Цитология и генетика

УДК 57.085.23

Изучение функций консервативных белков септинов в культуре клеток S2 *Drosophila* *melanogaster*

Алексеева А. Л.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Септины – консервативные ГТФазы, обнаруженные во всех эукариотических организмах, за исключением растений. У дрозофилы обнаружены пять септиновых генов: pnut, Sep1, Sep2, Sep4 и Sep5. Известно, что белки Pnut, Sep1 и Sep2 образуют гетеромерные комплексы, формирующие филаменты. О функции и локализации белков Sep4 и Sep5 практически ничего не известно.

Мы изучаем роль септиновых генов в митозе на фоне поочередного «выключения» каждого из них при помощи РНК-интерференции в культивируемых клетках S2 D. melanogaster. Методом Вестерн-блот анализа показано существенное снижение количества белков Pnut, Sep2 и Sep1 при поочередном «выключении» генов pnut, Sep1, Sep2 и Sep4. Необходимо отметить, что при подавлении экспрессии гена Sep1 количество белка Sep2 снижается слабее. Обнаружено, что при «выключении» любого из генов pnut, Sep1 или Sep2 существенно снижается число транскриптов двух оставшихся генов. Эти результаты свидетельствуют о взаимном влиянии септиновых генов на уровень экспрессии каждого из них.

Предварительный цитологический анализ показал, что истощение белков Sep1 и Sep4 приводит к увеличению числа клеток, содержащих более двух центросом и расположенных на двух противоположных полюсах деления, на 8-10%. В случае «выключения» гена Sep1 число клеток в прометафазе уменьшается на 17% (с увеличением числа клеток в анафазе и телофазе), а для гена Sep2 – увеличивается на 14%.

В ходе дальнейших исследований мы планируем завершить цитологический анализ нарушений митоза, к которым приводит «выключение» каждого септинового гена дрозофилы, и детально исследовать механизм взаимозависимой регуляции их экспрессии.

Автор выражает благодарность канд. биол. наук Андреевой Е. Н. за совместное получение данных по Вестерн-блот анализу, а также. Яринич Л. А за предоставление данных по количественной ПЦР.

Научные руководители – канд. биол. наук Пиндюрин А. В.,   
канд. биол. наук Федорова С. А., канд. биол. наук Андреева Е. Н.

УДК 594.38 (592)

Влияние паразитирования трематоды *Plagiorchis* *mutationis* на иммунитет моллюска-хозяина *Lymnaea* *stagnalis*

Астапенко Д. А.

Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск

Брюхоногие моллюски участвуют в многочисленных трофических цепях и в том числе трансмиссии паразитических червей – трематод, для которых они служат промежуточными хозяевами.

У паразитов сформирован комплекс приспособлений и выработан ряд стратегий, способствующих успешному поиску, проникновению в организм хозяина и сводящих к минимуму воздействие его защитных систем.

Целью работы было оценить возможные изменения в иммунном статусе моллюска-хозяина *Lymnaea* *stagnalis* под влиянием партеногенетического поколения трематоды *Plagiorchis* *mutationis*.

Было зафиксировано общее белковое истощение лимфы у зараженных моллюсков. При электрофоретическом разделении белков в полиакриламидном геле было показано, исчезновение или истощение определённых типов белков у заражённых моллюсов. Кроме того, у заражённых моллюсков отсутствует агглютинирующая активность в лимфе, в отличие от незараженных, у которых активность составила lg7. При окрашивании микрофиламентов клеток с Phaloidine было обнаружено, что большая часть клеток заражённых моллюсков пребывала в стрессовом состоянии, о чём свидетельствует неравномерное распластывание и формирование агрегатов цитоскелета на периферии гемоцитов и стресс-фибрил в центре. При окрашивании клеток крови лектином WGA, способным связываться с гликопротеинами и гликолипидами клеточной поверхности, у заражённых моллюсков было зафиксировано незначительное уменьшение WGA-положительных клеток, что свидетельствует о частичной блокировке рецепторов, специфичных к N-ацетил D-глюкозамину.

Церкарии трематод *Plagiorchis mutationis* влияют на клеточный иммунитет моллюсков *Lymnaea* *stagnalis*, а именно подавляют жизнеспособность гемоцитов, способность гемоцитов к распластыванию и капсулообразованию. Поскольку агглютинины и лектин-подобные соединения выполняют роль рецепторов и опсонинов, угнетение данной функции выгодно паразиту.

Научный руководитель – канд. биол. наук Крюкова Н. А.

УДК 575.89

Анализ синапсиса и рекомбинации у Phodopus sungorus и Ph. campbelli и их гибридов

Бикчурина Т. И., Тишакова К. В.

Новосибирский государственный университет

Стерильность у межвидовых гибридов, как правило, сопровождается различными нарушениями гомологичного синапсиса и рекомбинации хромосом в процессе мейоза. Однако причины и механизмы изоляции на самых ранних стадиях видообразования остаются малоизученными. Исследования поведения хромосом в мейозе у гибридов близкородственных видов может помочь в изучении этой проблемы.

В данной работе мы анализировали синапсис и рекомбинацию у самцов и самок гибридов Ph. campbelli и Ph. sungorus обоих направлений, а также у родительских видов (время дивергенции примерно 0,8-1 млн лет назад). Оба вида имеют одинаковый набор хромосом (2n=28) и практически идентичный кариотип. Анализ проводили с помощью метода иммунолокализации ключевых белков мейоза: белка синаптонемного комплекса (СК) SYCP3, белка мисс-матч репарации, маркирующего сайты рекомбинации, MLH1, а также модифицированного гистона гамма H2AX, маркирующего районы нерепарированных двунитевых разрывов.

Ранее было показано, что для самцов гибридов Ph. campbelli x Ph. sungorus характерна высокая частота асинапсиса половых хромосом. В нашей работе мы обнаружили практически полное отсутствие спаривания у самцов и частичное – у самок, а также отсутствие явных нарушений в процессе синапсиса аутосом у гибридов. У родительских видов мы не наблюдали нарушений спаривания как аутосом, так и половых хромосом.

В результате проделанной работы мы обнаружили, что средняя частота рекомбинации у аутосом гибридных самцов по сравнению с самцами одного из родительских видов осталась практически неизменной (19,51±2,43 и 18,40±3,52 соответственно) при средней длине СК 139,10±45,41 и 120,28±17,17. В дальнейшем мы планируем значительно расширить выборку данных.

Научный руководитель – канд. биол. наук Торгашева А. А.

УДК 575.89

Филогенетические особенности пространственной организации X-хромосомы у близкородственных видов малярийных комаров *Anopheles* *labranchiae* и *Anopheles* *atroparvus*

Бондаренко С. М.

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Более одного миллиона людей в мире ежегодно гибнет от малярии. Глобальное потепление климата может способствовать распространению малярии в зоны с умеренным климатом. Основными возбудителями на территории Евразии и Северной Америки являются 6 из 25 видов комаров группы Maculipennis. Характеристика эпидемиологических особенностей этих видов не возможна без понимания филогенетических отношений между ними, которые на данный момент слабо изучены и противоречивы. Анализ пространственной организации хромосом трофоцитов и фолликулярного эпителия (ФЭ) может пролить свет на проблему филогенеза внутри данной группы комаров.

Цель исследования – выявить эволюционные особенности пространственной организации хромосомной территории (ХТ) X-хромосомы у двух близкородственных гомосеквентных видов (с идентичным паттерном дисков на политенных хромосомах), группы Maculipennis: Anopheles atroparvus и Anopheles labranchiae. Для визуализации ХТ использовали метод 3D-FISH полнохромосомных проб X-хромосомы с ядрами питающих клеток и фолликулярного эпителия яичников особей обоих видов. Меченные пробы получали посредством DOP-PCR. Матрицей для изготовления меченых проб являлась ДНК, полученная в ходе микродиссекции хромосом An. atroparvus. Оптические срезы ядер трофоцитов и ФЭ получали при помощи конфокального микроскопа LSM 780 («Carl Zeiss», Германия). Сегментация изображений и измерения проводились при помощи ПО Fiji (ImageJ) с комплексом плагинов «TANGO». Для статистического анализа использовали язык R.

В результате исследования получены данные о видоспецифичных особенностях размеров и формы ХТ X-хромосомы. В рассмотренных типах клеток у обоих видов ХТ занимает 13,9% объема и расположена на периферии ядра. Однако найдены межвидовые отличия компактизации, регулярности формы ХТ и степени вытянутости Х-хромосомы трофоцитов и клеток ФЭ. Таким образом, не смотря на то, что An. atroparvus и An. labranchiae – гомосеквентные виды, они имеют различную пространственную организацию X-хромосомы в трофоцитах и клетках ФЭ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-14-20011).

Научные руководители – канд. биол. наук. Артемов Г. Н.,   
д-р биол. наук, проф. Стегний В. Н.

УДК 575.89

Эволюция половых хромосом у саранчовых семейства Pamphagidae (Orthoptera, Acridoidea)

Булэу О. Г.

Новосибирский государственный университет

По современным представлениям половые хромосомы возникли из пары аутосом. Ключевым моментом этого превращения могло быть подавление рекомбинации в данной паре, возникшее, вследствие инверсий на небольшом участке и распространившееся впоследствии на всю хромосому. Это привело к тому, что прото-Y-хромосома начала накапливать мутации, гетерохроматинизироваться и деградировать. У насекомых, за исключением некоторых видов рода Drosophila, процессы формирования гоносом практически не исследованы, несмотря на огромное разнообразие систем определения пола и половых хромосом.

Наше исследование посвящено анализу эволюции половых хромосом саранчовых семейства Pamphagidae. В этой группе возникновение XY/XX гетерогаметного пола из исходного X0/XX связано с реципрокной транслокацией акроцентрических Х-хромосомы и аутосомы. При этом первоначальная Х-хромосома становится метацентрической, а непарная аутосома у самца – Y-хромосомой.

Молекулярно-цитогенетический анализ 15 видов саранчовых семейства из Казахстана и Турции показал, что все исследованные представители трибы Nocarodeini (подсемейство Pamphaginae) и большинство видов подсемейства Thrinchinae имеют neo-XY♂/neo-XX♀ механизм определение пола. Совокупность исследованных нами видов демонстрирует серию промежуточных этапов миниатюризации и гетерохроматинизации вновь образованной Y-хромосомы. Так в подсемействе Thrinchinae Y-хромосома крупная, гомологичная по длине аутосоме и в проксимальном районе содержит мелкие глыбки гетерохроматина, а в подсемействе Nocarodeini Y-хромосома меньше своего гомолога и сильно гетерохроматинизирована. Гетерологичный FISH с микродиссекционными пробами из половых хромосом показал, что гетерохроматинизация Y-хромосомы у представителей подсемейств Thrinchinae и Nocarodeini происходит за счёт разных фракций повторённых последовательностей ДНК, что свидетельствует о независимых путях эволюции Y-хромосомы в этих видовых группах.

Научный руководитель –д-р биол. наук, проф. Бугров А. Г.

УДК 575.83

Выявление особенностей эволюции и организации генов биосинтеза флавоноидов в разных таксонах покрытосеменных растений

Глаголева А. Ю.

Новосибирский государственный университет

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирк

Полногеномное секвенирование широкого спектра видов покрытосеменных растений позволило существенно дополнить имеющиеся данные цитологического анализа и сравнительного генетического картирования и получить таким образом ясную картину преобразования геномов в ходе эволюции. Вместе с тем, эволюции отдельных генов растений пока еще уделено недостаточно внимания. При этом имеющиеся данные указывают на то, что даже в универсальных метаболических путях, распространенных у всех видов растений, могут возникать специфические особенности регуляции, что несомненно не может не отражаться и на характере эволюции структурных генов. Можно предположить, что на гены, участвующие в разных этапах биосинтеза, действует разное давление отбора. Возможно также что, соотношение синонимичных и несинонимичных замен меняется для одних и тех же генов в разных группах таксонов, в зависимости от регуляторных особенностей. Для проверки подобных гипотез подходящей моделью являются гены биосинтеза флавоноидов, как наиболее хорошо изученного с генетической точки зрения метаболического пути растений.

Целью работы было выявление взаимосвязи между особенностями регуляции синтеза флавоноидных пигментов антоцианов в разных таксономических группах покрытосеменных растений и скоростью эволюции генов, участвующих в этом метаболическом пути.

В ходе данного исследования идентифицированы нуклеотидные последовательности генов биосинтеза антоцианов (Chs, Chi, F3h, F3'h, Dfr, Ans) арабидопсиса, винограда, петунии, львиного зева, кукурузы, риса, ячменя и пшеницы, из них Chs и F3'h пшеницы идентифицированы и аннотированы впервые. Анализ скорости эволюции генов биосинтеза антоцианов путем подсчета отношения несинонимичных и синонимичных замен (Ka/Ks) показал в большинстве случаев обратную взаимосвязь между скоростью эволюции генов и числом классов флавоноидных соединений, в биосинтезе которых участвует кодируемый фермент. Однако были выявлены исключения для некоторых генов в отдельных таксонах. Обсуждается возможная взаимосвязь между неожиданно высоким или низким давлением отбора на отдельные гены и особенностями регуляции биосинтеза антоцианов у соответствующих видов.

Научный руководитель − д-р биол. наук. Хлесткина Е. К.

УДК 575.174

Популяционно-генетический анализ экзомов представителей якутского этноса

Злобин А. С.

Новосибирский государственный университет

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Исследование генетического разнообразия в популяциях человека важно для решения как фундаментальных задач популяционной и эволюционной генетики, так и для медицинской генетики и судебной экспертизы. Исследование генетически изолированных популяций представляется интересным в рамках обнаружения генетических вариантов, распространенных с низкой частотой (<1%). Одной из таких популяций является якутская, представители которой в подавляющем своем большинстве проживают на территории Республики Саха (Якутия).

Целью данной работы являлось исследование генетического разнообразия якутской популяции путем анализа данных экзомного секвенирования 12 представителей якутского этноса. Нами был проведен популяционно-генетический сравнительный анализ якутской популяции и популяций, вошедших в проект “1000 Геномов”, а также идентифицированы аллели, характерные для якутской популяции. В результате было идентифицировано 746 396 полиморфизмов, из которых 56 949 не представлены в базе данных “dbSNP” и являются уникальными для якутской популяции. В результате проведения популяционно-генетического сравнительного анализа якутской популяции с популяциями вошедшими в проект “1000 Геномов” было установлено, что якутская популяция представляет собой обособленный кластер между европейцами и жителями Восточной Азии. Данный факт подтверждает то, что якутская популяция прошла период “бутылочного горлышка” в своем развитии.

Таким образом, было показано, что исследование генетически изолированной популяции (в данном случае якутской) может пополнить существующие базы данных информацией о новых полиморфизмах, которые могут быть ассоциированы с различными фенотипическими проявлениями. Также было установлено положение якутской популяции относительно других популяций человека.

Научный руководитель – д-р биол. наук Аульченко Ю. С.

УДК 575

Генетическая структура популяции и филогеография стерляди *Acipenser* *ruthenus* и сибирского осетра *Acipenser* *baerii* в бассейне реки Oбь

Побединцева М. А.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Новосибирский государственный университет

Стерлядь (*A. ruthenus*) и сибирский осетр (*A. baerii*) относятся к семейству осетровых (Acipensiridae) и имеют частично перекрывающиеся ареалы в реках Евразии. Для этих ценных в хозяйственном отношении рыб характерно позднее половое созревание, не ежегодное икрометание и жесткие рамки экологических требований для реализации жизненного цикла. Осетровые чрезвычайно уязвимы к воздействию разнообразных факторов, препятствующих их естественному воспроизводству. Кроме того, снижению численности способствует интенсивный промысел, в том числе незаконный.

Основная цель настоящей работы – описание генетической структуры популяций стерляди (*A. ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*) в Обь-Иртышском бассейне для выявления их популяционной организации и формирования действенной стратегии охраны и рациональной эксплуатации данных видов.

Для анализа был выбран контрольный район митохондриальной ДНК. В исследованных выборках стерляди (245 особей) и сибирского осетра (70 особей) по последовательности 628 пн контрольного района выявлен 61 гаплотип и 17 гаплотипов, соответственно. Проведение филогенетического анализа обнаруженных замен позволило выделить 11 основных гаплогрупп для стерляди и всего 2 гаплогруппы для сибирского осетра, представленных с разной частотой в разных районах бассейна.

Изучение гаплотипов стерляди показало значительные межрегиональные отличия по генетическому разнообразию и гаплотипическому составу, что свидетельствует об их сложной популяционной структуре. Обнаружено, что генетическое разнообразие сибирского осетра значительно меньше.

Необходимо дальнейшее сравнение изученных популяций стерляди и сибирского осетра Обь-Иртышского бассейна с популяциями Енисея, Волги, Дуная и Лены с целью изучения степени их изоляции.

Научный руководитель – канд. биол. наук Трифонов В. А.

УДК 575

Определение пути формирования гибридных клеток мыши фибробластного фенотипа: дифференцировка или репрограммирование

Побединцева М. А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Новосибирский государственный университет

Репрограммирование – процесс конверсии дифференцированных клеток в плюрипотентное состояние, механизмы которого до конца не изучены. Гибридные клетки – удобная экспериментальная модель для изучения этого процесса. В системе гибридизации при слиянии плюрипотентных и соматических клеток ранее наблюдали образование исключительно плюрипотентных клеток. Это привело к устойчивому мнению о том, что результат гибридизации не может быть другим.

Нами было показано, что при гибридизации эмбриональных стволовых клеток и дифференцированных фибробластов мыши возможно появление гибридных клеток двух типов, соответствующих родительским фенотипам. Образование гибридных клонов с дифференцированным (фибробластоподобным) фенотипом ранее не было описано. Мы выдвинули две гипотезы, объясняющие появление гибридных клонов с фенотипом дифференцированных клеток: 1) Эти клетки являются результатом дифференцировки плюрипотентного генома под действием генома соматического партнера по гибридизации. 2) Появление гибридных клеток с соматическим фенотипом является результатом скачкообразного репрограммирования плюрипотентного генома.

Для проверки этих гипотез нами были созданы генно-инженерные конструкции и получены соответствующие клеточные линии, позволяющие детектировать экспрессию маркера дифференцировки Brachyury в ходе процесса репрограммирования.

Научный руководитель – канд. биол. наук Фишман В. C.

УДК 575

Определение первичной структуры ортологов гена FZP у линий и форм пшеницы и ржи с измененным и стандартным строением колоса

Попова К. И.

Новосибирский государственный аграрный университет

Зерновые являются важнейшим источником питания для населения. Поэтому ведение селекции в направлении увеличения урожайности, является приоритетным. Во многом, продуктивность зависит от строения колоса. Стандартные колосья пшеницы и ржи имеют по одному колоску на уступе стрежня колоса, а ветвистоколосые формы имеют дополнительные колоски.

Целью настоящей работы является определение первичной структуры ортологов гена FZP пшеницы T. turgidum и ржи посевной S. cereale.

В работе использовали образцы пшеницы T. turgidum с ветвистым и простым колосом, самофертильные инбредные линии ржи посевной S. cereale со стандартным и монстрозным типом колоса. Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы ИЦиГ СО РАН. Суммарную ДНК выделяли из листьев или проростков растений по опубликованной ранее методике (Plaschke et al. 1995). Проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Полученные фрагменты ПЦР секвенировали по методу Сэнгера в ЦКП автоматического секвенирования ДНК ИЦиГ СО РАН.

Сравнение первичной структуры гена WFZP обнаружило, что все ветвистоколосые образцы T. turgidum отличаются от образцов с простым колосом наличием однонуклеотидной несинонимической замены, приводящей к замене аминокислот в функциональном домене AP2/ERF. Все ветвистоколосые образцы не зависимо от происхождения несут одинаковую мутацию, из чего можно сделать вывод о том, что они возникли в результате одной мутации и после этого были распространены на разных территориях.

Выравнивание полученных последовательной у изучаемых линий ржи показало, что кодирующая область гена у мутантной линии не несет перестроек, но в 5’- некодирующем районе гена была обнаружена инсерция мобильного элемента. Это может влиять на экспрессию гена, вплоть до полного замолкания (сайленсинга).

Таким образом, в результате проведенных исследований

1) была определена первичная структура гена WFZP-A у образцов с ветвистым и простым колосом тетраплоидного вида пшеницы T. turgidum

2) был впервые изолирован ген scFZP ржи, определена первичная структура ДНК этого гена у формы ржи с монстрозным колосом и линий со стандартным типом колоса.

Научный руководитель – канд. биол. наук Добровольская О. Б.

УДК 571.27

Создание химерного антигенного рецептора с антигенраспознающим модулем на основе 10-го домена фибронектина III человека

Сизенцова Я. Г.

Новосибирский государственный университет

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Проблема лечения онкологических заболеваний является одной из самых насущных в современной медицине. В последние годы активное развитие получила адоптивная иммунотерапия CAR Т-клетками (CAR – химерный антигенный рецептор). Этот подход основан на ex vivo трансгенезе аутологичных Т-клеток, с последующим их введением пациенту. CAR T-клетки находят и избирательно уничтожают раковые клетки, пролиферируя и оставаясь в организме длительное время. Раковые клетки опознаются CAR T-лимфоцитами при помощи внеклеточной части химерного антигенного рецептора, которая обычно представлена одноцепочечными вариабельными фрагментами иммуноглобулинов (scFv). Применение последних, однако, имеет ряд ограничений: scFv спонтанно димеризуются, вызывают нежелательный иммунный ответ и имеют большой размер. В качестве альтернативы scFv для антигенраспознающей части CAR мы предлагаем использовать 10-й домена фибронектина III человека (Fn3), который лишен указанных недостатков.

Цель данной работы – проверка гипотезы о возможности замены традиционных scFv в составе CAR на Fn3. Были наработаны вирусные частицы с кассетой, кодирующей химерный антигенный рецептор с Fn3 против VEGFR2. Полученным вирусом были трансдуцированы в клетки Т-лимфомы Jurkat, в результате чего была получена линия, стабильно экспрессирующая CAR с Fn3 против VEGFR2. Далее полученная линия была проинкубирована с клетками-мишенями, экспрессирующими VEGFR2 или с изогенными контрольными клетками. Уже через 4 часа после начала инкубации клетки-мишени вызвали активацию CAR Т-лимфоцитов, что говорит о функциональности использованного CAR с Fn3. Таким образом, нами впервые показана возможность использования Fn3 в качестве антиген-распознающих модулей в составе CAR.

Научный руководитель – канд. биол. наук Кулемзин С. В.

УДК 576.526

Разработка тканеинженерных конструкций, заселенных эндотелиальными и муральными клетками человека

Смирнова А. М.

Новосибирский государственный университет

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

В настоящее время в сосудистой хирургии существует проблема получения заменителей сосудов малого диаметра. Использование аутологичных сосудов часто затруднено в силу медицинских показаний, а синтетические материалы имеют ряд физических недостатков и как следствие – неудовлетворительные показатели в отдаленном периоде. Тканевая инженерия предоставляет решение этой проблемы – это возможность создания клеточно-наполненного сосудистого трансплантата. Требования к прочности, долговечности и физиологичности трансплантата могут быть решены за счет заполнения их эндотелиальными и гладкомышечными клетками, которые в естественном сосуде представляют собой тесно взаимодействующую систему. В задачи тканевой инженерии сосудов особенно малого диаметра входит не только подбор источников клеток, но и подходящих для заселения материалов. Для этого был разработан эффективный метод получения тканеинженерных конструкций на основе мембран из поликапролактона и хитозана, заселенных эндотелиальными и гладкомышечными клетками кардиальных эксплантов человека. Проведены исследования способности пролиферации, жизнеспособности эндотелиальных клеток в составе полученных конструкций, анализ поверхностных антигенов и компонентов цитоскелета, оценка способности синтезировать компоненты межклеточного матрикса и формировать капилляроподобные структуры. Полученные конструкции пригодны для заселения данными типом клеток и на их основе возможно создание сосудистых трансплантатов малого диаметра со свойствами, максимально приближенными к физиологическим.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00082.

Научный руководитель – канд. биол. наук Захарова И. С.

УДК 576.536

Эпигенетический статус Х-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека

Стригина Е. В.

Новосибирский государственный университет

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека 46,XX имеют разный эпигенетический статус Х-хромосом, который нестабилен и может изменяться в ходе культивирования. В нашей работе мы показали, что условия культивирования способны влиять на эпигенетический статус Х-хромосом в ПСК человека. В частности, показано, что от условий культивирования зависит обогащение неактивной Х-хромосомы триметилированным гистоном H3 по лизину K9 (H3K9me3). Установлено, что в ПСК человека, культивируемых на матригеле, X-хромосома, обогащенная H3K9me3, ассоциирована с гистонметилтрансферазой SETDB1 и белком KAP1, ответственным за ее привлечение на хроматин. Из ЭСК линии HuES9 получены маркированные зелёным флуоресцентным белком плюрипотентные клоны единичных клеток. Выявлено, что в экспрессирующем зеленый флуоресцентный белок клоне Х-хромосомы демонстрируют весь спектр эпигенетических состояний, характерный исходной культуре клеток, при этом доля клеток с Х-хромосомой, обогащенной H3K9me3, статистически значимо не отличается от таковой в исходной культуре. Таким образом, можно заключить, что гетерогенность клеток по эпигенетическому статусу Х-хромосом в культуре HuES9 связана с постоянно идущими в ней эпигенетическими процессами, затрагивающими одну из двух Х-хромосом.

Научный руководитель – канд. биол. наук Шевченко А. И.

УДК 575.162

Анализ мутации ff16, вызывающей полную стерильность гомозигот Drosophila Melanogaster

Хрущева А. С.

Новосибирский государственный университет

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Ранее в лаборатории Генетики клеточного цикла была получена мутация ff16, вызывающая полную стерильность у гомозиготных самцов и самок. Было предположено, что мутации ff16 соответствует рамке считывания CG10752 (69F2-69F2; 3L:12952686..12954647 [-]), кодирующей уникальный ген, не охарактеризованный ранее.

Нами был просеквенирован район, соответствующий рамке считывания CG10752, у мух дикого типа и гомозигот по мутации ff16. При сравнении полученных нуклеотидных последовательностей было выявлено 5 замен, находящихся во втором экзоне, среди которых только одна является несинонимичной и меняет полярность аминокислоты. Для того, чтобы доказать, что данная замена в гене CG10752 является мутацией ff16 и вызывает стерильность гомозигот, необходимо провести спасение фенотипа. Для этого полноразмерная копия гена CG10752 была встроена в вектор pUASP-attB, позволяющий ткане- и стадиеспецифически запускать эктопическую экспрессию данного гена. Затем эмбрионы мух линии yw (yw; P{y[+t7.7]=CaryP}attP40;M{vas-int.B}ZH-102D) были инъецированы полученной плазмидной ДНК и получены трансгенные линии мух, несущие встройку конструкции pUASP—attB-CG10752 в район 2L:5,108,448..5,108,448 2-ой хромосомы. Для эксперимента по спасению фенотипа в гонадах гомозигот по мутации ff16 будет индуцирована эктопическая экспрессия гена CG10752. Возвращение фертильности мутантным мухам после добавления полноразмерной копии гена CG10752 послужит доказательством того, что нуклеотидная замена в триплете, кодирующем 414 аминокислоту белка CG10752 является мутацией ff16.

Также для изучения функции гена CG10752 в делении соматических клеток была проведена РНК-интереференция в S2 культуре клеток дрозофилы. Эффективность эктопического подавления экспрессии была оценена при помощи количественного ОТ-ПЦР. Цитологический анализ показал, что эктопическое подавление экспрессии гена CG10752 не влияет на деление соматических клеток.

Научный руководитель – канд. биол. наук Фёдорова С. А.

УДК 576.535:616.851

Создание панели изогенных линий клеток, моделирующих болезнь Хантингтона *in vitro*

Шарипова Д. В., Маланханова Т. Б.

Новосибирский государственный университет

Создание клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний является актуальной задачей современной биомедицины в связи с ограниченной доступностью биологического материала для исследований.

Болезнь Хантингтона является наследственным заболеванием, вызванным увеличением числа копий триплета CAG в первом экзоне гена HTT, что приводит к синтезу мутантного белка хантингтина и гибели нейронов стриатума.

С помощью гомологичной рекомбинации и современной технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 возможно создание изогенных клеточных моделей наследственных заболеваний. Полученные таким образом линии клеток имеют одинаковый генетический фон и отличаются только определенной мутацией, изучаемой исследователем.

Целью данной работы было получение панели изогенных линий клеток, моделирующих болезнь Хантингтона *in* *vitro*.

Для внесения мутации были использованы плазмида pX458–HTT, кодирующая компоненты системы CRISPR/Cas9, и донорная плазмида, несущая 215 повторов CAG, фланкированных плечами гомологии к гену HTT. Плазмидные векторы были трансфицированы в эмбриональные фибробласты кожи человека, которые в дальнейшем были субклонированы. В результате было получено 32 субклона. С помощью ПЦР анализа было показано, что 2 из 32 субклонов содержат удлиненные тракты тринуклеотидных повторов в гене HTT. Таким образом, были получены две изогенные линии фибробластов, содержащие мутантные аллели гена HTT. В дальнейшем данные линии клеток будут репрограммированы к плюрипотентному состоянию.

Научный руководитель – канд. биол. наук Малахова А. А.