

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
ХРОМОСОМА 2023  
МАТЕРИАЛЫ**



**INTERNATIONAL CONFERENCE  
CHROMOSOME 2023  
ABSTRACTS**

**5 - 10 сентября 2023, Новосибирск  
September 5 - 10, 2023, Novosibirsk, Russia**

## Организаторы



ИМКБ СО РАН  
mcb.nsc.ru



СО РАН  
sbras.ru



НГУ  
nsu.ru

## Спонсоры

**Stormoff**®  
stormoff.ru

**ИНТЕРГЕН**  
Официальный дилер Olympus  
intergen.ru

*Высокое качество стало доступным*

**ОПТИКА**  
MICROSCOPES  
I T A L Y



### **Микроскопы серии В-500, ОПТИКА (Италия)**

Характеристики оптической системы, цифровой камеры и сенсорного дисплея позволяют наблюдать за образцами с точностью 4К, которая до недавнего времени была невообразимой.

**Stormoff**®

МО, г. Красногорск, б-р Строителей, 4/1  
+7 495 780 07 95, 495 956 05 57  
lab@stormoff.ru, www.stormoff.ru

**ИНТЕРГЕН**

Официальный дилер Olympus

**OLYMPUS**<sup>®</sup>



Every  
Diagnosis  
Counts

## HiBand

Хромосомный анализ - кариотипирование



Every  
Diagnosis  
Counts

## HiFISH

FISH Анализ



ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
ХРОМОСОМА 2023**

Материалы

5 – 10 сентября 2023 г.

Новосибирск

2023

УДК 57  
ББК 28  
Х 942

**Редакционная коллегия**

акад. РАН *И. Ф. Жимулев*, член-корр. РАН *А. С. Графодатский*,  
д-р биол. наук *И. Ю. Баклушинская*, д-р биол. наук *Ю. Ф. Богданов*,  
д-р биол. наук *А. В. Вершинин*, канд. биол. наук *Н. Е. Воробьева*,  
д-р биол. наук *Е. Р. Гагинская*, акад. РАН *П. Г. Георгиев*,  
акад. РАН *С. Г. Георгиева*, д-р биол. наук *А. И. Калмыкова*,  
д-р биол. наук *Т. Д. Колесникова*, акад. РАН *А. В. Кочетов*,  
д-р биол. наук *В. А. Лухтанов*, д-р биол. наук *С. А. Романенко*,  
д-р биол. наук *Н. Б. Рубцов*, д-р биол. наук *В. А. Трифонов*

**Х 942** Хромосома – 2023 : материалы Междунар. конф. 5–10 сентября 2023 г. / Ин-т молекулярной и клеточной биологии СО РАН ; Новосиб. гос. ун-т. — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2023. — 226 с.

ISBN 978-5-4437-1514-8

Сборник материалов содержит тезисы докладов и постеров, представленных на Международной конференции «Хромосома – 2023». Основные результаты, представленные на конференции, посвящены организации и эволюции хромосом и геномов, гетерохроматину, генетической организации интерфазных хромосом, структуре ядра и другим темам. Материалы представляют интерес для научных сотрудников, работающих в области генетики и молекулярной биологии.

**УДК 57  
ББК 28**

ISBN 978-5-4437-1514-8  
DOI 10.25205/978-5-4437-1514-8

© Новосибирский государственный  
университет, 2023  
© ИМКБ СО РАН, 2023

INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY SB RAS  
SIBERIAN BRANCH OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
NOVOSIBIRSK STATE UNIVERSITY

**INTERNATIONAL CONFERENCE**  
**CHROMOSOME 2023**

Abstracts

September 5 – 10, 2023

Novosibirsk

2023

УДК 57  
ББК 28  
X 942

#### **Editorial board**

RAS Acad. *I. F. Zhimulev*, RAS Corr. Member *A. S. Grafodatsky*,  
Dr. Biol. Sci. *I. Yu. Baklushinskaya*, Dr. Biol. Sci. *Yu. F. Bogdanov*,  
Dr. Biol. Sci. *A. V. Vershinin*, Dr. Biol. Sci. *N. E. Vorobyova*,  
Dr. Biol. Sci. *E. R. Gaginskaya*, RAS Acad. *P. G. Georgiev*,  
RAS Acad. *S. G. Georgieva*, Dr. Biol. Sci. *A. I. Kalmykova*,  
Dr. Biol. Sci. *T. D. Kolesnikova*, RAS Acad. *A. V. Kochetov*,  
Dr. Biol. Sci. *V. A. Lukhtanov*, Dr. Biol. Sci. *S. A. Romanenko*,  
Dr. Biol. Sci. *N. B. Rubtsov*, Dr. Biol. Sci. *V. A. Trifonov*

**X 942** Chromosome – 2023 : Proceedings of the International Conference. September 5–10, 2023 / Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS ; Novosibirsk State University — Novosibirsk : IPC NSU, 2023. — 226 p.

ISBN 978-5-4437-1514-8

The Abstract book contains materials presented at the International Conference "Chromosome – 2023". Main areas discussed at the conference are devoted to the organization and evolution of chromosomes and genomes, heterochromatin, genetic organization of interphase chromosomes, structure of nucleus and other topics.

These materials may be interested for the scientists working in the field of genetics and molecular biology.

**УДК 57  
ББК 28**

ISBN 978-5-4437-1514-8  
DOI 10.25205/978-5-4437-1514-8

© Novosibirsk State University, 2023  
© IMCB SB RAS, 2023



Материалы расположены в алфавитном порядке по фамилии первого автора  
Материалы представлены в авторском виде с минимальным форматированием

Abstracts are arranged in alphabetical order by the surname of the first author  
Abstracts are provided in the form submitted by authors with minimal formatting

## **Evidences for specific proteins associated with hot spots of physiological double-stranded genomic DNA breaks at forum domain termini**

**Alembekov I.R.**

Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow

Forum domains are large, approx. 200 kbp, parts of genome delimited by hot spots of double-stranded breaks (DSBs). The hot spots are characterized by constant localization, great abundance, compactness, variable frequency of breaks, and dispersal throughout genome. Such genome organization was observed in human, fruit fly, plants, and, seemingly, has widespread appearance. At first instance, forum domain chromatin organization tier was observed during pulsed field electrophoresis as genomic DNA nonrandom fragmentation to high molecular weight fraction. Sequencing of DNA library comprising genomic DSBs showed great abundance of the hot spots throughout HEK293T and Schneider 2 genomes. Implemented real time PCR-based approach for DSBs frequency quantitation has showed response of selected hot spots to physiological stress (such as, heat or osmotic shock).

In current study was accomplished detection of at least 7 yet unidentified proteins by the DNA library hybridization with fragmented HEK293T chromatin. Since the library comprises large number of individual hot spots distributed genome-wide (tens of thousands), any abundantly detected protein should be considered as nonrandom and specific for the loci. For sake of hybridization specificity confirmation control experiments with equivalent amount of unrelated DNA was conducted, with no protein yield. Identification of the proteins and genome-wide elucidation of protein complexes at the hot spots is under way.

Research was funded by RSF grant № 22-24-01118.

## **Multiplex analysis of the effect of transcription termination on gene activity in eukaryotes**

**Andreyeva E.N., Letiagina A.E., Boldyreva L.V., Ogienko A.A., Galimova Y.A., Yarinich L.A., Pindyurin A.V., Omelina E.S.**

Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk

The termination of RNA polymerase II transcription is a complex process that substantially contributes to gene regulation in eukaryotes. Large-scale studies of mutagenesis have mainly focused on DNA sequences critical for the transcription initiation and required for the functioning of such genomic regulatory elements as enhancers and promoters. To identify DNA sequences important for the transcription termination in eukaryotes, we used a massively parallel reporter assay (MPRA) to systematically analyze the influence of short (8 bp) sequence variants (mutations) located downstream of the polyadenylation signal (PAS) on the steady-state mRNA level of the upstream gene, employing an eGFP reporter and human HEK293T cells as a model system. In total, we evaluated 227,755 mutations located at different overlapping positions within +17..+56 bp downstream of the PAS for their ability to regulate the reporter gene expression. We found that the positions +17..+44 bp downstream of the PAS are more essential for gene upregulation than those located more distal to the PAS, and that the mutation sequences ensuring high levels of eGFP mRNA expression are extremely T-rich. Next, we validated the positive effect of some mutations identified in the MPRA screening on the eGFP and luciferase protein expression. The most promising mutations significantly increased the expression of the reporter proteins in HEK293T and CHO cells could be used for further improving the efficiency of production of therapeutic products, e.g., recombinant antibodies.

This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1086, contract No. RF----193021X0015, 15.III.21.0015).

## **Моделирование влияния изотопов радона как генераторов альфа-излучения на развитие дрозифилы**

**Biyasheva Z., Dyachkov V., Zaripova Yu., Onalbek D., Ko A.**

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

zarembiya@gmail.com

Радон - это природный благородный газ, все изотопы которого радиоактивны. Два наиболее распространенных изотопа  $Rn^{222}$  (называемый радоном) и  $Rn^{220}$  (называемый тороном) являются частью цепей естественного распада  $U^{238}$  и  $Th^{232}$  и возникают непосредственно в результате распада изотопов  $Ra^{226}$  и  $Ra^{224}$  соответственно.  $Ra^{226}$  практически повсеместно присутствует в горных породах и почвах, а также в любом строительном материале, изготовленном из них. Радон попадает в наружную среду главным образом путем выдоха из верхнего слоя почвы, а также может попадать в атмосферу из грунтовых вод, природного газа, океанов и в результате деятельности человека. Алматинская область ввиду наличия большого количества тектонических разломов, усиливающих эманацію радона, может быть отнесена к радоноопасным территориям.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила  $Rn^{222}$  (радон) как одну из ведущих причин рака легких после курения. Он ответственен за 3-14% всех смертей, вызванных раком легких [1]. Европейская комиссия включила радон в правовую базу в рамках Директивы об основных стандартах безопасности (ОСБ). Согласно этой директиве, государства - члены ЕС обязаны разработать план действий по борьбе с радоном для устранения долгосрочных рисков, связанных с радоном в жилых помещениях, зданиях с общественным доступом и на рабочих местах.

Казахстан в настоящее время занимает второе место в мире по запасам урана, составляя 12% мировых запасов и является ведущим производителем урана во всем мире. Регионы Казахстана имеют естественный фоновый уровень радиации около 3,1 мЗв/год, а население получает около 1,1 мЗв/год при медицинских осмотрах и от бытовой техники. Следовательно, общее радиационное воздействие на одного человека в Казахстане в среднем составляет около 4 мЗв/год, что в полтора раза превышает среднемировой показатель. Поэтому изучение генотоксичности излучения заряженных частиц из окружающей среды крайне важно для населения Казахстана, а исследования данных проблем на модельных объектах имеет важное значение для решения проблем радиационной безопасности в жилищах [2].

Существует приблизительно 40 известных изотопов радона, два из них, а именно радон-222 и радон-220, имеют практическое значение. Радиоактивный распад изотопов радона приводит к испусканию альфа-частиц, что приводит к образованию других элементов, известных как продукты дочернего распада радона (ДПР). Хотя и радон-222, и радон-220 подвергаются радиоактивному распаду, вклад в общую дозу облучения от радона-222 примерно в 20 раз больше, чем от радона-220.

Для оценки генотоксичности альфа-излучения, в качестве материалов исследования, были выбраны изотопы, при распаде которых, испускаются альфа-частицы, это: Pu238, Pu239, Ra226 и Триплет (Pu238 + Pu239 + U233). Для оценки мутагенной активности  $\alpha$ -излучения у дрозофилы использовался метод сцепленных X-хромосом на *Drosophila melanogaster* линии Winsley. Анализировали наличие морфозов, которые вызывают морфологические изменения в морфологии взрослой мухи, напоминающие нормальные структуры, но лишённые какой-либо функциональной роли. Отсутствие определенной нормальной структуры или части (частей), является вариантом морфоза. Часто морфоз выглядит как неудачная «сборка» из обычных правильных элементов [3].

Анализ F<sub>1</sub> выявил условные мутации или морфозы, частота возникновения которых прямо пропорциональна поглощенной дозе радиации. Наблюдались индуцированные альфа-излучением, морфозы: нарушение формы крыльев, отсутствие крыла или ноги, деформация брюшного отдела, пузыри на крыльях. Все это подтверждает генотоксичность альфа-частиц, их тератогенные свойства и влияние на онтогены или гены, регулирующие клеточные деления, определение плоскости деления и цитоскелеты органов.

Литература:

- 1 WHO (World Health Organization). Handbook on Indoor Radon; WHO: Geneva, Switzerland, 2009
- 2 Kazymbet P.K. Radioecological state of the residential areas in the uranium mining regions of Kazakhstan. Scientific Proceedings of Institute for Radiobiology and Radiation Protection. - 2014. - Vol. 1. - P. 19-55.
- 3 Chadov B., Fedorova N. (2023) Ontogens and their role in the structure of cells. Achievements in the field of bioscience and biotechnology, 14, 49-73. doi: 10.4236/abb.2023.142004

## **Patterns of genetic differentiation imply distinct evolutionary histories of the sibling mosquito species *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* in Eurasia**

**Brusentsov I.I.<sup>1,2</sup>, Gordeev M.I.<sup>3</sup>, Yurchenko A.A.<sup>1,2</sup>, Karagodin D.A.<sup>1</sup>, Moskaev A.V.<sup>3</sup>, Hodge J.M.<sup>1</sup>, Burlak V.A.<sup>4</sup>, Artemov G.N.<sup>4</sup>, Sibataev A.K.<sup>5,6</sup>, Becker N.<sup>7,8</sup>, Sharakhov I.V.<sup>2,4</sup>, Baricheva E.M.<sup>1</sup>, Sharakhova M.V.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratory of Cell Differentiation Mechanisms, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University and Fralin Life Sciences Institute, Blacksburg, VA, USA

<sup>3</sup> State University of Education, Mytishi, Moscow Region, Russia

<sup>4</sup> Laboratory of Ecology, Genetics, and Environmental Protection, Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>5</sup> Department of General Biology and Genomics, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

<sup>6</sup> Department of Agricultural Biology, Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>7</sup> Center for Organismal Studies, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

<sup>8</sup> German Mosquito Control Association, Speyer, Germany

Detailed knowledge of phylogeography is important for control of mosquito species involved in transmission of human infectious diseases. *Anopheles messeae* is a geographically widespread and genetically diverse dominant vector of malaria in Eurasia. A closely related sibling species, *An. daciae*, was distinguished from *An. messeae* based on a few nucleotide differences in its ribosomal DNA. However, the mechanisms of speciation and their evolutionary histories are poorly understood. Here, we performed a large-scale population genetics analysis of 3694 mosquitos from Eurasia to understand the species divergence, diversity, and population structure using the internal transcribed spacer 2 of ribosomal DNA for species identification and frequencies of 11 polymorphic chromosomal inversions as genetic markers. The study revealed striking differences in the geographical distribution of the sibling species. The largest genetic differences between *An. messeae* and *An. daciae* were detected in the X sex chromosome suggesting that this chromosome plays a role in speciation. The frequencies of autosomal inversions differed significantly between the species, strongly supporting a restricted gene flow between them. The clinal variability of some inversion frequencies was revealed in both species implicating their possible involvement in climate adaptations. Statistical analysis of inversion polymorphism clearly distinguished two clusters associated with the two species and demonstrated much higher genetic diversity within *An. messeae*. Overall, the frequencies of hybrids in all locations were extremely low with the exception of several southeastern

populations, where putative hybrids were abundant. Thus, the pattern of genetic differentiation implies dramatic differences in geographic distribution, population structure, and evolutionary histories of the sibling species *An. messeae* and *An. daciae*.

Mosquito collections were supported by the Russian Science Foundation grant 19-14-00130 to M.V.S. ITS2 sequencing was funded by the Russian Science Foundation grant 21-14-00182 to I.V.S. Inversion polymorphism analysis was funded by the Russian Science Foundation grant 22-24-00183 to M.I.G. Statistical analysis was funded by the FWNR-2022-0015 project of the Institute of Cytology and Genetics FWNR-2022-0015 project of the Institute of Cytology and Genetics.

## **Molecular cytogenetic markers for identification of polymorphic inversion karyotypes in diploid cells of *Anopheles messeae* (Culicidae) malaria mosquito**

**Calderón Rueda X.S., Artemov G.N. \***

Laboratory of ecology, genetics and environment protection, National Research Tomsk State University, 634050 Tomsk, Russia

\*Corresponding author: g-artemov@mail.ru

Malaria mosquitoes are the only vector born of a dangerous human disease – malaria. The representative of this taxonomic group, *Anopheles messeae* fall. Is widely distributed in Eurasia, and its range covers a variety of climatic zones. The amazing adaptive plasticity of this species at the genetic level is provided by inversion polymorphism. How chromosomal inversion – a 180-degree flip of a chromosome segment – can determine its fitness is still a mystery.

The chromosome complement of *Anopheles messeae* is  $2n=6$ : chromosome 2 is metacentric, chromosome 3 is sub metacentric and the X chromosome is metacentric. There are five widespread inversions in the natural populations: two in the left arm of the X (*X1*, *X2*), one in the right arm of the chromosome 2 (*2R1*) and by one for each the right (*3R1*) and left (*3L1*) arms. In *Anopheles*, the only methods for inversion detection realized through the analysis of the order of disks of polytene chromosomes on the squashed preparations, generally, of the salivary glands cells of mosquito larvae and nurse cells of females. These tissues are convenient for analysis; however, they develop only at certain stages of mosquito ontogeny. At the same time, it is difficult or often impossible to study the inversion karyotype in adult males, pupae, larvae of 1-2 instars, as well as at the egg stage. In this regard, the development of new approaches for determining the inversion variants of chromosomes is a priority.

Therefore, in this study, we developed cytogenetic markers for identification of polymorphic inversion karyotype in diploid cells based on fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of micro dissected DNA-probes, which overlap one of the breakpoint regions of the each *X1*, *X2*, *2R1*, *3R1* and *3L1* inversions in *An. messeae*.

FISH is a technique routinely used for a variety of tasks, such as development of high-quality genome physical maps for improving the genome assemblies or for comparative cytogenetics. Here we micro dissected four DNA-probes from 3L region 39C-37A, 2R region 3C-5B, 3R region

22A-23C, and XL region 25A-26C. Each of them detects one inversion except DNA-probe from X for both *X1* and *X2* inversions. Inversion variant is defined as the pattern of fluorescent



signals on the homologous chromosomes. Standard variant of the chromosome is characterized by a solid signal, but the inverted - by two signals, since inversion transpose the part of the labeled region and change it on the non-labeled region. The utility of that inversion detection system was confirmed with analysis of larvae imaginal discs metaphase chromosomes.

Therefore we made it possible to analyze inversions on the cells without polytene chromosomes, which significantly expands the possibilities of analyzing inversion polymorphism in *An. messeae*. When applying this approach, it is possible to determine the inversion karyotype in cells at the metaphase stage, cells with low-quality polytene chromosomes, and some diploid cells at the interphase stage. The developed technique can be applied to population cytogenetics, chromosome taxonomy, and systematics for other insect groups.

We would like to acknowledge that this research was conducted as part of Ximena S. Calderon's doctoral studies at National Research Tomsk State University, and it was supported by the Russian Science Foundation grant no. 21-14-00182.

## Identification of *trans*-acting factors that controls B chromosome drive

Chen J., Houben A.

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben, 06466 Seeland, OT Gatersleben, Germany

The B chromosome (B) is a dispensable element in the genome of many plants, animals, and fungi. To counteract the elimination of supernumerary chromosomes, many Bs evolved a drive mechanism to transmit themselves at a higher frequency compared to the standard A chromosome. To decipher the chromosome drive process, we have selected the B of rye (*Secale cereale*) as a model. During the first pollen grain mitosis (PMI), rye B sister chromatids continue to stay cohesive rather than separate, and then both chromatids preferentially enter the generative nucleus. The drive process of the rye B is controlled by the *trans*-acting B-located non-disjunction control region. Bs lacking the non-disjunction control region (NCR) undergo normal disjunction at the first pollen mitosis and therefore do not drive. The rye B shows an efficient drive also when it is introduced into wheat. To narrow down the non-disjunction control region, we compared the repeat composition of the long arm of different B variants by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and identified a subtelomeric region (~8% of the B) that controls the drive of the rye B. To identify the genetic element(s) that control the non-disjunction of the rye B, we assembled the rye B sequences using PacBio, Nanopore sequencing, and optical mapping. In addition, 33 RNA-seq data from anthers undergoing PMI of rye and wheat were generated, including drive-positive and drive-negative data. Differential expression analysis revealed only 16 candidates up-regulate in all the comparisons between drive-positive and drive-negative data. PCR-based mapping revealed that 10 of the 16 candidates locate within the non-disjunction control region. Their tissue- and stage-specific expression patterns were tested in RNA-seq data from 7 different tissues of wheat with Bs. The drive-associated candidate gene *NCR28* shows a PMI-specific and strong expression. *NCR28* is encoded by 13 transcriptionally active copies, and FISH confirmed the NCR-specific localization and multiple copy number of *NCR28*. Transient expression of a *NCR28::GFP* reporter in *Nicotiana benthamiana* revealed a microtubule-like pattern in dividing cells. Our results shed light on the mechanism of chromosome drive in plants.

We thank the China Scholarship Council (CSC202006850005), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) project HO1779/30-1, European Regional Development Fund (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000827) and IPK Gatersleben for funding and T. Endo (Japan) for providing the valuable seeds.

## **Transcription activation by ecdysone in salivary glands of *Drosophila melanogaster* larvae**

**Evdokimova A.A.<sup>1</sup>, Kolesnikova T.D.<sup>2</sup>, Vorobyeva N.E.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

Email to: vorobyeva@genebiology.ru

Ecdysone is the main steroid hormone in *Drosophila*. Increase in its titer controls the many key stages in the *Drosophila* development. The role of ecdysone in the metamorphosis is best characterized. Two peaks of an ecdysone titer lead to the transformation of a *Drosophila* larva into a prepupa, and then into a pupa, activating various programs in its tissues. In the cells of the larval salivary glands, ecdysone activates the following developmental programs: first, the transcription of *sgs* genes, whose are necessary for attaching the larva to the substrate, and then, the apoptosis and autophagy genes, whose activation results in the degradation of the salivary glands during the prepupal ecdysone pulse. In addition, an increase in the ecdysone titer at different developmental stages of the salivary glands leads to the activation of the ecdysone cascade genes encoding transcriptional regulators. So far, the mechanism of transcription activation by ecdysone in various tissues remains unclear.

To study the effect of ecdysone on the molecular machinery of the cell, we decided to use the natural component of the ecdysone cascade, the E23 membrane transporter (capable of transporting ecdysone from cells to the extracellular space) (Hock et al. 2000; Itoh, Tanimura, and Matsumoto 2011). We studied changes in the pattern of gene transcription in the salivary glands of the late L3 stage larvae (preparing for metamorphosis) caused by the expression of the E23 transporter (which leads to the decrease the ecdysone concentration in the tissue). We found that the expression of E23 in the salivary glands results in a significant decrease in the transcriptional level of all the main ecdysone cascade genes (*Eip78C*, *Eip74ef*, *Eip75b*, *Eip71CD*, *hr4*), as well as genes of the *sgs* group (*sgs3*, *sgs4*, *sgs5*, *sgs7*, *sgs8*). The observed decrease in the transcription level of previously characterized ecdysone targets reflects the effectiveness of our experimental approach. To study the mechanism of transcription activation by ecdysone, we investigated the molecular state of promoters and enhancers of the ecdysone targets. To our surprise, for most of the genes whose transcription decreased upon the E23 expression, we did not observe significant changes in the state of the promoters - the level of total RNA polymerase II and even its phosphorylated Pol II CTD Ser2P isoform, which usually marks the state complex capable of effective elongation, are not decreased.

To our surprise, for most of the genes whose transcription was reduced by E23 expression, we did not observe significant changes in the state of promoters - the level of total RNA polymerase II and even its phosphorylated Pol II CTD Ser2P isoform, which usually marks the state of the complex capable of effective elongation, did not decrease. On the contrary, on enhancers, we observed significant changes both in the chromatin state (we detected its condensation, as well as a decrease in the level of the H3K27Ac enhancer marker) and in the set of proteins associated with enhancers (we observed a decrease in the level of RNA polymerase II, as well as the PAF1 component that promotes transcription elongation). Together, our results suggest that the main target of ecdysone action in larval salivary gland cells is the activity of enhancers rather than the state of the preinitiation complex on the promoters.

The work was supported by Russian science foundation – grant № 23-14-00184 (to Vorobyeva N.E.).

## Germline restricted chromosome behavior in the zebra finch oocytes

Galkina S., Takki O., Jukova Ju., Volodkina V., Matveeva K., Kulak M.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

In 1998, in a detailed study of chromosome sets in germline cells of the zebra finch *Taeniopygia guttata* (Estrildidae, Passeriformes) an additional chromosome was discovered. While somatic cells have the diploid chromosome number  $2n=80$ , the growing oocytes and spermatocytes contain the germline-restricted chromosome (GRC). It is eliminated from the somatic cells and differentiating spermatocytes, but always presents in oocytes, thus transmitting via female meiosis. The function of GRC is unknown, it may contain sequences important for germ cell differentiation and mature oocyte functioning. Currently, GRC of various passerine birds are being intensively studied in genomics and transcriptomic projects, however, we know little about its organization and behavior as a cytogenetic structure. The GRC's centromere region, how it is organized? Are there any unique features distinguishing it from other chromosomes, and which can provide non-mendelian inheritance of the GRC? GRC's homologues, are they fully equal? We are trying to resolve these issues by exploring the chromosome in its lampbrush phase, isolated directly from the germinal vesicle. We described in detail the lampbrush GRC morphology and constructed a cytological map of its chromomere pattern. In the zebra finch, GRC is the largest chromosome, comprising about 120 chromomeres, and thus contains more than 150 Mbp. We traced the change in the morphology of the GRC to the postlampbrush stage. We performed FISH on GRC at the lampbrush stage to localize several satellite repeats, including telomere and centromere, as well *dph6* fragment, known to be highly amplified in the zebra finch GRC. A characteristic feature of the GRC-bivalent at the lampbrush stage is heterochromatic loopless DAPI-positive regions. These regions do not contain phosphorylated form of RNA polymerase II, but at certain stages of oogenesis they can be associated with coilin-positive bodies of unknown function. We speculate that the large heterochromatic blocks may play a role in a preferential segregation of GRC, acting as neocentromere, forcing GRC to move faster to the poles during meiotic divisions.

The work was supported by Russian science foundation – grant № 22-24-00538.

## Studying gene transcription regulation after activation of humoral immune response in *D. melanogaster* S2 cell culture

Ghassah M.<sup>1</sup>, Polunina Y.A.<sup>1</sup>, Stepanov N.S.<sup>1,2</sup>, Pravednikova A.E.<sup>1</sup>, Lebedeva L.A.<sup>1</sup>, Kachaev Z.M.<sup>1</sup>, Shidlovskii Y.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Gene Expression Regulation in Development, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of Biology and General Genetics, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Humoral innate immunity has been highly conserved among eukaryotes. This observation has shed light to the importance of studying molecular mechanisms of immune signaling pathways in *Drosophila melanogaster*, as it is a powerful model organism. The S2 cell line is a fairly convenient model system for studying immune response. Toll and IMD are principle signaling pathways of the humoral immune system in *D. melanogaster*. The IMD signaling pathway is activated by gram-negative bacteria, while the Toll pathway is activated by gram-positive bacteria and fungi. Toll and IMD activation lead to the downstream production of Antimicrobial peptides (AMPs). We activated the Toll pathway by treating S2 cells with the gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* and the spores of the fungi *Metarhizium anisopliae*, and used the gram-negative bacteria *Escherichia coli* to activate the IMD pathway. We assessed the activation of Toll and IMD pathways by the corresponding expression levels of AMP genes (*Drosomycin*, *Drosocin*, *Cecropin* and *Metchnikowin*). We found sufficiently high levels of AMP genes expression after S2 cells treatment with *E. coli* and *M. luteus*. Despite the fact that *Dro* and *CecA1* are mainly activated after activation of the IMD pathway, we found a high level of expression of these genes after activating Toll pathway using *M. luteus*. The expression levels of *Drs* were significantly lower than other genes. The spores of *M. anisopliae* did not lead to any activation. Moreover, we analyzed the recruitment of the transcription factor Relish, which activate the transcription of AMP genes in IMD pathway, to the promoters of AMP genes. We were able to detect Relish recruitment to the promoter regions of AMPs genes, not only after IMD pathway activation, but also after Toll pathway activation. We can suggest that there is a cross-link between IMD and Toll pathway, as our results show that the transcription of all the studied genes is Relish-dependent. Finally, our data show different effects on the transcription of AMP genes after treating S2 cells with 20-hydroxyecdysone (20HE), as the presence of 20HE did not always lead to the activation of AMP genes transcription. At the same time, for the first time, we were able to detect relatively high levels of AMPs gene expression after S2 cells treatment with 20HE and *M. anisopliae* spores, and the recruitment of Relish to genes promoters with this treatment. Overall, our findings not only help in better understanding of the humoral immune response in *D. melanogaster*, but also provide insights for therapeutic targets aimed at improving immunity.

Project is funded by the Russian Scientific Foundation grant (23-14-00348)

# **Inversion polymorphism of natural populations of malaria mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* subgroup in Western Siberia associated with parasitic nematode infection**

**Haidara M.K., Burlak V.A., Artemov G.N.**

Laboratory of Ecology, Genetics and Environmental Protection, Tomsk State University, Tomsk  
E-mail: mohamedkaderh@gmail.com

Chromosomal paracentric inversions are commonly observed in natural mosquito populations and are believed to play a role in shaping the distribution of coadapted alleles within gene blocks that enhance an individual's fitness in specific local environmental conditions. In the context of malarial mosquitoes, these inversions have been associated with a range of factors including environmental influences, insecticide resistance, feeding behaviour, and vector competence. These connections suggest that these inversions could also influence the susceptibility to parasitic infections, including pathogens responsible for vector-borne diseases in both humans and animals. Specifically, the *Anopheles messeae* and *Anopheles daciae* species, recognized vectors for *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*, are of interest in this study. The main objective is to investigate the impact of parasitic infections (*D. repens* and *D. immitis*) on the polymorphism of chromosomal inversions in natural populations of malaria mosquitoes within Western Siberia.

The study material encompassed ovaries of *Anopheles* mosquitoes collected from diverse natural populations spanning the Tomsk and Tyumen regions, as well as the Khanty-Mansi Autonomous Okrug (KMAO), over the years 2021 and 2022. To prepare polytene chromosome specimens for analysis, the standard lacto-aceto-orcein staining method as outlined by Kabanova et al. in 1972 was employed. In the identification of mosquito species *An. messeae* and *An. daciae*, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, as detailed by Artemov et al. in 2021, was utilized. Additionally, PCR was employed for the identification of the *D. repens* and *D. immitis* parasites, following the protocol by Rishniw et al. in 2006.

Notably, the frequencies of inversion genotypes exhibited variation across the nine distinct natural populations of these species, excluding genotypes with inversions located on the 3L arm. Notably, genotypes X00 (01) were exclusive to *An. daciae*, while genotypes X22 (12) were confined to *An. messeae*. A geographic trend in the frequency of the 2R1 inversion was observed, decreasing from southern to northern regions in *An. messeae*.

Investigation of inversion genotype frequencies was conducted in populations both infected and uninfected with dirofilariae, particularly in habitats predominantly occupied by *An. daciae*, including Kolarovo village in the Tomsk region, Maslov and B. Akiyara villages in the Tyumen region, and the subsequent seasonal dynamics in Kolarovo. An association between infection and the inversion genotype 3R00 and karyotypes X00(01)-2R00-3R00-3L00 was discerned in

Kolarovo village, with validation from B. Akiyar and S. Maslov samples. Moreover, the X01-2R00-3R00-3L00 karyotype displayed a link with mosquito infection in Kolarovo village during July, coinciding with an augmented probability of dirofilariiae transmission from July to September.

Further examination of inversion genotypes was carried out in the sympatric zone of *An. daciae* and *An. messeae* in agglomeration of Kolpashevo, Tomsk region, with species representation at 31% and 69%, respectively. Predominance of the inversion genotypes X01,3R00 was noted among infected *An. daciae* individuals. In *An. messeae* heterozygotes, individuals with the 3R01 inversion genotype were prominent, along with those bearing karyotypes XL11-2R11-3R01-3L01 and XL12-2R00-3R00-3L00. Across all populations, an association between infection and genotypes 3R00 and 3L00 was established.

While 81 karyotypes were theoretically possible for *An. messeae*, although 81 karyotypes were theoretically possible, only 30 were detected, encompassing 15 in infected and 18 in uninfected mosquitoes. Among these, 12 karyotypes were shared between infected and uninfected individuals, while 3 were exclusive to infected mosquitoes. In the study, it was found that out of the theoretical number of 54 possible karyotypes for *An. daciae*, only 24 different karyotypes were observed, with 7 karyotypes observed in the general population and just one in infected individuals. This suggests a comparatively higher karyotypic diversity in *An. daciae* as opposed to *An. messeae*. Notably, an elevated specific inversion load among infected individuals from different species could potentially contribute to host species divergence. Individuals heterozygous for inversions in both species, exemplified by genotype X12 in *An. messeae* and individuals with X01 in *An. daciae*, displayed potential transmissivity, characterized by susceptibility to infection with L2 and L3 stage larvae.

In a comparative evaluation of geographically neighboring *An. messeae* populations, one infected (Priobyie village, KMAO) and the other uninfected (Peregrebnoye village, KhMAO), no statistically significant differences in inversion genotypes were identified. However, a correlation was detected between infection and the XL11(22)-2R00-3R00-3L00 karyotypes.

This study introduces novel evidence linking inversion polymorphism in malaria mosquitoes to their vulnerability to *D. repens* and *D. immitis* infections. Additionally, the observed karyotypes might influence the mosquito's capacity to support parasite larval development and enhance their transmission to definitive hosts like dogs or humans.

The Tomsk State University Development Program (Priority-2030) provided financial support for this study.



## The X-chromosome evolution in Cervidae (Artiodactyla, Mammalia)

Ivanova E.S.<sup>1,2</sup>, Proskuryakova A.A.<sup>1</sup>, Larkin D.M.<sup>3</sup>, Ferguson-Smith M.A.<sup>4</sup>, Yang F.<sup>5</sup>, Uphyrkina O.V.<sup>6</sup>, Perelman P.L.<sup>1</sup>, Graphodatsky A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Lavrentiev ave 8/2, Novosibirsk 630090, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Pirogova str. 1, 630090, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> The Royal Veterinary College, Royal College Street, University of London, NW1 0TU, UK

<sup>4</sup> Cambridge Resource Center for Comparative Genomics, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK

<sup>5</sup> Shandong University of Technology, School of Life Sciences and Medicine, Zibo, China

<sup>6</sup> Federal Research Center for Biodiversity of the Terrestrial Biota of East Asia, Vladivostok, Russia

The family Cervidae is one of the most diverse families in the infraorder Pecora due to a striking variability in the diploid chromosome numbers, ranging from 6 to 70. The family also stands out for a high evolution rate of the X-chromosome. Despite the conservatism of X-chromosomes in mammals, deer X chromosomes had undergone inversions, autosomal translocations, changes in centromere positions, and heterochromatin expansion during evolution. For a long time, the X chromosomes of most members of the family remained unstudied, making it impossible to compile a complete picture of all the rearrangements that occurred in Cervidae during evolution. The aim of the work was to expand the data on the X chromosome in different deer species and analyze all available data.

The deer family includes two subfamilies: Cervinae and Capreolinae. We built a detailed X-chromosome map of representatives of both subfamilies: reindeer (*Rangifer tarandus*, Capreolinae), gray brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Capreolinae), Chinese water deer (*Hydropotes inermis*, Capreolinae), black muntjac (*Muntiacus crinifrons*, Cervinae), tufted deer (*Elaphodus cephalophus*, Cervinae), sika deer (*Cervus nippon*, Cervinae) and red deer (*Cervus elaphus*, Cervinae) with 27 cattle BACs (Bacterial artificial chromosomes). The obtained data on the morphology of the X-chromosomes were compiled with the data from previous studies and chromosome level assembled species.

As a result, an identical inversion in the block which was previously considered conservative was found in all the Cervinae representatives. The same inversion was shown in several representatives of Capreolinae (water deer, gray brocket deer), which may indicate that the Cervidae ancestral X-chromosome also had this evolution breakpoint. The presence of this inversion in the paraphyletic group was shown, which implies that it occurred in Capreolinae

independently at least twice. The centromere reposition was also shown in Capreolinae subfamily, according to obtained data this event happened at least four times independently, whereas in Cervinae subfamily the centromere reposition occurred only once in the Cervinae ancestral X-chromosome. In addition, it was shown that the X-chromosome morphology in Capreolinae is more diverse than in Cervinae, which indicates an increased rate of evolution, although it was previously believed that the rate of evolution in the Cervinae subfamily is much higher than in Capreolinae.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ проект №19-14-00034-П и бюджетного проекта FWGZ-2021-0015 (122011800125-7).

## **The nature and spatiotemporal allocation of mosaic chromosomal abnormalities in first trimester miscarriages**

**Lebedev I.N., Drozdov G.V., Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Tolmacheva E.N., Fonova E.A., Demeneva V.V., Kashevarova A.A.**

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 634050, Tomsk, Russia

Chromosomal mosaicism is a hallmark of human early embryogenesis affecting developmental potential of blastocysts, its implantation and delivery rates. Recent data highlight possibility of normal development and live birth after transfer of mosaic blastocysts in *in vitro* fertilization (IVF) with preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) cycles. It is suggested that different mechanisms of karyotype self-correction are involved but origin and tissue-specific allocation of mosaic abnormalities are poorly investigated. Moreover, less attention is paid to spontaneous abortions where abnormal distribution of mosaic cell lines may cause detrimental effect on embryo development. Here, using segmental copy number variations (CNV) and runs of homozygosity (ROH) as cytogenetic markers we provide evidence for the origin and abnormal tissue-specific compartmentalization of mosaic cell lines in human spontaneous abortions.

Twenty quads (mother, father, and two tissues of embryonic and extraembryonic origin from first-trimester spontaneous abortion) were investigated by SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K microarrays (Agilent Technologies, USA) with 13 kb median aCGH probes spacing. Spontaneous abortions with normal karyotype were selected for the study to exclude the influence of chromosomal aneuploidies and gross structural chromosomal rearrangements on embryo development. Normal karyotype of miscarriages was determined by conventional G-banding karyotyping after long-term cell culture. Maternal cell contamination and false paternity were excluded by STR-analysis using the “CORDIS Expert 26” kit (Gordiz, Russia). Chorionic villous cytotrophoblast (CV) and extraembryonic mesoderm (EM) were studied. As far as CV and EM are derivatives of trophoctoderm and inner cell mass lineages, comparative analysis of both tissues and parental DNA samples allows to investigate the origin of mosaic CNVs or ROH by postzygotic *de novo* appearance or correction of the inherited variants.

Altogether 116 CNVs were detected in CV and EM samples from spontaneous abortions. Fifty four (46.6%) variants were present in both tissues, while 29 (25%) were confined by CV and 33 (28.4%) by EM. Most tissue-specific segmental aneuploidies in CV (90%) and EM (79%) arose *de novo*, while others were inherited from parents. It is important that 5 maternally inherited microduplications in clinically significant regions 1p21.1, 2p21, 3p22.3, 7q36.3, and Xq28 were confined by EM, whereas two at 4p16.3 and 19q13.43 by CV. One can suggest that confined

placental mosaicism for inherited maternal microduplications arisen by trisomy rescue mechanism with loss of additional maternal chromosome homologue in CV or EM after its divergence around the time of blastocyst implantation. This hypothesis is confirmed by comparative SNP-haplotype analysis of DNA samples from both CV and EM tissues as well as parental samples in the subchromosomal regions of microduplications and adjusted loci.

The same mechanism was suggested for tissue-specific ROH distribution. In our study 45 ROH were found in spontaneous abortions. The length of ROH varied from 1.7 to 11.9 Mb. Seventeen ROH were presented in both tissues, and 12 partially overlapped between CV and EM. The origin of these ROH can be suggested from the presence of identical heterozygous haplotypes in maternal and paternal genomes. Importantly, ROH in maternal and paternal genomes did not overlapped with ROH in miscarriages, which is theoretically compliance with the classical mode of inheritance.

At the same time, we unexpectedly observed that 36% of ROH (16 from 45) were tissue-specific. Eight ROH in regions 1q42.11, 3q13.31-q13.32, 5q14.3, 5q22.2, 6p22.1, 8p23.3-p23.1, 9p24.3, 10q21.2 were confined by CV. Another 8 regions (4q28.2-q28.3, 5p13.3-p13.2, 8q11.21-q11.23, 8q23.3, 8q24.11-q24.12, 18q12.3, 18q12.1-12.2, Xq22.3-q24) were affected by ROH in EM. In total, tissue-specific pattern of ROH distribution was observed in 12 miscarriages (60%).

The origin of mosaic tissue-specific ROH, like segmental CNVs can be suggested from a trisomy rescue mechanism. It is possible that development of embryos with mosaic ROH started from trisomic zygote. We hypothesize that early post-zygotic trisomy rescue due to chromosomal non-disjunction could have occurred before divergence of embryonic (EM) and extraembryonic (CV) lineages. As a result, in one cell lineage an extra chromosome with a different haplotype was lost leading to karyotype self-correction and ROH appearance. In another cell line an additional chromosome with the same haplotype was lost keeping heterozygosity within the region.

The presented data point out that comparative cytogenomic and haplotype analysis of different tissues and parental DNA samples is useful approach to investigate the modes of post-zygotic chromosome segregation in early embryo development. From the genetic counseling point of view, the normal karyotype in spontaneous abortion does not mean that embryo development in some cases started from the zygote with normal karyotype. Frequent chromosome segregation errors and karyotype self-correction events during preimplantation development should be taken into account to explain the genetic causes of miscarriage with normal karyotype.

The study was supported by the Russian Science Foundation, project № 21-65-00017, <https://rscf.ru/project/21-65-00017>

## Chromosomal inversions in the arboviral vector *Aedes aegypti* are associated with epidemiologically important traits

Liang J.<sup>1,2</sup>, Rose N.<sup>3</sup>, Brusentsov I.I.<sup>1,4</sup>, Lukyanchikova V.<sup>1,4</sup>, Karagodin D.<sup>4</sup>, Tu Z.<sup>2,5</sup>, Sharakhov I.V.<sup>1,2,6</sup>, McBride C.<sup>3</sup>, Sharakhova M.V.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Entomology, Virginia Polytechnic and State University;

<sup>2</sup> Fralin Life Science Institute, Virginia Polytechnic and State University, Blacksburg, USA;

<sup>3</sup> Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, USA;

<sup>4</sup> Laboratory of Cell Differentiation Mechanisms, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia;

<sup>5</sup> Department of Biochemistry, Virginia Polytechnic and State University, Blacksburg, USA

<sup>6</sup> Department of Genetics and Cell Biology, Tomsk State University, Tomsk, Russia;

Chromosomal inversions play a fundamental role in evolution and have been shown to be associated with the epidemiologically important traits in malaria mosquitoes. However, they have never been characterized in the major vector of arboviruses *Aedes aegypti* because of the poor structure of its polytene chromosomes.

In this study, we applied a Hi-C proximity ligation approach to identify chromosomal inversions in 23 strains of *Ae. aegypti* from world-wide distribution, two old laboratory colonies, and the closely related species *Ae. mascarensis*. Presence of five chromosomal inversions was directly validated by fluorescence *in situ* hybridization.

The study identified 23 multi-megabase inversions and created a new nomenclature for large chromosomal inversions in *Ae. aegypti*. All chromosomal inversions including the one specific for *Ae. mascarensis* were polymorphic. The sizes of inversion in recently colonized strains varied from 5 to 55 Mbp with a mean inversion size of 22 Mbp. Strikingly, three overlapping inversions were found in 1q arm in 3 strains from West Africa. Inversions were unevenly distributed along chromosomal arms with the highest numbers determined in 1q and 3p arms which are homologous to the inversion-rich 2R chromosomal arm in *An. gambiae*.

The inversions were highly associated with the geographical origin of the strains and were more abundant in the African than in the non-African strains, 15 versus 3 inversions, respectively. In Africa, the highest number of inversions was observed in Western areas of the continent. The hierarchical cluster analysis based on 2 highly polymorphic inversions 1pA and 3qG subdivided all mosquito populations into four large clusters: 1) Eastern Kenya and non-African locations; 2) Coastal West Africa; 3) West-Africa; and 4) Central Africa. Three inversions in 1p and 3p arms were associated with genomic locations of chemoreceptors involved in host seeking behavior of

mosquitoes. One large chromosomal inversion in 2p arm overlapped with locations of quantitative trait loci to dengue and filarial worm infections.

Thus, our study determined existence of a large pool of structural variations in the *Ae. aegypti* genome potentially involved in mosquito adaptation to humans and interactions with pathogens.

This study was supported by NIH/NIAD grant R21AI146528 to M.V.S, and by the Tomsk State University Development Program (Priority-2030) to I.V.S. and Institute of Cytology and Genetics FWNR-2022-0015 project of the Institute of Cytology and Genetics

## Dynamics of the 3D genome architecture in a malaria mosquito

Lukyanchikova V.A.<sup>1</sup>, Brusentsov I.I.<sup>2</sup>, Sharakhov I.V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA;

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics SBIRAS, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Tomsk State University, Tomsk, Russia.

The 3D structure of chromatin observed in malaria mosquitoes has several characteristics of chromatin organization that have been previously reported in *Drosophila*. However, the *Anopheles* mosquito also reveals novel concepts of 3D genome organization, such as the existence of heterochromatic B-compartments, which are spatially separated from euchromatic B-compartments, as well as evolutionarily conserved and developmentally stable giant multimegabase-long chromatin loops (Lukyanchikova et al 2022). Here, we investigated aspects of the 3D genome architecture that are dynamic throughout mosquito individual development. We performed Hi-C on embryonic, larval, and adult stages of the mosquito development as well body parts of adult females and males including heads, antennae, proboscises and maxillary palps, thoraxes, and gonads of *Anopheles coluzzii*. Comparison of Hi-C maps obtained from adult and embryonic tissues confirmed that several autosomal and X-chromosomal giant loops are present across developmental stages of the mosquito. However, we also identified long-range chromatin interactions, particularly on the 3R arm, that occur at specific stages or in certain body parts during mosquito development. Some giant loops are soma-specific as they are absent in ovaries or testes but present in thoraxes and heads of adult mosquitoes. Moreover, heads have stronger contacts as well as additional giant loop that are absent in thoraxes suggesting their possible function in the nervous system or sensory perception. To explore this further, we compared Hi-C maps of antennae and heads without antennae. Antennae have receptors that are responsible for mosquito olfaction and play an important role in host-seeking, foraging, oviposition, and mating behaviors (Konopka et al 2021). We found that antennae and heads without antennae share only most but not all long-range looping interactions in the 3R chromosomal arm. Mosquito heads have additional giant loops that are absent in antennae. GO enrichment analysis of genes located at loop anchors identified odorant/gustatory receptor genes and genes with functions in the nervous system and immunity. The dynamic nature of these looping interactions in different cell types and during individual development suggests their functional significance for mosquito biology.

## References:

Lukyanchikova V, Nuriddinov M, Belokopytova P, Taskina A, Liang J, Reijnders MJMF, Ruzzante L, Feron R, Waterhouse RM, Wu Y, Mao C, Tu Z, Sharakhov IV, Fishman V. *Anopheles* mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects. Nat Commun. 2022 Apr 12;13(1):1960. doi: 10.1038/s41467-022-29599-5.

Konopka JK, Task D, Afify A, Raji J, Deibel K, Maguire S, Lawrence R, Potter CJ. Olfaction in *Anopheles* mosquitoes. Chem Senses. 2021 Jan 1;46:bjab021. doi: 10.1093/chemse/bjab021.

The study was carried out at the expense of grants NIH R21AI159382, Russian Science Foundation 21-14-00182, Tomsk State University Development Programme Priority-2030.



## **Human embryo selection based on mitochondrial DNA quality and quantity**

**Mazunin I.**

Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology,  
Moscow, Russia

Elevated mtDNA content in trophoctoderm biopsy samples at the blastocyst stage has been proposed as a potential biomarker of embryonic implantation failure. However, the robustness of this association and the underlying mechanisms have been debated, as previous studies have been based on small sample sizes and complicated by technical differences. Here, we aimed to address these issues by analyzing the mitochondrial component of human infertility using 35,135 low-coverage, whole genome human embryo sequences derived from trophoctoderm biopsies. To ensure robustness of our analytical pipeline, we employed two complementary approaches: we compared euploid and aneuploid embryos as population cohorts as well as sibling embryos from the same family and IVF cycle. Our findings show that embryos not recommended for transfer (NRFT) due to chromosomal abnormalities possess significantly higher amounts of mtDNA compared to euploid embryos recommended for transfer (RFT). Strikingly, we also uncovered an excess of ultra-rare and potentially deleterious mtDNA variants in NRFT embryos compared to RFT embryos. The large sample size and family-based design allowed us to conclude with confidence that increased mtDNA content is an important risk factor for aneuploidy, and that increased mtDNA content is associated with aneuploidy regardless of maternal age. Furthermore, our findings greatly expand current understanding of purifying selection against deleterious mtDNA variants, in that a striking enrichment of ultra-rare mtDNA mutations in aneuploid embryos may serve as a novel mechanism to prevent deleterious mtDNA variants from entering the human population. The latter conclusion is supported by comparisons of these human aneuploid embryones mtDNA variants to human population polymorphisms based on 195,983 completely sequenced mitochondrial genomes from around the globe.

The work was supported by the Russian Science Foundation (No. 21-75-10081).

## The mechanisms of haemoglobin gene switching in *Danio rerio*

Molodova M.<sup>1,2</sup>, Epik Y.<sup>1,2</sup>, Ulianov S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

Haemoglobin gene switching, or sequential expression of genes encoding stage-specific forms of haemoglobin, is a common phenomenon in all vertebrates.

In important model organism *Danio rerio* (zebrafish), genes encoding  $\alpha$ - and  $\beta$ -haemoglobin chains are arrayed within common clusters. The major haemoglobin gene locus resides within a genomic region syntenic in vertebrates. The locus is segregated into two distinct subloci, interspaced by a CTCF-dependent insulator. One of them harbours “embryo-larval” haemoglobin genes, while the other contains “adult” genes, controlled by a conserved upstream enhancer  $\alpha$ -MRE. The switching from embryo-larval to adult haemoglobin gene expression occurs on the ~24 day of development. The stage-specific regulation of the embryo-larval sublocus remains largely unexplored.

To address this challenge, we analyzed DNA methylation and GATA-1 binding, as well as the accumulation of active and repressive histone modifications in larval and adult erythrocytes in *Danio rerio*.

First, we have shown that DNA methylation, H3K27me3 repressive mark, and H3panAc active mark exhibit different patterns within the embryo-larval and adult subloci in both larval and adult erythrocytes. In larval erythroid cells, the promoters of embryo-larval  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin genes are methylated, in line with their inactive state, while no differential DNA methylation is observed in adult erythrocytes. On the other hand, for both subloci, inactive state is associated with broad H3K27me3 domains, suggesting Polycomb-mediated repression. Thus, in contrast to the adult sublocus, the embryonic-larval sublocus is not repressed by simultaneous accumulation of H3K27me3 and DNA methylation, implying alternative mechanisms of the stage-specific repression. Of note, H3panAc profiles are strikingly different within two subloci. In larvae, H3panAc mark covers the bodies of the adult haemoglobin genes pointwise, whereas within the adult sublocus in adult erythrocytes, it forms several broad domains covering both gene bodies and intergenic regions.

Second, using ChIP-seq, we revealed stage-specific binding of GATA-1 – erythroid master regulator, reported to control haemoglobin gene switching in amniotes, acting as both an activator and repressor of different target genes. Importantly, we have mapped a larvae-specific GATA-1 binding site downstream of the embryonic-larval subdomain. Functional analysis using

luciferase reporter vector constructs demonstrated opposite activity of GATA-1-binding element concerning the promoters of two different larval globin genes: a strong silencer activity targeting the *βe1* promoter and a weak enhancer activity targeting the *αe1* promoter. Using the site-directed mutagenesis of two GATA-1- and one Ikaros-binding sites, we confirmed that the silencer activity is GATA-1 dependent. We propose that this regulatory element could facilitate the expression of embryonic-larval genes in two different ways. In particular, it could function as both an enhancer of a larval  $\alpha$ -globin gene and a silencer of the inter-sublocus non-coding transcript, which is possibly transcribed from *βe1* promoter in reverse orientation and is assumed to be essential for the adult sublocus activation.

Analyzing the locus spatial organization using C-TALE method, we demonstrated that in the nuclei of adult erythrocytes, the active adult haemoglobin genes, inter-sublocus region and a part of the flanking *NPRL3* gene form a globular structure. Adult haemoglobin genes and  $\alpha$ -MRE enhancer establish multiple contacts within the globula.

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant number № 21-64-00001).

## Chromatin folding changes revealed in schizophrenia patients

**Morozov K. <sup>1</sup>, Pletenev I. <sup>1</sup>, Bazarevich M. <sup>1</sup>, Ermakova E. <sup>2</sup>, Kononkova A. <sup>1</sup>, Vaulin N. <sup>1</sup>, Zagirova D. <sup>1</sup>, Cherkasov A. <sup>1</sup>, Efimova O. <sup>1</sup>, Golimbet V. <sup>3</sup>, Tiukacheva E. <sup>4</sup>, Komkov D. <sup>4</sup>, Kondratyev N. <sup>3</sup>, Morozova A. <sup>3</sup>, Kostyuk G. <sup>3</sup>, Razin S. <sup>4</sup>, Khaitovich Ph. <sup>1</sup>, Ulianov S. <sup>4</sup>, Khrameeva E. <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology , Moscow

<sup>2</sup> Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>3</sup> N.A. Alekseev Medical Centre for Mental Health, Moscow

<sup>4</sup> Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow

Schizophrenia is a heterogeneous complex disorder with variable clinical manifestations of psychotic symptoms such as auditory hallucinations, paranoid delusions, disorganized thinking, and significant social dysfunction. Schizophrenia is a highly inherited disorder whose genetic risk is associated with a large number of different alleles, including common alleles with little effect that can be detected in genome-wide association studies (GWAS). In addition, the development of schizophrenia can be critically influenced by epigenetic changes in the patients' brain cells.

At the moment, few studies have been published on changes in chromatin structure and folding in schizophrenia patients' brain cells, although differences in the chromatin openness (ATAC-seq), hereditary single nucleotide polymorphisms (SNPs), histone methylation levels (ChIP-seq) and DNA, as well as changes in the expression of many genes in schizophrenia are well studied. Therefore, in this work we analyze Hi-C maps for four healthy donors representing neurotypical controls and three patients with schizophrenia.

We observe differences between schizophrenia patients and neurotypical controls in Hi-C maps at all levels of chromatin organization, starting from large-scale ones, such as changes in the structure of compartments and TADs, and ending with the smallest ones at the level of chromatin loops and individual statistically significant contacts, which we can study in detail due to the high resolution of our Hi-C maps. In addition, the resolution of Hi-C maps made it possible to detect genomic rearrangements, as well as other changes in chromatin structure unique for individual schizophrenia patients.

The statistically significant changes in chromatin organization that we found encompass quite many genes (more than 100 genes in total), which changes are associated with schizophrenia according to various studies. In particular, we detected changes in genes important for neurons and glia functionality, such as NRXN1, DRD2, OPCML, GRIN2B, representatives of the solute carrier family (SLC6A11, SLC6A17, SLC26A2), and others.

This study was supported by the Russian Science Foundation (grant number 21-74-10102 to E.K.).

## **Achievements of mammalian cytogenetics in the development of chromosomal diagnostics and species systems**

**Orlov V.N.**<sup>1</sup>, **Lyapunova E.A.**<sup>2</sup>, **Baskevich M.I.**<sup>1</sup>, **Kartavtseva I.V.**<sup>3</sup>, **Malygin V.M.**<sup>4</sup>,  
**Bulatova N.Sh.**<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: bulatova.nina@gmail.com

<sup>2</sup> N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 113994 Russia

<sup>3</sup> Biology and Soil Institute of Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

<sup>4</sup> Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

The use of cytogenetic methods has largely changed the system of mammalian species, initially based solely on morphological approaches. Since the 1960s, classical cytogenetic analysis and methods of differential chromosome staining - later molecular cytogenetic analysis - have been used in institutions of the Russian Academy of Sciences, SB RAS, FEB RAS to study issues of evolutionary problems and systematics based on progressive levels of analysis of chromosomal rearrangements and the genome. Based on the materials of cytogenetic collections of several laboratories with a long history of chromosome research, for the first time in connection with the 50th anniversary of the Theriological Society at the Russian Academy of Sciences, a taxonomic analysis of most mammalian genera studied, including with the participation of the review authors, on the territory of the country was carried out. It is emphasized that new karyotypes are still being found even within previously studied taxa, and it has often been possible to show that in many cases large polytypic species of traditional taxonomy are complexes of morphologically similar, but genetically well distinguishable and reproductively isolated species. The identification of cryptic taxa (hidden twin species) is a necessary link in the description of biological diversity and at the same time draws attention to the discussion of the concepts of species and speciation at a new level. Modern molecular cytogenetic analysis makes it possible to establish the homology of large segments of the genome – the arms of chromosomes and whole chromosomes, as well as to identify point features that reveal intrachromosomal genetic differentiation of taxa at the DNA level, which qualitatively changes the previously accepted permissive levels of comparative cytogenetics. The support of the State Task IPEE RAS № FFER-2021–0003 is acknowledged.

## Searching for potential functional state markers of cultured cells

Osipov Y.A.<sup>1</sup>, Kalashnikova D.A.<sup>2</sup>, Samoilova E.M.<sup>3</sup>, Antoshina P.A.<sup>2</sup>, Sidelnikov L.O.<sup>1</sup>, Laktionov P.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

<sup>3</sup>Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow

Aging of the organism is a complex multifactorial process, which is accompanied by deterioration of the functional state of organs and organ systems. At the cellular level, aging is manifested by characteristic changes in morphology, acquisition of a specific secretory phenotype, and a decrease in replicative potential up to complete cessation of division. The loss of replicative potential of primary cultures is a major obstacle to the therapeutic use of donor cells. This problem is especially acute in older donors. Creation of a system that would allow assessing the replicative potential of donor cells is a necessary step in the development of cell therapy. To create such a system, it is necessary to clearly define markers of the functional state of cells in culture.

The presented work is aimed at a comprehensive study of various predictive markers of replicative aging in human embryonic lung fibroblast cell line LF1. As a result, it is planned to select several of the most perspective markers that can be analyzed under standard laboratory conditions. Epigenetic age analysis, expression levels of marker genes such as LMNB1 and HMGB2, and telomere length estimation were used as markers of aging.

For the LF1 cell line, a model was optimized based on methylation pattern analysis of four CpG-dinucleotides. This model allowed us to estimate the "culture" epigenetic age with high accuracy and was used as an independent metric of cultivation duration.

The expression of a number of marker genes associated with cellular senescence was also analyzed. It was found that LMNB1, encoding nuclear lamin B1 protein, and HMGB2, encoding nuclear architectural protein, are the most promising genes as marker genes of cell aging. Decreased levels of lamin B1 and degradation of nuclear lamina is a characteristic sign of cellular senescence, and suppression of its expression causes irreversible cell cycle arrest and activation of senescence markers. At the same time, suppression of LMNB1 expression and related phenotypic manifestations of cell aging have no effect on the epigenetic age of cells. Decreased HMGB2 expression level is an early marker of cell aging, which precedes p21

activation and leads to the rearrangement of chromatin spatial structure, in particular, to the formation of clusters enriched with CTCF protein. During aging of the LF1 cell line, a significant decrease in the expression level of both genes was observed.

In addition, protocols for determining the expression of other genes, including genes encoding sirtuin proteins, have been worked out, but at this stage they cannot be considered as independent markers of cell aging.

Assessment of telomere shortening dynamics is also a classical marker of cellular aging. In our work, we were able to adapt a real-time PCR-based telomere length measurement protocol during the LF1 cell line aging. The observed dynamics of telomere shortening allowed us to use telomere length measurement as a convenient marker for assessing the stage of cellular senescence.

Thus, we were able to select and optimize several ways to analyze the replicative aging of cell cultures. Later we plan to test these systems on mesenchymal stem cells from donors of different age groups. In this way, we will be able to establish a correlation between the individual characteristics of donors and the functional state of their cells.

The study was supported by the grant from the Russian Science Foundation № 22-74-10123.

## **Karyotype diversity and B chromosome polymorphism within cryptic species of the subgenus *Stenocranius* (Cricetidae, Rodentia)**

**Pavlova S.V.** <sup>1,5</sup>, **Romanenko S.A.** <sup>2</sup>, **Matveevsky S.N.** <sup>3</sup>, **Kuksin A.N.** <sup>4</sup>, **Dvoyashov I.A.** <sup>5</sup>, **Kovalskaya Yu.M.** <sup>1</sup>, **Petrova T.V.** <sup>5</sup>

<sup>1</sup> A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow

<sup>2</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk

<sup>3</sup> Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow

<sup>4</sup> Tuviniian Institute for Exploration of Natural Resources, SB RAS, Kyzyl

<sup>5</sup> Zoological Institute, RAS, Saint-Petersburg

The subgenus *Stenocranius* includes two cryptic species, *Lasiopodomys raddei* Poljakov, 1881, which occurs in South-Eastern Transbaikalia and widespread *L. gregalis* Pallas, 1779; the latter has three allopatric and genetically well-isolated lineages A, B and C having unclear taxonomic rank. Literature data showed that the karyotype of narrow-headed voles throughout the vast territory from the Tien-Shan Mountains and Yamal Peninsula to the Indigirka River is characterised by a stable diploid chromosome number,  $2n = 36$ , and only in populations from the Khangai and Khentii Mountains in Central Mongolia  $2n$  has varied between 36 and 40 owing to the presence of one to four supernumerary, i.e., B chromosomes (Bs).

To identify speciation mechanisms within the narrow-headed vole cryptic species complex, we analysed karyotypic variation of *Stenocranius* voles from previously unexplored regions of South Siberia and, in particular, from the Altai-Sayan region, and from the Transbaikal Region – the major centers of diversity within the subgenus. In total, 121 individuals from 37 localities (among them, 49 individuals were newly karyotyped from 15 previously unpublished sampling sites) were analysed. To determine karyotypic differences we used both classic differential bandings as well as fluorescent *in situ* hybridisation with ribosomal and telomeric DNA probes. In addition, we examine the structure and meiotic silencing of Bs using immunocytochemical analysis of synaptonemal complexes (SCs) in *Stenocranius* pachytene spermatocytes.

Both cryptic species differ in several chromosomal characteristics although initially they shared the same diploid number of chromosomes,  $2n = 36$ . Intra-population karyotype variation of *L. gregalis* is mainly due to various number of Bs. No Bs are observed in the early Pleistocene relic *L. raddei*, all examined individuals have a  $2n = 36$ ,  $FN_a = 52$ ; the G-banded karyotype is presented for the first time. Among the *L. gregalis* lineages, six karyotypic variants are detectable:  $2n = 36$  ( $FN_a = 50$ ),  $2n = 36+1B$ ,  $2n = 36+2Bs$ ,  $2n = 36+3Bs$ ,  $2n = 36+4Bs$  and  $2n = 36+5Bs$ , i.e., the number of heterochromatic small acrocentrics Bs varies from one to five: increasing from older lineage A to evolutionarily younger lineages B and C. Besides some



differences in C-heterochromatic blocks, karyotypes of the two species also differ in distribution patterns of ribosomal DNA in A chromosome sets and on Bs, whereas telomeric sequences show stable localisation across all examined karyotype variants.

The structure of the meiotic karyotype corresponds well to the mitotic one. Immunodetection of several meiotic proteins indicates that the meiotic supernumerary chromosomes are transcriptionally inactive, located generally within the sex body and manifest a pattern of meiotic behaviour similar to that of sex chromosomes. These data allow us to suppose some homology of Bs to the sex chromosomes.

The increasing number of Bs can point to an evolutionary series from the older forms of *L. raddei* and *L. gregalis* lineage A (with almost stable  $2n = 36$ ) to younger lineages B and C carrying one to five Bs, with complete loss of the initial chromosome set in lineage C. Accordingly, at the moment, we can offer only possible reasons for such a pattern, on the basis of hypotheses about the influence of high seismic activity in the Altai-Sayan region or about the hybridogenic nature of Bs. Further research is needed to clarify the nature, mechanisms of inheritance and stability of supernumerary chromosomes in narrow-headed voles.

This research was funded by the Russian Science Foundation (RSF) N 22-24-00513.

## **Analysis of the Diversity of Large Tandem Repeats in Carnivora**

**Popova M., Komissarov A.**

iTMO, Saint Petersburg

Tandem repeats, consisting of repetitive DNA sequences arranged in consecutive copies of identical or similar nucleotide units, are prevalent in eukaryotic genomes. These repetitive elements have long been disregarded as "junk DNA" due to their repetitive nature and lack of protein-coding potential. Consequently, they have often been overlooked in genome research endeavors. However, with the advent of advanced sequencing technologies and improved genome assemblers, our perception of tandem repeats has undergone a transformative shift.

Recent breakthroughs have shed light on the functional significance of tandem repeats, revealing their crucial roles in DNA structure and function. Tandem repeats have been implicated in a myriad of biological processes, including gene regulation, DNA replication, chromatin organization, and genome stability. Their presence in substantial proportions within genomes indicates their potential importance in shaping the genomic landscape and influencing cellular processes. The evolution of high-throughput sequencing technologies and the availability of chromosome-level assemblies have paved the way for in-depth investigations into the diversity and characteristics of tandem repeats. This has opened up new avenues of research to explore their functional implications and unravel the underlying molecular mechanisms.

The genomes of Carnivora, a diverse order of mammals comprising various families, provide an excellent opportunity to explore the diversity and characteristics of TRs. However, the comprehensive investigation of large TRs in Carnivora genomes has been limited due to the lack of suitable tools and resources. To bridge this gap we have undertaken an in-depth investigation of the diversity of large TRs in Carnivora genomes using chromosome-level assemblies obtained from DNAZoo.org. We have investigated the presence and characteristics of tandem repeats in the genomes of various families within the Carnivora order. During this comprehensive analysis 112,135 TRs from 13 Carnivora families were found and clustered into 7,868 families, providing valuable insights into the distribution and classification of TRs. One of the primary motivations for this study was to overcome the limitations of previous research on TRs, which often focused on one or a few families and analyzed only a small number of tandem repeats. Moreover, many previous studies relied on wet lab techniques to analyze the localization and variation of TRs. In contrast, our approach utilized advanced machine learning techniques, enabling to develop a robust computational pipeline for the identification, annotation, classification, and visualization of TRs across a broader spectrum of Carnivora families.

A key challenge encountered in the investigation was the imperfect nature of chromosome assemblies in accurately representing long repetitive sequences. This is a longstanding issue in genomics, and this study further highlights the need for improved techniques to capture and assemble these important components of the genome. The limitations of chromosome assemblies in accurately representing TRs, particularly in capturing centromeres and telomeres regions and the presence of gaps, pose challenges for downstream analyses and interpretations. It emphasizes the importance of considering the limitations and potential biases associated with the assembly process when studying TRs within genomes. Despite these challenges, the analysis of TRs in various Carnivora families revealed intriguing patterns. We found that some TR motifs were specific to particular families, suggesting lineage-specific evolution and potential functional roles unique to those lineages. On the other hand, we also observed the presence of shared TR motifs across multiple families, indicating conservation across different lineages within the Carnivora order. This finding suggests the existence of ancient and conserved TR elements that have played important roles in the genomic evolution of Carnivora species. To validate the findings, we compared the identified TR sequences in our study to known TR sequences stored in the NCBI database. This comparison revealed similarities between identified sequences and those reported by other researchers, further supporting the accuracy and reliability of our approach. The presence of shared TR sequences across independent studies reinforces the notion that these repetitive elements are indeed conserved and functionally relevant.

The computational pipeline developed in the study provides a robust framework for the analysis and classification of TRs in Carnivora genomes. By integrating quality assessment, identification, analysis, visualization, and classification techniques, we have advanced our understanding of the genomic characteristics of TRs. This research serves as a foundation for further investigations into the roles of TRs in Carnivora genomics and highlights the significance of computational approaches in unraveling the complexities of repetitive elements in genomes. The observed richness and diversity of TRs in Carnivora genomes underscore their potential importance in the biology and evolution of these species.

## **Karyotypic diversity of fish in the inland waters of Phu Quoc Island**

**Prazdnikov D.V.**

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow

Fragmentation and isolation of teleost populations may contribute to an increase in their karyotypic diversity. In this regard, it is relevant to study the karyotypic diversity of the ichthyofauna of continental islands, which could be subjected to repeated isolation of fish populations due to geological events and climatic fluctuations. One of these islands is the Vietnamese island of Phu Quoc, located in the Gulf of Thailand. The island has a hilly terrain and a relatively large area occupied by rivers and streams, which makes it promising for chromosomal studies of fish.

In the course of cytogenetic studies, karyotypes of fourteen freshwater and brackish water fish species belonging to nine families were studied: Adrianichthyidae, Channidae, Clariidae, Cobitidae, Cyprinidae, Eleotridae, Gobiidae, Mastacembelidae, Siganidae. Freshwater fish species of Phu Quoc Island were characterized by different levels of karyotypic variability. For example, in *Channa lucius*, interpopulation chromosomal variability due to pericentric inversion was found. For another species from the same Channidae family, *C. striata*, intrapopulation chromosomal polymorphism is associated with Robertsonian fusion. *Barbodes binotatus* from both studied river basins of the island was characteristic of the same diploid number  $2n=50$  but different karyotype composition as a result of chromosomal rearrangements leading to a change in the centromere position. Among the studied karyotypes of brackish water fish species, such as *Oryzias javanicus* and *Siganus javus*, chromosomal variability was not found.

A comparative cytogenetic analysis of island and mainland populations showed that the six studied fish species were characterized by interpopulation chromosomal variability. The greatest differences in karyotype structure were found for *Macrogathus circumcinctus*, differing in 8 pairs of meta-submetacentric chromosomes ( $2n=48$ ,  $NF=48$  from Phu Quoc Island and  $2n=48$ ,  $NF=64$  from Thailand); the karyotype of the island population, consisting of 48 subtelo-acrocentric chromosomes, is the closest to the putative ancestral karyotype of the Mastacembelidae family. The revealed heterozygous karyotypes among the studied island populations and comparison with the mainland populations indicate both possible hybridization between karyomorphs with different numbers of chromosomes and the fixation of heterozygous chromosomal rearrangements, which can play an important role in maintaining karyotypic diversity.

Studies of the geological evolution of the Phu Quoc basin show that the island had a common history with the Cambodian mainland, and during the cycles of ice ages, accompanied by drops in sea level, the island was part of the valley of mainland rivers. As a result of these events, continental populations of various taxonomic groups of fish could colonize the territory of the future island. It can be assumed that the isolation of the island populations of freshwater fish and the peculiarities of the mountainous relief contributed to the appearance of chromosomal polymorphism or its maintenance. Possible secondary contacts between populations associated with climatic fluctuations could lead to an increase in karyotypic diversity. Further cytogenetic studies of fish species in the inland waters of Phu Quoc Island from different river basins and an increase in the sample size will most likely reveal even greater karyotypic diversity.

I am grateful to the administration of the Vietnam-Russian Tropical Center for financially supporting field research on Phu Quoc Island.

## **B chromosome inheritance in *Apodemus flavicollis***

**Rajičić M., Miljević M., Bajić B., Budinski I., Rončević A., Vujošević M., Blagojević J.**

Department of Genetic Research, Institute for Biological Research “Siniša Stanković” – National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142, 11000 Belgrade, Serbia

Correspondance: Marija Rajičić (marija.rajicic@ibbis.bg.ac.rs)

B chromosomes (Bs) are additional elements to the standard karyotype that are not required for normal growth and development. Bs are predominantly derived from chromosomes of the standard chromosome set. In some species, these supernumerary chromosomes are passed on to the next generation more frequently than would be expected under Mendel's law of segregation. Although the molecular mechanism is unknown, this chromosome drive can occur during premeiotic, meiotic, or postmeiotic division. Inheritance of B chromosomes across generations is unknown in many species, including *Apodemus flavicollis*. The standard karyotype of this species ( $2n=48$ ) may contain up to eight B chromosomes, but animals with 1B are most common. Animals with Bs are present in all studied populations of *A. flavicollis* in Serbia with different frequencies (0.10-0.64).

Here we studied the transmission rate of B chromosomes in captive-bred pairs of *A. flavicollis*. Juveniles were selected for sex and Bs markers, all of which were determined by PCR. In addition, primary cell cultures and chromosome preparations were performed for animals with positive B markers to select animals with 1B. In this way, we were able to form two combinations of breeding pairs: four pairs with 1B females and 0B males and three pairs with 0B females and 1B males.

In the pairs where the female had 1B and the male 0B, we obtained a total of 20 offspring, 14 of which were carriers of the B chromosome (13 with 1B and one animal was a mosaic with 0-2Bs in the cells). In pairs where males were carriers of 1B and females of 0B, we obtained 10 offspring, of which five animals were carriers of the B chromosome (4 with 1B and one animal was a mosaic with 0-1B).

In our previous studies of more than forty natural populations, the frequencies of animals with Bs were the same in males and females. Also, previous studies of meiotic segregation in males showed that there was no accumulation of Bs, suggesting a general lack of meiotic drive. Herein, for the first time, we found deviations from Mendel's law of segregation in the transmission of Bs by the female sex. Our preliminary results suggest the possible presence of a meiotic drive in the female sex of *A. flavicollis*, in which  $\frac{3}{4}$  of the offspring inherit B from the mother, whereas in the male sex B is inherited according to Mendel's law of segregation. However, the small number of crossed pairs of animals and the small number of litters in the present study indicate the need to continue this experiment to address the issue of Bs transmission across generations in *A. flavicollis*.

# **Optimization of CRISPR-Cas12a for improving human mitochondrial genome editing**

**Rimskaya B.**

Ph.D. Education Programme, Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia.  
Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology,  
Moscow, Russia

A primary barrier to comprehending mitochondrial biology and developing gene therapy for inherited diseases associated with mitochondrial DNA (mtDNA) mutations lies in the absence of highly efficient, widely accessible systems capable of targeted human mitochondrial genome editing. We propose that the CRISPR-Cas technology platform is a promising and versatile candidate due to its inherent principle of DNA template complementarity recognition. Yet, the ubiquitous use of this platform for editing mtDNA has been stymied by an incomplete understanding of RNA import pathways in the mitochondria of mammalian cells.

As a proof-of-concept, we attempted a deletion in mtDNA of human cell culture. This endeavor required the import of Cas12a nucleases and two crRNAs into mitochondria and knockdown of MGME1, an endonuclease responsible for the rapid degradation of mtDNA with double-strand breaks.

We constructed and tested a lentiviral plasmid vector, expressing small hairpin RNAs (shRNA) for effective MGME1 knockdown, based on the most efficient siRNA to MGME1 previously tested by our team. We also constructed and tested a lentiviral vector, expressing the Su9-AsCas12a nuclease with a mitochondrial import determinant. These constructs were combined into a single lentiviral plasmid vector for simultaneous expression of shRNA to MGME1 and Su9-AsCas12a. Furthermore, we designed and chemically synthesized crRNAs and developed a system for quantitative evaluation of mtDNA cleavage efficiency.

crRNAs that leave sticky ends after DNA hydrolysis by AsCas12a/crRNA complex were selected, and to ensure effective import into the mitochondrial matrix, either the 5' or 3'-end of crRNAs was modified with one of the low-molecular-weight address ligands based on cholesterol, berberine, triphenylphosphonium, or rhodamine.

The presence of sticky ends, coupled with simultaneous suppression of mtDNA degradation system, promotes double-strand break repair, and consequently, the formation of deletions in mtDNA. However, as mtDNA double-strand break repair mechanisms are still poorly understood and presumably effective only for a small fraction of mtDNA molecules, we intend to test an additional deletion analysis system based on blunting and ligation of free mtDNA ends. In both cases, we plan to carry out quantitative analysis of deletions by amplifying the investigated region of mtDNA and performing fragment quantitative analysis of PCR products. Our research provides a promising step forward in treating inherited diseases linked to mitochondrial dysfunction.

The work was supported by the Russian Science Foundation (No. 23-45-10010).

## **The puzzling genomes of the Lemnaceae family - a new aquatic crop**

**Schubert I.**

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

The ancient monocot family of duckweeds (Lemnaceae) represents the fastest growing flowering plants and emerged as world-wide distributed, free-floating in fresh water, organ-reduced, hibernating and mainly asexually propagating crop which needs no arable land for cultivation. Duckweeds are used for waste water remediation (removal of nitrate, phosphate, heavy metals), for generation of bioethanol or transgenic proteins (including vaccine), for feeding fish, shrimps, poultry, pig, ruminants and, based on their valuable metabolite composition, for human consumption. The five duckweed genera (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffia* and *Wolffiella*) show high infrageneric morphological similarity, highly variable chromosome numbers and genome sizes, and phylogenetically progressive reduction of roots and body size.

Particularly enigmatic are the strong intraspecific variation of genome size and chromosome numbers between the clonal accessions. By multiple approaches including genomics, flow-cytometry, chromosome counting and genomic in situ hybridization (GISH), we revealed interspecific hybridization and/or polyploidy as potential reasons for intraspecific genome variability, showing that several independent approaches are mandatory to prevent misinterpretation of data.

Future investigations are required to interpret the relatively frequent occurrence of triploidy and of interspecific hybridization between mainly asexually propagating species.



## **Is chromonema coiling conserved in eukaryotes?**

**Schubert V.**

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben, Germany

The condensed higher-order chromatin organization of chromosomes required to handle them during mitosis and meiosis is under controversial debate for >140 years. While helical models suppose that each sister chromatid at metaphase is formed by a helically coiled chromatin thread (named chromonema) non-helical models assume that the chromatin is folded within the chromatids without forming a helix. By analyzing historical and recent investigations based on classical and modern methods it became clear that the helical organization was found in living, fixed and treated chromosomes of a wide range of plant and animal genera, and even in single-cell eukaryotes containing large chromosomes. Thus, chromonema coiling seems to be a fundamental feature established early during the evolution of eukaryotes to handle increasing genome sizes.

The study was carried out at the expense of a grant from the German Research Foundation (Schu 762/11-1).

## **Search for markers of replicative potential of LF1 cells using cytologic methods**

**Sidelnikov L.O.**<sup>1</sup>, **Epifanov R.U.**<sup>1</sup>, **Osipov Y.A.**<sup>1</sup>, **Shloma V.V.**<sup>1,2</sup>, **Kalashnikova D.A.**<sup>1,2</sup>, **Samoilova E.M.**<sup>3</sup>, **Laktionov P.P.**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090, Russia

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090, Russia

<sup>3</sup>Federal Research Clinical Center, FMBA of Russia, Moscow, 115682, Russia

Cellular aging is a complex problem important for many applied fields, such as biotechnology and regenerative medicine. The search for and routinization of methods to assess the proliferative potential of donor cells, cell lines and the creation of universal predictive models remain actual tasks today.

In this study, we focused on finding predictive markers of replicative senescence that can be detected by cytologic methods. The identification of such markers may be useful for the development of systems to assess the replicative potential of primary donor cells. We chose human embryonic pulmonary fibroblasts (LF1) as a model of replicative senescence because they are easy to culture and show all typical signs of cellular senescence.

When LF1 cells were cultured, a change in morphology and growth dynamics was observed with the course of aging. Thus, older cells had lower abundance while achieving similar confluency. In early passages, cells were passaged once every 3-4 days, while in passages 14-18, cells required 4-5 days, and starting from passage 23, achieving confluency of the passage required about 30 days.

Proliferation markers are directly related to the proliferative potential of cells; to assess them, we immunostained LF1 cells at different stages of aging (from 6 to 21 passages) for Ki-67 protein, histone  $\gamma$ H2AX variant, and analyzed DNA fragmentation (TUNEL-test). As a result, a marked decrease in the concentration of Ki-67 marker was detected during cultivation; chromatin granules corresponding to the histone  $\gamma$ H2AX variant became detectable starting from the 16th passage. TUNEL-test showed similar results - the first signals were detected starting from passage 19. The evaluation of Ki-67 immunostaining results was duplicated using machine learning algorithms based on the ResNet-50 neural network, resulting in a mathematical model for estimating the culture age with an accuracy of 4 passages.

Division arrest in aging cell culture is associated with changes at the level of nuclear architecture, in particular, the distribution of heterochromatin in cell nuclei changes. To assess the dynamics of expression and distribution of heterochromatin factors, we performed immunostaining for heterochromatin proteins HP1a, HP1b and HP1g, as well as histone modifications H3K9me3 and H3K27me3. For HP1a, HP1g and H3K27me3, no significant changes were detected during cellular senescence. At the same time, the H3K9me3 tag was detectable in the cytoplasm in late passages, consistent with previously described cytoplasmic chromatin filaments (CCFs).

Also, the results of immunostaining were used to evaluate the dynamics of nuclei size. The results obtained are consistent with the data on the increase in nucleus size during cell aging.

By cytologic examination of cells in culture, we have identified several promising markers for assessing the proliferative potential of cells in culture. We plan to take advantage of mathematical modeling to combine different methods and develop a predictive model to assess the functional state of cells.

Financial support: Russian Science Foundation grant № 22-74-10123.

## HP1-driven phase separation: an *in vitro* artefact or an *in vivo* organizing principle?

Singh P.B.

Nazarbayev University School of Medicine, 5/1 Kerei, Zhanibek Khandar Street, Nur-Sultan 05K4F4, Kazakhstan

Heterochromatin is the largest differentiated chromatin compartment in eukaryotic nuclei. How this compartment is formed has been the subject of intense research for nearly one hundred years. More recently, in the past three decades, research has implicated an evolutionarily conserved class of proteins, the HP1 proteins, in the establishment and maintenance of heterochromatin.

In mammals there are three isoforms, HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  and HP1 $\gamma$ . *In vivo* disruption of the corresponding mammalian HP1 genes, *Cbx1* (encoding HP1 $\beta$ ), *Cbx3* (encoding HP1 $\gamma$ ) and *Cbx5* (encoding HP1 $\alpha$ ), revealed that each possesses a unique mutant phenotype. *Cbx1* null mutant animals die around birth, while disruption of *Cbx3* leads to infertility and an increased postnatal mortality. In stark contrast, *Cbx5* null animals exhibit no overt phenotype; they are viable and fertile. How these *in vivo* data can be reconciled, if at all, with *in vitro* work showing that HP1 proteins might act as mediators of “phase separation” of heterochromatin from euchromatin in mammalian nuclei is the subject of this talk. The phase separation work has focussed on HP1 $\alpha$ . Using a range of *in vitro* bulk and single-molecule techniques HP1 $\alpha$  was shown to undergo *liquid-liquid* phase separation (LLPS), forming phase-separated droplets, when phosphorylated and in combination with DNA. It was found that the central disordered region of HP1 $\alpha$  is sufficient to enable LLPS with DNA. Notably, under the same conditions, HP1 $\beta$  and  $\gamma$  do not form liquid droplets; HP1 $\beta$  may have the opposite effect of being able to dissolve HP1 $\alpha$  condensates. On the face of it, the *in vivo* work is not commensurate with the *in vitro* data. Given the discrepancy we suggest that HP1-driven LLPS may not be that important in mammalian nuclei. Instead, we discuss a possible role for HP1-driven *polymer-polymer* phase separation. We formulate a simple theoretical framework for understanding how HP1 proteins mediate polymer-polymer *micro*-phase separation and segregation of heterochromatin-like domains that are found widespread in eukaryotic genomes.

## The mitotic roles of nucleolar proteins

Somma P.M. <sup>1\*</sup>, Andreyeva E.N. <sup>2\*</sup>, D'Alessandro A. <sup>1</sup>, Pucinischi G. <sup>1</sup>, Bonaccorsi S. <sup>1</sup>, Cenci G. <sup>1</sup>, Picchetta L. <sup>1</sup>, Marzullo M. <sup>1</sup>, Popova Ju.V. <sup>2</sup>, Maltceva S.V. <sup>2</sup>, Yarinich L.A. <sup>2</sup>, Pavlova G.A. <sup>2</sup>, Omelina E.S. <sup>2</sup>, Pindyurin A.V. <sup>2</sup>, Gatti M. <sup>1§</sup>

1. IBPM, CNR and Department of Biology and Biotechnology “C. Darwin”, Sapienza University of Rome

2. Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Russia

\* Equal contribution. § Correspondence

One of the most well known hallmarks of cancer cells is increased size and number of nucleoli. Several nucleolar proteins have been implicated in cancer and some of them have been considered as targets for cancer therapy. Many nucleolar proteins (~ 70 in humans) accumulate around mitotic chromosomes forming a perichromosomal layer (PCL). Most of these proteins contain disordered stretches and have propensity to undergo liquid-liquid phase separation (LLPS). The best-known PCL component is the tumor marker Ki-67, which is required for perichromosomal localization of most of the other PCL proteins. Although PCL formation does not appear to be required for the fidelity of mitosis, some published data and our preliminary results indicate that certain nucleolar/PCL proteins have mitotic roles.

We began to analyze the mitotic roles of 3 *Drosophila* proteins that are homologous to human PCL proteins: Nnp-1 (homologous to the ribosomal assembly factor RRP1), CG6937 (homologous to the RNA binding and Ki-67-interacting NIFK protein) and Non3 (homologous to the ribosomal biogenesis factor RPF2). RNAi in cultured S2 cells and analysis of mutant larval brains showed that loss of Nnp-1 results in small centrosomes with little or no microtubule (MT) nucleation ability. CG6937 silencing also resulted in centrosome defects, consisting in expansion of the pericentriolar material (PCM) and centrosome fragmentation. RNAi in S2 cells showed that Non3 depletion results in altered chromosome segregation, likely caused by kinetochore defects. Consistent with this finding, we also observed strong chromosome segregation defects in HeLa cells treated with siRNAs against RPF2.

In both Nnp-1 and CG6937 depleted cells, the centrosome defects are not seen in early prophase but become manifest only after nucleolus breakdown in late prophase. This makes the mitotic functions of these proteins quite special, as they are exerted specifically during cell division. We don't know whether also Non3 and RPF2 play similar mitosis-specific roles, because chromosome segregation can be analyzed only after nucleolus breakdown, and not before, as occurs for centrosome behavior. Nevertheless, we hypothesize that Nnp-1, CG6937 and Non3 play mitotic functions that are exerted only after nucleolus breakdown. To the best of our knowledge, these peculiar mitotic functions have never been specifically studied and their definition could be relevant for cancer diagnosis and treatment.

# Dynamics of chromatin architecture in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle

Ulianov K.A.<sup>1</sup>, Zhegalova I.V.<sup>1,2</sup>, Khrameeva E.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia

Email: Kirill.Ulianov@skoltech.ru

Chromatin is a highly dynamic structure which spatial architecture undergoes deep changes during cell cycle progression. Chromatin folding is tightly associated with molecular processes inside the nucleus. Proper contacts between genomic regions and chromatin accessibility of the DNA strand predispose successful transcription and replication. There are TADs (Topologically Associated Domains) and chromatin loops that help maintain chromatin contacts at shorter distances. Both TADs and loops are explained by the loop extrusion model in mammalian species. According to the model, cohesin complexes push the DNA thread through the ring-like protein structure resulting in loop formation. The extrusion continues until cohesin complex encounters CTCF proteins from each side, which are bound with DNA in a convergent orientation. Nonetheless, CTCF proteins is absent in more distant species that possess TADs and loops, e.g. budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Therefore, another mechanism for boundary determination in TADs and loops must exist.

In this work, we looked into changes in the spatial architecture of the genome at the scale of TADs and loops in chromatin of *Saccharomyces cerevisiae* during cell cycle. We annotated positions of both structures on Micro-C contact frequency maps (Costantino et al. 2020) derived for multiple timepoints. We found out TAD boundaries typically arise in genomic areas enriched by divergently oriented genes, while boundaries of loops, which appear only during the S phase and mitosis, tend to be placed in regions abundant with convergent genes. Analyzing ChIP-seq data (Bar-Ziv, Voicheck, and Barkai 2016), we observed that distribution pattern of histone modification of active chromatin H3K9ac, H3K4me1 and H3K4me3 distinguishes at the boundaries compared to the surrounding areas.

## References:

Bar-Ziv, Raz, Yoav Voicheck, and Naama Barkai. 2016. "Chromatin Dynamics during DNA Replication." *Genome Research* 26 (9): 1245–56. <https://doi.org/10.1101/gr.201244.115>.

Costantino, Lorenzo, Tsung-Han S. Hsieh, Rebecca Lamothe, Xavier Darzacq, and Douglas Koshland. 2020. "Cohesin Residency Determines Chromatin Loop Patterns." *ELife* 9 (November): e59889. <https://doi.org/10.7554/eLife.59889>.

# New genomic data on the origin of the hybrid parthenogenetic lizard species *Darevskia unisexualis*

Urin A.V.<sup>1,2</sup>, Komissarov A.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> ITMO University, Saint Petersburg, Russia

The genus *Darevskia*, which inhabits the Caucasian region spanning countries such as Iran, Turkey, Georgia, Armenia, Azerbaijan, and Russia, comprises over 30 species of lizards. Of these, 7 have a hybrid origin and reproduce through parthenogenesis. The presence of numerous overlapping habitat ranges, the absence of strict cytological constraints, and climate changes frequently lead to interspecific hybridization events. Some of these events have given rise to hybrid parthenogens, while others have facilitated horizontal gene transfer between species. This reticulate evolution has resulted in a complex system of phylogenetic relationships among the species, a system that has yet to be fully elucidated. Whole-genome sequencing data could significantly simplify this reconstruction.

In our study, we focused on one of the parthenogenetic species, *Darevskia unisexualis*. Based on allozyme comparison followed by microsatellite analysis, it is believed that the paternal species is *Darevskia valentini* and the maternal one is *Darevskia raddei* (subspecies *naerensis*). Previous data suggests that all females of this species have a shared clonal origin, as evidenced by the microsatellite analysis of 109 *D. unisexualis* individuals, 17 *D. valentini*, and 45 *D. raddei nairensis*.

We conducted sequencing of representatives from the entire parthenogenetic trio using third-generation PacBio HiFi sequencing, which allows for read lengths up to 15 kb with quality comparable to short-read Illumina sequencing. Several genome assemblies of *D. unisexualis* were then produced using tools like Flye, Canu, and Hifiasm. Currently, only Hifiasm offers a feature to separate haplotigs into different files based on parental read data, which was utilized in our study. Based on quality metrics and after comparison with a ReiSeq assembly of *Lacerta agilis*, the assembly quality is suitable for annotation and taxonomic analysis of *D. unisexualis*.

We selected 4,799 conserved protein-coding genes, which were annotated in each of the three genomes as well as in the *L. agilis* genome. Among the retrieved genes within the haploid genomes of *D. unisexualis*, allelic pairs were formed. These pairs, after alignment and distance matrix construction, were categorized into different groups. For instance, genes having a

heterozygous form, where one allele is closer to *D. raddei* and the other to *D. valentini*, comprised only 13.8%, whereas 38.2% of the heterozygous genes had one allele similar to *D. raddei* and the other more distantly related to *D. valentini*. Based on these indicators, it can be inferred that the most recent common ancestor between the maternal and hybrid species existed more recently than the most recent common ancestor between the parthenogen and the paternal species. However, without population data, it remains unclear whether this was another species that lived earlier and is now extinct or another population of *D. valentine* more closely related in evolutionary history to *D. unisexualis*.

Furthermore, genes from varying categories were mapped onto the pseudo-chromosomal assembly of *Lacerta agilis*. Remarkably, five regions were identified housing homozygous genes, wherein both alleles were congruent with the maternal species allele. This observation corroborates previous hypotheses suggesting infrequent crossover events during meiosis in the germ cells of the parthenogen. These specific loci are positioned on chromosomes 8, 10, 13, and the sex-determining Z chromosome. It's noteworthy that only one of these homozygous segments does not reside at a chromosomal extremity, which could potentially be attributed to a rare double crossover event.

The genomes procured through this research can serve as invaluable resources for subsequent studies dedicated to the investigation of parthenogenetic lizards within the *Darevskia* genus and the intricate reticulate evolution patterns inherent to it. Future endeavors for the research team comprise population studies aiming to verify the consistency of the currently derived findings across various populations of the evaluated parthenogenetic triad.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00083-П.



## Интрогрессивная гибридизация мягкой пшеницы

Адоина И.Г.<sup>1,2\*</sup>, Тимонова Е.М.<sup>1,2</sup>, Салина Е.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Курчатовский геномный центр Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия

Под чужеродной интрогрессией понимают перенос в геном какого-либо биологического вида генетической информации от другого вида, а в селекции растений – это интеграция в геном культурных растений генов других культурных или дикорастущих видов.

Интрогрессивная гибридизация играет значительную роль в эволюции растений, однако прежде всего – это один из способов увеличения генетического разнообразия культурных растений, в частности, такой важнейшей сельскохозяйственной культуры как мягкая, или хлебная пшеница (*Triticum aestivum*). Дикие и культурные виды, родственные *T. aestivum*, условно можно отнести к нескольким генным пулам. Виды, принадлежащие к первичному генному пулу, имеют геномы, гомологичные субгеномам А, В и D мягкой пшеницы.

Вторичный генный пул включает полиплоидные виды пшениц и эгилопсы, имеющие, по крайней мере, один геном, гомеологичный субгеномам А, В, D *T. aestivum*. Виды, относящиеся к третичному генному пулу, считаются более отдаленными родственниками пшеницы. Хромосомы их геномов негомологичны хромосомам мягкой пшеницы.

Способы переноса генов от разных видов напрямую зависят от их принадлежности к тому или иному пулу. Результаты проведенного нами анализа данных выявили некоторые закономерности интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы. Так, больше всего чужеродных транслокаций, полученных с участием видов, относящихся к вторичному генному пулу, встречается в хромосомах субгенома В, а с участием видов третичного генного пула – в хромосомах субгенома D. Это объясняется тем, что геномы соответствующих видов наиболее близки к субгеномам пшеницы В и D. Наименьшая частота чужеродных интрогрессий наблюдается по хромосомам 4А, 5А. Основной причиной этого может быть наличие в геноме мягкой пшеницы транслокации 4AL/5AL/7BS, а также перичентрической и парацентрической инверсий хромосомы 4А, перестроек, произошедших в эволюционной истории пшениц на уровне тетраплоидного предшественника гексаплоидной пшеницы. Значительное число транслокаций, полученных с участием видов *Aegilops* секции Sitopsis в хромосомах 2В и 6В можно объяснить присутствием в соответствующих гомеологичных хромосомах этих видов гаметоцидных генов, имеющих преимущество при передаче потомству. Возможно, одной из причин значительного числа замещений хромосомы 7D и наличия чужеродных

транслокаций в хромосоме 7D является то, что хромосомы гомеологичной группы 7, кроме хромосомы 7B, играют незначительную роль в определении жизнеспособности и фертильности мягкой пшеницы по сравнению с хромосомами других групп. В настоящее время значительный практический интерес представляют синтетические амфиплоиды, объединяющие в себе генетический потенциал сразу нескольких видов. В селекции мягкой пшеницы наиболее применимы синтетические гексаплоидные пшеницы, получаемые путем скрещивания тетраплоидных видов *Triticum durum*, *Triticum dicoccoides* или *Triticum dicoccum* ( $2n=4\times=28$ , AABB) с *Aegilops tauschii* ( $2n=2\times=14$ , DD) или последовательным скрещиванием диплоидных доноров субгеномов А, В и D. Процесс создания синтетической гексаплоидной пшеницы воспроизводит события естественной истории, в результате которых образовалась мягкая пшеница *T. aestivum* ( $2n=6\times=42$ , AABBDD) с той разницей, что каждый раз в нем задействованы новые генотипы. Стабильные гексаплоидные синтетические пшеницы могут затем успешно скрещиваться с мягкой пшеницей. Традиционно более всего в различных интрогрессивных формах селекционеры привлекает устойчивость к биотическому стрессу т.е. к болезням и вредителям. К другим селекционно-значимым признакам относятся короткостебельность, обеспечивающая устойчивость к полеганию, округлая форма зерна (важный технологический признак, способствующий его эффективной переработке) и признаки качества. К настоящему времени нами получена разнообразная коллекция линий мягкой пшеницы с интрогрессиями от чужеродных видов. Изучение коллекции интрогрессивных линий по хозяйственно важным признакам показало, что образцы, полученные с участием тетраплоидных видов *T. durum* и *T. dicoccum*, имеют повышенное содержание белка, клейковины в зерне, а также более высокое содержание цинка и железа. Они могут быть потенциальными источниками новых генетических локусов, влияющих на качество конечной продукции. Таким образом, интрогрессивная гибридизация мягкой пшеницы имеет значительный потенциал дальнейшего развития.

Исследование по анализу белка, клейковины и микроэлементов выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-16-00041, <https://rscf.ru/project/23-16-00041/>.

Исследование поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0017.

## Кариологический анализ инвазивного вида кровососущих комаров *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae)

Алексеева С.С.<sup>1\*</sup>, Андреева Ю.В.<sup>1</sup>, Сибатаев А.К.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет

<sup>2</sup> Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина

<sup>3</sup> Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева

\*sveta.alexh@mail.ru

В настоящее время в разных регионах мира все чаще обнаруживаются инвазивные виды комаров рода *Aedes*. Одним из наиболее инвазивных видов в мире является *Aedes (Hulecoetomyia) koreicus* в связи с чем интерес к изучению данного вида не угасает, так как расширение его ареала продолжается. В данном исследовании был проведен кариологический анализ комаров вида *Ae. koreicus*.

Лактоацетоорсеиновое окрашивание хромосом позволило произвести точные измерения их длин. В соответствии с классификацией хромосом комаров р. *Aedes*, предложенной McDonald и Rai (1970), хромосомы идентифицировали по их длинам, где хромосома 1 – самая короткая, хромосома 2 – самая длинная, а хромосома 3 является средней по длине по сравнению с другими хромосомами. В результате измерений для *Ae. koreicus* получены следующие значения: длина хромосомы 1 –  $4,9 \pm 0,07$  мкм, хромосомы 2 –  $7,8 \pm 0,12$  мкм, хромосомы 3 –  $7,1 \pm 0,11$  мкм. Также были вычислен центромерный индекс и относительные длины хромосом, на основании значений которых показано, что у *Ae. koreicus* все три пары хромосом являются метацентрическими.

Дифференциальная С-окраска выявила интенсивно окрашенные блоки гетерохроматина в районе центромер всех трех пар хромосом также, как и флуоресцентная DAPI-окраска.

Анализ локализации 18S рДНК показал наличие у *Ae. koreicus* 4 локусов рибосомальных генов во всех трех парах метафазных хромосом. Два крупных локуса расположены в хромосоме 2. Третий локус, более мелкий, локализован в районе центромеры первой хромосомы и четвертый, наименьший по величине и яркости сигнал, был обнаружен в районе центромеры хромосомы 3. По этим данным *Ae. koreicus* отличается от других видов кровососущих комаров. Так, один из наиболее изучаемых видов – вид *Ae. aegypti*, как и многие другие виды р. *Aedes*, имеет один локус генов рДНК, который локализован в пол определяющей хромосоме 1. Подобным образом, а именно в половых хромосомах, данные гены локализованы и у комаров р. *Anopheles*. Данные результаты позволяют предположить, что в процессе эволюции, происходили хромосомные перестройки, такие как транслокации и дупликации, которые привели к переносу данных генов на другую хромосому и образованию нескольких локусов на геном.

Исследование выполнено за счет гранта госзадание Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FSWM-2020-0019, РФФИ № 19-34-90044.

## **Свидетельства наличия специфичных белков, обнаруживаемых в горячих точках физиологических двухцепочечны разрывов геномной ДНК на концах форум-доменов**

**Алембеков И.Р.**

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Форум-домены представляют собой протяжённые области генома, обычно 200 т.п.н., ограниченных на концах горячими точками дц-разрывов. Горячие точки характеризуются неизменностью расположения, большим количеством, компактностью, определённой частотой возникновения разрывов, и распределением по всему геному. Такой способ организации генома наблюдается у человека, дрозофилы, растений, и встречается, по видимому, повсеместно. Первоначально форум-доменный уровень организации хроматина обнаружен как неслучайная фрагментация геномной ДНК на высокомолекулярные фрагменты при пульс-электрофорезе. Секвенирование созданной полногеномной ДНК-библиотеки дц-разрывов показало большое количество и широкое распространение горячих точек дц-разрывов в геномах клеток НЕК293Т и Schneider 2. При использовании подхода на основе ПЦР в реальном времени для количественной оценки частоты разрывов было показано, что при физиологических изменениях (тепловой, осмотический шок) индивидуальных горячих точках изменяется частота дц-разрывов.

В недавно проведённой работе с использованием гибридизации ДНК-библиотеки с фрагментированнмх хроматином из клеток НЕК293Т было обнаружено не менее 7 ещё не идентифицированных на данный момент белков. Поскольку ДНК-библиотека содержит последовательности большого количества индивидуальных горячих точек с полногеномным охватом (десятки тысяч), любые детектируемые белки можно считать не случайными и специфичными для изучаемых локусов. Для подтверждения специфичности гибридизации проводились контрольные эксперименты с эквивалентным количеством неродственной ДНК, - белки отсутствовали. Работа по идентификации полученных белков и установлению состава белковых комплексов во всех горячих точках продолжается.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 22-24-01118.

## Генетические отношения популяций черного коршуна (*Milvus migrans*) Азии, Тайваня, Японии и Австралии: существует ли Тайванский подвид?

Андреевкова Н.Г.<sup>1</sup>, Хонг Ш-Ю.<sup>2,3</sup>, Ивами Я.<sup>4</sup>, Карякин И.В.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Institute of Wildlife Conservation, College of Veterinary Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Taiwan

<sup>3</sup> Raptor Research Group of Taiwan

<sup>4</sup> Yamashina Institute for Ornithology, Abiko, Japan

<sup>5</sup> Российская сеть изучения и охраны пернатых хищников, ООО «Сибирский экологический центр», Новосибирск, Россия

Черный коршун — один из самых обычных пернатых хищников, занимающий широкий ареал в Евразии, Африке и Австралии. Этот вид демонстрирует уникальную экологическую пластичность, населяя самые разные биотопы и охотно используя преимущества проживания рядом с человеком.

По разным данным черный коршун имеет от пяти до семи подвидов. В Палеарктике обитают два из них: западную часть занимает европейский черный коршун *M. m. migrans*, а восточную – черноухий коршун *M. m. lineatus*. Индию и Индокитай населяет индомалайский подвид *M. m. govinda*, а в Австралии и на прилегающих к ней островах обитает *M. m. affinis*. На территории восточной части материкового Китая, на Тайване и Хайнане в начале XX века был описан особый подвид *M. m. formosanus*, который напоминал *M. m. lineatus* и никогда всерьез не изучался. С момента описания популяции черного коршуна на этих территориях подверглись сильному антропогенному прессингу и пережили резкое сокращение из-за интенсивного применения пестицидов в сельском хозяйстве. В настоящее время нет никаких данных, подтверждающих существование *M. m. formosanus*, как самостоятельной генетической ветви черного коршуна. Острова Японии населены *M. m. lineatus*, однако эта популяция существует достаточно изолированно от материковой и может отличаться от нее генетически. Ее возникновение представляет определенный интерес, поскольку маршруты передвижения этих птиц не выходят за пределы Японии, тогда как все материковые коршуны восточной Палеарктики совершают далекие сезонные миграции с севера на юг и обратно.

Ранее мы обнаружили, что подвиды Европы, Северной Азии и Индии имеют собственные гаплогруппы митохондриального гена цитохром В (*CytB*). Европейский и североазиатский подвиды образуют широкую зону интерградации от Западной Сибири и Казахстана до

Восточной Европы. Однако низкая вариабельность гена *CytB* не позволила обнаружить различия между популяциями Индии и Австралии. На этот раз мы проанализировали ген *CytB* вместе с геном субъединицы II NADH-дегидрогеназы (*ND2*) в популяциях черного коршуна северо-восточной Азии, Индии, Тайваня, Японии и Австралии. Мы обнаружили, что японские коршуны несут только одну из двух основных гаплогрупп азиатских *M. m. lineatus*, что свидетельствует о недавней изоляции от материка. Популяции Индии и Австралии оказались разными, но генетически близкими группами, что говорит об относительно недавнем их разделении.

Среди гнездящихся коршунов Тайваня мы обнаружили как носителей митохондриальных гаплогрупп *M. m. lineatus*, так и носителей новой гаплогруппы, которая до сих пор не встречалась в других популяциях. Эта группа могла быть унаследована от подвида *M. m. formosanus*, ранее обитавшего в этом районе. Вероятно, недавний спад численности местной популяции, а также расселение *M. m. lineatus* привели к тому, что в настоящее время Тайвань населяют потомки обоих подвидов. Кроме того, резкое снижение численности коршуна в 1970-е годы, по-видимому, привело к формированию двух изолированных, генетически различных популяций черного коршуна на юге и севере Тайваня.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 23-24-00185.

## Роль комплекса dREAM в регуляции генов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*

Антошина П.А.<sup>1</sup>, Лактионов П.П.<sup>1</sup>, Максимов Д.А.<sup>1</sup>, Белякин С.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Одним из наиболее важных транскрипционных регуляторов в клетках зародышевого пути самцов дрозофилы является комплекс tMAC (testis-specific meiotic arrest complex), который необходим исключительно для активации набора семенник-специфичных генов. Интересно отметить, что tMAC является аналогом комплекса dREAM (*Drosophila* Rb, E2F and Myb-interacting proteins), который активен в широком спектре клеточных типов и в преимущественно известен как транскрипционный репрессор. В состав этих комплексов входят общие субъединицы Mir40 и Caf1/p55, а также паралогичные компоненты: Tomb/Mir120, Aly/Mir130 и Wuc/dLin52. При этом функции dREAM изучали только в соматических клетках, что не оставляло без ответа вопросы о возможном взаимодействии двух комплексов-аналогов и о влиянии dREAM на экспрессию генов в половых клетках.

В более раннем исследовании было проведено DamID картирование белка Mir40, продемонстрировавшее значительную динамику его локализации в процессе сперматогенеза. Учитывая, что Mir40 – это общий компонент tMAC и dREAM, было высказано предположение, что перераспределение этой субъединицы отображает взаимодействие между комплексами.

Чтобы установить конкретный вклад комплекса dREAM в регуляцию экспрессии генов в половых клетках самцов дрозофилы, было проведено DamID картирование сайтов локализации Mir130 (субъединица dREAM), позволившее разделить мишени двух рассматриваемых комплексов. Также при помощи системы редактирования генома CRISPR-Cas9 был получен нокаут гена *mip130*, что позволило выявить изменения транскриптома половых клеток на фоне отсутствия комплекса dREAM и установить его вклад в регуляцию экспрессии.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на своё сходство, комплексы tMAC и dREAM не взаимодействуют и обнаруженная динамика локализации их общей субъединицы Mir40 связана с привлечением tMAC к его мишеням, а не перераспределением dREAM. Анализ данных транскриптома указывает, что активность dREAM направлена на подавление экспрессии яичник-специфичных генов, что осуществляется как за счёт прямого воздействия, так и за счёт вторичных регуляторов.

## **Критичная роль неструктурированного N-концевого участка белка MSL1 в функционировании комплекса дозовой компенсации *Drosophila melanogaster***

**Бабоша В.А., Георгиев П.Г., Максименко О.Г.**

Институт биологии гена РАН, г. Москва

Комплекс дозовой компенсации (КДК) плодовой мушки *Drosophila melanogaster* специфично связывается с X-хромосомой самцов и повышает уровень экспрессии генов. В состав комплекса входят пять белков (MSL1, MSL2, MSL3, MOF и MLE) и две длинные некодирующие РНК (roX1 и roX2). Специфичное связывание КДК с X-хромосомой самцов является уникальной моделью для исследования механизмов сборки сложных белковых комплексов и их рекрутирования на определенные регуляторные элементы.

На N-конце белка MSL1 находится альфа-спиральный домен (96-178 а.о.), который формирует гомодимер и взаимодействует с MSL2, образуя центральную часть КДК, способную самостоятельно узнавать определенные сайты на X-хромосоме, названные Высокоафинными Сайтами Связывания (ВСС).

Нами была исследована функциональная роль неструктурированного N-концевого участка белка MSL1 (1-85 а.о.). Были получены трансгенные линии дрозофилы, которые экспрессируют мутантные варианты белка MSL1 с делециями 1-15 а.о., 15-20 а.о., 24-39 а.о., 41-65 а.о., 66-85 а.о. Неожиданно оказалось, что делеция 1-15 а.о. приводит к дестабилизации белка MSL1, поэтому была сделана трансгенная линия, которая экспрессирует мутантный вариант MSL1 («GS») с заменой 5 аминокислот: (K3S R4S F5G K6S W7G). Было показано, что делеция 41-65 а.о. и GS не влияют на стабильность белка MSL1, но приводят к почти полной потере связывания MSL-комплекса с X-хромосомой. В настоящее время мы исследуем роль этих районов во взаимодействии с некодирующей РНК roX, которое, вероятно, является ключевым в сборке КДК и его специфичной ассоциации с X-хромосомой. Одновременно нами было показано, что 66-85 а.о. и 1-15 а.о. белка MSL1 взаимодействуют с большой группой ДНК-связывающих транскрипционных факторов с кластерами цинковых пальцев C2H2-типа. Функциональная роль этих участков белка MSL1 в настоящее время исследуется и результаты будут представлены в докладе.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 21-14-00211 и субсидии Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1661.



## **РВАФ комплекс млекопитающих специфически распознает H3K14ac с помощью DPF домена субъединицы PHF10-P**

**Байрамова Д.О.<sup>1</sup>, Сошникова Н.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины института молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, г. Москва  
bayramova.daria@gmail.com (Б.Д.О.), so2615nat@gmail.com (С.Н.В.)

Комплекс РВАФ – это член семейства SWI/SNF – ремоделеров хроматина, субъединичный состав которого варьируется, определяя специфичность связывания комплекса с определенным типом хроматина и, соответственно, специфичность ремоделируемых генов. Одной из специфичных субъединиц РВАФ является PHF10. Транскрипты *PHF10* убиквитарно экспрессируются, начиная с гаструляции, а его нокаут приводит к гибели организма на ранних эмбриональных стадиях. Существует 2 типа изоформ белка PHF10: Р-изоформы (содержат домен DPF на С-конце) и S-изоформы (не содержат DPF). Изоформы альтернативно включаются в РВАФ комплекс, по-разному влияя на специфичность РВАФ, а смена одной изоформы на другую в комплексе сопровождает процесс дифференцировки клетки и изменение транскрипционных паттернов. DPF домен ранее был описан у пяти гомологов PHF10 как домен, связывающий H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac/cr, H4 и H4K5ac/K8ac/K12ac/K16ac модификации гистонов.

На основании моделирования по гомологии, выполненного ранее нашей группой, было выяснено, что PHF10-DPF имеет характерные структурные особенности, отличающие его от других DPF. В соответствии с этим была выдвинута гипотеза, что DPF домен PHF10 должен связывать H3K14ac и активно «выталкивать» H3K4me3 модификации гистонов. H3K14ac является маркёром хроматина промоторов и тел генов, находящихся на стадии активации транскрипции; H3K4me3 же обнаруживается на промоторах константно транскрибирующихся генов.

Мы проверили данную гипотезу *in vitro*. Экспрессировали человеческий вариант DPF в бактериальной системе и очистили его с помощью аффинной, ион-обменной хроматографий и гель-фильтрации. Далее мы измерили теплоту связывания DPF и хвостов гистонов методом изотермической титрационной калориметрии с последующим вычислением термодинамических параметров, включая константу диссоциации  $K_D$ . Мы протестировали N-концевые участки гистонов H3 и H4, по-разному модифицированные и не модифицированные, и обнаружили, что домен DPF не связывает ни один из вариантов H4: H4, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac. А среди модификаций N-конца гистона H3

единственным вариантом, с которым DPF обнаружил связывание, оказался H3K14ac, причём  $K_D$  этого связывания оказалась меньше констант диссоциации для DPF-H3K14ac остальных пяти белков млекопитающих, содержащих DPF-домен. DPF слабо связывал H3 ( $K_D$  порядка  $10^{-3}$  М) и не связывал H3K4me, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac и H3K9me3. Эксперимент с двойными модификациями H3 H3K4meK14ac и H3K4me3K14ac также не показал наличия взаимодействия этих пептидов с DPF.

Таким образом, DPF домен RHF10 связывает исключительно H3K14ac и избегает H3K4me/me2/me3 – добавление даже одной метильной группы к 4-му лизину в дополнение к уже имеющемуся ацетилированию 14-го лизина полностью нарушает взаимодействие DPF-H3K14ac. Мы считаем, что RHF10-DPF является селективным эпигенетическим «ридером» H3K14ac. Это свойство домена специфичной субъединицы комплекса RBAF способно определять поведение всего комплекса RBAF, в том числе в процессе дифференцировки клетки за счёт участия RBAF в активационной или базальной транскрипции.

Исследование выполнено за счёт гранта РФФИ № 21-14-00258.

## **Хромосомные перестройки и видообразование: слепушонки подрода *Ellobius***

**Баклушинская И.Ю.**

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

Вопрос о том, инициируют ли хромосомные перестройки дивергенцию, может быть решен при изучении модельных групп с широкой хромосомной изменчивостью, примером которых являются слепушонки. Эволюционная судьба хромосомных перестроек определяется тем, в какой момент жизненного цикла и в каких клетках организма они произошли. Вероятность наследования выше у перестроек, возникающих при первых эмбриональных делениях, в зародышевой линии и в ходе гаметогенеза, который радикально различается у самцов и самок млекопитающих. Для мужского мейоза характерен более строгий контроль качества гамет, тогда как женский мейоз оказывается более толерантным к перестройкам, и может обеспечивать неравновесное распределение измененных и нативных хромосом вследствие перераспределения генетического материала при формировании полярных телец. Наиболее вероятно наследование хромосомных перестроек, возникающих в мейозе I у самцов и в мейозе II у самок, последнее деление которого следует за оплодотворением.

Возможность возникновения хромосомных перестроек в ходе гаметогенеза снимает наиболее острые вопросы, которые возникают при обсуждении хромосомного видообразования, а именно, как распространяются и закрепляются перестройки в популяции. Большое количество измененных гамет в сперматогенезе или плодовитое потомство от одной самки в случае изменений в оогенезе позволяют перестройкам закрепиться в популяции за несколько поколений. Но механизмы возникновения перестроек, в частности, Робертсоновских транслокаций (Rbs) неясны. Обширный материал из природных популяций слепушонок разных видов и длительных экспериментов по их гибридизации позволил выявить некоторые закономерности. В природных популяциях восточной слепушонки *Ellobius tancrei* описаны различные формы с частичной (монобрахиальной) гомологией Rbs, имеющие собственный ареал и, фактически, находящиеся на ранних стадиях видообразования (Romanenko et al., 2019). Другие варианты Rbs характерны для алайской слепушонки *E. alaicus*, возможна также гибридизация между этими видами в природе (Bakloushinskaya et al., 2019; Tambovtseva et al., 2022). Обнаружение контактов негомологичных хромосом в профазе мейоза I у самцов *E. alaicus* предоставило возможность переосмыслить творческую роль мейоза и предложить гипотезу механизма формирования Rbs, в которой именно такие контакты

могут создавать Rbs (Matveevsky et al., 2020a, 2022). Подземный образ жизни и особенности социальной структуры слепушонок обеспечивают быстрое закрепление перестроек в природной популяции. В эксперименте показано, что при гибридизации разнохромосомных форм у *E. tancrei* неравновесное наследование перестроек (мейотический драйв) приводит к формированию новых кариотипов (Tambovtseva et al., 2019, Тамбовцева, 2023). Изменение положения хромосом в ядре у близких видов с одинаковым числом хромосом (*E. tancrei* и обыкновенная слепушонка *E. talpinus*) оказалось тем событием, которое обеспечило полную репродуктивную изоляцию этих видов (Matveevsky et al., 2020b) – у межвидовых экспериментальных гибридов в пахитене нарушения архитектоники ядра приводили к дефектам спаривания, незавершенному синапсису гомологичных хромосом, снижению уровню рекомбинации и растягиванию центромер, что в комплексе привело к стерильности гибридов.

Три вида-двойника слепушонок подрода *Ellobius* демонстрируют широкий спектр эволюционных преобразований хромосомных наборов, что позволяет использовать данную группу для изучения полного цикла хромосомного видообразования: от возникновения перестроек, их наследования (гаметогенез), закрепления в популяциях и до диверсификации форм.

Исследование выполнено в рамках ГЗ №0088-2021-0019.

## **Архитектурные белки хроматина когезин и конденсины участвуют в поддержании стабильности генома**

**Баттулин Н., Смирнов А., Юнусова А., Хабарова А., Рыжкова А., Кабирова Э.**

ИЦиГ СО РАН

Архитектурные белки хроматина играют ключевую роль в функционировании генома. Основные архитектурные белки (когезин и конденсины) осуществляют важную структурную функцию: организуют и упорядочивают петли хроматина. В последние годы значительное внимание уделяется исследованиям роли когезина в поддержании глобальной 3D архитектуры хроматина в ядре, формировании топологически ассоциированных доменов генома. Однако петлевая структура хроматина влияет не только на “главную функцию генома” — транскрипцию генов, но также на такой фундаментальный параметр клетки, как механические свойства ядра. К сожалению, взаимосвязи молекулярных механизмов, обеспечивающих поддержание архитектуры генома с реализацией биомеханических свойств хроматина и ядра, во многом остаются неизвестными. Между тем, это ключевой параметр, влияющий на стабильность генома и защиту ДНК от повреждений. Мы создали клеточные линии с индуцируемой ауксином деградацией когезина и конденсинов. Такие клетки обеспечивают уникальную возможность исследовать последствия потери функции жизненно важного для клетки белка методами геномики, микроскопии и физическими методами. Использование полученных клеток позволит комплексно оценить вклад архитектурных белков хроматина в поддержание стабильности генома.

Проект поддержан грантом РФФ 23-74-00055.

## **Создание эффективной системы направленной репрессии генов с использованием химерных белков dCas12-REPRESSOR на модели клеток *S2 Drosophila melanogaster***

**Баттулина Н.В., Моторина Д.М.**

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

*D. melanogaster* является удобным модельным объектом для изучения скоординированной работы генов в различных эволюционно-консервативных процессах. Транзистентное подавление экспрессии позволяет исследовать функции жизненно важных генов, а также специфичность работы генов на разных стадиях развития. Подбор эффективной регулируемой системы репрессии, которая в дальнейшем может быть использована для подавления транскрипции нескольких генов является актуальной задачей.

Распространенный метод РНК-интерференция (РНКи) зачастую недостаточно эффективен и приводит лишь к незначительному снижению количества транскриптов интересующего гена, что в итоге снижает количество белка лишь в 1,5-2 раза и не имеет значительного эффекта либо фенотипического проявления. Также у метода РНКи есть недостатки, связанные с неспецифическими эффектами. Технология CRISPR/Cas гораздо менее подвержена системным нецелевым эффектам [1]. Cas-нуклеазы Cas9 и Cas12, компоненты антифаговой защиты прокариот, в нативном виде используют для направленного связывания с ДНК и редактирования генов, а белки без ДНКазной активности (dCas9/dCas12) могут выступать репрессорами транскрипции, физически блокируя продвижение РНК-полимераз. Для усиления эффекта данные белки дополняли репрессорным доменом KRAB (Krüppel associated box) или модификаторами гистонов (HDAC, SETDB1). Однако эффективность данных систем репрессии может сильно варьировать от 2-х до 18-кратного снижения экспрессии целевых генов в различных организмах [2,3].

Для усиления репрессорной активности белка dCas12 мы сконструировали три химерных белка, содержащих дополнительно один из следующих белков: Polycomb (Pc), Heterochromatin protein 1 (HP1) или линкерный гистон H1. Мы используем одновременно несколько направляющих РНК к разным регуляторным участкам гена, расположенным до и после старта инициации транскрипции ( $\pm 150$  п.о.), а также в области терминации транскрипции. Путем привлечения белка Pc к регуляторным районам интересующих генов мы надеемся инициировать сборку репрессорного комплекса PRC1 в целевых районах, что приведет к компактизации хроматина и к подавлению транскрипции целевых генов. Белок HP1 участвует в репрессорном комплексе PRC2, также задействованном в

компактизации хроматина [4]. Гистон H1 участвует в образовании хроматина более высокого порядка, что делает хроматин недоступным для транскрипционной машины [5].

Конструкции, с которых будет нарабатываться химерный белок dCas12-репрессор (Pc/HP1/ H1) и направляющие РНК, будут протестированы на эффективность репрессии целевых генов в культивируемых клетках S2 дрозоды. В качестве мишеней были выбраны гены *MBD-R2* и *Novel nucleolar protein 3 (Non3)*, исследуемые в лаборатории клеточного деления ИМКБ СО РАН.

1. Smith I, Greenside PG, Natoli T, Lahr DL, Wadden D, Tirosh I, et al. (2017) Evaluation of RNAi and CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map. *PLoS Biol* 15(11): e2003213. <https://doi.org/10.1371/>
2. Gilbert, L.A.; Larson, M.H.; Morsut, L.; Liu, Z.; Brar, G.A.; Torres, S.E.; Stern-Ginossar, N.; Brandman, O.; Whitehead, E.H.; Doudna, J.A.; et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* 2013, 154, 442–451, doi:10.1016/j.cell.2013.06.044.
3. Liu Y., Han J., Chen Z., Wu H., Dong H. and Nie G. (2017) Engineering cell signaling using tunable CRISPR–Cpf1-based transcription factors. *Nat. Commun.* 8, 2095 10.1038/s41467-017-02265-x
4. Danzer, J.R.; Wallrath, L.L. Mechanisms of HP1-Mediated Gene Silencing in *Drosophila*. *Development* 2004, 131, 3571–3580, doi:10.1242/dev.01223.
5. Chen, P.; Zhao, J.; Wang, Y.; Wang, M.; Long, H.; Liang, D.; Huang, L.; Wen, Z.; Li, W.; Li, X.; et al. Corrigendum: H3.3 Actively Marks Enhancers and Primes Gene Transcription via Opening Higher-Ordered Chromatin. *Genes Dev.* 2021, 35, 782–782.

**Studies of constitutive heterochromatin and comparative chromosome maps in martens from the genera *Martes* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia): using bioinformatics' analysis and methods of molecular cytogenetics**

**Изучение конститутивного гетерохроматина и сравнительные хромосомные карты куниц рода *Martes* (Mustelidae, Carnivora, Mammalia): использование биоинформатического анализа и методов молекулярной цитогенетики**

**Беклемишева В.Р., Лемская Н.А., Прокопов Д.Ю., Перельман П.Л., Романенко С.А., Проскуракова А.А., Сердюкова Н.А., Уткин Я.А., Графодатский А.С.**

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Конститутивный гетерохроматин (КГ) остается плотно упакованным основную часть клеточного цикла, содержит тандемно расположенные повторенные последовательности и обычно локализован в прицентромерных, прителомерных, реже в интерстициальных участках хромосом. Тандемные повторы составляют фракцию сателлитной ДНК. На заре цитогенетической эры эта часть генома считалась балластной, но на современном этапе развития биологии установлено, что с КГ связаны различные клеточные процессы, в том числе хромосомная сегрегация, конформация хроматина, защита концов хромосом. Цитогенетические данные свидетельствуют о том, что блоки гетерохроматина могут быть горячими точками при хромосомных перестройках.

В зависимости от размера мономера различают микро-, мини-, миди- и макросателлитные последовательности ДНК. Известно, что макросателлиты могут содержать как некодирующие, так и кодирующие последовательности и регулировать организацию хроматина в ядре. Макросателлитная ДНК изучена больше у человека, а у других видов млекопитающих практически не исследована.

При секвенировании геномов основное внимание уделяется сборке кодирующих последовательностей, а повторенные фракции ДНК ускользают из поля зрения. При этом цитогенетические методы (С-окраска, CDAG-метод) надежно выявляют блоки КГ. В нашем исследовании мы совместили биоинформатические и молекулярно-цитогенетические подходы для изучения тандемно повторенной ДНК у четырех видов куниц рода *Martes*: (каменной куницы (*M. foina*,  $2n=38$ ), соболя (*M. zibellina*,  $2n=38$ ), лесной куницы (*M. martes*,  $2n=38$ ) и харзы (*M. flavigula*,  $2n=40$ )). Используя прочтения генома каменной куницы из базы данных NCBI SRA (SRX8108270), мы впервые



идентифицировали 11 наиболее представленных макросателлитов и локализовали их на хромосомах куниц методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Также с помощью молекулярной цитогенетики выявлены кластеры рибосомных генов и теломерных последовательностей у четырех видов куниц.

Чтобы сравнивать накопление повторенных последовательностей в гомологичных синтетических группах четырех видов куниц, мы опирались на данные сравнительного пэйнтинга. С использованием хромосомных библиотек каменной куницы впервые получены хромосомные карты для соболя и лесной куницы. Кроме того, с использованием пэйнтинг-проб проб домашней собаки впервые построена сравнительная карта хромосом харзы, подтверждающая наличие одного разрыва и по крайней мере двух инверсий, специфичных для этого вида.

Для выявления блоков КГ и особенностей нуклеотидного состава гетерохроматиновых блоков использовали метод CDAG, позволяющий надежно идентифицировать каждую пару хромосом. Полученные хромосомные карты с информацией о расположении 11 вариантов макросателлитных последовательностей показывают, что выявленные биоинформатическими методами последовательности не метят некоторые прицентромерные и теломерные блоки КГ. Следовательно, полный спектр повторенной ДНК, участвующий в формировании гетерохроматина у изученных видов, еще предстоит узнать. Полученные данные подтверждают консерватизм эухроматиновой части геномов и свидетельствуют о том, что макросателлитная ДНК играет существенную роль в обеспечении межвидовых различий гомологичных хромосом у куниц рода *Martes*.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00034-П.

## Гибридная стерильность самцов серых полевок рода *Microtus*: цитогенетический и транскриптомный анализ

Бикчурина Т.И.<sup>1</sup>, Голенищев Ф.Н.<sup>3</sup>, Убогоева Л.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>3</sup> Лаборатория Териологии, Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

На ранних стадиях видообразования увеличение генетической дивергенции может приводить к формированию репродуктивной изоляции, одним из ключевых механизмов которой у млекопитающих является гибридная стерильность. Близкородственные виды полевок *Microtus rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* (Rodentia; Arvicolinae) являются хорошей моделью для изучения ранних этапов видообразования: дивергенция между этими видами произошла менее чем 0.2 млн лет назад и их кариотипы не отличаются по крупным хромосомным перестройкам. Для определения цитологических механизмов формирования гибридной стерильности между этими видами мы провели гистологический и цитогенетический анализ особенностей сперматогенеза и мейоза половозрелых самцов межвидовых гибридов, а также родительских видов. Для выявления генетических механизмов, участвующих в формировании репродуктивной изоляции на ранних стадиях видообразования у этих таксонов, мы провели секвенирование транскриптома семенников с последующим поиском дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), ассоциированных со стерильностью гибридов.

Впервые был собран *de novo* транскриптом данных видов полевок. Для анализа функционального обогащения ДЭГ мы использовали онлайн ресурсы IDEP.95 и ShinyGO. Мы идентифицировали 11609 ДЭГ (уровни экспрессии различаются более чем в 2 раза,  $\text{Padj} < 0,05$ ), ассоциированных со стерильным фенотипом, из них 6,9% отражают вариацию в стадиях остановки сперматогенеза между гибридами прямого и реципрокного направления скрещивания. Сравнение семенников гибридов *M. mystacinus* x *M. rossiaemeridionalis* и *M. rossiaemeridionalis* x *M. mystacinus* с родительскими видами выявило 9958 ДЭГ (5011 генов с повышенной экспрессией и 5075 с пониженной) и 10674 (5142 генов с повышенной экспрессией и 5624 с пониженной), соответственно, что указывает на тенденцию к подавлению экспрессии генов у гибридов. После интеграции данных гистологического и цитогенетического анализа был составлен список генов, ассоциированных со стерильностью у самцов гибридов. Таким образом, мы выявили гены-кандидаты, нарушение регуляции которых вносит вклад в формирование гибридной стерильности.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации #2019-0546 (FSUS-2020-0040).

## Ревизия классических представлений о капсуле кариосферы

Боголюбов Д.С.

Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

Кариосфера (кариосома) — специфический гетерохроматиновый компартмент половых клеток, отражающий особое состояние хромосомного аппарата на стадии диплотены мейоза. По определению (Bogolyubov, 2018), это эволюционно консервативная структура, образованная конденсированными бивалентами, ассоциированными друг с другом в ограниченном участке крупного ядра (в ооцитах, для которых наиболее характерна стадия кариосферы, — зародышевого пузырька, GV). 100 лет назад немецкий зоолог Карл Вагнер (Wagner, 1923) предположил, что в ооцитах лягушки *Rana temporaria* сформированная кариосфера окружена волокнистым материалом (faserigen Substanz), названным капсулой. Спустя более полувека идея Вагнера получила развитие в ультраструктурном исследовании (Gruzova, Parfenov, 1977), в котором в GV *R. temporaria* были описаны скопления 40–50-нанометровых филаментов (экстрахромосомных тяжей, strands, ЭХТ-St), объединяющих 65–75-нанометровые *annuli*, по морфологии неотличимые от поровых комплексов ядерной оболочки. Эти ЭХТ-St априори стали рассматривать как «волокнистый компонент» капсулы Вагнера — капсулы кариосферы. Согласно сложившимся представлениям, капсула кариосферы, несмотря на немембранную природу, представляет «реминисценцию» ядерной оболочки, формируя особый компартмент, изолирующий хромосомы от остальной части GV.

При анализе серийных ультратонких срезах мы не обнаружили какого-либо замкнутого экстрахромосомного компартмента в GV *R. temporaria*. Кроме того, LEMD-белки (интегральные белки внутренней ядерной мембраны) и BAF/BANF1 (посредник между хроматином и ядерной оболочкой благодаря взаимодействиям с ДНК, ламинами и LEMD-белками) присутствуют в нуклеоплазме, но не в самих ЭХТ-St, которые, кроме того, не содержат ламина. Наконец, несмотря на то что GV заполнен густой сетью актиновых филаментов (Parfenov et al., 1995), сами ЭХТ-St актина не содержат; однако концентрация актина в участках расположения ЭХТ-St действительно более чем в 2.5 раза превышает таковую в участках GV за пределами кариосферы, что создает иллюзию присутствия «капсулы» на уровне светооптического (флуоресцентном) уровне (Ilicheva et al., 2018). Единственным из исследованных белков, продемонстрировавшим четкую локализацию в ЭХТ-St, явился SMC1 — один из ключевых белков когезинового комплекса. Таким образом, ЭХТ-St могут морфологически отражать избыток белков, вовлеченных в формирование кариосферы, в условиях гигантского GV.

Что касается характерных annuli, эти структуры не продемонстрировали заметной реакции с антителами к двум репрезентативным нуклеопоринам внутреннего кольца ядерных пор — Nup35 и Nup93; эти нуклеопорины представлены в нуклеоплазме и даже обнаруживаются в специфических биомолекулярных конденсатах, хотя и не относятся к группе FG-нуклеопоринов, способных к фазовому переходу.

Таким образом, традиционные представления о существовании в GV *R. temporaria* стабильно-структурного компартмента — капсулы кариосферы — оказались несколько преувеличенными. ЭХТ-St не образуют структурного скаффолда для хромосом, собранных в кариосферу; annuli по составу вряд ли можно считать «автономными» поровыми комплексами; сама же кариосфера *R. temporaria* представляет собой кариосому — «простой» клубок конденсированных бивалентов (post-lampbrushes). Однако капсула кариосферы — как незамкнутый, но всё же структурный каркас для хромосом, мажорным компонентом которого является F-актин, — действительно существует в природе, но более характерна для ядра ооцитов некоторых насекомых, а не лягушки.

Литература:

Bogolyubov, D.S., *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2018, vol. 337, pp. 1–48.

Gruzova, M.N., and Parfenov, V.N., *J. Cell Sci.*, 1977, vol. 28, pp. 1–13.

Пичева, N., et al., *Nucleus*, 2018, vol. 9, pp. 516–529

Parfenov, V.N., et al., *Exp. Cell Res.*, 1995, vol. 217, pp. 385–394.

Wagner, K., *Arch. Zellforsch.*, 1923, Bd. 17, S. 1–44

Исследование выполнено за счет гранта РНФ, проект № 22-24-00380.

## **Масштабные нарушения метилирования на фоне анеуплоидии в плаценте человека**

**Васильев С.А.<sup>1,\*</sup>, Деменева В.В.<sup>1</sup>, Васильева О.Ю.<sup>1</sup>, Толмачева Е.Н.<sup>1</sup>, Зуев А.С.<sup>1</sup>,  
Шевцов Д.Г.<sup>1,2</sup>, Филатова С.А.<sup>1,2</sup>, Ушакова А.С.<sup>1,2</sup>, Никитина Т.В.<sup>1</sup>, Саженова Е.А.<sup>1</sup>,  
Лебедев И.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр, г. Томск

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Ранняя эмбриональная гибель является наиболее тяжелым проявлением генетических нарушений, среди которых наибольшими по размеру являются нарушения числа хромосом – анеуплоидия. Действительно, от 50 до 60 % спонтанных абортусов первого триместра беременности имеют анеуплоидии по различным хромосомам. Тяжесть фенотипа ранней эмбриональной гибели обуславливает возможность существования в этом периоде и масштабных эпигенетических нарушений. Действительно, значительные нарушения метилома выявлены в плаценте при различных патологиях беременности на поздних сроках: преэклампсии, задержке роста плода, гестационном диабете.

Нами был проведен анализ нарушений метилирования в хорионе спонтанных абортусов первого триместра беременности с помощью нескольких методов: анализа уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования в хорионе 286 спонтанных и 46 медицинских абортусов, широкогеномного анализа метилирования с помощью бисульфитного массового параллельного секвенирования ограниченного набора локусов (RRBS) в 8 эмбрионах с моносомией X и 8 эмбрионах с нормальным кариотипом и 8 медицинских абортусах.

Уровень метилирования LINE-1, часто используемый для характеристики среднего уровня метилирования по геному, был значимо повышен в группе спонтанных абортусов с трисомией 16 и моносомией X по сравнению с медицинскими абортусами. Спонтанные абортусы с нормальным кариотипом имели значительно большую вариацию уровня метилирования LINE-1 по сравнению с медицинскими абортусами, что было связано с повышенным уровнем метилирования LINE-1 у части спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. Кроме того, была обнаружена значимая корреляция уровня метилирования LINE-1 у 22 пар спонтанных абортусов из одних и тех же семей ( $R=0,43$ ,  $p=0,048$ ), что указывает на влияние родительских факторов на этот параметр.

С помощью RRBS показаны масштабные нарушения метилома в хорионе спонтанных абортусов первого триместра как с анеуплоидным, так и с нормальным кариотипом, ведущими из которых являются нарушения метилирования генов морфогенеза плаценты и генов ремоделирования спиральных артерий. Это может объяснять гибель части эмбрионов в период первого триместра, когда происходит ремоделирование спиральных артерий матки, благодаря которому обеспечивается дальнейший быстрый рост и развитие эмбриона. Часть из генов с нарушениями метилирования у спонтанных абортусов, по данным литературы имела аномальный уровень метилирования и при других патологиях беременности: преэклампсии, задержке роста плода, гестационном диабете.

Полученные результаты указывают на то, что нарушения метилирования, наблюдаемые при различных патологиях беременности, по-видимому, являются частными случаями более общих нарушений метилома плаценты, тяжесть фенотипического проявления которых может варьироваться от гибели эмбриона на ранних стадиях развития до преждевременных родов. Пять из пятнадцати генов с наибольшим числом ДМС у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом были импринтированными, что указывает на то, что наблюдаемые нашей группой ранее множественные аномалии импринтинга в хорионе спонтанных абортусов также являются частным проявлением более общих нарушений метилома.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 23-15-00341.

## Аномальное метилирование генов ремоделирования спиральных артерий на фоне анеуплоидии в плаценте человека

Васильева О.Ю.<sup>1</sup>, Толмачева Е.Н.<sup>1</sup>, Деменева В.В.<sup>1</sup>, Дмитриев А.Э.<sup>1,2</sup>,  
Даркова Я.А.<sup>1,2</sup>, Никитина Т.В.<sup>1</sup>, Саженова Е.А.<sup>1</sup>, Лебедев И.Н.<sup>1</sup>, Васильев С.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр, г. Томск

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

У человека анеуплоидия несовместима с рождением здоровых детей и в основном приводит к гибели эмбрионов на ранних стадиях развития в первом триместре беременности. Большая часть анеуплоидных эмбрионов гибнет на стадии имплантации, а следующий пик эмбриональной летальности отмечается около 8-9 недели беременности. В этом периоде происходит важнейший процесс – ремоделирование спиральных артерий, заключающееся в миграции клеток трофобласта в спиральные артерии матери, замещение их эндотелия и ремоделирования для обеспечения стабильного питания эмбриона и снабжения кислородом. Это комплексный процесс, зависящий от множества факторов как со стороны эмбриона, так и со стороны матери. Наши предварительные результаты показывают, что у спонтанных абортусов первого триместра с анеуплоидным кариотипом наблюдаются масштабные нарушения метилирования, в том числе генов, участвующих в ремоделировании спиральных артерий. Целью настоящего исследования является анализ частоты аномального метилирования генов ремоделирования спиральных артерий среди спонтанных абортусов первого триместра беременности с анеуплоидией и нормальным кариотипом.

Нами был проведен анализ уровня метилирования 7 генов (*ADORA2B*, *NPR3*, *PRDM1*, *PSG2*, *PHTLH*, *SV2C*, *TICAM2*), участвующих в ремоделировании спиральных артерий, в хорионе спонтанных абортусов с наиболее частыми анеуплоидиями (трисомия 16 (n=14) и моносомия X (n=15)), с нормальным кариотипом (n=33) и в контрольной группе медицинских абортусов (n=10). Анализ проводился с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. В группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был дополнительно проведен анализ уровня метилирования ретротранспозона LINE-1, благодаря которому группа была подразделена на подгруппы с нормальным (n=19) и повышенным (n=14) уровнями метилирования LINE-1.

В группе спонтанных абортусов с трисомией 16 был значимо повышен уровень метилирования генов *PRDM1* и *PSG2* по сравнению с медицинскими абортусами (p=0,0004 и p=0,0015, соответственно). В группе спонтанных абортусов с нормальным

кариотипом и повышенным уровнем метилирования LINE-1 был также значимо повышен уровень метилирования генов *ADORA2B*, *PRDMI* и *PSG2* по сравнению с медицинскими абортусами ( $p=0,02$ ,  $p=0,01$  и  $p=0,0005$ , соответственно). Для остальных генов значимых отличий между группами абортусов обнаружено не было. Вариабельность уровней метилирования в группах спонтанных абортусов была значительно большей по сравнению с медицинскими абортусами, что указывает на наличие аномального метилирования у части спонтанных абортусов. Аномалии метилирования генов *ADORA2B*, *PRDMI* и *PSG2* встречались у более 27%, 40% и 35% спонтанных абортусов, соответственно. При этом 73% (45/62) всех спонтанных абортусов имели аномалии метилирования хотя бы одного из 7 исследованных генов, а в группах спонтанных абортусов с трисомией 16 и нормальным кариотипом с повышенным уровнем метилирования LINE-1 все абортусы имели аномалии метилирования хотя бы по одному из исследованных генов, а более половины абортусов – по двум и более генам (71% и 57%, соответственно).

Ген *PRDMI* является ключевым регулятором терминальной дифференцировки гигантских клеток трофобласта, замещающих собой эндотелий спиральных артерий матери. Ген *ADORA2B* также связан с ремоделированием спиральных артерий, а его гиперметилирование связано с нарушением развития плаценты, задержкой роста плода и развитием преэклампсии. Ген *PSG2* (DCN) кодирует белок декорин (специфичный для беременности бета-1-гликопротеин 2), повышенный уровень экспрессии которого децидуальными клетками ассоциирован с нарушением пролиферации, инвазии трофобласта и преэклампсией.

Полученные результаты указывают на то, что повышенный уровень метилирования генов ремоделирования спиральных артерий может быть важным фактором, ассоциированным с гибелью эмбрионов человека в первом триместре беременности. Учитывая, что нарушения метилирования генов ремоделирования спиральных артерий фиксируются на фоне как анеуплоидии, так и нормального кариотипа, возможно, что масштабные нарушения метилирования предшествуют возникновению анеуплоидии.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 23-15-00341.



## **Организация промоторов генов домашнего хозяйства и развития в полном геноме дрозофилы**

**Ватолина Т.Ю.<sup>1</sup>, Левицкий В.Г.<sup>2</sup>, Цуканов А.В.<sup>2</sup>, Жимулев И.Ф.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Ранее была предложена модель 4х состояний хроматина, входящих в состав генома дрозофилы. Благодаря этой модели все гены генома дрозофилы были распределены в две группы - 6562 гена домашнего хозяйства (в литературе также используется термин "гены с повсеместной активностью"), промоторы которых расположены в участках хроматина типа аквамарин (междиски политенных интерфазных хромосом), а тело гена (экзоны и интроны) - в хроматине лазурит (в серых дисках политенных хромосом). Промоторы остальных 5664 генов расположены в остальной части генома, из них 3162 находятся в хроматине рубин, который соответствует черным дискам политенных хромосом.

В работе впервые исследовали организацию промоторов генов развития и генов, необходимых для обще клеточных функций - «домашнего хозяйства» клетки в полном геноме *Drosophila melanogaster*. С помощью биоинформатических методов показано, что гены, промоторы которых расположены в междисках политенных хромосом, обогащены функциями, связанными с обще клеточными процессами, тогда как остальная часть генов (примерно половина генома *Drosophila*) связана с узкоспециализированными процессами, происходящими в ходе развития. В промоторной зоне генов «домашнего хозяйства» обнаружено четыре специфичных мотива, которые могут присутствовать у разных генов индивидуально или в различных комбинациях. Существенная часть междисковых промоторов не содержит выявленных мотивов. Анализ, проведенный с помощью Gene Ontology показал, что для отдельных групп междисковых генов, содержащих в промоторах один мотив или их комбинации, характерно выполнение определенных функций.

Определены размеры участков, в которых локализуются промоторы генов домашнего хозяйства по размерам фрагмента аквамарин, который составляет в среднем 4 кб, при этом сайт инициации транскрипции расположен на расстоянии около 2 кб от границы фрагмента. С помощью метода поиска мотивов de novo (STREME) выявлено преобладание мотивов, локализованы участки мотивов и их качественная составляющая. Выявлены различные комбинации мотивов в промоторах междисковых генов. Существенная часть генов междисков не содержит этих мотивов. Для генов развития выявлена достоверная корреляция с мотивом ТАТА-бокс.

Существенная часть генов домашнего хозяйства (3712 генов) расположена в пределах одного междиска и считывается с противоположных цепей и в противоположных направлениях. В хроматине рубин таких генов значительно меньше (776 генов).

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00051-П и Программой фундаментальных научных исследований FWGZ-2021-0014.

## Сайт-специфическая интеграция последовательностей фагового происхождения в геномах *Sinorhizobium meliloti*

Владимирова М.Е., Мунтян В.С., Симаров Б.В., Румянчева М.Л.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Санкт-Петербург, Россия

Типичным примером чужеродной ДНК в геноме бактерии являются последовательности фагового происхождения (ПФП), которые у некоторых видов бактерий могут составлять порядка 20% генома. ПФП являются активными участниками горизонтального переноса генов, их интеграция/эксцизия имеет непосредственное отношение к адаптации бактерий к различным экологическим нишам. ПФП существенно различаются между собой: это могут быть профаги различной целостности (интактные или неполные), а также геномные острова. Цель данной работы была оценить пул ПФП и локусы их преимущественной интеграции в геномы штаммов клубеньковых бактерий люцерны, *Sinorhizobium meliloti*. В рамках работы проведен поиск ПФП в геномах 27-ми штаммов *S. meliloti* (геномы трех штаммов получены в рамках РФФ 17-16-01095) с использованием PHASTER и IslandViewer 4. Всего выявлено 313 PRS, при этом на один геном приходилось от 5 до 30 ПФП, и их распределение по репликонам (хромосоме, мегаплазмидам и несимбиотическим плазмидам) было равномерным ( $P > 0,05$ ). Установлено, что интеграция ПФП происходила только в 25 из 52-х выявленных генов тРНК на хромосоме, согласно анализу с использованием tRNAscan-SE v. 2.0. Выявлены факты наличия дополнительных генов, кодирующие тРНК Met, fMet, Thr, Ser, Leu, Lys или Val, в геномах изученных штаммов, которые были привнесены в составе ПФП (частота 0.28). Показано, что преимущественно интеграция ПФП происходила в гены тРНК<sup>Asn</sup>(GTT), тРНК<sup>Thr</sup>(GGT) и тРНК<sup>Lys</sup>(CTT), которые рассматривали как “горячие точки интеграции ПФП”. При этом, в последний из указанных генов преимущественно были интегрированы последовательности профагов, тогда как в два первых гена – геномные острова и профаги/геномные острова, соответственно. Анализ гена, кодирующего интегразу, который был выявлен у всех изученных ПФП показал, что они имели сходство с тирозиновыми интегразами фагов, относящихся к 25-ти семействам, а также к неохарактеризованным фагам. В результате проведенных исследований показано, что последовательности интеграз специфичны к сайтам интеграции ПФП, что представляет интерес при конструировании хозяйственно-ценных штаммов *S. meliloti* с заданными характеристиками.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ проект № 17-16-01095.

## Длина теломер в хромосомах красноухой черепахи *Trachemys scripta elegans*

Галкина С.А., Луговая А.А., Такки О.Д., Кулак М.М.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Теломеры представляют собой специализированные структуры на концах линейных хромосом, которые защищают концы хромосом от укорочения и слипания, тем самым сохраняя стабильность генома. Длина теломер может меняться: они могут укорачиваться из-за проблем репликации или репарации концов; теломерные последовательности могут удлиняться теломеразой и/или за счет рекомбинации (ALT, альтернативное удлинение теломер). У позвоночных теломерная последовательность (TTAGGG)<sub>n</sub> консервативна. В соматических клетках человека теломеры имеют длину от 0,5 до 15 т.п.н., причем самые длинные расположены на 1p, 2p, 3p, 4q, а самые короткие — на 17p, 19p, 20q.

Предполагается, что самые короткие теломеры можно рассматривать в качестве более надежного индикатора гомеостаза генома, чем средний размер теломер. Изменчивость длины теломер, ее значение и механизмы регуляции вызывают большой интерес во многих исследованиях, в первую очередь у человека и мыши, а также у других животных с большой продолжительностью жизни или необычным экологическим поведением.

В группе Reptilia, в которой есть виды-долгожители, явно недостаточно данных по ключевым вопросам биологии теломер. Немногочисленные исследования динамики теломер у рептилий показали, что возрастное укорочение этих последовательностей не является общей закономерностью в животном мире. У некоторых черепах и змей в течение жизни не происходит укорочения теломер. Положительная корреляция длины теломер и возраста была продемонстрирована при сравнении вылупившихся детенышей и годовалых особей долгоживущего водяного питона *Liasis fuscus*, т.е. за год длина теломер увеличилась! Динамика теломер может быть связана с полом, регенерацией тканей, сдвигами скорости метаболизма и динамикой популяции. Было показано, что длина теломер существенно различается в разных типах клеток крови у представителя Агамовых ящериц, и что эритроциты имеют более длинные теломеры, чем эпителиальные клетки у каретты.

В настоящей работе мы использовали флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) на препаратах хромосом и растянутого хроматина (fiber-FISH) для определения варибельности длины индивидуальных теломерных последовательностей у красноухой черепахи *Trachemys scripta elegans* (Testudinoidea, Emididae). Препараты хромосом и хроматина получали из первичной культуры фибробластов взрослых особей. На

метафазных хромосомах FISH с теломерным зондом дает сигналы на концах хромосом разной яркости, что может объясняться разной длиной теломер. Измерение размера вытянутых сигналов после проведения FISH на растянутом хроматине показало, что длина теломер в неиммortalизованных фибробластах красноухой черепахи варьирует от ~ 13 т.п.н. до ~ 111 т.п.о., что эквивалентно 2160-18500 копиям повтора TTAGGG. Это не противоречит данным по средней длине теломерной последовательности (50 т.п.н.) в эритроцитах *T. scripta*, полученным методом определения длины теломерных рестрикционных фрагментов. Мы пока не можем сказать, какие именно хромосомы имеют более длинные теломеры, но в качестве кандидатов можно рассматривать микрохромосомы с более яркими FISH-сигналами. Например, оказывается, что длинные теломеры составляют концы некоторых микрохромосом у цикадки *Sphenodon punctatus* (Rhynchoserphalia). Можно предположить, что длина теломер может быть критическим фактором, определяющим возможность стабильного переноса микрохромосом в ходе митотических делений, но в настоящее время неизвестно, имеет ли гетерогенность длины теломер какое-либо биологическое значение.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ №22-24-00538.

## Экспрессия генов CENH3 и пространственная организация родительских геномов в клетках аллополиплоидных гибридов злаков

Гацкая С.С.<sup>1</sup>, Евтушенко Е.В.<sup>1</sup>, Елисафенко Е.А.<sup>1,2</sup>, Вершинин А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Отдаленная гибридизация, т.е. скрещивание между разными видами и родами, в результате которой получаются аллополиплоидные гибриды, является важнейшим фактором в эволюции культурных злаков и широко используется в их селекции. При отдаленной гибридизации образующиеся гибриды переживают “геномный шок”. Наиболее ярким проявлением такого шока являются различные хромосомные нарушения, ведущие к стерильности гибридов. Скрещивания различных сортов пшеницы и ржи оказались наиболее успешными примерами отдаленной гибридизации с точки зрения получения воспроизводимого потомства и использования гибридов – тритикале (*Triticum x Secale*) – в селекции. Однако селекционно-генетический анализ генофонда тритикале показал, что у них недостаточно реализован генетический потенциал адаптивности ржи. Для полной реализации генетического потенциала родителей у гибридов первостепенное значение имеют такие факторы, как полное проявление функциональной активности обоих родительских геномов, которая обеспечивается отсутствием нарушений в пространственной организации хромосомных наборов.

В докладе будет представлен анализ различных комбинаций аллополиплоидных гибридов секалотритикум, в которых материнским растением является рожь, и тритикале. Показателем функциональной активности родительских геномов в гибридных растениях на различных стадиях развития являлись уровни экспрессии генов, кодирующих основные формы центромерного гистона CENH3. Исследована структурная организация регуляторных районов этих генов в родительских геномах. Сравнительный анализ интегральных характеристик центромер у родительских форм и гибридов не выявил отрицательного влияния отдаленной гибридизации. Не обнаружено влияние цитоплазмы на данный показатель, что указывает на способность центромер адаптироваться к новому генетическому окружению. Организация родительских геномов в гибридных клетках визуализирована методом геномной *in situ* гибридизации. Изображения получены в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>). Исследования проводятся при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19-14-00051-П) и Программы фундаментальных научных исследований FWGZ-2021-0014.

## Идентификация димеризующего домена белка Su(Hw) у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*

Головнин А.К., Мельникова Л.С., Молодина В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), г. Москва

Генетическая транскрипция, осуществляется в результате взаимодействия между промоторами и различными *cis*-регуляторными элементами, энхансерами либо сайленсерами. Активирующий эффект энхансеров, как и репрессирующий эффект сайленсеров, должен распространяться только на специфичные гены, т.е. должен быть ограничен независимым доменом транскрипции. Считается, что регуляторными элементами, изолирующими функциональные домены, являются взаимодействующие ДНК-белковые комплексы, названные инсуляторами. Большинство инсуляторных комплексов формируется вокруг какого-то одного ключевого ДНК-связывающего белка, но содержит одинаковые компоненты, как, например, белки CP190 или Mod(mdg4) у *Drosophila*. Предполагается, что специфичность взаимодействия между однотипными инсуляторами обеспечивается способностью ДНК-связывающего белка к димеризации. Затем димер стабилизируется взаимодействиями между другими компонентами инсуляторного комплекса. Известно, что инсуляторобразующие белки BEAF и CTCF способны димеризоваться. Однако способность к димеризации хорошо изученного инсуляторного белка *Drosophila*, Su(Hw), ранее не была продемонстрирована.

Белок Su(Hw) состоит из нескольких доменов. N-концевой домен связывает белок CP190, C-концевой домен – белок Mod(mdg4)-67.2, домен, содержащий 12 цинковых пальцев, обеспечивает связывание инсуляторного комплекса с ДНК. Чтобы выяснить, способен ли Su(Hw) димеризоваться, мы изучили взаимодействие между различными районами белка с помощью дрожжевой двугибридной системы. Полученные результаты показали, что за димеризацию белка Su(Hw) отвечает небольшой район, включающий 30 а.о., расположенный между 1-ым и 2-ым цинковыми пальцами (в дальнейшем назван ZPL). С помощью биоинформатических методов мы выяснили, что район ZPL формирует третичную структуру, напоминающую цинковый палец. Затем были проведены эксперименты по соосаждению отдельных доменов Su(Hw) на глутатион сефорозе и коиммунопреципитация делеционных производных белка из лизата клеток S2. В этих экспериментах N-концевой район белка Su(Hw) формировал стабильные димеры. Делеционные производные N-концевого района, лишённые 1-ого цинкового пальца и прилежащего к нему дистального района, содержащего ZPL, утрачивали способность димеризоваться. Делеция кислого района, ответственного за связывание белка CP190, не ослабляла димеризацию. Сам 1-ый цинковый палец Su(Hw) димеризовался слабо, но при добавлении к нему участка ZPL, димеризация восстанавливалась и была сопоставима с

димеризацией целого N концевой района. Следовательно, можно предположить, что димеризация белка Su(Hw) обеспечивается 1-ым цинковым пальцем, а прилежащий район ZPL обеспечивает правильную конформацию димеризующегося участка.

Для анализа роли димеризующего района *in vivo* была создана линия дрозофил, в которой белок дикого типа был замещён трансгеном, экспрессирующим белок Su(Hw) с делецией района ZPL (Su(Hw) $\Delta$ ZPL). Уровень транскрипции трансгена Su(Hw) $\Delta$ ZPL несколько превышал транскрипцию гена *su(Hw)* дикого типа. Делеция района ZPL не влияла на жизнеспособность мух, однако гомозиготные по конструкции самки были стерильны. Мутация  $\Delta$ ZPL не затрагивает районы Su(Hw), участвующие во взаимодействии с белками CP190 и Mod(mdg4). Тем не менее, в трансгенной линии  $y^2$  *sc<sup>D1</sup> ct<sup>6</sup>; Su(Hw) $\Delta$ ZPL/Su(Hw) $\Delta$ ZPL* Su(Hw)-зависимая инсуляция была ослаблена. Недавно мы создали модельную систему, позволяющую визуально оценивать взаимодействия между Su(Hw)-зависимыми инсуляторными комплексами, локализованными на расстоянии 40 т.п.н. друг от друга, по уровню экспрессии генов *yellow* и *white*. Взаимодействие инсуляторов в этой модельной системе приближает специфичные энхансеры к промоторам репортёрных генов и обеспечивает активацию их транскрипции. Для оценки роли последовательности ZPL в дистанционных цис-взаимодействиях, линию Su(Hw) $\Delta$ ZPL, либо линию, экспрессирующую полноразмерный Su(Hw), скрестили с модельными линиями. Если в модельной системе экспрессировался Su(Hw) $\Delta$ ZPL, репортёрные гены *yellow* и *white* практически не активировались, тогда как в контрольной линии с полноразмерным белком оба репортёрных гена экспрессировались на уровне дикого типа. Наблюдаемый фенотип можно объяснить либо неспособностью белка Su(Hw) $\Delta$ ZPL димеризоваться, либо неспособностью связываться с хроматином и формировать инсуляторный комплекс.

С помощью ChIP-анализа мы протестировали, как делеция ответственной за гомодимеризацию последовательности ZPL влияет на связывание компонентов Su(Hw)-зависимого инсулятора с хроматином. Оказалось, что снижение связывания компонентов инсуляторного комплекса на различных инсуляторных сайтах в линии Su(Hw) $\Delta$ ZPL не критично в сравнении с линией дикого типа. Следовательно, в линии Su(Hw) $\Delta$ ZPL формируются функциональные инсуляторы, которые, тем не менее, не способны взаимодействовать.

Таким образом, мы впервые обнаружили и локализовали димеризующий домен белка Su(Hw), *in vivo* обеспечивающий специфичное взаимодействие дистанцированных Su(Hw)-зависимых инсуляторных комплексов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 21-14-00205.

## Фрагменты митохондриальной ДНК в ядерном геноме человека

Голубенко М.В.

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск

Митохондриальная ДНК (мтДНК) является особенной частью генома, будучи расположенной за пределами ядра клетки и обладая некоторыми свойствами ДНК бактерий. В процессе эволюции эукариот большинство генов переместилось из митохондрий в ядро, и, например, у большинства животных мтДНК кодирует только 13 белковых субъединиц дыхательной цепи, а также РНК-компоненты для синтеза этих белков. Тем не менее, анализ геномных последовательностей показывает, что встраивание фрагментов мтДНК в ядерный геном продолжается, не только на уровне макроэволюции, но как микроэволюционный процесс. Например, в референсном геноме человека версии GRCh37/hg19 выявлено 766 вставок фрагментов митохондриального генома, гомологичных современной последовательности мтДНК (Calabrese F.M. et al., 2012). Для этих последовательностей используется название NUMT – NUclear MiTochondrial sequence. Показано, что общим механизмом встраивания фрагментов мтДНК в ядерный геном является негомологичное соединение концов (Non-Homologous End Joining, NHEJ) как способ репарации двунитевых разрывов ДНК (Газиев А.И., Шайхаев И.О., 2010).

Анализ данных проекта «1000 геномов» (999 человек из 20 популяций) выявил 141 полиморфный сайт NUMT в ядерном геноме, из них 42% полиморфных NUMTs расположены в интронах генов, а 43% - в межгенных регионах, а большинство этих NUMTs «младше» миллиона лет (Dayama G. et al., 2014). Анализ геномов 66 тысяч индивидов, в том числе более 10000 трио (Wei W. et al., 2022), дал оценку частоты инсерций NUMT de novo: примерно 1 на 10000 рождений и примерно 1 на 1000 опухолей. Кроме того, было выявлено более полутора тысяч новых NUMTs, подавляющее большинство которых были редкими в популяции либо «приватными», т.е. найденными только у одного индивида. Оценки времени интеграции в ядерный геном для нескольких сотен NUMTs показали, что в 90% эти события произошли не более 100 тысяч лет назад (Wei W. et al., 2022).

Эти результаты говорят о том, что встраивание фрагментов мтДНК в ДНК хромосом является относительно частым событием, и соответственно, его необходимо учитывать в нескольких аспектах. Прежде всего, случайная вставка любого фрагмента ДНК в экзонные и регуляторные последовательности генов может иметь патогенный эффект. Случаи наследственных заболеваний, вызванных инсерциями фрагментов мтДНК в ядерные гены, действительно описаны, но нужно заметить, что они являются единичными. Тем не менее, вставки в пределах экзонов и регуляторных последовательностей были обнаружены в злокачественных опухолях (Wei W. et al., 2022). Кроме того, NUMTs могут повлиять на



результаты при исследовании гетероплазмии мтДНК, особенно в случае низкого уровня мутантного аллеля, а также при определении числа копий мтДНК в клетке. Также NUMTs могут быть одной из причин противоречивых результатов, получаемых в работах по изучению метилирования ДНК. Следует учитывать существование NUMTs и в криминалистике. Кроме того, исследования, проведенные после публикации работы о феномене отцовского наследования мтДНК (Luo S. et al., 2018), показали, что подобные случаи на самом деле объясняются вставками конкатемеров (тандемных линейных копий) мтДНК в ядерный геном (Wei W. et al., 2020; Bai R. et al., 2021).

Таким образом, феномен транслокации фрагментов мтДНК в ядерный геном представляет собой особый тип геномной изменчивости, который заслуживает пристального внимания исследователей.

Исследование поддержано бюджетным проектом № FGWM-2022-0026

#### Литература

1. Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ядерно-митохондриальные псевдогены // Молекулярная биология. 2010; 44(3): 405-417.
2. Bai R., Cui H., Devaney J.M., et al. Interference of nuclear mitochondrial DNA segments in mitochondrial DNA testing resembles biparental transmission of mitochondrial DNA in humans. *Genet Med.* 2021; 23(8):1514-1521.
3. Calabrese F.M., Simone D., Attimonelli M. Primates and mouse NumtS in the UCSC Genome Browser. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13(Suppl 4):S15.
4. Dayama G., Emery S.B., Kidd J.M., Mills R.E. The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(20):12640-12649.
5. Luo S., Valencia C.A., Zhang J., et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115(51):13039-13044.
6. Tsuzuki T., Nomiyama H., Setoyama C., et al. Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA. *Gene.* 1983; 25(2-3):223-229.
7. Wei W., Schon K.R., Elgar G., et al. Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes. *Nature.* 2022; 611(7934):105-114.
9. Wei W., Pagnamenta A.T., Gleadall N., et al. Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat Commun.* 2020; 11(1):1740.

## **Повторяющиеся последовательности ДНК в геноме перепончатокрылых насекомых (Hymenoptera)**

**Гохман В.Е.**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Перепончатокрылые – один из наиболее богатых видами, таксономически сложных и практически важных отрядов насекомых. В составе этого отряда традиционно выделяются три основные группы – низшие Hymenoptera (подотряд Symphyta), а также высшие перепончатокрылые (подотряд Apocrita), включающие паразитоидов (Parasitica) и жалящих (Aculeata). Ныне описано более 150 тысяч представителей Hymenoptera, а их общее число в мировой фауне, вероятно, составляет не менее миллиона видов. За последние годы заметно вырос объем знаний о структуре генома данных насекомых, в том числе о повторяющихся последовательностях ДНК в его составе. Сведения об этих последовательностях получены с использованием методов цитогенетики, прежде всего флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), а также биоинформатики. В настоящее время последние приобретают все более существенное значение вследствие возрастающей доступности результатов полногеномного секвенирования. Тем не менее, указанные методы дополняют друг друга, обеспечивая взаимный контроль получаемых результатов.

Как и у других организмов, повторяющиеся последовательности ДНК перепончатокрылых можно условно разделить на сателлитную ДНК, обычно располагающуюся на хромосомах в виде кластеров, и ДНК мобильных элементов. Среди сателлитных последовательностей у представителей Hymenoptera лучше всего изучены кластеры рибосомной ДНК (рДНК). В гаплоидном геноме многих перепончатокрылых присутствует единственный кластер рДНК, однако количество подобных кластеров в среднем возрастает с увеличением хромосомных чисел и может достигать 4, 6 и 15 в пределах Symphyta, Parasitica и Aculeata соответственно. Во многих случаях, особенно у перепончатокрылых с относительно высокими числами хромосом, кластеры рДНК занимают на хромосомах терминальное или субтерминальное положение. FISH позволяет проводить физическое картирование рДНК, но ее кластеры также можно предварительно выявить, например, с помощью окраски хромомицином А<sub>3</sub> (СМА<sub>3</sub>), поскольку эти кластеры обычно являются СМА<sub>3</sub>-положительными, хотя обратное справедливо далеко не всегда. Для картирования рДНК на хромосомах Hymenoptera в качестве пробы наиболее часто используется последовательность 18S, реже 45S и 28S.

За последние годы весьма существенно изменились наши знания о теломерных повторах перепончатокрылых. Ранее считалось, что для всех представителей этой группы, как и для

многих других насекомых, характерен теломерный мотив ТТАГГ. Действительно, к настоящему времени известно, что соответствующие повторы, выявленные в семействах Tenthredinidae, Cephidae и Orussidae, встречаются у низших Hymenoptera и, следовательно, являются исходными для данного отряда. У большинства высших перепончатокрылых эти повторы, однако, заменены другими мотивами, которые, как правило, являются уникальными или характерными для тех или иных семейств и родов. Так, для изученных представителей Parasitica известны самые разнообразные повторы – от мононуклеотидной последовательности поли-Т длиной в несколько сотен пар оснований у одного из наездников семейства Ichneumonidae до теломерного мотива ТТАТТГГГ, обнаруженного у многих паразитоидов надсемейства Chalcidoidea. Для отдельных групп жалящих Hymenoptera также характерны специфические мотивы, например, ТТГЦГТЦТГГГ и ТТАГГТТГГГГ, соответственно выявленные у ос надсемейства Vespoidea и шмелей рода *Bombus* (Apidae). В то же время, мотив ТТАГГТЦТГГГ, напротив, встречается у ряда Aculeata, принадлежащих к разным группам. По этой причине представляется весьма вероятным, что наличие указанного повтора является предковым состоянием для жалящих перепончатокрылых. Более того, у многих представителей Hymenoptera вышеперечисленные теломерные мотивы перемежаются с транспозонами типа SART.

Остальные повторяющиеся последовательности ДНК перепончатокрылых изучены довольно фрагментарно. Так, различные микросателлиты, т.е. короткие tandemные повторы ДНК, весьма разнообразны как по составу, так и по локализации в пределах данного отряда. В частности, они могут располагаться как в гетерохроматиновых, так и в эухроматиновых районах хромосом. Далее, в ходе хромосомного исследования Aculeata удалось идентифицировать специфические центромерные повторы, общие для некоторых муравьев (Formicidae), относящихся к роду *Solenopsis*, хотя у пчелиных (Anthophila) подобные мотивы, судя по данным микродиссекции и хромосомного пэйнтинга, могут различаться даже у разных хромосом в пределах вида. Единичные работы также посвящены физическому картированию на хромосомах Hymenoptera т.н. малых ядерных ДНК и различных повторов, характерных для В-хромосом. Наконец, в геномах муравьев *Myrmica ruginodis* Nylander и *Tapinoma ibericum* Santschi выявлено несколько типов мобильных элементов, причем по крайней мере один из них найден и на хромосомах тлей из рода *Aphis*, находящихся в симбиотических отношениях с этими муравьями.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00068.

## Организация хроматина насекомых в ядре млекопитающих

Гридина М.М.<sup>1,2</sup>, Торгунаков Н.Ю.<sup>1,2</sup>, Нурисламов А.Р.<sup>1,2</sup>, Фишман В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Организация хроматина в клетках животных необходима для реализации процессов транскрипции, репликации и репарации геномной ДНК. Функциональное состояние хроматина определяется множеством белков, некоторые из которых — например гистоны и факторы ремоделинга хроматина — демонстрируют крайне высокую степень эволюционной консервативности, в то время как другие — например, некоторые факторы транскрипции — могут значительно отличаться даже у близких видов. В соответствии с этим, в укладке хроматина также могут наблюдаться как общие для всех животных паттерны, так и существенные различия.

Одним из примеров межвидовых различий в укладке хроматина является уровень топологически-ассоциированных доменов (ТАДов) — пространственно-обособленных локусов ДНК, обнаруженных у всех животных. Несмотря на общность названия, ТАДы позвоночных и насекомых, судя по всему, образуются совершенно разными механизмами: в то время как ТАДы позвоночных формируются преимущественно за счет взаимодействия белков когезинового комплекса с инсулятором CTCF, у насекомых этот инсулятор не связан с формированием ТАДов, а роль в их образовании играют совершенно другие факторы, например BEAF-32 и CP190, а также модификации гистоновых белков и процесс транскрипции.

Ещё одним важным и мало изученным вопросом то, как в ходе эволюции меняется связь между укладкой и белковым составом хроматина и процессом транскрипции. Известно, что многие широко используемые промоторы млекопитающих не активны в клетках насекомых. В то же время часть канонических промоторных мотивов, например TATA-box, встречаются у всех животных. В целом остается неясным, насколько транскрипционная машина животных универсальна.

Для ответа на поставленные выше вопросы важно разделять эволюционные изменения в последовательностях цис-регуляторных элементов, которые могут приводить к изменению в профиле связывания белков, укладки и функционирования хроматина и эволюционные изменения в транс-факторах, которые также могут приводить к межвидовым различиям в работе генома.

В нашей работе мы создали уникальную модельную систему, которая позволяет исследовать укладку и функционирование генома насекомых в окружении транс-факторов человека. Для этого, мы провели слияние между клетками человека (HEK293) и комара (MSQ43). Были получены гибридные клоны, в которых цитологический анализ методом FISH и молекулярный анализ подтвердили интеграцию крупных, хромосомного размера фрагментов генома комара в геном клеток HEK293. По результатам Hi-C анализа гибридных клеток хроматин комара сформировал гетерохроматиновый кластер с редкими слабовыраженными доменами. В гибридных клетках наблюдается экспрессия отдельных участков комариного генома, однако подавляющее большинство локусов транскрипционно-неактивно. Отсутствие полноценной масштабной экспрессии генома комара подтверждает наши предположение на основании результатов Hi-C о гетерохроматизации большей его части.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект №22-14-00247.

## **Определение хромосомной локализации транскрипта прицентромерной ДНК семейства HSAT2 в клетках A549 и мезенхимных стромальных клетках человека: анализ *in situ* и *in silico***

Гуца Е.А.<sup>1</sup>, Пономарцев Н.В.<sup>1</sup>, Зилов Д.С.<sup>2</sup>, Добрынин М.А.<sup>1</sup>, Енукашвили Н.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> SCAMT: Лаборатория прикладной геномики, SCAMT, Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург

ДНК сателлитов 2 и 3 (human satellite, HS2 и HS3) человека относят к тандемноповторяющимся прицентромерным (ТПц) ДНК. В настоящее время показано, что количество ТПц транскриптов HS2 и HS3 может возрасть многократно при различных клеточных процессах, например, канцерогенезе.

**Цель работы:** поиск последовательностей и картирование ТПц ДНК, кодирующих выявляемые в опухолях транскрипты, в полной сборке генома человека T2T-CHM13.

**Материалы и методы:** Для поиска транскриптов в транскриптоме методом FISH был подобран олигонуклеотид, выявляющий ТПц ДНК HS2 и HS3 на большинстве хромосом. Далее с его помощью методами биоинформатики в транскриптомах аденокарциномы легкого выявили несколько транскриптов с сайтами гомологии к олигонуклеотиду и определили локализацию ТПц ДНК, их кодирующих. Результаты анализа *in silico* проверяли методом FISH: на мезенхимных стромальных клетках пупочного канатика (МСКПК) с нормальным кариотипом и на клетках аденокарциномы A549 со значительным количеством хромосомных перестроек.

**Результаты:** На первом этапе работы подобрали зонд DYZ1, состоящий из пентануклеотидных повторов ТПц ДНК HS2 и HS3. Методами биоинформатики зонд выявили на 13 парах хромосом, а также Y-хромосоме. Локализация в прицентромерных участках большинства хромосом была подтверждена методом FISH. Используя DYZ1 для поиска транскриптов ТПц ДНК в транскриптомах *in silico* выявили четыре транскрипта и отобрали один, наиболее представленный. К данному транскрипту подобрали пару праймеров для синтеза методом ПЦР флуоресцентно меченого зонда, покрывающего весь транскрипт, а также олигонуклеотиды к фрагментам транскрипта. С помощью ДНК-ДНК гибридизации на метафазных пластинах обнаружили, что все зонды в проанализированных линиях гибридизуются с более чем одной парой хромосом, включая и зонд, покрывающий весь транскрипт. В клетках A549 сигнал выявляли на большем количестве хромосом по сравнению с МСКПК, что связано с наличием хромосомных

перестроек в A549. Мы картировали последовательность транскрипта используя сборки GRCh38/hg38 и T2T-CHM13. Показано, что эта последовательность представлена на 7 парах хромосом, а также на Y-хромосоме. Анализ геномной локализации и аннотации последовательности в сборке T2T-CHM13 показал, что транскрипт принадлежит к семейству HSAT2 (человеческий сателлит 2) ТПц ДНК. Транскрипт обнаружен на обеих цепях массивов HSAT2. Ориентация ДНК, кодирующей транскрипт, отличалась на разных хромосомах, в подсемействах хромосом и внутри самого подсемейства. Таким образом, данная последовательность не уникальна и присутствует на нескольких хромосомах.

Однако неизвестно, активируется ли транскрипция всех этих последовательностей, или только одной, или нескольких из них. Данные, полученные в ходе исследования, подтверждают активацию транскрипции HS2, HS3 в клетках опухолевого происхождения.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ №075-15- 2021-1075 от 28.09.2021.

## Применение систем направленного редактирования генома в изучении структурно-функциональной организации локуса *Notch* у *Drosophila melanogaster*

Демаков С.А.<sup>1</sup>, Андреенков О.В.<sup>1</sup>, Волкова Е.И.<sup>1</sup>, Дорогова Н.В.<sup>2</sup>,  
Андрееenkova Н.Г.<sup>1</sup>, Тихомиров С.А.<sup>1</sup>, Жимулев И.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

До недавнего времени возможности молекулярно-генетических манипуляций с геномом дрозофилы в значительной степени были связаны с транспозон-опосредованным встраиванием рекомбинантных ДНК в геном мух. Однако в последние годы был достигнут значительный прогресс в развитии техник геномного редактирования, которые позволяют эффективно и направленно изменять целевые участки ДНК непосредственно в составе генома. В данной работе мы применили комплекс молекулярно-генетических методов и новых эффективных систем направленного мутагенеза, таких как CRISPR/Cas9, в сочетании с attP/attB, для изучения структурно-функциональной организации локуса *Notch*, участвующем в контроле развития *Drosophila melanogaster*.

В рамках изучения генетических механизмов формирования и регуляции хромомерной организации интерфазных хромосом, были получены новые мутации в гене *Notch*. Впервые получены уникальные делеции в промоторной области и в одном из внутренних энхансерных районов гена *Notch* в его эндогенном (естественном) генетическом окружении. Молекулярно-генетический анализ линий мух с этими делециями позволил выявить участки ДНК, вовлеченные в регуляцию активности и организацию хроматина этого локуса. Наиболее сильные нарушения в развитии мух наблюдались в линиях с делециями, затрагивающими предполагаемый инсулятор в районе промотора этого гена. В результате тонкого цитологического картирования района политенных хромосом с этими делециями в промоторной области гена впервые был определен минимальный участок ДНК, соответствующий делеции размером 255 п.н., вызывающий исчезновение междиска 3С6/С7 и слияние соседних дисков. Иммуноокрашивание политенных хромосом антителами к инсуляторным белкам dCTCF и CHROMATOR (Chriz) показало, что при этом происходит исчезновение их сайтов посадки в этом районе. Встройка вспомогательного элемента в первый интрон гена *Notch* сама по себе или в сочетании с делецией инсулятора в промоторной области гена приводит к снижению экспрессии гена *Notch* в яичниках и, как следствие, к нарушениям клеточных процессов, обеспечивающих рост ооцитов и формирование вокруг них специализированного эпителия. Эти мутантные фенотипы *Notch* ранее не были описаны в литературе, что позволяет предположить еще одну функцию этого гена в оогенезе. Результаты данной работы показывают высокую эффективность систем направленного геномного редактирования для исследования влияния регуляторных последовательностей ДНК на структурную организацию интерфазного хроматина и активность генов в их эндогенном генетическом окружении.

Работа поддержана грантом РФФ 20-14-00074.



## **Встройка гена 5S рРНК в последовательность рибосомного межгенного спейсера (IGS) у позвоночных**

Демин А.Г., Галкина С.А., Давидьян А.Г., Ильина А.В., Гагинская Е.Р.

Санкт-Петербургский государственный университет

Рибосомные гены (рДНК), кодирующие 18S, 5.8S, 28S и 5S рибосомные РНК (рРНК), являются одним из ключевых элементов эукариотических геномов, так как их продукты принимают непосредственное участие в биогенезе и функционировании рибосом, осуществляющих синтез белка. Множественные кластеры генов 18S, 5.8S и 28S рРНК (45S рДНК), разделенные межгенными спейсерами (IGS), образуют ядрышко-организующий район (NOR), который может располагаться на одной или нескольких парах хромосом. В подавляющем большинстве эукариотических геномов копии гена 5S рРНК не связаны с NOR: они могут быть сгруппированы на одной или множестве пар хромосом за пределами NOR (Vierna et al., 2013). Существование такого паттерна коррелирует с разными путями биогенеза рРНК. Гены 18S, 5.8S и 28S рРНК транскрибируются РНК-полимеразой (RNAP) I как единый предшественник 45S пре-rRNA с последующим процессингом в три независимые молекулы рРНК непосредственно в ядрышке. Молекулы 5S рРНК, синтезированные RNAP III, выходят через ядерные поры в цитоплазму для завершения процессинга. Затем они импортируются обратно в ядро и достигают ядрышка, где включаются в большую рибосомную субъединицу (Smirnov et al., 2008). В геноме одного и того же организма рибосомные гены 45S и 5S рРНК обычно представлены разным числом копий. Существование разделенных массивов 45S и 5S рДНК, транскрибируемых специализированными полимеразами, свидетельствует об их согласованной транскрипции, поскольку все молекулы рРНК присутствуют в рибосоме в эквимольных количествах (в единственном экземпляре). Определенный баланс молекул рРНК в клетке может поддерживаться тем, что не все повторы рДНК в NOR активны одновременно (Hori et al., 2021). До недавнего времени считалось, что описанные выше принципы организации рДНК свойственны всем видам Deuterostomia. При этом полные последовательности рибосомных повторов были установлены лишь для очень небольшого числа таксонов высших эукариот (Duomin et al., 2019), что объясняется сложностями аннотирования переменных протяженных последовательностей рибосомных спейсеров, таких, как IGS. Впечатляющие механизмы баланса между генами 45S пре-рРНК и геном 5S рРНК были обнаружены у животных с амплификацией 45S рДНК в ооцитах. У позвоночных множественная амплификация рДНК с образованием внехромосомных ядрышек описана для ооцитов рыб (Vincent et al., 1969; Locati et al., 2017), земноводных (Gall, 1968), черепахах (Callebaut et al., 1997; Davidian et al., 2021) и крокодилов (Uribe,

Guillette, 2000). У рыб и амфибий очевидный дисбаланс между дозами генов 18S, 5.8S, 28S и 5S рРНК разрешается наличием в геномах дополнительных сайтов генов 5S рРНК, дифференциально транскрибируемых в соматических клетках и ооцитах. Эти два типа 5S рДНК, определяемые как ооцитный (или материнский) и соматический типы, демонстрируют дифференциальный паттерн экспрессии генов в разных тканях.

В рамках реализации задачи по сборке и аннотированию полных рибосомных повторов ряда таксонов с амплификацией рДНК в оогенезе нами был выполнен поиск фрагментов рибосомных повторов в неаннотированных WGS-контигах и данных SRA (NCBI) у представителей различных классов Deuterostomia. Проведенный анализ, показал, что у черепах и крокодилов (Davidian et al., 2022), а также автохтонных антарктических рыб семейства Nototheniidae (Dyomin et al., 2023) копия гена 5S рРНК встроена во все последовательности IGS (NOR-5S) в направлении, противоположном основным кластерам 45S рДНК. При этом в геномах представителей данных таксонов присутствуют также повторы гена 5S рРНК не связанные с NOR. Во всех выявленных случаях последовательности NOR-5S рРНК отличаются рядом замен от обычных последовательностей 5S рРНК, однако сохраняют каноническую вторичную структуру.

Мы обнаружили риды NOR-5S рРНК в транскриптомах яичников китайской трёхкилевой черепахи и Патагонского клыкача (Nototheniidae) при их отсутствии в транскриптомах семенников и соматических тканей. На примере краснухой черепахи мы продемонстрировали, что NOR-5S гены экспрессируются только в ооцитах, и установили, что на стадии вителлогенеза в ооцитах преобладают рибосомы, содержащие NOR-5S рРНК, а не каноническую 5S рРНК в большой рибосомной субъединице, что указывает на роль модифицированных рибосом в ооцит-специфической трансляции. Таким образом, мы рассматриваем ген NOR-5S как матрицу 5S рРНК материнского типа. Колокализация 5S- и 45S-рибосомных генов может быть значимой для эквимоллярной продукции всех четырех рРНК у таксонов, характеризующихся амплификацией NOR во время оогенеза, и, возможно, сопутствовала их эволюционному успеху.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 22-24-00538.

## Хромосомы типа ламповых щеток *Danio rerio*: морфологическое описание и построение цитологических карт

Добровольская М.А.<sup>1</sup>, Дедух Д.В.<sup>1,2</sup>, Куликова Т.В.<sup>1</sup>, Маслова А.В.<sup>1</sup>,  
Красикова А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Лаборатория Менделеевской генетики, Институт Физиологии и Генетики Животных при Чешской Академии Наук, Либехов, Чешская Республика

*Danio rerio* — востребованный модельный объект геномики, эмбриологии и биомедицины. Несмотря на то, что кариотип *Danio rerio* достаточно подробно охарактеризован, детальное цитологическое картирование его хромосом типа ламповых щеток еще не проводилось. Хромосомы типа ламповых щеток образуются на стадии диплотены мейоза в растущих ооцитах и позволяют осуществлять цитогенетическое картирование высокого разрешения, поскольку они значительно больше митотических метафазных хромосом. Хромосомы типа ламповых щеток характеризуются хромомерно-петлевым строением, им свойственны петли особой морфологии и локус-специфичные тельца. Более того, хромосомы типа ламповых щеток характеризуются активной транскрипцией, что позволяет точно картировать вновь синтезируемые РНК.

В настоящем исследовании мы впервые описали кариотип *Danio rerio* на стадии хромосом типа ламповых щеток. Сначала мы адаптировали для рыб стандартный протокол выделения хромосом типа ламповых щеток и подобрали оптимальную концентрацию гипотонического раствора для диспергирования хромосом. Первичный морфологический анализ показал, что хромомеры, равномерно распределенные вдоль осей хромосом, преимущественно однородны при окрашивании DAPI, а центромеры морфологически не идентифицируются. Визуально можно выделить только три бивалента: два бивалента с хромосом-ассоциированными сферическими тельцами и один бивалент с несферическими РНП-богатыми маркерными структурами. Мы обнаружили, что локус-специфичные ядерные тельца обогащены коилином и не содержат фибрилларин. Локусы их формирования предположительно соответствуют кластерам генов гистонов на концах двух хромосом, согласно текущей версии генома *Danio rerio* GRCZ11/danRer11. Факторы сплайсинга, выявленные с помощью иммуноокрашивания антителами против TMG-кэпа зрелых мРНК, накапливаются в длинных маркерных петлях в субтеломерных районах одного бивалента и в отдельных маркерных петлях почти на всех бивалентах. Для идентификации центромер мы картировали три перицентромерных tandemных повтора (RFAL1, RFAL2 и RFAM) на митотических метафазных хромосомах *Danio rerio* и на

хромосомах типа ламповых щеток. Повторы RFAL1, RFAL2 и RFAM картированы в перицентромерных районах всех бивалентов, при этом повторы RFAL2 и RFAM продемонстрировали значительную ко-локализацию. Кроме того, при помощи метода РНК-FISH мы обнаружили транскрипты перицентромерных повторов на пяти-восьми хромосомах типа ламповых щеток. Мы также обнаружили транскрипты теломерного повтора на концах примерно 10 бивалентов. При этом в контрольных экспериментах предварительная обработка хромосом РНКазой А устраняла все гибридизационные сигналы из РНП-матрикса латеральных петель. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интенсивная транскрипция перицентромерных и теломерного тандемных повторов ДНК универсальна для стадии хромосом типа ламповых щеток в оогенезе. Наконец, мы построили цитологические карты для всех хромосом типа ламповых щеток *Danio rerio*, иллюстрирующие распределение морфологически различимых маркерных структур, их молекулярных компонентов и положение центромер. Построенные цитологические карты хромосом типа ламповых щеток позволят более точно картировать различные повторы и гены интереса, а также изучать их транскрипцию и функции в оогенезе.

Исследование выполнено в рамках гранта № МК-3553.2022.1.4 с использованием оборудования Центра молекулярных и клеточных технологий и Обсерватории экологической безопасности Научного парка СПбГУ.

## Влияние нуклеопорина Elys на геномную архитектуру у дрозофилы

Доронин С.А.<sup>1</sup>, Ильин А.А.<sup>1</sup>, Кононкова А.Д.<sup>2</sup>, Соловьев М.А.<sup>3</sup>, Оленкина О.М.<sup>1</sup>,  
Ненашева В.В.<sup>1</sup>, Михалева Е.А.<sup>1</sup>, Лавров С.А.<sup>1</sup>, Храмеева Е.Е.<sup>2</sup>, Ульянов С.В.<sup>3</sup>,  
Разин С.В.<sup>3</sup>, Шевелев Ю.Я.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра  
«Курчатовский институт», г. Москва

<sup>2</sup> Сколковский институт науки и технологий, г. Москва

<sup>3</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Накапливаются данные, показывающие, что периферический хроматин находится в тесном контакте как с ядерной ламиной, так и с ядерными порами. Участки генома, взаимодействующие с ядерной ламиной (ламина-ассоциированные домены, ЛАДы), были картированы у различных организмов. Эукариотические геномы взаимодействуют и с нуклеопоринами – компонентами комплексов ядерных пор. У многоклеточных животных взаимодействия нуклеопоринов с хроматином могут происходить не только на ядерной оболочке, но и внутри ядра. Elys является единственным известным нуклеопорином, который может напрямую связывать хроматин с ядерными порами, поскольку он содержит ДНК-связывающий AT-hook мотив и белковый домен, способный связываться с нуклеосомами. Elys участвует в закладке ядерных пор в восстанавливающуюся ядерную оболочку в конце митоза, связывая деконденсирующийся хроматин с субкомплексом ядерных пор Nup170-160. До недавнего времени Elys дрозофилы не был охарактеризован. В 2020 году было показано, что нокдаун Elys в слюнных железах личинок дрозофилы вызывает апоптоз и исчезновение ядерных пор с ядерной оболочки (Mehta et al. 2020). В недавних работах методом ChIP-seq были определены сайты связывания Elys с геномом в мозге личинок и в клетках S2 дрозофилы (Pascual-Garcia et al. 2017; Gozalo et al. 2020).

Целью нашей работы было выяснение того, как Elys влияет на состояние хроматина и на экспрессию генов. Мы установили, что деплеция Elys в эмбриональных клетках S2 дрозофилы не приводит к усилению апоптоза и к исчезновению ядерных пор с ядерной оболочки. Следовательно, клетки S2 являются подходящей моделью для анализа влияния Elys на геномную архитектуру. Методом DamID мы картировали геномные участки, с которыми взаимодействует Elys в 16-18-часовых эмбрионах дрозофилы, и выделили среди них консервативные сайты Elys, с которыми он связан, находясь либо в составе ядерных пор, либо будучи в нуклеоплазме. Сайты связывания с порами, расположенные внутри ЛАДов, имели низкий уровень ацетилирования гистонов и соответствовали провалам в профиле ламина. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с зондами к двум участкам ЛАДов, содержащих сайты прикрепления к порам, продемонстрировала, что при деплеции Elys в

клетках S2 происходит удаление этих районов от ядерной оболочки. Таким образом, мы обнаружили, что Elys, наравне с ламином, участвует в прикреплении периферического гетерохроматина к ядерной оболочке.

Чтобы выяснить, как Elys влияет на плотность упаковки хроматина, были проведены эксперименты Hi-C в контрольных клетках S2 и клетках с деплецией Elys. При деплеции Elys топологически ассоциированные домены (ТАДы), которые состояли в основном из активного хроматина, стали более компактными, тогда как ТАДы, связанные с ядерной ламиной, стали менее компактными. Чтобы установить, как Elys локально влияет на плотность упаковки хроматина, мы построили усредненные тепловые Hi-C карты, центрированные вокруг различных типов сайтов Elys. Оказалось, что частота контактов в сайтах Elys, прикрепленных к ядерным порам и расположенных в ЛАДах, снижается после деплеции Elys сильнее, чем в соседних районах генома. В то же время, частота контактов в сайтах, с которыми Elys связан в нуклеоплазме, после деплеции Elys повышается, как и в соседних районах. Эти результаты свидетельствуют о том, что сайты периферического гетерохроматина, с которыми Elys связан в составе ядерных пор, имеют особую конформацию, облегчающую контакты между соседними участками генома, а связывание нуклеоплазменного Elys с активным хроматином вызывает деконденсацию хроматина.

Проведенный нами RNA-seq анализ в контрольных клетках S2 и клетках с деплецией Elys продемонстрировал, что уровень экспрессии генов, связанных с Elys в нуклеоплазме, заметно выше, чем у генов, связанных с Elys в составе ядерных пор. Деплеция Elys приводит к незначительному повышению уровня экспрессии слабо экспрессирующихся генов и практически не меняет экспрессию активно экспрессирующихся генов.

В данной работе мы впервые показали, что Elys в составе комплексов ядерных пор играет ключевую роль в локализации факультативного гетерохроматина на периферии ядра во время интерфазы. Мы также обнаружили, что Elys, находящийся внутри ядра, связан с промоторами и энхансерами активных генов, что приводит к декомпактизации их хроматина. Эти результаты значительно углубляют наши представления о фундаментальных механизмах организации хроматина в интерфазном ядре.

Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1062).

## Репродуктивные барьеры, размер генома и состав повторов у эндемичных видов байкальских амфипод (Crustacea: Amphipoda) рода *Eulimnogammarus*

Дроздова П.Б.<sup>1</sup>, Саранчина А.Е.<sup>1</sup>, Золотовская Е.Д.<sup>1</sup>, Такки О.Д.<sup>2</sup>, Галкина С.А.<sup>2</sup>, Тимофеев М.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Иркутский государственный университет, г. Иркутск

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Древние озёра являются известными точками взрывного видообразования, но даже среди них Байкал, возраст которого составляет 25-30 млн лет, выделяется по видовому разнообразию (Cristescu *et al.*, 2010, doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04832.x). Одной из наиболее крупных групп близкородственных видов в Байкале являются рачки-амфиподы (Crustacea: Amphipoda: Gammaroidea). Морфологических видов амфипод в Байкале насчитывается более 350 (Takhteev, 2000, doi: 10.1016/S0065-2504(00)31013-3), а с учётом видов-двойников существенно больше (Väinölä and Kamaltynov, 1999, <https://www.jstor.org/stable/20106211>). Частично разнообразие амфипод в Байкале можно объяснить широким спектром местообитаний и экологических ниш: виды этой группы различаются по глубине обитания (0–1642 м), способу питания, периоду размножения. Тем не менее, многие виды обитают совместно, обладая при этом сходными размерами, спектрами питания и периодом размножения, что вызывает вопрос о барьерах, обеспечивших их видообразование. Согласно данным для 36 видов, размер геномов байкальских амфипод варьирует почти на порядок (от 2 до 17 пг); найдена слабая положительная корреляция размера генома с максимальной длиной тела особей и глубиной обитания вида (Jeffery *et al.*, 2017, doi:10.1139/gen-2016-0128). При этом число хромосом в кариотипах идентично ( $2n = 52$ ) для 33 из 34 изученных видов (Salemaa and Kamaltynov, 1994, <https://eurekamag.com/research/009/548/009548816.php>; Natyaganova and Sitnikova, 2012, doi: 10.11352/scr.15.43). Стабильность кариотипа при изменчивости размера генома указывает на вклад повторяющихся последовательностей.

В данной работе мы сконцентрировались на изучении организации геномов у массовых литоральных видов байкальских амфипод из рода *Eulimnogammarus*. Виды *E. verrucosus*, *E. vittatus* и *E. cyaneus* часто встречаются совместно, но отличаются по таким параметрам, как размер тела и размер генома (около 6,1, 4 и 3,8 пг по данным денситометрии ядер, окрашенных по Фельгену, соответственно; Jeffery *et al.*, 2017). Кроме того, в Байкале *E. verrucosus* составляют по крайней мере три географически разделённые криптические генетические линии (Gurkov *et al.*, 2019, doi: 10.1186/s12862-019-1470-8; Drozdova *et al.*,

2022, doi: 10.3390/ijms231810858). В этой работе мы нашли статистически значимые различия между размером геномов в трёх известных генетических линиях байкальских *E. verrucosus*: наибольшим (8,0 пг) оказался размер генома представителей южной линии (S), средним (6,9 пг) — западной (W) и самым маленьким (6,1 пг) — восточной (E). Что важно, мы обнаружили существование как презиготического, так и постзиготического межвидового барьера между этими линиями, что позволяет нам говорить о трёх биологических видах. Оценки размера геномов для *E. vittatus* (4,7 пг) и *E. cyaneus* (4,1 пг) согласуются с опубликованными данными (Jeffery *et al.*, 2017) при учёте известной разницы между значениями, получаемыми методами денситометрии и проточной цитометрии. Для выявления причин обнаруженной разницы в размерах геномов мы изучили спектр повторов у пяти изучаемых видов с помощью секвенирования в низком покрытии и обнаружили, что большинство повторов является сателлитами, а обилие повторов в каждом изученном геноме имеет положительную корреляцию с размером. Состав повторов внутри видов, входящих в морфологический вид *E. verrucosus*, принципиально схож, в то время как различия повторов в геномах этих видов и в геномах *E. vittatus* и *E. cyaneus* гораздо более значительны. Дополнительно мы оценили предполагаемое время расхождения видов на основе восстановленных полных митохондриальных геномов. Согласно этой оценке, общий предок трёх изученных *E. verrucosus* существовал около 4,6 млн. лет назад, а общий предок *E. verrucosus* и *E. vittatus* — около 6,5 млн. лет назад. Можно предположить, что разделение этих морфологических видов было связано с отбором, затронувшим в том числе и повторяющиеся последовательности. Наконец, на основе полученных последовательностей наиболее распространённых классов повторов были подобраны зонды для флуоресцентной гибридизации *in situ*, и мы выяснили, что повторы двух наиболее частых классов распределены по большинству хромосом у *E. verrucosus*. Таким образом, полученные данные позволяют говорить о существенном вкладе повторяющихся последовательностей в эволюцию геномов байкальских амфипод.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда No 22-14-00128, <https://rscf.ru/project/22-14-00128/>.



## Механизм активации транскрипции экдизоном в клетках слюнных желез личинки *Drosophila melanogaster*

Евдокимова А.А.<sup>1</sup>, Колесникова Т.Д.<sup>2</sup>, Воробьева Н.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская федерация

<sup>2</sup> ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская федерация

Email to: vorobyeva@genebiology.ru

Экдизон является основным стероидным гормоном дрозофилы. Повышение его концентрации управляет протеканием многих ключевых этапов развития дрозофилы. Лучше всего охарактеризована роль экдизона в процессе метаморфоза. Два последовательных пика повышения концентрации экдизона приводят к превращению личинки дрозофилы в предкуколку, а затем, и куколку, активируя принципиально различные программы в ее тканях. В клетках слюнных желез личинки на разных стадиях экдизон активирует следующие программы развития: сначала, транскрипцию генов группы *sgs*, необходимых для прикрепления личинки к субстрату, а, затем, генов апоптоза и аутофагии, активация которых приводит к деградации слюнных желез на фоне повышения концентрации экдизона на стадии предкуколки. Кроме того, на фоне повышения концентрации экдизона на разных стадиях развития в клетках слюнных желез происходит активация набора генов, кодирующих регуляторы транскрипции, известный как экдизоновый каскад. До сих пор остается неясным механизм активации транскрипции генов на фоне повышения концентрации экдизона в различных тканях.

Для исследования механизма воздействия экдизона на молекулярный аппарат клетки было решено использовать природный компонент экдизонового каскада генов, мембранный транспортер E23 (способный переносить экдизон из клеток во внеклеточное пространство) (Hock et al. 2000; Itoh, Tanimura, and Matsumoto 2011). Для личинок поздней L3 стадии (готовящихся к метаморфозу) нами было исследовано изменения паттерна транскрипции генов в клетках слюнных желез на фоне экспрессия транспортера E23 (снижающего концентрацию экдизона в ткани). Мы обнаружили, что экспрессия E23 в слюнных железах приводит к значительному снижению уровня транскрипции всех основных генов экдизонового каскада (*Eip78C*, *Eip74ef*, *Eip75b*, *Eip71CD*, *hr4*), а также генов группы *sgs* (*sgs3*, *sgs4*, *sgs5*, *sgs7*, *sgs8*). Снижение уровня транскрипции ранее охарактеризованных мишеней экдизона на фоне экспрессии E23 отражает эффективность нашего экспериментального подхода. Для исследования механизма активации

транскрипции экдизоном нами было изучено молекулярное состояние промоторов и энхансеров генов. К нашему удивлению, для большинства генов, чья транскрипция снизилась на фоне экспрессии E23, мы не наблюдали значительных изменений в состоянии промоторов – на них практически не снижался уровень тотальной РНК-полимеразы II и даже ее фосфорилированной изоформы Pol II CTD Ser2P, которая обычно маркирует состояние комплекса, способного к эффективной элонгации. Напротив, на энхансерах генов мы наблюдали значительные изменения, как в состоянии хроматина (мы наблюдали его конденсацию, а также снижение уровня маркера энхансеров H3K27Ac), так и в наборе ассоциированных с ними белков (было детектировано снижение уровня РНК-полимеразы II, а также, RAF1 компонента, способствующего элонгации транскрипции). Вместе, наши результаты свидетельствуют в пользу того, что основной мишенью действия экдизона в клетках слюнных желез личинки является активность энхансеров генов, а не состояние преинициаторного комплекса на промоторе.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №23-14-00184 (рук. Воробьева Н.Е.).

## Динамика включения вариантов центромерного гистона H3 в нуклеосомы центромер у аллополиплоидных гибридов ржи и пшеницы

Евтушенко Е.В.<sup>1</sup>, Гацкая С.С.<sup>1</sup>, Новожилов Н.А.<sup>1,2</sup>, Вершинин А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский Государственный университет, г. Новосибирск

В царстве растений полиплоидизация играет ключевую роль не только в видообразовании, но и в создании экономически важных гибридов. Одними из наиболее известных искусственно созданных полиплоидных гибридов в семействе злаков Poaceae являются *xTriticale*, гибриды пшеницы (*Triticum*) и ржи (*Secale cereale* L.,  $2n=2x=14$ , RR). Однако селекционно-генетический анализ генофонда тритикале показал, что у них недостаточно реализован генетический потенциал адаптивности ржи. Настоящее исследование выполнено на межродовых гибридах *xSecalotriticum*, наследующих цитоплазму от материнской формы ржи. Гибриды *Secalotriticum* (*xSecalotriticum*, <sup>S</sup>/RRAABB,  $2n=6x=42$ ) были получены при скрещивании тетраплоидной ржи (<sup>S</sup>/RRRR,  $2n=4x=28$ ) с гексаплоидным тритикале (<sup>T</sup>/RRAABB,  $2n=6x=42$ ). При объединении двух и более дивергентных геномов в аллополиплоидных клетках возникает проблема правильного разделения геномов в митозе и мейозе. Ключевую роль в сборке кинетохора и правильном разделении хромосом играет центромера, специализированный хромосомный домен, маркированный центромерным вариантом гистона H3 (CENH3 у растений). У большинства диплоидных видов растений CENH3 кодируется одной копией гена. Однако для видов ржи, как и для других видов трибы Triticeae, было показано наличие двух копий гена CENH3,  $\alpha$ CENH3 и  $\beta$ CENH3. Мы определили размеры центромер у гексаплоидной пшеницы (AABBDD), тетраплоидной ржи (RRRR) и секалотритикум, анализируя интенсивность сигналов иммунофлуоресценции  $\alpha$ CENH3 в соматических клетках кончиков корней. Размеры центромер у родительских форм достоверно различаются, средний размер центромер тетраплоидной ржи примерно на 35% превышает средний размер центромер пшеницы. Размеры центромер у гибридных форм, тритикале и секалотритикум, показывают промежуточные значения. Согласно данным RT-qPCR, экспрессия  $\alpha$ CENH3 выше, чем экспрессия  $\beta$ CENH3:  $\beta$ CENH3 экспрессируется на низком уровне в корнях, coleoptile и очень слабо в листьях, однако транскрипты  $\beta$ CENH3 присутствуют на высоком уровне в пыльниках и пестиках. Яркие сигналы иммунофлуоресценции  $\alpha$ CENH3 и более слабые  $\beta$ CENH3 наблюдаются на всех стадиях митоза, от ранней профазы до телофазы у ржи и гибридов секалотритикум. Вместе с тем, фокус CENH3 каждой центромеры в мейоцитах содержит яркий сигнал  $\beta$ CENH3 в интерфазе и лептотене мейоза. Следовательно, включение вариантов CENH3 в

нуклеосомы во время сборки центромер в мейоцитах может сильно отличаться от таковой в соматических клетках. Суммируя, можно сделать вывод, что, несмотря на консервативную функцию, структура центромер злаков динамична и пластична. Обеспечение правильного расхождения хромосом у видов с большими хромосомами, таких как рожь, гибриды секалотритикум и тритикале, может происходить за счет увеличения включения  $\alpha$ CENH3 в нуклеосомы центромер во время митоза, либо за счет увеличения количества  $\beta$ CENH3 – содержащих нуклеосом во время первого мейотического деления.

С использованием геномной *in situ* гибридизации мы определили, что хромосомные территории хроматина ржи и пшеницы в гибридах секалотритикум пространственно разделены друг от друга. Геном материнского растения (рожь) проявляет тенденцию к образованию кластеров, содержащих одну или две хромосомы и распределенных по всему ядру. Пространственное разделение родительских геномов в ядре во время клеточного цикла также может способствовать стабильному наследованию геномов у аллополиплоидных гибридов. Микроскопический анализ был выполнен в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM780.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00051-П.

Бюджетный проект № FWGZ-2021-0014.

## **Роль транскрипции перицентромерной tandemно повторяющейся ДНК в канцерогенезе**

**Енукашвили Н.И.<sup>1</sup>, Пономарцев Н.В.<sup>1</sup>, Бричкина А.И.<sup>2</sup>, Белик Л.А.<sup>1,3</sup>, Семенова Н.Ю.<sup>3</sup>, Мартынкевич И.С.<sup>3</sup>, Гуца Е.А.<sup>1</sup>, Травина А.О.<sup>1</sup>, Пржбельский А.Д.<sup>4</sup>, Зилов Д.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Марбургский Университет Филиппа, Марбург, Германия

<sup>3</sup> ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Тандемно повторяющаяся (тп) ДНК перицентромерных (пц) районов хромосом у млекопитающих относится к классу сателлитных ДНК и составляет около 3% генома. Первоначально предполагалось, что эти участки генома никогда не транскрибируются. Однако в последние 20 лет данные представления пересмотрены, но функция транскриптов остается неясной. Известно, что в опухолях часто наблюдается многократное (в 100-1000 раз) усиление транскрипции пцтпДНК классических сателлитов 2 и 3 (HS2, HS3), функциональное значение которой неизвестно, однако известно, что она всегда ассоциирована с плохим прогнозом. В нашем исследовании мы показали на примере одного из гемобластозов (множественной миеломы) и солидной опухоли (аденокарциномы легкого), что на ранних стадиях, а также после терапии пцтпДНК HS2, HS3 транскрибируется преимущественно в клетках стромального компонента – мезенхимных стромальных клетках (МСК) и фибробластах. В обоих случаях клетки обладали выраженным опухоль-ассоциированным секреторным фенотипом и способностью усиливать хемотрезистентность опухолевых клеток. Факторы, индуцирующие поляризацию по опухоль-ассоциированному типу (TGF $\beta$ , интерлейкин 1 $\alpha$ , сокультивирование с опухолевыми клетками), индуцировали и экспрессию пцтпДНК в фибробластах и МСК. Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) в наших исследованиях по своему фенотипу во многом сходны с SASP-фибробластами (секреторный фенотип стареющих клеток). Ингибирование транскрипции антисмысловыми нуклеотидами приводило к снижению выраженности проинфламаторного, протуморогенного, опухоль-ассоциированного фенотипа фибробластов, снижало выраженность признаков SASP в них. В ряде препаратов ОАФ транскрипты локализованы в CD63<sup>+</sup> везикулах, что говорит о возможности их выхода во внеклеточную среду. Обработка опухолевых клеток аденокарциномы мыши кондиционированной средой опухоль-ассоциированных фибробластов человека приводила к появлению в ядрах клеток аденокарциномы транскриптов пцтпДНК

человека, что подтверждает данное предположение. В опухолях поздних стадий отмечено высокое содержание транскриптов пцтпДНК HS2 в собственно опухолевых клетках. Повышение уровня транскриптов пцтпДНК в опухолевых клетках после трансфекции их конструкциями, оверэкспрессирующими пцтпДНК, наблюдали морфологические изменения и появление маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. Блокирование транскрипции пцтпДНК HS2 в клетках аденокарциномы снижало уровень экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли пцтп ДНК HS2, HS3 в развитии опухолей: на ранних стадиях пцтпДНК накапливается в фибробластах и МСК, участвуя в их поляризации по опухоли-ассоциированному типу и стимулируя формирование протуморогенного микроокружения опухоли – опухолевой стромы и внеклеточного матрикса. По мере прогрессии опухоли, транскрипты (экзо- и эндогенные) появляются в опухолевых клетках, стимулируя в них эпителиально-мезенхимальный переход, являющийся одним из первых этапов метастазирования. Таким образом, ассоциация транскрипции пцтпДНК с плохим прогнозом связана с ролью этих последовательностей в формировании опухолевого микроокружения на ранних этапах и их участием в процессах метастазирования – на поздних стадиях развития опухоли.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования (Соглашение № 075-15-2021-1075, подписано 28.09.2021).

## **Гены развития и домашнего хозяйства: два типа организации в геноме дрозофилы**

**Жимулёв И.Ф.<sup>1</sup>, Ватолина Т.Ю.<sup>1</sup>, Левицкий В.Г.<sup>2</sup>, Цуканов А.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Разработан биоинформатический алгоритм локализации групп генов развития (3162 гена) и домашнего хозяйства (6562 гена) в полном геноме *Drosophila melanogaster*, обнаружены существенные различия в их организации, функционировании и локализации в хромосомах. Сделаны следующие выводы: (1) гены домашнего хозяйства занимают две структуры – промоторы расположены в междисках, а тела генов – в соседних серых дисках, гены развития располагаются полностью в черных компактных дисках. Таким образом, гены двух типов локализуются в разных структурах хромосом; (2) имеются существенные различия в составе и организации хроматина: гены домашнего хозяйства занимают состояния хроматина аквамарин/лазурит, гены развития – хроматин рубин; (3) обнаружены существенные различия в плотности упаковки хроматина в черных и серых дисках, и междисках, в которых расположены гены развития и домашнего хозяйства; (4) процессы инсуляции хроматина и элонгации транскрипции осуществляются разными белками и модифицированными гистонами у этих групп генов; (5) имеются различия в организации репликации - основная масса белков ORC расположена в районах промоторов генов домашнего хозяйства, и почти отсутствуют в генах развития; (6) существенно различаются принципы организации этих типов генов по длине интронов, экзонов, межгенных промежутков, по плотности расположения генов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00051-П, грантом РФФИ № 21-14-00240 и Программой фундаментальных научных исследований FWGZ-2021-0014.

## Первичная последовательность рДНК Японского перепела *de novo*

Жукова А.А.<sup>1</sup>, Сайфитдинова А.Ф.<sup>1,4</sup>, Галкина С.А.<sup>2</sup>, Демин А.Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный педагогический университет им. А.И.Герцена, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского Минздрава РФ, Саратов, Россия

<sup>4</sup> Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Определение первичной последовательности рДНК птиц относится к сложным задачам из-за высокой степени обогащения GC-парами и сложной организации внутренних повторяющихся элементов. На сегодняшний день наиболее полное описание рДНК выполнено для домашней курицы. В отличие от большинства птиц, японский перепел (*Coturnix japonica*) содержит в геноме не один, а три ядрышковых организатора (ЯОР), локализация одного из которых соответствует локализации ЯОР у курицы, а два дополнительных имеют терминальную локализацию на коротких плечах акроцентрических микрохромосом. Идентификация этих микрохромосом осложнена не полной сборкой референсного генома курицы, в которой отсутствует информация о соответствующих микрохромосомах. В то же время, ранее нами было показано, что транспозиция рДНК на короткие плечи микрохромосом связана с увеличением в этих районах блоков гетерохроматина. Отдельные элементы рДНК идентифицируются практически на всех акроцентрических микрохромосомах, тогда как функциональную активность демонстрируют только два терминальных ЯОР в наборе.

Для сборки кластера рибосомных генов (рРНК) японского перепела, включая транскрибируемые спейсеры и нетранскрибируемые участки, были использованы секвеннограммы, полученные методом Oxford Nanopore. Границы генов рРНК перепела были идентифицированы путем сравнения их с куриными (*Gallus gallus*) последовательностями под номером MG967540 в GenBank, а также определением начала и конца транскрипции. Для повышения качества консенсусной последовательности мы использовали биоинформатическую обработку и некоторые данные Illumina.

В результате была получена первичная последовательность рДНК Японского перепела длиной 21166 п.н., включающая 5'-ETS (1779 п.н.), 18S (1823 п.н.), ITS1 (2047 п.н.), 5.8S (157 п.н.), ITS2 (658 п.н.), 28S (4185 п.н.), 3'-ETS (639 п.н.) и IGS (9878 п.н.).

Ни один из участков кластера рДНК перепела, содержащего тандемные повторы, обогащенные полипуриновыми и полипиримидиновыми повторами, не был представлен в базах данных NCBI. Полученная последовательность была принята в GenBank под регистрационным номером OK523374.



## **Кариотип и геном *Macrostomum lignano*: необычный результат кариотипической и геномной эволюции после полногеномной дупликации**

**Задесенец К.С., Ершов Н.И., Бондарь Н.П., Рубцов Н.Б.**

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Ранее сравнительный молекулярно-цитогенетический анализ представителей рода *Macrostomum* показал, что три из них (*M. lignano*, *M. janickei*, *M. mirumnovem*) возникли в результате полногеномной дупликации (ПГД) и последующих хромосомных перестроек, вследствие которых возникла хромосома, объединившая в себе один комплект предковых хромосом. Неополиплоидное происхождение этих видов маскировано многочисленными хромосомными перестройками, включающими слияния хромосом. Мы показали, что хромосома MLI1 у *M. lignano* содержит крупные паралогичные районы, высокогомлогичные мелким хромосомам MLI2-4. Таким образом, эуплоидные особи *M. lignano* с нормальным кариотипом ( $2n=8$ ) фактически можно рассматривать как скрытые тетраплоиды, в то время как анеуплоидные особи с двумя экстрахромосомами MLI1 представляют собой скрытые гексаплоиды.

Для изучения организации генома *M. lignano*, а также особенностей эволюционных пост-ПГД преобразований в геноме у других макростомид, мы провели биоинформатический анализ опубликованных ранее геномных сборок *M. lignano* (высокоинбредная линия DV1), который обнаружил, что большая часть генома представлена трехкопийными паралогичными последовательностями, что предполагает наличие в геноме трех генетически изолированных субгеномов.

Сравнительный геномный анализ созданных нами *de novo* высокоинбредных линий DV1\_8 ( $DV1=8$ ) и DV1\_10 ( $2n=10$ ) выявил значительные различия между последовательностями копий хромосомы MLI1 при высоком уровне идентичности последовательностей нуклеотидов в гомологах мелких хромосом (MLI2-4). Применение нетривиального биоинформатического подхода, включающего мультивариантный к-мерный анализ и анализ существующих геномных сборок *M. lignano* путем самовыравнивания, нам удалось идентифицировать ДНК хромосомы MLI1 и верифицировать результат с помощью секвенирования ДНК-библиотеки из пула микродисектированных хромосом MLI1.

На основании полученных данных и проведенного анализа обсуждаются возможные механизмы формирования и последующего поддержания в геноме *M. lignano* трёх генетически изолированных субгеномов, их возможное значение и роль в видообразовании макростомид.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-0021. Проведение микроскопического анализа поддержано № FWNR-2022-0015.

## Взаимосвязь регуляции генов с 3D архитектурой генома на модели локуса *Kit/Kdr* мыши

Кабирова Э.М.<sup>1,2</sup>, Рыжкова А.С.<sup>1</sup>, Лукьянчикова В.А.<sup>1</sup>, Хабарова А.А.<sup>1</sup>,  
Баттулин Н.Р.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Физическое сближение энхансера с промотором усиливает транскрипцию гена. Такое сближение обеспечивают топологически ассоциированные домены (ТАДы) — петли хроматина, сформированные белковым комплексом когезином и ограниченные сайтами связывания белка CTCF. Полагают, что ТАДы выполняют регуляторную функцию. Изменение их структуры могут приводить к формированию новых эволюционных адаптаций, как показали для одной из адаптаций кротов к подземному образу жизни, связанной с перестройкой 3D организации локуса *Fgf9*. Однако большинство работ по нарушению структуры ТАДов демонстрируют, что ТАДы необязательны для поддержания паттерна экспрессии. Таким образом, до сих пор не существует единого взгляда на механизм влияния ТАДов на регуляцию экспрессии генов.

Для решения проблемы мы исследовали локус *Kit* мыши при различной регуляции в двух клеточных типах. Локус представлен двумя ТАДами, в каждом из которых расположен один из генов: *Kit* или *Kdr*. При этом они демонстрируют контрастную экспрессию в зависимости от клеточного типа: в тучных клетках и меланоцитах активен *Kit* (*Kdr* молчит), а в эндотелиальных клетках активен *Kdr* (*Kit* молчит). В таком дизайне эксперимента состоит новизна нашей работы (ранее изучали разные локусы преимущественно на эмбриональных стволовых клетках мыши)

Мы получили *in vivo* модель — линии мышей с удалёнными CTCF-сайтами на границе ТАДов в локусе *Kit*. Мы обнаружили, что нарушение структуры ТАДов приводит к эктопической активации *Kdr*, но только в меланоцитах. Это изменение сопровождается появлением новых пространственных контактов между ТАДами *Kit* и *Kdr* — они оказываются объединены. В тучных клетках ТАДы остались изолированы, а экспрессия генов осталась на прежнем уровне. Мы полагаем, что такое различие может быть объяснимо различным эпигенетическим ландшафтом локуса в меланоцитах и тучных клетках: расположением энхансеров и уровнем экспрессии гена *Kit*.

С одной стороны, наши данные согласуются со сложившимся представлением о необязательной роли ТАДов в регуляции. Но расширяют это представление знанием о возможной клеточной специфичности. Таким образом, хотя ТАДы вносят вклад в регуляцию экспрессии, их роль не является ключевой и зависит от других факторов, локус- и ткане-специфичность которых может объяснить противоречивость ранее получаемых результатов о регуляторной функции ТАДов.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ проект № 22-14-00247.

## Новый piРНК-независимый механизм регуляции мобильных элементов и теломер в гаметогенезе *Drosophila*

Калмыкова А.И.<sup>1</sup>, Соколова О.А.<sup>1</sup>, Кобеляцкая А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии РАН, г. Москва

Поддержание стабильности генома герминальных клеток принципиально важно для нормального развития и предотвращения генетических аномалий. Подавление активности мобильных элементов и поддержание теломер относятся к ключевым механизмам контроля генетической стабильности. Система с участием коротких Piwi-interacting RNA (piРНК), является важным механизмом транскрипционного сайленсинга транспозонов в гонадах животных. piРНК также участвуют в регуляции теломер дрозофилы, поддерживаемых за счет перемещения теломерных ретротранспозонов. Однако это не единственный механизм, участвующий в этих важных процессах. Контроль активности мобильных элементов и поддержание теломер регулируются на разных уровнях, различными механизмами, далеко не все из которых известны. Наше исследование выявило новый механизм транскрипционного сайленсинга МЭ и теломерных повторов с участием РНК-связывающего белка Ars2. Этот высококонсервативный белок с неизвестной биохимической активностью играет существенную роль в ядерном метаболизме многих типов РНК у растений, дрожжей, животных. Ars2 служит негативным регулятором экспрессии теломерной РНК у человека и дрозофилы. Мы обнаружили, что герминальный нокдаун Ars2 дрозофилы не влияет на представленность разных типов коротких РНК, в том числе piРНК, т.е. не нарушает работу piРНК системы. В то же время, нокдаун Ars2 вызывает сверхэкспрессию теломерных повторов и некоторых мобильных элементов, которая сопровождается появлением эпигенетических маркеров активного хроматина на последовательностях мобильных элементов и теломерных ретротранспозонов и повреждениями теломерной ДНК. Учитывая то, что Ars2 не является хроматиновым белком, мы предполагаем наличие нового механизма с участием Ars2, который передает сигнал от транскрибируемых мобильных элементов факторам ремоделинга хроматина. Чтобы выяснить, какие особенности мобильных элементов и их транскриптов распознает Ars2, мы использовали трансгены, содержащие теломерный ретротранспозон HeT-A. Наши данные позволяют предположить, что Ars2 узнает транскрипты, которые преждевременно терминируются в областях, содержащих необычные вторичные структуры ДНК. В целом, наше исследование выявило новый уровень регуляции транскрипции чужеродных элементов генома, независимый от piРНК, опосредованный Ars2 - фактором контроля качества РНК в ядре.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-14-00006 и Государственного задания № ГЗ 0088-2021-0007.

## Анализ геномных ландшафтов комаров рода *Anopheles*

Кириленко К.М., Шарахов И.В.

Лаборатория экологии, генетики и охраны окружающей среды, Томский государственный университет, г. Томск

e-mail: kirillkirilenko.tomsk@gmail.com

Изучение геномных ландшафтов малярийных комаров *Anopheles* позволяет раскрыть механизмы, лежащие в основе их устойчивости к инфекции и резистентности к инсектицидам, а также выявить потенциальные мишени для контроля малярии. Среди основных элементов геномного ландшафта выделяют кодирующие последовательности, повторяющиеся последовательности. Настоящая работа посвящена изучению геномных ландшафтов комаров *Anopheles*: *An. albimanus*, *An. arabiensis*, *An. coluzzi*, *An. funestus*, *An. stephensi*, *An. atroparvus*, *An. merus*, *An. freeborni* с целью дифференциации эу- и гетерохроматиновых участков генома, детального анализа представленности повторяющихся последовательностей разных семейств в геномах комаров.

Для изучения геномных ландшафтов были взяты хромосомные сборки представленных комаров из открытых баз данных RefSeq и GenBank. При наличии более одной сборки для указанных комаров выбирались наиболее новые сборки, полученные с помощью технологий длинных прочтений (PacBio, ONT). В тех случаях, когда для одного вида имелось множество сборок, полученных с помощью технологий длинных прочтений, выбиралась такая сборка, которая давала наибольший процент покрытия повторяющимися последовательностями по геному, исходя из предположения, что чем больше повторов, тем лучше собран гетерохроматин. Процент покрытия повторяющимися последовательностями определялся методом создания библиотеки повторов *de novo* программой RepeatModeler с последующей аннотацией генома RepeatMasker.

Для отобранных сборок комаров создавалась общая библиотека повторяющихся последовательностей с помощью пайплайна EDTA с опцией *-sensitive 1*, позволяющей дополнительно запустить RepeatModeler. Аннотация каждого генома на повторяющиеся последовательности проводилась с помощью RepeatMasker. Постпроцессинг файлов с переводом их в формат BED проводился с помощью пакета программ BEDOPS. Для более глубокого анализа в геномах комаров все типы повторяющихся последовательностей были разбиты на 4 группы, в соответствии с результирующим файлом EDTA: Класс I: Ретротранспозоны, Класс II: ДНК-транспозоны, Неизвестные (unknown) повторы, Простые повторы. Для дифференциации эу- и гетерохроматина в каждой из хромосом комаров последовательно проводилось разбиение на окна (бины) различной длины и

расчет покрытия повторами определенной группы в окнах. Анализ проводился с помощью библиотек pandas, Matplotlib, SciPy языка программирования Python. Также для визуализации использовалась программа IGV-browser, с предобработкой BED-файлов пакетом bedtools и получением BedGraph файлов. Предсказание генов производилось с помощью программы Augustus.

При анализе отдельных хромосомных сборок, замечено, что технологии длинных прочтений значительно увеличивают суммарное покрытие генома повторяющимися последовательностями. Так, в хромосомной сборке *An. atroparvus* 2013 года, полученной с помощью технологии Illumina, 7.53% генома покрыто повторяющимися последовательностями, тогда как в сборке 2021 года, полученной с помощью технологии PacBio – 30.21%. Что согласуется с литературными данными. Наибольшее покрытие повторяющимися последовательностями выявлено в геноме *An. arabiensis* (сборка ONT) – 30.43%, наименьшее покрытие в геноме *An. albimanus* (гибридная сборка illumina и ONT) – 5.65%. Выявлено, что наименее хаотично по геному малярийных комаров распределены повторяющиеся последовательности Класса I: ретротранспозоны. Ретротранспозоны составляют наибольшую часть повторяющихся последовательностей у *Anopheles*, заметно значительное увеличение числа повторов этого класса в области предполагаемого прицентромерного гетерохроматина, у большинства комаров замечены области, где возрастает покрытие этим классом повторов вдали от прицентромерных районов, также в этих областях в большинстве случаев снижено количество и покрытие генами. Эти участки генома – предполагаемый интеркалярный гетерохроматин. Для большинства из выявленных областей предполагаемого гетерохроматина, было статистически достоверно показано уменьшение количества генов по сравнению со средним количеством по всей хромосоме и увеличение покрытия повторов по сравнению со средним покрытием по всей хромосоме. Было замечено, что наилучшее разрешение визуализации достигается при размере окна равном 100 кб, такой размер окна может служить приближением к размеру реального интеркалярного гетерохроматина, однако для определения реальных его границ требуется разработка более сильных статистических методов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-14-00182.

## Перераспределение ядрышковых белков при тепловом шоке в клетках человека

Клушевская Е.С., Алембеков И.Р., Чуриков Н.А.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Ядрышко является самой большой немембранной органеллой ядра. До недавнего времени считалось, что основной функцией ядрышка является образование рибосомных субъединиц. В настоящее время обсуждается так же участие ядрышек во многих других процессах – в поддержании архитектуры ядра, в регуляции экспрессии генов, в энергетическом метаболизме и др. Известно, что ядрышки в клетках человека линии НЕК293Т, образуют частые контакты с генами, вовлеченными в дифференцировку и канцерогенез [4]. Нами были достаточно подробно изучены контакты генов *pPНК* с субтеломерной областью 4 хромосомы, которые пропадали после теплового шока. Контакты располагаются вокруг генов *DUX4* человека, кодирующих транскрипционные факторы, необходимые только в период раннего развития. Их экспрессия на более поздних стадиях развития приводит к одному из видов мышечной дистрофии [5]. С помощью флуоресцентной гибридизации (FISH) нам удалось на отдельных клетках определить, что при тепловом шоке количество этих контактов уменьшается более, чем в 2 раза; при этом увеличивается расстояние между фокусами гибридизации рДНК и *DUX4*, что согласуется с данными, полученными методом 4С.

Для того, чтобы определить, соответствуют ли в наших экспериментах фокусы гибридизации зондов рДНК активным или молчащим генам *pPНК*, мы окрашивали ядра антителами к UBF и нуклеолину. UBF участвует в формировании стабильного транскрипционного комплекса на промоторе генов *pPНК*, выполняет структурную функцию, взаимодействуя с межгенным спейсером и транскрибируемой областью активного ядрышкового организатора [1]. Нуклеолин связывается с рДНК и рРНК и необходим для синтеза и процессинга рРНК [3].

С помощью комбинации методов (FISH) и иммуноокрашивания мы наблюдали, что фокусы иммуноокрашивания антителами, в основном, совпадают с фокусами гибридизации рДНК. Количественный анализ и статистическую обработку изображений, полученных на конфокальном микроскопе, проводили с помощью программы ImageJ, с использованием инструмента для анализа колокализации сигналов флуоресценции JACoP, (Just Another Co-localization Plugin) [2]. Использовали коэффициент корреляции Пирсона, который учитывает интенсивность сигналов флуоресценции.

После теплового шока происходили изменения в интенсивности иммуноокрашивания указанных белков ядрышка. При тепловом шоке ассоциация между генами *pPНК* и нуклеолином немного, но достоверно снижалась ( $r$  от 0,752 до 0,695, при  $F=10,59$ ,  $p=0,002$ ). При этом почти в полтора раза увеличивалось количество фокусов нуклеолина,

несвязанных с фокусами гибридизации зонда рДНК. Напротив, ассоциация генов *pPHK* с UBF после теплового шока возросла ( $t$  от 0,896 до 0,944 при  $F=37,34$ ,  $p=0,000$ ), а число фокусов UBF, несвязанных с фокусами гибридизации rDNA, несколько уменьшилось (в 1,2 раза). Мы предполагаем, что такие изменения в связывании нуклеолина и UBF с генами *pPHK* связаны со структурными изменениями в ядрышках и снижением транскрипции генов *pPHK* после теплового шока.

С помощью включения FUrD метки и окрашивания антителами к ней и к нуклеолину, достоверных изменений в интенсивности флуоресценции между рДНК и FUrD, а так же между фокусами FUrD и нуклеолина до и после теплового шока не обнаружено.

Следовательно, значительного изменения уровня транскрипционной активности в области ядрышек в выбранных нами условиях не происходит. Ранее нами было обнаружено, что через 2,5 часа после теплового шока происходит достоверное изменение количества контактов ядрышек, но при этом не наблюдается изменения транскрипции генов, контактирующих с ядрышком. Изменения в транскрипции были зафиксированы только после более значительного периода восстановления (6 часов) [4]. Таким образом, при стрессовом ответе, в первую очередь происходят эпигенетические изменения в структуре хроматина генов *pPHK*, которые являются предпосылкой для изменения транскрипционной активности многих генов.

Список литературы:

1. Bell S.P., Learned R.M., Jantzen H.M., Tjian R. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis // Science. 1988. N 241. V. 4870. P. 1192-1197. doi: 10.1126/science.3413483
2. Bolte S., Cordelières F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy // Journal of Microscopy. 2006. V.6 N3. P. 213-232.
3. Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing // EMBO J. 1998. N 17. P. 1476–1486.
4. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Klushevskaya E.S., Slovohtov I.Y., Chechetkin V.R., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. rDNA Clusters Make Contact with Genes that are Involved in Differentiation and Cancer and Change Contacts after Heat Shock Treatment. // Cells. 2019. Nov 5; 8 (11): 1393.
5. van der Maarel S.M., Tawil R., Tapscott S.J. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and DUX4: breaking the silence // Trends. Mol. Med. 2011. N 17. P. 252–258. Doi. 10.1016/j.molmed.2011.01.001

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 21-14-00035.

## **Изучение механизмов работы промоторов гетерохроматиновых генов**

**Козлов Е.Н., Соколов В.В., Пекина Ю.В., Максименко О.Г., Георгиев П.Г., Федотова А.А.**

Институт биологии гена РАН, г. Москва

В прицентромерном гетерохроматине дрозофилы находится большая группа генов домашнего хозяйства, которые активно транскрибируются. При этом промоторы этих генов не работают в эухроматине. Для исследования механизмов работы промоторов в гетерохроматине были выбраны два архитектурных белка с кластерами цинковых пальцев C2H2 типа, E(var)3-9 и Odj, которые взаимодействуют с основным белком гетерохроматина HP1. К белкам были получены специфичные поликлональные антитела, которые позволили провести полногеномное исследование сайтов связывания для этих белков. Было показано, что E(var)3-9 и Odj связываются с промоторами гетерохроматиновых генов. Для обоих белков были определены участки, которые взаимодействуют с HP1 и белком CP190. Ранее было показано, что белок CP190 совместно с Z4 и Chriz определяют активность промоторов эухроматиновых генов домашнего хозяйства. Для исследования функциональной роли доменов в архитектурных белках, которые взаимодействуют с HP1 и CP190, были получены платформы с заменой генов e(var)3-9 и odj на attP сайты, что в дальнейшем позволит проводить ре-интеграцию мутантных вариантов генов. Полученные платформы позволят провести анализ регуляции работы генов, расположенных в гетерохроматине и описать функционирование их промоторов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 22-24-00894



## Политенные хромосомы дрозофилы как инструмент для исследования вероятностной природы инициации репликации

### *Drosophila* polytene chromosomes as a tool for studying the probabilistic nature of replication initiation

Колесникова Т.Д.<sup>1</sup>, Воробьева Н.Е.<sup>2</sup>, Довгань В.В.<sup>1</sup>, Schubert V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН, г. Москва

<sup>3</sup> Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben, Seeland, Germany

Политенная хромосома состоит множества точно выровненных нитей ДНК. Если какой-то фактор с большой вероятностью присутствует в определенном геномном локусе, то его сигнал в политенной хромосоме будет виден в виде полосы, перпендикулярной оси хромосомы. Если фактор встречается в локусе с низкой вероятностью, при его выявлении цитологическими методами мы увидим точечные сигналы. Мы использовали это свойство для исследования вероятностной природы инициации репликации. Нами был разработан подход к изучению ранней инициации репликации в политенных хромосомах слюнных желез *D. melanogaster* на основании индукции эктопической S фазы слабым тепловым шоком у линий, несущих трансген *hsp70-CycE* (Knoblich et al., 1994). Микроскопия сверхвысокого разрешения со структурированным освещением (3D-SIM) позволила нам идентифицировать множественные дискретные сигналы импульсного включения маркера репликации 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) и исследовать поведение сигналов репликации в первые минуты S-фазы на ультраструктурном уровне. Мы показали, что инициация репликации в политенных хромосомах происходит преимущественно в интервалах между наиболее компактными дисками политенных хромосом, а внутри этих интервалов инициация носит вероятностный характер. Каждый интервал действует как зона инициации репликации, где на каждой нити ДНК репликация иницируется лишь на одном из потенциальных ориджинов репликации. Эти зоны существенно различаются по вероятности инициации репликации в единицу времени. Мы обнаружили около 40 очень эффективных сайтов инициации ранней репликации, в которых инициация происходит на большинстве нитей политенной хромосомы в первые несколько минут S-фазы. Большинство этих сайтов совпали с локусами экдизон-зависимых генов. Эти гены последовательно активируются в ходе так называемого экдизонового каскада, инициируемого изменениями титра гормона экдизона. Эти локусы соответствуют экдизон-зависимым пуфам, образующимся в политенных хромосомах на более поздних

стадиях развития. В политенных хромосомах слюнных очень эффективные сайты инициации ранней репликации ярко окрашиваются антителами к белку рецептора экидона (EcR). EcR функционирует как лиганд-зависимый фактор транскрипции, который регулирует экспрессию гена-мишени путем связывания сайтами-мишенями в их промоторных или энхансерных областях. Мы обнаружили, что некоторые хромосомные локусы демонстрировали эффективную инициацию репликации на всех анализируемых стадиях личиночного развития, тогда как другие выступали в роли эффективных сайтов инициации репликации только на определенных стадиях. Способность локусов рано и эффективно иницировать репликацию может предшествовать транскрипции в локусе и сохраняться в течение некоторого времени после прекращения транскрипции в ходе дальнейшего развития. Сравнение высокоэффективных сайтов инициации репликации в клетках слюнных желез, распределения пиков на треке «ранние ориджины репликации в клетках S2» (MacAlpine et al., 2010) с опубликованными данными по распределению EcR, Orc2, модификациям гистонов и распределению факторов транскрипции позволило сделать вывод что наиболее эффективные ориджины/кластеры ориджинов появляются в участках хромосом с несущих энхансерные маркеры.

Исследование поддержано бюджетным проектом FWGZ-2021-0014.

## Роль фактора сборки и ремоделирования хроматина Chd1 в регуляции дозовой компенсации у дрозофилы

Конев А.Ю., Кучинская Я.А., Репинская Ж.А., Гненная Ю.А., Тютюнник А.А., Барановская И.Л., Рыбалкина А.А.

НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, г. Гатчина

Дозовая компенсации (ДК) обеспечивает равный уровень экспрессии генов X-хромосомы между обоими полами у гетерогаметных организмов. У дрозофилы она достигается в результате увеличения экспрессии X-хромосомных генов у самцов примерно в два раза. Центральную роль в процессе ДК у *Drosophila melanogaster* играет комплекс дозовой компенсации MSL, включающий в себя белки MSL1-MSL3 (male-specific lethal), ацетилтрансферазу MOF, РНК геликазу MLE и две длинные некодирующие РНК (roX1 и roX2). Дозовая компенсация широко используется в качестве модельной системы для изучения фундаментальных механизмов генетической и эпигенетической регуляции, поскольку она требует специфического нацеливания регуляторных факторов на X-хромосому и координированной тонкой регуляции экспрессии множества генов.

АТФ-зависимые хроматин-ремоделирующие факторы определяют структуру хроматина уровне и крайне существенны для регуляции экспрессии генов, однако об их роли в процессе ДК известно очень мало. Фактор сборки и ремоделирования хроматина CHD1 способен сдвигать нуклеосомы и индуцировать регулярное расстояние между ними, собирать хроматин *in vitro* и *in vivo*, его гомологи у человека вовлечены в развитие ряда тяжёлых заболеваний, в том числе в канцерогенез. При исследовании морфологии политенных хромосом нуль-мутантных по гену *Chd1* особей мы обнаружили, что, в то время как мутантные самки имеют нормальную структуру хромосом, X-хромосома самцов становится укороченной и утолщенной, четкость дискового рисунка снижается. Ранее нами было показано, что белок CHD1 необходим для независимой от репликации сборки хроматина, содержащего вариантный гистон H3.3, на уровне всего генома в мужском пронуклеусе дрозофилы. Нами обнаружено, что сочетание делеции одного из двух кодирующих гистон H3.3 генов - *His3.3B* с нуль-мутациями по гену *Chd1* приводит к синтетической летальности. У самцов, несущих делецию *His3.3B* в сочетании с нуль – мутацией по гену *Chd1*, морфология X-хромосомы в слюнных железах личинок изменена существенно сильнее по сравнению с особями, несущими только мутации *Chd1*. Локализация ацетилированного по лизину 4 гистона H4 и вариантного гистона H3.3 выглядит нарушенной в X-хромосомах мутантных по гену *Chd1* самцов.

Мы проанализировали влияние сверх-экспрессии нативной, либо каталитически не активной (не имеющей АТФ-азной активности) форм CHD1 в слюнных железах на распределение белков комплекса MSL в хромосомах. Сверх-экспрессия CHD1 (как нативной, так и каталитически не активной формы) приводит к появлению эктопических сайтов локализации комплекса ДК в аутосомах. В эктопических сайтах выявляются белки MOF и MSL1, что свидетельствует о формировании в них комплекса ДК. Такое изменение локализации комплекса ДК свидетельствует о де-регуляции нацеливания комплекса на X-хромосому в результате сверх – экспрессии CHD1, подобно тому, как это наблюдается при других нарушениях функционирования комплекса дозовой компенсации.

Для изучения влияния мутаций *Chd1* и его сверх – продукции на экспрессию генов в процессе ДК мы исследовали уровень транскрипции локализованных в X – хромосоме длинных некодирующих РНК *roX1* и *roX2* с помощью ОТ-ПЦР. Экспрессию *roX1* и *roX2* РНК анализировали у нуль-мутантов по гену *Chd1* и особей дикого типа в слюнных железах, у личинок третьего возраста и в головах 4-х и 10-дневных имаго. Во всех случаях экспрессия *roX1* либо *roX2* РНК у самцов увеличена или не изменена. Наиболее сильное влияние нуль-мутаций по гену *Chd1* наблюдается в головах 4-х и 10-дневных самцов, где экспрессия *roX1* РНК увеличена соответственно в 3,9 и 3,4 раза. В то же время у самок экспрессия *roX* РНК не изменена (*roX1*) или понижена (*roX2*). Сверх – экспрессия обоих *Chd1* - трансгенов приводит к подавлению экспрессии *roX* РНК. Проведенный анализ показал, что CHD1 дифференциально регулирует экспрессию *roX1* и *roX2* РНК у самцов и самок и является у самцов супрессором, ограничивающим уровень их транскрипции.

Для прямого исследования влияния мутаций в гене *Chd1* на процесс дозовой компенсации мы проанализировали глобальную экспрессию генов в X-хромосоме и аутосомах у самцов и самок дрозофилы на личиночной стадии с помощью РНК-секвенирования. Мы обнаружили, что у самок, мутантных по гену *Chd1* экспрессия генов в X – хромосоме и аутосомах не различается. В то же время у самцов мы выявили достоверное увеличение транскрипции X-хромосомных генов по сравнению с аутосомными. Таким образом, мы обнаружили, что CHD1 дрозофилы непосредственно вовлечен в регуляцию дозовой компенсации, являясь аттенуатором, ограничивающим увеличение транскрипции кодирующих белки X-хромосомных генов у самцов в ходе этого процесса.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121060200127-6 Функциональная и структурная организация сложных, мультикомпонентных биологических систем и их динамика).

## Механизм дальнего взаимодействия p53-зависимого энхансера 75C6 и гена *Xrp1* у *Drosophila melanogaster*

Конопатов А.В.<sup>1</sup>, Конова К.Ю.<sup>1</sup>, Лебедева Л.А.<sup>1</sup>, Шедл П.<sup>1,2</sup>, Шидловский Ю.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория регуляции экспрессии генов в развитии, ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Лаборатория молекулярной биологии, Принстонский университет, Принстон, США

<sup>3</sup> Кафедра биологии и общей генетики, ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Высококонсервативный фактор транскрипции белок p53 активируется под действием ионизирующего излучения. В геноме он связывается с энхансером p53RE, расположенным в локусе 75C6, и индуцирует экспрессию не только близлежащих (около 300 тпн) к энхансеру генов *Reaper*, *Sickle* и *Head Involution Defective*, но также и гена *Xrp1*, находящегося более чем в 20 Мпн от энхансера. В 3С-экспериментах было показано, что p53RE физически контактирует с геном *Xrp1 in vivo*. Этот вывод подтверждается экспериментами с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH), в которых продемонстрирована их совместная локализация после облучения. Такой контакт p53RE с *Xrp1* является уникальным примером супер-дальнего взаимодействия (так как они располагаются на разных плечах хромосомы). Молекулярный механизм, обеспечивающий взаимодействие между *Xrp1* и p53RE, неизвестен. Предполагается, что этот механизм опосредован специфическими архитектурными элементами, например, инсуляторами, которые играют ключевую роль в формировании хромосомной структуры высокого порядка. В соответствии с этой гипотезой, методом ChIP около последовательности p53RE были выявлены сайты связывания некоторых белков (GAF, Su(Hw) и CTCF), способность которых участвовать в активации генов была уже показана ранее на аналогичных моделях активации. Помимо этого, биоинформатический анализ показал наличие известных сайтов связывания перечисленных белков в локусе гена *Xrp1*.

Однако непосредственная роль указанных архитектурных факторов в активации гена *Xrp1* еще предстоит показать, что и стало целью нашей работы. Для этого мы использовали два основных подхода.

В первом случае мы провели мутагенез области p53RE. Фрагмент, содержащий 75C6 энхансер и сайты связывания архитектурных факторов, был удален и заменен мутантными формами, в которых были удалены отдельные сайты связывания указанных белков.

Эмбрионы полученных линий дрозофилы мы облучили, и методом FISH изучили влияние мутагенеза на формирование контактов *p53RE* – *Xrp1* в пространстве ядер.

Во втором случае ген *Xrp1* был разделен на шесть частей с целью найти область, ответственную за формирование контакта с *p53RE*. Каждый из этих фрагментов был помещен в репортерную конструкцию с геном *GFP*, а затем интегрирован в различные локусы на правом плече третьей хромосомы. У полученных линий мы проверили активацию репортера при облучении.

Таким образом, наше исследование позволит выявить последовательности ДНК и белковые факторы, которые необходимы для формирования дальних взаимодействий между геном *Xrp1* и энхансером *p53RE*.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 20-14-00201.

## **Моделирование механизмов укладки хроматина в хромосомах типа ламповых щёток**

**Константинов В.В.<sup>1,2</sup>, Лагунов Т.А.<sup>1,2</sup>, Нурисламов А.Р.<sup>1,2</sup>, Гридина М.М.<sup>1</sup>,  
Куликова Т.В.<sup>3</sup>, Красикова А.В.<sup>3</sup>, Фишман В.С.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ИЦиГ СО РАН

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет

Хромосомы типа ламповых щёток формируются на определённых стадиях развития ооцитов большинства животных, исключая млекопитающих, и представляют собой мейотический бивалент, состоящий из четырех сестринских хроматид (по две для каждого гомолога), с большой степенью деконденсации хроматина и стабильной хромомерно-петлевой организацией. Сестринские хроматиды в таких бивалентах соединены между собой когезинами, а хроматин в хромомерах упакован с участием комплекса конденсин.

Благодаря их гигантским размерам, хромосомы типа ламповых щёток можно изучать даже с помощью световой микроскопии, сопровождаемой достаточно простыми методами визуализации хроматина. Более того, недавнее появление методов анализа конформации хромосом в единичных клетках позволило нам вместе с коллегами получить уникальную информацию о паттернах трехмерных контактов хроматина в хромосомах типа ламповых щёток в ооцитах курицы. Несмотря на это, а также на длительную историю изучения хромосом-”ламповых щёток”, механизмы их формирования до сих пор остаются не до конца изученными и не объясняются в рамках существующих моделей. Например, согласно полученным нами данным, в границах контактных доменов отсутствует обогащение сайтами посадки CTCF белков.

В нашей работе мы предлагаем механизм формирования доменов хроматина в хромосомах типа ламповых щёток путём смещения экструдеров активной транскрипцией из конденсированного состояния. Для проверки этого механизма мы провели моделирование хромосомы как полимера методами молекулярной динамики. Для проверки адекватности модели была смоделирована конкретная хромосома курицы и проведено сравнение карты контактов, полученной в модели, с картой экспериментальной карты контактов, полученной методом single cell Hi-C. Мы продемонстрировали, что возможно образование временных доменов (не привязанных к последовательности ДНК) путём активной экструзии хроматина экструдерами без барьерных белков, и что активная транскрипция может выступать барьером для формирования стабильных доменов хроматина.

Работа поддержана грантом РФФ 22-14-00247.

## **PCID2 субъединица комплекса TREX-2 *D. melanogaster* имеет два РНК-связывающих района, необходимых для экспорта мРНК из ядра**

**Копытова Д.В., Вдовина Ю.А.**

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Белок PCID2 *D. melanogaster* является субъединицей комплекса ядерного экспорта мРНК эукариот TREX-2. Несмотря на продолжительное изучение этого комплекса у эукариот, остается неисследованным, как взаимодействует TREX-2 с мРНК у многоклеточных. Ранее, у *S. cerevisiae* было показано, что во взаимодействии с РНК участвуют два белка комплекса: Thp1 и Sac3. Было показано, что эти два белка образуют общую РНК-связывающую поверхность, независимо же друг от друга эти белки с РНК не взаимодействуют. В данной работе мы показали специфичное взаимодействие белка PCID2 *D. melanogaster* (гомолога Thp1 *S. cerevisiae*) с 3'-некодирующей областью мРНК гена *ras2*. Мы идентифицировали домены PCID2, участвующие во взаимодействии с мРНК гена *ras2* у *D. melanogaster* методом EMSA. Домен, локализованный на С-конце PCID2 (С), гомологичный РНК-связывающему домену Thp1 *S. cerevisiae*, специфически связывает фрагмент 3'-некодирующей области мРНК гена *ras2*. Этот домен также взаимодействует с Xmas-2 (гомолог Sac3 *S. cerevisiae*), но Xmas-2 не является необходимым для взаимодействия PCID2 с РНК. Мы также нашли ранее неизвестный домен (М) PCID2, находящийся в центральной части белка, неспецифически связывающийся с мРНК. Точечные мутации эволюционно консервативных аминокислот в М-домене приводят к полному исчезновению взаимодействия PCID2 с РНК в то время, как делеция С-домена PCID2 приводит только к частичному уменьшению связывания. Мутации в М домене также нарушают ядерный экспорт мРНК. Таким образом, неспецифическое взаимодействие М-домена PCID2 с РНК необходимо для специфического связывания С-домена PCID2 и экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Наши данные также показывают, что в отличие от Thp1 *S. cerevisiae*, PCID2 *D. melanogaster* может взаимодействовать с РНК независимо от других субъединиц комплекса.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 22-14-00270 и гранта 075-15-2019-1660 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Центра высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН.



## **Акустический стресс изменяет динамику длины теломер и активность теломеразы у *Danio rerio***

**Королева А.Г., Аvezова Т.Н., Волкова А.А., Яхненко В.М., Кирильчик С.В., Глызина О.Ю., Черезова В.М., Суханова Л.В., Сапожникова Ю.П.**

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

Слух — одна из важных способностей рыб. Он необходим при ориентации в пространстве, отслеживании добычи или врага, размножении и общении особей между собой. Однако в условиях возрастающего шумового загрязнения водной среды гидробионты сталкиваются все с большей опасностью (Amorim et al., 2022). Нарушение слуха ведет к снижению выживаемости, нестандартному поведению и хроническому стрессу, который влияет на целостность и регуляцию генома, метаболизм, защитные функции (Popper et al., 2019; Wong et al., 2022; Amorim et al., 2022). Для каждого вида имеется свой порог повреждений и свои сроки восстановления (Popper et al., 2005; Jiakun et al., 2008).

В этой работе мы изучали влияние звука разной частоты на теломерную биологию рыб *Danio rerio* дикого типа и цветных ГМО (встроен ген красного флуоресцирующего белка). Хотя *D. rerio* является модельным организмом, в исследованиях реакций на акустический стресс остаются значительные бреши (Popper, Sisneros, 2022). Слуховая чувствительность взрослых рыб находится в диапазоне 600-800 Гц, а естественный уровень звука для данио составляет 102-104 дБ (Wang et al., 2015). Антропогенное воздействие в естественной среде и уровень шума в аквариумных комплексах превышает эти значения, что влияет на здоровье рыб. Громкий звук (1000-2000 Гц при 150 дБ) меняет поведение рыб, увеличивает их тревожность, приводит к повреждениям слухового эпителия (Shafiei et al., 2016; Breitzler et al., 2020; Lara et al., 2022; Popper, Sisneros, 2022), но эффекты акустического стресса на молекулярном уровне у *D. rerio* пока неизвестны. Наша работа — одна из первых в этом отношении. Эксперимент проводился в условиях уникальной научной установки «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» при Лимнологическом институте СО РАН. Рыбы подвергались воздействию белого шума и 1000 Гц при 150 дБ в течение недели. После им давался месяц на восстановление. Для анализа были выбраны известные маркеры стресса — теломеры и теломераза (Lin, Epel, 2022; Salmon et al., 2016; Injaian et al., 2019; Grunst et al., 2020; Sapozhnikova et al., 2021). Исследовались целевая ткань (слуховой эпителий), мозг и мышцы. ДНК выделялась фенол-хлороформным методом (Sambrook et al., 1989); белки с РНК экстрагировались с помощью раствора, содержащего CHAPS. Анализ длины

теломер осуществлялся методом Q-PCR во всех тканях (Cawthon, 2002). Q-TRAP использовался для определения активности теломеразы только в мозге (Yip et al., 2017).

Было выявлено, что стрессовый фактор влияет не столько на конечную величину анализируемых признаков (длину теломер или активность теломеразы), сколько на динамику этих признаков. Причем в разных тканях и у разных полов звуковое воздействие имело разный характер. В слуховом эпителии *D. rerio* теломерная ДНК была очень стабильна как у рыб дикого типа, так и у ГМО. Однако по другим тканям было видно, что рыбы дикого типа больше чувствительны к белому шуму, тогда как ГМО рыбы реагировали на все виды шума. Интересно, что активность теломеразы при любом шумовом воздействии у обоих полов дикого типа и ГМО всегда увеличивалась.

Если стресс сказывается на динамике длины теломер и активности теломеразы, то он затрагивает регуляцию этих признаков. Ранее был сформулирован вывод, что не длина теломер определяет продолжительность жизни, а скорость ее укорочения, т.е. динамика (Whittemore et al., 2019). Возможно поэтому акустический стресс, как любой другой стресс, ускоряет старение. У *D. rerio* он проявляется на разных уровнях: приводит к повреждениям волосковых клеток в ушах, меняет поведенческие реакции, а также провоцирует изменения на молекулярном уровне, дестабилизируя концевые районы хромосом и механизмы их поддержания.

Исследование выполнено за счет бюджетной темы No. 0279-2021-0005 (121032300224-8) при финансовой поддержке РФФИ и МОКНСМ в рамках научного проекта №20-54-44017 Монг-а.

## Гистон метилтрансферазы Su(var)3-9 и SetDB1 дрозофилы

Коряков Д.Е.<sup>1</sup>, Романов С.Е.<sup>1,2</sup>, Калашникова Д.А.<sup>1,2</sup>, Максимов Д.А.<sup>1,2</sup>,  
Шлома В.В.<sup>1,2</sup>, Лактионов П.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Модификации гистонов являются эпигенетическими метками, которые играют важную роль в активации или инактивации генов эукариот. Одной из основных меток, вовлеченной преимущественно в процесс инактивации, является метилирование H3K9. У дрозофилы известны три консервативных фермента, способных устанавливать эту модификацию: Su(var)3-9, SetDB1 и G9a. При помощи метода DamID-seq мы определили профили распределения Su(var)3-9 и SetDB1 на хромосомах слюнных желез. Оказалось, что Su(var)3-9 – это преимущественно гетерохроматиновый белок, который преобладает в повторенных последовательностях, а SetDB1 – это в основном эухроматиновый белок, который сосредоточен в TSS и 5'UTR повсеместно активных генов. Сравнение этих профилей с распределением H3K9me2 продемонстрировало высокую корреляцию Su(var)3-9 с этой модификацией и неожиданно низкую корреляцию с ней для SetDB1.

Распределение Su(var)3-9 на хромосомах слюнных желез и питающих клеток ооцитов у мутантов *egg* (ген, кодирующий SetDB1) показало, что SetDB1 необходим для связывания Su(var)3-9 со многими уникальными генами, и не влияет на связывание Su(var)3-9 с повторенными последовательностями, хотя есть исключения. Так, большие кластеры piRNA (42AB и 38C) по-разному связывают Su(var)3-9 в хромосомах соматических клеток и клеток зародышевого пути. Если в слюнных железах Su(var)3-9 связывается с кластерами независимо от SetDB1, то в питающих клетках ооцитов – зависимо.

Чтобы исследовать как одновременное отсутствие SetDB1 и Su(var)3-9 влияет на развитие мух, мы объединили эти мутации в одной линии. Оказалось, что двойная мутация *egg; Su(var)3-9* значительно снижает жизнеспособность эмбрионов, в меньшей степени влияет на рост личинок, но вызывает их гибель перед и во время метаморфоза. RNA-seq показал, что в слюнных железах и крыловых имагинальных дисках двойная мутация влияет на экспрессию разных групп генов, которые мало обогащены H3K9me2, а большинство из них не являются прямыми мишенями SetDB1 или Su(var)3-9. Вопреки ожиданиям, у двойных мутантов H3K9me2/me3 не исчезают полностью, а сохраняется в остаточном количестве, что предполагает существование у дрозофилы как минимум еще одного фермента, способного метилировать H3K9.

Исследование поддержано грантом РФФ 23-24-00114.

## **Транскриптом ядер ооцитов домашней курицы: полный спектр последовательностей, транскрибируемых на латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток**

**Красикова А.В.<sup>1</sup>, Куликова Т.В.<sup>1</sup>, Щелкунов М.И.<sup>2,3</sup>, Макарова Н.Е.<sup>2</sup>, Попов А.<sup>2</sup>, Федотова А.В.<sup>2,4</sup>, Бернгардт В.А.<sup>1</sup>, Маслова А.В.<sup>1</sup>, Федоров А.В.**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Центр коллективного пользования в области геномики, Сколковский институт науки и технологий, Москва

<sup>3</sup> Институт проблем передачи информации РАН, Москва

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

У всех позвоночных, за исключением плацентарных и сумчатых млекопитающих, оогенез протекает по гипертранскрипционному типу, сопровождающемуся чрезвычайно высокой скоростью синтеза РНК в ядре ооцита (также называемом зародышевым пузырьком). Во время гипертранскрипционной стадии оогенеза хромосомы приобретают выраженную хромомерно-петлевую морфологию. Материнские РНК, производимые и хранящиеся в ооците, служат как РНК-матрицами для синтеза белка, так и некодирующими регуляторами экспрессии генов на ранних стадиях эмбриогенеза. Транскриптомы целых ооцитов интенсивно изучаются. Однако спектр последовательностей, транскрибируемых на хромосомах типа ламповых щеток в ооцитах птиц, оставался малоизученным. Здесь мы впервые охарактеризовали весь спектр транскрибируемых последовательностей по всей длине всех хромосом типа ламповых щеток в кариотипе курицы, включая половые и точечные хромосомы. С этой целью мы секвенировали тотальную и полиаденилированную РНК из ядер и цитоплазмы ооцитов с последующим выравниванием прочтений против полностью расшифрованного генома курицы. Мы определили спектр материнских РНК, которые синтезируются на латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток, передаются в зиготу и сохраняются на ранних стадиях эмбриогенеза. В частности, мы установили паттерн экспрессии генов на хромосоме W на стадии диплотены. При анализе фракции РНК из ядер ооцитов мы получили более полный набор транскриптов, включая длинные некодирующие РНК, удерживаемые в ядре. Транскрипция массивов tandemных повторов, включая повторы длиной 41 п.н., а также уникальных центромерных последовательностей, была также верифицирована путем выравнивания результатов секвенирования внутриядерной РНК с полностью расшифрованными последовательностями всех хромосом в кариотипе. Визуальный анализ профилей экспрессии для сотен транскрибируемых генов показал, что внутриядерная РНК содержит как полноразмерные транскрипты генов, так и интронные последовательности.

Поскольку для многих генов мы обнаружили полноразмерные внутриядерные транскрипты, мы задались целью обнаружить вновь синтезируемые РНК *in situ*. В целом, с помощью РНК-FISH мы визуализировали транскрипцию 42 белок-кодирующих генов и 8 генов длинных некодирующих РНК на латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток. Был продемонстрирован ко-транскрипционный сплайсинг вновь синтезируемой РНК на латеральных петлях хромосом. Полученные результаты показали, что по данным секвенирования внутриядерной РНК из ооцитов можно предсказывать хромомерно-петлевую организацию геномного участка на хромосомах типа ламповых щеток. Мы также охарактеризовали спектр регуляторных некодирующих РНК, транскрибируемых на этой стадии оогенеза, включая длинные некодирующие РНК, короткие РНК и кольцевые РНК. Результаты проведенного исследования демонстрируют вклад транскриптов, синтезируемых на латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток, в пул материнских РНК, которые играют важную роль на самых ранних стадиях эмбриогенеза.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ проект № 19-74-20075 с использованием оборудования ресурсных центров "Молекулярные и клеточные технологии" (Санкт-Петербургский государственный университет) и Центра коллективного пользования в области геномики (Сколковский институт науки и технологий).

## **Картирование крупномасштабных доменов хроматина на хромосомах типа ламповых щеток домашней курицы**

**Куликова Т.В., Родригес Рамос Х.С., Суркова А.Ю., Маслова А.В., Красикова А.В.**

Санкт-Петербургский Государственный Университет, г. Санкт-Петербург

Хромосомы типа ламповых щеток формируются в диплоидных ооцитах большинства классов позвоночных. На стадии ламповых щеток хроматин хромосом организуется в выраженную хромомерно-петлевою структуру, в которой выделяются два типа доменов – хромомеры и латеральные петли. В хромомерах хроматин конденсирован, а в латеральных петлях полностью деконденсирован и вовлечен в процесс гипертранскрипции.

Хромосомы типа ламповых щеток домашней курицы и других видов птиц демонстрируют гетерогенность распределения хромомеров вдоль осей хромосом и длинные латеральные петли. Некоторые участки хромосом могут быть представлены плотными крупными хромомерами с относительно короткими латеральными петлями, тогда как другие формируют рыхлые и мелкие хромомеры и длинные латеральные петли. Ранее, на основании этих характеристик, а также картирования геномных последовательностей были составлены цитологические карты хромосом типа ламповых щеток домашней курицы (Galkina et al., 2006; Zlotina et al., 2012).

Мы проанализировали характер иммунокрашивания хроматина на стадии ламповых щеток с помощью антител против белка гетерохроматина HP1b, триметилированного по лизину 9 гистона H3 и ацетилюрованного гистона H4, а также с помощью антител против 5-метилцитозина. В результате была выявлена гетерогенность в распределении 5-метилцитозина и триметилированного по лизину 9 гистона H3 вдоль осей хромосом. На основании этих данных были составлены карты распределения эпигенетических маркеров открытого и закрытого хроматина вдоль осей макрохромосом домашней курицы на стадии ламповых щеток.

Полногеномные исследования трехмерной архитектуры хроматина в интерфазном ядре многих таксонов эукариот, основанные на выявлении попарных взаимодействий, позволили выделить домены хроматина, характерные для интерфазного ядра. Так, с помощью метода Hi-C было выявлено два крупномасштабных домена хроматина – А и В компартменты (Lieberman-Aiden et al., 2009). Число контактов в пределах В компартментов выше, чем в А компартментах, соответственно хроматин в В компартментах упакован плотнее, это свойство также коррелирует с обогащенностью В компартментов эпигенетическими маркерами закрытого хроматина и более низкой транскрипционной активностью (Rao et al., 2014; Rowley et al., 2017).

Поэтому мы провели сопоставление А и В компартментов интерфазного ядра соматических клеток и сегментов хромосом типа ламповых щеток из ооцитов домашней курицы. Используя данные Hi-C эмбриональных фибробластов курицы (Fishman et al., 2019), мы сопоставили распределение А/В компартментов вдоль макрохромосом в этих клетках с распределением хромомеров в хромосомах типа ламповых щеток. Кроме того, мы подобрали ВАС-клоны из библиотеки CHORI-261 к геномным участкам, соответствующим А и В компартментам в соматических клетках, и провели FISH-картирование этих участков на хромосомах типа ламповых щетках домашней курицы.

Оказалось, что геномные участки, соответствующие конститутивным В компартментам в соматических клетках, на стадии хромосом типа ламповых щеток часто находятся в составе кластеров более плотных крупных хромомеров с относительно короткими латеральными петлями. Эти же кластеры демонстрируют обогащение эпигенетическими маркерами закрытого хроматина.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ проект № 19-74-20075.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров «Научного парка» СПбГУ («Развитие молекулярных и клеточных технологий»).

## Генетическое разнообразие лошадей саргаринско-алексеевской культуры Обь-Иртышья Западной Сибири

Куслий М.А.<sup>1,2</sup>, Графодатский А.С.<sup>1</sup>, Тишкин А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Алтайский государственный университет, г. Барнаул

В археологическом и историческом плане саргаринско-алексеевская культура Обь-Иртышья Западной Сибири позднего бронзового века является довольно глубоко изученной. Происхождение этой культуры связано с эволюцией андроновской культуры бронзового века индоиранского происхождения. Вопросы о других культурах (помимо андроновской), внесших свой вклад в формирование вышеназванной культуры, о её разделении на локальные варианты и о преемственности по отношению к более поздним культурам региона остаются открытыми до настоящего времени. Для того чтобы внести свой вклад в разрешение этих вопросов мы исследовали митохондриальные геномы 5 лошадей этой культуры путем высокопроизводительного секвенирования обогащенных геномных библиотек и последующего филогеографического анализа. Полученные данные позволили нам определить генетическое разнообразие по материнской линии исследованных лошадей этой культуры. Как оказалось, они относятся к 4 гаплогруппам (E, M, Q, R по классификации Ахилли и соавторов), при этом самые близкие к их митотипам гаплотипы принадлежат лошадям ахалтекинской породы с центром происхождения в Центральной Азии, иранской породы со Среднего Востока и породы мареммано Южной Европы (Италия). В определенные нами гаплогруппы также входят некоторые древние лошади культуры херексуров и “оленных” камней Монголии позднего бронзового – раннего железного веков и бийкенской культуры Алтая раннего железного века. Это свидетельствует в пользу индоиранского происхождения саргаринско-алексеевской культуры и указывает на преемственность с более поздними культурами исследуемого региона.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 22-18-00470.



## **Белок Orc5 присутствует в локусе генов гистонов и участвует в регуляции их экспрессии**

**Кутolina Ю.А., Куршакова М.М.**

Институт Молекулярной Биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Белковый ORC комплекс описан у многих эукариот, состоит из шести белков Orc1, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 и участвует в инициации репликации. Однако, по последним данным, комплекс ORC и его отдельные субъединицы осуществляют множество функций, не связанных с репликацией. В частности, во многих работах показано взаимодействие белков ORC с РНК и важное функциональное значение таких взаимодействий.

Мы обнаружили, что одна из субъединиц ORC комплекса белок Orc5 присутствует в локусе, содержащем 100 копий тандемного повтора из пяти генов гистонов, на полигенных хромосомах из клеток слюнных желез личинок *Drosophila*. В S2 клетках *Drosophila* Orc5 локализуется в ядре в HLB (histone locus body) тельце – эволюционно консервативной структуре, координирующей транскрипцию генов гистонов и процессинг их мРНК. Orc5 взаимодействует со специфическими белковыми факторами, локализующимися в HLB тельце и регулирующими экспрессию и процессинг мРНК генов гистонов. Orc5 привлекается в мРНК частицы генов гистонов. Нокаун Orc5 в S2 клетках при помощи РНК-интерференции приводит к нарушению синтеза и процессинга мРНК гистонов – появлению неправильно процессированных форм транскриптов и общему увеличению уровня мРНК. Таким образом, было показано, что в составе HLB тельца Orc5 взаимодействует с молекулярным аппаратом, управляющим экспрессией генов гистонов, и вовлечен в биогенез их мРНК.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-24-00721.

## Дифференциальное окрашивание гетерохроматина методом CDAG

Лемская Н.А. <sup>1</sup>, Беклемишева В.Р. <sup>1</sup>, Романенко С.А. <sup>1</sup>, Билтуева Л.С. <sup>1</sup>,  
Проскуракова А.А. <sup>1</sup>, Павлова С.В. <sup>2</sup>, Перельман П.Л. <sup>1</sup>, Графодатский А.С. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, Москва

СВГ-окрашивание является наиболее часто используемым методом для выявления структурного гетерохроматина. При этом трудно идентифицировать некоторые элементы кариотипа, поскольку тело хромосомы окрашено равномерно и не имеет исчерченности за исключением С-блоков. Нами был разработан метод выявления конститутивного гетерохроматина CDAG, который можно разделить на четыре основных этапа: GTG-окрашивание метафазных хромосом, включающее ферментативную обработку хроматина; тепловая денатурация формамидом; тепловая солевая ренатурация; окрашивание хромосом флуоресцентными красителями DAPI и хромомицин А3.

Чтобы протестировать нашу методику, мы выбрали представителей млекопитающих из разных отрядов и показали, что CDAG особенно ценен для выявления гетерохроматина у различных видов с уникальными кариотипическими характеристиками, такими как крупные центромерные и прителомерные блоки, районы ядрышковых организаторов, выраженный интерстициальный гетерохроматин, полностью гетерохроматиновые плечи и преимущественно гетерохроматиновые хромосомы.

В цитогенетике существует потребность в быстром и эффективном подходе, который позволил бы одновременно выявить множество особенностей хромосом. Основными преимуществами предлагаемого нами метода являются простая воспроизводимость протокола, надежная идентификация С-позитивных хромосом и описание состава гетерохроматина (АТ-/GC-обогащенность). Показана эффективность применения CDAG для окрашивания прицентромерного и интерстициального гетерохроматина основного набора хромосом, включая половые хромосомы, а также добавочных В-хромосом.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00034-П.

## **Небольшие изменения последовательности ДНК, расположенной после сайта полиаденилирования, влияют на экспрессию трансгена в клетках линий НЕК293Т и СНО**

Летягина А.Е.<sup>1,2</sup>, Пиндюрин А.В.<sup>1</sup>, Яринич Л.А.<sup>1</sup>, Болдырева Л.В.<sup>1</sup>, Огиенко А.А.<sup>1</sup>, Галимова Ю.А.<sup>1</sup>, Андреева Е.Н.<sup>1</sup>, Омелина Е.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

У эукариот терминация транскрипции может оказывать значительное влияние на уровень экспрессии генов различными путями. Терминация транскрипции белок-кодирующих генов основана на сборке функционального комплекса разрезания и полиаденилирования (cleavage and polyadenylation, CPA) на 3'-конце синтезируемого транскрипта.

Нуклеотидный состав 3'-участка незрелого транскрипта влияет на то, какой именно вариант комплекса CPA будет сформирован и какой сигнал полиаденилирования (СПА) будет выбран, однако консенсусная нуклеотидная последовательность, индуцирующая и улучшающая сборку комплекса CPA, до сих пор не определена. Таким образом, детальное исследование механизмов терминации транскрипции с учётом регуляторной активности нуклеотидных мотивов на 3'-конце гена актуально для понимания регуляции экспрессии белок-кодирующих генов у млекопитающих.

Мы показали, что делеция одного цитозина в позиции +32 п.н. ниже СПА (deltaC) приводит к двукратному повышению уровня транскриптов репортёрного гена eGFP в эмбриональных стволовых клетках мыши mESCs, культивируемых мышинных клетках 3Т3 и клетках почки эмбриона человека НЕК293Т. Таким образом, можно предположить, что последовательность deltaC вовлечена в некий консервативный для млекопитающих молекулярный механизм.

Затем мы провели Массовый Параллельный Репортёрный Анализ (МПРА) для того, чтобы исследовать влияние последовательности, находящейся после СПА, на уровень транскриптов гена eGFP в клетках НЕК293Т. МПРА основан на использовании плазмидных библиотек, которые содержат два ключевых фрагмента, отличающихся очень высоким разнообразием: исследуемая последовательность (мутация) и штрихкод. Как правило, они представляют собой короткие случайные последовательности, причём только штрихкод входит в состав зрелого транскрипта. Таким образом, штрихкод может быть использован для оценки влияния различных мутаций на количество зрелого транскрипта eGFP в трансфицированных клетках.

Мы сконструировали девять плазмидных библиотек для МПРА. В них штрихкоды имели длину 18 п.н. и располагались в 3'-нетранслируемой области гена eGFP перед СПА. Мутации длиной 8 п.н. находились в позициях от 17 до 56 п.н. после СПА в зависимости от библиотеки. Этими плазмидными библиотеками были поочередно трансфицированы клетки НЕК293Т. Через 2 дня из клеток была выделена тотальная РНК, синтезирована кДНК и амплифицированы штрихкоды. Параллельно были амплифицированы штрихкоды исходных плазмидных библиотек, которые были использованы для нормировки. Также с помощью эмульсионной ПЦР были получены образцы для определения соответствия между штрихкодами и мутациями.

В полученных библиотеках нам удалось проанализировать от 8 до 56 тысяч различных вариантов мутаций из 65536 возможных. От 9 до 44% мутаций, расположенных в районе 17-40 п.н. после СПА, вызывали увеличение уровня зрелой мРНК в 5 раз и более по сравнению с исходной последовательностью. В то же время только 0,1-3,7% мутаций того же района вызвали снижение количества транскрипта в 2 раза и более. Мутации, расположенные в районе 41-56 п.н. после СПА, вызывали увеличение уровня зрелой мРНК в 5 раз и более по сравнению с исходной последовательностью только в 4% случаев. В то же время от 2 до 18% мутаций этого района вызывали снижение количества транскрипта в 2 раза и более. Таким образом, оказалось, что изменение исходной нуклеотидной последовательности, расположенной после СПА, гораздо чаще приводит к повышению уровня зрелой мРНК, а не к его снижению. При этом районы, расположенные ближе к СПА, оказывают большее влияние на количество зрелых транскриптов.

Для того, чтобы оценить, какие признаки последовательностей мутаций оказывают наибольшее влияние на количество зрелой мРНК, а также предсказать уровень транскрипции мутаций, которые не были представлены в данных секвенирования, мы использовали методы машинного обучения. Анализ показал, что Т-богатые мутации (содержащие от 3 и более тимининов на 8 п.н.) связаны с более высоким уровнем транскрипции репортёрного гена, в то время как мутации, имеющие менее двух тимининов на 8 п.н., связаны с низким уровнем транскрипции. С повышением количества зрелой мРНК eGFP также связаны гуанин в 29, тимин в 31-37 и цитозин в 40 позициях после СПА, а также наличие мотива ГТГТ. Присутствие мотивов ГЦАТ и АГ, наоборот, значительно снижает предсказанный уровень экспрессии репортёрного гена.

## Эволюция сателлитной ДНК у ящурок (*Eremias*, Lacertidae)

Лисачева Л.С.<sup>1</sup>, Лисачев А.П.<sup>2</sup>, Романенко С.А.<sup>1</sup>, Андреюшкова Д.А.<sup>1</sup>,  
Давлетшина Г.И.<sup>1,2</sup>, Назаров Р.А.<sup>3</sup>, Трифонов В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>3</sup> Зоологический музей МГУ, Москва

Сателлитная ДНК – это тандемно расположенные высокоповторенные фрагменты ДНК длиной 150-200 пар нуклеотидов, локализованные у позвоночных в зонах конститутивного гетерохроматина. Сателлитная ДНК участвует в поддержании структуры хромосом, во взаимодействии хромосом друг с другом и с функциональными элементами клетки во время митоза и мейоза. Дивергенция сателлитной ДНК в ходе эволюции может способствовать гибридной стерильности, и таким образом видообразованию. Накопление сателлитной ДНК может способствовать дифференциации половых хромосом. В отличие от группы зеленых ящериц (подсемейство Lacertinae), у ящурок (подсемейство Eremiadae) сателлитная ДНК практически не изучена. В данной работе мы применили секвенирование геномной ДНК с низким покрытием и последующий анализ биоинформатическим инструментом TAREAN для выявления сателлитной ДНК у ряда видов ящурок: *Eremias velox*, *E. regeli*, *E. intermedia*, *E. lineolata*, *E. multiocellata*, *E. persica*, *E. stummeri*. Сиквенсы еще нескольких видов получали из архива NCBI SRA: *E. yarkandensis*, *E. nikolskii*, *E. dzungarica*, *E. argus*, родственный вид *Acanthodactylus guineensis*. Мы обнаружили не описанный ранее сателлит длиной 177 п.н., названный Ere-Sat-177 и характерный для всех ящурок, отсутствующий у *A. guineensis*. Также мы обнаружили вероятный W-сцепленный сателлит длиной 90 п.н. у *E. multiocellata*, присутствовавший в образце ДНК самки, но не самца. С помощью FISH на хромосомах *E. velox* было показано, что Ere-Sat-177 расположен в прицентромерных районах всех хромосом. Сравнительный филогенетический анализ Ere-Sat-177 и митохондриальной ДНК, извлеченной из тех же данных и из GenBank, показал их в основном согласованную эволюцию. У *E. velox* из Ирана (но не из Узбекистана и Казахстана), а также у *E. stummeri* в дополнение к гаплотипам Ere-Sat-177 из основной клады обнаружены сильно дивергентные варианты, которые, вероятно, возникли до диверсификации ящурок, и присутствуют в геномах в малом числе копий. В будущем планируется FISH-картирование Ere-Sat-177 на хромосомах других видов ящурок, картирование сателлита из *E. multiocellata*, а также изучение сателлитной ДНК родственных родов Eremiadae, таких как *Acanthodactylus* и *Mesalina*.

Исследование поддержано грантами 19-14-00034-Р (РНФ) и № FWNR-2022-0015.

## Цитогенетика немодельных видов насекомых в эпоху сборки полных геномов

Лухтанов В.А.<sup>1</sup>, Паженкова Е.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Университет Любляны, г. Любляна, Словения

Хотя кариотипы некоторых модельных видов насекомых, таких как *Chironomus plumosus* и *Bombyx mori*, изучены чрезвычайно детально, для немодельных видов информация о кариотипах, если имеется вообще, часто ограничивается значением диплоидного (гаплоидного) числа хромосом и приблизительным описанием размерных характеристик отдельных хромосом, то есть остается на уровне, который характеризовал цитогенетику столетней давности. В значительной степени это связано с различными объективными трудностями изучения хромосом с помощью микроскопа.

Современные подходы к анализу геномов, основанные на получении длинных прочтений, использовании Hi-C технологии и методах валидации результатов, позволяют получить сборки, в которых все или хотя бы большая часть хромосом прочитаны от теломеры к теломере. Такие сборки пригодны для анализа структуры и эволюции кариотипов с использованием методов биоинформатики.

В нашем исследовании мы проанализировали хромосомные сборки геномов для 220 видов насекомых из восьми отрядов, делая особый акцент на изучение структуры теломерных и субтеломерных регионов, а также на выявление хромосомных перестроек, разделяющих близкие виды с одинаковыми и резко измененными числами хромосом. Мы показываем, что у большинства насекомых теломерная ДНК - это не просто набор коротких повторов, а очень длинная последовательность, состоящая из (TTAGG)<sub>n</sub> (или других мотивов), регулярно и специфически прерываемая ретротранспозонами, а сами короткие повторы (теломерные мотивы) чрезвычайно разнообразны по длине и нуклеотидному составу (Lukhtanov, Pazhenkova, 2023).

Мы показываем, что в эволюции насекомых из отряда чешуекрылых (Lepidoptera) фаза хромосомного консерватизма характеризуется стабильностью большинства аутосом и динамическими изменениями половой хромосомы Z, что приводит к множественным вариантам NeoZ- хромосомы, возникающим в ходе слияния аутосом и половых хромосом (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023a,b). Изменение числа хромосом в процессе быстрой хромосомной эволюции, по крайней мере отчасти, является канализированным процессом и может осуществляться в разных филогенетических линиях за счет повторного использования одних и тех же предковых хромосомных точек разрыва (Pazhenkova, Lukhtanov, 2023b).

## Литература

Lukhtanov V.A., Pazhenkova E.A. 2023. Diversity and evolution of telomeric motifs and telomere DNA organization in insects. *Biological Journal of the Linnean Society*. doi: 10.1093/biolinnean/blad068

Pazhenkova, E.A.; Lukhtanov, V.A. 2023a. Whole-genome analysis reveals the dynamic evolution of holocentric chromosomes in satyrine butterflies. *Genes*, 14, 437. <https://doi.org/10.3390/genes14020437>

Pazhenkova EA, Lukhtanov VA. 2023b. Chromosomal conservatism vs chromosomal megaevolution: enigma of karyotypic evolution in Lepidoptera. *Chromosome Res.* 2023 Jun 10;31(2):16. doi: 10.1007/s10577-023-09725-9

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00202.

## Размер геномов и популяционно-генетическая структура двух близкородственных видов байкальских эндемичных амфипод рода *Ommatogammarus* в градиенте глубин

Мадьярова Е.В., Дягилева А.А., Дроздова П.Б., Тимофеев М.А.

Иркутский государственный университет, г. Иркутск

e-mail: madyarova@yandex.ru

Уникальная природа Байкала хранит в себе множество тайн и загадок. Особый интерес вызывает происхождение и эволюция эндемичной фауны древнейшего и глубочайшего озера планеты. Одними из наиболее успешных представителей фауны являются амфиподы (Crustacea: Amphipoda), которые занимают доминирующее положение среди макробеспозвоночных, они освоили все глубины и типы субстратов; в озере их более 350 видов и подвидов (Takhteev et al., 2015). Особое внимание привлекают глубоководные амфиподы, обитающие в условиях высокого гидростатического давления. Так, к примеру, некоторые представители рода *Ommatogammarus* Stebbing, 1899 живут в широком диапазоне глубин, т.е. являются эврибатными. Это *O. flavus* и *O. albinus*; они встречаются на глубинах от 2,5 м (*O. flavus*) и от 47 м (*O. albinus*) до по крайней мере 1300 м (Bazikalova, 1945), что позволяет изучить роль гидростатического давления в формировании популяционной структуры у близкородственных видов одного рода.

Отлов амфипод осуществляли в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал) со льда озера с помощью глубоководных ловушек в марте 2022 г. Отбор проводили по вертикальному градиенту глубин: 25 м, 100 м, 300 м, 650 м и 1000 м. Животных фиксировали в жидком азоте сразу после вылова.

Собранные с разных глубин амфиподы отличались по окраске тела и цвету глаз. *O. flavus* примерно от 25 м до 300-500 м желто-оранжевый, яркий и визуальным образом хорошо отличим от *O. albinus*. При этом *O. flavus* с глубин 600 м и более уже сложно визуальным образом отличить от *O. albinus*, который, в свою очередь, обладает молочно-белым окрасом на всех глубинах. В большинстве случаев цвет глаз у *O. flavus* – черный, это его отличительный признак, однако на глубинах от 600 м и глубже глаза приобретают красный цвет, как у *O. albinus*. Такое разнообразие позволяет предположить, что данные виды могли сформировать отдельные популяции на разных глубинах.

Для изучения популяционной структуры видов в качестве маркерных генов использовали участок COI мтДНК и участок ядерного длинноволнового опсина (LWS). Размер геномов определяли с помощью проточной цитометрии. Оценка возраста общего предка



проводилась в программе BEAST2 для гена COI, используя известное для амфипод значение скорости накопления мутаций (1,773 % за миллион лет) (Copilaș-Ciocianu et al., 2019). Общее содержание каротиноидов измеряли по модифицированной методике (Drozdova et al., 2020).

Анализ популяционно-генетической структуры показал, что исследуемые виды обладают низким гаплотипическим разнообразием как по участку митохондриального гена COI, так и по участку ядерного гена LWS. Мы не обнаружили какой-либо подразделенности на популяции по глубинам ни для *O. flavus*, ни для *O. albinus*. Таким образом, выдвинутая нами гипотеза о существовании разных популяций на разных глубинах для этих видов не подтвердилась. Возможно, что такие тонкие отличия могут быть выявлены только при дополнительном анализе более быстро эволюционирующих маркеров.

По обоим генетическим маркерам мы увидели четкое разделение на два вида. Так, разрыв между внутривидовой и межвидовой изменчивостью (Barcode gap) для гена COI был равен 12 % (Lefébure et al., 2006), в нуклеотидных заменах — около 90. Ген LWS ожидаемо оказался более консервативным — 1% и 4 замены. Поскольку как *O. flavus*, так и *O. albinus* на всех глубинах не различались по исследованным маркерам, размер их геномов мы оценивали у животных с одной глубины: *O. flavus* — со 100 м, *O. albinus* — с 300 м. Размер генома для *O. flavus* составил 7,3 пг, а для *O. albinus* — 5,4 пг, что также подтверждает, что это два разных вида, не согласуется с известной закономерностью о положительной связи размера генома и глубины обитания (Ritchie et al., 2017). Существование общего предка двух исследуемых видов мы оценили в 4,6 млн лет. Таким образом, морфологическое описание видов совпало с генетическим.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ, проект № 23-14-00165, <https://rscf.ru/project/23-14-00165/>.

## **Консервативный белок RCC1 – новый компонент неактивных районов политенных хромосом *Drosophila***

**Мальцева М.В., Ватолина Т.Ю., Баттулина Н.В., Омелина Е.С., Жимулёв И.Ф.**

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

В политенных хромосомах *Drosophila* выделяют три основных морфологических класса структур: черные диски, серые диски и междиски. Оказалось, что тканеспецифичные гены расположены в черных дисках, которые представляют собой интеркалярный гетерохроматин. Он демонстрирует свойства гетерохроматина, такие как поздняя репликация ДНК, недорепликация во время циклов политенизации, эктопическое спаривание.

Белок RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) является высоко консервативным, и его аналоги обнаружены у разных эукариот, в том числе у человека и *Drosophila*. Консервативность данного белка подтверждается тем фактом, что антитела на белок RCC1 *Xenopus* специфически связываются с белком человека и *Drosophila*, что показано с помощью Вестерн-блот анализа.

С помощью метода иммуноокрашивания мы показали, что RCC1 связывается с прицентромерным гетерохроматином и с черными дисками (около 300 дисков), или интеркалярным гетерохроматином. Во время активации тканеспецифичных генов, что приводит к декомпактизации материала и образованию пухов, RCC1 покидает этот район, а после завершения образования пуфа возвращается в черный диск. С помощью Вестерн-блот анализа показано, что в линиях *Drosophila* с подавлением недорепликации происходит увеличение количества белка RCC1 относительно дикого типа пропорционально количеству ДНК.

Считают, что одной из главных функций белка RCC1 является контроль клеточного цикла. На примере различных клеточных линий было изучено изменение локализации белка на разных стадиях митотического деления.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00051-П и Программой фундаментальных научных исследований FWGZ-2021-0014.

## Негомологичные хромосомные контакты в профазе I мейоза в природных популяциях алайской слепушонки *Ellobius alaicus*

Матвеевский С.Н.<sup>1</sup>, Баклушинская И.Ю.<sup>2</sup>, Тамбовцева В.Г.<sup>2</sup>, Богданов А.С.<sup>2</sup>, Коломиец О.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

Слепушонки подрода *Ellobius* (Rodentia) имеют не только уникальную систему половых хромосом (XX♀♂), но и характеризуются широкой хромосомной изменчивостью. У алайской слепушонки *Ellobius alaicus* 2n варьирует от 52 до 48 при постоянном количестве плеч NF=56. В популяциях этого вида в течение короткого времени происходят стабилизация (переход в гомозиготное состояние) и фиксация новых кариотипов вследствие Робертсоновских транслокаций (Rb), как описано нами ранее для природных популяций в Памиро-Алае (Bakloushinskaya et al., 2019). К настоящему времени механизмы формирования Rb метацентриков неизвестны. Мы полагаем, что изменения во взаимодействии хромосом в профазе мейоза I могут вести к появлению таких перестроек.

В профазе I мейоза гомологичные хромосомы формируют особый мультибелковый скелет, называемый синаптонемным комплексом (СК). СК используется как индикатор хромосомной изменчивости. Исследование СК в сперматоцитах *E. alaicus* позволило впервые обнаружить особые контакты негомологичных хромосом («через SYCP3-филамент»; SYCP3 – synaptonemal complex protein 3), вплоть до их слияния и формирования двуплечих хромосом с двумя центромерами, т.е. дицентриков (ДЦ). Формированию таких ДЦ предшествует несколько событий: сближение коротких плеч двух СК-бивалентов акроцентриков, последующие модификация и удлинение осевых/латеральных элементов СК в районе коротких плеч; прикосновение SYCP3-осей (филаментов) двух СК-бивалентов; связывание и слияние теломерных районов акроцентриков с образованием ДЦ-СК-бивалента. Так как каждая из двух гомологичных хромосом в составе СК-бивалента состоит из двух хроматид, то в результате двух мейотических делений сформируются четыре сперматозоида, несущих по одной сформированной de novo Rb-хромосоме. В дальнейшем возможны 2 эволюционных сценария для ДЦ: либо инактивация одной из двух центромер, либо слияние двух центромер в одну. Не исключена и потеря части сперматоцитов, несущих ДЦ, в результате неправильного расхождения ДЦ во время I и II делений мейоза.

В поисках предпосылок соединения конец-в-конец двух акроцентриков был проведен анализ некоторых белков в зонах контактов хромосом. Не были обнаружены фокусы гистона  $\gamma$ H2AX, маркирующего двунитевые разрывы (DSBs) ДНК. Однако в 2–3% случаев на стадии сближения хромосом выявлены сигналы белка RPA, маркирующего одноцепочечные разрывы ДНК. Также в районах контактов хромосом выявлены фокусы двух белков, связанных с внутренней и внешней мембраной ядерной оболочки – SUN1 и KASH5, мутации которых нарушают прикрепление теломер к ядерной оболочке. Ядерная оболочка представляет собой платформу, где взаимодействуют тысячи белков для поддержания целостности хромосом и архитектоники ядра. Мы предполагаем, что возможные модификации или дефекты в структуре теломерных участков могут служить триггером к контактам акроцентриков на ядерной оболочке, включая их полное слияние. При этом гомология участков ДНК в местах разрывов может способствовать связыванию теломер друг с другом в процессе репарации таких разрывов и возникновению Rbs.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ проект № 22-24-00285.

## Филогеография шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) Восточной Сибири в позднем плейстоцене

Модина С.А.<sup>1</sup>, Куслий М.А.<sup>1</sup>, Молодцева А.С.<sup>1</sup>, Маликов Д.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН, г. Новосибирск

К настоящему времени, собрана достаточная научная база для определения филогеографии одних из самых многочисленных в летописи окаменелостей представителей мамонтовой фауны — вида шерстистый мамонт (*Mammuthus primigenius*). Несмотря на большую степень изученности, выборка образцов из Сибири и Дальнего Востока была представлена в основном северными и восточными регионами. Образцы мамонтовой фауны такой географически изолированной территории, как Минусинская котловина и остров Котельный, не были исследованы на молекулярно-генетическом уровне, хотя полученные данные могут выявить не обнаруженное ранее генетическое разнообразие вида, уникальные популяции, которые эволюционировали здесь независимо от всех остальных.

В рамках данной работы были получены митохондриальные библиотеки семи шерстистых мамонтов Минусинской котловины юга Восточной Сибири и десяти шерстистых мамонтов острова Котельный севера Восточной Сибири. Для данных библиотек было проведено двухэтапное обогащение геномных библиотек с использованием гибридизации с биотинилированными фрагментами современной митохондриальной ДНК *Elephas maximus*, которое позволяет значительно увеличить долю эндогенной древней ДНК.

Филогенетический анализ выявил принадлежность всех исследуемых мамонтов к кладе I, что позволило расширить её ареал. Расположение образцов в базальном положении и близость гаплотипов мамонтов с острова Котельный, а также расположение митотипов мамонтов Минусинской котловины в разных кладах внутри клады I может указывать на достаточно высокое разнообразие их генофонда. Филогеографические реконструкции подтвердили время расхождения I и II митохондриальных клад мамонтов, как 1–2 млн. лет, выявили генетическую близость митохондриальных линий позднеплейстоценовых мамонтов Минусинской котловины и других, в том числе сопредельных, регионов Восточной Сибири и их дивергенцию во временном промежутке от 100 до 150 тыс. лет назад, что свидетельствует об активных миграциях шерстистых мамонтов на обширных территориях Восточной Сибири в конце среднего плейстоцена–начале позднего плейстоцена.

Поддержано грантом РФФ 23-74-10060.

## **Видовое определение млекопитающих сопровождающих человека на стоянках в горных районах Центральной Азии**

**Молодцева А.С.<sup>1,2</sup>, Модина С.А.<sup>1</sup>, Яковлев А.В.<sup>1</sup>, Алишер кызы С.<sup>2</sup>, Абдыканова А.<sup>3</sup>, Чаргынов Т.<sup>4</sup>, Шнайдер С.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Международная лаборатория «Археозоология в Сибири и Центральной Азии» ZooSCAn, IRL 2013, Национальный центр научных исследований – Институт археологии и этнографии СО РАН, Новосибирск-Россия

<sup>3</sup> Американский университет Центральной Азии, Бишкек, Кыргызстан

<sup>4</sup> Национальный университет Кыргызстана им. Ж. Баласагына, Бишкек, Кыргызстан

Центральное географическое расположение памятников горной части Центральной Азии определяет их ключевую роль в понимании миграционных процессов человека и культурной диффузии между популяциями соседних регионов. На настоящий момент в регионе известно более десятка объектов периода финального плейстоцена-раннего голоцена. Изучение коллекций фаунистических материалов позволит проследить развитие археологических культур в важнейший исторический период – переход к производящему хозяйству.

Одним из ключевых памятников региона, где представлены слои раннего голоцена является стоянка Обишир-5, где полевые исследования были возобновлены в 2015 г. с целью уточнения культурной атрибуции памятника, уточнения хронологических рамок и получения новой археологической коллекции. Для палеофаунистических коллекций, полученных в ходе раскопок 2015-2017 гг. проведена серия биоархеологических исследований, которая показала на присутствие на памятнике domesticiрованных овец и коз начиная с 8 тыс. л.н. (Taylor et al., 2021).

В связи с получением свидетельств раннего скотоводства в регионе принято решение о проведении дополнительных исследований палеофаунистических материалов со стоянки Обишир-5, Сурунгур (юг Ферганской долины, синхронна Обишир-5) и Айгыржал-2 (центральный Тянь-Шань, финальный плейстоцен), всего древняя ДНК была выделена из 17 образцов, были приготовлены библиотеки для высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Перед секвенированием проводили обогащение библиотек путем гибридизации с биотинилированной современной мтДНК *Ovis ammon*,

иммобилизованной на Dynabeads® Streptavidin магнитных частицах (Life Technologies, США).

Полученные риды картировали на референсный геном NC\_047196 *Ovis ammon ammon*. Для 14 образцов определили видовую принадлежность, среди образцов оказались *Ovis ammon*, *Ovis aries*, *Capra sibirica*, *Capra hircus*. Филогенетические построения для 12 почти полных митохондриальных геномов позволили уточнить положение исследуемых образцов и гаплотипы.

Shnaider, S.V., Krajcarz, M.T., Viola, T.B., Abdykanova, A., Kolobova, K.A., Fedorchenko, A.Y., Alisher-Kyzy, S., Krivoshapkin, A.I., 2017. New investigations of the Epipalaeolithic in western Central Asia: Obishir-5. *Antiquity* 91.

Taylor, W.T.T., Pruvost, M., Posth, C., Rendu, W., Krajcarz, M.T., Abdykanova, A., Brancaloni, G., Spengler, R., Hermes, T., Schiavinato, S., Hodgins, G., Stahl, R., Min, J., Alisher kyzy, S., Fedorowicz, S., Orlando, L., Douka, K., Krivoshapkin, A., Jeong, C., Warinner, C., Shnaider, S., 2021. Evidence for early dispersal of domestic sheep into Central Asia. *Nat. Hum. Behav.* 5, 1169–1179. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01083-y>

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-78-10053 «Происхождение производящего хозяйства в горной части Центральной Азии»

## **Комплекс нарушений внутриклеточной организации нейронов, дифференцированных из фибробластов пациентов с синдромом Коэна**

**Морозова К.Н.<sup>1,2</sup>, Шнайдер Т.А.<sup>1</sup>, Хабарова А.А.<sup>1</sup>, Четкина С.<sup>2</sup>, Чвилева А.<sup>2</sup>, Юнусова А., Вольф Е.<sup>1</sup>, Киселева Е.В.<sup>1</sup>, Пристяжнюк И.Е.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Синдром Коэна – это редкое врожденное аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся задержкой физического и умственного развития, микроцефалией, гипермобильностью суставов, гипотонией, дистрофией сетчатки и нейтропенией. Вызывается мутациями гена *COH1 (VSP13B)*. Белок COH1 является участником системы внутриклеточного мембранного транспорта, центральным звеном которого является комплекс Гольджи. Цель исследования – определение структурно-функциональных нарушений в культуре нейронов с мутацией *COH1*. Нейроны получали дифференцировкой индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных из фибробластов биопсийного материала пациентов – носителей мутации *COH1*. В качестве контроля использовали нейроны, полученные из ИПСК здоровых доноров. Ультроструктурный анализ проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM1400 (Jeol, Япония) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Электронно-микроскопический анализ показал, что в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с синдромом Коэна, наблюдаются существенные ультроструктурные изменения: фрагментация диктиосом аппарата Гольджи, нарушение структуры митохондрий, расширение пространства большинства мембранных структур: ядерной оболочки, гладкого и шероховатого ЭПР. Выявляются также нарушения аутофагии и стресс (везикуляция) ЭПР, характерные для различных наследственных и возрастных нейродегенеративных заболеваний.

Исследование выполнено в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0015 ИЦиГ СО РАН и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021).

Культивирование линий клеток проводили на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells>).



## СТСФ и эволюция пространственной организации генома

Нурисламов А.Р.<sup>1,2</sup>, Гридина М.М.<sup>2</sup>, Попов А.А.<sup>1,2</sup>, Шадский А.А.<sup>1,2</sup>, Фишман В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

СССТС-связывающий фактор (СТСФ) – один из белков-инсуляторов у билатеральных животных. Структура СТСФ консервативна, однако его функции могут различаться у разных таксонов. У позвоночных СТСФ участвует в формировании петель хроматина посредством механизма когезин/СТСФ-зависимой экструзии, что является основным фактором формирования топологически-ассоциированных доменов (ТАДов) у позвоночных животных. У других исследованных групп билатеральных животных данный механизм не был обнаружен, несмотря на консервативность структуры белка. В связи с этим вызывает большой интерес выявление факторов, определяющих наличие или отсутствие когезин/СТСФ-зависимой экструзии петли у билатеральных животных.

В данной работе нами проведен эволюционный анализ аминокислотных последовательностей СТСФ, в частности, N-терминального домена, который имеет наиболее вариабельную структуру среди билатеральных животных и критически важен для формирования петель хроматина у позвоночных. По результатам анализа были выявлены специфичные для челюстноротых позвоночных последовательности N-терминального домена, отсутствующие у круглоротых позвоночных и бесчерепных хордовых животных. Также мы обнаружили, что мотив YXF присутствует в СТСФ у всех исследуемых групп билатеральных животных, кроме *Trichinella spiralis*, где СТСФ, вероятно, утрачивает свои функции. Мотив YXF в СТСФ позвоночных обязателен для формирования петель хроматина, так как обеспечивает взаимодействие СТСФ с комплексом экструзии петли. Таким образом, вероятно, способность СТСФ позвоночных участвовать в формировании петель хроматина обусловлена не только наличием мотива YXF, но и другими факторами.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-14-00247.

## **Достижения цитогенетики млекопитающих в разработке хромосомной диагностики и системы видов**

**Орлов В.Н.<sup>1</sup>, Ляпунова Е.А.<sup>2</sup>, Баскевич М.И.<sup>1</sup>, Картавцева И.В.<sup>3</sup>,  
Малыгин В.М.<sup>4</sup>, Булатова Н.Ш.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, Москва

\* E-mail: bulatova.nina@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва

<sup>3</sup> Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток

<sup>4</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Использование цитогенетических методов во многом изменило систему видов млекопитающих, первоначально основанную исключительно на морфологических подходах. Начиная с 1960-х годов классический цитогенетический анализ и методы дифференциальной окраски хромосом - в дальнейшем и молекулярно-цитогенетический анализ – находят применение в академических учреждениях РАН, СО РАН, ДВО РАН для изучения вопросов эволюционной проблематики и систематики на базе прогрессирующих уровней анализа хромосомных перестроек и генома в целом. На материалах цитогенетических коллекций нескольких лабораторий с давней историей исследования хромосом впервые в связи с 50-летием Териологического общества при РАН был проведен таксономический анализ большинства родов млекопитающих, изученных, в том числе с участием авторов обзора, на территории нашей страны. Подчеркивается, что до сих пор продолжают находки новых кариотипов даже в пределах ранее изученных таксонов и часто удавалось показать, что во многих случаях большие политипические виды традиционной систематики представляют собой комплексы морфологически сходных, но генетически хорошо различимых и репродуктивно изолированных видов. Выявление криптических таксонов (скрытых видов-двойников) является необходимым звеном в описании биологического разнообразия и в то же время привлекает внимание к обсуждению на новом уровне концепций вида и видообразования. Современный молекулярно-цитогенетический анализ дает возможность установления гомологии больших сегментов генома – плеч хромосом и целых хромосом, а также выявления точечных признаков, обнаруживающих внутривидовую генетическую дифференциацию таксонов на уровне ДНК, что качественно изменяет до сих пор принятые разрешающие уровни сравнительной цитогенетики. Поддержка Госзадания ИПЭЭ РАН № FFER-2021–0003.

## **Архитектурные белки Orbp и M1BP имеют сходные функции в организации активного промотора гена домашнего хозяйства**

**Осадчий И.С., Максименко О.Г., Георгиев П.Г.**

Институт биологии гена РАН, г. Москва

По современным представлениям хроматин дрозофилы организован в топологически ассоциированные домены (ТАДы), границы которых приходятся на промоторы активно экспрессирующихся генов домашнего хозяйства и обогащены архитектурными белками, такими как Su(Hw), CTCF, M1BP, ZIPIC, а также кофакторами - Chromator, Pzg, CP190.

Мы охарактеризовали новый архитектурный белок Orbp, который взаимодействует с CP190, Pzg, Chromator, TRF2 и имеет небольшое число сайтов связывания в геноме (около 30) вблизи точек инициации транскрипции генов «домашнего хозяйства». Белок M1BP, напротив, имеет более 5000 сайтов в геноме, большая часть из которых находятся в промоторах генов. Белок M1BP также взаимодействует с CP190, Chromator, TRF2 на промоторах генов домашнего хозяйства.

Используя в качестве модельной системы промотор гена рибосомального белка RpL27a, содержащий сайты связывания M1BP и Orbp вблизи точки инициации транскрипции, нами было продемонстрировано, что мотивы M1BP и Orbp функционально взаимозаменяемы и играют ключевую роль в активации промотора посредством привлечения необходимых для работы промотора транскрипционных комплексов. Мы полагаем, что многие архитектурные C2H2-белки способны выполнять сходные функции. На основе полученных результатов предложена модель, согласно которой промоторы генов домашнего хозяйства состоят из комбинаций частых мотивов для общих факторов транскрипции и редких мотивов, с которыми специфично связываются архитектурные белки. Разработан алгоритм для поиска в области промоторов генов домашнего хозяйства вероятных мотивов транскрипционных факторов.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ № 19-74-30026-П и субсидии Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1661.

## **Основные принципы устройства геномов вирусов и их таксономия**

**Осипов И.Д., Нетёсов С.В.**

Новосибирский государственный университет

Изложена история развития классификации вирусов. Приведены и объяснены основные принципы современной классификации (таксономии) вирусов. Представлено таксономическое дерево царства вирусов на конкретных примерах. Показаны примеры классификации ряда важных вирусов человека и животных. Приведена классификация подсемейства коронавирусов и показаны основные, наиболее показательные различия вариантов коронавирусов человека и их субвариантов, выявленных в ходе пандемии.

Работа поддержана госзаданиями FSUS-2020-0035 и FSUS-2022-0021, а также программой НГУ «Приоритет-2030».

## **Basic principles of the structure of virus genomes and their taxonomy**

**Osipov I.D., Netesov S.V.**

Novosibirsk State University

The history of the development of the classification of viruses is outlined. The main principles of the modern classification (taxonomy) of viruses are presented and explained. A taxonomic tree of the kingdom of viruses is presented using specific examples. Examples of the classification of some most important human and animal viruses are shown. The classification of the subfamily of coronaviruses is presented and the main, most significant differences between the variants of human coronavirus SARS-CoV2 and its variants identified during the pandemic are shown.

The work was supported by FSUS-2020-0035, FSUS-2022-0021 and program Prioritet-2030.

## Характеристика гибридного потомства от отдалённой гибридизации *Zea mays* с *Tripsacum dactyloides*

Панихин П.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

<sup>2</sup> Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск

Методом отдалённой гибридизации между диплоидными линиями кукурузы *Zea mays* L. (*Zm*), используемыми в гибридной селекции на гетерозис – 573МВ и 611СВ, и тетраплоидным *Tripsacum dactyloides* L. (*Td*) был создан ряд гибридных форм с геномом  $2n = 56 = (20Zm + 36Td)$ . Данные растения были получены с целью закрепления гетерозиса у кукурузы путём передачи апомиктического способа репродукции от её отдалённого родственника – гамаграсса. Весь эксперимент по гибридизации и получению кукурузно-трипсакумных гибридов базировался на поэтапном добавлении гаплоидного набора хромосом кукурузы: 1) при получении 46-хромосомных растений – как обычный половой процесс между кукурузой и гамаграссом; 2) при получении 56-хромосомных гибридов – как результат В-III гибридизации ( $2n + n$ ) при опылении 46-хромосомных форм пыльцой кукурузы. В связи с этим было легко контролировать процесс гибридизации простым подсчётом хромосом на стадии метафазы в корешках гибридов и визуальным контролем гибридизации, сравнивая габитусы полученных 46- и 56-хромосомных растений. Результаты показали, что габитус 46-хромосомных растений  $2n = 46 = (10Zm + 36Td)$  больше походит на гамаграсс, тогда как добавление 10 хромосом кукурузы с получением 56-хромосомных формы  $2n = 56 = [(10Zm + 36Td) + 10Zm]$  даёт значительный рост их линейных размеров. Сравнение 56-хромосомных гибридов с разной комбинацией кукурузных геномов в присутствии хромосом трипсакума показало, что гибриды несущие геномы от разных кукурузных родителей  $2n = 56 = [(10Zm(573) + 36Td) + 10Zm(611)]$  проявляют гетерозис по некоторым признакам.

## Гены рРНК в геноме зебровой амадины: организация 5S рДНК

Панферов Е.В., Такки О.Д., Кулак М.М., Галкина С.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Рибосомная ДНК (рДНК) представляет собой кластеры генов, кодирующих рибосомные РНК (рРНК), которые в совокупности с белками формируют рибосому - ключевой элемент белок-синтезирующего аппарата клетки. Для эукариот характерно наличие 4 видов рРНК: 18S рРНК входит в состав малой 40S субъединицы рибосомы, в то время как 28S(25S), 5.8S и 5S рРНК формируют большую 60S субъединицу. В рибосому входит по одной молекуле каждого типа рРНК. У эукариот гены 18S, 5.8S и 28S рРНК находятся на хромосомах в районе ядрышкового организатора (ЯОР), в то время как кластер с копиями гена 5S рРНК обычно расположен за пределами ЯОР в отдельном хромосомном локусе. При этом гены, находящиеся в ЯОР, транскрибируются РНК-полимеразой I, а кластер генов 5S - РНК-полимеразой III; число копий генов в разных кластерах, как правило, разное. Остается неизвестным, каким образом обеспечивается сбалансированная экспрессия этих генов. Расшифровка этой области генома, представленной повторяющейся ДНК, сложная задача. Точная последовательность ЯОР остается неизвестной для ряда крупных таксонов позвоночных. У птиц кластеры генов 18S-5.8S-28S и 5S рРНК подробно охарактеризованы только у домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*) (Daniels, Delany, 2003, doi: 10.1023/A:1024008522122; Dyomin et al., 2016, 2019). Гены 5S рРНК обнаруживаются как в виде полноценного кластера на хромосоме 9 (Daniels, Delany, 2003), так и в виде единичного транскрибируемого гена на хромосоме 2 (Lazar, 1984). В нашей работе мы изучили распределение генов 5S рРНК в геномах Воробьинообразных птиц.

Поиск в базе данных NCBI Genome последовательностей, сходных с 5S рРНК домашней курицы (GenBank X01309.1), и последующая аннотация в сборках хромосомного уровня показали, что в геномах 17 видов птиц из отряда Passeriformes 5S рДНК кластер также преимущественно выявляется в составе хромосомы 9 или 10 (т.е. ортологов хромосомы 9 курицы). Исключением являются виды *Parus major* и *Poecile atricapillus*, в геноме которых кластер был выявлен на макрохромосоме 1A (ортологе длинного плеча хромосомы 1 курицы). У новозеландского стрелка (*Acanthisitta chloris*) обнаружены два кластера на хромосомах 1 и 8. Наконец, в геноме зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*) содержится 3 кластера генов 5S рРНК – на 2, 4 и 9 хромосомах. Исключения, обнаруженные нами в геномах птиц из разных семейств (зебровой амадины (сем. Estrildidae), большой синицы, черношапочной гайчки (сем. Paridae) и новозеландского стрелка (сем. Acanthisittidae), могут говорить о том, что несколько кластеров 5S рДНК существуют в действительности в геномах всех Воробьинообразных. То, что мы биоинформатически не обнаруживаем

дополнительные кластеры во всех проанализированных геномах, может объясняться недостаточно качественной сборкой геномов, в частности районов тандемных повторов.

Нами была проведена детальная аннотация рДНК кластеров в геноме зебровой амадины. Было установлено, что кластеры различаются между собой числом повторяющихся единиц и последовательностями как самих 5S рРНК генов, так и нетранскрибируемых спейсеров (NTS). Выравнивание последовательностей 5S рРНК генов между собой показало, что последовательности генов на хромосоме 2 и 4 идентичны друг другу, и отличаются от последовательностей генов с хромосомы 9. Для генов 5S рРНК хромосом 2 и 4 характерна замена ряда нуклеотидов на 3' конце на цитозин. Последовательность гена 5S рРНК хромосомы 9 зебровой амадины наиболее близка к последовательности 5S рРНК курицы. Аналогично, последовательности NTS хромосом 2 и 4 практически идентичны, и существенно отличаются от таковых с 9 хромосомы. На хромосоме 9 выявлено 3 варианта NTS, в то время как на хромосомах 2 и 4 NTS сравнительно единообразны.

При помощи предсказательной модели (Andronescu et al., 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btm223) показано, что замены в 3' участке генов 5S рРНК оказывают значительное влияние на вторичную структуру предполагаемой молекулы РНК, кодируемой ими. Структура молекулы 5S рРНК, кодируемая генами с 9 хромосомы, наиболее близка к канонической.

При помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на препаратах метафазных хромосом описанные биоинформатически кластеры были физически картированы. Флуоресцентный сигнал обнаруживается на хромосомах TGU1, TGU4 и TGU10, соответствующих 2, 4 и 9 хромосомам в сборке генома, что подтверждает существование описанных кластеров. Интересно, что сигналы также присутствовали и на коротких плечах некоторых акроцентрических микрохромосом, что было подтверждено высокоразрешающей FISH на хромосомах стадии лаповых щеток. Сигнал от зонда к 5S рДНК оказывается расположен в непосредственной близости к сигналу от зонда к ассоциированному с центромерами повтору Tgut716. Таким образом, высокоразрешающее физическое картирование на хромосомах типа ламповых щеток подтверждает присутствие 5S рДНК в перицентромерном районе микрохромосом, в том числе в составе самых маленьких, состоящих из одного-двух хромомеров. Биоинформатический анализ выявляет единичные 5S рРНК подобные последовательности только на хромосомах 24 и 35.

Насколько нам известно, выявление в сборке генома зебровой амадины двух вариантов 5S рДНК является первым наблюдением такого рода для птиц. Остается невыясненным, транскрибируются ли оба варианта 5S рРНК, и если да, то выполняют ли они разные функции.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ №22-24-00538.

## Дальние взаимодействия хроматина в нейронах коры головного мозга

Плетенев И.А.<sup>1</sup>, Базаревич М.В.<sup>1</sup>, Загирова Д.Р.<sup>1</sup>, Кононкова А.Д.<sup>1</sup>, Черкасов А.В.<sup>1</sup>, Ефимова О.И.<sup>1</sup>, Тюкачева Е.А.<sup>2</sup>, Морозов К.В.<sup>1</sup>, Комков Д.С.<sup>2</sup>, Голимбет В.Е.<sup>3</sup>, Кондратьев Н.В.<sup>3</sup>, Разин С.В.<sup>2,4</sup>, Хайтович Ф.Е.<sup>1</sup>, Ульянов С.В.<sup>2,4</sup>, Храмева Е.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий, г. Москва

<sup>2</sup> ИБГ РАН, г. Москва

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», г. Москва

<sup>4</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, г. Москва

Известно, что трехмерная структура хроматина изменяется в процессе дифференцировки клеток [1,2]. Тем не менее роль структуры хроматина в определении клеточной судьбы остаётся малопонятной.

В данной работе мы применили метод Hi-C для анализа пространственной организации хроматина в зрелых нейронах коры головного мозга человека. Анализ выявил сеть дальних (>10 Мб) высокочастотных внутри- и межхромосомных контактов, ассоциированных с гистоновой меткой H3K27me3. Эти контакты пространственно сближают промоторы транскрипционных факторов. Анализ данных RNA-seq и scRNA-seq показал, что данные транскрипционные факторы активны в процессе развития организма, однако репрессированы в зрелых нейронах. Сравнение нейрональных Hi-C карт контактов с картами других типов клеток коры головного мозга демонстрирует уникальность сети дальних контактов для нейронов. Мы предполагаем, что эти контакты необходимы для более эффективной репрессии транскрипционных факторов, не участвующих в жизнедеятельности зрелых нейронов. Ассоциация дальних контактов с гистоновой меткой H3K27me3 указывает на возможную роль белков группы поликомб в их формировании [3].

Список литературы:

1. J.R.Dixon et al. (2015) Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation, *Nature*, **518**:331–336.
2. B.Bonev et al. (2017) Multiscale 3D genome rewiring during mouse neural development, *Cell*, **3**:557–572.
3. S.Kundu et al. (2017) Polycomb repressive complex 1 generates discrete compacted domains that change during differentiation, *Molecular Cell*, **3**:432–446.

Мы благодарим Анну Морозову и Георгия Костюка из ПКБ № 1 им. Н.А. Алексеева.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 21-74-10102.



# Транскрипция прицентромерной сателлитной ДНК в стромальных фибробластах аденокарциномы легкого человека и мышцы: роль в канцерогенезе

Пономарцев Н.В.<sup>1</sup>, Пржибельский А.Д.<sup>2</sup>, Бричкина А.И.<sup>3</sup>, Енукашвили Н.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,

<sup>3</sup> Марбургский Университет Филиппа, Марбург, Германия

Сателлитная ДНК (сатДНК) – tandemно-повторяющиеся последовательности ДНК, располагающиеся в конститутивном хроматине центромерных, перицентромерных и теломерных участков хромосом. На сегодняшний день известно, что сатДНК может транскрибироваться как в нормальных физиологических условиях, так и при патологиях. В последнее время особое внимание исследователей было уделено транскрипции прицентромерной сатДНК в опухолевых клетках. Однако в опухолевой ткани, помимо злокачественных опухолевых клеток, изменению подвергается также и окружающая опухоль ткань, формируя опухолевое микроокружение (ОМ). ОМ создает благоприятные условия для опухолевой прогрессии. В состав клеточного компонента ОМ входят стромальные клетки, клетки иммунной системы, эндотелий.

**Целью** исследования являлось изучение транскрипции прицентромерной мажорной сатДНК (MaSat) мышцы и сателлита 2/3 человека (HS2/3) в опухолевой ткани немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) мышцы и человека.

Работа выполнена на парафиновых срезах легких, а так же на первичной культуре фибробластов, полученных из легких мышей линии Kras<sup>G12D</sup>. Исследование транскрипции HS2/3 человека проводили на срезах НМРЛ, предоставленных Университетом Марбурга, а также на первичных культурах фибробластов с помощью методов кПЦР и ДНК-РНК FISH, комбинированной с иммуноцитохимическими методами. Фенотип, ассоциированный с опухолью у фибробластов по присутствию белка α-гладкомышечного актина и кодирующей его мРНК, накоплению SA-β-галактозидазы в клетках с помощью реагента X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактозида) по стандартной методике.

На первом этапе исследовали уровень транскриптов MaSat в опухоли и прилегающей к опухоли ткани легкого у мышей линии Kras<sup>G12D</sup>. Оказалось, что уровень транскриптов MaSat в прилегающей ткани выше, чем в опухоли. Исследование срезов легких мышей и человека с помощью ДНК-РНК FISH, комбинированной с иммуноцитохимическим методом с АТ к маркерным белкам различных типов клеток, показало, что у мыши и

человека в некрупных опухолях положительными по сигналу от зонда к прицентромерным сатРНК являются ассоциированные с опухолью фибробласты (ФАО), но не опухолевые клетки. Тогда как на более поздних стадиях, сигнал от зонда к сатРНК наблюдался также и в опухолевых клетках у мыши и человека. Анализ опубликованных данных транскриптомов scRNA-seq пациентов с НМРЛ с помощью биоинформатических методов подтвердил эти результаты. Эксперименты *in vitro* показали, что в фибробластах мыши и человека в ответ на обработку клеток TGF $\beta$ , IL1 $\alpha$ , цитостатиками блеомицином и цисплатином, а также ко-культивирование с опухолевыми клетками происходит активация транскрипции исследуемых сатДНК, а также формирование фенотипа, который характерен для ФАО. Инактивация транскриптов HS2/3 человека в фибробластах приводила к замедлению этого процесса, индуцированного блеомицином, TGF $\beta$  или ко-культивированием с опухолевыми клетками. В ФАО транскрипты HS2/3, помимо ядер клеток, располагались также в цитоплазме в составе CD63+ экзосом. Обработка мышинных первичных культур средой от фибробластов человека, в которых транскрипцию сатДНК индуцировали блеомицином, приводит к появлению в клетках мыши HS2/3 человека. Эти данные демонстрируют способность сатРНК участвовать в межклеточных взаимодействиях, опосредованных везикулярным транспортом.

Таким образом, показано, что транскрипты прицентромерной сатДНК человека и мыши играют важную роль в развитии опухоли НМРЛ, участвуя в формировании фенотипа ФАО.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021.

## Особенности паттернов распределения сайтов репликации в соматических ядрах инфузорий

Попенко В.И., Леонова О.Г.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Пространственная организация клеточного ядра и структур хроматина в нем являются важными факторами регуляции экспрессии генома. Исследования последних десятилетий показали, что клеточное ядро эукариот имеет сложную пространственную организацию. Оно состоит из хромосомных территорий, пространство которых образовано хроматиновыми доменами, каждый из которых содержит около 1000 т.п.н. ДНК, и интерхроматинового компартмента [1]. Процессы репликации ДНК происходят в строго специфичных сайтах, при этом пространственно-временные паттерны распределения сайтов репликации очень похожи у клеток всех изученных до настоящего времени многоклеточных организмов [2, 3], что показывает консервативность организации высших уровней хроматина в клетках многоклеточных. Однако вопрос о том, каковы паттерны сайтов репликации в ядрах инфузорий и как они соотносятся со структурной организацией хроматина в последних, остается открытым. Каждая инфузория в своей клетке содержит одновременно ядра двух типов: один или несколько диплоидных генеративных неактивных микронуклеусов и (чаще всего) одно транскрипционно-активное полиплоидное соматическое ядро (макронуклеус). Уникальной особенностью генома макронуклеуса является то, что он представлен огромным числом минихромосом размером 0.4 - 20 т.п.н. у видов с «генным» размером минихромосом или от нескольких десятков до нескольких сотен т.п.н у видов с «субхромосомной» ДНК макронуклеуса.

Целью данного исследования было сравнить распределение реплицирующихся генов на ранних и поздних стадиях S-фазы в макронуклеусах инфузорий *Paramecium multimicronucleatum*, *Didinium nasutum* и *Bursaria truncatella*. Размеры молекул ДНК макронуклеусов в этих видах составляли ~50-1700 т.п.н., ~50-1000 т.п.н. и ~50-450 т.п.н., соответственно. На ультратонких срезах интерфазных макронуклеусов хроматин имел вид телец размером ~ 60-200 нм. При снижении активности в условиях голодания в макронуклеусах *P. multimicronucleatum* и *D. nasutum* хроматиновые тельца во всем объеме макронуклеуса увеличивались в размере, а в *D. nasutum* наблюдалось образование коротких фибрилл толщиной ~ 200 нм из нескольких телец. В макронуклеусе *B. truncatella* укрупнение телец при голодании происходит в «зонах конденсации» - обособленных участках ядра, расположенных в центральной части макронуклеуса. При инцистировании в «зонах конденсации» *B. truncatella* происходит формирование хромонемных фибрилл толщиной ~ 200 нм.

Для мечения новосинтезированной ДНК использовали этинил-дезоксиуридин с последующей клик-реакцией с sulfo-Суanine3 азидом. Препараты изучали в конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Известно, что S фаза у парамеций занимает около 50%, а у *D.nasutum* и *B.truncatella* 70-75% времени между делениями макронуклеуса. Для мечения ранне- и позднереплицирующихся генов этинилдезоксиуридин находился в среде культивирования на протяжении первой или последней трети S фазы.

С помощью конфокальной микроскопии показано, что макронуклеусах *P. multimicro-nucleatum* и *D. nasutum* сайты репликации ранне- и позднереплицирующихся генов равномерно распределены по объему ядра. Однако паттерны репликации в макронуклеусе *B. truncatella* отличались: в центральной зоне ядра в "зонах конденсации" расположены позднереплицирующиеся гены, а раннереплицирующиеся гены *B.truncatella* предпочтительно распределены в периферических районах соматического ядра. Полученные паттерны отличаются от описанной в литературе ситуации в макронуклеусах *Stylonychia lemnae* («генный» размер ДНК макронуклеуса), где репликация происходит в узких зонах, перемещающихся в течение S фазы от концов макронуклеуса к центральной части [4].

Таким образом, в отличие от высших эукариот, где во всех клетках наблюдается сходная картина паттернов репликации генов в ядре, в соматических ядрах с организацией генома в виде большого числа коротких минихромосом паттерны репликации могут отличаться, что отражает особенности организации хроматина в макронуклеусах.

#### Список литературы

1. Cremer T., Cremer M., Cremer C. (2018). 4D-нуклеом: компартиментализация генома в контексте эволюции. *Биохимия*. **83**, 452 – 466.
2. O’Keefe R.T., Henderson S.C., Spector D.L. (1992). Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences *J Cell Biol.*, **116**, 1095-1110.
3. Alexandrova O., Solovei I., Cremer T., David C.N. (2003). Replication labeling patterns and chromosome territories typical of mammalian nuclei are conserved in the early metazoan Hydra. *Chromosoma*. **112**, 190–200.
4. Postberg et al. (2005). Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J.Cell Sci.*, **118**, 3973-3983.

## **Нуклеаза S1 – новый фермент для фрагментации хроматина в экспериментах по захвату конформации хромосом**

**Попов А.А.<sup>1,2</sup>, Шадский А.А.<sup>1,2</sup>, Торгунаков Н.Ю.<sup>1,2</sup>, Фишман В.С.<sup>1,2</sup>,  
Гридина М.М.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Развитие методов изучения пространственной организации генома в сочетании с полногеномным секвенированием радикально изменило наши представления об укладке хроматина в ядре. Геном можно разделить на компартменты А/В, которые соответствуют открытому и закрытому хроматину соответственно; в свою очередь компартменты можно разделить на топологически ассоциированные домены (ТАДы), которые состоят из петель хроматина и в которых наблюдается повышенный уровень внутридоменного взаимодействия разных участков генома. Подобная организация обеспечивает регуляцию таких важных процессов, как экспрессия генов и репликация, за счет создания физически доступных и недоступных участков ДНК в ядре.

Одни из наиболее широко используемых методов изучения пространственной организации хроматина — технологии захвата конформации хромосом, включая полногеномный анализ контактов ДНК, именуемый Hi-C. Он включает в себя ряд обязательных этапов, а именно: фиксацию клеток формальдегидом, сохраняющим укладку нативного генома внутри ядра; фрагментацию хроматина; мечение хроматина биотином с последующим лигированием сближенных в пространстве концов ДНК. В результате секвенирования полученных молекул можно узнать, какие участки генома были непосредственно близки в клетке до фиксации.

Здесь важным этапом является фрагментация, от которой, в частности, зависит разрешение получаемых данных, т.е. минимальный размер участка генома, для которого можно определить профиль трехмерных контактов в ядре. Для создания наиболее мелкомасштабных Hi-C карт требуются ферменты, которые не имеют специфических сайтов распознавания в геноме. На данный момент для создания библиотек Hi-C используются 2 таких фермента: микрококковая нуклеаза (MNase) и ДНКазы I (DNase I). Однако использование обеих нуклеаз имеет ряд ограничений: использование MNase требует дополнительных шагов фиксации клеток, тщательной оптимизации концентрации для равномерного расщепления генома, и ее нельзя использовать для анализа безнуклеосомного хроматина, в свою очередь, в Hi-C библиотеках, приготовленных с использованием DNase I, большая доля неинформативных ридов, которые образуются из

нелигированных фрагментов, что требует более глубокого секвенирования для получения карт высокого разрешения.

Таким образом, требуется фермент, который тоже не имел бы специфических участков распознавания ДНК и был бы лишён недостатков, которые присущи MNase и DNase I. В качестве такого фермента мы предлагаем нуклеазу S1.

Мы разработали протокол приготовления Hi-C библиотек с использованием нуклеазы S1 для фрагментации хроматина. Анализ данных секвенирования полученных библиотек показал, что качество Hi-C библиотек, полученных с помощью S1, не уступает таковым полученным с помощью DNase I.

В данной работе мы провели описание мест разрывов, которые вносит нуклеаза S1 с целью узнать: существуют ли предпочтения в разрезании генома нуклеазой S1 в зависимости от последовательности ДНК или от типа хроматина. Нами было подтверждено, что нуклеаза S1 не имеет предпочтительного сайта разрезания и данная нуклеаза эффективно вносит разрывы как в участки открытого, так и закрытого хроматина. Несмотря на то, что гидролизу подвергались участки ДНК как в эу-, так и в гетерохроматине, мы наблюдали «нуклеосомный паттерн» в распределении участков разрывов, сходный с описанным ранее для гидролиза ДНК высокой концентрацией MNase. Это говорит о том, что нуклеаза S1 имеет предпочтение к гидролизу свободной от нуклеосом ДНК и, в перспективе, может быть использована не только для захвата конформации хромосом, но и для анализа нуклеосомной укладки и других геномных исследований.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-24-00190.

# **Redefining Tandem Repeat Analysis in Mammalian Genomes: A Novel Software Toolset and Classification Approach**

**Попова М., Комиссаров А.**

Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург

In an era where mammalian genome sequencing has become routine, securing high-quality samples often presents a bigger challenge than the sequencing process itself. Despite this, genome assemblers are still far from perfection, except for the Telomere-to-Telomere (T2T) genome assembly. Among the most complex tasks in genome annotation is the elucidation of large arrays of tandem repeats located in the heterochromatic regions of genomes, a challenge that becomes even more daunting with lower quality assemblies. Addressing this issue, we have developed a software toolset tailored specifically for the comparative annotation of tandem repeats. This toolset not only facilitates genome-wide analysis in both assembled genomes and raw, unassembled reads but also operates under the assumption that tandem repeat assembly is often incomplete. Consequently, this significantly enhances the quality and efficiency of genome analysis.

We have further pioneered a novel classification system for tandem repeats. This system classifies these critical genome components based on a multitude of parameters, such as their array length, genome-wide array copy number, array divergence and length variation, relationship with transposable elements, chromosome localization, conservation in evolution, and taxon-specificity.

To validate and exploit our software and classification system, we analyzed 2770 genome assemblies encompassing a vast array of 726 mammalian species. Where raw reads were available, we leveraged these to estimate the overall count of tandem repeats in the respective genomes.

Our work demonstrates that chromosome-level assemblies are not indispensable for the assembly of large tandem repeats. We further reveal that Hi-C-based assemblies essentially order large arm fragments, yet fail to assemble large tandem repeats effectively. Our research also underscores the fact that many HiFi assemblers filter out or collapse reads containing large tandem repeats, thus removing them during the deduplication steps.

While we continue to employ the term 'large tandem repeats' instead of 'satellite DNA', we also report several new types of large tandem repeats that do not conform to the classical definition of satellite DNA.

Our in-depth analysis unearths taxon-specific tandem repeats at each taxonomic level, in addition to identifying species-specific and chromosome-specific repeats. Moreover, we propose a cost-effective computational method for designing FISH probes based on low coverage, raw short reads, which can be universally applied across species.

We conclude by discussing the overarching analysis of tandem repeats, taking into account existing hypotheses about their function and evolution. Our findings pave the way for future explorations into the fascinating realm of the darkest part of the genome.



## Хромосомная эволюция в подотряде жвачные (*Artiodactyla*, *Ruminantia*)

Проскурякова А. А.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Отряд парнокопытные (*Artiodactyla*, ранее *Cetartiodactyla*) включает в себя крупный подотряд жвачные (*Ruminantia*), который имеют ряд отличительных признаков (наличие рогов, редуцированные резцы, многокамерный желудок). В подотряд входит множество сельскохозяйственных и редких видов млекопитающих. Филогенетически жвачные разделяются на два инфраотряда – оленьковые (*Tragulina*) и высшие жвачные (*Rocora*). Высшие жвачные представлены множеством семейств – вилороги (*Antilocapridae*), жирафы (*Giraffidae*), оленивые (*Cervidae*), кабарги (*Moschidae*), полорогие (*Bovidae*), тогда как оленьковые представлены только одним семейством – *Tragulidae*.

Хромосомная эволюция жвачных имеет две особенности: широкую вариабельность диплоидного числа хромосом от 7 до 70 и нестандартную морфологию X-хромосомы. В настоящее время накоплен массив данных касательно геномов жвачных для представителей из каждого семейства. Изучение геномов жвачных велось с разных сторон и включало комплексный подход: классическую и бэндинг цитогенетику, данные сравнительной геномики, секвенирование и сборки геномов. Нами были получены новые данные по распределению ВАС клонов (*bacterial artificial chromosome*) на хромосомах жирафа и сборка генома этого вида до уровня хромосом; по выявлению точек эволюционных разрывов хромосом, проведенное на широком спектре видов жвачных; по получению сравнительных карт хромосом северного оленя и черного мунтжака с гомологиями одногорбого верблюда. Было проведено широкое исследование по выявлению закономерности распределения ядрышкообразующих районов (ЯОР) на хромосомах жвачных. При помощи суммирования и анализа новых и ранее полученных данных были внесены изменения в ранее опубликованный предковый кариотип высших жвачных. Также нами было показано, что внутривхромосомные перестройки в аутосомах жвачных происходили гораздо чаще, чем считалось ранее.

Также мы исследовали эволюцию X-хромосомы при помощи локализации 27 консервативных ВАС клонов. Карты распределения ВАС клонов были получены при помощи локализации флуоресцентной *in situ* гибридизации для широкого спектра видов жвачных из всех семейств: яванский оленек (*Tragulidae*), вилорог (*Antilocapridae*), сибирская кабарга (*Moschidae*) и жираф (*Giraffidae*). Чтобы проследить эволюцию X-хромосомы в ходе быстрой радиации крупных семейств жвачных, нами было выбрано несколько видов из семейств оленивые (лось, сибирская косуля, водяной олень, серый

мазама, европейская лань, олень святого Давида, черный мунтжак, хохлатый олень, пятнистый олень и марал) и полорогие (овцебык, коза, овца, черная антилопа, антилопа Дик-Дик, корова, нильгаи, саола и гаур). Путем локализации ВАС-клонов мы выявили три основных консервативных блока и реконструировали структуру предполагаемой предковой X-хромосомы жвачных. Наблюдаемая в настоящее время изменчивость X-хромосомы сформировалась путем инверсий, изменения положения центромеры, накопления блоков гетерохроматина и аутомных транслокаций в течение 55 миллионов лет эволюции жвачных животных. Скорость X-специфических перестроек у Ruminantia значительно превышает таковую у плацентарных млекопитающих.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00034П.

ГЗ FWGZ-2021-0015.

## **Полногеномные, сегментные и локус-специфичные дубликации генов и вторичная диплоидизация кариотипов – разнонаправленные изменения геномов и кариотипов на путях видообразования и прогрессивной эволюции растений**

**Родионов А.В., Гнутиков А.А., Журбенко П.М., Мачс Э.М., Носов Н.Н., Пунина Е.О., Сухов А.С., Шнеер В.С.**

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Среди растений полиплоиды встречаются значительно чаще, чем в мире животных: по оценкам кариологов от 30 до 50% кариотипов растений выглядят как полиплоидные. Однако сравнительные геномные исследования показали, что предки ВСЕХ современных многоклеточных наземных растений прошли через один или несколько раундов полногеномных дубликаций (WGD). Следовательно, удивлять должно не то, что полиплоидов среди растений много, а то, что от 50 до 70% видов растений, пройдя через несколько актов WGD, имеют кариотипы, выглядящие как диплоидные.

Полиплоидизация генома – это радикальный и быстрый способ видо- и родообразования у растений. Таким путем возникли десятки тысяч видов современных растений. Удачные сочетания аллелей разных субгеномов, характерные для полиплоидов относительно крупные размеры, частый переход к неполовому размножению способствуют успешному освоению полиплоидами новых ареалов, адаптации к экстремальным условиям существования, но не к обретению новых ароморфозов – это видообразование, но видообразование на уже освоенном уровне эволюционной сложности, шаг, не ведущий сам по себе к прогрессивной эволюции. В этом смысле полиплоиды можно считать “dead-ends” на филогенетическом древе растений.

Напротив, сравнительный анализ кариотипов предков-основателей таксонов надродового уровня (семейств и выше) показывает, что, как правило, виды-основатели имели низкохромосомные кариотипы. У общего предка однодольных и двудольных в геноме было 15 протохромосом и 22 800 генов, у предка двудольных – 7 протохромосом, у предка однодольных 5 протохромосом, у предка злаков 7 протохромосом (Murat et al., 2017). Появление малохромосомных видов в потомстве полиплоидов достигается путем дисплоидии и фракционирования геномов. В этом случае неополиплоид постепенно утрачивает большую часть дублицированных копий генов, число хромосом в геноме уменьшается. Какие гены будут утрачены в ходе фракционирования генома, а какие сохранят дублицированные копии, зависит от того, каким образом возникли в геноме копии того или иного протеин-кодирующего гена. Для генов, дублицированных в результате WGD, действует правило: гены, продукты которых работают в составе

гетеропротеиновых комплексов, сохраняются, гены гомопротеиновых комплексов и гены, следующие правилу: «один ген – один фермент», предпочитают моногенное существование. Напротив, если дублированные копии генов появились в геноме в результате тандемной или сегментной дубликации, то в первую очередь, по той же причине, утрачиваются «лишние» копии генов компонентов гетеромерных комплексов.

У разных особей вида, вставшего на путь стохастического фракционирования генома и диспloidии, первоначально возникшая в результате WGD генетическая избыточность разных компонентов генома трансформируется своеобразно, что приводит к радикальному увеличению внутривидового геномного и эпигенетического полиморфизма и дает богатый материал для естественного отбора.

Эволюционная геномика показывает, что именно виды с такими вторично диплоидизированными геномами и кариотипами в какой-то момент приобретают и передают потомству комплекс генов и признаков, достаточный для того, чтобы опытные систематики считали эту группу видов особым семейством.

И, наконец, о роли локус-специфичных мультипликаций генов в эволюции. По-видимому, она состоит, прежде всего, в том, что изменением числа копий того или иного гена корректируются результаты того расклада аллелей, который остается в геноме полиплоида или диплоида в результате процессов вторичной диплоидизации и фракционирования геномов неополплоидов, приведения в божеский вид стохастически сложившегося набора аллелей полиплоида и диплоидизированного потомка, генофонд которых уже отличается от прошедшего длительный отбор генофонда предковых видов.

Еще одна причина появления в геноме мультиплицированных копий какого-либо гена состоит в геномном гомеостазе - способности генома поддерживать оптимальное для вида в данных конкретных условиях число копий (паралогов) виталей - необходимых для жизни генов. Яркими примерами такого ответа являются мультипликация генов дигидрофолатредуктазы в ответ на действие метотрексата (Goker et al., 1995) и мультипликация в 40-100 раз числа копий гена EPSPS в геномах *Amaranthus palmeri*, защищающая растения, обработанные глифосфатом, который должен убивать растение подавляя синтез продукта этого гена - фермента 5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазы (EPSPS) (Koo et al., 2018). Причем у растений благоприобретенное таким образом изменение генома передается в ряду поколений, в том числе, половых.

Ну и, конечно, мультипликация генов - это шанс для появления нео-генов.

Отдельные разделы работы выполнены при поддержке грантов РФФИ No 22-24-01117 (АВР, ПМЖ, ЕОП) и 22-24-01085 (ААГ, ННН).

## **Конститутивный гетерохроматин у грызунов (Rodentia, Mammalia)**

Романенко С.А.<sup>1</sup>, Лемская Н.А.<sup>1</sup>, Филонова В.А.<sup>2</sup>, Графодатский А.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Конститутивный гетерохроматин (КГ) образует постоянные структурные элементы в парах гомологичных хромосом и располагается преимущественно в центромерных и теломерных районах хромосом. Крупные блоки КГ характерны для Y-хромосом и добавочных (В) хромосом позвоночных. Количество и распределение блоков КГ видоспецифично и может существенно варьировать даже у близкородственных видов. Основным компонентом КГ является сателлитная ДНК, организованная в тандемные повторы. Блоки КГ выявляют с помощью С-окрашивания. СДАГ-окрашивание позволяет визуализировать обогащенность последовательностей, формирующих блоки, АТ- и GC-основаниями и привязать блоки к GTG-окрашенным хромосомам.

К настоящему моменту С-окрашивание хромосом, выполненное для значительного числа видов грызунов, показало огромную вариативность количества и распределения выявляемых блоков КГ у представителей этого отряда. При этом первые результаты СДАГ-окрашивания показали, что у одного вида обогащенность последовательностей выявляемых блоков АТ- и GC-основаниями может различаться. Повторяющиеся элементы лишь единичных видов грызунов охарактеризованы. Так, описаны сателлитные повторы в геноме домового мыши и одного вида перепончатопалых хомяков, выявлены и локализованы на метафазных хромосомах сателлитные повторы, характерные для отдельных видов полевок. Установлено, что у полевок повторенная ДНК в центромерных районах хромосом создает обширную межвидовую цитогенетическую изменчивость, а у лесных мышей два типа хроматина специфичны для В-хромосом.

В настоящей работе мы суммируем литературные данные и данные полученные нами при изучении распределения и при анализе состава повторенных последовательностей, формирующих блоки КГ, у различных представителей отряда грызунов. Показываем, насколько сильно может различаться репертуар повторенных последовательностей и их локализация у близкородственных видов, еще раз подтверждая высокие скорости преобразования геномов грызунов и значимый вклад повторенной ДНК в эволюцию их геномов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-14-00034-П.

## **Гибридная стерильность у полевок рода *Alexandromys*: на что способен хромосомный полиморфизм и гетерозиготность по перестройкам**

**Рубцова Д.В.<sup>1,2</sup>, Бикчурина Т.И.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Формирование репродуктивной изоляции является важным механизмом видообразования. У млекопитающих возникновение гибридной стерильности считается одним из основных механизмов формирования репродуктивной изоляции. Самцы межвидовых и межпопуляционных гибридов серых полевок рода *Alexandromys* являются хорошей моделью для изучения ранних этапов формирования гибридной стерильности. В работе мы использовали самцов межвидовых гибридов *A. tujanensis* x *A. maximovicii*, *A. tujanensis* x *A. evoronensis*, *A. evoronensis* x *A. tujanensis* и самцов межпопуляционных гибридов *A. evoronensis*. Важной особенностью этих полевок является относительно небольшое время дивергенции родительских видов – 110 тысяч лет. Кариотипы родительских видов отличаются по серии хромосомных перестроек, также существенно то, что для родительских видов характерен высокий уровень хромосомного полиморфизма.

Было показано, что самцы межвидовых гибридов полевок рода *Alexandromys* стерильны во всех направлениях скрещиваний, однако самцы межпопуляционных гибридов потенциально фертильны. Это явление связано с возникновением простой гетерозиготности в кариотипах межпопуляционных гибридов и сложной гетерозиготности – у межвидовых. Гетерозиготность по многим хромосомным перестройкам разных типов, в отличие от простой, может приводить к нарушениям сперматогенеза вследствие аберраций синапсиса и рекомбинации.

В ходе работы мы выявили с помощью иммулокализации основных белков мейоза на препаратах распластанных синаптонемных комплексов сперматоцитов нарушения синапсиса и рекомбинации. На пахитеноподобной стадии профазы I у межвидовых гибридов хромосомы формировали гетероморфные биваленты, триваленты, а также сложные мультиваленты, тогда как у межпопуляционных гибридов структур сложнее тривалентов отмечено не было. Гистологический анализ срезов семенных канальцев у межвидовых гибридов выявил высокий уровень апоптоза клеток сперматогенного ряда, подтвердив выявленные иммулокализацией нарушения. При анализе эпидидимальных мазков у межвидовых гибридов было выявлено значительное снижение количества

сперматозоидов относительно родительских видов, при этом большая их часть имела аномалии морфологии.

Таким образом, мы выявили многочисленные нарушения синапсиса и рекомбинации у гибридов между тремя видами полевок рода *Alexandromys* – сложных гетерозигот по многим хромосомным перестройкам. Развитие половых клеток, содержащих эти нарушения, останавливается на разных стадиях сперматогенеза у разных скрещиваний, что ведет к гибридной стерильности.

## **На пути от «анемии к лейкемии»: миелодиспластические синдромы (МДС) как модель для изучения комплексных нарушений кариотипа и феномена хромотрипсиса**

**Рюмин С.С., Латыпова М.В., Гиндина Т.Л.**

Лаборатория цитогенетики и диагностики генетических заболеваний, Клиника «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой», ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург

Миелодиспластические синдромы (МДС) – группа генетически гетерогенных клональных заболеваний системы крови, для которых характерны цитопения периферической крови, дисплазия миелоидного ростка костного мозга, неэффективность гемопоэза, а также высокая вероятность трансформации заболевания в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ-МДС).

Одним из важных диагностических признаков МДС является обнаружение в гемопоэтических клетках цитогенетических нарушений, в том числе комплексного кариотипа (при наличии трёх и более хромосомных аномалий на одну метафазу). Тем не менее, пути и механизмы такой структурной эволюции кариотипа при МДС и ОМЛ-МДС остаются мало изученными. Дополнительной диагностической проблемой является необходимость привлечения для точной идентификации сложных перестроек многоцветной флуоресцентной *in situ* гибридизации (mFISH и mBand), недоступной в большинстве клинических лабораторий. Таким образом, изучение вовлечения генетического материала отдельных хромосом в изолированные и комплексные цитогенетические нарушения при МДС и ОМЛ-МДС является актуальной задачей, необходимой как для понимания механизмов патогенеза этого заболевания, так и для стратификации пациентов на прогностические группы при выборе тактики лечения.

В исследование было включено 441 пациента, проходивших обследование в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачёвой, которым был установлен диагноз МДС или ОМЛ-МДС и выявлены нарушения кариотипа.

В группе «детского возраста» (85 пациентов, медиана возраста – 8 лет) среди некомплексных цитогенетических нарушений доминировали аномалии 7-ой хромосомы (33%), в основном представленные моносомиями и разноуровневыми делециями 7q. Далее по убыванию вклада в общую структуру цитогенетических нарушений у пациентов детского возраста были отмечены приобретённые трисомии 8-ой (15%) и 21-ой (8,5%)



хромосом, разные варианты дисбаланса половых хромосом (7%). У 22 пациентов были выявлены комплексные перестройки кариотипа, в основном связанные с гипердиплоидией (64%) за счёт трисомий отдельных хромосом (в первую очередь хромосом 8, 19 и 21). Структурные перестройки в комплексных кариотипах редко превышали 1-2 хромосомные аномалии на метафазу и были ассоциированы с транслокациями 1q, 3q и 11q, делециями 7-ой хромосомы. При этом формирование сложных дериватов из фрагментов нескольких хромосом обнаружено не было.

Цитогенетические профили обнаруживаемых хромосомных аномалий изменялись с повышением возрастной группы пациентов. Так, аномалии 7-ой хромосомы в изолированном статусе доминировали у пациентов группы «молодых взрослых» (103 пациента, медиана возраста – 34 года) – 20%, постепенно снижая свою представленность в группах «среднего возраста» (115 пациентов, медиана возраста – 54 года) – 11,2%, пожилых пациентов (103 пациента, медиана возраста – 66 лет) – 8,5%, полностью исчезая у пациентов «старческой» возрастной группы (35 пациентов, медиана возраста – 80 лет). С другой стороны, с повышением возраста пациентов случаи с изолированной делецией 5q встречались чаще – от 3,2% у «молодых взрослых» и до 23% у пациентов старших возрастов.

Частота встречаемости комплексных кариотипов повышалась с возрастом пациентов - от 29,6% у «молодых» взрослых и до 40,6% у пациентов старшего возраста. При этом, в отличие от детей, у взрослых пациентов прогностически неблагоприятные гиподиплоидные варианты анеуплоидий с множественными структурными перестройками, такими как делеции 5q, 17p, 20q, несбалансированные транслокации 1q, 3q, 12q и 13q, встречались чаще. В свою очередь, гипердиплоидные кариотипы, ассоциированные с множественной амплификацией отдельных хромосомных сегментов были выявлены в меньшей когорте взрослых пациентов. Кроме того, отличительной чертой комплексных кариотипов взрослых было формирование сложных дериватов из нескольких фрагментов, наиболее часто организованных из материала хромосом 4, 7, 8 и 12, что, скорее всего, может быть связано с феноменом хромотрипсиса.

Таким образом, МДС является хорошей моделью для изучения структурных изменений кариотипа, демонстрируя широкое разнообразие цитогенетических проявлений кариотипической нестабильности, которая качественно различается у больных разных возрастов.

## Тканеспецифичность связи пространственной архитектуры хроматина и генной экспрессии на примере локуса *Slc29a3/Unc5b* мыши

Сальников П.А.<sup>1,2</sup>, Ян А.П.<sup>1,2</sup>, Белокопытова П.С.<sup>1,2</sup>, Весна Э.<sup>1,2</sup>,  
Торгунаков Н.Ю.<sup>1,2</sup>, Степанчук Я.К.<sup>1,2</sup>, Тихомиров С.А.<sup>1</sup>, Лукьянчикова В.А.<sup>1,2</sup>,  
Фишман В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Одним из уровней организации хроматина в интерфазном ядре являются Топологически Ассоциированные Домены (ТАДы). Эти домены - участки ДНК с большим количеством внутренних контактов и относительной изоляцией от геномного окружения - формируются за счёт взаимодействия когезина и белка CTCF. ТАДы эволюционно консервативны и, предположительно, участвуют в регуляции генной экспрессии, хотя механизмы остаются неясными. Полная деплеция CTCF не приводит к серьезным изменениям в экспрессии генов, а случаи значительной реорганизации ТАДов, приводящей к нарушению регуляции экспрессии, редки. Предполагается, что влияние структуры ТАДов на экспрессию генов может варьироваться в зависимости от эпигенетического статуса локуса и онтогенетической истории клетки. В этой работе мы проверили гипотезу о тканеспецифичности влияния реорганизации генома в локусе *Slc29a3/Unc5b* (chr10:60755585-60761088, mm10) мыши на экспрессию генов.

Локус мыши *Slc29a3/Unc5b* имеет высокую степень инсуляции между двумя смежными ТАДами, содержащими гены, активные в различных тканях и обеспечивающие жизненно важные функции. С использованием технологии CRISPR/Cas9 мы создали модельную линию мышей на генетическом фоне линии C57Bl/6, удалив кластер сайтов связывания белка CTCF в исследуемой границе ТАДов. Мы проанализировали аллель-специфичную экспрессию генов локуса в различных органах гибридов между модельной линией и *Mus musculus castaneus*. Результаты модификации оценивались как различия в концентрациях аллелей CAST и C57Bl/6 (мутантных и дикого типа).

Значимые изменения генной экспрессии были замечены менее, чем в половине типов тканей, и в большинстве случаев они не превышали 25%, что согласуется с литературными данными. Мы обнаружили два случая изменений в разных направлениях: так, экспрессия *Slc29a3* в почках уменьшилась на 25%, а в мозжечке - увеличилась на 20%; экспрессия *Vsir* уменьшилась на 20% в обонятельной луковице, но увеличилась на 10% в мочевом пузыре.

Анализ трендов в этом эксперименте показал интересные результаты. Наиболее значительные изменения (около двух раз) обнаружены в экспрессии тканеспецифичных генов локуса - *Unc5b* и *Cdh23*, важных для эмбрионального развития. Это согласуется с гипотезой, что ТАДы обычно изолируют сложно регулируемые гены развития от влияния цис-окружения. Эти гены демонстрируют схожие изменения экспрессии в мозжечке и мочевом пузыре, и противоположную в почках. Исходя из этого, мы предполагаем увидеть общие паттерны реорганизации пространственных контактов или изменения в распределении гистоновых модификаций для мозжечка и мочевого пузыря, и отличный - для почки.

Мы также выявили корреляцию в изменениях экспрессии генов *Slc29a3*, *Vsir* и *Sgpl1* в различных тканях в ответ на реорганизацию ТАДов. Эти гены располагаются у основания петель, формирующих соседние ТАДы, что в трехмерном пространстве приводит к их сближению, несмотря на значительное расстояние между ними в последовательности ДНК. Влияние реорганизации ТАДов на гены, расположенные в основаниях петель, ранее пристально не изучалось.

В заключение, наши результаты доказывают, что механизмы, обуславливающие взаимосвязь трехмерной структуры хроматина и регуляции генной экспрессии, зависят от эпигенетического статуса хроматина и онтогенетической истории клетки.

Исследование конкретных зависимостей регуляции генной экспрессии в зависимости от локальной структуры ТАДов представляет собой интересное направление для дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-14-00247) и Министерства Образования и Науки РФ, грант #2019-0546 (FSUS-2020-0040).

## Молекулярно-цитогенетическое исследование видов рода *Calendula* L

Саматадзе Т.Е. <sup>1,3</sup>, Юркевич О.Ю. <sup>1</sup>, Хазиева Ф.М. <sup>2</sup>, Суслина С.Н. <sup>3</sup>, Морозов А.И. <sup>2</sup>, Амосова А.В. <sup>1</sup>, Муравенко О.В. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений, г. Москва

<sup>3</sup> Российский университет дружбы народов, г. Москва

В настоящее время около 40% лекарственных средств, вырабатываемых химико-фармацевтической промышленностью, изготавливаются из растительного сырья. Лекарственные средства на основе природных биологически активных соединений обладают рядом преимуществ по сравнению с их синтетическими аналогами и связано это с их малой токсичностью и возможностью длительного применения без побочных явлений. К числу таких лекарственных растений, можно отнести некоторых представителей рода календулы (*Calendula* L.), обладающие широким спектром фармакологической активности и широко востребованными в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

Род *Calendula* (Asteraceae) включает около 20 видов травянистых растений и полукустарников, распространенных преимущественно в Средиземноморье, Иране, Центральной Европе, Африке, Азии. Химический состав календулы изучен достаточно подробно. В цветках и траве присутствуют: флавоноиды, ксантофиллы и каротиноиды, эфирное масло, кумарины (скополетин), водорастворимые полисахариды (14,75%) (Hiller, Melzig, 2010). Выявлено ингибирование экстракта календулы (70-100%) на пролиферацию различных типов опухолевых клеток человека и мышинных клеточных опухолевых линий (Jiménez-Medina et al., 2006; Sak et al., 2017). Благодаря своим антигенотоксическим/защитным, а также противоопухолевым и антиметастатическим эффектам, доказанным на моделях животных, многие виды календулы могут иметь важные будущие последствия в разработке новых стратегий лечения рака (Jimenez-Medina et al., 2006; Sak et al., 2017; Abutaha et al., 2019).

*Calendula* L. является таксономическим и цитологическим сложным родом, главным образом из-за событий гибридизации и большой морфологической изменчивости, что приводит к появлению широкого спектра промежуточных форм, имеющих различные названия в многообразных таксономических категориях (Heun, Joel 1983). Хотя этот род был предметом нескольких исследований, до настоящего времени не было достигнуто единого мнения о его таксономии и эволюционных взаимоотношениях внутри этого рода (Nora et al. 2013). Все это требует глубокого и всестороннего сравнительного изучения

лекарственных и родственных видов календулы, которые могут быть не только дополнительными источниками ценного сырья, но и источниками полезных признаков, которые необходимо учитывать при проведении селекции календулы.

Целью данного исследования стало сравнительное изучение структуры кариотипов трех видов рода *Calendula*: *C. stellata* CAV., *C. tripterocarpa* RUPR. и *C. arvensis* L. с использованием молекулярно-цитогенетических подходов для характеристики их внутри- и межвидовой хромосомной вариабельности и уточнения их геномных и систематических взаимоотношений.

Материалом для исследования послужили делящиеся клетки корневой меристемы растений календулы: *C. stellata*, *C. tripterocarpa* и *C. arvensis*, выращенных в Ботаническом саду Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР, г. Москва). Морфометрический анализ проводили на основе измерения общей длины и длины короткого плеча хромосом. В соответствии с принятой методикой вычисляли центромерный индекс хромосом, классифицировали их по типу и определяли формулы кариотипов (Агапова, Гриф, 1982). Идентификацию хромосом в кариотипах проводили по рисунку C/DAPI-окрашивания с учетом их морфологии. Приготовление хромосомных препаратов и процедуру FISH (fluorescence in situ hybridization) осуществляли по ранее описанной методике (Yurkevich и др., 2017). FISH-анализ хромосом проводился с использованием классических генетических хромосомных маркеров 45S и 5S рДНК. Просмотр препаратов, отбор метафазных пластинок и их анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX61, снабженного черно-белой ПЗС (прибор с зарядовой связью) камерой CoolSnap (RoperScientific Inc., США).

Уточнены числа хромосом в кариотипах у видовых образцов, которые составили: *C. stellata* ( $2n=2x=14$ ), *C. tripterocarpa* ( $2n=2x=30$ ) и *C. arvensis* ( $2n=4x=44$ ). Результаты морфометрического анализа C/DAPI-бэндинга, показали, что длины хромосом изучаемых видов календулы находятся в пределах от 1,5 до 4,0 мкм и представлены метацентрическими и субметацентрическими хромосомами, постепенно убывающими по длине. Кариотипы исследованных видов являются симметричными. На основании морфометрического анализа были составлены формулы кариотипов для каждого вида.

Сравнительный анализ кариотипов трех видов календулы по рисунку C/DAPI дифференциального окрашивания. Установлено, что мелкие и среднего размера C/DAPI-бэнды локализуются в теломерных и интеркалярных районах хромосом исследуемых видов. Прицентромерные блоки хромосом, как правило, являются наиболее крупными и меньше варьируют по величине. В кариотипах каждого из изученных видов календулы не выявлены хромосомные аномалии. Визуальный анализ выявил, что в кариотипе у *C.*

*arvensis* обычно наблюдаются более крупные прицентромерные C/DAPI-бэнды, чем у кариотипов *C. stellata* и *C. tripterocarpa*. Теломерные, интеркалярные и прилегающие к вторичным перетяжкам C/DAPI –бэнды были высокополиморфными у всех трех видов календулы. Все хромосомы были идентифицированы по рисункам C/DAPI-бэндинга в соответствии с цитологической классификацией хромосом в кариотипе календулы лекарственной (*C. officinalis* L.) (Samatadze et al., 2019)

Изучение локализации рибосомных генов с помощью двухцветного FISH-метода установило, что у диплоидного вида *C. stellata* локализация 5S рДНК генов выявлена в субтеломерном районе хромосомы 6, а крупного размера сайт 45S рДНК локализован в области вторичной перетяжки ядрышкообразующих хромосом 2 и 7. У *C. tripterocarpa* обнаружены три пары спутничных хромосом (2,7,14) с небольшими сайтами гибридизации 45S рДНК, а у *C. arvensis* пять пар спутничных хромосом, четыре из которых имели крупные сайты гибридизации 45S рДНК (2, 7, 14, 21), а одна пара (9) – небольшие сайты гибридизации. Установлено, что в кариотипе *C. tripterocarpa* четыре пары хромосом, несущих крупные сайты гибридизации 5S рДНК (6, 12, 13, 15), а у *C. arvensis* пять пар хромосом, несущих сайты гибридизации 5S рДНК, причем четыре пары имели крупные сайты 5S рДНК (6, 19, 20, 22), а одна пара хромосом (13) - сайты 5S рДНК небольшого размера.

Существует несколько гипотез, относительно пloidности календулы и происхождения видов календулы. Одна из гипотез предполагает, что вид *C. arvensis* является тетраплоидным гибридом двух таксонов с числом хромосом 15 и 7 (Heyn et al., 1974; Nora et al., 2013). В нашем исследовании рисунок распределения C/DAPI-бэндов и основных сайтов рибосомных генов у изучаемых видовых образцов календулы свидетельствует в пользу гибридного происхождения *C. arvensis* ( $2n=4x=44$ ) в результате возможной, возникшей в процессе эволюции, интрогрессивной гибридизации между видами *C. stellata* ( $2n=2x=14$ ) и *C. tripterocarpa* ( $2n=2x=30$ ).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №22-26-00221.

Hiller K., Melzig M.F. Lexikon der Heilpflanzen und Drogen, 2. Auflage. – Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag, 2010. – S.106-107.

Jimenez-Medina E., Garcia-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer, 2006, №6. P. 119.

Sak K., Nguyen T.H., Ho V.D., Do T.T., Raal A. Cytotoxic effect of chamomile (*Matricaria recutita*) and marigold (*Calendula officinalis*) extracts on human melanoma SK-MEL-2 and epidermoid carcinoma KB cells. *Cogent Med.* 2017, Vol. 4. P. – 2–7.

Abutaha N., Nasr F.A., Mohammed A.Z., Semlali A., Al-Mekhlafi F.A., Wadaan M.A. *Calendula arvensis* L. as an anti-cancer agent against breast cancer cell lines. *Mol Biol Rep.* 2019. Vol. 46. P. 2187–2196.

Nora S.V., Castro S., Loureiro J., Gonçalves A.C., Oliveira H., Castro M., Santos C., Silveira P. Flow cytometric and karyological analyses of *Calendula* species from Iberian Peninsula. *Pl. Syst. Evol.* 2013. Vol. 299. P. 853–864

Агапова Н. Д., Гриф В. Г. О хромосомной терминологии. - Бот. журнал, 1982, N 9, т.67, с.123 -127

Yurkevich O. Y., Kirov I. V., Bolsheva N. L., Rachinskaya O. A., Grushetskaya Z. E., Zoschuk S. A., Samatadze T. E., Bogdanova M. V., Lemesh V. A., Amosova A. V., Muravenko O. V. Integration of physical, genetic, and cytogenetic mapping data for Cellulose synthase (CesA) genes in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Front. Plant Sci.* 2017. Vol. 8:146.

Samatadze T.E., Zoshchuk S.A., Haziya F.M., Yurkevich O.Yu., Svistunova N.Yu., Morozov A.I., Amosova A.V., Muravenko O.V. Phenotypic and molecular cytogenetic variability in calendula (*Calendula officinalis* L.) cultivars and mutant lines obtained via chemical mutagenesis. *Sci. Rep.* 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45738-3

Heyn C.C., Dagan O., Nachman B. The annual *Calendula* species: taxonomy and relationships. *Israel J Bot.* 1974. Vol. 23. P. 1201–1969.

## **Нарушение ламина-В и физиологическое старение приводят к дестабилизации теломер и гетерохроматина в герминальных клетках *Drosophila***

**Сизова Т.В., Моргунова В.В., Соколова О.А., Калмыкова А.И.**

Институт биологии развития РАН, Москва, Россия

Важную роль в функционировании генома и регуляции активности генов играет пространственная организация хроматина в ядре. Нарушения функций ядерной ламины и белков, с ней ассоциированных, приводят к декомпактизации и транскрипционной активации гетерохроматина. Схожие эффекты наблюдаются при клеточном старении. Известно, что заболевания, вызванные мутациями генов ламинов, вызывают синдром преждевременного старения и сопровождаются дисфункцией теломер. Однако причинно-следственные связи молекулярных изменений, которые вызваны нарушением ламинов и физиологическим старением, пока далеки от понимания. Крайне важно прийти к пониманию механизмов старения на организменном и тканевом уровнях.

В данном исследовании в качестве модельной системы были использованы герминальные ткани самок *Drosophila melanogaster*. Целью работы было сравнить молекулярные изменения, вызванные мутацией ламина-В и процессом физиологического старения. Известно, что ламин-В участвует в поддержании стабильности гетерохроматина на периферии ядра. С помощью RT-qPCR была продемонстрирована активация транскрипции теломерных повторов и мобильных генетических элементов как в мутантах по ламину-В, так и при естественном старении. С помощью метода хроматин-иммунопреципитации (ChIP) было показано, что в герминальных клетках *Drosophila* на фоне мутации ламина-В наблюдается декомпактизация гетерохроматина. С помощью иммуноокрашиваний (IS) было установлено, что у мутантов по ламину-В появляются двунитевые разрывы ДНК и признаки гомологичной рекомбинации в гетерохроматине, при этом наиболее сильные эффекты были в теломерах. Интересно, что аналогичные молекулярные изменения были зафиксированы и при физиологическом старении, в герминальных тканях 50-дневных самок *Drosophila*. Мутация белка Argonaute 2, Ago2, который является партнером ламинов, также приводила к активации рекомбинации в теломерах, что указывает на новую ядерную роль Ago2 в поддержании стабильности теломер. У ламиновых мутантов и при старении наблюдалась гибель клеток зародышевого пути. Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение биогенеза ламина-В и процесс старения способствуют дестабилизации структуры гетерохроматина, появлению разрывов ДНК и активации гомологичной рекомбинации в гетерохроматине. Эти процессы могут запускать клеточный ответ на повреждение ДНК и провоцировать гибель клеток. Наши данные указывают на тесную связь механизмов поддержания целостности гетерохроматина на периферии ядра с механизмами старения.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект РФФИ №22-14-00006.

ГЗ №0088-2021-0007.



## **Метод для исследования роли SMC-комплексов в репарации отдаленных двухцепочечных разрывов ДНК в эмбриональных стволовых клетках мыши**

**Смирнов А.В., Рыжкова А.С., Юнусова А.М.**

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

SMC-комплексы когезина и конденсинов I/II необходимы для организации архитектуры хроматина и функционирования основных клеточных процессов. В тоже время, роль этих комплексов в репарации двухцепочечных разрывов ДНК (DSB) и поддержании стабильности генома пока еще слабо изучена. Опубликованные исследования показывают, что в клетках SMC-комплексы действуют на нескольких уровнях: от хромосомного (удержание сестринских хроматид для гомологичной рекомбинации) и топологического (ограничение подвижности концов DSB в рамках “доменов репарации”), до локального (рекрутирование факторов репарации ДНК в фокус репарации).

В нашей лаборатории ранее были получены эмбриональные стволовые (ЭС) клетки мыши с делециями Rad21 (когезин), CapH (конденсин I), CapH2 (конденсин II), Smc2 (конденсины I/II). Мы поставили своей целью систематически проанализировать влияние ауксиновой деградации этих белков SMC-комплексов на частоты делеций и инверсий в разных районах генома. Внесение разрывов будет обеспечиваться нуклеофекцией RNP комплекса CRISPR/Cas9 и пары gРНК. Для подсчета перестроек мы адаптировали метод капельной цифровой ПЦР (ddPCR), позволяющий детектировать редкие события в смешанной популяции клеток. Мы проанализировали данные Hi-C и ChIP-seq для хромосомы 6 в ЭС клетках мыши и выбрали по 2 района для каждого из 5 условных “типов” топологических участков: “обычные” районы внутри топологически ассоциированных доменов (ТАДов); районы с сильной границей между ТАДами; маленькие ТАДы; районы с активным и неактивным хроматином. В этих участках будут созданы делеции и инверсии разной размерности: ~200 п.о., 3-5 тыс. п.о., 50-100 тыс. п.о. Для начала мы протестировали выбранный подход на участке гена Ace2 на X-хромосоме. Для создания перестроек были использованы пары gРНК на расстоянии 3445 п.о. и 192 п.о. После оптимизации условий нуклеофекции и анализа активности gРНК методом TIDE, мы провели серию экспериментов с добавлением ауксина. Для большинства проанализированных ЭС клонов частоты больших делеций находились в диапазоне 6-20%, а частоты инверсий – 2-10%. Пока мы не смогли подтвердить гипотезу о том, что нокдаун когезина приводит к росту числа больших делеций. В тоже время, мы обнаружили достоверное увеличение числа инверсий на 20-110% во всех проанализированных биологических репликах с деплецией Smc2, но не Rad21 или CapH2. Природу этого эффекта предстоит выяснить.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ, проект № 22-74-00084.

## Картирование точек разрывов фиксированных и полиморфных инверсий в хромосоме X у малярийного комара *Anopheles messeae*

Соболева Е.С., Артемов Г.Н., Шарахов И.В.

Лаборатория экологии, генетики и охраны окружающей среды, Томский государственный университет, г. Томск

e-mail: jane.sable.me@gmail.com

Хромосомные инверсии играют важную роль в эволюции и адаптации малярийных комаров. Было установлено, что скорость эволюции X хромосомы в этой группе приблизительно в 3 раза выше эволюции аутосом (Neafsey et al., 2015). Несмотря на морфологическое сходство, генетические различия между видами-двойниками облегчает реконструкцию филогенетических связей внутри видовых комплексов. Исследования филогенетических отношений в палеарктической подгруппе *Maculipennis*, использовали фиксированные хромосомные перестройки как в аутосомах, так и в X хромосоме, в качестве маркеров (Yurchenko et al., 2023). Недавно было показано наличие двух вложенных фиксированных инверсий в X хромосоме у одного из представителей группы, *Anopheles messeae*, по сравнению с более древними *An. atroparvus* и *An. maculipennis* (Soboleva et al., 2023). Четыре точки разрыва разделяют хромосому на 5 синтенных блоков (СБ1-5 от теломерного конца к центромерному). Поскольку точки разрыва вложенных инверсий расположены близко друг от друга, то длина синтенных блоков заключённых между ними составляет 0,5 млн п. н. для СБ2 и 2,1 млн п. н. для СБ4 при общей длине X хромосомы 17,7 млн. п. н. СБ2 и СБ4 транслоцируются в новую позицию, меняясь местами, и имеют обратный порядок генов у *An. messeae* по сравнению с *An. atroparvus*.

В природных популяциях *An. messeae* и вида-двойника *An. daciae* распространены особи, несущие полиморфные инверсии X2 и X0, соответственно. Целью настоящей работы было проверить располагаются ли точки разрыва полиморфных инверсий *An. messeae* и *An. daciae* в диапазонах локализации точек разрывов фиксированных инверсий *An. messeae*, что должно раскрыть направление эволюции X хромосомы малярийных комаров в подгруппе *Maculipennis*.

Отсутствие полногеномных сборок представителей подгруппы *Maculipennis*, кроме *An. atroparvus*, вынуждает прибегать к использованию метода «итеративного» картирования точек разрыва инверсий (см. тезис доклада в настоящем сборнике). Всего было гибридизовано 18 ДНК-проб на X хромосоме *An. messeae* с генотипом X22 и *An. daciae* с генотипом X00. Дистальная точка разрыва инверсии X0 *An. daciae* локализована в диапазоне 4.608-4.609 млн. п. н. на геномной карте *An. atroparvus*, тогда как

проксимальная точка разрыва инверсии расположена в диапазоне 17.256-17.324 млн. п. н. Более низкое разрешение картирования последней точки связано с низкой плотностью генов и сложностью картирования в недореплицированных районах прицентромерного гетерохроматина.

Один из фланкерных генов проксимальной точки разрыва инверсии *X2 An. messeae* совпадает с таковым для четвертой точки разрыва фиксированной инверсии, тогда как дистальная точка разрыва локализуется внутри СБ4 12.347-14.521 млн. п. н. (по карте *An. atroparvus*). Таким образом полиморфная инверсия *X2* восстанавливает порядок генов в районе СБ4, возвращая их в прежнюю позицию и в прежнем порядке, как это наблюдается у *An. atroparvus*. Данный район содержит 41 ген, чьи синтезируемые белки связаны с метаболизмом нуклеиновых кислот, биосинтезом атроментина (антикоагулянта и антибактериальная активность), гема, стероидных гормонов (экдизона), синтез различных антибиотиков, и метаболизма цитохрома P450.

Таким образом, полиморфные инверсии в X хромосоме *An. messeae* и *An. daciae* не могли иметь общее происхождение с фиксированными инверсиями и очевидно возникли уже после дивергенции этих видов двойников. Однако, нельзя не заметить, что точки разрыва обеих фиксированных вложенных инверсий и полиморфной инверсии *X2 An. messeae* располагаются на геномных отрезках, составляющих  $\approx 0,32\%$  от длины всей X хромосомы (в соотв. со сборкой AatrE3). Это, вероятно связано с существованием либо горячих районов разрывов X хромосомы, где перестройки происходят чаще, либо с тем, что именно в окрестности этих районов располагаются гены, структуру или регуляцию которых можно изменять через инверсионный механизм.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-14-00182.

## **Итеративное картирование – новый подход к геномному картированию точек разрыва инверсий на примере хромосом малярийных комаров рода *Anopheles* подгруппы *Maculipennis***

**Соболева Е.С., Артемов Г.Н.**

Лаборатория экологии, генетики и охраны окружающей среды, Томский государственный университет, г. Томск; e-mail: jane.sable.me@gmail.com

Эволюция некоторых организмов связана с хромосомными инверсиями. Считается, что инверсии ограничивая кроссинговер в инвертированной области формируют блоки коадаптированных аллелей генов, которые могут быть ассоциированы как с межвидовыми различиями в экологических нишах, так и влиять на репродуктивную изоляцию.

Поскольку считается, что инверсия происходит в результате уникального события и, далее, может закрепляться (фиксироваться), то картирование точек разрывов инверсий у разных видов позволяет провести реконструкцию филогенеза групп, где эти инверсии распространены. При этом использование рутинного цитогенетического анализа может не дать достаточного разрешения для выполнения такой реконструкции. Развитие технологии высокопроизводительного секвенирования нового поколения значительно облегчает эту задачу. Однако, поскольку накопление геномных данных происходит неравномерно в разных таксонах, требуется разрабатывать новые подходы для геномного картирования точек разрыва инверсий.

Палеарктическая подгруппа *Anopheles Maculipennis* представлена близкородственными видами комаров, эволюция которых сопровождалась парацентрическими хромосомными инверсиями (Стегний, 1991). В настоящее время для анализа доступен геном только одного вида комаров подгруппы – *Anopheles atroparvus* (Artemov et al., 2017). Как показало физическое картирование 17 равноудаленных друг от друга ортологов маркерных генов этого вида на X хромосоме близкородственного *An. messeae* эти виды разделяют две вложенные парацентрические инверсии в левом плече X хромосомы (Артемов и др. 2018). Определение более точного местоположения точек разрывов потребовало бы полногеномного секвенирования генома *An. messeae*, либо разработки других подходов.

Целью настоящей работы была разработка метода геномного картирования точек разрывов как фиксированных, так и полиморфных инверсий у малярийных комаров методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Геном *An. atroparvus* (AatrE3) был использован в качестве референсного для геномного картирования точек разрыва фиксированных инверсий X хромосомы *An. messeae*, с тем

допущением, что изменение порядка и ориентации генов в эволюции этих видов происходило только за счет инверсионных событий.

Материалом для исследования послужили личинки 4-го возраста малярийных комаров *An. messeae*, собранных на территории Томской области. Видовую принадлежность комаров определяли с помощью ПЦР-ПДРФ анализа (Artemov et al., 2021). Готовили давленные препараты политенных хромосом, кариотипировали особей, и для дальнейших этапов исследования отбирали самок со стандартным вариантом половой хромосомы X11.

Метод геномного картирования точек разрыва инверсий, который нами был назван «итеративный» представляет собой повторение (итерацию) трех этапов: 1) выбор нескольких генов-маркеров на геномной карте референса в том диапазоне, где, как предполагается, должна находиться точка разрыва инверсии; 2) физическое картирование ортологов генов-маркеров методом FISH на хромосоме изучаемого вида организма; 3) определение генов-маркеров, которые изменяют свою локализацию по сравнению с референсным порядком, то есть находятся внутри инверсии.

Для картирования точек разрывов фиксированных инверсий X хромосомы *An. messeae* при выборе диапазона расположения точек разрыва первоначально ориентировались на результаты картирования 17 ортологов генов-маркеров. Фрагмент гена (обычно экзон или его часть) амплифицировали по стандартному протоколу в присутствии геномной ДНК *An. atroparvus* в качестве матрицы, затем метили TAMRA-5-dUTP (Биосан, Новосибирск) и использовали полученный ДНК-зонд для FISH с препаратом X11 *An. messeae*. Далее, проводили физическое картирование ортолога маркерного гена на стандартных хромосомных картах (Artemov et al., 2021).

В результате итеративного картирования 53 ортологов маркерных генов удалось определить геномное расположение четырех точек разрывов фиксированных инверсий в X хромосоме *An. messeae* с разрешением 7-12 тыс. п. н. (по геномной карте референсного генома *An. atroparvus*). Разработанный нами метод имеет недостатки: поскольку информация о геноме изучаемого вида отсутствует мы не можем оценивать размер предельного диапазона, в котором расположена точка разрыва инверсии у изучаемого вида, а также не можем судить о составе генетических элементов в его окрестности. Тем не менее этот подход применим для сравнения локализации точек разрыва разных инверсий в пределах одного вида, позволяет оценивать внутривидовую изменчивость в локализации точек разрыва и проводить реконструкцию эволюции кариотипа с большим разрешением, чем это позволяет делать только сравнительный цитогенетический анализ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-14-00182.

## **Инсуляторный белок BEAF32 необходим для удлинения теломер и поддержания субтеломерных хроматиновых доменов**

**Соколова О.А., Сизова Т.В., Кобеляцкая А.А., Калмыкова А.И.**

Институт биологии развития РАН, Москва, Россия

Важную роль в организации структуры хроматина и регуляции экспрессии генов играют инсуляторные комплексы или пограничные элементы генома. Инсуляторы имеют множество сайтов связывания в геноме и участвуют в сближении энхансеров и промоторов и разделении доменов с разными типами хроматина. Кроме того, инсуляторные белки могут непосредственно участвовать в транскрипции, входя в состав репрессивного или активаторного транскрипционного комплекса. Инсуляторные белки млекопитающих играют важную роль в процессах гаметогенеза, а их нарушения приводят к стерильности и остановке развития. Однако, учитывая многофункциональность инсуляторных белков, зачастую сложно выявить механизмы их действия и тканеспецифичные мишени. Инсуляторный белок BEAF32 (Boundary Element-Associated Factor 32 kDa) – один из ключевых инсуляторных белков дрозофилы, мутация которого вызывает нарушение гаметогенеза.

В данной работе мы исследовали теломерную роль BEAF32. Было показано, что инсуляторный белок BEAF32 и его партнеры белки Chr13 и CP190 связываются с регуляторной областью теломерного повтора *TART* перед участком, проявляющим энхансерную активность. На фоне ноль-мутации BEAF32 происходит активация транскрипции *TART*. В норме за счет снижения количество белка BEAF32 на ранних этапах оогенеза, происходит кратковременная активация экспрессии *TART* и продукция обратной транскриптазы, необходимой для удлинения теломер на этой стадии развития. Количество повторов *TART* значительно увеличено в геноме мутантной линии BEAF32, что свидетельствует о том, что инсуляторный белок BEAF32 и его партнеры играют важную роль в удлинении теломер у *Drosophila*. Кроме того, BEAF32 локализован между субтеломерными участками хромосом (telomere associated sequences) и эухроматиновым доменом, формируя границу между разными типами хроматина. TAS примыкают непосредственно к теломерным повторам и, предположительно, необходимы для поддержания теломерного гетерохроматинового компартмента. Используя метод полногеномного секвенирования, мы показали, что при мутации BEAF32 не наблюдается глобального изменения в продукции коротких РНК, комплементарных мобильным элементам, но происходит резкое снижение количества коротких РНК комплементарных субтеломерным повторам. Можно заключить, что BEAF32 обеспечивает функциональную независимость и целостность TAS. Изучение роли BEAF32 в ходе оогенеза впервые демонстрирует важность архитектурных элементов для работы теломер и регуляции продукции коротких РНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №23-24-00025.

## Сайты рекомбинации бактериофагов в геномах эукариот

Сорокина Н.С., Дикая В.А., Даугавет М.А.

Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

Эволюционные линии прокариот и эукариот разделились более 2 млрд лет назад. За это время гены про- и эукариот прошли независимую эволюцию, и сходство между ними зачастую обнаружить очень сложно. Однако, существуют случаи, когда геномы эукариот содержат гены с высоким уровнем сходства с прокариотическими генами. Одно из объяснений этого явления – это горизонтальный перенос генов, то есть передача и наследование ДНК чужеродного организма. В некоторых исследованиях предполагается, что посредниками горизонтального переноса могут выступать бактериофаги. В том числе в нашей работе были описаны гены эукариот, которые содержат последовательности похожие на сайты рекомбинации бактериофагов (AttP). Эти гены также содержат участки прокариотического происхождения и примыкающие к ним специфические эукариотические последовательности – цистеин-богатые повторы (Daugavet et al., 2019; Daugavet et al., 2020). Поэтому было выдвинуто предположение, что последовательности ДНК, схожие с сайтами рекомбинации бактериофагов, могут обеспечивать интеграцию прокариотических генов. В таком случае число подобных последовательностей в геноме должно коррелировать с количеством генов, перенесенных в него горизонтально.

В рамках данной работы выбрано две группы геномов: 8 геномов позвоночных животных, для которых описаны единичные случаи горизонтального переноса генов, и 8 геномов других организмов, для каждого из которых показано большое число чужеродных генов, в том числе прокариотического происхождения. Для каждого генома рассчитывали количество последовательностей, схожих с AttP, на 100 пар оснований. Это значение варьирует 0,1-0,9 AttP/100 п.о. у позвоночных и 0,05-0,7 AttP/100 п.о. у других организмов. Сравнение групп не выявило достоверных отличий. Например, в геноме *Monosiga brevicollis* удаётся найти лишь 0,05 похожих на AttP последовательностей на 100 п.о. При этом в геноме ранее обнаружено от 400 до 1000 чужеродных генов (Yue et al., 2013; Tucker et al., 2013). В геноме *Danio rerio* 0,87 похожих на AttP последовательностей на 100 п.о. и обнаружен один случай переноса бактериального гена (Sun et al., 2015). Таким образом, для выбранных модельных геномов частота расположения последовательностей схожих с AttP бактериофагов не совпадает с большим количеством генов, произошедших путем горизонтального переноса.

На основании полученных ранее данных гены, приобретенные путем горизонтального переноса, часто содержат в аминокислотной последовательности цистеин-богатые

повторы (Daugavet et al., 2020). Поэтому, мы предположили, что для встраивания в геном чужеродных генов необходимы цистеин-богатые повторы и последовательность схожая с AttP в составе одного гена. Чтобы проверить это предположение создан набор белков, содержащий цистеиновый паттерн CX(4,9)CX(4,9)CX(4,9)CX(4,9)CC, характерный для цистеин-богатых повторов. Для контроля использован набор белков тех же организмов, не содержащий такой паттерн цистеинов. В нуклеотидной последовательности соответствующих генов выполнен поиск последовательностей с высоким сходством с сайтами рекомбинации бактериофагов AttP. Таким образом было получено 4 группы белков: 1) белки, содержащие и цистеиновые повторы, и AttP, 2) белки с цистеиновыми повторами, но без AttP, 3) белки без цистеиновых повторов и с AttP и 4) белки без цистеиновых повторов и без AttP. Размер каждой группы составил 992 аминокислотных последовательности.

Проводили поиск родственных последовательностей (BLAST) среди прокариотических белков. Чтобы исключить последовательности, которые имеют большое сходство между прокариотами и эукариотами из-за высокой консервативности, отбирали только совпадения, удовлетворяющие условиям: e-value ниже  $10^{-4}$ , длина выровненной части более 100 аминокислот и идентичность последовательностей больше 50 %. Для белков из каждой из четырёх групп найдены совпадения с бактериальными аминокислотными последовательностями, которые удовлетворяют этим условиям. Среди генов, содержащих цистеиновые повторы и AttP, для 87 последовательностей найдены аминокислотные последовательности бактерий с высоким сходством. Среди генов, содержащих только цистеиновые повторы - для 52 последовательностей. В том случае, если гены не содержали цистеиновые повторы, а содержали только AttP, найдено 37 последовательностей схожих с бактериальными. Если гены не содержали ни цистеиновых повторов, ни AttP - 29 последовательностей. Таким образом, максимальное количество белков, содержащих предположительно бывшие бактериальные последовательности, содержат также цистеин-богатые повторы и возможные сайты рекомбинации бактериофагов в нуклеотидной последовательности. Однако, для подтверждения этой связи необходимы дальнейшие исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение №075-15-2021-1075, подписано 28.09.2021).



## **Эпидемиология и дифференциальная диагностика наследственных оптических нейропатий в Западной Сибири**

**Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И.**

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Наследственная оптическая нейропатия Лебера (LHON) распространённое нейродегенеративное заболевание, обусловленное мутациями в митохондриальной ДНК. Заболевание наследуется по материнской линии и проявляется безболезненной потерей центрального зрения вследствие дегенерации нейронов ганглиозного слоя сетчатки. Болезнь чаще поражает мужчин молодого и среднего возраста. Вследствие высокой доли спорадических случаев, около 40% (Meerson *et al.*, 2015), выявление патогенных мутаций методами молекулярной диагностики является ключевым при постановке диагноза.

Цель данного исследования - скрининг митохондриальных и ядерных геномов в группе выявленных нами семей с симптомами болезни на наличие известных и новых мутаций, приводящих к нарушению энергозависимых путей клеточного метаболизма.

В анализ включено 178 человек из 44 семей, отобранных в лаборатории молекулярной генетики человека за период с 1997 года, из которых 85 человек имели симптомы болезни Лебера, остальные являлись родственниками по материнской линии. Полное офтальмологическое обследование, включающее в том числе, осмотр глазного дна и тест полей зрения, предоставили 52 человека из 37 семей. Пациенты были обследованы врачами новосибирского филиала ФГАУ «Микрохирургия глаза». Для людей, обратившихся в лабораторию самостоятельно (г. Омск, Томск, Новокузнецк, Республика Алтай и Казахстан), также проведено молекулярно-генетическое обследование и, в случае обнаружения патогенной мутации, семья включалась в исследование. Для каждой семьи была составлена родословная для выяснения характера генетического наследования. Индивидуальное информированное согласие на участие в научном проекте получали в каждом отдельном случае.

В целях поиска патогенных мутаций в состоянии гетероплазии (наличие мутантных и дикого типа мтДНК в одной и той же пробе) в группе пациентов с леберо-подобными симптомами (LHON-like), в которой не были обнаружены первичные патогенные мутации в результате секвенирования методом Сэнгера, было проведено дополнительное секвенирование на платформе Illumina HiSeq шести полных митогеномов из 6 неродственных семей.

Также на платформе Illumina HiSeq было секвенировано 6 митогеномов членов семьи L2 (патогенная мтДНК мутация m.10663T>C) для исследования корреляции уровня гетероплазмы m.10663T>C и клинического проявления симптомов LHON.

По нашим предварительным оценкам, количество выявленных случаев заболеваемости по Новосибирской области составило менее 30% от ожидаемой частоты, а количество носителей патогенных мутаций менее 10%, соответственно. Это вероятно связано с тем, что болезнь Лебера плохо диагностируется ввиду неполной пенетрантности, а также по причине низкой информированности врачей в отношении редких генетических заболеваний.

Спектр выявленных в Западной Сибири мутаций отличается от описанных в Европе и Азии: среди классических LHON-мутаций m.11778G>A является самой частой в Сибири (53%) и её встречаемость ниже, чем в странах Европы (69%), в Китае и Японии (90%) (Mackey *et al.*, 1996; Mashima *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2015). Распространённость m.3460G>A (22%) значительно отличается от европейских стран, где она в два раза ниже. Встречаемость m.14484T>C 19% несколько выше, чем в Европе (13%). Нами были выявлены редкие варианты m.10663T>C и m.3635G>A (Sukernik R.I *et al.*, 2005), описанные в мире как единичные. Недавно в одной из семей выявлен потенциально патогенный вариант m.4659G>A в 64 кодоне функционального домена ND2-гена мтДНК. Очевидно, что спектр патогенных мутаций, являющихся первопричиной болезни Лебера на территории Западной Сибири, более разнообразен.

Феномен спонтанного восстановления зрения для мутаций m.14484T>C (описан многими исследованиями) и m.10663T>C (описан впервые в нашей работе), вероятно связан с относительно низким уровнем экспрессивности этих мутаций по сравнению с классическими m.11778G>A и m.3460G>A. В пользу данной гипотезы может свидетельствовать индекс патогенности мутаций, согласно алгоритмам Mutpred: m.14484T>C – 0,618; m.10663T>C – 0,604; m.11778G>A – 0,789; m.3460G>A – 0,919.

Группа пациентов, имеющих леберо-подобную клиническую картину, у которых не выявлены известные или новые (кандидатные) патогенные мутации, должна быть исследована на наличие доминантной оптической атрофии (DOA). Однако, в нашей группе не все случаи имеют типичное для DOA течение из-за поздней манифестации и быстрого прогрессирования болезни (Fraser *et al.*, 2010). Зачастую отсутствие семейных случаев в данной группе затрудняет диагностику. В качестве направления дальнейших исследований мы рассматриваем также поиск мутаций ядерных генов, кодирующих ферменты, функционирующие в митохондриях.

## Хромосомная изменчивость алайской слепушонки *Ellobius alaicus* в общей мозаике генетической изменчивости

Тамбовцева В.Г.<sup>1\*</sup>, Баклушинская И.Ю.<sup>1</sup>, Матвеевский С.Н.<sup>2</sup>, Богданов А.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

<sup>2</sup> Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН

\* lynx1994@gmail.com

Алайская слепушонка *Ellobius alaicus* – высокогорный вид роющих грызунов, составляющий группу видов-двойников (подрод *Ellobius*) с восточной слепушонкой *E. tancrei* и обыкновенной слепушонкой *E. talpinus*. В отличие от широкоареального и преимущественно степного вида *E. talpinus*, восточная и алайская слепушонки характеризуются хромосомной изменчивостью Робертсоновского типа ( $2n=54-30$  и  $2n=52-48$  соответственно). Несмотря на многолетние исследования, охватившие значительную часть ареала *E. tancrei* и *E. alaicus*, пространственные и филогенетические взаимоотношения этих видов-двойников остаются малоизученными. В серии работ мы проанализировали материал из Памиро-Алая, где впервые показали присутствие алайской слепушонки, а также районы Алайской долины и южной части Тянь-Шаня), включая зоны контакта двух видов. Основной целью было изучение генетического полиморфизма и паттернов эволюции *E. tancrei* и *E. alaicus* по различным маркерам (хромосомным, ядерным, митохондриальным). Анализ кариотипов проводился с помощью рутинной и дифференциальной G-окраски, поскольку анализ структуры кариотипа для формы с  $2n=48$  был выполнен ранее с помощью хромосомного пейнтинга. Для филогенетического анализа были использованы молекулярные маркеры: *cytb*, митохондриальный ген *cytochrome b*; ядерные гены *XIST*, X-inactive specific transcript и *IRBP*, interphotoreceptor retinoid-binding protein.

Выявленная в результате хромосомная изменчивость *E. alaicus* по числу хромосом не выходила за пределы ранее описанных вариаций ( $2n = 48-52$ ); типичным для алайских слепушонок из большинства локалитетов остаётся кариотип  $2n = 52$ ,  $NF = 56$ . Однако паттерны хромосомной изменчивости *E. alaicus* по всему ареалу демонстрируют интересные закономерности, характеризующие эту группу как эволюционно молодую, находящуюся в процессе активных преобразований. Робертсоновские перестройки у слепушонок, обитающих в Памиро-Алае и Алайской долине, одни и те же (Rb(2.11), Rb(4.9) и Rb(3.10)), тогда как на юге Тянь-Шаня эти перестройки отсутствуют. В том регионе характерны монобрахиально гомологичные транслокации, а именно, широко распространенная Rb(1.3) и другие, ранее не описанные перестройки, обнаруженные у

уникальной двойной гетерозиготы с  $2n=48$  в ущелье к югу от оз. Иссык-Куль. Эта находка позволяет предположить существование ещё не описанной формы с  $2n=46$ . Кроме того, мы наблюдаем в природных популяциях присутствие животных, гетерозиготных по различным парам Rb-метацентрических хромосом ( $2n=53$ , 1Rb(2.11) у особей с северных склонов Алайского хребта и  $2n = 53$ , 1Rb(1.3) у животных из Нарынской долины). Таким образом, для алайской слепушонки Ферганский хребет является географическим барьером, по обе стороны от которого происходят независимые активные процессы формообразования и контакты с близкородственным видом *E. tancrei*.

Скорость хромосомной эволюции *E. alaicus* и *E. tancrei* очень высока в сравнении со скоростью накопления изменений в последовательностях яДНК и мтДНК. Добавление в анализ молекулярных маркеров демонстрирует несогласованную во времени и пространстве мозаичную картину генетической изменчивости (Tambovtseva et al., 2022) для выборки из Алайской долины и её окрестностей. Такое несоответствие во многом объясняется особенностями, характерными для подземных млекопитающих и ярко проявляющимися у слепушонок: ограниченной мобильностью, развитой социальностью, формированием колоний близкородственных особей, и, как следствие, относительно высоким уровнем инбридинга. В сочетании с фрагментацией ареала в горной местности, эти факторы создают уникальную модель для изучения начальных этапов видообразования на примере *E. alaicus*.

Работа выполнена при поддержке Государственной программы фундаментальных исследований Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, № 0088-2021-0019.

## **Импорт ДНК в митохондриях эукариот: современное состояние и перспективы использования для фундаментальных и прикладных исследований**

**Тарасенко В.И., Тарасенко Т.А., Клименко Е.С., Кулинченко М.В., Горбенко И.В., Константинов Ю.М.**

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск

Существование природной компетентности митохондрий к поглощению ДНК (импорт ДНК), обнаруженной с использованием изолированных митохондрий кукурузы (*Zea mays*), в последние годы получило свое экспериментальное подтверждение в условиях *in vivo* с использованием протопластов, полученных из растений *Arabidopsis thaliana* (Tarasenko et al., 2019). Поскольку как нами ранее установлено (Tarasenko et al., 2021), транспорт молекул ДНК разной длины в митохондрии происходит с участием разных мембранных механизмов, можно предположить, что митохондриальный импорт ДНК выполняет важные генетические и физиологические функции. Так, по всей вероятности, одна из основных генетических функций митохондриального импорта ДНК у высших растений может состоять в обеспечении внутриклеточного обмена ДНК между ядром и митохондриями и хлоропластами, что подтверждается наличием в составе отличающегося чрезвычайно большими размерами митохондриального генома растений последовательностей ядерного и хлоропластного происхождения. Наряду с инсерциями ядерной и хлоропластной ДНК в митогеноме разных видов растений обнаруживается последовательности бактериальной, вирусной и неизвестного происхождения ДНК, что наводит на мысль о том, что импорт ДНК в митохондрии может выполнять защитную функцию, нейтрализуя ДНК патогенов различной природы. При этом хлоропласты не обладают способностью импортировать ДНК из цитоплазмы. В состав генетической системы митохондрий многих видов высших растений помимо высокомолекулярной ДНК (мастер-хромосомы) входят видоспецифичные наборы линейных и кольцевых плазмид. Среди них наибольший интерес представляют линейные S-плазмиды кукурузы (2.3 кб, 5.4 кб и 6.4 кб), которые на концах молекулы имеют концевые инвертированные повторы и могут существовать как автономно, так и встраиваться в высокомолекулярную хромосому органелл. С учетом их структурно-функциональных особенностей эти плазмиды относят к мобильным генетическим элементам (МГЭ). Часть линейных и кольцевых плазмид в виде разного размера встроек (включая полноразмерные копии) обнаруживаются на всех ядерных хромосомах *Zea mays*, и, таким образом, должны рассматриваться как часть мобилома этого вида. Несомненно, что наличие плазмид с такими свойствами позволяет использовать их как основу для конструирования генетических векторов для

митохондрий. Так, S3 плазида послужила основой для создания генетической конструкции, несущей ген *gfp* под контролем митохондриального промотора. Использование этой конструкции позволило установить, что импортируемая ДНК способна служить как матрицей для синтеза ДНК, так и транскрибироваться. На настоящем этапе исследований сложно однозначно оценить значимость импорта ДНК для функций митохондрий в клетке. Не исключено, что это явление может быть следствием механизма, оставшегося от бактериального предка митохондрий. Известна способность бактериальных клеток к захвату чужеродного генетического материала, играющая существенную роль в их эволюции. Наряду с этим, возможно участие митохондриальных транспортных каналов в поглощении ДНК, имеющей вирусное происхождение, с целью запуска связанных с этими органеллами защитных механизмов. В прикладном отношении наличие природной компетентности у митохондрий растений к поглощению ДНК и наличие у них плазмид с интегративными свойствами может служить хорошей основой для создания биотехнологической платформы для продукции рекомбинантных белков путем их синтеза в митохондриях *in vivo* (Rozov et al., 2023).

Исследование поддержано бюджетным проектом № FWSS-2022-0005.

1. Tarasenko T. A., Tarasenko V. I., Koulintchenko M. V., Klimenko E. S., Konstantinov Y. M. DNA import into plant mitochondria: complex approach for *in organello* and *in vivo* studies // Biochemistry (Moscow). – 2019. – 84. – 817-828.
2. Tarasenko T.A., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Konstantinov Y.M. Plant mitochondria import DNA via alternative membrane complexes involving various VDAC isoforms // Mitochondrion. – 2021. – Vol. 60. – 43-58.
3. Rozov S.M., Zagorskaya A.A., Konstantinov Y.M., Deineko E.V. Three Parts of the Plant Genome: On the Way to Success in the Production of Recombinant Proteins // Plants. - 2023.- Vol. 12. – 38. <https://doi.org/10.3390/plants12010038>

## Транс-сплайсинг у *Drosophila melanogaster*

Тихонов М.В., Бегинязова О., Солдатова Ю.В., Максименко О.Г., Георгиев П.Г.

Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

Альтернативный сплайсинг является основным механизмом повышения транскриптомного и протеомного разнообразия. Для всех эукариот характерен «цис-сплайсинг», который включает лигирование экзонов в пределах одной пре-мРНК. В отличие от типичного цис-сплайсинга, транс-сплайсинг объединяет экзоны из двух отдельных транскриптов с образованием химерной мРНК. Этот вариант - редкий пример сплайсинга, среди высших эукариот он обнаружен в нефизиологических условиях и при некоторых патологических процессах. Это связано с тем, что сплайсинг интронов происходит ко-транскрипционно, благодаря этому нивелируется возможность формирования вредных химерных продуктов. Тем не менее у некоторых генов насекомых транс-сплайсинг является основным способом формирования альтернативных изоформ мРНК. В локусе *mod(mdg4)* двукрылых и чешуекрылых транс-сплайсинг осуществляется между экзонами, кодирующими белок. У *Drosophila melanogaster* ген *mod(mdg4)* производит как минимум 31 изоформу, которые имеют четыре общих 5'-экзона и различаются своими 3'-концами. Альтернативные акцепторные 3'-пре-мРНК транскрибируются независимо от общей донорной 5'-пре-мРНК. Определение механизма, обеспечивающего возможность транс-сплайсинга, является целью нашего исследования.

Нами показано, что для осуществления транс-сплайсинга необходимы регуляторные последовательности в промоторной области и теле донорного гена, а также несколько РНК-мотивов в последнем интроне донорного транскрипта. С помощью ChIP-анализа установлено, что после синтеза донорного транскрипта РНК-полимераза переходит в состояние паузы. Анализ распределения интермедиатов сплайсинга в компартментах клеток показал, что донорный транскрипт сплайсируется на хроматине и переходит в нуклеоплазму и цитоплазму только в сплайсированном состоянии. Напротив, акцепторные пре-мРНК, синтезируемые в избытке, присутствуют в несплайсированной форме во всех компартментах клетки. Анализ кинетики сплайсинга показал, что период полужизни 5'-сплайс-сайта составил 4.7 минуты, против 8-20 минут различных 3'-сплайс-сайтов. При замене консервативного участка в аутроне одной из доминантных изоформ 3'-пре-мРНК переставала задерживаться в ядре, а транс-сплайсинг нарушался. При переносе донорного гена в другой локус был обнаружен неспецифический транс-сплайсинг с более чем тысячей акцепторными сайтами различных генов. Анализ кинетики сплайсинга показал, что доминирующие случаи — это медленно сплайсирующиеся интроны, длительное время обладающие свободным 3'-сплайс-сайтом. Для идентификации

последовательности транскрипционных событий мы использовали метаболическую маркировку с включением 4-тиоуридина. Было показано, что сплайсинг новосинтезированной донорной пре-мРНК идет в том числе и с более старой акцепторной 3'-пре-мРНК, образовавшейся еще до добавления метки.

Согласно нашей модели, на промотор и на тело донорного гена привлекаются ДНК-связывающие белки, являющиеся платформой для рекрутирования РНК-связывающих белков, необходимых для транс-сплайсинга. Вскоре после донорного сайта транс-сплайсинга РНК-полимераза переходит в состояние паузы. В данном состоянии транскрипционный комплекс ожидает короткое время и сплайсируется с одним из многочисленных акцепторных транскриптов. В свою очередь акцепторные транскрипты синтезируются независимо в значительном избытке. В состав их аутона входят мотивы, которые способствуют удержанию несплайсированных 3'-пре-мРНК в ядре, повышая локально их концентрацию. Специфический сплайсинг донорных и акцепторных транскриптов обеспечивается избытком последних и, по всей видимости, формированием хроматинового домена.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 23-44-00038 и Гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1661



## **Исследование роли доменов белка MSL2 в рекрутировании комплекса дозовой компенсации *Drosophila melanogaster***

**Тихонова Е., Георгиев П.Г., Максименко О.Г.**

Институт биологии гена РАН, г. Москва

Связывание специфического для самцов *Drosophila melanogaster* комплекса дозовой компенсации (КДК) с X-хромосомой обеспечивает дозовую компенсацию за счет увеличения уровня экспрессии генов X-хромосомы (X/Y) в два раза по сравнению с самками (X/X). КДК состоит из пяти белков, MSL1, MSL2, MSL3, MOF и MLE, и включает две некодирующие РНК, гоX1 и гоX2. Целью работы было исследование функциональной роли отдельных участков белка MSL2, который экспрессируется только у самцов и играет ключевую роль в организации комплекса дозовой компенсации. Белок MSL2 взаимодействует с димером белка MSL1, формируя структурное ядро комплекса, которое может специфично связываться с воспроизводимым набором примерно из 200 сайтов на X-хромосоме, названных HAS (High-Affinity Sites). Было показано, что СХС-домен MSL2 может специфично связываться с GA-повторами, которые находятся в составе HAS. Также с HAS связывается полифункциональный белок CLAMP, который играет важную роль в рекрутировании КДК. Нами было показано, что неструктурированный домен белка MSL2 (620-655 а.о.) специфично взаимодействует с N-концевым цинковым пальцем белка CLAMP. Также были получены трансгенные линии мух, в которых экспрессируются мутантные варианты MSL2-FLAG с делециями отдельных участков и точечными аминокислотными заменами. В результате было показано, что двойная мутация в MSL2, нарушающая связывание с CLAMP и инактивирующая СХС-домен оказывает кооперативный эффект в процессе снижения привлечения КДК на X-хромосому самцов. Было установлено, что делеция С-конца (664-773 а.о.) белка MSL2 незначительно влияет на эффективность привлечения КДК. Интересно то, что ранее предполагалась ключевая роль С-конца MSL2 в рекрутировании гоX РНК в состав комплекса. Напротив, нами был найден участок на N-конце белка MSL2 между 157 и 242 а.о., делеция которого значительно снижает эффективность сборки КДК на X-хромосоме у самок даже при эктопической экспрессии гоX2, что косвенно может указывать на роль данного участка белка во взаимодействии с гоX РНК. Делеции других участков MSL2 оказывали влияние на стабильность белка и способность к активации транскрипции. Дальнейшие исследования в данном направлении позволят детально расшифровать структурно-функциональные особенности MSL2 как ключевого участника сборки КДК.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 21-14-00211 и Гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1661

## Оценка уровня гетерозиготности соболя (*Martes zibellina*), лесной куницы (*Martes martes*) и их гибридов

Томаровский А.А.<sup>1,2</sup>, Тотиков А.А.<sup>1,2</sup>, Перельман П.Л.<sup>1</sup>, Беклемишева В.Р.<sup>1</sup>, Сердюкова Н.А.<sup>1</sup>, Бульонкова Т.М.<sup>3</sup>, Сидоров М.<sup>4</sup>, Мамаев Н.<sup>4</sup>, Охлопков И.<sup>4</sup>, Мухачева А.<sup>5</sup>, Коняева К.<sup>6</sup>, Абрамов А.В.<sup>7</sup>, Графодатский А.С.<sup>1</sup>, Кливер С.Ф.<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>3</sup> Институт систем информатики им. А. П. Ершова СО РАН, г. Новосибирск

<sup>4</sup> Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

<sup>5</sup> Сихотэ-Алинский государственный природный биосферный заповедник имени К.Г. Абрамова, п. Терней

<sup>6</sup> Зоопарк “Лесная сказка”, г. Барнаул

<sup>7</sup> Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>8</sup> Независимый исследователь

Соболь и лесная куница являются близкородственными представителями рода *Martes*, в зоне симпатрии которых происходит образование гибридов - кидасов, отличающихся промежуточными фенотипическими признаками [1]. Внутрипопуляционный и межвидовой анализ генетического разнообразия этих симпатрических видов ранее оценивался с использованием отдельных ядерных и митохондриальных маркеров [2,3]. Одним из важных аспектов такого анализа является уровень гетерозиготности, который мы оценили на основании собственных полногеномных данных 7 образцов *M. martes*, 13 образцов *M. zibellina* и 12 образцов их предполагаемых гибридов. По результатам поиска генетических вариантов на основании геномных сборок хромосомного уровня обоих видов [4,5], распределения гомозиготных и гетерозиготных SNP были подсчитаны в скользящих окнах размером 1 млн п.н. с шагом в 100 тыс п.н. Мы разделили образцы на 3 группы в соответствии с модой уровней гетерозиготности: группа соболей (0,5 SNP/1 тыс п.н.), группа лесных куниц (1,5 SNP/1 тыс п.н.) и группа предполагаемых гибридов (3,5 SNP/1 тыс п.н.), демонстрирующих повышенный уровень гетерозиготности. Значимое различие (р-значение < 0,05) средних значений гетерозиготности между образцами соболей и лесных куниц было подтверждено как на основании геномной сборки лесной куницы (тест Манна-Уитни:  $U = 117$ ; Т-тест:  $t = 17.26$ ), так и на основании геномной сборки соболя (тест Манна-Уитни:  $U = 117$ ; Т-тест:  $t = 15.93$ ). Участки с высоким уровнем гетерозиготности выявлены как в референсном образце соболя (на хромосомах 2, 14, 16, 17 и X), так и в референсном образце лесной куницы (на хромосомах 14 и X). При этом в обоих референсных образцах обнаружены участки гомозиготности протяженностью более

80 млн п.н. Из 12 образцов предполагаемых гибридов, лишь один образец отличается наименьшим содержанием протяженных участков гомозиготности и наибольшим средним значением уровня гетерозиготности в 2,9 SNP/1 тыс п.н. Большая часть образцов характеризуется чередованием регионов с высоким и низким уровнем гетерозиготности. Данная особенность подтверждает интрогрессивную гибридизацию, в результате которой определенные участки генома одного вида закрепляются в геноме другого, при этом кроссинговер остается не подавлен. Как следствие, процесс гибридизации соболя и лесной куницы может в разной степени происходить не только в зоне симпатрии этих видов хищных млекопитающих, но и выходить за пределы ее территории. Многочисленные протяженные участки гомозиготности в геноме референсного образца соболя, вероятно, являются следствием программы реинтродукции, проводимой советским правительством в 1940-х годах [6]. Присутствие таких участков свидетельствует о наличии инбридинга и указывает на отсутствие потока генов, что является причиной снижения адаптивного потенциала и, в результате, может привести к сокращению численности популяций этого вида. Полученные результаты послужат основой для будущих популяционных и природоохранных исследований этих близкородственных видов семейства *Mustelidae*.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект №19-14-00034-П.

Список литературы:

1. Юргенсон П. Кидас–гибрид соболя и куницы // Тр Печоро-Илычского Заповед. 1947. № 5. Р. 145–178.
2. Рожнов В. et al. Генетическая структура соболя (*Martes zibellina* L.) Евразии анализ распределения митохондриальных линий // Генетика. Федеральное государственное бюджетное учреждение " Российская академия наук", 2013. Vol. 49, № 2. Р. 251–251.
3. Рожнов В. et al. Генетический анализ популяций соболя (*Martes zibellina*) и лесной куницы (*M. martes*) в районах совместного обитания на Северном Урале // Генетика. Федеральное государственное унитарное предприятие Академический научно ..., 2010. Vol. 46, № 4. Р. 553–557.
4. *Martes\_martes* [Electronic resource] // DNA Zoo. URL: [https://www.dnazoo.org/assemblies/Martes\\_martes](https://www.dnazoo.org/assemblies/Martes_martes) (accessed: 30.05.2023).
5. *Martes\_zibellina* [Electronic resource] // DNA Zoo. URL: [https://www.dnazoo.org/assemblies/Martes\\_zibellina](https://www.dnazoo.org/assemblies/Martes_zibellina) (accessed: 30.05.2023).
6. Насимович А., Тимофеев В. Соболя. Географические особенности питания. 1973.

## Оценка уровня гетерозиготности представителей рода *Mustela*

Тотиков А.А.<sup>1,2</sup>, Томаровский А.А.<sup>1,2</sup>, Перельман П.Л.<sup>1</sup>, Беклемишева В.Р.<sup>1</sup>, Сердюкова Н.А.<sup>1</sup>, Бульонкова Т.М.<sup>3</sup>, Панов В.В.<sup>4</sup>, Мухачева А.С.<sup>5</sup>, Абрамов А.В.<sup>6</sup>, Графодатский А.С.<sup>1</sup>, Кливер С.Ф.<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

<sup>3</sup> Институт систем информатики им. А. П. Ершова СО РАН, г. Новосибирск

<sup>4</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск

<sup>5</sup> Сихотэ-Алинский государственный природный биосферный заповедник им. К. Г. Абрамова, п. Терней

<sup>6</sup> Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>7</sup> Независимый исследователь

Род *Mustela* представлен широко распространенными хищниками, охватывающими большую часть Голарктического региона. Несмотря на широкое распространение и не угрожаемый природоохранный статус большинства этих видов, для некоторых из них фиксируется снижение численности в отдельных популяциях. Важным шагом в определении причин снижения численности является анализ уровня гетерозиготности на полногеномном уровне, отражающий текущее состояние генетического разнообразия.

Для оценки уровня гетерозиготности, мы использовали как собственные, так и общедоступные полногеномные данные 6 видов рода *Mustela* из различных популяций: *M. nivalis* - 4 образца, *M. erminea* / *M. richardsonii* - 8 образцов, *M. eversmannii* - 1 образец, *M. putorius* - 8 образцов, *M. furo* - 15 образцов, и *M. nigripes* - 7 образцов. Гетерозиготные SNP были подсчитаны в скользящих окнах размером 1 млн п.н. с шагом в 100 тыс п.н.

Согласно полученным результатам, наибольший уровень гетерозиготности имеют все образцы *M. nivalis* вне зависимости от их географической локализации (более 2 SNP/тыс п.н.). Образцы из Европы показывают наибольший уровень гетерозиготности (более 2.5 SNP/тыс п.н.) по сравнению с образцами из Сибири и Дальнего востока (от 2 до 2.5 SNP/тыс п.н.). Сразу после *M. nivalis*, высокий уровень гетерозиготности наблюдается в образцах *M. erminea* / *M. richardsonii* (от 0.9 до 2 SNP/тыс п.н.). Ранее высокие значения гетерозиготности этих двух видов из Датской популяции были определены с использованием микросателлитных маркеров, а также установлено, что уровень генетического разнообразия *M. erminea* исторически не менялся и остается высоким [1]. В то же время, другие исследования с использованием мтДНК определили крайне низкий уровень генетической изменчивости *M. erminea*, по сравнению с *M. nivalis* [2]. Следом идет образец *M. eversmannii* (0.6 SNP/тыс п.н.). Меньший уровень гетерозиготности имеют

европейские образцы *M. putorius* (0.25 SNP/тыс п.н.), локальные популяции которого имеют природоохранный статус в ряде европейских стран. Некоторые исследования отмечают относительно высокий уровень генетической изменчивости на протяжении более 50 лет в Польских популяциях этого вида с использованием микросателлитов и мтДНК [3]. Ожидаемо критически низкий уровень гетерозиготности был подтвержден в образцах *M. nigripes* (менее 0.1 SNP/тыс п.н.). Значения немного уступают даже образцам *M. furo* (0.1 SNP/тыс п.н.). Когда-то широко распространенный северо-американский вид *M. nigripes* в настоящий момент находится на грани вымирания [4]. Вид долгое время был признан вымершим, затем была обнаружена небольшая популяция из чуть более 50 особей. Благодаря программам сохранения вида, в настоящий момент, численность *M. nigripes* достигает не менее 650 особей. Ранее низкий уровень генетической изменчивости *M. nigripes* был определен с использованием аллозимов, микросателлитов и мтДНК [5].

В целом, учитывая снижение численности в локальных популяциях, полученные результаты имеют важное значение для понимания генетической структуры популяций. Они могут быть использованы при разработке природоохранных программ, направленных на долгосрочное сохранение видов, находящихся не только под угрозой исчезновения, но и имеющих глобальный не угрожаемый статус.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект №19-14-00034-П.

Список литературы:

1. Pertoldi C., Norup A.-M., Madsen A.B., et al. No evidence of past bottlenecks in two Danish mustelids: results of craniometric and genetic studies in time and space // Biol. J. Linn. Soc. 2006. Vol. 88, № 4. P. 541–553. doi: 10.1111/j.1095-8312.2006.00639.x.
2. Kurose N., Abramov A.V., Masuda R. Comparative Phylogeography between the Ermine *Mustela erminea* and the Least Weasel *M. nivalis* of Palaearctic and Nearctic Regions, Based on Analysis of Mitochondrial DNA Control Region Sequences // Zoolog. Sci. Zoological Society of Japan, 2005. Vol. 22, № 10. P. 1069–1078. doi: 10.2108/zsj.22.1069.
3. Martínez-Cruz B., Zalewska H., Zalewski A. The genetic diversity and structure in the European polecat were not affected by the introduction of the American mink in Poland // PLOS ONE. Public Library of Science, 2022. Vol. 17, № 9. P. e0266161.
4. Biggins D.E., Godbey J.L. Challenges to reestablishment of free-ranging populations of black-footed ferrets // C. R. Biol. 2003. Vol. 326. P. 104–111.
5. Wisely S.M., Statham M.J., Fleischer R.C. Pleistocene Refugia and Holocene Expansion of a Grassland-Dependent Species, the Black-Footed Ferret (*Mustela nigripes*) // J. Mammal. 2008. Vol. 89, № 1. P. 87–96. doi: 10.1644/07-MAMM-A-077.1.

## Взаимодействие линкерного домена теломерсвязывающего белка TRF2 с ламинами

Травина А.О.<sup>1</sup>, Котова А.В.<sup>1,2</sup>, Подгорная О.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Покровский банк стволовых клеток, г. Санкт-Петербург

Теломеры представляют собой ДНК-белковые комплексы, находящиеся на концах хромосом эукариот. Известно, что ламины – белки, формирующие ядерную ламину, выстилающую внутреннюю мембрану ядерной оболочки, оказывают влияние на локализацию теломер в ядре и участвуют в поддержании длины теломер [1].

Взаимодействие TRF2 с ламинами А-типа показано [2]. Теломерсвязывающие белки TRF1 и TRF2 являются паралогами и имеют сходную доменную структуру, но существенно различаются N-концевыми доменами и линкерными доменами, расположенными между димеризационными и ДНК-связывающими доменами. Ранее мы показали, что рекомбинантный белок, соответствующий линкерной области TRF2 (udTRF2-домен), взаимодействует с ламинами А- и В-типа *in vitro* [3].

Для проверки возможности взаимодействия между udTRF2 и ламинами в клетках (*in vivo*) создана плаزمиды, кодирующая udTRF2-домен, слитый с красным флуоресцентным белком TagRFP, для экспрессии в эукариотических клетках. Для того чтобы определить локализацию экзогенного TagRFP-udTRF2 клетки линий MHeLa и HEK293, а также дермальные фибробласты человека трансфицировали конструкцией pTagRFP-udTRF2 или контрольным вектором pTagRFP-C без вставки. В клетках обеих линий и в фибробластах udTRF2, слитый с TagRFP, локализовался в ядре, преимущественно в гетерохроматине, в то время как TagRFP локализовался в цитоплазме. Для проверки взаимодействия с ламинами А-типа лизаты клеток MHeLa, трансфицированных конструкцией pTagRFP-udTRF2 или контрольным вектором pTagRFP-C, инкубировали с антителами к TagRFP, а затем с протеин А-сефарозой. Результаты иммунопреципитации оценивали с помощью иммуноблоттинга с антителами к TagRFP и ламинам А/С. Ламины А/С коиммунопреципитировались с TagRFP-udTRF2, но не с контрольным TagRFP, что указывает на то, что udTRF2 взаимодействует с ламинами А/С. Поскольку известна меньшая растворимость нуклеоплазменных ламинов В-типа по сравнению с ламинами А-типа [4], возможное взаимодействие udTRF2 с ламинном В1 проследили с помощью котрансфекции двумя плазмидами – pTagRFP-udTRF2 и pTagGFP2-lamin В1 (Евроген), с последующей флуоресцентной микроскопией. В клетках линий MHeLa и HEK293 и в фибробластах мы обнаружили колокализацию сигналов TagRFP-udTRF2 и TagGFP2-

ламина В1. При этом в клетках линии НЕК293 и в фибробластах TagRFP-udTRF2 и TagGFP2-ламин В1 локализовались в основном на периферии ядра, в то время как в клетках МНеLa совместная локализация обнаруживалась в околоядрышковом гетерохроматине. Во всех типах клеток очаги совместной локализации TagRFP-udTRF2 и TagGFP2-ламина В1 наблюдались в наиболее ярко окрашенных DAPI районах гетерохроматина.

Список цитируемой литературы:

1. Gonzalez-Suarez I., Redwood A.B., Gonzalo S. Loss of A-type lamins and genomic instability // *Cell Cycle*. 2009. Vol. 8, № 23. P. 3860–3865.
2. Wood A.M. et al. TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends // *Nat Commun*. 2014. Vol. 5. P. 5467.
3. Travina A.O. et al. The Long Linker Region of Telomere-Binding Protein TRF2 Is Responsible for Interactions with Lamins // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 7.
4. Moir R.D. et al. Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells // *J Cell Biol*. 2000. Vol. 151, № 6. P. 1155–1168.

Исследование выполнено за счет гранта Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, соглашение №075-15-2021-1075. Использование генетических технологий для поиска биомаркеров, моделирования и терапии заболеваний человека.

## Разработка системы направленного редактирования 3D генома человека

Тюкачева Е.А.<sup>1,2,3,4,5</sup>, Лужин А.В.<sup>1</sup>, Круглова Н.А.<sup>1</sup>, Ульянов С.В.<sup>1,2</sup>,  
Васецкий Е.С.<sup>3,4</sup>, Разин С.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, г. Москва

<sup>3</sup> Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, г. Москва

<sup>4</sup> CNRS UMR9018, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

<sup>5</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), г. Москва

Одним из ключевых факторов, влияющих на экспрессию генов, является трехмерная (3D) организация хроматина. В пределах хромосомной территории, активный и неактивный хроматин сегрегирован в пределах А/В компартментов. На масштабе 100-1000 т.п.н. хроматиновая фибрилла свернута в топологически ассоциированные домены (ТАДы), как правило интерпретируемые как хроматиновые глобулы. У млекопитающих границы ТАДов в значительной мере определяются сайтами связывания белка CTCF (CTCF Binding Sites, CBSs). Эти последовательности служат местами остановки когезин-опосредованной экструзии хроматиновой петли за счет прямого взаимодействия между N-концевым доменом CTCF и когезином. Петли между CBS играют важную роль в локальной трехмерной организации хроматина и установлении контактов между регуляторными последовательностями генома. В частности, CBSs могут играть роль барьера для энхансер-промоторной коммуникации.

Поскольку некоторые тяжелые пороки развития и онкологические заболевания вызваны нарушениями пространственной организации хроматина, мы разрабатываем технологию редактирования 3D-генома и эпигенома с использованием архитектурных белков хроматина и нуклеазы Cas9, лишенной энзиматической активности (dCas9). Основываясь на анализе литературы, опубликованных данных Hi-C и эпигенетических профилях, мы выбрали локус *HoxD* в качестве модельного региона генома для тестирования нашей стратегии редактирования. У людей и мышей небольшие мутации и перестройки в трехмерной организации этого локуса приводят к возникновению заболеваний, связанных с нарушением развития конечностей. Аномальная экспрессия генов *HoxD*, обусловленная нарушением регуляции энхансеров внутри локуса, также наблюдается при менингиоме.

Для возможности регуляции петлевых контактов и границ ТАДов, мы разработали генетические конструкции, для экспрессии химерных белков, состоящих из



инактивированной нуклеазы dCas9 слитой с доменами белка CTCF, ответственными за взаимодействие с когезином. Для детекции в клетках в состав химерных белков был также включен флуоресцентный белок GFP. Были созданы экспрессионные конструкторы для трех вариантов белков: с N-концевым доменом белка CTCF, с N-концевым доменом и двумя ближайшими к нему доменами вида «цинковый палец» белка CTCF, с N-концевым доменом и семью ближайшими к нему доменами вида «цинковый палец» белка CTCF.

В наших экспериментах данные химерные белки связывались точкой в локусе *HoxD*, которая не является CBS, границей ТАДа и не вовлечена в петлевые взаимодействия. В контрольных экспериментах использовался белок dCas9-GFP. Для анализа и визуализации изменений пространственной организации локуса *HoxD* мы использовали ранее разработанный нами метод фиксации конформации хромосом C-TALE. Мы обнаружили, что привлечение химерных белков приводит к возникновению петель, между точкой привлечения и другими участками в пределах локуса. Важно, что наиболее сильные взаимодействия формировались при использовании химерного белка в составе которого, был только N-концевой домен и два домена вида «цинковый палец».

Для исследования возможности восстановления топологии локуса с мутацией, изменившей профиль контактов и границы ТАДов, мы создали линию клеток K562 с делецией CBS в локусе *HoxD*. Мы привлекли три вышеупомянутых химерных белка в точку локуса, в непосредственной близости от места делеции. Мы обнаружили возрастание частоты контактов между местом привлечения химерных белков и точками локуса, в которых есть CBS и которые контактировали с делетированным CBS в оригинальной линии клеток. Полученные результаты указывают на возможность использования подобных химерных белков для восстановления топологии локусов, поврежденных в результате точечных или протяженных мутаций. Как и в предыдущем эксперименте, наиболее сильные взаимодействия формировались при привлечении химерного белка в составе которого, был только N-концевой домен и два домена вида «цинковый палец». Это подтверждает ранее опубликованные данные о важности именно N-концевого доменом CTCF и двух ближайших к нему доменов вида «цинковый палец» для взаимодействия с когезином и регуляции топологии генома.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ №21-64-00001.

## Генетическое разнообразие серебряного карася (*Carassius gibelio*) Сибири и Дальнего Востока

Уткин Я.А.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Серебряные караси могут легко натурализоваться в местах интродукции и нередко замещают аборигенные формы, поэтому многие исследователи считают, что широкие границы его ареала были достигнуты искусственно. Его высокий инвазивный потенциал обеспечен широкой экологической пластичностью, полиплоидностью и самое главное наличием популяций, размножающихся гиногенетически.

Несмотря на высокую сельскохозяйственную значимость и большое внимание научного сообщества к серебряному карасю, его генетическое разнообразие и границы ареала на территории России остаются не до конца изученными. Изучение молекулярно-генетических характеристик популяций, населяющих территорию Сибири и Дальнего Востока, позволят сформировать основу, необходимую для эффективного мониторинга распространения данного вида.

В рамках данного исследования было проанализировано 142 образца серебряного карася, населяющих такие крупные реки, как: Амур, Лена, Колыма, Яна, Анабар, Оленёк. Секвенирование контрольного района митохондриальной ДНК показало, что на данных территориях встречаются 12 гаплотипов серебряного карася, 7 из которых ранее не были описаны.

Гаплотипы, обнаруженные на территории Восточной Сибири, объединяются в одну кладу, являющуюся базальной по отношению ко всем ранее описаннымкладам серебряного карася, что может указывать на древность их происхождения.

Также был обнаружен феномен гаплотипической гомогенности популяции этого вида на больших территориях Северо-Востока Евразии. В совокупности с характерными для данной территории условиями абиотической среды это может указывать на то, что представители данной популяции обладают рядом функциональных отличий, обусловленных отбором к экстремальным абиотическим условиям.

## Об избирательном сочетании гетерозиготных инверсий в кариотипе *Chironomus plumosus* Linnaeus 1758 (Diptera, Chironomidae)

Филинкова Т.Н.

Уральский государственный педагогический университет, г. Екатеринбург

Материал для исследования собран в водоемах Свердловской области. Кариотипы изучали на давленных препаратах из клеток слюнных желез личинок *Chironomus plumosus* Linnaeus 1758, зафиксированных в спирт-уксусной смеси. Препараты политенных хромосом готовили по стандартной этил-орсеиновой методике (Демин, Ильинская, 1988; Демин, Шобанов, 1990). Для картирования хромосом использовали систему Максимовой (1976, 1979), детализированную Шобановым (1994). При оценке хромосомного полиморфизма использовали целый ряд показателей (спектр дисковой структуры хромосомных плеч, частота личинок без гетерозиготных инверсий (ГИ), частота личинок с ГИ, число ГИ на особь, частота встречаемости последовательностей хромосомных дисков в каждом из плеч, частота генотипических сочетаний последовательностей хромосомных дисков), в том числе частота личинок с двумя и более ГИ в кариотипе. Для обозначения последовательностей дисков хромосом употребляли символы, принятые в кариологии хирономид: буквы (A, B, C, D) обозначают хромосомные плечи, две цифры после буквы характеризуют последовательность хромосомных дисков каждого из гомологов.

В восьми популяциях *Ch. plumosus* из десяти обследованных отмечены личинки, в кариотипе которых присутствовало две и более ГИ. Частота встречаемости подобных особей по разным популяциям варьировала от 0.06 до 0.32. Наиболее распространенным сочетанием ГИ в кариотипе *Ch. plumosus* является B1.2C1.2, обнаруженное в шести популяциях с частотой 0.01–0.17. Кроме того, в трех популяциях отмечено сочетание ГИ A1.2B1.2 с частотой 0.01–0.13, также в трех популяциях – сочетание ГИ C1.2D1.2 с частотой 0.05–0.21, в двух популяциях – сочетание ГИ A1.2C1.2 с частотой 0.03–0.04, также в двух популяциях – сочетание ГИ B1.2D1.2 с частотой 0.014–0.08, в одной популяции – сочетание ГИ A1.2D1.2 у 0.014 особей. В нескольких популяциях *Ch. plumosus* встретились личинки с тремя ГИ в кариотипе. Так, сочетание ГИ A1.2C1.2D1.2 отмечено в 4-х популяциях с частотой 0.01–0.08. В одной из популяций обнаружены личинки с сочетанием в кариотипе ГИ A1.2B1.2C1.2 с частотой 0.01. В одной популяции с частотой 0.08 присутствует сочетание ГИ B1.2C1.2D1.2 и в карьере близ г. Верхотурье у 0.08 особей в кариотипе сразу оказалось четыре ГИ (A1.2, B1.2, C1.2, D1.2).

Анализ показал, что сочетание ГИ в кариотипе и частота встречаемости данных сочетаний могут иметь избирательный характер. В пруду Юконка (окрестности г. Верхотурье) у *Ch.*

*plumosus* частоты встречаемости ГИ В1.2, С1.2 и D1.2 практически одинаковые (0.29, 0.27 и 0.23 соответственно), а частота ГИ А1.2 составляет 0.08. В данной популяции отмечены сочетания ГИ в кариотипе В1.2С1.2 и С1.2D1.2, но отсутствует сочетание В1.2D1.2. Имеются сочетания А1.2В1.2, А1.2С1.2 и отсутствует сочетание А1.2D1.2, но имеется сочетание А1.2С1.2D1.2, которое встречается примерно в три раза чаще (0.03), чем сочетание А1.2В1.2С1.2 (0.01).

В реке Тура (в черте г. Верхотурье) ГИ А1.2 отмечена у 0.25 особей, В1.2 – у 0.33 особей, С1.2 – у 0.25 особей и D1.2 – у 0.50 особей, при этом отмечены сочетания ГИ в одном кариотипе В1.2С1.2, В1.2D1.2, В1.2С1.2D1.2 и А1.2С1.2D1.2 и каждая из них у 0.08 особей. Анализ позволяет заметить, что каждая из трех ГИ (В1.2, С1.2 и D1.2) участвует в образовании трех сочетаний с другими ГИ, а А1.2 встречается только в одном варианте сочетаний, при том, что ГИ А1.2 имеет одинаковую частоту встречаемости с ГИ С1.2.

Относительно популяции *Ch. plumosus* в пруду на территории поселка Бисерть (Ниже-Сергинский район) можно отметить следующее. В данном водоеме ГИ А1.2 отмечена у 0.04 особей, ГИ В1.2 – у 0.06 особей, ГИ С1.2 – у 0.4 особей и ГИ D1.2 – у 0.37. Таким образом, ГИ А1.2 имеет примерно такую же частоту, как и ГИ В1.2. Частоты последовательностей ГИ С1.2 и D1.2 также примерно равны между собой. При этом имеется только сочетание ГИ В1.2С1.2, а сочетания ГИ А1.2С1.2, А1.2D1.2 и В1.2D1.2 отсутствуют. Таким образом, сочетание различных ГИ в одном кариотипе и частота встречаемости особей с двумя и более ГИ в одном кариотипе у *Ch. plumosus* могут отклоняться от теоретически возможного.

## **Технологии захвата конформации хромосом для исследования структуры хроматина животных, сборки геномов и детекции хромосомных перестроек**

**Фишман В.С.** <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский Государственный Университет, НГУ, г. Новосибирск

Технологии захвата конформации хромосом, активно развивающиеся на протяжении чуть более десятка лет, открыли новый, субмикроскопический уровень организации ДНК в ядре клетки. Наша группа в ИЦиГ СО РАН активно использует Hi-C, 4C и другие методы эпигеномики для того чтобы исследовать структуру, эволюцию и функции хроматина человека и животных. Результаты многих из этих исследований заявлены на конференцию Хромосома — 2023. В своём докладе я представлю несколько крупных направлений, в рамках которых развиваются эти работы, обобщу ключевые результаты, которые нам удалось получить и остановлюсь на вопросах, которые остаются открытыми. В частности, я представлю результаты, которые касаются:

- функциональной роли и клеточной специфичности топологически-ассоциированных доменов и других структур хроматина у позвоночных животных;
- межвидовому сравнению контактов хроматина;
- разработке новых методов детекции хромосомных перестроек у человека на основе технологий захвата конформации хромосом;
- нарушений цис-регуляторных взаимодействий в геноме человека, ассоциированных с хромными перестройками и ведущих к развитию наследственных патологий.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 22-14-00247.

## Функциональная роль компонентов *Brahma*-ассоциированных комплексов в патогенезе нейродегенеративных заболеваний на модели *D. melanogaster*

Чмыхало В.К.<sup>1</sup>, Токарев А.Т.<sup>1</sup>, Степанов Н.С.<sup>1,2</sup>, Лебедева Л.А.<sup>1</sup>, Деев Р.В.<sup>1</sup>, Шидловский Ю.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

<sup>2</sup> Кафедра биологии и общей генетики, ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полногеномные скрининговые исследования ряда наследственных синдромов, симптоматически описываемых интеллектуальной недееспособностью носителей, наряду с экспериментами на *in vitro* и *in vivo* моделях, позволили выявить центральные сигнальные пути, вовлеченные в патогенез нейродегенеративных заболеваний, - каскады MTOR, CREB, Ras, GR и AP-1. Единой платформой для модуляции генов-мишеней вышеуказанных систем в нервной ткани, при этом довольно эволюционно-консервативной, оказываются АТФ-зависимые хроматиновые ремоделирующие комплексы семейства SWI/SNF. Ортологи субъединиц SWI/SNF-комплексов обнаружены у млекопитающих (*Brahma*-ассоциированные факторы - BAF) и у насекомых (*brm*-ассоциированные белки - BAP). Применение модельного насекомого *Drosophila melanogaster* в целях изучения нейродегенеративных заболеваний, пороков развития нервной системы и процессов формирования памяти остается актуальным и с применением поиска полногеномных ассоциаций позволяет проводить исследования, недоступные при работе с модельными млекопитающими или на культуре клеток человека, что демонстрируют модельные линии болезни Альцгеймера, Паркинсона, лобно-височной деменции, бокового амиотрофического склероза и т. д.

Ортологи SWI/SNF-комплекса обладают широчайшим спектром влияния на процессы развития и функционирования нервной ткани, в частности, в реализации сложных поведенческих реакций у эволюционно продвинутых групп метамерных животных. Структурно SWI/SNF-комплексы представлены несколькими модулями, среди которых наибольший для нас интерес представляют компоненты, ответственные за таргетирование локусов — *osa*, SAYP (кодируемый *e(y)3*), Polybromo и bicra. Поэтому у *D. melanogaster* выделяют три вида *brm*-ассоциированных комплексов — канонический (BAP, в составе которого *osa*), неканонический (NBAP с компонентом *bicra*) и Polybromo BAP (SAYP и

Polybromo, соответственно). Предположительно, динамический паттерн распределения b7m-ассоциированных комплексов в разных сайтах генома, как достаточно самостоятельный, но недостаточно изученный механизм модуляции экспрессии генов, может играть существенную роль в формировании кратко- и долговременной памяти не только у насекомых, но и позвоночных.

Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования является функциональная характеристика компонентов (P)ВАР — *osa* и *SAYP* — в мозге *D. melanogaster*. Для этого в рамках исследования предполагается использование трансгенных линий *D. melanogaster* для получения нокаутных мутантов с помощью CRISPR-Cas; РНК-интерференции с помощью системы нейронального драйвера *elav-GAL4* и *UAS-siRNA-anti-osa/e(y)3*; ауксин-зависимой TIR1-опосредованной протеолитической деградации *osa* и *SAYP* в мозге насекомых. Наряду с этим коллектив задействован в получении кроличьих антител к различным эпитомам *osa*. На данный момент получены мутанты с функциональными аллелями *osa* и *e(y)3*, несущие антигены FLAG, V5 и MYC наряду с последовательностью ауксин-зависимого дегрона (AID). Функциональная оценка взаимодействий белков проводится с помощью иммунопреципитации и белкового блот-анализа с известными компонентами b7m-ассоциированных комплексов. Подтверждено, что данные аллели *osa* и *SAYP* кодируют белки, встраивающиеся в эндогенные (P)ВАР комплексы. Показано, что в линии, несущей *elav-GAL4*, *UAS-TIR1* и *osa-AID* детектируется снижение уровня экспрессии *osa* спустя сутки после внесения 25 мМ β-индолилуксусной кислоты (гетероауксина) в питательную смесь. Для оценки паттерна распределения (P)ВАР комплексов в головах имаго *D. melanogaster* используется метод преципитации хроматина с последующим количественным ПЦР анализом (ChIP-qPCR). В качестве исследуемых мишеней используются промоторы нейрон-специфических генов (*ninaC*, *7B2*, *inaD*), а также генов немедленного ответа (*sr*, *hr38*). Верификация данных экспериментов ChIP-qPCR производится с помощью ОТ-ПЦР транскриптов приведенных выше генов. Следующий этап требуют привлечения методов преципитации хроматина с дальнейшим секвенированием (ChIP-Seq). Проект ориентирован на получение новой информации о вкладе факторов *osa* и *SAYP* в паттерн активности экспрессии генов и эпигенетического ландшафта в нейронах *D. melanogaster* и выявление новых эволюционно-консервативных мишеней для перспективных разработок в области заболеваний, связанными с ментальной дисфункцией.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ № 20-14-00201.

## **Использование CRISPR/Cas9 технологии при получении мегабазного масштаба делеций в прителомерном районе хромосомы 12 мыши вызывает остановку развития на ранних стадиях**

**Чуйко Э.А.<sup>1,2</sup>, Нурисламов А.Р.<sup>1,2</sup>, Серова И.А.<sup>1,2</sup>, Серов О.Л.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 10 e-mail: serov@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> НИИ медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10

## **Using of CRISPR/Cas9 technology for generation of megabase scale deletions at the telomeric region of mouse chromosome 12 induces stopping development at the early stages**

**Chuyko E.A.<sup>1,2</sup>, Nurislamov A.R.<sup>1,2</sup>, Serova I.A.<sup>1,2</sup>, Serov O.L.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090 Novosibirsk, prospect Lavrentiev, 10, e-mail: serov@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 634050, Tomsk, Ushaika str, 10.

Key words: CRISPR/Cas9 technology, megabase scale deletions, microinjection into mouse zygotes, address genome modifications

Адресное редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 технологии революционизировало генетические исследования и даже открыло перспективу терапевтического применения этой технологии для коррекции мутантных генотипов [1,2]. Однако использование CRISPR/Cas9 не лишено рисков [3,4]. Недавние исследования показали, что использование CRISPR/Cas9 технологии может индуцировать хромотрипсис, процесс, который получил название "CRISPRthripsis" [4]. Суть процесса состоит в том, что результате целевого двуцепочечного разрыва (DSB) ДНК формируются два фрагмента хромосомы – один ассоциированный с центромерой хромосомы, тогда как другой с ней не связан. Если не произошла репарация разрыва в первом митозе, в дочерних клетках формируются два фрагмента, один из которых формирует либо микроядро или хромосомные мосты. Легко представить, что использование двух и более пар направляющих РНК, например, при получении масштабных делеций, потенциально может спровоцировать усиление хромотрипсиса.



Недавно мы столкнулись с подобным явлением в экспериментах с использованием CRISPR/Cas9 технологии при создании мышей с адресной масштабной делеции (размером около 750 т.п.о., включавшей гены *Tmem196* и *Macc1* в при теломерном районе 12-ой хромосомы. В качестве первого шага были синтезированы 7 направляющих РНК (sgRNA) (3 на левый участок, 4 на правый) и тестированы на их способность генерировать инсерции и делеции (инделлы) в зиготах мышей, что было подтверждено последующим секвенированием по Сэнгеру. Анализ инделов с помощью декомпозиции (TIDE) [5], позволил нам оценить их эффективность и отобрать наиболее подходящие в эксперименте (97.5% при  $R^2 = 0.97$  и 79.4% при  $R^2 = 0.82$ , соответственно).

В опытах по микроинъекциям компонентов CRISPR/Cas9 (две - правая и левая sgRNA, белок Cas9 в концентрации 800 фмоль/мкл для каждой из sgRNA (эту концентрацию принимали за **1X** [6]) и однонитевой нуклеотид, использованный качестве матрицы при репарации ДНК) в пронуклеусы **413** зигот, мы наблюдали, что **372** (90%) развились *in vitro* до 2-клеточной стадии, после чего они были трансплантированы матку суперовулированным самкам. В результате было **получено 0 потомков F0**. В связи с этим, было принято решение о снижении концентрации белка Cas9 в два раза (**0.5X**) и были повторно проведены эксперименты по микроинъекциям в **124** зиготы, из которых **102** выжили (82%) и развились *in vitro* до 2-клеточной стадии, а затем были трансплантированы суррогатным матерям, в этом эксперименте также не было получено **потомков F0**.

Потенциальными причинами остановки развития экспериментальных эмбрионов могут быть: 1. Токсический эффект отдельных компонентов использованной CRISPR/Cas9 технологии; 2. Гаплонедостаточность генов *Tmem196* и *Macc1* при адресных их делециях и феномен хромотрипсиса. В Таблице 1 приведены данные о последствиях микроинъекций индивидуальных компонентов в зиготы мыши на их выживаемость при культивировании *in vitro* экспериментальных эмбрионов до стадии E3.5.

Из этих данных следует, что при инъекции индивидуальных компонентов CRISPR/Cas9 технологии не оказывают заметного влияния на развитие *in vitro* эмбрионов до 3.5 суток - до момента формирования зрелых бластоцист, за исключением ssODN. Таким образом, эти данные позволяют сделать вывод об отсутствии токсичных эффектов направляющих РНК и белка Cas9 при их инъекции в зиготы. В резком контрасте с этими данными, хорошо видно из Таблицы 1, что при совместной инъекции левой и правой направляющих РНК в сочетании с белком Cas9, наблюдается резкое снижение выживаемости, даже в случае уменьшения концентрации компонентов в два раза. Важно отметить, что, согласно

визуального наблюдения, все эмбрионы имели тенденцию к значительному снижению клеток внутриклеточной массы и в меньшей степени это касалось трофобласта.

Таблица 1 Анализ последствий микроинъекций в зиготы мыши индивидуальных компонентов CRISPR/Cas9 технологии на выживаемость *in vitro* экспериментальных эмбрионов до стадии E3.5. 1X концентрация – 1600 фмоль/мкл и 0.5X - 800 фмоль/мкл.

Компонент CRISPR/Cas9	Концентрации компонентов CRISPR/Cas9	Число экспериментальных зигот	Число и (%) развившихся эмбрионов до стадии E3.5
sgRNA левая	1X	38	33 (86%)
sgRNA правая	1X	28	22 (78%)
Белок Cas9	1X	20	18 (90%)
ssODN	1X	45	28 (62%)
Смесь 1:1 sgRNA левого и правого плюс белок Cas9	1X	27	2 (7.4%)
Смесь 1:1 sgRNA левого и правого плюс белок Cas9	0.5X	59	16 (27%)

Имеет смысл остановиться о возможности гаплонедостаточности генов *Tmem196* и *Macc1* при индукции адресных делеций в прителомерном районе хромосомы 12 мыши. Ген *Tmem196* кодирует трансмембранный белок 196 и экспрессируется он преимущественно в головном мозге взрослых мышей, а его активация наблюдается на 14 день внутриутробного развития. Ген *Macc1* кодирует метастазирующий белок 1, ассоциированный с раком толстого кишечника. Ген экспрессируется в эпителиальных клетках мочевого пузыря. Учитывая, что оба гена не экспрессируются на ранних стадиях развития, маловероятно что делеции, особенно одной копии, этих генов могут заметно влиять на жизнеспособность ранних эмбрионов мыши.

Это наблюдение привело нас к выводу о возможности хромотрипсиса в нашем эксперименте. В связи с этим планируется в ближайшее время проведение single-cell sequencing и хромосомный микроматричный анализ совместно с коллегами НИИ

медицинской генетики Томского НИМЦ экспериментальных эмбрионов на 2-х, 4-х и 8-ми клеточных стадиях и контрольных эмбрионов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-65-00017; <https://rscf.ru/project/21-65-00017/>.

#### **Список литературы:**

1. Luthra R., Kaur S., Bhandari K. Applications of CRISPR as a potential therapeutic // *Life Sci. Pergamon*, 2021. Vol. 284. P. 119908.
2. Uddin F., Rudin C.M., Sen T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future // *Front. Oncol. Frontiers Media S.A.*, 2020. Vol. 10. P. 541550.
3. Leibowitz M.L. et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing // *Nat. Genet. Nat Genet*, 2021. Vol. 53, № 6. P. 895–905.
4. Amendola M., Brusson M., Miccio A. CRISPRthripsis: The Risk of CRISPR/Cas9-induced Chromothripsis in Gene Therapy // *Stem Cells Transl. Med. Stem Cells Transl Med*, 2022. Vol. 11, № 10. P. 1003–1009.
5. Brinkman E.K. et al. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition // *Nucleic Acids Res. Oxford Academic*, 2014. Vol. 42, № 22. P. e168–e168.
6. Abe T. et al. Pronuclear Microinjection during S-Phase Increases the Efficiency of CRISPR-Cas9-Assisted Knockin of Large DNA Donors in Mouse Zygotes // *Cell Rep. Cell Press*, 2020. Vol. 31, № 7. P. 107653.

## Анализ заражения желтушек рода *Colias* (Lepidoptera, Pieridae) эндосимбиотическими бактериями рода *Wolbachia*

Шаповал Г.Н. <sup>1</sup>, Шаповал Н.А. <sup>2</sup>, Крупицкий А.В. <sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Алтайский государственный университет, г. Барнаул

<sup>2</sup> Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва

<sup>4</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва

Желтушки (*Colias*) – крупный род дневных бабочек, насчитывающий, по современным трактовкам, приблизительно 90 валидных видов, имеющих преимущественно голарктическое распространение. Несмотря на огромный интерес к этой группе со стороны энтомологов, таксономия рода разработана крайне слабо, а филогенетические реконструкции, основанные главным образом на митохондриальных ДНК-баркодах, серьёзно противоречат существующим таксономическим представлениям. Характерные для рода *Colias* филогенетические и таксономические конфликты – несоответствие митохондриальных и ядерных филогений морфологическим данным, наличие в пределах одного морфологического вида нескольких глубоко дивергировавших митохондриальных линий – могут быть следствием заражения внутриклеточными бактериями рода *Wolbachia*, встречающихся в основном у насекомых и способных оказывать разнообразное влияние на организм хозяина и его эволюцию. Эти бактерии способны вызывать: (1) андроцид – гибель самцов на ранних стадиях эмбрионального развития, что приводит к резкому уменьшению их доли (или почти полному исчезновению) в природных популяциях хозяина; (2) феминизацию – превращение «генетических» самцов в функциональных самок с мужским набором хромосом; (3) полную элиминацию самцов и переход от полового размножения к партеногенезу; (4) значительное повышение плодовитости зараженных самок по сравнению с незараженными; (5) цитоплазматическую несовместимость, снижающую долю незараженных самок в популяции, путём исключения их из размножения.

Для желтушек, у которых были выявлены дискретные, генетически далекие митохондриальные линии, нами был проведен ДНК-скрининг на наличие заражения эндосимбиотическими бактериями. Гены вольбахии *16S*, *wsp* и *fts-Z* были использованы в качестве молекулярных маркеров. Всего было проанализировано более 4000 особей 10 видов рода *Colias*. ДНК-скрининг выявил дискретный характер заражения и на генетическом, и на гендерном уровне: у всех изученных видов только самки конкретных митохондриальных линий оказались на 100% инфицированными вольбахией; самцы этих

же линий, а также особи обоих полов других митохондриальных линий практически не заражены. Для всех зараженных особей было проведено секвенирование генов *вольбахии* *16S*, *wsp* и *fts-Z*. Установлено, что бактерии, обнаруженные у желтушек с разными митохондриальными гаплотипами, принадлежат к разным, генетически далеким линиям (штаммам) супергрупп А и В.

Полученные данные свидетельствуют, что *вольбахия* играла ключевую роль в эволюции и диверсификации этой группы чешуекрылых и, по-видимому, является основной причиной несоответствия традиционных таксономических представлений молекулярным филогенетическим реконструкциям, полученным на основе анализа митохондриальной ДНК.

Работа выполнена в рамках государственного задания №122031100272-3, проекта FZMW-2023-0006 “Эндемичные, локальные и инвазивные членистоногие животные (Arthropoda) гор Южной Сибири и Центральной Азии: уникальный генофонд горячей точки биоразнообразия” Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации, при поддержке грантов РНФ № 22-24-01086 и Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-1069.

## Изучение партеногенетических и двуполых популяций листоблошек рода *Cacopsylla* (Hemiptera, Psylloidea) методами хромосомного и молекулярного анализа

Шаповал Н.А.<sup>1</sup>, Шаповал Г.Н.<sup>2</sup>, Кузнецова В.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Алтайский государственный университет, г. Барнаул

*Cacopsylla* – крупный род гемиптероидных насекомых надсемейства Psylloidea, насчитывающий около 170 валидных видов. Нами было показано, что эта уникальная группа псиллид характеризуется наличием как диплоидных видов (размножающихся половым путём), так и видов с триплоидным и даже пентаплоидным наборами хромосом (размножающихся партеногенетически). Также было показано, что в некоторых популяциях триплоидных партеногенетических видов *C. myrtilli* и *C. ledi* встречаются редкие самцы (в некоторых случаях это т.н. спанандрические самцы, то есть они имеют аберрантный мейоз и, поэтому, не функциональны) и диплоидные самки.

Для более чем 1500 особей, собранных в разных частях ареалов *C. myrtilli* и *C. ledi*, мы получили митохондриальные ДНК-баркоды и, на их основе, провели детальный филогеографический анализ обоих таксонов. Было показано, что генетическая структура каждого вида характеризуется наличием двух основных (численно преобладающих и широко распространенных географически) и целого ряда сателлитных гаплотипов. Партеногенетические и бисексуальные особи, даже в условиях симпатрии, были строго ассоциированы с одним из основных гаплотипов или его производных, что свидетельствует о том, что бисексуальные и партеногенетические носители этих гаплотипов представляют собой изолированные филогенетические линии.

На материале пяти видов *Cacopsylla* с разными типами репродукции, мы протестировали гипотезу, согласно которой переход к партеногенетическому размножению и диверсификация на популяции чисто партеногенетические и популяции с редкими самцами могли быть индуцированы присутствием эндосимбиотической бактерии рода *Wolbachia*. Мы провели ДНК-скрининг (в качестве молекулярных маркеров были использованы гены *16S* рРНК и *wsp*) на наличие вольбахии у двух диплоидных видов, *C. lapponica* и *C. fraudatrix* ( $2n=24+XX/X0$ ), двух триплоидных видов, *C. myrtilli* и *C. ledi* ( $2n=3x=36+XXX$ ) и одного пентаплоидного вида, *C. borealis* ( $2n=5x=60+XXXXX$ ).

Проведенный анализ не выявил существенных различий в степени заражения между партеногенетическими и бисексуальными популяциями изученных видов. Мы пришли к

выводу, что дифференциация репродуктивных стратегий в ходе эволюции рода *Cacopsylla* не является следствием заражения вольбахией. Тем не менее, характер и сложный географический паттерн заражения свидетельствуют о том, что эти микроорганизмы играют важную роль в биологии и эволюции листоблошек.

Работа выполнена в рамках государственного задания №122031100272-3 и при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования № 075-15-2021-1069.

## Реорганизация пространственной структуры локуса, содержащего гены кератинов I типа, в ходе эпидермальной дифференцировки

Штомпель А.С.<sup>1,2</sup>, Калабушева Е.П.<sup>3</sup>, Лужин А.В.<sup>2</sup>, Воротеляк Е.А.<sup>3</sup>,  
Ульянов С.В.<sup>1,2</sup>, Разин С.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН, г. Москва

<sup>3</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

Пространственная организация хроматина играет важную роль в процессе транскрипции, обеспечивая, в частности, коммуникацию регуляторных элементов. Топология многих локусов в геноме изменяется в ходе клеточной дифференцировки, что необходимо для правильной реализации программ экспрессии генов, характерных для различных типов клеток.

Для исследования взаимосвязи между 3D конфигурацией хроматина и транскрипцией был выбран локус кератиновых генов человека, расположенный на хромосоме 12 (12q13.13). Используя оригинальный метод фиксации конформации хромосом C-TALE, мы охарактеризовали пространственную структуру локуса кератиновых генов при индукции эпидермальной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Мы обнаружили, что в ходе дифференцировки ИПСК до активации экспрессии гена *KRT5*, характерного для кератиноцитов, в первую очередь устанавливается контакт между потенциальными зонами контроля локуса (Locus Control Region, LCR1 и LCR2), фланкирующими локус кератиновых генов. В дифференцированных ИПСК, где наблюдается активная экспрессия гена *KRT5*, устанавливаются контакты промотора гена с обеими LCR, что также наблюдается для нормальных кератиноцитов из базального слоя кожи и позволяет говорить о потенциальной возможности мультивзаимодействий между регуляторными элементами в локусе кератиновых генов.

Полученные данные согласуются с результатами, полученными методом 3D-FISH в сочетании с конфокальной микроскопией. Мы обнаружили, что в ходе эпидермальной дифференцировки, локус кератиновых генов становится более компактным, что также может указывать на формирование активаторного транскрипционного хаба за счет сближения LCRs и промотора *KRT5*, что приводит к наблюдаемому уплотнению локуса и уменьшению его физического размера. 3D-FISH с точечными зондами к LCR1 и LCR2, а также к промотору *KRT5* показал наличие частичной колокализации в иммортализованных кератиноцитах HaCaT, по сравнению с фибробластами кожи.



С целью изучить влияние транскрипции на укладку хроматина в локусе кератиновых генов, мы охарактеризовали пространственную структуру локуса в иммортализованных кератиноцитах NaCaT методом C-TALE, обработанных ингибиторами транскрипции - флавопиридолом и триптолидом. Обработка флавопиридолом, ингибирующим инициацию транскрипции, приводила к усилению контакта между LCRs, а также контактов в 5'-области локуса. В то же время обработка триптолидом, индуцирующим протеасомную деградацию РНК-полимеразы II, напротив, приводила к значимому ослаблению или исчезновению аналогичных контактов. Изменение в паттерне контактов наблюдалось в интронах или межгенных участках локуса, в которых обнаружены области ацетилирования гистона H3 по лизину-27 и активная транскрипция, что может указывать на наличие локальных энхансеров. Полученные данные соотносятся с недавними сведениями о роли транскрипции как CTCF-независимого барьера для когезин-опосредованной экструзии хроматина.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 21-64-00001.

## Исследование роли комплексов конденсинов в поддержании пространственной структуры генома эмбриональных стволовых клеток мыши

Юнусова А.М.<sup>1</sup>, Шнайдер Т.А.<sup>1</sup>, Нуриддинов М.А.<sup>1</sup>, Баттулин Н.Р.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

Хроматин в ядре клетки распределен не хаотично, а имеет организованную структуру, которая оказывает влияние на функционирование генома. Многочисленные исследования с использованием, как FISH-методик, так и C-методов, основанных на лигировании близкорасположенных молекул, убедительно доказали, что фрагменты ДНК, расположенные на удаленном друг от друга расстоянии имеют функционально значимые пространственные контакты. Ключевыми участниками организации и поддержания архитектуры хроматина являются комплексы когезинов и конденсинов, имеющих сходное строение, но действующих в разных фазах клеточного цикла. Так, в интерфазном ядре когезиновые комплексы по механизму протягивания петли ДНК формируют топологически ассоциированные домены (ТАДы), ограниченные конвергентно ориентированными CTCF-связывающими сайтами. Тогда как действие комплексов конденсинов I и II ограничено стадией митоза и приводит к формированию компактной митотической хромосомы. Согласно нашим и литературным данным, конденсин II, хоть и присутствует в интерфазном ядре, не влияет ни на пространственную организацию хроматина, ни на регуляцию экспрессии генов. А все потому, что находится в несвязанном с хроматином состоянии. Этому препятствует белок Mcph1. Мы заинтересовались, что произойдет с пространственной укладкой хроматина, если в интерфазе заменить комплекс когезина на конденсин II. Иными словами, способен ли конденсин II опосредовать функциональные контакты регуляторных участков ДНК, и присутствуют ли в геноме последовательности, аналогичные CTCF-связывающим сайтам, формирующим границы доменов для конденсина II. Для этого мы создали линии ЭСК мыши с ауксин-зависимой деградацией субъединицы когезинового комплекса Rad21 вкупе с нокаутом гена *Mcph1*. Примечательно, что интерфазные ядра таких клеток имеют компактные профазоподобные хромосомы, что объясняется преждевременной загрузкой конденсина II. Мы проанализировали пространственную организацию хроматина *Mcph1*<sup>-/-</sup> клеток при острой деплеции когезина методом Hi-C. Мы показали, что распределение контактов хроматина при замене комплекса когезина на конденсин II в интерфазе резко отличается от типичного. Конденсин II не формирует хроматиновые домены аналогичные ТАДам. Кроме того меняется паттерн дальних (более 10 Mb) контактов. Наши результаты расширяют корпус знаний о принципах 3D организации генома и функциях архитектурных белков хроматина.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ проект № 22-74-00112.

## Электронно-микроскопический анализ одноклеточного эукариота *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* на разных стадиях жизненного цикла

Юхтанов Д.А.<sup>1,2</sup>, Науменко Л.Г.<sup>1</sup>, Мензоров А.Г.<sup>1,2</sup>, Дорошков А.В.<sup>1</sup>, Сульдина Л.А.<sup>1</sup>, Киселева Е.В.<sup>1</sup>, Морозова К.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Клада протистов Telonemia, Stramenophila, Alveolata, Rhizaria (TSAR) занимает до половины видового разнообразия эукариот, при этом – одна из наименее изученных. Эти организмы имеют разные варианты клеточного деления: от простого бинарного до сложных и не до конца изученных, таких как шизогония. Класс Labyrinthulomycetes (или Labyrinthulea) – это группа гетеротрофных протистов, распространенных в морских и пресноводных системах и играющих важную роль в разложении органических веществ. К ним относится отряд Thraustochytrida, представители которого имеют большое экологическое значение. Жизненный цикл Thraustochytrida изучен слабо. Недавно открытый подвид *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* имеет биотехнологический потенциал – содержит гены, необходимые для биосинтеза важных для человека жирных кислот. Таким образом, *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* является перспективным модельным объектом для изучения прикладных и фундаментальных свойств протистов.

Цель нашей работы – разработка методов получения *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* на стадиях вегетативной клетки и зооспоры и электронно-микроскопический анализ этих стадий.

В результате работы был стандартизован протокол получения стадии зооспорангия и свободных зооспор *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii*. Для стадий вегетативных клеток и зооспор разработаны протоколы фиксации для просвечивающей электронной микроскопии и для сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения. Это позволит получить трехмерное изображение *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* и провести детальный ультраструктурный анализ его внутриклеточной организации на основных стадиях жизненного цикла.

Культивирование клеток выполнено на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепромышленного и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; [http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_cells/collections/ICG\\_SB\\_RAS\\_CELL](http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL)).

Электронно-микроскопический анализ выполнен на микроскопе JEM1400 (Jeol, Япония) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Исследование поддержано бюджетным проектом FWNR-2022-0015.

## Детекция пространственных контактов плазмидной ДНК и хроматина клеток НЕК293Т

Ян А.П.<sup>1,2</sup>, Сальников П.А.<sup>1,2</sup>, Гридина М.М.<sup>1,2</sup>, Белокопытова П.С.<sup>1,2</sup>,  
Фишман В.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Хроматин в интерфазном ядре имеет сложную пространственную организацию и разделен на функциональные домены. Один из механизмов сегрегации хроматина – жидкостная фазовая сепарация белков, которые специфично связывают последовательности ДНК и РНК, и за счет слабых нековалентных взаимодействий между собой формируют глобулы или «фазы». Различают компартменты активного и неактивного хроматина, ядрышко, компартмент репарации, ламино- и ядрышко-ассоциированные домены и т.д (Hildebrand & Dekker, 2020). До сих пор остается открытым вопрос о том, сколько существует таких «фаз», и о том, какие последовательности ДНК задают паттерн связывания с белками, участвующими в компартиментализации.

Для того, чтоб определить генетические детерминанты компартиментализации, мы разработали метод детекции пространственных контактов плазмидной ДНК и хроматина. Мы доставляем целевую последовательность ДНК в составе плазмиды в исследуемые клетки и, используя 4С-эксперимент, выявляем предпочтения в трехмерных контактах последовательности плазмидной ДНК с геномом. Для этого трансфицируем специально спроектированный для 4С эксперимента плазмидный вектор в клетки НЕК293Т, получаем и секвенируем 4С-библиотеки с помощью NGS технологии.

Биоинформатический анализ полученных 4С-библиотек показал, что используемый подход позволяет детектировать контакты между плазмидной ДНК и геномом с эффективностью 86%, что открывает перспективу для тестирования различных ДНК-последовательностей

Таким образом, мы впервые показали возможность применения 4С-метода для изучения транс-контактов плазмидной ДНК с хроматином в ядре клетки.

Hildebrand, E. M., & Dekker, J. (2020). Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(5), 385–396.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.01.002>

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 22-14-00247.

Научное издание

**ХРОМОСОМА – 2023**

Материалы  
Международной конференции

5–10 сентября 2023 г.

Оригинал-макет и обложка *Д. Е. Коряков*

Одобрено к публикации 30.08.2023 г.  
Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 28,25. Усл. печ. л. 26,3.

Заказ № 186.

Издательско-полиграфический центр НГУ  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

