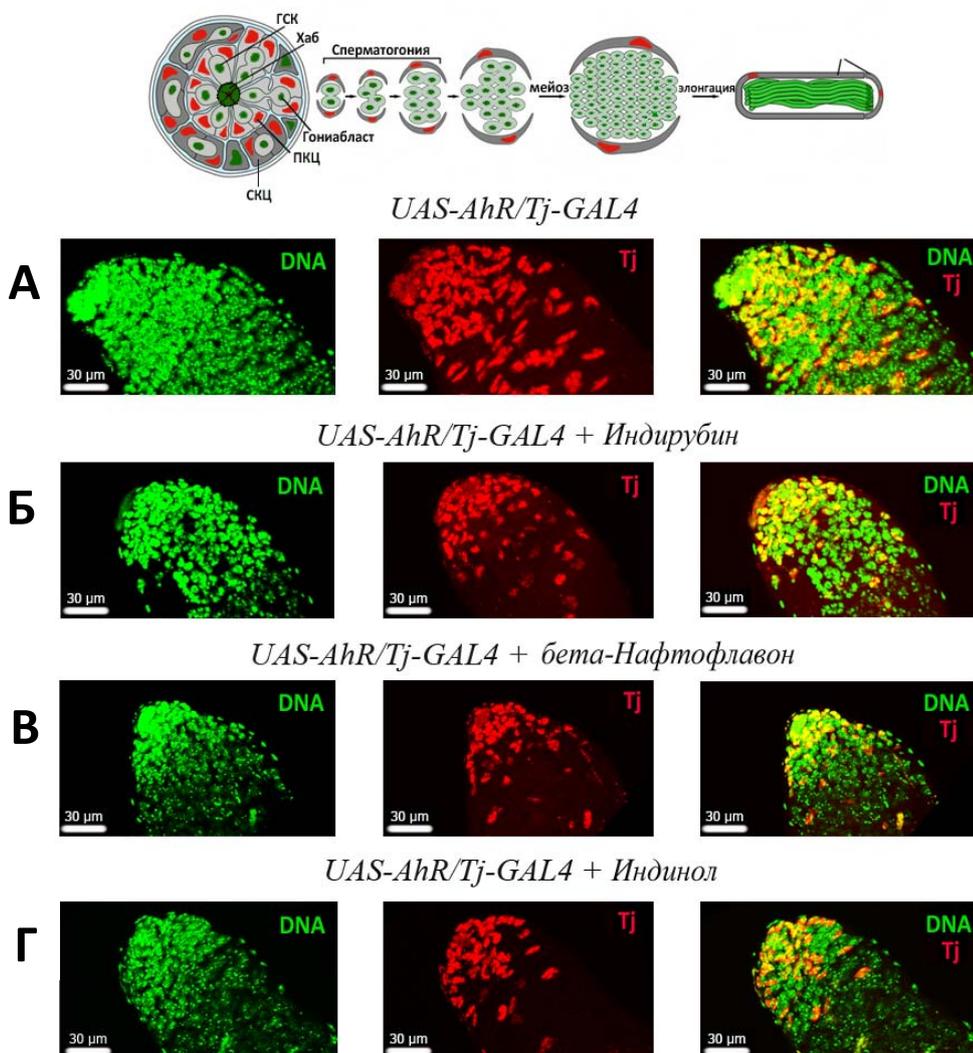


Рисунок 3.2 – Конфокальные срезы апикальной области семенников дрозофилы, окрашенные SytoxGreen (ДНК -зелёный) и анти-Tj (для визуализации скс - красный). Третья колонка – совмещённые срезы. Семенники от самцов, росших на стандартной среде (А), 3 дня потребляющих корм с индирубином (Б), бета-Нафтофлавоном (В), индинолом (Г). Генотип всех самцов одинаков - *UAS-AhR/Tj-Gal4*. Масштаб -30 μm. Вверху – схема сперматогенеза. ГСК – герминативная стволовая клетка, ПКЦ – предшественник соматической клетки цисты, СКЦ – соматическая клетка цисты. Окраска на схеме соответствует окраске на срезах

Подсчет Tj-положительных клеток в иммуногистохимических препаратах семенников самцов, развивавшихся на корме, содержащем экзогенные лиганды, выявил

достоверное уменьшение их числа по сравнению с семенниками, выделенными из контрольных самцов, развивавшихся на обычном корме (рисунок 3.3).

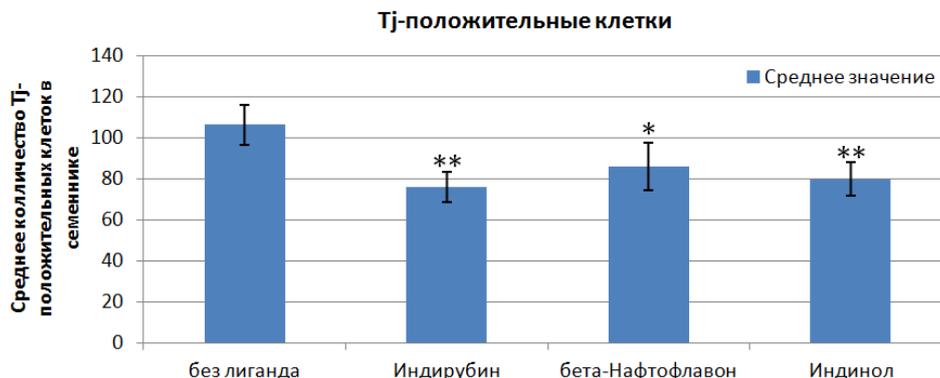


Рисунок 3.3 - Подсчет Tj-положительных клеток в хабе семенников имаго *UAS-AhR/Tj-GAL4*, росших 3 дня на стандартной среде, среде с индирубином, бета-Нафтофлавоном, индинолом. (* $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$)

В основе обнаруженных функциональных и морфологических различий между контрольными и подопытными самцами, без сомнений, должна быть активность целевых генов АНР, регулирующих гомеостаз и развитие семенников. Для оценки вызванных действием экзогенных лигандов изменений уровня транскрипции целевых генов АНР мы использовали метод полимеразной цепной реакции. С его помощью оценили влияние ксенобиотиков на уровень транскрипции генов, участвующих в поддержании гомеостаза, пролиферации и дифференцировки клеток. Результаты этих измерений представлены в виде графиков на рисунке 3.4. Полученные результаты уровней транскрипции целевых генов АНР после действия экзогенных лигандов в большинстве случаев свидетельствуют об их понижении, хотя и в разной степени. Активация АНР человека Индирубином привела к активации транскрипции почти всех протестированных генов, кроме *Mgat1*, *Cyp6g1* и *Myс*. Активация АНР человека бета-Нафтофлавоном приводила к активации экспрессии *Cyp6g*, *Rel* и *Myс*, а также к подавлению экспрессии генов *Mgat1* и *dap*. Активация АНР человека с помощью Индинола приводила к подавлению экспрессии *Cyp6g* и слабой активации экспрессии генов *Mgat1*, *GstT4*, *Csas*, *Rel*, *p53*, *Myс* и *Jra*. Они противоречат ожидаемым результатам, так как использованные нами лиганды относят к агонистам АНР и должны повышать его транскрипционную активность. В предыдущей нашей работе мы отнесли этот эффект к эпигенетическому состоянию генов и как следствие возможностью АНР человека связаться с *XREs* конкурируя при этом с эндогенным АНР дрозофилы [8].

UAS-Ahr/Tj-GAL4

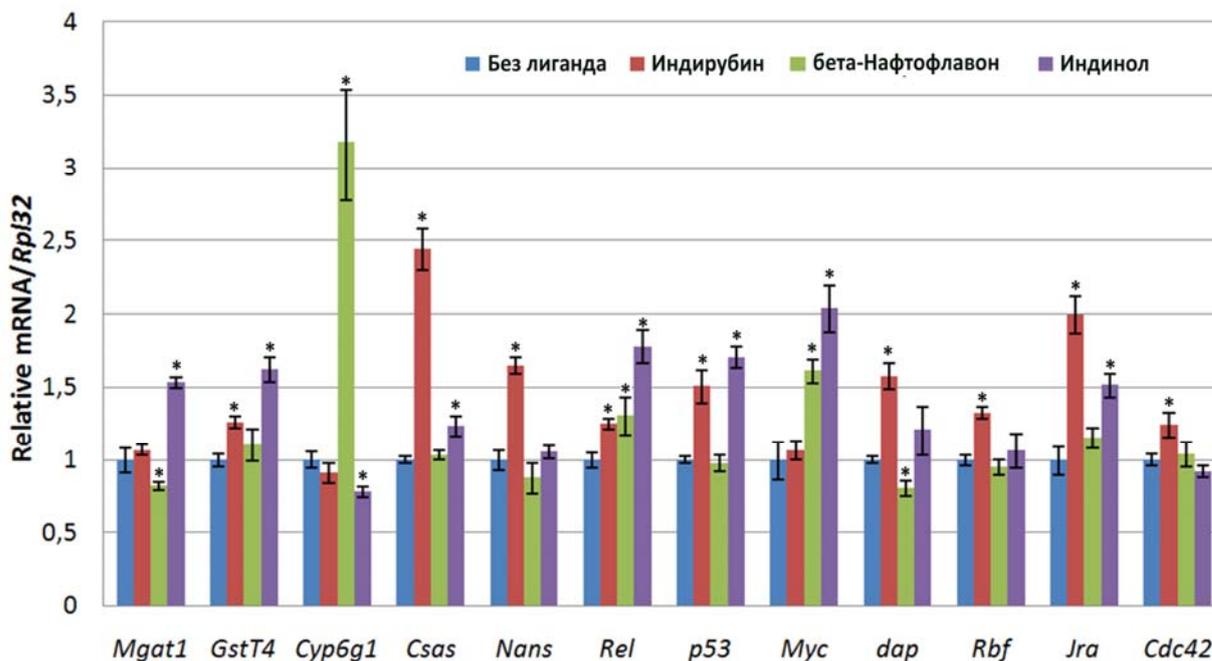


Рисунок 3.4 - Графики уровня экспрессии генов в образцах РНК, выделенной из семенников имаго, развивавшихся на среде, содержащей лиганд, 2 суток после вылета из пупария. Генотип: *UAS-Ahr/Tj-GAL4*. * $p < 0.05$

Учитывая, что в формировании эпигенетического статуса генов участвуют не только гены комплексов *Pc – Trx*, но и регуляторы активности гистонов H2A-H2B - нуклеотропные шапероны семейства генов *NAP1* - мы решили испытать значимость одного из его членов этого семейства - тестис-специфического tNAP1 на уровень транскрипции целевых генов АНР человека в клетках семенников дрозофилы. tNAP1 кодируется геном *CG5017*. Основанием для предположения об участии *CG5017* в регуляции активности АНР послужили результаты совмещения в одном геноме гипоморфных мутаций в локусе *CG5017* и *AHR*. Их совмещение в одном геноме вызывает синергию в проявлении обеих мутаций [8]. Для проверки высказанного предположения о влиянии tNAP1 на уровень транскрипции целевых генов АНР человека мы заменили нормальный ген *CG5017* у мух *Tj-GAL4/UAS-AHR* на мутантный аллель *ss^{asc}*. Результаты измерений уровней транскрипции целевых генов АНР в семенниках подопытных мух *UAS-hAHR/Tj-GAL4; ss^{asc}* с пониженным уровнем транскрипции *CG5017* и контрольных, с нормальным геном *CG5017* представлены на рисунке 3.5.

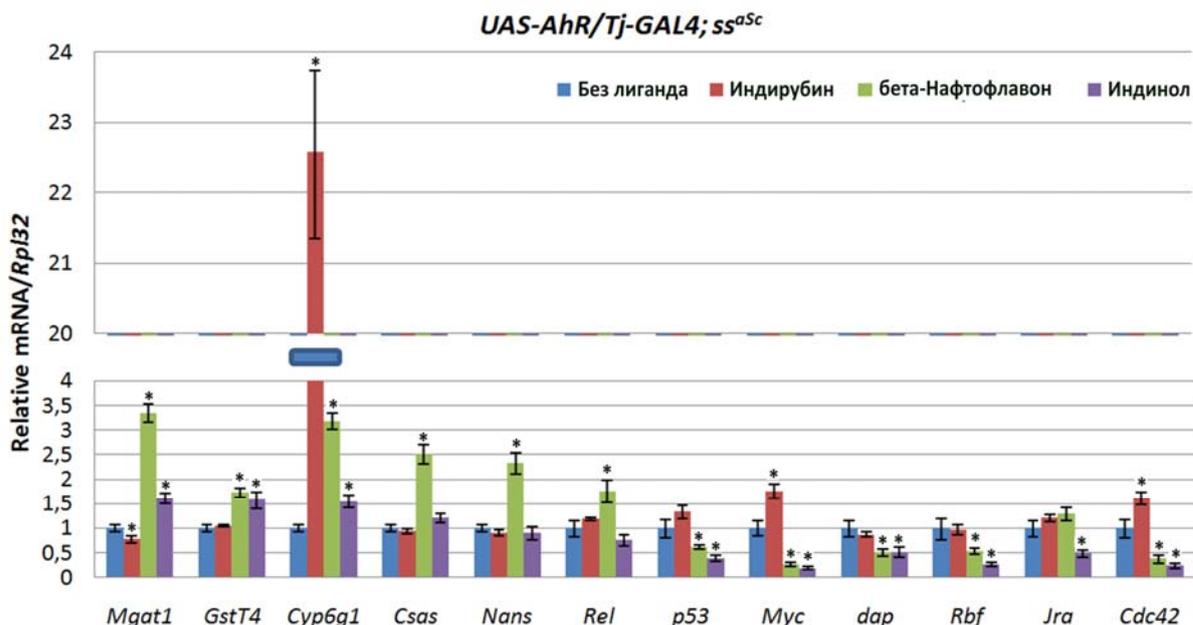


Рисунок 3.5 – Снижение экспрессии нуклеотропного шаперона CG5017 приводит к лиганд-зависимой активации некоторых целевых генов АНР. РНК выделяли из семенников имаго, развивавшихся на среде, содержащей лиганд, 2 суток после вылета из пупария. Генотип: *UAS-AhR/Tj-GAL4; ss^{aSc}*. * $p < 0.05$

Сравнение результатов измерений уровней транскрипции целевых генов АНР в семенниках подопытных и контрольных мух выявило повышение уровней транскрипции части из них в условиях эксперимента (таблица 3.2). При этом повышение уровней транскрипции разных целевых генов, в ответ на действие разных лигандов отличается. Кроме того, повышение уровней транскрипции в основном отмечено для генов, вовлеченных в процессы поддержания гомеостаза клеток. На уровень транскрипции генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток действие использованных лигандов не повлияло.

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

Таблица 3.2 – Снижение экспрессии шаперона CG5017 активирует лиганд-зависимую транскрипцию некоторых целевых генов АНР. Суммарные результаты РТ-ПЦР (рисунки 3.4 и 3.5): «+» повышение уровня транскрипции, «-» снижение, «0» нет влияния.

Ген	Лиганд					
	Индирубин		бета-Нафтофлавон		Индинол	
	Аллель CG5017					
	+/+	<i>ss^{aSc}</i>	+/+	<i>ss^{aSc}</i>	+/+	<i>ss^{aSc}</i>
<i>Mgat1</i>	0	–	–	+	+	+
<i>GstT4</i>	+	0	0	+	+	+
<i>Cyp6g1</i>	0	+	+	+	–	+
<i>Csas</i>	+	0	0	+	+	0
<i>Nans</i>	+	0	0	+	0	0
<i>Rel</i>	+	0	+	+	+	0
<i>p53</i>	+	0	0	–	+	–
<i>Myc</i>	0	+	+	–	+	–
<i>dap</i>	+	0	–	–	0	–
<i>Rbf</i>	+	0	0	–	0	–
<i>Jra</i>	+	0	0	0	+	–
<i>Cdc42</i>	+	+	0	–	0	–

3.4 Заключение

В 2019 году мы изучали действие экзогенных лигандов АНР на развитие семенников самцов *D. melanogaster*, трансформированных человеческим геном *AhR*. Используемая модель позволяет анализировать действие экзогенных лигандов АНР человека в пределах одного типа клеток дрозофилы, так как гомолог АНР дрозофилы не активируется экзогенными лигандами. Несмотря на то, что работа выполнена на модельном объекте – дрозофиле, её результаты важны для понимания возможных рисков у людей, подвергшихся действию ксенобиотиков, обладающих лигандной активностью по отношению к АНР человека. Описываемые результаты действия ксенобиотиков свидетельствуют о рисках нарушения процессов сперматогенеза у человека, подвергшегося действию экзогенных лигандов. Несмотря на то, что действие используемых лигандов у дрозофилы имеет обратимый характер, для человека последствия могут быть более глубокими и продолжительными, что является причиной изучения влияния ксенобиотиков на репродуктивные способности человека и сельскохозяйственных животных в условиях *in vivo*. Кроме этого, другой важной стороной результатов является демонстрация участия нуклеотропного шаперона семейства NAR1 в формировании дифференциальной доступности АНР человека к некоторым целевым генам [9].

Зависимость активации целевых генов АНР от их эпигенетического статуса, мы планируем выполнить в 2020 году. Полученные данные расширят представления об участии АНР человека в процессах регуляции развития и биodeградации токсических факторов.

3.5 Список использованных источников

- 1 Ge N.L., Elferink C.J. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle // J. Biol. Chem. - 1998. -Vol. 273. - P. 22708–22713.
- 2 Jaronen M., Quintana F. Immunological relevance of the coevolution of IDO1 and AHR // Front. Immunol. - 2014. - Vol. 5. - P. 521.
- 3 Stegeman J.J., Hahn M.E. // Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC, Ostrander GK. (Eds.). Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. CRC/Lewis. Boca Raton. - 1994. - P. 87–206.
- 4 Hahn ME. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective // Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol Toxicol Endocrinol. - 1998. - Vol. 121.- P. 23-53.
- 5 Mark E., Hahn M.E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution // Chemico-Biological Interactions. - 2002. - V. 141.- P. 131–160.
- 6 Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis // Biochem. Pharmacol. – 2000. – Vol. 59, P. 65– 85.
- 7 Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2019. V. 13. N.1. P. 36-54. DOI: 10.1134/S1990750819010116.
- 8 Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Mertsalov I.B., Zatsepina O.G., Slezinger M.S., Panin V.M., Petruk S., Enikolopov G.N., Mazo A., Simonova O.B., Kuzin B.A. Xenobiotic-induced activation of human Aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // Oncotarget. - 2017. - Vol. 8, P. 102934 - 102947.
- 9 Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Slezinger M.S., Simonova O.B., Kuzin B.A. NAP family CG5017 chaperone pleiotropically regulates human AHR target genes expression in *Drosophila* testis // Int. J. Mol. Sci. - 2019. V. 20. P. 1-13. DOI: 10.3390/ijms20010118.

РАЗДЕЛ 4 КЛЕТочНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Подраздел 4.1 Редактирование генома кок-сагыза

4.1.1 Введение

Натуральный каучук (НК) является важным стратегическим сырьем для производства широкого спектра промышленной продукции. Существует порядка 2500 видов растений, производящих каучук. Но на сегодняшний день, в основном, гевея (*Hevea brasiliensis*) является коммерческим продуцентом НК. Все плантации гевеи расположены в странах Юго-Восточной Азии. Актуальность темы данной работы связана с проблемами, возникшими в последнее десятилетие, а именно с несоответствием соотношения спроса и производства натурального каучука, гибелью плантаций гевеи, подтверждением возникновения аллергических реакций на продукты, изготовленные из гевейного каучука. Возникшее положение в мире и рост спроса на НК привели к поиску и созданию альтернативных гевее культур.

Taraxacum kok-saghyz, также известный как русский или казахский одуванчик, является диплоидным ($n = 16$), размножающимся половым путем и самонесовместимым видом, принадлежащим к роду *Taraxacum* [1]. После его открытия в 1931 году Л. Родиным и в связи с определением высокого содержания каучука в корнях, потенциал этого многолетнего растения был исследован, чтобы использовать в качестве стратегического источника натурального каучука. В последнее время *Taraxacum kok-saghyz* вновь получил популярность и многие страны начали исследовательскую деятельность с целью повышения его агрономических характеристик [2].

Целью работы является разработка эффективной методики микроклонального размножения и получение клонов каучуконосного растения *Taraxacum kok-saghyz*, а также создание трансгенных растений посредством генетической трансформации и отработка действенной методики трансформации кок-сагыза для дальнейших исследовательских работ, связанных с увеличением выхода НК у этого растения [3].

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: 1. Изучение культуры *Taraxacum kok-saghyz*, ее особенностей биологического развития, генетического потенциала; 2. Исследование методик микроклонального размножения, выявление и доказательство их преимуществ; 3. Разработка протоколов и проведение генетической трансформации корней кок-сагыза со сравнением вариантов методик. На данном этапе нами для популяций кок-сагыза была разработана эффективная система

регенерации растений *in vitro* из корневых эксплантов, для дальнейшей генетической трансформации [4].

4.1.2 Материалы и методы

Генетическая инженерия может быть очень эффективной для улучшения агрономической ценности и метаболизма кок-сагыза, а также для изменения свойств, таких как содержание и качество каучука в корнях и оптимизации выхода НК. В работе в качестве эксплантов использовали растения и семена кок-сагыза (*in vitro*), полученные из ВИР им. Вавилова.

4.1.2.1 Подготовка исходного материала

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

Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL1 с вектором p35 (рисунок 4.1). Вектор p35 содержит селективный ген *hph*, устойчивости к гигромицину В и маркерный ген *uidA*, кодирующий β-глюкуронидазу. А также сайты рестрикции: *Sal1*, *Kpn1*. Бактерии выращивали на средах LB и АВ с добавлением антибиотиков.

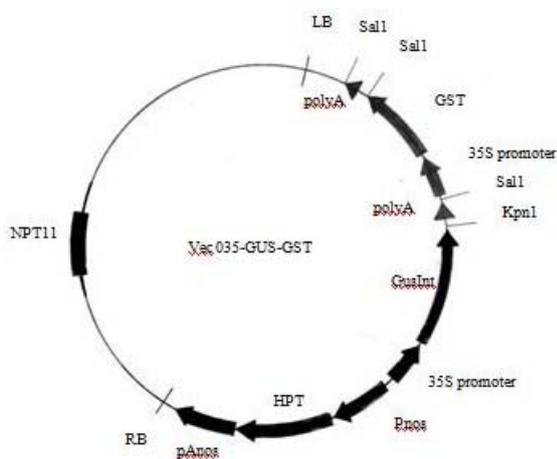


Рисунок 4.1.1 – Схема конструкции на основе вектора p35.

4.1.2.2 Микрклональное размножение *Taraxacum kok-saghyz*

Для культивирования кок-сагыза за основу брали питательную среду Мурасиге-Скуга, дополненную сахарозой 20 г/л, витаминами В5 1мг/л, а также содержащую агар 5,5 г/л. Значение рН=5,7. Для микрклонального размножения могут быть использованы различные части растения. В данной работе для микроразмножения *Taraxacum kok-saghyz* брали сегменты корней. Корни растений из пробирок разрезали на сегменты 1-2 см и переносили на чашки Петри. Использовали 2 варианта сред: вариант 1 - МС+6-БАП 1мг/л+ цефотаксим 300 мг/л; вариант 2 - МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л+ цефотаксим 300 мг/л. Для индукции регенерации растений в среду были добавлены регуляторы роста ауксины и цитокинины.

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

Для подготовки растительных эксплантов к трансформации были подобраны два варианта сред: вариант 1 - МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л с 20 г/л сахара; вариант 2 - МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л с 90 г/л сахара. Для подготовки агробактерии к трансформации ночную культуру агробактерии культивировали на среде АВ. Подготовленную агробактерию по стандартной методике разбавляли 1/2 средой МС. В эту колбу поместили заранее порезанные по 1 см корневые экспланты. И поставили на шейкер 100 об/мин, 28°C, 30 мин. Через 30 минут вынули корни и промыли средой 50/50 АВ+МС. Высадили корни на заранее подготовленные чашки Петри с двумя вариантами сред. Экспланты совместно с агробактерией ко-культивировались в темноте, в течение трех дней, при 28°C. Через 3 дня корни пересаживали на среду МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л+ цефотаксимом 600 мг/л для иллюминации бактерии.

После трансформации, при появлении побегов во время регенерации из сегментов корня экспланты переносили на селективную среду с гигромицином 3 мг/мл культивировали в течение четырех недель. Для селекции была подобрана среда с содержанием оптимальной концентрации гигромицина. Для этого сегменты корней не подвергавшихся трансформации высаживали на среду МС в чашки Петри с концентрациями гигромицина: 0,5; 1,0; 3,0; 6,0; 9,0 мг/мл. А также сегменты корней помещались на контрольную среду без антибиотика. Далее экспланты культивировали с фотопериодом 12 (16) ч света/темноты при 24°C в течение четырех недель. Учитывали появление участков регенерации и дальнейшее развитие из них побегов, а также количество погибших эксплантов.

4.1.3 Результаты и обсуждение

4.1.3.1 Микрклональное размножение *Taraxacum kok-saghyz*

Регенерацию из корневых эксплантов наблюдали через 7 дней после посадки на среды MS+БАП и MS+БАП+ИУК. Ниже на диаграмме представлены результаты экспериментов: количество регенерирующих эксплантов, каллуса, полноценных побегов из корневых эксплантов (рисунок 4.1.2).

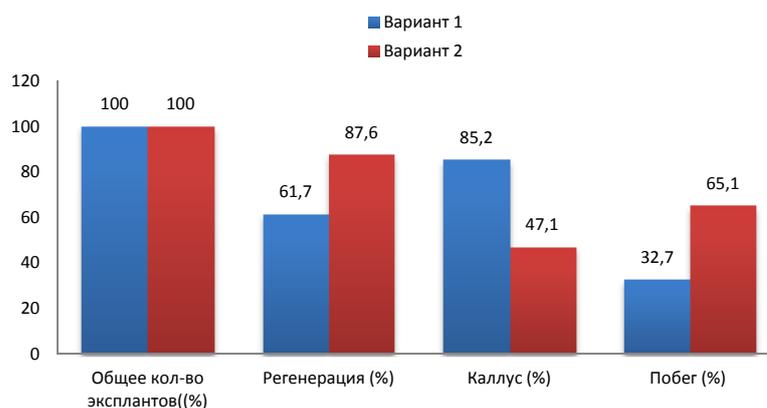


Рисунок 4.1.2 - Сравнение культуральных сред для регенерации корневых эксплантов Вариант 1: MS+6-БАП 1мг/л+ цефотаксим 300 мг/л; Вариант 2: MS+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л+ цефотаксим 300 мг/л.

Из рисунка 4.1.2 можно сделать вывод, что на культуральной среде в 1 варианте каллусообразование выше, чем во 2 варианте. Это может быть обусловлено отсутствием ауксинов в культуральной среде варианта 1, что приводит к дедифференцировке тканей (рисунок 4.1.3 А). Образовавшийся каллус светло-зеленой окраски с плотной структурой. В дальнейшем из каллуса развивались зачатки листьев и корней, формировались полноценные побеги.

Во втором варианте процент регенерации значительно выше, чем в первом. На такой результат могла повлиять комбинация ауксина и цитокина в питательной среде. Наличие ауксинов в среде привело к формированию эмбриоидов и побегов из корневых эксплантов. Количество образовавшихся побегов во втором варианте выше на 32,4%, чем в первом варианте. Побеги имеют светло-зеленую окраску, распложены группой. В большинстве случаев побеги образуются на ткани корня, минуя стадию каллуса (рисунок 4.1.3 Б).

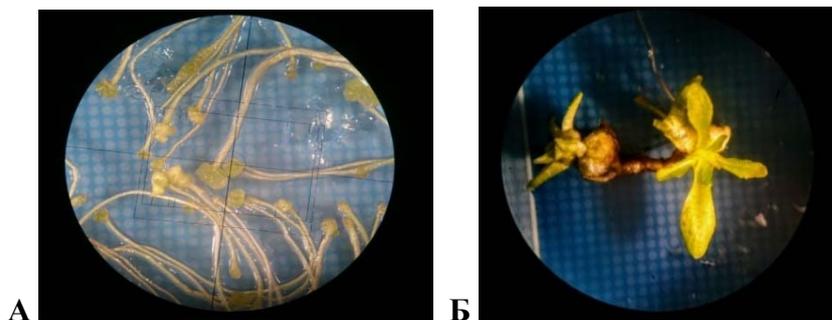


Рисунок 4.1.3 - Получение каллуса из корней (А) и регенерация побега из корня (Б)

Для быстрого получения каллуса из корневых эксплантов кок-сагыза подходит методика с использованием культуральной среды, содержащей БАП-6 с концентрацией 1 мг/л (вариант 1; при уровне значимости $p=0,05$), т.к. она показала наилучший результат между сравниваемыми вариантами.

Для прямой регенерации побегов из корневых эксплантов эффективнее оказалась среда с содержанием БАП-6 и ИУК с концентрациями 1 мг/л и 0,2 мг/л соответственно (вариант 2; при уровне значимости $p=0,05$). У побегов, полученных на данной среде спустя время, появлялись зачатки корней и далее наблюдалось развитие мощного, длинного корня.

4.1.3.2 Результаты подбора селективной среды.

В контрольном варианте среды без добавления антибиотика из корневых эксплантов во всех повторностях, наблюдалась регенерация и последующее развитие побегов. На селективной среде с концентрацией гигромицина 0,5 мг/мл на 10 день наблюдалась регенерация эксплантов с низким процентом образования побегов по сравнению с контрольным вариантом. В этом варианте среднее число погибших эксплантов составляло более 50% от всего количества эксплантов исследуемых в данном варианте среды. В среде с гигромицином 1 мг/мл, процент регенерации был ниже, чем в варианте с 0,5 мг/мл на 40% и составлял 5,6% от общего числа эксплантов. Наблюдалось заметное увеличение числа погибших эксплантов, которое достигало 94,4%. На всех эксплантах помещенных на среды с концентрациями антибиотика выше 3,0 мг/мл очаги регенерации не наблюдались. В течение четырех недель культивирования, такие экспланты приобретали черный цвет.

По полученным данным составлен график «доза-эффект» и найдена концентрация гигромицина, оказывающая летальное воздействие на корневые экспланты. В данном случае, эффект – это ответ клеток или ткани кок-сагыза на концентрацию гигромицина в селективной среде. При концентрации антибиотика ниже определенных значений,

эффектслишком мал для измерения и оценки, он стал заметным при более высоких концентрациях и впоследствии увеличения концентрации наблюдался его рост. После того как концентрация стала достаточно высокой, эффект прекратил расти и достиг своего максимума (рис. 4.1.4).

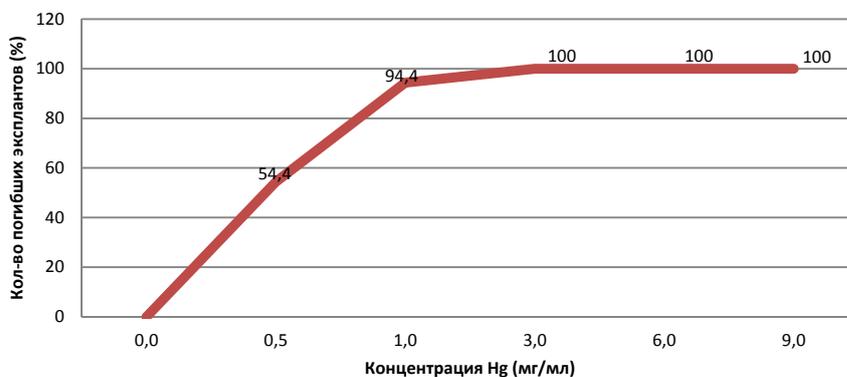


Рисунок 4.1.4 - Влияние различных концентраций гигромицина В на гибель корневых эксплантов

Из рисунка 4.1.4 видно, что при увеличении концентрации антибиотика в питательной среде, возрастает процент гибели эксплантов кок-сагыза. Превышение концентрации в среде 3 мг/мл ведет к 100% гибели эксплантов. В контрольном варианте среды корневые побеги оставались живыми и давали 100 % регенерацию. Для дальнейшего отбора трансформированных клеток была выбрана селективная среда с концентрацией гигромицина 3 мг/мл.

4.1.3.3 Результаты генетической трансформации

Для разработки методик по регенерации корневых побегов после трансформации кок-сагыза были отработаны 2 варианта культуральных сред. На корневых эксплантах на 7 день после трансформации стали заметны очаги регенерации. На 14 день культивирования эксплантов на среде с повышенным содержанием сахарозы, как и предполагалось, наблюдался высокий процент регенерации, составляющий 95,7%. Был отмечен каллусогенез, так и органогенез.

На рисунке 4.1.5 представлена диаграмма сравнения эффективности методик трансформации. В первом варианте процент регенерации ниже на 9,1 % и составляет 86,6%. Процент полученных предполагаемых трансформантов во втором варианте составил 12%. Процент полученных побегов в первом варианте, оказался существенно ниже и составил 3,2%.

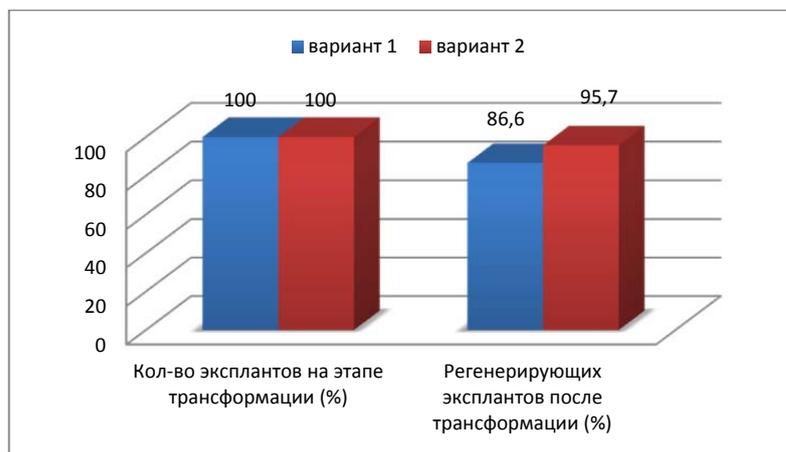


Рисунок 4.1.5 - Сравнение эффективности методик для регенерации побегов кок-сагыза из эксплантов после трансформации (%). Вариант 1: МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л с 20 г/л сахара. Вариант 2: МС+6-БАП 1мг/л +ИУК 0,2 мг/л с 90 г/л сахара

4.1.3.4 Результаты гистохимического окрашивания

В качестве целевого гена, который позволил оценить эффективность данной методики трансформации был выбран маркерный ген *uidA*, кодирующий синтез β-глюкуронидазы. Целевой ген находился в составе векторной конструкции р35, клонируемой в *Agrobacteriu mtumefaciens*. Этот ген является удобным при оценке экспрессии, так как при взаимодействии реактива X-Gluc с геном наблюдается окрашивание в ярко синий цвет.

Гистохимический метод дал возможность определить локализацию трансформированных тканей и областей, в которых произошли генетические модификации клеток. Подтверждением эффективности использованной методики трансформации корней кок-сагыза стала наблюдаемая экспрессия маркерного гена *uidA*, которая проявилась в виде синего окрашивания тканей растения, после инкубации в растворе с X-Gluc (рисунок 4.1.6).



Рисунок 4.1.6 - Экспрессия маркерного гена в побеге кок-сагыза

4.1.4 Заключение

В связи с необходимостью импортозамещения натурального каучука (НК) из гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis*) необходим поиск и организация производства НК из растительных каучуконосов, выращенных в климатических условиях средней полосы Российской Федерации. Перспективным для возделывания в средней полосе РФ является кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin). Для популяции кок-сагыза была разработана эффективная система регенерации растений *in vitro* из корневых эксплантов, для дальнейшей генетической трансформации. В настоящем исследовании показано, что сегменты корней и листьев могут регенерировать в фертильные растения на среде Мурасиге и Скуга с добавлением регуляторов роста.

Предполагаемые трансгенные проростки, полученные в течение 7 недель, были устойчивы к гигромицину и экспрессировали маркерный ген *uidA*. Побеги укоренялись на питательной среде и развивали мощные корни. Частота трансформации составила – 10,3 %. В дальнейшем возможно микрклональное размножение полученных модифицированных растений кок-сагыза.

Разработанные методики регенерации, и трансформации кок-сагыза являются простой системой для получения жизнеспособных трансгенных растений за срок 10-15 недель. Разработанный протокол позволяет улучшать продуктивность НК кок-сагыза, методами генной инженерии.

4.1.5 Список использованных источников

- 1 Krotkov G. A review of literature on *Taraxacum koksaghyz* Rod // The Botanical Review – 1945. – Vol. 11. – P. 417 - 461.
- 2 Van Beilen J.B, Poirier Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber // Trends Biotechnol. - 2007. - Vol. 25. - P. 522 - 529.
- 3 Гапоненко А.К., Вербицкая А.А., Гаврилова В.А., Таранов В.В., Шульга О.А. Улучшение продуктивности и качества натурального каучука у альтернативных гевее растений // Последние достижения: Сб. Мат. – М., 2018. - С. 34.
- 4 Иванова А.С., Вербицкая А.А., Гапоненко А.К.: Разработка методов микрклонального размножения и генетической трансформации кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) // Биология - наука 21 века: 23-я Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых: Сб. Мат. – М., 2019. - С. 434.

Подраздел 4.2. Влияние химических мутагенов на морфогенез ряда сельскохозяйственных и декоративных растений

4.2.1 Введение

Рапс (*Brassica napus* L.) – это культурное растение «широкого профиля», которое выращивают и как источник ценного растительного масла с высоким содержанием моно- и полиненасыщенных жирных кислот, и как источник белка, который используют и в комбикормах, и для введения незаменимых аминокислот в рацион человека. Рапс неприхотлив, не требует высоких затрат на агротехнику, может возделываться в условиях умеренного климата. Рапс возник от двух диплоидных видов сурепицы (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*, геном А) и капусты (*B. oleracea* ssp. *albaglabra*, геном С) [1]. Эти два генома *Brassica* произошли от подобного *Arabidopsis* древнего предка в результате геномной дупликации, хромосомных перестроек, делений и слияний [2-4]. Более того, в каждом из этих геномов встречаются копии мультигенов, например, вовлеченных в биосинтез жирных кислот, и улучшение признака у рапса часто намного сложнее, чем у его диплоидных видов-предшественников, поскольку гены обоих диплоидных геномов кодируют ферменты, обуславливающие биосинтез у амфидиплоидного вида [5].

Использование семян рапса в качестве кормовой добавки ограничено наличием в них антипитательных веществ: лигнина, синапинов и проантоцианидинов (РАs). Они представляют собой фенольные соединения, которые образуются в различных рукавах фенилпропаноидного биосинтеза. Синапин ((холиновый эфир), как основной компонент флавоноидов в виде комплексов с гликозидами флавонолов, снижающий качество рапсового белка в фураже, считается анти-питательным, хотя в растении он поставляет важный компонент для биосинтеза фосфатидилхолина плазматической мембраны и способствует защите от ультрафиолета [6]. Проантоцианидины – это окисленные танины, обуславливающие окраску семян. Наибольшее их количество содержится в черных оболочках семян [7, 8].

Наиболее эффективный способ индуцирования изменчивости у рапса – химический мутагенез [9-12]. Этот метод, получил широкое распространение в нашей стране, благодаря супермутагенам, открытым И.А. Рапопортом. Супермутагены, такие как ЭМС, позволяют с высокой частотой получать важные в теоретическом смысле, и полезные для практической работы, так называемые «таксономические» мутации, среди которых встречаются как рецессивные, так и доминантные [13].

Цель исследования – изучение полиморфизма признаков, их возможной связи с содержанием белка, жира и «антипитательных» фенольных соединений (синапин, лигнин,

фенилпропаноиды) в семенах растений мутантных линий ярового рапса в ряду мутантных поколений.

4.2.2 Материалы и методы

4.2.2.1 Растительный материал

Коллекция мутантных форм и линий с измененными морфологическими признаками, созданная на Кропотовской биостанции ИБР РАН. Работу проводили на Кропотовской биостанции и в ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса.

4.2.2.2 Биохимические анализы

Содержание жира определяли методом обезжиренного остатка; содержание общего азота - фотометрически с последующим пересчетом на белок; клетчатки – методом Геннеберга и Штоманна (Weende method (Henneberg and Stohmann)), Содержание лигнина, НДК, КДК определяли по стандартной методике ВИК им. В.Р. Вильямса [14]. Толщину оболочки семян растений линий поколений М₄-М₈ определяли с помощью Scanning electron microscope JEOL, JSM-6380LA. Accelerating voltage 20 kV. SEI mode.

4.2.3 Результаты и обсуждение

4.2.3.1 Исследование полиморфизма морфологических признаков в поколениях М₄-М₉

В новом сезоне были выявлены новые мутантные линии М₄-М₅: уникальная линия №1243, в которой сочетаются крупные размеры цветков и стручков, хотя во всех ранее выделенных формах размеры цветков и ширина лепестков не превышают размеров цветка дикого типа. Стручки растений широкие - около 8 мм, но не укороченные (до 5,5 см), а нормальной длины (6-7см), и крупные широколепестные цветки (рисунок 4.2.1 А), прикрепление стручков при этом вертикальное или смешанное, причем между стручком и цветоножкой образуется угол; позднеспелая линия №1156 - растения высокорослые с морщинистыми листьями (рисунок 4.2.1 А, Б); позднеспелая линия №401 – растения с крупными бледно-желтыми цветками (рисунок 4.2.2 В);



Рисунок 4.2.1 - Цветки и стручки линии №1203 (А1 - стручок широкий короткий) и №1243 (А2 - крупный цветок, стручок широкий длинный) и их расположение на побегах (Б1- короткий и Б2 – длинный)

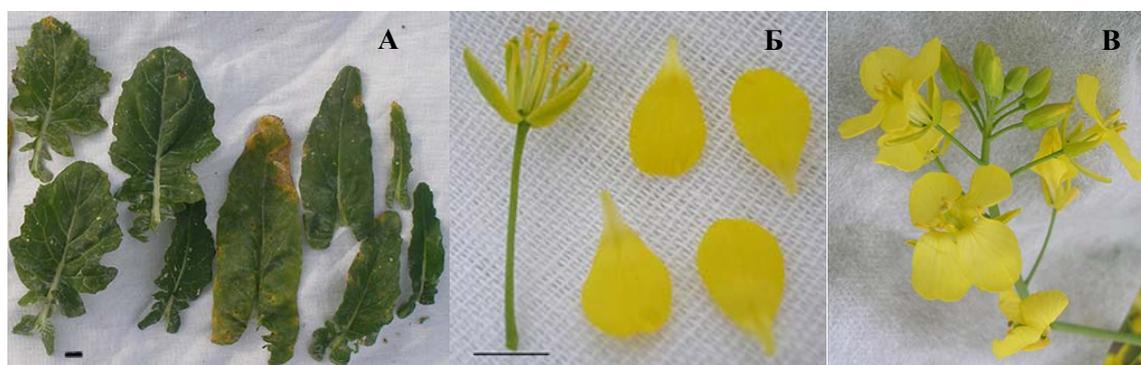


Рисунок 4.2.2 - Морфологические особенности мутантных линий ярового рапса: А- слабопузырчатые листья мутантного растения линии №1256, Б – Бледно-желтые широколепестные цветки мутантного растения, линия №401; В – широколепестный цветок. Масштабная полоска = 1см

4.2.3.2. Оценка и отбор перспективных высокобелковых мутантных линий.

Для использования в селекции кормовых сортов были отобраны формы М₃-М₄ с повышенным содержанием белка, в том числе, с измененной окраской семян. В результате исследований на основе этих форм были получены линии М₆-М₈.

4.2.3.2.1. Изучение вертикальностручковых линий рапса. Для семян растений позднеспелых линий № 904/16 характерно высокое содержание белка, у отдельных растений до 32%, и пониженное содержание жира (до 32-38%), в котором при этом содержание олеиновой жирной кислоты достигает 72-74% (рисунок 4.2.3).



Рисунок 4.2.3 - Растения вертикальностручковой линии №951 с высокой семенной продуктивностью – в среднем около 30 г с 1 растения

В линиях М₇ были выявлены единичные растения, семенная продуктивность которых достигала 50 г семян с одного растения. Мутантные линии с вертикальным расположением стручков, с компактным габитусом, с урожайностью около 40 г с растения, среднего срока созревания, полученные из семьи №951, №952, и позднеспелые линии семьи 904/16 были изучены в конкурсном сортоиспытании и размножены для передачи в ФГУ «Госсорткомиссия», в качестве высокобелковых сортов. Таким образом, высокобелковые линии №№ 949, 951, 952 и 904/16, отобранные в 2018 г, прошли конкурсное испытание, показали высокую семенную продуктивность (в среднем 35г и более с 1 растения), отличаются характерными признаками и средним или среднепоздним сроком созревания. Компактный габитус растений в сочетании с высокой урожайностью делает эти формы перспективным материалом для создания новых сортов [15],

4.2.3.2.2. Изучение мутантных линий рапса М₆-М₇ «сурепичного типа». Изучение биологии цветения «сурепичных» растений и исследование особенностей пыльцы с помощью сканирующей микроскопии позволило понять причину низкой семенной продуктивности этой формы. Оказалось, что у этой формы естественное самоопыление затруднено из-за того, что тычиночные нити длинных тычинок короче, чем у обычных растений и пыльца не попадает на рыльце пестика. Кроме того, при меньшем, по сравнению с нормальными растениями, количестве пыльцевых зерен, 60-90% стерильны, т.е. недоразвиты, с различными нарушениями. Цитологическое изучение показало, что у растений этих линий наблюдаются хромосомные нарушения в мейозе/митозе, чем и объясняется высокая стерильность пыльцы и низкая семенная продуктивность растений «сурепичного» типа [16].

Биохимическое изучение мутантных линий рапса М₆-М₇ «сурепичного типа», показало, что в ее побегах содержится примерно на 1/4 меньше лигнина, чем в исходном сорте (таблица 4.2.1), а количество целлюлозы и гемицеллюлозы выше на одну треть. Ткани стеблей у этого мутантного типа мягче, менее устойчивы к повреждению тлей даже в конце вегетации. Также это объясняет, почему у этого типа растений главный побег склонен в начале отрастания к полеганию, нарушению апикального доминирования, в связи с чем наблюдается усиленный рост боковых побегов.

Таблица 4.2.1 - Содержание НДК, КДК и лигнина в стеблях растений «сурепичного» и «рапсового» типов линий 577-987 и 577-876

Номер линии	Стебли		
	НДК	КДК	Лигнин
Т Викрос	36,40	30,1	5,92
577-876 (рапсовый)	39,08	33,44	6,68
Т 577-987 (сурепичный)	41,12	31,9	4,64

Таким образом, линии «сурепичного» типа можно использовать для получения зеленой массы, поскольку на высоком агрофоне она быстро разрастается, ее стебли не лигнифицируются в течение всего периода вегетации, и она активно ветвится, поскольку для ее пазушных почек нехарактерен период покоя.

4.2.3.3. Сравнительное изучение толщины, окраски и содержания клетчатки и запасных жиров и белков в разноокрашенных семенах мутантных растений линий М₄-М₆ ярового рапса.

У мутантных растений из разных линий №27-20, №27-21, №27-13, отобранных в потомстве одной светлосемянной формы №27, окраска семян в пределах одного растения может отличаться, причем светлые и темные семена могут соседствовать в одном стручке, а толщина оболочки варьирует незначительно. Кроме того, в зависимости от температуры воздуха в период цветения и первые 15 дней после оплодотворения, семена на побегах разных порядков и разных ярусов в пределах одного растения могут отличаться по окраске. Окраска оболочки более вариабельна, чем ее толщина, а в зависимости от погодных условий, у желтоокрашенных форм образуются исключительно темные семена или смесь по окраске, содержащая в среднем от 10 до 90% светлых семян, а у темноокрашенных – более 70% светлых семян. У растений линий с высоким содержанием

жира, полученных от коричневосемянной формы №834 наблюдается подобная же зависимость, но варьирует соотношение коричневых и темно-коричневых семян. Самая толстая часть оболочки, в среднем 60-90 мкм, у всех семян в независимости от окраски находится в районе это семенной крышечки, (hillum), в месте прикрепления семяножки, и даже у желтых семян с прозрачной оболочкой она слабоокрашена (рисунок 4.2.4).

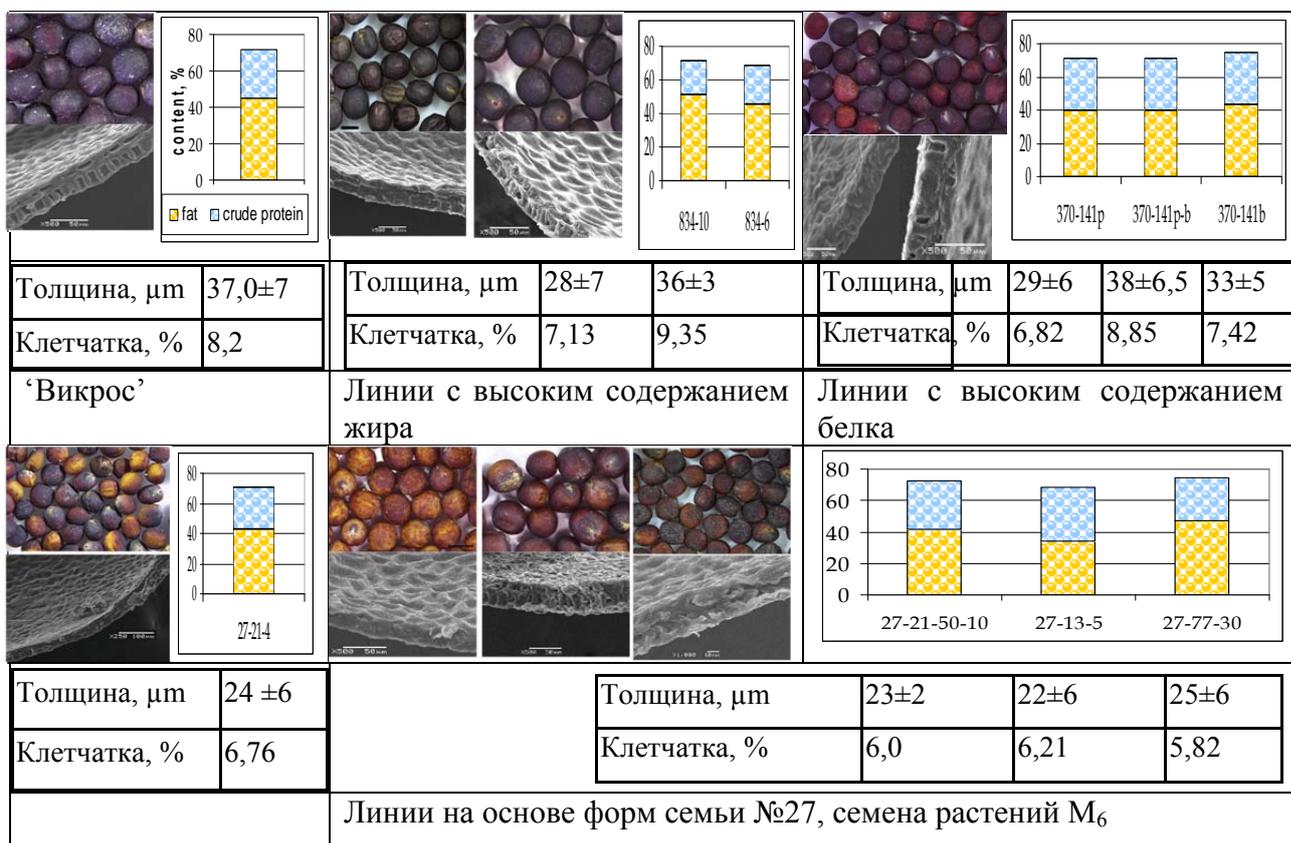


Рисунок 4.2.4 - Сравнительное изучение толщины, окраски и основных биохимических показателей рапса сорта ‘Викрос’ и мутантных линий M_4 - M_6

Наиболее высокое суммарное содержание жира и белка было выявлено в семенах с окрашенными оболочками. Отмечено, что, если вести отбор на признак «светлая оболочка», можно не получить формы с повышенным содержанием жира и белка. Таким образом, между окраской, содержанием клетчатки, лигнина и запасных белков, и жиров в семенах мутантных форм зависимость не прямая, хотя при отборе форм с повышенным содержанием белка и жира можно получить формы со сниженным содержанием сырой клетчатки. Как показали биохимические исследования, степень лигнификации оболочки зависит в большей степени от генотипа, поскольку в ряду поколений содержание лигнина у растений одной линии (M_6 - M_7) отличается незначительно. Коричневый оттенок связан, по-видимому, с высоким содержанием проантоцианидинов, а не лигнина. Высокое

содержание лигнина только усиливает окраску. Кроме того, и у светлых, и у темных оболочек наблюдается регулярная «ячеистая» структура, в то время как на поверхности оболочек красноватого оттенка отмечены различные нарушения формирования клеточных стенок и ячеистой структуры. Оболочка с низким содержанием лигнина - «пальто» - эластична, легко снимается с семени почти целиком, а высокое содержание лигнина делает ее жесткой – тип «скорлупа», при препарировании она крошится. Как показали биохимические исследования, эта особенность обусловлена низким (меньше 1%) или высоким содержанием лигнина (таблица 4.2.1). Лигнина в семенах Викросе содержалось 6%, в красно-коричневых было 4,5%, а желто-оранжевых и желтых семенах было в 5 раз меньше, чем в Викросе.

4.2.4 Заключение

Как показали исследования, при использовании низких концентраций мутагенов чаще возникают формы с тенденцией к повышению содержания белка, а растения повышенным содержанием жира возникают значительно реже. При этом, выявленные в первых 3х поколениях высокомасличные формы не сохраняют этот признак, если не происходит одновременное изменение габитуса. И, напротив, при отборе компактных раннеспелых «технологичных» растений на первых этапах работы, можно выявить высокомасличные формы. Сочетание в семенах высокого содержания белка с пониженным содержанием жира и клетчатки, созданных в результате исследования новых мутантных линий, позволяет использовать их для получения сортов кормового направления. Также, формы с тенденцией к увеличению белка в семенах (24% в М₄ и 32% - М₇) индуцируются с высокой частотой ЭМС и ДЭС. Кроме того, в семенах высокобелковых форм, полученных с помощью ДЭС, в поколениях М₆-М₇ отмечено высокое содержание олеиновой ЖК, более 70%, что делает такие линии перспективным материалом для получения высокоолеиновых линий для использования в медицинских целях [15-16].

4.2.5 Список использованных источников

- 1 Rahman H., Singer S.D., Weselake R.J. Development of low-linolenic acid *Brassica oleracea* lines through seed mutagenesis and molecular characterization of mutants // Theor Appl Genet. - 2013. - Vol. 126. - P. 1587 - 1598.
- 2 Lagercrantz U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication

accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements // *Genetics*. -1998. - Vol. 150. - P. 1217 – 1228.

3 Lagercrantz U., Lydiate D.J. Comparative genome mapping in *Brassica* // *Genetics*. - 1996. - Vol. 144. - P. 1903 – 1910.

4 Lysak M.A., Koch M.A., Pecinka A., Schubert I. Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae* // *Genome Res.* - 2005. - Vol. 15. - P. 516 – 525.

5 Rahman M.H. Fatty acid composition of resynthesized *Brassica napus* and trigenic *Brassica* void of genes for erucic acid in their A genomes // *Plant Breed.* - 2002. – Vol. 121. - P. 357 – 359.

6 Hannoufa A., Pillai B.V.S., Chellamma S. Genetic enhancement of *Brassica napus* seed quality // *Transgenic Research*. - 2014. - Vol. 23. - P. 39 - 52.

7 Wittkop B., Snowdon R.J., Friedt W. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe // *Euphytica*. – 2009. – Vol. 170. - P. 131 – 140.

8 Wittkop B, Snowdon RJ, Friedt W. Improvement of rapeseed meal quality via reduction of seed fibre-fractions // *GCIRC Proceedings*. - 2007. - Vol. 5. - P.303-305.

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

10 Mikolajczyk K., Dabert M., Karlowski W.M., Spasibionek S., Nowakowska J., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. Allele-specific SNP markers for the new low linolenic mutant genotype of winter oilseed rape // *Plant Breed.* - 2010. -Vol. 129. - P. 502 – 507.

11 Thurling M., Depittayanan V. EMS induction of early flowering mutants in spring rapeseed (*Brassica napus*) // *Plant Breed.* - 1992. - Vol. 108. - P. 177 – 184.

12 Jain S.M. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2005. - Vol. 82. - P. 113–123.

13 Рапопорт И.А. Открытие химического мутагенеза. Избранные труды. // М.: Наука. 1993. - 304 с.

14 Воробьев С.С., Худякова Х.К., Гарнст А.В. Методические рекомендации по определению углеводной питательности растительных кормов для жвачных животных // Москва. 1984. Типография ВАСХНИЛ. - 44 с.

15 Широкова А., Воловик В., Коровина Л., Уткина В., Шевцов А., Крутиус О. Сравнительный анализ высокобелковых форм ярового рапса, полученных в результате использования химических мутагенов диэтилсульфата и этилметансульфоната // Проблемы интенсификации животноводства с учетом охраны окружающей среды и

производства альтернативных источников энергии, в том числе биогаза: сборник статей. – Варшава: Институт технологических и естественных наук в Фалентах, 2019. – С. 181-184.

16 Amosova A.V., Zoshchuk S.A., Volovik V.T., **Shirokova A.V.**, Horuzhiy N.E., Mozgova G.V., et al. Phenotypic, biochemical and genomic variability in generations of the rapeseed (*Brassica napus* L.) mutant lines obtained via chemical mutagenesis // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14. - e0221699.

Подраздел 4.3 Изучение системы размножения и связанных с ней особенностей морфологической структуры цветка календулы лекарственной как индикаторов содержания биологически активных веществ.

4.3.3 Введение

В 2018-2019 гг. на ОЭУ "Кропотово" возобновлены исследования с календулой лекарственной сорта "Сахаровская оранжевая", оригинатором которого является ИБР РАН (Свидетельство №5374 согласно приказа Государственной комиссии Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам №236 от 26 декабря 1990 г.), выведенного Сахаровым В.В., Кузьминой А.В., Аркатовым В.В., Беляевой Р.Г., Довженко Л.И. Сорт внесен в Государственный реестр селекционных достижений и допущен к использованию в качестве исходного сырья для производства лекарственных форм [1].

По сведениям, имеющимся в ИБР РАН, и по данным одного из разработчиков данного сорта кандидата биологических наук Беляевой Р.Г. работа с сортом календулы лекарственной "Сахаровская оранжевая" была остановлена, в силу объективных причин, на этапе его регистрации в Государственном реестре селекционных достижений в 1990 году. Семеноводство было остановлено, в производство его так и не передали.

Мы поставили перед собой задачу, совместно с оригинатором сорта Беляевой Р.Г., возобновить семеноводство данного сорта, изучить систему размножения и связанных с ней особенностей морфологической структуры цветка календулы лекарственной как индикаторов содержания биологически активных веществ [2].

Одновременно, для изучения потребительского рынка календулы и лекарственных качеств сорта "Сахаровская оранжевая" был установлен контакт с АО "Красногорсклексредства" (Красногорский завод лекарственных средств) — старейшим в России предприятием по производству лекарственных средств из растительного сырья, расположенного в г. Красногорске Московской области, которое на сегодняшний день является лидером отечественной отрасли переработки лекарственных растений.

4.3.2 Материалы и методы

Выращивания элитных семян проводили в изолированном питомнике размножения непосредственно под руководством одного из авторов сорта календулы (*Calendula officinalis L.*) «Сахаровская оранжевая» Беляевой Р.Г. По комплексу важнейших признаков и свойств, присущих данному сорту (диаметр цветков –корзинки -5-9 см., вес соцветия -3-9 г., окраска цветков –интенсивно оранжевая, однотонная, высота растений – около 70-75 см., куст рыхлый, стебель прямостоячий), осуществлялся отбор лучших и браковка

худших потомств. Обращалось внимание на типичность растений данного сорта, отсутствие поражения вредителями, болезнями.

4.3.3 Результаты и обсуждение

Для реализации поставленной задачи оригинатор сорта "Сахаровская оранжевая" Беляева Р.Г., любезно предоставила нам семена суперэлиты урожая 2011 и 2013 годов.

Совместно Беляевой Р.Г. и сотрудниками ОЭУ "Кропотово" был заложен опытный участок, засеянный семенами суперэлиты "Сахаровская оранжевая" урожая 2011 и 2013 годов (три варианта) (рисунок 4.2.1):

1. семена суперэлиты 2011 года – отборы по цветкам и семенам, в момент отбора растения слабые, окраска цветков светлая, махровость слабая;
2. семена суперэлиты 2013 года – отборы по цветкам, в момент отбора растения хорошо развиты;
3. семена суперэлиты 2013 года – отборы по цветкам и семенам, в момент отбора растения хорошо развиты, махровость высокая. Год очень влажный. Отборы проводились (с июля) две недели каждый день. Популяция чистая, очень мало простых, встречаются желтые.



Рисунок 4.3.1 - Участок календулы сорта "Сахаровская оранжевая", 2018 г.

В результате по всем вариантам была получена высокая всхожесть семян (около 97%). Было проведено два прореживания. На всех вариантах были удалены все растения с простыми цветками и со светло-желтой окраской лепестков – 1-2%. Особо выделялся

третий вариант – растения были хорошо развиты (диаметр куста в среднем около 20 см, высота около 60 см), цветки крупные (от 4,5 до 6 см), средняя масса одного соцветия около 2 г., окраска насыщенная (оранжевые), степень махровости – супермахровые (все цветки язычковые) (рисунок 4.3.2). По первому и второму варианту больших различий не отмечалось.



Рисунок 4.3.2 - Цветки календулы: супермахровые (1), махровые (2) и простые цветки (3)

Для продолжения исследований в 2019 году использовали семена календулы лекарственной сорта "Сахаровская оранжевая" генерации 2018 г., которые были получены из отобранных растений хорошо развитых, крупных, оранжевой окраски, супермахровых (более 5 рядов лепестков в цветке – 96%). Результаты обследования 2019 г. растений этой группы на экспериментальном участке показали высокую степень супермахровости – до 95%. Растения с другими фенотипическими признаками цветка (простые, светло-желтая окраска) выбраковывались и удалялись. Семена лучших растений отобраны и сохранены для продолжения селекционных работ.

Поскольку окраска и махровость цветка коррелирует с накоплением и содержанием флавоноидов, необходимо углублять исследования по изучению химического состава цветков и их микроскопического анализа, а возможно и всей структуры цветка.

Сортовая чистота 100% (по показателям) составила:

- а) соцветия махровые, более 5 рядов лепестков в цветке – 96%;
- в) полумахровые соцветия, 3-5 рядов лепестков в цветке – 3%;
- с) единичные немахровые со светло-оранжевым венчиком – 1-2%.

Семена суперэлиты (рисунок 4.3.3) собирали отдельно по всем вариантам вручную только с первых цветков для дальнейшего изучения.



Рисунок 4.3.3 - Собранные семена календулы с участка суперэлиты

Предварительно с этих вариантов были отобраны образцы цветков – растительного сырья. Собранные цветки высушивали при температуре около 45⁰С в сушильном шкафу (рисунок 4.3.4).



Рисунок 4.3.4 - Сушка цветков. Подготовленные для отправки на анализ цветки

Высушенные образцы были направлены для анализа в контрольно-аналитическую и микробиологическую лаборатории ОКК 08.08.2018 г. (№18/08/01) АО «Красногорские лекарственные средства». Анализ выполнен по ГФ XII изд. ФС.2.5.0030.15 (таблица 4.3.1). Полученные результаты анализа показали, что представленные образцы по всем показателям не только отвечают требованиям нормативной документации, но и по главному показателю «Сумме флавоноидов в пересчете на рутин» в 2 раза превышают нормативные показатели.

Таблица 4.3.1 – Анализ состава цветков *Calendula officinalis L.* сорта "Сахаровская оранжевая"

Анализ выполнен по	ГФ XII изд. ФС.2.5.0030.15
--------------------	----------------------------

Аналитический листок на сырье № ВСО00000173				
Контрольно-аналитическая и микробиологическая лаборатории ОКК				
Ноготков лекарственных цветки (Цельное)				
Номер партии		Дата поступления		
Количество в партии, кг	0,20	Дата отбора пробы	08.08.2018 г.	
Поставщик	Кропотовская биостанция			
Результаты внешнего осмотра				
Анализ выполнен по	ГФ XII изд. ФС.2.5.0030.15			
№	Наименование показателей	Требования НД	Результаты испытаний	Примечание
1	Внешние признаки	Должны соответствовать НД	Соответствуют	
2	Влажность, % не более	14	10,2	
3	Золы общей, % не более	11	8,3	
4	Золы, нерастворимой в 10% HCl, % не более	5	1,3	
5	Экстрактивных веществ, извлекаемых водой, % не менее	35	41,7	
6	Суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % не менее	1	1,9	
7	Микроскопия	Должна соответствовать НД	Соответствует	
8	Качественные реакции	Должны соответствовать НД	Подтверждены	
9	Зараженность вредителями запасов, не выше	1 степень	Не обнаружено	А;
	Следы жизнедеятельности насекомых (мертвые насекомые).			
	Начальник ОКК			16.08.2018

Таким образом, впервые календула лекарственная сорта «Сахаровская оранжевая», полученная на опытно-экспериментальном участке «Кропотово», была апробирована непосредственно потребителем АО «Красногорсклексредства». Отделом качества и закупок нашему образцу была дана высокая оценка и предложено представить коммерческие предложения на закупку семян данного сорта.

Параллельно с возобновлением работ по сохранению производства семян суперэлиты календулы лекарственной "Сахаровская оранжевая" проведены исследования в производственных условиях при механизированном возделывании до уборки без применения ручного труда (рисунок 4.3.5).



Рисунок 4.3.5 - Производственный участок календулы *Calendula officinalis* L.

На производственном участке площадью около 0.5 га селекционной сеялкой с междурядьем 45 см была высеяна (14 мая) календула с нормой высева 10 кг/га.

К сожалению, по объективным причинам оптимальные сроки сева были упущены, что не позволило для борьбы с сорной растительностью применить боронование по всходам. Но, тем не менее, результаты показали возможность сева селекционной сеялкой с применением в последующем междурядной обработки. Использование такой технологии требует дополнительной проверки экспериментом. Но уже сейчас понятно, что это позволит значительно сократить расход семенного материала (в 5-7 раз) и затраты по возделыванию календулы, что в результате скажется на себестоимости продукции.

Данный посев мы использовали для заготовки семян. За период вегетации было проведено 8 сборов. Коробочки семян собирали вручную. Первый сбор был проведен 20 августа. Отсутствие трудовых ресурсов не позволило в полном объеме собрать семена. Окончательное количество семян после обработки, очистки и калибровки (рисунок 4.3.6) на лабораторном комплексе «Petcus» составило 26 кг. Таким образом, в случае

необходимости и при наличии трудовых ресурсов, параллельно с работой по сохранению чистоты сорта и его обновлению, имеется возможность вести семеноводство, а также совершенствовать элементы технологии механизированного возделывания календулы для лекарственных целей.



Рисунок 4.3.6 - Сортировка семян на лабораторном комплексе

4.3.4 Заключение

По результатам работы мы сделали следующие выводы.

1. Возобновлено первичное семеноводство календулы сорта "Сахаровская оранжевая" с элементами механизированного возделывания.

2. Установлено, что окраска и махровость цветка коррелирует с накоплением и содержанием флавоноидов. Махровые соцветия, более 5 рядов лепестков в цветке, по главному показателю «Сумме флавоноидов в пересчете на рутин» в 2 раза превышают нормативные показатели.

3. Впервые календула лекарственная сорта «Сахаровская оранжевая» полученная на опытно-экспериментальном участке «Кропотово» была апробирована непосредственно потребителем АО «Красногорсклексредства». По результатам биохимического анализа растения с супермахровыми цветками превышают требуемые показатели в 2 раза.

4.3.5 Список использованных источников

1 Беляева Р.Г. Генетическое изучение мутации махровость у растений с монокарпическим побегом // Генетика. -1995. - Т. 31. - С. 674 - 677.

2 Государственный реестр селекционных достижений, 2017. Том 1. Сорта растений.

РАЗДЕЛ 5. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И ПРОЦЕССЫ ОНТОГЕНЕЗА

5.1. Введение

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

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

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

В этом контексте убиквитилирование гистонов имеет особую значимость, поскольку объемный остаток убиквитина должен вызывать значительные напряжения в структуре нуклеосомы (например, при убиквитилировании остатка лизина K34 гистона H2B, расположенного между двумя витками нуклеосомной ДНК). Убиквитилирование гистонов играет ключевую роль в поддержании стабильного профиля экспрессии генов клетки. Приобретенные или наследуемые абнормальности профиля убиквитилирования

гистонов нарушают корректную экспрессию генов [8-9] и приводят к различным заболеваниям включающим онкологические заболевания [10-11], нарушения метаболизма[13-14], аутоимунные заболевания [15-16] и др. Исследование регуляторной роли убиквитилирования гистонов в процессах транскрипции и контроля динамики хроматина имеет большое значение для разработки методов диагностики и лечения этих заболеваний.

Действительно, нами впервые показано [17-18], что H2В K34ub (и, в меньшей степени, H2BK120) могут значительно увеличивать структурную динамику нуклеосомной частицы и способствовать генерированию «гексасом» - функционально-активных интермедиатов нуклеосом, содержащих только один димер H2A-H2B (примечательно, что лабильные гексасомные частицы [19] являются ключевым элементом большинства, если не всех, процессов функционирования хроматина [19-21]). На данный момент это первые данные, что модификации гистонов играют не только роль регуляторных «сигналов», но также способны кардинально изменять характеристики упаковки нуклеосомной ДНК, приводят к образованию функционально-активных интермедиатов нуклеосом. Так, влияние модификации H2В K34ub на структуру и динамику нуклеосомы сравнимо с эффектом энзиматических комплексов перестройки хроматина – например, комплекс FАСТ [22-26].

5.2 Материалы и методы

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

5.3 Результаты и обсуждение

Нами было разработана эффективная бесклеточная система модификации гистонов H2BK34ub с использованием рекомбинантных белков Msl1 и Msl2 (рисунок 5.1).

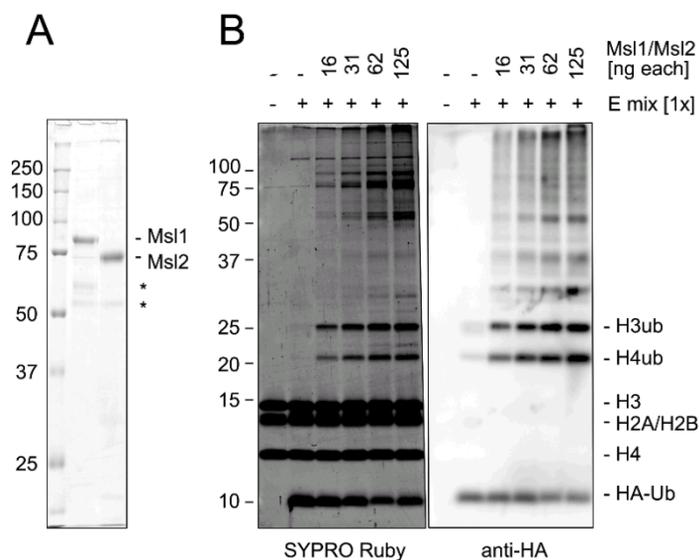


Рисунок 5.1 - (А) 10% SDS PAGE, окрашенный кумасси R250, показывающий очищенные белки MSL1 и MSL2. Некоторые неспецифические загрязнения / продукты разложения отмечены звездочками. (В) Гистоновые октамеры (2 мкг на 10 мкл реакции) инкубировали с увеличивающимися концентрациями очищенного MSL1/MSL2 в присутствии 1-кратной смеси убиквитилирования (смесь E; 5 нг / мкл E1, 25 нг / мкл E2, 50 нг / мкл HA-Ub) и 3 мМ АТФ в течение 1 ч при 26 ° С. Затем реакции разрешали в 15% SDS-PAGE и окрашивали SYPRO Ruby или вестерн-блоттингом с антителами против HA, как указано

Мы ранее показали, что убиквитилирование гистонов H2B по остатку лизина K34 способно значительно дестабилизировать нуклеосомы, причем даже «асимметричное» убиквитилирование нуклеосом (- т.е. модификация только одного димера гистонов) значительно сказывалось на динамике, хотя и в меньшей степени чем «симметричное» убиквитилирование. Поскольку различия симметричного и асимметричного убиквитилирования могут иметь регуляторное значение *in vivo*, мы предприняли попытку изучить особенности, характеристики и эффективность симметричного и асимметричного убиквитилирования H2BK34 нуклеосом очищенным комплексом Msl1/Msl2 (E3-убиквитин лигаза для гистона H2B). Мы приготовили белки Msl1 и Msl2 человека (Flag-tagged) посредством экспрессии в Bac-to-Bac (Invitrogen) бакуловирусной системе экспрессии белков (исходные векторные конструкции (pFastBac1) были те же, что использовались в Wu et al. (2011) [27] (рисунок 5.1). В качестве субстрата использовали нуклеосомные кор-частицы, реконструированные на 147 п.н. ДНК '601' используя

немодифицированные октамеры гистонов. Симметричное и асимметричное H2BK34-убиквитилирования изучали, сравнивая профили электрофоретического мигрирования модифицированных *in vitro* нуклеосом (энзиматическое убиквитилирование должно приводить к торможению нуклеосомных частиц в геле, степень торможения будет зависеть от количества (один или двух) присоединенных остатков убиквитина. См. публикации [17-18, 28] для описания электрофоретических профилей симметрично- и асимметрично модифицированных H2BK34ub нуклеосом. Мы показали, что, модификация нуклеосомных частиц происходила значительно менее эффективно по сравнению с модификациями отдельных димеров гистонов H2A-H2B и тетрамеров H3-H4 (рисунок 5.2) (ранее было показано, что Msl1/Msl2 проявляют специфичность к H2BK34 только в составе нуклеосом).

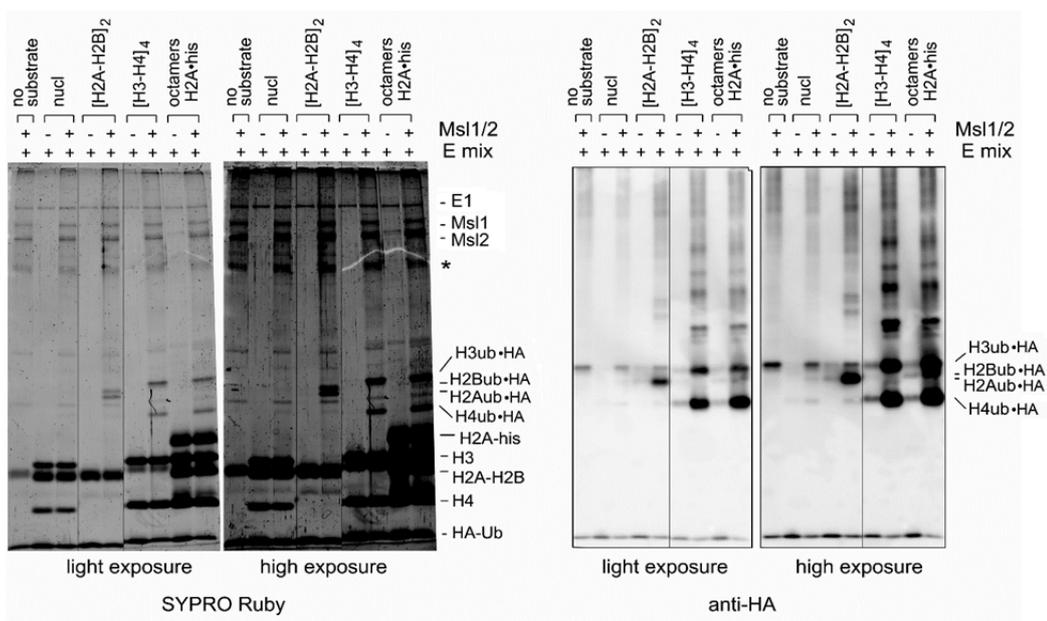


Рисунок 5.2 - Убиквитилирование нуклеосом в реакции с MSL1/MSL2. Реконструированные нуклеосомы (2 мкг), димеры гистонов (1,2 мкг), тетрамеры гистонов (1,2 мкг) или октамеры, содержащие H2A-his-tag (4 мкг), инкубировали в 10 мкл реакционных объемов в течение 1 ч в присутствии 3 мМ АТФ 100 нг каждого из MSL1 / MSL2, 3 мМ АТФ и 1-кратной смеси убиквитилирования (смесь E; 5 нг / мкл E1, 25 нг / мкл E2, 50 нг / мкл HA-Ub). Затем реакции анализировали в 15% SDS-PAGE и гели окрашивали SYPRO Ruby (левая панель) или вестерн-блоттингом с антителами против HA (правая панель)

Эти результаты предполагают, что для эффективной модификации нуклеосом комплексом Msl1/Msl2 необходима перестройка структуры нуклеосомы. Мы показали, что

нуклеосомная частица потенциально способна включать две группы убиквитина, т.е. потенциально возможно «симметричная» модификация гистонов H2В в обоих димерах H2А-H2В (рисунок 5.3). Результаты опубликованы [29].

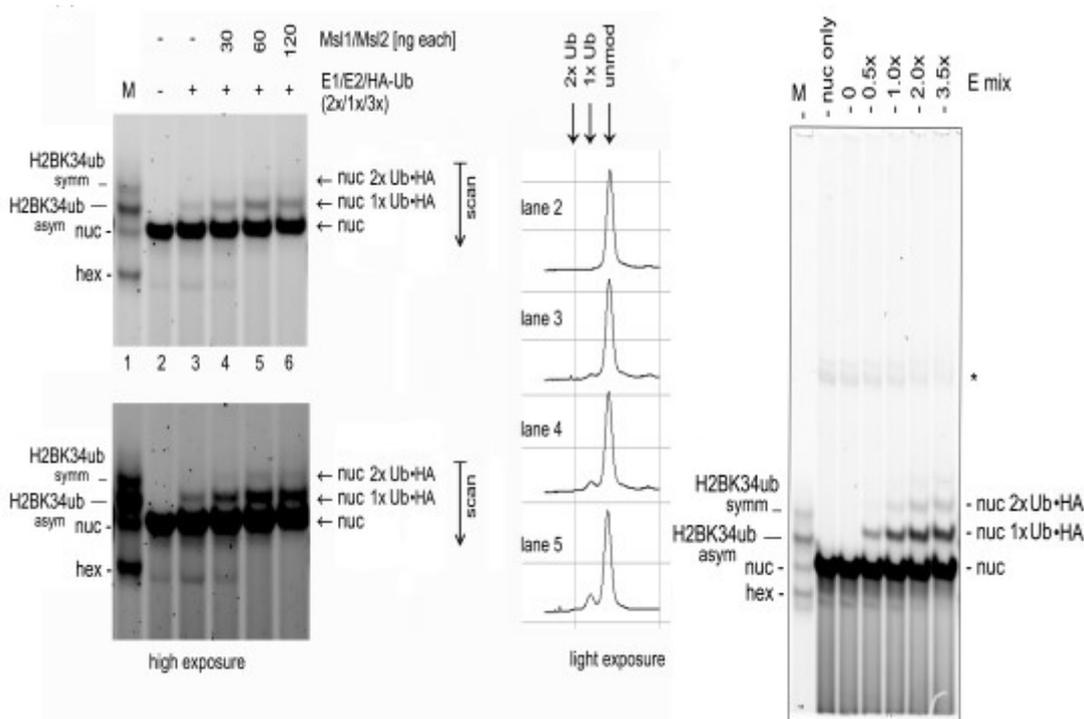


Рисунок 5.3. Левая панель. Прямой анализ убиквитилирования нуклеосом с помощью MSL1 / MSL2. Немодифицированные нуклеосомы (0,4 мкг) инкубировали в 10 мкл реакционных объемов в течение 3 часов в присутствии очищенного MSL1 / MSL2, 3 мМ АТФ и E1 / E2 / HA-Ub в указанных концентрациях. Затем 1/2 часть реакционного объема анализировали в 5,5% нативном нуклеопротеиновом геле и окрашивали SYBR Gold. На дорожке 1 показана смесь немодифицированных и симметрично / асимметрично модифицированных нуклеосом H2BK34ub. Денситометрическое отслеживание указанных полос геля показано справа. Правая панель. EMSA-анализ E3-независимого убиквитилирования нуклеосомы. Немодифицированные нуклеосомы инкубировали в течение ночи (26 ° C) с 3 мМ АТФ и 0,5-3,5-кратной убиквитилирующей смесью (смесь E; 1x соответствует конечным концентрациям 5 нг / мкл E1, 25 нг / мкл E2, 50 нг / мкл HA-Ub); затем продукты реакции анализировали в нативном ПААГ, как указано выше. «М» - смесь немодифицированных и симметрично / асимметрично модифицированных нуклеосом H2BK34ub. Неспецифический кондоминат нуклеосом обозначен звездочкой

Нами впервые показано, что модификации гистонов играют не только роль «сигналов» для регуляторных белков клетки, но также способны непосредственно изменять характеристики упаковки ДНК, приводя к образованию функционально-активных интермедиатов нуклеосом. Это позволяет предложить концепцию эпигенетического «структурного кода» активности хроматина, наряду с существующей

концепцией «сигнального кода» активности хроматина. На основе литературных данных и наших результатов опубликованы статьи, представляющие эту гипотезу [30-31].

5.4 Заключение

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

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

5.5 Список использованных источников

- 1 Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // Nature - 1997. - Vol. 389, P. 251 - 260.
- 2 Krajewski W.A., Razin S.V. DNA-protein interactions and spatial organization of DNA // Mol. Biol. Rep. - 1993. - Vol. 18, P. 167 - 175.

- 3 Krajewski W.A. On the role of inter-nucleosomal interactions and intrinsic nucleosome dynamics in chromatin function // *Biochem. Biophys. Rep.* - 2016. - Vol. 5, P. 492 - 501.
- 4 Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell* - 2007. - Vol. 128, P. 693 - 705.
- 5 Rothbart S.B., Strahl B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications // *Biochim. Biophys. Acta* - 2014. - Vol. 1839, P. 627 - 643.
- 6 Suganuma T., Workman J.L. Signals and combinatorial functions of histone modifications // *Annu. Rev. Biochem.* - 2011. - Vol. 80, P. 473 - 499.
- 7 Bowman G.D., Poirier M.G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics // *Chem. Rev.* - 2015. - Vol. 115, P. 2274 - 2295.
- 8 Bhaumik S.R., Smith E., Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* - 2007. - Vol. 14, P. 1008 - 1016.
- 9 Mirabella A.C., Foster B.M., Bartke T. Chromatin deregulation in disease // *Chromosoma* - 2016. - Vol. 125, P. 75 - 93.
- 10 Cao J., Yan Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer // *Front Oncol.* - 2012. - Vol. 2, P. 26.
- 11 Cole A.J., Clifton-Bligh R., Marsh D.J. Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy // *Endocr. Relat Cancer* - 2015. - Vol. 22, P. T19 - T33.
- 12 Johnsen S.A. The enigmatic role of H2Bub1 in cancer // *FEBS Lett.* - 2012. - Vol. 586, P. 1592 - 1601.
- 13 Gluckman P.D., Hanson M.A., Buklijas T., Low F.M., Beedle A.S. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases // *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2009. - Vol. 5, P. 401 - 408.
- 14 Gao C., Huang W., Kanasaki K., Xu Y. The role of ubiquitination and sumoylation in diabetic nephropathy // *Biomed. Res. Int.* - 2014. - Vol. 2014, P. 160692.
- 15 Dieker J., Muller S. Epigenetic histone code and autoimmunity // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* - 2010. - Vol. 39, P. 78-84.
- 16 Zou B., Yang D.L., Shi Z., Dong H., Hua J. Monoubiquitination of histone 2B at the disease resistance gene locus regulates its expression and impacts immune responses in *Arabidopsis* // *Plant Physiol* - 2014. - Vol. 165, P. 309 - 318.
- 17 Krajewski W.A., Li J., Dou Y. Effects of histone H2B ubiquitylation on the nucleosome structure and dynamics // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - Vol. 46, P. 7631 - 7642.

- 18 Krajewski W.A. Effects of DNA superhelical stress on stability of H2B-ubiquitylated nucleosomes // *J. Mol. Biol.* - 2018. - Vol. 430, P. 5002 - 5014.
- 19 Zlatanova J., Bishop T.C., Victor J.M., Jackson V., Van Holde K.E. The nucleosome family: dynamic and growing // *Structure.* - 2009. - Vol. 17, P. 160 - 171.
- 20 Rychkov G.N., Ilatovskiy A.V., Nazarov I.B., Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Konev A.Y., Isaev-Ivanov V.V., Onufriev A.V. Partially Assembled Nucleosome Structures at Atomic Detail // *Biophys. J.* - 2017. - Vol. 112, P. 460 - 472.
- 21 Venkatesh S., Workman J.L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2015. - Vol. 16, P. 178 - 189.
- 22 Formosa T. The role of FACT in making and breaking nucleosomes // *Biochim. Biophys. Acta* - 2013. - Vol. 1819, P. 247 - 255.
- 23 Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* - 2013. - Vol. 110, P. 7654 - 7659.
- 24 Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Experimental analysis of hFACT action during Pol II transcription *in vitro* // *Methods Mol. Biol.* - 2015. - Vol. 1276, P. 315 - 326.
- 25 Winkler D.D., Luger K. The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization//*J. Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 286, P. 18369-18374.
- 26 Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement // *Mol. Cell* - 2009. - Vol. 35, P. 365 - 376.
- 27 Wu L., Zee B.M., Wang Y., Garcia B.A., Dou Y. The RING finger protein MSL2 in the MOF complex is an E3 ubiquitin ligase for H2B K34 and is involved in crosstalk with H3 K4 and K79 methylation // *Mol. Cell* - 2011. - Vol. 43, P. 132 - 144.
- 28 Krajewski W.A., Vassiliev O.L. Analysis of histone ubiquitylation by MSL1/MSL2 proteins *in vitro* // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2019. - Vol. 666, P. 22 - 30.
- 29 Krajewski, W.A., Vassiliev O.L. Analysis of histone ubiquitylation by MSL1/MSL2 proteins *in vitro* // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2019. - Vol. 666, P. 22-30.
- 30 Krajewski, W.A. ‘Direct’ and ‘indirect’ effects of histone modifications: Modulation of sterical bulk as a novel source of functionality // *BioEssays.* – 2020. -Vol. 20; принято в печать (bies.201900136)
- 31 Krajewski, W.A. Ubiquitylation: How nucleosomes use histones to evict histones // *Trends Cell. Biol.* - 2019. - Vol. 29, P. 689 - 694.

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

6.1 Введение

Брачный ритуал дрозофил основан на генерации и рецепции раздражителей различного рода брачными партнерами. Сигналы, которыми обмениваются брачные партнеры, очень разнообразны: тактильные, акустические, визуальные, дистантные и контактные феромоны. К настоящему времени репродуктивное поведение дрозофил подробно описано, наиболее изучен брачный ритуал у *Drosophila melanogaster*. В то же время мутаций, которые влияют непосредственно только на половое поведение, известно немного. Недавно был открыт ген *quick-to-court (qtc)*, изменяющий некоторые аспекты поведения самцов [1]. Эффектом мутации явилось ускорение процесса ухаживания за самкой и увеличению частоты ухаживаний самцов за самцами. Молекулярные функции белка QTC до сих пор не известны. Недавно нами была получена делеция, включающая полную последовательность гена *qtc* [2]. Задачей нашей работы было исследование поведенческих особенностей полученного нами делеционного мутанта.

6.2 Материалы и методы

Поведение ухаживания регистрировали методом видеотипирования: все взаимодействия между самкой и самцом записывались на видеокамеру Sony HDR-SR 12E (Япония), а далее анализировались с помощью компьютерной программы Virtual Dub 1.10.3. Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программы Statistica v.10.

Исследование брачной песни проводилось совместно с Лабораторией сравнительной генетики поведения Института физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии Наук по методике, описанной ранее [3].

6.3 Результаты и обсуждение

Мы исследовали 8 элементов брачного поведения у мух с делецией гена *qtc*. В целом делеция *qtc* не влияла на частоту элементов брачного ритуала, однако для некоторых элементов ухаживания латентный период уменьшался, а продолжительность самих элементов увеличивалась (рисунки 6.1, 6.2).

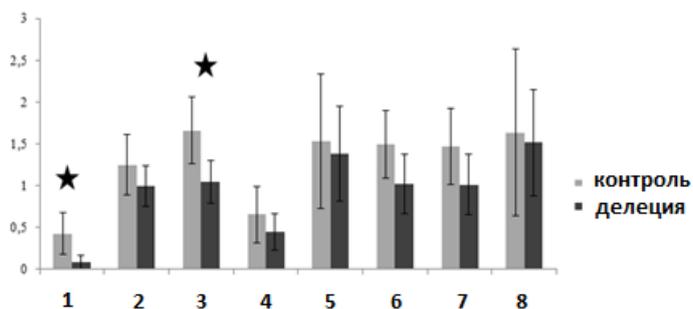


Рисунок 6.1 – Латентный период брачных элементов в условных единицах для контрольных мух и мух с делецией (1 - преследование самки самцом, 2 - ощупывание самцом конца брюшка самки, 3 – лизание, 4 - «пение» самца, 5 – кружение, 6 - попытка копуляции, 7 -взлет самки и 8 - отталкивание самкой задними ногами самца)

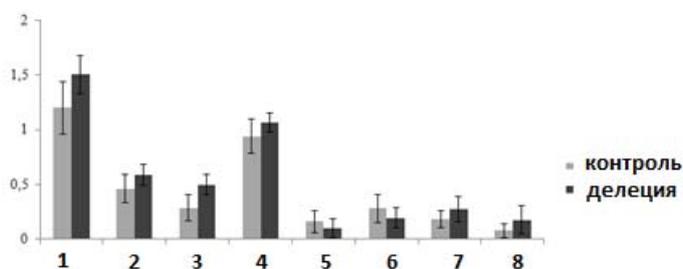


Рисунок 6.2 – Продолжительность брачных элементов в условных единицах для контрольных мух и мух с делецией (1 - преследование самки самцом, 2 - ощупывание самцом конца брюшка самки, 3 – лизание, 4 - «пение» самца, 5 – кружение, 6 - попытка копуляции, 7 -взлет самки и 8 - отталкивание самкой задними ногами самца)

Самым длительным из элементов брачного ритуала является песня самца, представляющая собой видоспецифический акустический сигнал, который самец генерирует, вибрируя отставленным в сторону крылом. Считается, что звуковая стимуляция нужна для усиления рецептивности самки и демонстрации готовности к спариванию. Нами было проведено два эксперимента по исследованию брачной песни. В одном самцы с делецией ухаживали за нормальными самками, в другом – нормальные самцы ухаживали за самками с делецией. Обнаружено, что самцы дикого типа ухаживали за мутантными самками менее интенсивно, чем за контрольными. Это проявлялось в снижении индекса пения (тест Mann-Whitney (MW), $P=0,03$), вызванного снижением частоты инициации посылок (MW, $P=0,05$). Кроме того, самцы начинали ухаживать за мутантными самками позже, чем за контрольными: в случае мутантных самок увеличиваются латентное время до первого импульса (MW, $P=0,02$) и латентное время до

первой посылки (MW, P=0,01). Таким образом, дефицит *qtc* у самок приводил к тому, что они хуже распознавались брачным партнером.

6.4 Заключение

Исследование показало, что делеция гена *qtc* в целом не приводит к нарушению структуры брачного поведения, хотя продолжительность некоторых элементов изменялась. В исследовании брачной песни впервые показало, что дефицит *qtc* у самок приводит к некоторым изменениям брачного ритуала, хотя раньше считалось, что этот ген участвует в формировании брачного поведения только самцов. Эти данные сочетаются с тем, что ген транскрибируется в одинаковой степени, как у самцов, так и у самок [1].

6.5 Список использованных источников

- 1 Gaines P., Tompkins L., Woodard C.T., Carlson J.R. quick-to-court, a drosophila mutant with elevated levels of sexual behavior, is defective in a predicted coiled-coil protein // *Genetics*. - 2000. - V. 154. - P. 1627 - 1637.
- 2 Kravchuk O.I., Mikhailov V.S., Savitsky M.Y. A Simple and Efficient Method of Inducing Targeted Deletions in the Drosophila Genome // *Genetika*. – 2015. - 51. – P. 1325 - 1329.
- 3 Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В., Камышев Н.Г. Особенности акустической коммуникации у плодовых мушек *Drosophila melanogaster* // *Сенсорные системы*. - 2000. - Т. 14. - С. 60.

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

7.1 Введение

В нормальных мышцах **активные формы кислорода (АКФ)** участвуют в регуляции многих процессов: адаптации к нагрузкам, напряжении, регенерации мышечных волокон и т.д. Чрезмерная генерация АКФ, которая наблюдается при гиперинтенсивных нагрузках, миопатиях и сахарном диабете, приводит к дисбалансу редокс-сигнализации в мышцах. Текущий этап работ посвятили разработке модельной системы FSHD на основе клеточных линий миобластов с повышенным содержанием активных молекул кислорода и поиску генов, меняющих свою активность в условиях окислительного стресса, возникающего при мышечной дистрофии Ландузи-Дежерина (МДЛД, FSHD). Это заболевание вызывает миопатию, которая наследуется по аутосомно-доминантному типу и приводит к мышечной атрофии, нарушению регенерации мышц, воспалению и окислительному стрессу. FSHD является одной из наиболее распространенных (1:8000-1:20000) наследственных нервно-мышечных патологий [1-2]. Этиология FSHD до конца не ясна и эффективного лечения не существует. Предполагается, что МДЛД развивается в результате совокупности генетических и эпигенетических событий, которые приводят к уменьшению гетерохроматического состояния в длинном плече хромосомы 4 (локус 4q35) и, как следствие, aberrантной экспрессии ряда генов в ядре [3]. Всё больше внимание уделяется эпигенетическим механизмам, влияющим на локальную упаковку хроматина ключевых генов раннего развития [4].

На сегодняшний день в качестве основного гена, индуцирующего FSHD, рассматривают ген *DUX4*, кодирующий транскрипционный фактор, экспрессия которого во взрослом организме в норме подавлена. В мышечных клетках больных FSHD ген *DUX4* работает спорадически на крайне низком уровне. Механизмы патологического действия *DUX4* до конца не понятны. Накапливаются данные, показывающие, что окислительный стресс и воспаление являются следствием экспрессии *DUX4* и одновременно ключевыми факторами, поддерживающим и усиливающим каскады де-регуляции, запущенные этим транскрипционным фактором. В случае FSHD, было показано, например, что окислительные повреждения ДНК, запускают сигнал, приводящий к повышению экспрессии *DUX4* в миобластах. Кроме того, было показано, что нарушение способности миобластов больных FSHD формировать нормальные миотубулы *in vitro* также, отчасти связано, с чрезмерной генерацией АКФ в этих клетках. Настоящее исследование

посвящено выяснению редокс-зависимого механизма патологического действия *DUX4* на созданной нами модельной клеточной культуре миобластов человека.

7.2 Материал и методы

Для исследования редокс-зависимых механизмов патологического действия *DUX4* мы использовали линию иммортализованных миобластов человека MB135 с индуцибельной экспрессией *DUX4-fl* (линия MB135-*DUX4*). Работу проводили с использованием стандартных методов молекулярной и клеточной биологии.

7.3 Результаты и обсуждение

7.3.1 Миобласты *MB135-DUX4* –удобная модель для исследования *in vitro* МДЛД.

Оказалось, что в наших условиях культивирования клеток *MB135-DUX4* экспрессия рекомбинантного *DUX4* в отсутствие индуктора (доксицилина) заблокирована не полностью. Это следовало из повышения экспрессии транскрипционных мишеней *DUX4*, *hZSCAN4* и *hTRIM43* в клетках MB135-*DUX4* по сравнению с его экспрессией в клетках MB135 (рисунок 7.1).

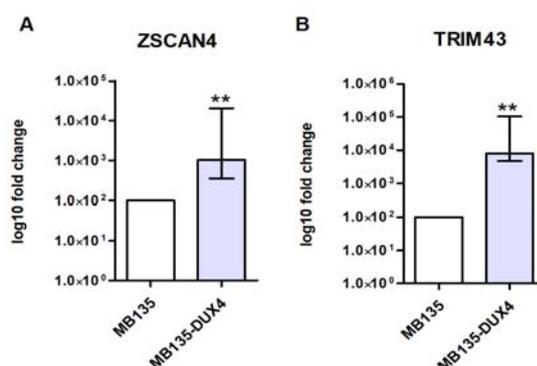


Рисунок 7.1 - Экспрессия *ZSCAN4* (A) и *TRIM43* (B) в клетках MB135 и MB135-*DUX4*, N = 7

Неполное ингибирование экспрессии *DUX4* в клетках MB135-*DUX4* вело к типичному для МДЛД нарушению миогенеза. Таким образом, клетки линии MB135-*DUX4* без дополнительной индукции экспрессии *DUX4* оказались подходящей моделью для исследования МДЛД *in vitro*.

7.3.2 Использование антиоксидантов вызывает снижение АФК и восстановление миогенеза в миобластах MB135-*DUX4*

Миобласты *MB135-DUX4* производят больше АКФ, чем контрольные миобласты *MB135* без экспрессии *DUX4* (рисунок 7.2). Применение как классических антиоксидантов (Tempol, Trolox), так и митохондриального антиоксиданта SkQ1 (ион Скулачёва SkQ1) эффективно снижает уровень АКФ (рисунок 7.2).

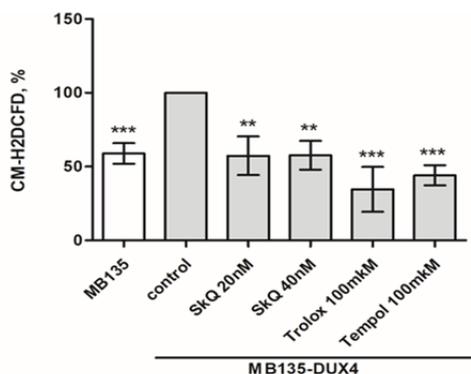


Рисунок 7.2 – Определение количества АКФ (CM-H2DCFDA) с помощью клеточной проточной цитометрии в исходной линии *MB135* и в условиях оксидативного стресса до (контроль) и после добавления антиоксидантов; N = 5 - 16.

В миобластах *MB135-DUX4*, предварительно обработанных антиоксидантами в течение 4 дней до их дифференцировки, произошло заметное исправление мутантного фенотипа, что восстановило их способность к дифференцировке и формированию толстых разветвлённых миотрубок, сходных с миотрубками контрольных клеток *MB135* (рисунок 7.3).

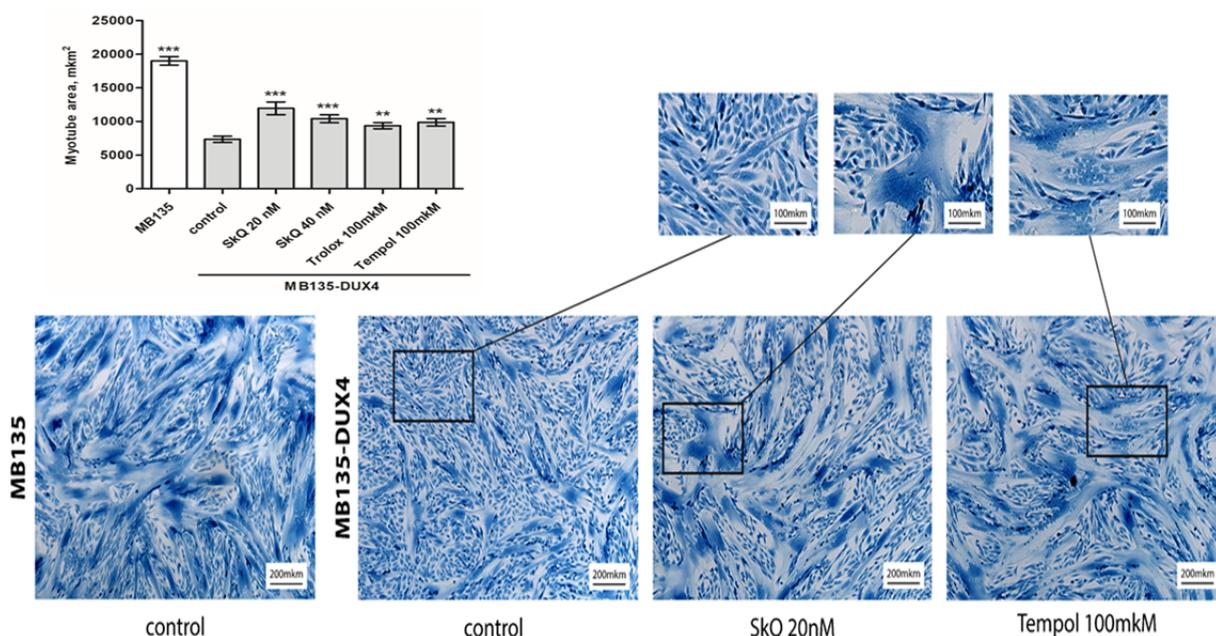


Рисунок 7.3 – Размер миотрубок и миобласты линии *MB135* или *MB135-DUX4*, предварительно обработанные/необработанные антиоксидантами в течение 4 дней до индукции их к дифференцировке

В контрольных миобластах MB135 обработка антиоксидантом слегка ингибирует дифференцировку миобластов, что естественно для классических антиоксидантов. Митохондриальный антиоксидант SkQ1 не нарушает миогенез в контрольных клетках MB135 (рисунок 7.4).

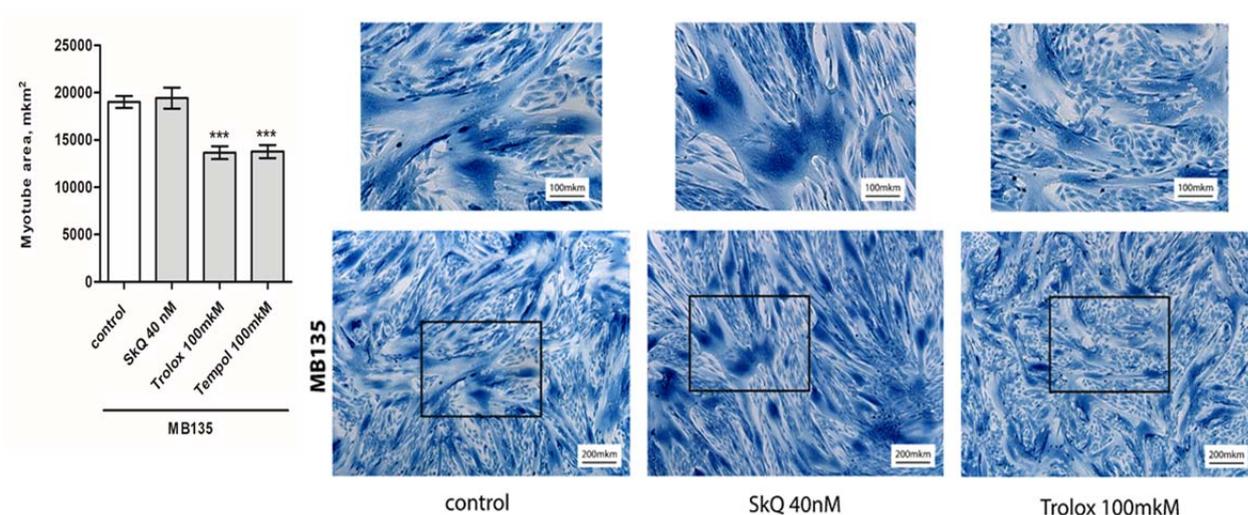


Рисунок 7.4 – Размер миотрубок и миобласты, сформировавшиеся в клетках MB135, необработанных (control) и предварительно обработанных антиоксидантами в течение 4 дней до индукции их к дифференцировке

Также мы показали, что антиоксиданты имеют восстанавливающий эффект на миогенез только, если обработка ими проводилась до момента дифференцировки миобластов. Если антиоксидант добавляли в культуру клеток только после индукции дифференцировки, без 4-дневной предварительной обработки миобластов, она не давала эффекта (рисунок 7.5).

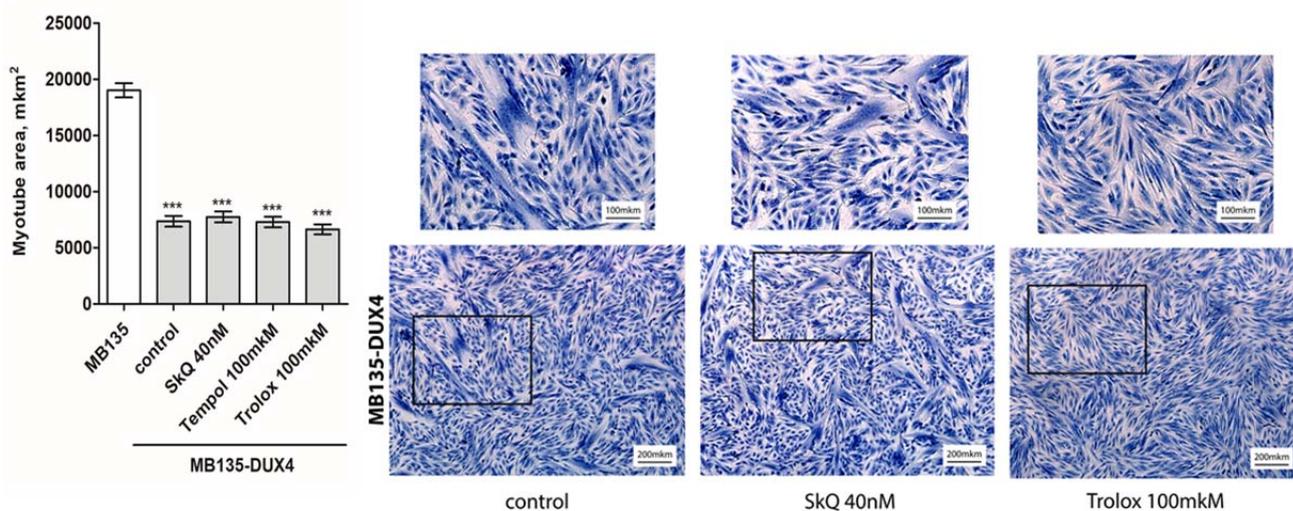


Рисунок 7.5 – Размер миотрубок и миобласты линии *MB135-DUX4*, необработанные/обработанные антиоксидантами после индукции их к дифференцировке

7.3.3 Обработка антиоксидантами изменяет экспрессию генов в клетках *MB135-DUX4*, делая их более похожим на контроль

Как фактор транскрипции, *DUX4* может изменять экспрессию генов, регулируя его прямые мишени. В то же время известно, что *DUX4* вызывает окислительный стресс, а сам окислительный стресс может изменять экспрессию генов. Чтобы идентифицировать подмножества генов, которые могут быть прямыми мишенями *DUX4*, а не мишенями окислительного стресса, мы реконструировали профили транскрипции в клетках *MB135* и *MB135-DUX4*, обработанных и не обработанных антиоксидантами в течение 4 дней.

Данные RNAseq показывают, что клеточные линии *MB135* и *MB135-DUX4* различаются по экспрессии 377 генов (рисунок 7.6).

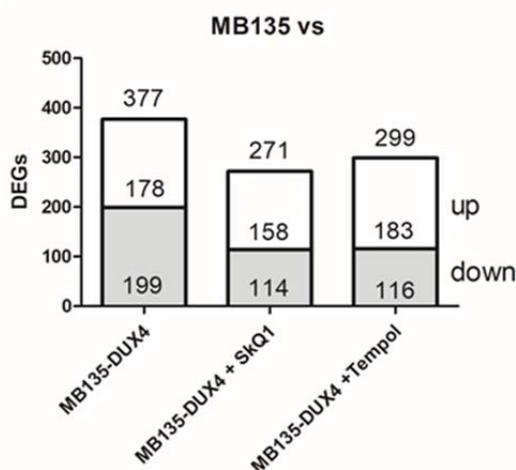


Рисунок 7.6 – Данные количества дифференциально экспрессирующихся генов (DEGs) в линии *MB135-DUX4* по сравнению с линией *MB135* до и после обработки антиоксидантами

В миобластах у пациентов с МДЛД ген *DUX4* экспрессируется на крайне низком уровне и не постоянно, но этого оказывается достаточно для того, чтобы существенно изменить их транскрипционный профиль. Сравнение транскрипционных профилей культур *MB135* и *MB135-DUX4* также выявило существенные значимые различия между ними (рисунок 7.6). Очевидно, что все эти изменения не могут быть результатом прямой транскрипционной активности *DUX4*, более вероятным кажется, что небольшое количество *DUX4* в отдельных клетках транскрипционным и/или не транскрипционным способом воздействует на какие-то пусковые механизмы, включающие сигнальные каскады и обеспечивающие таким образом его эффект. Одним из таких триггеров могут быть АФК, которые, как известно, являются мощными сигнальными молекулами, регулируемыми экспрессию значительного количества генов в норме и при патологиях. Сравнение транскрипционных профилей нормальных и экспрессирующих *DUX4* миобластов, обработанных и не обработанных антиоксидантами, позволило нам выявить гены, чувствительные к антиоксидантной обработке. Один этих генов, *PITX1*, привлёк наше внимание, поскольку показано, что *PITX1* вовлечен в патогенез МДЛД. Он специфически активируется в пораженных мышцах у пациентов с МДЛД, первичных миобластах больных и в миобластах, экспрессирующих рекомбинантный *DUX4*. Экспрессия рекомбинантного *PITX1* в мышцах мышей приводит к развитию мышечной атрофии и появлению воспалительного инфильтрата в мышцах у этих животных [5]

Данные транскриптомного анализа о редокс-регуляции *PITX1* были подтверждены методом обратной транскрипции ПЦР в реальном времени. Повышенная в клетках *MB135-DUX4* экспрессия *PITX1* подавлялась и классическими антиоксидантами (Тролокс, Темпол) и в меньшей степени митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1, что указывает на вовлечение как митохондриальных, так и цитоплазматических АФК в регуляцию экспрессии этого гена. Факт редокс-регуляции экспрессии *PITX1* подтверждался также тем, что добавление к здоровым миобластам H_2O_2 стимулировало экспрессию *PITX1*. Ранее сообщалось, что *PITX1* является прямой транскрипционной мишенью *DUX4* [6]. Было также сообщение, ставящее под сомнение такую возможность. Наши данные не проясняют этот аспект, но строго доказывают, что существует редокс-чувствительный механизм регуляции экспрессии *PITX1*, и что именно этот механизм в значительной степени обеспечивает повышение экспрессии *PITX1* в клетках с низкоуровневой экспрессией *DUX4*.

Мы показали, что человеческие миобласты с низкоуровневой экспрессией *DUX4* не могут формировать нормальные миотубулы из-за оксидативного стресса. Мы также показали, что добавление к нормальным миобластам *MB135* H_2O_2 , вызывающей

отложенную внутриклеточную генерацию АФК, главным образом митохондриями, приводит к нарушению миогенеза. Следует отметить, что миогенез в клетках с нарушенной экспрессией DUX4, восстанавливался как под действием общих антиоксидантов (Темпол и Тролокс), так и под действием митохондриально-направленного антиоксиданта (SkQ1), что указывало на участие мито-АФК в нарушениях миогенеза.

7.4 Заключение

Окислительный стресс характерен для мышц FSHD. Тем не менее, точная роль активных форм кислорода (АФК) в патогенезе FSHD остается неясной. Мы обрабатывали линию человеческих миобластов MB135, экспрессирующих DUX4 с повышенным содержанием АФК и формирующих атрофические миотрубки, различными антиоксидантами, изучали изменения в структуре экспрессии и формировании миотрубок. В отличие от классических антиоксидантов (Темпол, Тролокс), митохондриальный антиоксидант SkQ1 не подавлял образование миотрубок и благотворно влиял на миогенез в *MB135-DUX4*. Проанализировав профили транскрипции обработанных антиоксидантами клеток *MB135-DUX4*, мы обнаружили, что эта процедура снижает экспрессию гена *PITX1*.

7.5 Список использованных источников

1 Deenen J.C., Arnts H., van der Maarel S.M., Padberg G.W., Verschuuren J.J., Bakker E., Weinreich S.S., Verbeek A.L., van Engelen B.G. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy // *Neurology*. – 2014. – V. 83. – P. 1056 - 1059.

2 Mostacciolo M.L., Pastorello E., Vazza G., Miorin M., Angelini C., Tomelleri G., Galluzzi G., Trevisan C.P. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample // *Clin Genet*. – 2009. – V. 75. - P. 550 -5555.

3 Iarovaia O.V., Minina E.P., Sheval E.V., Onichtchouk D., Dokudovskaya S., Razin S.V., Vassetzky Y.S. Nucleolus: A Central Hub for Nuclear Functions // *Trends in Cell Biology*. 2019. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.04.003.

4 Veil M., Yampolsky L.Y., Gruening B., Onichtchouk D. Pou5f3, SoxB1, and Nanog remodel chromatin on high nucleosome affinity regions at zygotic genome activation // *Genome Research*. 2019. V. 29. Is. 3. P. 383-395. DOI: 10.1101/gr.240572.118.

5 Pandey S.N., Cabotage J., Shi R., Dixit M., Sutherland M., Liu J., Muger S., Harper S.Q., Nagaraju K. & Chen Y-W. Conditional over-expression of PITX1 causes skeletal muscle

dystrophy in mice // *Biol. Open.* - 2012. -V. 1. - P. 629 – 639.

6 Dixit M., Anseau E., Tassin A., Winokur S., Shi R., Qian H., Sauvage S., Mattéotti C., Van Acker A.M., Leo O., Figlewicz D., Barro M., Laoudj-Chenivresse D., Belayew A., Coppée F. & Chen Y.W. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – V. 104. – P. 18157 – 18162.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи этапа 2019 г темы НИР решены полностью.

Обнаружены новые возможности микроРНК – способность координировать экспрессию перекрывающихся транскриптов белок-кодирующих генов в развитии. Такой механизм мог сложиться в ходе эволюции для создания оптимальных условий совместного использования перекрывающимися генами общих регуляторных районов. Это открытие расширяет наше представление о малых некодирующих РНК, как о жизненно необходимых и эволюционно древних компонентах системы регуляции экспрессии генов.

Была изучена степень влияния различных ксенобиотиков на компетенцию рецептора АНР человека контролировать репродуктивную функцию через регуляцию экспрессии эволюционно-консервативных генов, вовлеченных в процессы биодegradации стресс-индуцибельных молекул. В результате исследований установили ранее неизвестную связь между системой активации целевых генов АНР и гистоновым шапероном CG5017, нарушение которой может вызывать снижение мужской фертильности. Выдвинута идея, что этот шаперон обеспечивает доступ человеческого АНР к особому набору его генов-мишеней во время сперматогенеза по эпигенетическому механизму.

В этом году новая концепция эпигенетического «структурного кода» активности хроматина, сформулированная по результатам работы в 2018 г., в основе которой лежит утверждение о существовании функционально-активных интермедиатов нуклеосом, дополнена новыми сведениями и деталями о «симметричной» модификации гистонов H2B на основе убиквитинилирования димеров H2A-H2B и продемонстрирована регуляторная роль топологического статуса ДНК на структуру и динамику модифицированных нуклеосом. Исследование регуляторной роли убиквитинилирования гистонов в процессах транскрипции и контроля динамики хроматина имеет большое значение для разработки методов диагностики и лечения ряда заболеваний.

Впервые был показан терапевтический эффект антиоксидантов на патогенез при мышечной дистрофии человека FSHD. Исследование было выполнено на разработанной уникальной модельной клеточной культуре, с помощью которой удалось найти предполагаемый ген (*PITX1*), активация которого в условиях оксидативного стресса могла стать одной из причин нарушения миогенеза при этом заболевании.

Был разработан новый эффективный протокол регенерации и методика агробактериальной трансформации растений кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz*), что

позволит в дальнейшем приступить к работам по редактированию генома этого растения для увеличения в нём доли натурального каучука, который является важным стратегическим сырьём, способным заменить каучук, добываемый из гевеи, произрастающей в Южной Америке.

Изучение биохимического состава и морфологических особенностей сортов другого сельскохозяйственного растения – ярового рапса (*Brassica napus L.*) – позволило выделить новые направления селекции этой культуры в медицинских целях.

В этом году была развернута работа по выращиванию и исследованию цветков и семян суперэлитного сорта календулы (*Calendula officinalis L.*) «Сахаровская оранжевая». Оказалось, что лекарственные цветки этого сорта в 2 раза превышают минимальные требования по главному показателю «Сумма флавоноидов в пересчете на рутин», что показывает перспективное направление для использования этого сорта в при производстве биологически активных веществ в фармакологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. **Akishina A.A., Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Slezinger M.S., Simonova O.B., Kuzin B.A.** NAP family CG5017 chaperone pleiotropically regulates human AHR target genes expression in *Drosophila testis* // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20. – P. 1-13. DOI: 10.3390/ijms20010118. (WoS, Scopus) – Q2.
2. Amosova A.V., Zoshchuk S.A., Volovik V.T., **Shirokova A.V.**, Horuzhiy N.E., Mozgova G.V., Yurkevich O.Yu., Artyukhova M.A., Lemesh V.A., Samatadze T.E., Muravenko O.V. Phenotypic, biochemical and genomic variability in generations of the rapeseed (*Brassica napus* L.) mutant lines obtained via chemical mutagenesis // *PLoS ONE*. - 2019. – V. 14. – Is. 8. – e0221699. DOI: 10.1371/journal.pone.0221699. (WoS, Scopus) – Q2.
3. Iarovaia O.V., Minina E.P., Sheval E.V., **Onichtchouk D.**, Dokudovskaya S., Razin S.V., **Vassetzky Y.S.** Nucleolus: a central hub for nuclear functions // *Trends in Cell Biology*. – 2019. – V. 29. Is. 8. – P. 647-659. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.04.003. (WoS, Scopus) – Q1.
4. **Krajewski W.A.** Ubiquitylation: how nucleosomes use histones to evict histones // *Trends in Cell Biology*. – 2019. – V. 29. Is. 9. – P. 689-694. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.06.002. (WoS, Scopus) – Q1.
5. **Krajewski W.A.**, Vassiliev O.L. Analysis of histone ubiquitylation by MSL1/MSL2 proteins *in vitro* // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – V. 666. – Is. 15. – P. 22-30. DOI: 10.1016/j.abb.2019.03.015. (WoS, Scopus) – Q2.
6. **Krajewski W.A.** "Direct" and "Indirect" effects of histone modifications: modulation of sterical bulk as a novel source of functionality // *Bioessays*. – 2019. – Art. 1900136. DOI: 10.1002/bies.201900136. (WoS, Scopus) – Q1.
7. **Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B.** Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. – 2019. – V. 13. – N.1. – P. 36-54. DOI: 10.1134/S1990750819010116. (WoS, Scopus) – Q4.
8. **Vorontsova J.E., Zavoloka E. L., Tcherezov R.O., Simonova O.B.** *Drosophila* as a model system used for searching the genes, signaling pathways, and mechanisms controlling cytoskeleton formation // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 50. No. 1. – P. 1-8. DOI: 10.1134/S1062360419010065). (WoS) – Q4. – **Воронцова Ю.Е., Заволока Е.Л., Черезов Р.О., Симонова О.Б.** Дрозофила, как модельная система для поиска генов, сигнальных путей и механизмов, контролирующей формирование цитоскелета // *Онтогенез*. 2019. Т. 50. №1 С. 3-11. DOI: 10.1134/S0475145019010063. (РИНЦ)

9. Vorontsova J.E., Zavoloka E. L., Tcherezov R.O., Simonova O.B. Three important discoveries in the field of the cytoskeleton's proteins functioning on the *Drosophila melanogaster* model // *Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 53. – N. 1. – P. 1-12. DOI: 10.1134/S0026893319010163. (WoS, Scopus) – Q4. – **Воронцова Ю.Е., Заволока Е.Л., Черезов Р.О., Симонова О.Б.** Три важнейших открытия из области функционирования белков цитоскелета, сделанные на модели *Drosophila melanogaster* // *Молекулярная биология*. 2019. Т. 53. №1 С. 3-15. DOI: 10.1134/S0026898419010166. (РИНЦ)

10. Veil M., Yampolsky L.Y., Gruening B., **Onichtchouk D.** Pou5f3, SoxB1, and Nanog remodel chromatin on high nucleosome affinity regions at zygotic genome activation // *Genome Research*. – 2019. – V. 29. Is. 3. – P. 383-395. DOI: 10.1101/gr.240572.118. (WoS, Scopus) – Q1.

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27» декабря 2019 г., протокол № 14