

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ХРОМОСОМА 2018
МАТЕРИАЛЫ**



**INTERNATIONAL CONFERENCE
CHROMOSOME 2018
ABSTRACTS**

**20 - 24 августа 2018, Новосибирск, Россия
August 20 - 24, 2018, Novosibirsk, Russia**

ОРГАНИЗАТОРЫ



Институт молекулярной
и клеточной биологии
СО РАН
mcb.nsc.ru

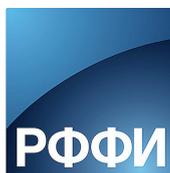


Новосибирский
государственный
университет
nsu.ru

ФИНАНСИРОВАНИЕ И СПОНСОРЫ



fano.gov.ru



rfbr.ru



Проект 5-100
5top100.ru



Компания ДИА-М
dia-m.ru



Компания ХЕЛИКОН
helicon.ru



Компания ХИММЕД
chimmed.ru

* НГУ В ЦИФРАХ И ФАКТАХ

7000
СТУДЕНТОВ

1400

ИНОСТРАННЫХ
СТУДЕНТОВ
из 57 стран мира



6

ФАКУЛЬТЕТОВ

3

ИНСТИТУТА

2500
ПРЕПОДАВАТЕЛЕЙ

880 ДОЦЕНТОВ

570 ПРОФЕССОРОВ
с докторской степенью

73 ЧЛЕНА РАН

БОЛЕЕ **80** СТРАН

охват массовых открытых
онлайн-курсов на Coursera

141

ПАРТНЕРСКИХ
УНИВЕРСИТЕТА
в 27 странах

**СОВМЕСТНЫЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ
ПРОГРАММЫ С КОМПАНИЯМИ**

Baker Hughes, OSCIAI,
Parallels, Intel, Яндекс, 2GIS,
Академпарк, Биотехнопарк,
Сбербанк Технологии

35

НАУЧНЫХ
ИНСТИТУТОВ-
ПАРТНЕРОВ
в Академгородке

139

ВЕДУЩИХ
ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ГРУППЫ
НГУ УЧАСТВУЮТ В

38

МЕЖДУНАРОДНЫХ
КОЛЛАБОРАЦИЯХ
в области физики
элементарных частиц
и наук о жизни

140
ЛАБОРАТОРИЙ

6 ЗЕРКАЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ

N>20

5-100 ОДИН ИЗ ЛИДЕРОВ
ПРОЕКТА 5-100 –
повышения конкурентоспособности ведущих
российских университетов

ТОП-100 ПО ФИЗИЧЕСКИМ
НАУКАМ

QS University Rankings

ТОП-500 АКАДЕМИЧЕСКОГО
РЕЙТИНГА
УНИВЕРСИТЕТОВ
МИРА

3 место среди
российских
университетов

11 МЕСТО

QS UNIVERSITY RANKINGS BRICS

2 МЕСТО

QS UNIVERSITY RANKINGS EMERGING
EUROPE AND CENTRAL ASIA 2015

63 МЕСТО

QS UNIVERSITY
RANKINGS
NATURAL SCIENCES

190 МЕСТО

GOOGLE SCHOLAR
CITATIONS

ТОП-250

QS UNIVERSITY RANKINGS
из 20 тысяч университетов мира

N*

Три поколения секвенирования: секвенирование по Сэнгеру ■ NGS ■ нанопоровое секвенирование



ThermoFisher
SCIENTIFIC

Oxford
NANOPORE
Technologies

Новый капиллярный секвенатор **SeqStudio, Applied Biosystems**

золотой стандарт секвенирования по Сэнгеру; 4 капилляра в удобном картридже со встроенной помпой, полимером и контейнером с анодным буфером; запуск прибора за считанные минуты; самая привлекательная цена среди капиллярников.



Высокопроизводительные секвенаторы **Ion GeneStudio S5/S5 Plus, Ion Torrent**

Простейшая процедура таргетного секвенирования, высокая скорость и экономичность; от небольших панелей генов или бактериальных геномов до экзомов и транскриптомов; инсталляция, обучение.

Нанопоровые секвенаторы MinIon, GridIon, **Oxford Nanopore Technologies**

Прямое, быстрое, он-лайн секвенирование оцДНК, дцДНК, РНК. Длина рида ограничена только длиной фрагмента!!!
Портативный секвенатор **MinION** – одна проточная ячейка, до 512 нанопоровых каналов, простая пробоподготовка 10 мин.
Высокопроизводительный секвенатор **GridION** – 5 проточных ячеек в одном приборе.



000 «Диаэм»

www.dia-m.ru

Москва
ул. Магаданская,
д. 7, к. 3
тел./факс:
(495) 745-0508
sales@dia-m.ru

Новосибирск
пр. Акад.
Лаврентьева, д. 6/1
тел./факс:
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань
ул. Парижской
Коммуны, д. 6
тел./факс:
(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

С.-Петербург
ул. Профессора
Попова, д. 23
тел./факс:
(812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
пер. Семашко, д. 114
тел./факс:
(863) 250-0006
rnd@dia-m.ru

Пермь
Представитель
в УФО
тел./факс:
(342) 202-2239
perm@dia-m.ru

Воронеж
Представитель
тел./факс:
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru

Армения
Представитель
тел.
094-01-01-73
armenia@dia-m.ru



Компания Хеликон обеспечивает полный рабочий процесс необходимым оборудованием и расходными материалами для молекулярной и клеточной биологии и прикладных исследований.

ДЕЛАЕМ ВОЗМОЖНОЙ РАБОТУ ЛАБОРАТОРИЙ В РОССИИ НА МИРОВОМ УРОВНЕ



ООО «Компания Хеликон» поставляет передовые решения ведущих мировых брендов и производит лабораторное оборудование для молекулярной биологии.

Подробнее на сайте www.helicon.ru



ДОСТАВКА



ОБУЧЕНИЕ



**СЕРВИСНОЕ
ОБСЛУЖИВАНИЕ**



**МЕТОДИЧЕСКАЯ
ПОДДЕРЖКА**

Центральный офис:

119991 г. Москва, Ленинские Горы, МГУ, д. 1, стр. 40
Тел. 8 (800) 770-71-21 Факс +7 (495) 930-00-84
mail@helicon.ru

www.helicon.ru

Представительство в Сибирском регионе:

630090 г. Новосибирск, ул. Инженерная, 28
Тел. +7 (383) 207-84-85, novosibirsk@helicon.ru

Представительство в Северо-Западном Регионе:

195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская д. 22 корп. 1
Тел. +7 (812) 244-85-52, spb@helicon.ru

Представительство в Приволжском регионе:

420021 г. Казань, ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел. +7 (843) 202-33-37, volga@helicon.ru

Представительство в Южном регионе:

344116 г. Ростов-на-Дону, ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а
Тел. +7 (863) 294-87-66, rostov@helicon.ru

Биохимические реактивы и расходные материалы

Life Sciences



- для культур клеток
- биохимии
- молекулярной биологии
- молекулярной генетики
- микробиологии
- сыворотки животных
- антитела
- рекомбинантные белки

www.chimmed.ru



HIMEDIA

abcam

Promega



Roche

MERCK

CORNING

nunc

Duchefa
BIOCHEMIES.V.

PEPROTECH
OUR SUPPORT. YOUR DISCOVERY.

CYGNUS
TECHNOLOGIES

CheMatech
macrocyte design technologies

BostonBiochem

life
technologies

biowest

fbioPharm

Avanti
Puram Labs, Inc.

Abnova

AbD Serotec
A bio-Rad Company

Miltenyi Biotec

MyBioSource.com

biotechne

RD SYSTEMS
a biotechne brand

TOCRIS
a biotechne brand

NOVUS
BIOLOGICALS
a biotechne brand

thermo
scientific

applied
biosystems

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Москва, 115230, Каширское шоссе, д. 9, корп. 3. Тел.: +7 (495) 728 4192, e-mail: bio@chimmed.ru
Санкт-Петербург, 195248, просп. Энергетиков, д. 19, оф. 314. Тел.: +7 (812) 605 0061, e-mail: spb@chimmed.ru
Казань, 420081, ул. Седова, д. 22. Тел.: +7 (843) 273 6761, 272 9786, e-mail: kazan@chimmed.ru
Новосибирск, 630090, просп. Академика Лаврентьева, 6/1. Тел.: +7 (383) 335 6108, e-mail: sibir@chimmed.ru

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

INSTITUTE OF MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY
NOVOSIBIRSK STATE UNIVERSITY

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ХРОМОСОМА 2018**

**INTERNATIONAL CONFERENCE
CHROMOSOME 2018**

Материалы

Abstracts

Новосибирск, Россия, 20 – 24 августа 2018

Novosibirsk, Russia, August 20 – 24, 2018

УДК 57
ББК 28
Х942

Executive editor: D. E. Koryakov PhD (Biology)

Х942 Хромосома 2018: Материалы Междунар. конф. Новосибирск, Россия, 20–24 авг. 2018 г. / Ин-т молекулярной и клеточной биологии СО РАН ; Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск, 2018. – 200 с.

Chromosome 2018: International Conference. August 20–24, 2018, Novosibirsk, Russia : Abstracts / Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS ; Novosibirsk State University. – Novosibirsk, 2018. – 200 p.

ISBN 978-5-4437-0806-5

УДК 57
ББК 28

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

ISBN 978-5-4437-0806-5

© Institute of Molecular and Cellular
Biology SB RAS, 2017
© Novosibirsk State University, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Andreyenkova NG... Phylogeography of the black kite (<i>Milvus migrans</i>) based on mitochondrial cytochrome b gene polymorphism	1
Vladimir Babenko... Transposable Elements mediated CTCF binding sites: their nuclear compartments localization in human genome	2
Violetta R. Beklemisheva... Cytogenetic analyses of leopard cat subspecies (<i>Prionailurus bengalensis</i>) revealed Y-chromosome polymorphism	4
Violetta R. Beklemisheva... Pinniped karyotype evolution and Ancestral Carnivore Karyotype refinement revealed by comparative chromosome painting of 10 pinniped species (<i>Pinnipedia</i> , <i>Carnivora</i>)	5
Stepan N. Belyakin... Functional dissection of <i>Drosophila melanogaster</i> SUUR protein influence on H3K27me3 profile	7
Agda M. Bernegossi... Generation of translocated chromosome probes of the <i>Mazama gouazoubira</i> species by microdissection	8
O.O. Bochkareva... Evolution of bacterial chromosomes	10
I.O. Bogolyubova... PECULIARITIES OF THE MOLECULAR COMPOSITION OF HETEROCHROMATIN ASSOCIATED WITH PRONUCLEOLI IN MOUSE EMBRYOS	12
Lidiya V. Boldyreva... Minor variations in the region immediately downstream of eGFP reporter 3'UTR notably increases level of its expression in mouse and human, but not in <i>Drosophila</i> cell cultures	14
Alexander G. Bugrov... Hypothesis of evolution of the B-chromosomes and additional elements of chromosome set in the <i>Acrididae</i> grasshopper	15
N.Sh. Bulatova... Karyotype discoveries in Ethiopian endemic rodents with special regards to illusory Y chromosome appearance in the routine XX pair	16
Anna S. Druzhkova... The phylogeographical history of the brown bear (<i>Ursus arctos</i> Linnaeus) in Northeast Eurasia	18
E.V.Evtushenko... EVOLUTIONARY DYNAMICS OF THE CENTROMERIC HISTONE CENH3 WITHIN THE TRIBE TRITICEAE	20
Fuhrmann Thomas... Genistein-induced stress signaling selectively derepresses major satellite repeat transcription in mouse heterochromatin	22
Baira Godneeva... The role of the SUMO ligase Su(var)2-10 in deposition of repressive chromatin marks and the piRNA pathway	23
Vladimir E. Gokhman Karyotypic features of parasitoid Hymenoptera revealed by base-specific fluorochromes and FISH	24
Alessio Iannucci... Karyotype evolution and conserved sex chromosomes in monitor lizards (<i>Varanidae</i>)	26
O. Iarovaia... The Role of Nucleolus in IGH Locus Rearrangements	27
Yury Ilinsky... Bacterial Species Concept and Rampant Recombination of <i>Wolbachia</i> Genomes	28

Ivanova Yu.N... Structural alterations of chromosomes in wheat hybrids obtained using the 1Rv(1A) line	30
V. Khoroshko... Gene location in intercalary heterochromatin bands of <i>Drosophila melanogaster</i> polytene chromosomes	32
Ilya G. Kichigin... Studying iguanid and gekkonid sex chromosomes by isolated chromosome sequencing	33
Maria Kim... Painting of fourth a chromosome-specific protein regulating the 4 th chromosome in <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Irina S.Kolesnikova... Altered rRNA levels in possible connection to intellectual disability	36
Tatyana D. Kolesnikova... Spatial-temporal organization of replication in polytene chromosomes of <i>Drosophila</i>	38
Kurshakova M.M... TRF4, the novel TBP-related protein of <i>D. melanogaster</i> , in the course of evolution acquired the new functions in the ER-associated processes in the cytoplasm	39
Petr P. Laktionov... Genome-wide analysis of gene regulation mechanisms during <i>Drosophila</i> spermatogenesis	40
O.I. Lavrik Poly(ADP-ribose) polymerase 1 in regulation of DNA repair and longevity	41
Lebedev I.N... EPIGENETIC SILENCING OF X-LINKED CNV BY SKEWED X-INACTIVATION IN WOMEN WITH A HISTORY OF PREGNANCY LOSS	43
Y.A. Lipikhina... SECALOTRITICUM HYBRIDS AS A NEW MODEL FOR STUDYING THE ACTIVITY OF GENES ENCODING CENTROMERE-SPECIFIC PROTEIN CENH3	45
Y.A. Lipikhina... THE CENH3 GENE ENCODING CENTROMERE-SPECIFIC HISTONE H3: ACTIVITY IN TRITICALE	46
Yicheng Luo... Regulation of rRNA transcription by SUMO pathway	47
Maksimov D.A... DOUBLESEX PROTEIN IS ASSOCIATED WITH GENE ACTIVATION IN <i>DROSOPHILA</i> MALES	48
Daniil A. Maksimov... Genome-wide analysis of SU(VAR)3-9 distribution in chromosomes of <i>Drosophila melanogaster</i>	49
Alexey Makunin Summary of mammalian B chromosome sequencing	50
Alex Makunin Using multiple reference genomes to identify phylogenetically informative markers for amplicon sequencing: an example from <i>Anopheles</i> mosquitoes	51
Mazunin I.O. Mitochondrial Genome Surgery	52
Mursalimov S... Cytomixis in male meiosis: monocots vs dicots	53
Maria Ninova Molecular mechanism of piRNA-guided transcriptional repression	54
Svetlana V. Pavlova... CYTOGENETIC ANALYSIS OF SMALL MAMMALS (EULIPOTYPHILA, LAGOMORPHA AND RODENTIA) FROM THE QINGHAI-TIBET PLATEAU, CENTRAL CHINA AND THE FIRST KARYOTYPE DESCRIPTION FOR TWO SPECIES	55

Pavlova GA... Roles of Drosophila NSL complex components in mitosis	57
Pellacani C... Direct roles of the Sf3A2 and Prp31 splicing factors in mitotic chromosome segregation	59
Galina V. Pokholkova... Tethering of insulator proteins results in decompaction of condensed bands in the Drosophila melanogaster polytene chromosomes	60
Prazdnikov D.V... CHROMOSOMAL VARIABILITY AND KARYOTYPIC EVOLUTION IN ISLAND POPULATIONS OF CHANNID AND GOBIOID FISHES (ACTINOPTERYGII, PERCIFORMES)	61
Anastasia A. Proskuryakova... Evolution of X chromosome in the order Cetartiodactyla	63
Putilov A.A... What was useful for us in the Neanderthal genome? An example of DNA regions regulating circadian clocks and sleep	64
Halie M. Rando... Construction of red fox chromosomal fragments from the short-read genome assembly	67
Romanov Stanislav E... IN VIVO DAMID MAPPING UNCOVERED DYNAMIC CP190 CHROMATIN BINDING LANDSCAPE IN COURSE OF DROSOPHILA SPERMATOGENESIS	68
Zhuldyz Sailau... THE DYNAMICS OF INTRANUCLEAR LOCALIZATION OF DAXX PROTEIN IN MOUSE EARLY EMBRYOGENESIS	70
Igor V. Sharakhov... Chromosome organization and dynamics in Anopheles species and their hybrids	72
Maria V. Sharakhova... Genomic divergence and chromosomal differentiation in the malaria mosquito Anopheles messeae sensu lato	73
Darya S. Sidorenko... MOLECULAR AND GENETIC ORGANIZATION OF BANDS AND INTERBANDS IN THE DOT CHROMOSOME OF DROSOPHILA MELANOGASTER	75
S. A. Simanovsky... Synaptonemal Complex Analysis in Spermatocytes of Three Nothobranchius Fish Species with XIX1X2X2/X1X2Y Sex Chromosome System	76
Roscoe Stanyon... The Evolution of Primate Centromeres	77
Vladimir N. Stegny Epigenetic mechanisms of speciation	78
Vladimir Timoshevskiy... Integrative Cytogenetics of the Sea Lamprey Chromosome Elimination	79
Tishakova K.V. Evolution of recombination rate in geckos (Gekkota, Squamata, Reptilia)	80
Vladimir A. Trifonov... Polyploidy and genome evolution of ray-finned fishes	81
Sergey V. Ulianov... SELF-ORGANIZATION OF DROSOPHILA CHROMATIN INTO TOPOLOGICALLY-ASSOCIATING DOMAINS	82
Sara Vlah... Cytogenetic characterization of two Graphiurus species (Rodentia) from South Africa through C banding, FISH with 18-28S rDNA and telomeric (TTAGG) _n probes	84

Walther, M... Su(var) GENES AND THE IDENTIFICATION OF NEW CHROMATIN REGULATORS IN DROSOPHILA	85
Kira S. Zadesenets... Karyotypic instability in macrostomid evolution	86
Dmitry O. Zharkov DNA REPAIR-DEFICIENT CELLS: FROM DISEASE MODELS TO GENOTOXICITY TESTING TOOLS	87
Igor F. Zhimulev... A Portrait of Functional Organization of the Drosophila Genome - Polytene Chromosomes	88
T.Yu. Zykova... Interband architecture in Drosophila polytene chromosomes	89
Андреева Е.Н... Белок CG17337 необходим для прохождения митоза и участвует в контроле клеточной смерти у Drosophila melanogaster	90
Андреев О.В... Получение направленных делеций в регуляторной зоне гена Notch с использованием CRISPR/Cas-опосредованного метода редактирования геномов	92
Андреюшкова Д.А... Выявление паралогичных районов в геноме стерляди (Acipenser ruthenus)	93
Артемов Г. Н... Эволюция X хромосомы малярийных комаров группы Maculipennis	94
Ахметова К.А... Влияние соматического окружения на миграцию предшественников зародышевых клеток в эмбриогенезе Drosophila melanogaster	96
С.И. Белянина Особенности гигантских хромосом Chironomus plumosus L. (Diptera, Chironomidae) из озера Заводское у Климова (район, затронутый чернобыльским следом) Брянской области	97
Бияшева З.М... МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АЛЬФА-ЧАСТИЦ В КРАТКОСРОЧНОМ ТЕСТЕ НА ДРОЗОФИЛЕ	99
Вирясова Г.М... Судьба ремоделирующего хроматин комплекса PBAF в процессе миелоидной дифференцировки и роль специфической субъединицы RHF10	101
Гайнер Т.А. Оптимизация исследования хромосомной патологии у плода при развивающейся и «замершей» беременности	103
Галимова Ю.А... Хроматин-ремоделирующий фактор GAGA регулирует различные типы миграции при формировании половых клеток самок дрозофилы	106
Глухов С.И... Su(Hw) инсулятор блокирует транскрипцию, специфическую сборку хроматина и продукцию коротких РНК при попадании в кластеры рiРНК в герминальных тканях Drosophila	108
А.А. Глухова... ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ PCID2 И NUDC DROSOPHILA MELANOGASTER IN VITRO	110
А.К. Головин... Белок HIP1 взаимодействует с инсулятором Su(Hw), но не участвует в Su(Hw)-зависимой репрессии у плодовой мушки Drosophila melanogaster	112
Грищенко И.В... ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ НА ЭКСПАНСИЮ УВЕЛИЧЕННОГО ПОВТОРА (ЦГГ) _n В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА	114

Дрёмов С.В... РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИСТОРИИ ЧУКЧЕЙ: НАХОДКИ ПО ДАННЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК	116
Жук А.С... Изучение природы «незаконных» гибридов, лишенных хромосомы III и регистрируемых в альфа-тесте для дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
А.А. Ильин... АНАЛИЗ ДИНАМИКИ СВЯЗЫВАНИЯ ХРОМОСОМ С ЯДЕРНОЙ ЛАМИНОЙ В ХОДЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ДРОЗОФИЛЫ	119
А. Калмыкова... Биология теломер в процессе оогенеза и раннего развития <i>Drosophila</i>	121
Киселева Е.В... Атипичное взаимодействие эндоплазматического ретикулума с ядерной оболочкой	123
М.С. Клёнов... Регуляция экспрессии копий рибосомной ДНК, содержащих инсерции ретротранспозонов	125
Конев А.Ю... Исследование функций фактора сборки и ремоделирования хроматина CHD1 у дрозофилы	126
Кордюкова М.Ю... Внутриклеточная локализация и механизм транспорта рибонуклеопротеиновых комплексов теломерного ретротранспозона HeT-A в герминальных тканях и раннем эмбриогенезе <i>Drosophila</i>	128
А.П. Крюков Филогеография и гибридизация врановых птиц Палеарктики	130
Куршакова М.М... TRF4, новый ТВР-подобный белок <i>D. melanogaster</i> , в ходе эволюции приобрел новые функции в процессах, ассоциированных с ЭПР, в цитоплазме	131
Лемская Н.А... Маркерные хромосомы, выявленные у пациентов с интеллектуальной недостаточностью	132
Логина Д.Б... Поведение хромосом в профазе мейоза у пшенично-ржаных гибридов F ₁	133
М.Е. Лопаткина... Дифференциальная экспрессия генов в нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с задержкой интеллектуального развития и реципрокными микроделециями и микродупликациями в субсегменте 3p26.3	135
Мазина М.Ю. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОАКТИВАТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ НА ТРАНСПОРТ мРНК НА МОДЕЛИ ЭКДИЗОН-ИНДУЦИРУЕМОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	138
Мазина М.Ю... Молекулярные механизмы активации транскрипции экдизон-зависимых генов	140
Малькеева Д.А... Воздействие малого белка теплового шока Hsp67Bc на приспособленность <i>Drosophila melanogaster</i> в нормальных и стрессовых условиях	141
Матвеевский С.Н... СОХРАНЕНИЕ ГЕНОВ СПЕРМАТОГЕНЕЗА И ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА У СЛЕПУШОНОК (<i>ELLOBIUS</i> , <i>RODENTIA</i>), УТРАТИВШИХ Y ХРОМОСОМУ	143
Л.С. Мельникова... Белки CP60 и BEAF подвергаются посттрансляционной SUMO-модификации	145
Никитина Т.В... Динамика нестабильности кольцевых хромосом при репрограммировании соматических клеток	147
Огиенко А.А... Влияние генетического фона в линиях дрозофилы на результаты исследований на примере линии #6458 из Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	149

Осадчий И. С... Изучение рекрутирования TRF2 на промоторы генов	151
Осипов Г.В... Выделение древней ДНК, секвенирование, генотипирование и видовая идентификация некоторых представителей древних кошачьих	152
Остромышенский Д.И... Тандемные повторы в геноме китайского хомячка (<i>Cricetulus griseus</i>) и близких видов	153
Пиндюрин А.В... Вклад последовательностей ДНК, располагающихся в районе терминации транскрипции, в уровень экспрессии генов	155
Побединцева М.А... Популяционная генетика осетровых Сибири	156
Ю.В.Попова... Ранее неизвестные функции белка NON3 у <i>Drosophila melanogaster</i>	158
Попова К.О. ИЗУЧЕНИЕ ДРЕВНЕЙ ДНК ИСКОПАЕМЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>ALCES</i>	160
Пурвиньш Я.В... ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ НА ЭКСПАНСИЮ (ЦГГ) _n ПОВТОРОВ НОРМАЛЬНОЙ ДЛИНЫ В МОДЕЛЬНЫХ ЛИНИЯХ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ	161
Пчелинцева П.В... ВЕРИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПАРТНЕРОВ БЕЛКА PITA КАК КОМПОНЕНТОВ АРХИТЕКТУРНОГО КОМПЛЕКСА D. MELANOGASTER	163
Радион Е.И... Роль системы рiРНК в поддержании структуры хроматина теломерного ретротранспозона TART у <i>Drosophila</i>	165
Разуваева А... Роль белков Asp и Patronin в формировании митотического веретена деления у <i>Drosophila</i>	167
Романенко С.А... Внутрихромосомные перестройки в эволюционно консервативных синтенных блоках полевковых	168
Рюмин С.С... О ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ В ВЫБОРЕ ЭЛИМИНИРУЕМОГО ГЕНОМА В ХОДЕ РАННЕГО ГАМЕТОГЕНЕЗА МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК КОМПЛЕКСА PELOPHYLAX ESCULENTUS	169
Савченко Р.Р... Влияние нокаута генов ADAMTS1 и THBS1 на формирование радиационно-индуцированного ответа клеток на повреждение ДНК	171
Сайфитдинова А.Ф... ЗАГАДКА ТРАНСКРИПЦИИ НА ЛАТЕРАЛЬНЫХ ПЕТЛЯХ ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ПТИЦ	173
Саматадзе Т.Е... ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ МУТАНТНЫХ ФОРМ <i>CALENDULA OFFICINALIS L.</i>	175
Скрябин Н.А... Регионы гомозиготности в экстраэмбриональных тканях абортусов из семей с привычным невынашиванием беременности	177
Олеся Соколова... Дерепрессия соматических мобильных элементов у <i>Drosophila</i> приводит к нарушению дифференцировки герминальных клеток яичников из-за снижения числа предшественников эскортных клеток	179
Тамбовцева В.Г... ГИБРИДИЗАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА У РАЗНОХРОМОСОМНЫХ СЛЕПУШОНОК <i>ELLOBIUS TANCREI</i> (MAMMALIA, RODENTIA)	180

Трухина А.В... Хромосома 4 и детерминация пола у домашней курицы	182
А. Н. Уварова... Влияние новой короткой изоформы секурина (РТТG1) на пролиферацию и ее возможная роль в митозе	184
Федорова Т.Н... УЧАСТИЕ БЕЛКА MEPI DROSOPHILA MELANOGASTER В ПРИВЛЕЧЕНИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ХРОМАТИН	185
Филинкова Т.Н. О РОЛИ ЛИЧИНОК РОДА CHIRONOMUS (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) В БИОИНДИКАЦИИ ВОДОЕМОВ	187
Н.А. Фурсова... ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА CG9890, СОДЕРЖАЩЕГО ДОМЕНЫ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ	189
Хамидуллина А.И... Судьба ремоделирующего хроматин комплекса RBAF в процессе миелоидной дифференцировки и роль специфической субъединицы RHF10	190
Хрунин А.В... УЧАСТКИ ПРОТЯЖЕННОЙ ГАПЛОТИПИЧЕСКОЙ ГОМОЗИГОТНОСТИ В ХРОМОСОМАХ ПОПУЛЯЦИЙ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ И УРАЛА	192
Юдкин Д.В... Молекулярная структура 5'нетранслируемой области гена FMR1 и тяжесть симптомов у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы	194
Юшкова А.А... Роль белка NON3 (Novel Nucleolar protein 3) в формировании прицентромерного гетерохроматина у Drosophila melanogaster	195

Phylogeography of the black kite (*Milvus migrans*) based on mitochondrial *cytochrome b* gene polymorphism

Andreyenkova NG¹, Andreyenkov OV¹, Karyakin IV², Popova OO¹, Zhimulev IF^{1,3}

¹ - Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS Novosibirsk, Russia

² - Sibecocenter, LLC Novosibirsk, Russia

³ - Novosibirsk State University Novosibirsk, Russia

The black kite *Milvus migrans* is common on the Eurasian continent, in Africa and Australia. This raptor's successful adaptation to the anthropogenic landscape is intriguing, and the black kite's abundance had recently been increasing. There are several subspecies of the black kite, but information about the phylogeny and structure of the species population remains extremely scarce. Attempts to clarify the phylogenetic relationships between subspecies based on DNA sequences have so far been confined to a very small sample of individuals, majority of which were obtained in Europe.

We collected tissue samples of more than 500 black kite individuals of four subspecies from different locations in Eurasia (including the countries of Europe, Russia, Kazakhstan, Mongolia, Pakistan and India), as well as from Australia. Using the data on the mitochondrial *cytochrome b* gene (*CytB*) polymorphism, we showed that the geographical distribution of haplotypes corresponds to the three kite subspecies's habitats in Eurasia (*M. m. migrans*, *M. m. lineatus*, *M. m. govinda*). Thus it can be argued that *CytB* polymorphism allows to clearly separate these subspecies.

Analysis of the *CytB* haplotypes network showed that the black kite population in Northern Eurasia was divided into eastern and western parts during the Pleistocene glaciations. Warming and forest expansion had resulted in the areas of these populations began to grow intensively and to date have formed a wide intergradations zone in Western Siberia. It also turned out that the South Asian subspecies *M. m. govinda* and the Australian *M. m. affinis* belong to the same branch of the phylogenetic tree, although it is now considered that these populations have no contact with each other. Apparently, this branch of the black kite has settled in the territory of South Asia and Australia in a short period of time at the end of the Pleistocene.

This study was supported by MCB SB RAS budget project # 0310-2018-0010

Transposable Elements mediated CTCF binding sites: their nuclear compartments localization in human genome

Vladimir Babenko^{1,2*}, Roman Babenko²

1 Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090, Lavrentieva 10, Novosibirsk, Russia

2 Novosibirsk State University, 630090, Pirogova 2, Novosibirsk, Russia

* bob@bionet.nsc.ru

It's now long been accepted that transposable elements (TE) exaptation led up to 25% of transcription factor binding sites (TFBS) emergence during human and other vertebrates genomes evolution (Jordan et al., 2003). In particular, CTCF binding sites were shown to be propagated by largely mouse B2 SINE interspersed repeats (Lunyak et al., 2007) and partially by human MIR TE (Wang et al., 2014). We undertook the task of elucidating chromosome specific transposon propagation with particular focusing on CTCF binding site.

We ascertained that essentially all of the TEs in human comprise a fraction of CTCF binding sites, but their active CTCF density does not exceed 0.03 for a vast majority of them, including the most abundant Alu, L1, MIR TEs. Moreover, it is known that the majority of TEs, especially abundant ones, are methylated (Ward et al., 2013), and CG-rich CTCF binding sites drastically lose binding affinity upon methylation (Ward et al., 2013). Thus, there is no such a “major player” as mouse B2 SINE (Lunyak et al., 2007) human analogue of *ctcf* lineage specific propagation in human genome (Ward et al., 2013). Instead, there is a set of Endogenous RetroViral (ERV) TEs responsible for a distinct fraction of active CTCFs propagation.

By crossing transposons and *ctcf* binding sites we identified 24 highly significant chromosome specific TEs yielding the active CTCF binding sites density 0.1-0.7. Also, as we have found out, the most pronounced, high-scored *ctcf* binding site consensi are maintained by TAR1 satellite, HUERS-P3 LTR, HERVIP10F ERV1 and LTR13 retrotransposons.

As a conclusion we state the following.

- While many of CTCF sites motifs reside in MIR TEs, the vast majority of them are inactive due to poor scored CTCF binding motif, heterochromatic environment, and/or methylation rate (active <3%)
- ERVs are the major carriers of robust active CTCF sites in human genome (active up to 70%)
- Chromosome 19 is pervasively enriched with chromosome – specific TE expansions
- The phenomenon of chromosome specific CTCF expansion by TEs is a rare, but intriguing fact.

As the final point, we found that Chromosome 19 features stark abundance of chromosome and nuclear compartment specific transposons such as LTR13 (A1), and L1M3a (B4) (Rao et al., 2014). We thus assume the association of CTCF sites and CGI-rich domains reported previously (Geuschinskaya et al., 2014; Ulianov et al., 2016; Babenko et al., 2017)

References

- Babenko VN, Chadaeva IV, Orlov YL. Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evol Biol.* 2017 Feb 7;17(Suppl 1):19.
- Gushchanskaya ES, Artemov AV, Ulyanov SV, Logacheva MD, Penin AA, Kotova ES, Akopov SB, Nikolaev LG, Iarovaia OV, Sverdlov ED, Gavrilov AA, Razin SV. The clustering of CpG islands may constitute an important determinant of the 3D organization of interphase chromosomes. *Epigenetics.* 2014 Jul;9(7):951-63
- Jordan IK, Rogozin IB, Glazko GV, Koonin EV. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet.* 2003;19:68-72.
- Lunyak VV, Prefontaine GG, Núñez E, Cramer T, Ju BG, Ohgi KA, Hutt K, Roy R, García-Díaz A, Zhu X, Yung Y, Montoliu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Developmentally regulated activation of a SINE B2 repeat as a domain boundary in organogenesis. *Science.* 2007 Jul 13;317(5835):248-51. PubMed PMID: 17626886.
- Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell.* 2014; 159(7):1665-80.
- Ulianov SV, Khrameeva EE, Gavrilov AA, Flyamer IM, Kos P, Mikhaleva EA, Penin AA, Logacheva MD, Imakaev MV, Chertovich A, Gelfand MS, Shevelyov YY, Razin SV. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Res.* 2016 Jan;26(1):70-84.
- Wang J, Vicente-García C, Seruggia D, Moltó E, Fernandez-Miñán A, Neto A, Lee E, Gómez-Skarmeta JL, Montoliu L, Lunyak VV, Jordan IK. MIR retrotransposon sequences provide insulators to the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 11;112(32):E4428-37.
- Ward MC, Wilson MD, Barbosa-Morais NL, Schmidt D, Stark R, Pan Q, Schwalie PC, Menon S, Lukk M, Watt S, Thybert D, Kutter C, Kirschner K, Flicek P, Blencowe BJ, Odom DT. Latent regulatory potential of human-specific repetitive elements. *Mol Cell.* 2013 Jan 24;49(2):262-72.

Cytogenetic analyses of leopard cat subspecies (*Prionailurus bengalensis*) revealed Y-chromosome polymorphism

Violetta R. Beklemisheva^a, Polina L. Perelman^{a,b}, Anastasia A. Proskuryakova^{a,b},
Svetlana A. Romanenko^a, Dmitri Y. Prokopov^a, S. Luo^c, Olga V. Uphyrkina^d

^aDepartment of Comparative Genomics, Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia; ^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia; ^cSchool of Life Sciences, Peking University Beijing, P.R.China, ^dFederal Scientific of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok, Russia

Email: polina.perelman@gmail.com

The species of Bengal cat, *Prionailurus bengalensis* (Felidae, Mammalia), is the complex of subspecies that range from Russian Far East to the southern Sunda Islands. Northern branch (Patel et al., 2017) includes two groups of subspecies selected based on mitochondrial DNA analyses. The most Northern subspecies inhabiting Russian Far East is *P. b. euphilurus*. This subspecies is morphologically and ethologically different from other Northern branch subspecies and hypothesized to be more close to the island subspecies (Tsushima, Taiwan, Irimote). We looked for cytogenetic features of *P. b. euphilurus* subspecies. We sampled 10 animals from four points at Primorsky Krai (Russia) and established primary fibroblast cultures.

The cytogenetic analyses showed the G-banded karyotype to be identical to the *P. bengalensis*, but revealed discerning polymorphism in the morphology of Y-chromosome. The Y morphology ranged from acrocentric to metacentric in 7 males of *P. b. euphilurus* and two *P. bengalensis* males from Northern and Southern subspecies. Interestingly, the morphology of Y also varied between cells of one individual. The Y polymorphism may be explained by differences in the repeat-rich heterochromatic part of Y chromosome.

To find out more about repeat differences we hybridized telomeric and ribosomal probes that showed same distribution. We also sequenced the genome of one *P. b. euphilurus* male, analysed repeat fractions and revealed some repeats that are different from repeats of Chinese *P. bengalensis*. To investigate repeat differences further we microdissected Y-chromosomes from two *P. bengalensis*, from two *P. b. euphilurus* and from *Felis catus* for sequencing.

Felidae karyotypes in general are evolutionary conserved and uniform. Even small karyotype differences might serve as species-level signatures. So far there is no clear cytogenetic evidence for subspecies differences in *P. bengalensis*. There is, however, the phenomenon of apparent polymorphism on Y-chromosome morphology in the species of *P. bengalensis*.

This study was funded by Russian Fund for Basic Research, grant № 17-00-00146

Pinniped karyotype evolution and Ancestral Carnivore Karyotype refinement revealed by comparative chromosome painting of 10 pinniped species (Pinnipedia, Carnivora)

Violetta R. Beklemisheva^a, Polina L. Perelman^{a,b}, Natalia A. Lemskaya^a,
Anastasia I. Kulemzina^a, Anastasia A. Proskuryakova^{a,b}, Vladimir N. Burkanov^{c,d},
Steven J.O'Brien^{e,f}, Alexander S. Graphodatsky^{a,b}

^aDepartment of Comparative Genomics, Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Acad. Lavrentiev Ave. 8/2, Novosibirsk, 630090, Russia; ^bNovosibirsk State University, 1, Pirogova str., Novosibirsk, 630090, Russia; ^cDepartment of Higher Vertebrates Ecology, Kamchatka Branch of Pacific Geographical Institute FEB RAS, 6, Partizanskaja str., Petropavlovsk-Kamchatski, 683000, Russia; and ^dNational Marine Mammal Laboratory, AFSC, NMFS, 7600 Sand Point Way N.E., Building 4 Seattle, Washington, 98115, USA; ^eTheodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, 41A, Sredniy Av., St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia; ^fOceanographic Center, Nova Southeastern University, 3301 College Avenue, Fort Lauderdale, Florida 33314-7796, USA

Email: bekl@mcb.nsc.ru

Karyotype evolution in Carnivora is thoroughly studied by classical and molecular cytogenetics and were supplemented by reconstructions of the Ancestral Carnivora Karyotype (ACK). Pinnipedia occupy unique position among Canoids: they represent the most basal canoid branch and become important lineage for ancestral karyotype reconstruction. However the group of Pinnipedia was not studied in detail.

Here we reconstruct pinniped karyotype evolution and refine ACK using published and our new painting data for 10 pinniped species. The combination of domestic dog (CFA) and human (HSA) whole-chromosome painting probes was used for the construction of the comparative chromosome maps for species from all three extant pinniped families. We analyzed 7 marine carnivores inhabiting sea shores of Russian Federation: the walrus (*Odobenus rosmarus*, Odobenidae), 4 true seals (Phocidae) – the ringed seal (*Phoca hispida*), larga seal (*Phoca largha*), bearded seal (*Erignathus barbatus*), Baikal seal (*Pusa sibirica*), 2 eared seals (Otariidae) – Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*), northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and 2 eared seal species from the southern hemisphere: New Zealand fur seal (*Arctocephalus forsteri*) and New Zealand sea lion (*Phocarctos hookeri*).

HSA and CFA autosome painting probes have delineated 32 and 68 conservative autosome segments in the studied genomes. The heterochromatin is in general scarce in genomes of Pinnipeds. There are additional telomeric heterochromatin segments in karyotypes of the bearded seal and three eared seals. Besides interstitial heterochromatin was revealed in the northern fur seal.

Telomeric repeats are localized in the terminal position only. Clusters of ribosomal genes are situated on one autosome pair homologous to 15th ancestral autosome in all species. We revealed an unusual site of rDNA on Y chromosome of the ringed seal.

Phylogenetic tree of the clade Pinnipedia based on karyotype relationships revealed by comparative chromosome painting agrees with topology based on the molecular data (Nyakatura and Bininda-Emonds, 2012). Our results show that pinniped karyotype evolution was characterized by slow rate of genome rearrangements (less than one rearrangement per 10 mln years), provides strong support for refined structure of ACK with $2n = 38$ and specifies plausible order of dog chromosome syntenic segments on ancestral Carnivora chromosomes. Pinniped karyotype evolution was accompanied by: few tandem fusions, seemingly absent inversions, addition of constitutive heterochromatin, sharing of pronounced karyological conservatism.

Financial supp.: RFBR №17-00-00146, RSF №16-14-10009.

Functional dissection of *Drosophila melanogaster* SUUR protein influence on H3K27me3 profile

Stepan N. Belyakin, Olga V. Posukh, Daniil A. Maksimov, Petr P. Laktionov,
Dmitry E. Koryakov

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

In eukaryotes, heterochromatin replicates late in S phase of the cell cycle and contains specific covalent modifications of histones. SuUR mutation found in *Drosophila* makes heterochromatin replicate earlier than in wild type and reduces the level of repressive histone modifications. SUUR protein was shown to be associated with moving replication forks, apparently through the interaction with PCNA. The biological process underlying the effects of SUUR on replication and composition of heterochromatin remains unknown. Here we performed a functional dissection of SUUR protein effects on H3K27me3 level. Using hidden Markov model-based algorithm we revealed SuUR-sensitive chromosomal regions that demonstrated unusual characteristics: They do not contain Polycomb and require SUUR function to sustain H3K27me3 level. We tested the role of SUUR protein in the mechanisms that could affect H3K27me3 histone levels in these regions. We found that SUUR does not affect the initial H3K27me3 pattern formation in embryogenesis or Polycomb distribution in the chromosomes. We also ruled out the possible effect of SUUR on histone genes expression and its involvement in DSB. Obtained results support the idea that SUUR protein contributes to the heterochromatin maintenance during the chromosome replication. A model that explains major SUUR-associated phenotypes is proposed.

Generation of translocated chromosome probes of the *Mazama gouazoubira* species by microdissection

Agda M. Bernegossi^{1,3}, Duílio M. Z. A. Silva², Iara M. Tomazella³,
Vladimir A. Trifonov⁴, Svetlana A. Romanenko⁴, Natalya A Serdukova⁴,
José M.B. Duarte³

¹ *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil*

² *Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil*

³ *Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brazil*

⁴ *Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Cervidae family stands out among mammals for presenting significant karyotype variation, due to its extreme chromosomal fragility. Currently there are 52 recognized species of cervids submitting karyotype ranging from $2n = 6$ (*Muntjac muntjak*) to $2n = 80$ (*Cervus porcinus*). This remarkable karyotype differentiation is related to chromosomal rearrangements commonly observed in species of the family.

The *Mazama* genus, belonging to the Cervidae family, display huge variation in number and have high chromosomal polymorphism diploid due to chromosomal instability. The presence of unstable chromosomes and their susceptibility to breakage in animals belonging to the genus may be the cause of the consecutive and complex chromosome rearrangements observed in these animals. In addition, it was observed the presence of B chromosomes in this genus. The extensive intraspecific chromosomal polymorphism in *Mazama* suggests that the genus has not fixed their karyotypes yet and stands in full development.

The neotropical species, *Mazama gouazoubira* also known as gray brocket deer, is a medium to small deer that is widely distributed in South America. It is characterized by having retained the hypothetical ancestral karyotype of the Cervidae family ($2n = 70$; FN = 70) and by the frequent presence of B chromosomes. In 1987, Neitzel defined that all the autosomes of the species are acrocentric, with the X chromosome acrocentric and the biggest of the batch, and the Y metacentric and the smaller of the batch. Nevertheless, Duarte (1992) and Duarte and Jorge (1996) when analyzing specimens of gray brocket, found individuals with their chromosome number reduced, which presented $2n = 69$ and B chromosomes as well. The authors concluded that the reduction of 70 to 69 chromosomes is due to the occurrence of a Robertsonian translocation.

Robertsonian translocation is a type of rearrangement often observed in the *M. gouazoubira* species, in which the central fusion occurs between two chromosomes of one arm originating a bi-armed chromosome. A recent study, using G-banding pattern, has identified seven distinct types of Robertsonian translocations (4; 16, 14; 16 X; 16, 7; 21, 8; 21, X; 21, 20; 26) in the Brazilian population of *M. gouzoubira* involving nine different chromosomes. However, the G-banding is a difficult technique to obtain results in deer.

As such, it becomes necessary to deepen on the studies of chromosomal polymorphism presented by *M. gouazoubira*, using highly sensitive techniques for location and confirmation of the rearrangements. Moreover, it is extremely important to advance the understanding on the mechanisms of evolution of the species of Cervidae family from the ancestral karyotype retained by *M. gouazoubira*. Thereby, the present study seeks the use of advanced techniques on the detection and confirmation the Robertsonian translocations that have occurred in the gray brocket deer.

For this purpose, it will be produced a chromosomal probe for each type of studied Robertsonian translocation. In order to confirm if the same type of translocation is shared by different animals it will be applied the fluorescence *in situ* hybridization technic. It is expected that the obtained results by the end of this study contribute as a baseline for subsequent studies, enabling the prepared chromosome probes to be identified in addition to other species of deer. Thereby, it will be possible to elucidate doubts such as to karyotype evolution of the family.

E-mail: agda.bernegossi@hotmail.com

Funding Agency: São Paulo Research Foundation – FAPESP (*Grant n^o 2018/06780-1 & 2017/21333-9*).

Evolution of bacterial chromosomes

O.O. Bochkareva^{1,2*}, P.V. Shelyakin^{1,2,3}, M.S. Gelfand^{1,2,4,5}

¹ *Institute for Information Transmission Problems RAS, Moscow, Russia*

² *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia*

³ *Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia*

⁴ *Higher School of Economics, Moscow, Russia*

⁵ *Lomonosov State University, Moscow, Russia*

* *e-mail: olga.bochkaryova@gmail.com*

Key words: bacterial chromosome evolution, genome rearrangements, phase variation, gene inflow

Background: Bacterial chromosomes are complex fast-evolving systems. Genome rearrangements and horizontal gene transfer lead to the genome plasticity that is necessary for adaptation for changes in life style. Genome rearrangements play the important role in bacterial evolution as they can destroy genes, create new genes and change the copy number of gene transcripts [1].

Based on pairwise comparison of bacterial chromosomes, several selection forces that form the pattern of genome rearrangements were revealed. Over-representation of symmetrical inversions is likely to be caused by selection keeping the replicore size balance and gene location on the leading/lagging strand [2]. Genome reduction by deletions in intra-cellular pathogens is a result of selection on bacterial genome size [3].

Motivation: Accumulation of large amount of whole-sequenced bacterial genomes from closely-related species allowed us to study genome rearrangements in context of evolution.

Results: We reconstructed the evolutionary history of genome rearrangements for bacterial species from diverse ecological niches and with different genome organization. Our results show that rearrangement rates differ dramatically in different bacterial species, that is likely to be related to the adaptation driven by changes in life style. Meanwhile, for newly formed pathogens such as *Yersinia pestis* and *Burkholderia mallei* with a particularly high rate of rearrangements we revealed the correlation between mutations rates and inversions rates.

Analysis of contradictions between the obtained evolutionary trees based on the alignments of common genes and the gene order yielded numerous parallel rearrangements. Numerous gene losses and inversions likely have been caused by a high rate of intragenomic recombination between limited number of repeated elements such as transposases and 16S-23S rRNA clusters.

In *Streptococcus pneumoniae* and *Burkholderia pseudomallei* we revealed parallel inversions that may result in phase (antigenic) variation.

The reconstructed inter-chromosome translocations in bacterial genomes with multi-chromosome genome organization indicate strong selection against transfer of large fractions of genes between the leading and the lagging strands.

According to the model based on analysis of gene tree and gene location we estimated gene inflow in species with high rate of horizontal gene transfer.

Conclusions: This study demonstrates the power of integrated analysis of chromosome rearrangements and genome composition in context of bacterial genome evolution.

Acknowledgements: Supported by the Russian Foundation of Basic Research under grant 16-54-21004.

References

1. Wolf YI, Rogozin IB, Kondrashov AS, Koonin EV (2001). "Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context." *Genome Res.* 2001 Mar;11(3):356-72.
2. Darling AE, Miklós I, Ragan MA (2008). "Dynamics of genome rearrangement in bacterial populations." *PLoS Genet.* 4:e1000128.
3. Moran, NA. 2002. "Minireview Microbial Minimalism: Genome Reduction in Bacterial Pathogens." *Cell* 108: 583–86.

PECULIARITIES OF THE MOLECULAR COMPOSITION OF HETEROCHROMATIN ASSOCIATED WITH PRONUCLEOLI IN MOUSE EMBRYOS

I.O. Bogolyubova,^{1,*} Z.K. Sailau,² D.S. Bogolyubov¹

¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

²Saint Petersburg State University

*e-mail: ibogol@mail.ru

The nucleus of mammalian preimplantation embryos is characterized by peculiar structure determined by formation of nuclear domains de novo, chromatin remodeling and re-activation of transcription. One of the characteristic features of the nucleus of mammalian embryos is the absence of functionally active nucleoli at the initial stages of cleavage. Instead them, there are rounded, completely fibrillar electron-dense structures, inactive with respect to RNA synthesis, which are known as the ‘pronucleoli’ or nucleolus precursor bodies. The pronucleoli are the most prominent structures specific for early embryos in some mammals. The vast majority of pronucleoli are surrounded by a ring-shaped heterochromatin zone, clearly seen after DAPI staining. According to the results of experiments with BrUTP microinjections, these heterochromatin areas are transcriptionally inactive, but not only the tri-methylated histone H3K9me3, an epigenetic mark of repressed chromatin, but also the acetylated histone H4K5ac, a marker of active chromatin, are revealed there in 1—2-cell mouse embryos.

These special heterochromatic compartments of the nucleus of early mammalian embryos we propose to term the peripronucleolar chromatin, since the use of the term “perinucleolar chromatin” in this case is incorrect because these areas cease to be detected during transition of the pronucleoli into functional nucleoli. Thereby, from our point of view, zones of the peripronucleolar chromatin, typical for the initial stages of mammalian embryo cleavage, can be considered as provisional chromatin compartments of the nucleus.

Our immunofluorescent data allow assuming that the molecular composition of peripronucleolar chromatin in mouse embryos is characterized by a certain dynamics during realization of the processes of zygotic genome activation as well as under artificial suppression of transcription activity. It is noteworthy that some factors of mRNA biogenesis, for instance, S/R-rich splicing factor SC35/SRSF2 and basal transcription factor TFIID, are revealed in peripronucleolar chromatin at early (transcriptionally inert) stages. On the contrary, other nuclear proteins begin to appear in this area at later stages of development; e.g., Y14, a core component of the exon-exon junction complex, as well as the chromatin-remodeling protein ATRX. A typical component of peripronucleolar chromatin is actin, and anti-actin immunocytochemical labeling is most pronounced at the 2-cell stage after zygotic genome activation. According to our data,

peripronucleolar chromatin in 1—2-cell mouse embryos has a peculiar molecular composition, which differs from that of heterochromatin areas at the periphery of the nucleus of somatic cells. It is characteristic that the molecular composition of peripronucleolar chromatin associated with different pronucleoli in one nucleus may also differ. This probably reflects a functional heterogeneity of morphologically similar pronucleoli in their competence to the process of nucleogenesis.

On the basis of our own and available data on the molecular composition and dynamics of heterochromatin in the nucleus of preimplantation mouse embryos, we assume that heterochromatin located at the periphery of pronuclei (the peripronucleolar chromatin) at the onset of embryogenesis represents not simply the sites of the repressed chromatin, but forms, together with pronucleoli, a structural scaffold for the formation of definitive 3D architectonics of the blastomere nucleus.

The work is supported by the granting program of the presidium of RAS “Molecular and cell biology”.

Minor variations in the region immediately downstream of *eGFP* reporter 3'UTR notably increases level of its expression in mouse and human, but not in *Drosophila* cell cultures

Lidiya V. Boldyreva^{1*}, Lyubov A. Yarinich^{1,2}, Elena N. Kozhevnikova¹, Mikhail O. Lebedev^{1,2}, Anton V. Ivankin¹, Alexey V. Pindyurin^{1,2}

¹Institute of Molecular and Cellular Biology of the SB RAS, Novosibirsk 630090, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk 630090, Russia

* *e-mail*: asd@mcb.nsc.ru

In eukaryotes, the majority of protein-coding genes generate multiple mRNAs, partially due to variations in termination of transcription. The process of transcription termination appears to be complex and provides one of the levels of gene regulation. We explored the influence of minor variations in the DNA sequence located immediately downstream of 3'UTR of the model reporter gene on the expression level of this gene. We generated “wild type” and mutant double-reporter plasmids encoding mCherry (inner reference) and eGFP (reporter) fluorescent proteins. In the mutant constructs, a one-nucleotide deletion was introduced shortly (32 nt) downstream of the AAUAAA polyadenylation signal (PAS) of the *eGFP* reporter. Using RT-qPCR and FACS analyses, we showed that the mutation leads to up to 4-fold increase in the reporter mRNA and protein levels in transiently transfected human HEK293T, mouse C57BL/3T3, but not in *Drosophila* Kc167 culture cells. The 3'-RACE analysis revealed that the this mutation affects the distribution of the pre-mRNA cleavage sites in human HEK293T cells. Compared to the control, pre-mRNA molecules synthesized from the mutant plasmid are about 2-fold more frequently cleaved at the position 14 nt downstream of the PAS. Interestingly, this position is located within the palindromic sequence UGACUAGUCA. On the contrary, pre-mRNA molecules synthesized from the “wild-type” plasmid are more frequently cleaved at a number of positions located between 14-57 nt downstream of the PAS. Additional double-reporter plasmid constructs, in which different fragments of the region located between positions 17-83 nt downstream of the PAS were mutated, and also demonstrate up to 4-fold increase in the reporter *eGFP* expression in transiently transfected human cells. Taken together, our results clearly indicate the substantial regulatory potential of the region located immediately downstream of gene PAS.

Project is funded by the Russian Scientific Foundation grant #16-14-10288.

We thank S.E. Kulemzin and E.S. Reshetnikova for help in FACS data acquiring.

Hypothesis of evolution of the B-chromosomes and additional elements of chromosome set in the Acrididae grasshopper

Alexander G. Bugrov (1, 2), Ilyas Y. Jetybayev (1, 3), Nikolay B. Rubtsov (2, 3)

(1) Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of Russian Academy of Science

(2) Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Russia

(3) Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Science

Additional elements of grasshopper's genome are represented by B-chromosomes and additional small arms of mainly acrocentric chromosomes. Both types of additional elements shares common characteristics such as C-banding and enrichment with repetitive sequences. Classical hypothesis suggest that these additional elements arose due to accumulation and amplification of different types repetitive element. This mechanism can explain C-positive chromosomes and additional arms, However, there are B-chromosomes with C-negative regions within C-positive material. We used FISH analysis of repetitive DNA in the B- chromosomes, and additional C-positive chromosome arms in populations of 1) *Eyprepocnemis plorans* from Armenia and Turkey; and 2) *Podisma sapporensis* from Hokkaido, Sakhalin and Kunashiri Islands to investigate molecular composition of these elements.

FISH of microdissected DNA-probes derived from the B chromosomes, of *E. plorans* and *P. sapporensis* exhibited that, C-positive regions of B chromosomes enriched by DNA repeats homologous to rDNA and were also present in some A chromosomes. In some populations of *P. sapporensis*, these DNA probes also painted all additional C-heterochromatic arms and the pericentromeric region of the X chromosome, but gave no signal in the euchromatic long arms and the autosomal pericentromeric C-positive regions. Many morphotypes of B chromosomes contained C- negative regions that was painted with euchromatic DNA probe.

We suggest new hypothesis of formation of these B chromosomes from normal autosomes. On the first stage repetitive sequences accumulates on the euchromatic B chromosome. Amplification of these repeats leads to formation of small C-positive blocks that merge due to deletion of euchromatic regions between the into larger blocks. Further process can lead to significant elimination of C-negative material. Similar process take place in the neo-Y chromosomes of Pamphagidae grasshoppers. We believe that this mechanism can be part of dosage compensation in case of aneuploidy in Acrididae.

Supported by the Russian Foundation for Basic Research #18-04-00192

Karyotype discoveries in Ethiopian endemic rodents with special regards to illusory Y chromosome appearance in the routine XX pair

N.Sh. Bulatova and D. Kostin

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russia

Remarkable diversity of endemics comprises a specificity of flora and fauna of Ethiopian Highlands concerning both wild or domesticated taxa, and mammals in particular. Such biogeographic feature of the country was earlier generalized by Nikolai Vavilov who made in 1927 a selfless expedition to find and collect the isolated for centuries botanical varieties of cultivated plants across montane regions of Abyssinia and Eritrea. The time of studies in endemic mammals came at least a half-century ago and even later and lasts till now. The international review on Ethiopian endemic mammals was initiated by D.W. Yalden and M.J. Largen (both U.K.) 65 years after the great Vavilov trip and presented a provisional list containing 30 species that were currently believed to be endemic to the mountain regions, particularly to the one or two plateaux, divided by the East African Rift Valley for the east and west parts. Due to the possibility to share the formation of joint Ethiopian-Russian Biological Expedition (ERBE), Russian investigators of chromosomes and DNA are making their input into recognition of endemic taxa of mammals of the Ethiopian Highlands in correspondence to taxonomic, evolutionary and conservation aspects (Lavrenchenko, Afework Bekele 2017). Reviewing the results of chromosome studies on the Muridae rodents, it can be concluded that new endemic taxa are often established or expected from the karyotype analysis based even on standard karyotypic features (2n, FN, heterochromatic or NOR regions). Thus, at least 9 new items can be added to the initial list of 14 zoologically registered Ethiopian endemics of the species rank plus a number of cases of intraspecies polytypy/polymorphisms were detected. In studying the chromosome variation in two endemic rodents of the genus *Stenocephalemys* which alter altitudinally, a visible effect of simulation of the specific Y chromosome was noticeable in the female routine XX sex pair. The extra typical XX' heteromorphism due to a large portion of heterochromatin is to reflect, in our opinion, the so far unknown cytogenetic phenomenon related probably with thin ecological-genetic mechanisms of reproductive adaptation, reported classically for montane endemics.

Synoptic list of Ethiopian Highlands endemic murids and their karyotypes (*following the taxonomic order by Yalden & Largen 1992 with further corresponding changes from various sources)

*Taxonomic group	Species	Chromosome studies	Distribution	2N
Rhizomyinae	<i>Tachyoryctes macrocephalus</i>		E, W plateaux	50 (E plateau)
		<i>T. cf. splendens</i>	W plateau	48
Dendromurinae	<i>Dendromus lovati</i>		E, W plateaux	44 (E plateau)
		<i>Dendromus</i> sp.nov.	E plateau	50
	<i>Megadendromus nikolausi</i>		E plateau	36
Murinae	<i>Grammomys minnae</i>		W plateau	
	<i>Arvicanthis blicki</i>		W plateau	48 (+E plateau)
	<i>Pelomys harringtoni</i>		E, W plateaux	52 (W plateau)
	<i>P. rex*</i>		W plateau	
	<i>Stenocephalemys albocaudata</i>	karyoforms 1, 2	E plateau	54
	<i>Stenocephalemys griseicauda</i>	karyoforms A, B	E, W plateau	54 (E plateau)
		<i>Stenocephalemys</i> sp. A	W plateau	50
	<i>Praomys albipes</i>		E, W plateaux	46
	<i>P. ruppi</i>		W plateau	
	<i>Muriculus imberbis</i>		E, W plateaux	
	<i>Mus mahomet</i>		E, W plateaux	36
	<i>Lophuromys melanonyx</i>		E, W plateaux	60 (E plateau)
		<i>Lophuromys brevicaudus</i> sp. A	E, W plateaux	54
		<i>Lophuromys simensis</i>	W plateau	
		<i>Otomys yaldeni</i> (sp. A)	E plateau	56
		<i>Otomys helleri</i> (sp. B)	E plateau	58
		<i>Otomys simiensis</i> (sp. D)	W plateau	54
	<i>Otomys typus</i>	W plateau	58	

The phylogeographical history of the brown bear (*Ursus arctos* Linnaeus) in Northeast Eurasia

Anna S. Druzhkova¹, Alexey I. Makunin¹, Ilia G Kichigin¹, Nadezhda V. Vorobieva^{1,2}, Sergey K. Vasiliev³, Mikhail V. Shunkov³, Alexey A. Tishkin⁴, Sergey P. Grushin⁴, Peeter Anijalg⁵, Egle Tammeleht⁵, Marju Keis⁵, Gennady Boeskorov⁶, Nikolai Mamaev⁷, Innokenty Ochlopkov⁷, Aleksey Kryukov⁸, Elena Lyapunova⁹, Marina Kholodova¹⁰, Valentina Salomashkina¹⁰, Ivan Seryodkin¹¹, Urmas Saarma⁵, Vladimir A. Trifonov^{1,2} & Alexander S. Graphodatsky^{1,2}

1 Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

3 Institute of Archaeology and Ethnography SB RAS, Novosibirsk, Russia

4 Altai State University, Barnaul, Altaiskiy Kray, Russia

5 Department of Zoology, Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Vanemuise 46, Tartu 51014, Estonia

6 Geological Museum, Institute of Diamond and Precious Metal Geology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk 677891 Russia

7 Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Division, Russian Academy of Sciences; 677980 Yakutsk

8 Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 690022 Vladivostok, Russia

9 N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, 119334 Moscow, Russia

10 A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky Prospect 33, 119071 Moscow, Russia

11 Pacific Institute of Geography, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

The bear family (Ursidae) is well studied and is widely represented in paleontological chronicles. Numerous bone remnants were used to establish the phylogeographical population evolution of bears. In this study we used the bone remains of four brown bears (*Ursus arctos*) from the paleontological and archaeological excavations of Southern Siberia: the Denisova Cave, the foothills of the Altai (Kolyvan-1), the banks of the Chik and Chumysh rivers (age 4.5-40 thousand years) and 19 modern bears of Siberia: Novosibirsk, Tomsk, Krasnoyarsk, Irkutsk, Yakutia; and the Far East: Khabarovsk.

After isolating the DNA from the ancient samples, we prepared libraries for sequencing. Libraries were enriched using hybridization with contemporary *U. arctos* biotinylated mtDNA immobilized on DynabeadsVR Streptavidin magnetic beads (Life Technologies, USA). Paired-end sequencing was performed on Illumina MiSeq.

Reference-based recovery of ancient bear mitochondrial genomes was performed using Paleomix BAM pipeline. Reads were trimmed and aligned to reference bear mitochondrial genome (GenBank NC001640), PCR duplicates were removed, base qualities were recalibrated with MapDamage, and indel regions were realigned with GATK. Contaminant reads were removed by alignment to human mitochondrial genome and mapping quality comparison using custom Python script. Consensus sequence was reconstructed in Geneious based on 75% majority consensus and manual refinement.

Population genetic analysis for 181 sequences of modern brown bears was performed using Arlequin 3.5. For phylogenetic analysis, we used mitochondrial sequences from our research and 260 previously published mitogenomes of brown and polar bears. It is established that ancient brown bears had great genetic diversity and belong to haplotypes from different migration waves. Modern bears are represented by two haplogroups, one of which is widespread throughout Eurasia, the second one is found only on the islands of Japan.

The study is supported grant RSF 16-14-10009

EVOLUTIONARY DYNAMICS OF THE CENTROMERIC HISTONE CENH3 WITHIN THE TRIBE TRITICEAE

E.V.Evtushenko^{1*}, *E.A.Elisafenko*², *S.S.Gatzkaya*¹, *Y.A.Lipikhina*¹, *V.Shubert*³, *A.Houben*³,
*A.V.Vershinin*¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

In most species, centromere identity is defined by the presence of the centromere-specific variant of histone H3 known in plants as CENH3. Unlike canonical histone H3 with its conserved structure, CENH3 shows considerable variability across species. Most of the diploid plant species (*Arabidopsis thaliana*, maize and rice), in which the structure and copy number of CENH3 have been determined, have this gene as a single copy. However, some species in the tribe Triticeae have CENH3 in two variants. Rye (*Secale* L.) is a Triticeae genus adapted to a wider range of environmental and climatic conditions than wheat and barley. Cultivated, weedy and wild *Secale* species have different pollination systems (self-incompatible, allogamous vs self-compatible, autogamous) and life-cycle durations (perennials vs annuals). Because the CENH3 proteins and genes encoding them in *Secale* species have yet to be known, we explore the molecular structure and the evolutionary dynamics of this central component of centromere specification and function.

We have determined the molecular structure and phylogenetic relationships of the CENH3 proteins in 11 rye species and subspecies, which have diverse crossing systems and are adapted to diverse biotic and abiotic stresses. The genome of the cultured rye *Secale cereale* has been found to have two paralogous CENH3 genes, which have different intron-exon structures and transcribe into two main forms of the protein, α CENH3 and β CENH3. These forms differ by size, have different amino acid compositions and co-localize in intermingled domains in interphase and mitotic centromeres. Using a set of wheat-rye addition lines, we assigned the α CENH3 and β CENH3 forms to rye *S. cereale* chromosomes 1R and 6R. The sequence alignment of CENH3s from *Secale* species and subspecies displays a high level of similarity, despite the differences that they have in morphology, life-cycle duration and pollination systems as well as environmental and growing conditions. The CENH3 proteins are strictly controlled by genetic factors responsible for purifying selection. Diversifying selection operates at a very few sites in cross-pollinating rye species. A comparison between *Hordeum*, *Secale* and *Triticum* species demonstrates that the structure of CENH3 in the subtribes Hordeinae and Triticinae has evolved at different rates. A high similarity between rye and wheat CENH3s is indicative of the evolutionary stability and conservation of the

genetic factors that control the CENH3 structure in the subtribe Triticinae. The role of reticulate evolution as a factor stabilizing the CENH3 structure and the rate of its evolution are discussed. This research was financially supported by the Russian Fundamental Scientific Research Program (project 0310-2018-0010), the Russian Foundation for Basic Research (grant 17-04-00748a) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, HO 1779/15-1).

Genistein-induced stress signaling selectively derepresses major satellite repeat transcription in mouse heterochromatin

Fuhrmann Thomas^{1,2}, Walther Matthias³, Onishi-Seebacher Megumi¹, Reuter Gunter³ and Jenuwein Thomas¹

¹ Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics (MPI-IE), Freiburg, Germany

² International Max Planck Research School for Molecular and Cellular Biology (IMPRSMCB) and University of Freiburg, Faculty of Biology

³ University of Halle-Wittenberg, Halle an der Saale, Germany

In mouse cells, pericentric heterochromatin is characterized by AT-rich, 234bp DNA repeats, called the major satellite repeats (MSR). MSR are marked by repressive chromatin modifications such as H3K9me3, H4K20me3, and DNA-methylation. MSR transcripts have been shown to be elevated during cellular stress responses such as heat shock or UV radiation. We investigated MSR expression in response to a variety of stress conditions and after modulation of several stress signaling pathways by using small molecule compounds. We identified the phytohormone genistein to selectively derepress MSR transcription but not that of other repeat elements. 24-hour treatment of mouse embryonic fibroblasts with genistein results in a more than 100-fold induction of MSR transcripts. Among the many described functions of genistein, it also has been shown to inhibit topoisomerase II. By using the topoisomerase inhibitors etoposide and topotecan, we can phenocopy the genistein-mediated desilencing of MSR transcription. Derepression of MSR transcription occurs without significant changes in histone modifications. However, treatment with JQ1, a potent BET-family inhibitor, results in considerable attenuation of genistein-mediated MSR upregulation. These observations indicate transcriptional stimulation of MSR repeats by genistein that appears independent of histone modifications. Together, these data suggest that inducing DNA damage and replicative stress in mouse embryonic fibroblasts leads to a strong derepression of MSR non-coding RNA and reveal mouse heterochromatin to be particularly sensitive to stress signaling pathways.

The role of the SUMO ligase Su(var)2-10 in deposition of repressive chromatin marks and the piRNA pathway

Baira Godneeva¹, Maria Ninova², Katalin Fejes Toth², Alexei Aravin^{1,2}

¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

²Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA

e-mail: godneeva@caltech.edu

In eukaryotes, gene expression is regulated primarily at the level of transcription. Small RNAs acting as transcription factors in complex with Argonaute family proteins are the principal components of gene expression through their ability to suppress target genes. In *Drosophila* Piwi proteins are clade of Argonaute proteins which repress the activity of transposable elements in the genomes. This transcriptional repression is associated with the deposition of repressive chromatin mark H3K9me3 by methyltransferase Eggless/SetDB1, however the mechanism of this process remains unclear. In the current study we found that the SUMO ligase Su(var)2-10 plays an important role in mechanisms of Piwi-induced transcriptional silencing and is required for deposition of the H3K9me3 mark on transposons. Depletion of Su(var)2-10 caused global loss of repressive histone marks and is associated with an increase in active transcription marks over the transposon sequences. In addition we revealed that Su(var)2-10 genetically and physically interacts with Piwi/Panx/Asx which are factors of the Piwi-induced transcriptional silencing complex. Furthermore, Su(var)2-10 is a member of the PIAS protein family and it is known that yeast and mammalian PIAS proteins act as SUMO E3 ligase. Here, we demonstrated that Su(var)2-10 interacts with SUMO and E2 SUMO ligase Ubc9 *in vitro* and *in vivo*. We found that this interaction is crucial for the repressive function of Su(var)2-10 and for transcriptional repression of transposable elements. Thus, SUMO pathway is required for piRNA-mediated transcriptional silencing.

This work was supported by the grants from the Ministry of Education and Science of Russian Federation (14.W03.31.0007) and from the National Institutes of Health (R01 GM097363).

Karyotypic features of parasitoid Hymenoptera revealed by base-specific fluorochromes and FISH

Vladimir E. Gokhman

Botanical Garden, Moscow State University, Moscow 119234, Russia

vegokhman@hotmail.com

Karyotypes of about 500 species of parasitoid Hymenoptera, a very diverse, taxonomically complicated and economically important group of insects, are studied up to now. Among parasitic wasps, known haploid chromosome numbers can vary from $n = 3$ to $n = 23$. In these insects, AT-binding fluorochromes, e.g. DAPI and Hoechst 33258, usually provide homogeneous chromosome staining, except for obvious gaps in the nucleolus organizer regions (NORs) which constitute clusters of ribosomal DNA (rDNA). Accordingly, GC-binding fluorochromes, such as chromomycin A₃, almost exclusively stain NORs in parasitoid Hymenoptera. Haploid chromosome sets of this group often carry one or two rDNA sites, although three and even six clusters of that kind can be found within karyotypes of certain members of the superfamily Ichneumonoidea (i.e., Ichneumonidae and Braconidae). Since this parameter generally corresponds to the chromosome number, and the latter value often decreases in advanced parasitoids, so does the number of rDNA sites. However, certain exceptions to this rule, e.g. varying numbers of rDNA clusters in different members of certain genera sometimes having the same chromosome number, also occur.

Specifically, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) demonstrates that in chalcid wasps of the genus *Eurytoma* (Eurytomidae), *Eu. compressa* (Fabricius) with $n = 5$ has two rDNA sites, whereas both *Eu. serratulae* (Fabricius) with $n = 6$ and *Eu. robusta* Mayr with $n = 7$ have single rDNA clusters which are situated on two apparently different chromosomes. Analogously, $n = 5$ in all members of *Trichogramma* (Chalcidoidea, Trichogrammatidae), although *T. pretiosum* Riley and *T. kaykai* Pinto et Stouthamer have one and two rDNA sites respectively. Moreover, we have found that CG-rich chromosome segments are characteristic of telomeric regions of all chromosomes of another chalcid wasp, *Trichospilus diatraeae* Cherian et Margabandhu (Eulophidae) with $n = 7$. Nevertheless, rDNA clusters in this species were not studied using FISH, and therefore their precise number and localization are currently unknown.

In addition, our views on the phylogenetic distribution of the canonical TTAGG insect telomeric repeat in the order Hymenoptera have dramatically changed during the last years. Specifically, the (TTAGG)_n telomeric motif was initially considered characteristic of the Hymenoptera in general, but it was actually found only within the families Formicidae and Apidae (Aculeata). Moreover, we failed to detect the TTAGG repeat on telomeres of all studied parasitoids of the superfamilies Ichneumonoidea, Cynipoidea and Chalcidoidea using FISH. Furthermore, all

other main groups of aculeate Hymenoptera were later shown to lack this motif. On the other hand, we have recently found the TTAGG telomeric repeat in lower hymenopterans of the clade Eusymphyta which is the sister group to all other remaining Hymenoptera. Specifically, this motif was detected using FISH in the two members of the family Tenthredinidae (Symphyta, Tenthredinoidea), *Tenthredo omissa* (Förster) and *Taxonus agrorum* (Fallén) both having $n = 10$. Taken together with all previously accumulated information, these data prove the ancestral nature of the TTAGG telomeric repeat in the order Hymenoptera as well as a subsequent loss of this motif in some basal members of the clade Unicalcarida (i.e., all Hymenoptera except Eusymphyta) and its independent reappearance in the Apidae and Formicidae.

Karyotype evolution and conserved sex chromosomes in monitor lizards (Varanidae)

Alessio Iannucci^{a*}, Marie Altmanová^{b,c*}, Claudio Ciofi^a, Malcolm Ferguson-Smith^d, Massimo Milan^e, Jorge Claudio Pereira^d, James Pether^f, Ivan Reháček^g, Michail Rovatsos^b, Roscoe Stanyon^a, Petr Velenský^g, Petr Ráb^c, Lukáš Kratochvíl^b, Martina Johnson Pokorná^{b,c}

^a Department of Biology, University of Florence, Via Madonna del Piano 6, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

^b Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 128 00, Prague, Czech Republic

^c Institute of Animal Physiology and Genetics, The Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, 277 21, Liběchov, Czech Republic

^d Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Madingley Road, Cambridge CB3 0ES, United Kingdom

^e Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy

^f Reptilandia Park, Galdar 35460, Gran Canaria, Spain

^g Prague Zoological Garden, U Trojského zámku 120/3, 171 00, Prague, Czech Republic

* These authors contributed equally to this work

Despite their long history with the basal split dating back to the Eocene, all species of monitor lizards studied so far share the same, among squamates derived, chromosome number $2n = 40$. However, there are differences in the morphology of the macrochromosome pairs 5-8. Further, sex determination, which revealed ZZ/ZW sex microchromosomes, was studied only in a few varanid species and only with techniques not allowing a test of their homology. We investigated karyotype evolution and sex chromosome homology across varanids by hybridizing flow sorted chromosome paints from *Varanus komodoensis* to metaphases of nine species of monitor lizards. The results show that differences in the morphology of the chromosome pairs 5-8 can be attributed to intrachromosomal rearrangements, which led to transitions between acrocentric and metacentric chromosomes in both directions. We also documented the first case of spontaneous triploidy among varanids in *Varanus albigularis*. The triploid individual was fully grown, which demonstrates that polyploidisation is compatible with life in this lineage. We found that the W chromosome differs between species in size, heterochromatin and repeat motifs. In contrast, the varanid Z chromosome is clearly conserved in all the analysed species. Next to iguanas, caenophidian snakes and lacertid lizards, varanids are thus other squamate group with proven highly conserved sex chromosomes for a long evolutionary time.

The Role of Nucleolus in IGH Locus Rearrangements

O. Iarovaia¹, D. Germini², A. Gavrillov¹, S. Razin¹, Y. Vassetzky²

¹Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334, Russia

²UMR8126, Université ParisSud, CNRS, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

Immunoglobulin heavy chain (IGH) locus is selectively rearranged during B lymphocytes development. We analyzed the nuclear localization of IGH locus in relation to nucleolus, heterochromatin, transcription factories and gammaH2AX foci. We found out that both productive and nonproductive IGH alleles relocate to the perinucleolar space at the SHM/CSR stages where they colocalize with the gammaH2AX foci and AID. We propose that SHM and CSR of the IGH locus occur in the perinucleolar “recombination compartment” occupied by AID.

The immunoglobulin heavy chain locus intrachromosomal DNA breakages and rearrangements during normal B lymphocytes differentiation create a risk for illegitimate interchromosomal translocations leading to a variety of B lymphocyte malignancies. In most Burkitt and mantle cell lymphomas, specific chromosomal translocations juxtapose the IGH locus with a CMYC or Cyclin D1 (CCND1) gene, respectively. The CCND1 gene was found very close to the IGH locus in naïve B lymphocytes and further away after maturation. In contrast, the CMYC alleles localized closer to an IGH locus at the stage of SHM/CSR, but not in naïve B lymphocytes. In both cases the colocalization between oncogene and the IGH locus at successive stages of B lymphocytes differentiation occurred in the immediate vicinity of the nucleolus, consistent with the known localization of the RAGs and AID whose function have been demonstrated in IGH physiological rearrangements. The colocalization of CCND1 and CMYC with IGH in perinucleolar space at the time the concerned B lymphocytes undergo V(D)J recombination or SHM/CSR, respectively, may favor rearrangement events leading to mantle cell lymphoma and Burkitt lymphoma.

This work was supported by the Russian Science Foundation (#142400022) and the Russian Foundation for Basic Research (# 165416014).

Bacterial Species Concept and Rampant Recombination of Wolbachia Genomes

Yury Ilinsky*¹, Yuri Vyatkin², Roman Bykov¹, Mary Yudina¹, Valentin Suslov¹

*e-mail: paulee@bionet.nsc.ru

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

The existence of bacterial species is a rather difficult issue. Typological approach of species designations that is based upon phenotypic characterisation has been widely used for prokaryotic organisms. Further, the molecular approach of conservative genes has a great impact on bacterial taxonomy that dramatically changed the idea of bacteria diversity. The phylogenetic approach provides robust inferences of main bacterial lineages. The phylo-phenetic bacterial species concept that combined molecular and traditional approaches has been considered as perspective, although in fact the results often include self-contradictions. Actually, the phylogenetic studies have revealed a phenomenon of horizontal gene transfer (HGT) in prokaryotes. It questioned the existence of bacterial species. The accumulated data of bacterial genomes allow to formulate the ideas of pangenome and core genes that recover the bacterial species idea. The modern bacterial species concept (BSC) based on the follows *i*) the certain gene number (core-genome) is present in all specimens of a species, *ii*) specimens within a species can freely exchange with genes whereas between species this process is limited, *iii*) specimens of a species are characterised by common ecological features therefore they have uniform evolution tendency. Thus, BSC is not only resolve the conflicts of typological and phylogenetic concepts but even to become close to the Mayr's biological species concept.

Here we consider bacteria of *Wolbachia* genus that belong to the group of symbiotic maternally inherited microorganisms (SMIM). The SMIM is a group of non-related bacteria that are mainly found in Arthropoda hosts. This group is characterized by the reduction genome evolution, viz. reduction of genome size, loss of genes and biochemical pathways. It is a result of dramatic effect of the genetic drift because an isolation of every member of SMIM by a host specimen lead to that only small part of bacterial population makes contribution in colonization of next generation of a host.

Among SMIM the *Wolbachia* genus is in a unique position. These bacteria in contrary to many other members of SMIM could be considered as both the reproductive parasites and mutualistic microorganisms. In addition *Wolbachia* symbionts have extremely wide range of hosts that include insects, other arthropods and some nematodes. According to traditional nomenclature there is the only species *W. pipientis* Hertig 1936, however it's genetic diversity is subdivided into about two tens of lineages. Two of them (A and B) have extremely high abundance. *Wolbachia* is

ordinary vertically transmitted from mother to offspring, however in evolutionary scale the horizontal transmission between different species is also observed.

In the report we consider the results of extensive survey of multilocus sequence data of *Wolbachia* isolates. We demonstrate rampant recombination of core *Wolbachia* genes between the strains within supergroup and rare gene exchange events between *Wolbachia* of different supergroups, and discuss the definition of *Wolbachia* species under BSC.

This work is supported by the RFBR № 16-04-00980.

Structural alterations of chromosomes in wheat hybrids obtained using the 1Rv(1A) line

Ivanova¹ Yu.N., Loginova¹ D.B., Volodina¹ E.A., Bondarevich² E.B., Solovey² L.A., Sycheva² E.A., Dubovets² N.I., Silkova¹ O.G.

¹ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

² Institute of Genetics and Cytology, Minsk, Belarus

kabanenko@bionet.nsc.ru

To date, the selection of bread wheat *Triticum aestivum* L., which provided a significant increase in yield, led to significant decrease in the plasticity and adaptability of varieties to adverse environmental factors. Rye *Secale cereale* L., whose chromosomes carry genes that control valuable economic and biological characteristics and properties, is widely used to obtain new forms. Introducing rye genetic material into the wheat genome, the researchers are faced with two main difficulties: the sterility of F₁ hybrids and the instability of hybrid genomes. The genomes stabilization process of wheat-rye hybrids is characterized by instability of chromosome sets, whole-chromosome or whole-genome elimination and the structural alterations of rye and wheat chromosomes. To increase the efficiency in obtaining prolific hybrids, selection of parental genotypes for hybridization is necessary. The aim of this study was to evaluate the contribution of the genotype of the wheat-rye substitution line 1Rv(1A) to the formation of karyotypes of wheat-rye hybrids obtained by crossing with rye (1Rv(1A)xR) and wheat variety (1Rv(1A)xS29).

Previously, our group showed a partial restoration of fertility in hybrids F₁ 1Rv(1A)xR as a result of meiotic restitution. The chromosomal composition of karyotypes was studied by applying C-banding and GISH using rye genomic DNA and sequential *in situ* hybridization using the centromere specific pAet-06 as probes. Aneuploidy of wheat and rye chromosomes, telocentric and wheat-rye centric translocations were observed in plants F₃ and F₅ generation. C-banding of chromosomes also allowed to determine the presence of deletions and the change in the size of heterochromatin blocks. Structural alterations of chromosomes were observed predominantly among chromosomes of B and D subgenomes. When selecting for plant productivity, telocentric chromosomes were less common among F₅ descendants than wheat-rye translocations, which may indicate greater stability of translocated rye genetic material in the genome of hybrids.

Analysis of F₂ hybrids 1Rv(1A)xS29 allowed to reveal the formation of telocentric chromosomes, deletions, change in the size of heterochromatin blocks, but the wheat-rye translocation were not formed. The F₂ karyotypes were marked with aneuploidy not only of chromosomes 1A and 1Rv, but also of 1D, 2D, 3D, 3B, 3A, 4A, 6D, 6B, 6A, 7D. Structural changes were observed for the chromosomes of the first homoeologous group (1Rv, 1A, 1D, 1B), as well as for 2B, 5D, 6B and 7B. Chromosomes 1Rv and 6B demonstrated aberrations more often.

The types of aberrations included centromeric breaks, deletions of various sizes and altered repeats in the pSc119.2 localization pattern.

We thank the Joint Access Center for Microscopy Analysis of Biological Objects (SB RAS) and the Joint Access Center for Artificial Plant Cultivation (IC&G SB RAS). The working of the Joint Access Centers was supported by the IC&G Budgetary Project no. 0324-2016-0001. FISH analysis of meiosis and the chromosome constitution of karyotypes was supported by the Russian Science Foundation (RSF no 16-16-00011). C-banding of mitotic chromosomes was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR B15CO-030).

Gene location in intercalary heterochromatin bands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes

V. Khoroshko¹, G. Pokholkova¹, T. Zykova¹, I. Zhimulev^{1,2}

¹Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Email: vicerna@mcb.nsc.ru

Drosophila polytene chromosomes are an exceptional model for genome organization research. As it can be seen under the microscope, the chromosomes have a very characteristic banding pattern, the nature of which lies in varying degree of chromatin compaction level along the chromosome body: densely packed regions form transverse dark stripes (bands) alternating with decompacted light regions referred to as interbands. Recently we discovered that banding pattern is the universal organization principle for both polytene chromosomes and mitotic cells.

Genetic organization of polytene chromosomes and correspondence between genes and their structural parts with bands and interbands is an unresolved question to this day, mostly due to the lack of appropriate methods that would allow accurate mapping of band and interband borders in the genome. By applying 4HMM bioinformatic model that was created in our laboratory we established exact borders for 32 interbands, 6 gray bands and 62 intercalary heterochromatin (IH) bands. It was earlier shown that interbands as the most decompacted and open chromatin fragments correspond to aquamarine chromatin of 4MM model and 5'-ends of housekeeping genes, while densely compacted IH bands are mostly composed of ruby chromatin which is always framed by malachite chromatin fragments we called "border malachite". Our research also educed a novel type of IH bands encompassing three 4HMM model chromatins: ruby, malachite, and lazurite.

By applying FISH we for the first time showed that bands in polytene chromosomes can be formed from gene structural part material, namely noncoding introns of actively transcribed genes. This fact could be explained by a differential pattern of chromatin condensation and decondensation of different gene structures during their activation. We showed that several bands and interbands might be produced by a singular intron, resulting in up to nine cytological structures formation.

This study was supported by Russian Science Foundation grant #14-14-00934

Studying iguanid and gekkonid sex chromosomes by isolated chromosome sequencing

Ilya G. Kichigin¹, Alexey I. Makunin¹, Alexander S. Graphodatsky^{1,2}, Vladimir A. Trifonov^{1,2}

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Russia*

Squamate reptiles show a striking diversity in modes of sex determination, including both genetic (XY or ZW) and temperature-dependent sex determination systems. The genomes of only a handful of species have been sequenced, analyzed and assembled including the genome of iguanid species *Anolis carolinensis*. Despite a high genome coverage, only macrochromosomes of *A. carolinensis* were assembled whereas the content of most microchromosomes remained unclear. Most of the anole species have homomorphic XY sex chromosome system. However, some species have large heteromorphic XY chromosomes (e.g. *Norops sagrei*) and even multiple sex chromosomes systems (e.g. *Ctenonotus pogus*), that were shown to be derived from fusions of the ancestral XY with microautosomes. Gekkonidae is a reptilian family containing the highest number of sex chromosome system transitions between even closely related species. Still in some genus like *Hemidactylus* sex determination mode remains unclear. We applied next generation sequencing of flow sorting derived chromosome-specific DNA pools to characterize the content and composition of microchromosomes in *A. carolinensis*, *N. sagrei*, *C. pogus* and *H. platyurus*. Comparative analysis of sequenced chromosome-specific DNA pools revealed that the *N. sagrei* and *C. pogus* XY sex chromosomes contain regions homologous to several microautosomes of *A. carolinensis*. We suggest that the sex chromosomes of *N. sagrei* and *C. pogus* are derived by fusions of the ancestral sex chromosome with several microautosomes and subsequent loss of some genetic content on the Y chromosome. In *H. platyurus* we have discovered and described the possible ZW system. Interestingly, it seems that some linkage groups tend to independently become a part of sex chromosomes in different lizard lineages.

Financial support: RSF grant No. 16-14-10009

E-mail: kig@mcb.nsc.ru

Painting of fourth a chromosome-specific protein regulating the 4th chromosome in *Drosophila melanogaster*

Maria Kim, Anna-Mia Johansson, Jacob Lewerentz, Marie-Line Faucillion, Henrik Lindehell,
Samaneh Tousi, Jan Larsson
Dept. of Molecular Biology, Umeå University, Sweden

In *Drosophila*, two chromosome-wide gene regulatory systems have been characterized: the male-specific lethal (MSL) dosage compensation system that acts on the male X-chromosome, and POF (Painting of Fourth) – mediating the chromosome-specific regulation of genes located on the 4th chromosome, which is the first example of a chromosome-wide, autosome-specific gene regulatory system.

Painting of fourth (POF) specifically targets and stimulates expression from the heterochromatic 4th chromosome. POF together with HP1 are involved in global regulation of the 4th chromosome. POF binding is dependent on heterochromatin, and POF and HP1 bind interdependently to the 4th chromosome. We have proposed that POF stimulates expression of genes in the repressive chromosome 4 environment and that a balancing mechanism involving POF and HP1 may provide a feed-back system that fine-tunes the expression status of these genes. The MSL-complex consists of male-specific lethal proteins and two long noncoding RNAs, *roX1* and *roX2*. For both the MSL-complex and POF the targeting sites are well characterized, but the principles underlying the targeting mechanisms have remained elusive. The striking similarity between POF and the dosage-compensating MSL-complex in evolutionary terms, their function as chromosome-wide regulators and their binding profiles, supports a common origin. In addition, chromosome 4 is suggested to represent a reversal of an ancient X-chromosome to an autosome.

Although dosage compensation has probably been required, and thus evolved, on a gene-by-gene or block-of-genes basis, the existence of systems like POF and the MSL-complex that act across a whole chromosome argues that some of their regulatory functions pre-existed and were recruited to compensate the X-chromosome as the proto-Y chromosome started to degenerate. It is therefore important to study the targeting mechanisms used by these systems and the relationship between them in order to understand chromosome evolution, the evolution of gene regulatory pathways and how balanced genome expression is established.

Both the X-chromosome and the 4th chromosome are known to have chromosome-specific chromatin structures, e.g. the male X-chromosome is enriched in acetylated H4K16 and the 4th is enriched in methylated H3K9. We have started to investigate additional chromosome-specific enrichments of histone modifications. We found a significant reduction in tri-methylated H3K36 on the male X-chromosome and increased enrichment on the 4th chromosome.

In *Drosophila melanogaster* the 1.688 satellite is one of the most abundant, with the longest array located in the pericentromeric region of the X-chromosome. Short arrays of 1.688 repeats are widespread within the euchromatic part of the X-chromosome, and these arrays were recently suggested to assist in recognition of the X-chromosome by the MSL-complex. We discovered that a short array of these repeats is essential for recruitment of the protein POF to a specific site on the X-chromosome (*PoX2*) and to various transgenic constructs. On an isolated target, *i.e.* an autosomic transgene consisting of a gene upstream of 1.688 satellite repeats, POF is recruited to the transgene in both males and females. The sequence of the satellite as well as its length and position within the recruitment element are the major determinants of targeting. Moreover, the 1.688 array promotes POF targeting to the *roX1*-proximal *PoX1* site in *trans*. Finally, binding of POF to the 1.688-related satellite-enriched sequences is conserved in evolution. We hypothesize that the 1.688 satellite functioned in an ancient dosage compensation system involving POF targeting to the X-chromosome.

The results presented support a model linking the MSL-complex to POF and chromosome specific gene regulation to regulation of heterochromatin. In addition, our data suggests that the X-chromosome (and the 4th chromosome) has evolved high tolerance for mis-expression, a property we speculate evolved in parallel with dosage compensation mechanisms and is predicted to be common for current and ancient sex-chromosomes.

Altered rRNA levels in possible connection to intellectual disability

Irina S.Kolesnikova¹, Alexander A. Dolzkiy¹, Natalya A. Lemskaya¹, Yulia V. Maximova², Asia R. Shorina³, Alexander S. Graphodatskiy¹, Dmitry V. Yudkin¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

Intellectual disability (ID) is an important medical and social problem that is commonly accompanied by comorbidities, psychological issues, social difficulties and often financial pressure for patients and their relatives. Its frequency is approximately 1% of the human population, and it can be caused by different genetic and environmental factors. One such genetic feature may be enlargement of p-arms on acrocentric autosomes, where rRNA genes are located. Although these chromosomes with substantially enlarged p-arms were reported since the 1970s, their presence in the karyotype can be accompanied by ID or have no manifestations (even passing through generations), and slight heteromorphism of p-arms in human acrocentric chromosomes is considered to be normal according to the human chromosome atlas.

In IMCB SB RAS, blood samples from patients with ID and their relatives were collected. In one of patients, CPG22, karyotyping revealed substantially enlarged p-arm on chromosome 13. An analogous chromosome was found in his healthy father CPG72, whereas his healthy mother CPG73 had a normal karyotype. FISH with a plasmid containing DNA sequences corresponding to 18S, 28S and 5.8S rRNA showed evidently large signals on affected chromosomes compared to normal homolog and other NOR-chromosomes in both the proband and his father indicating amplification of rDNA in both cases. To evaluate NOR functioning on the affected chromosome, we performed AgNO₃-staining of the same metaphase spreads as for rDNA localization in father and son. On proband's affected chromosome 13 enlarged p-arm stained on both chromatids across all the length substantially brighter than those on other NOR chromosomes and the normal homolog. Contrary, his healthy father revealed functional mosaicism of affected chromosome 13: in 57% of cells one active NOR, that was comparable with normal NOR-chromosomes, was detected, in 43% of cells – two different NORs, of which the more distally located one was stained brighter than the other. Finally, to evaluate rRNA expression, we performed real-time PCR quantification of 18S, 28S and 5,8S rRNAs in all three members of the family. In healthy parents all studied mRNA levels did not exceed those in the healthy control with a normal karyotype. Contrary, in CPG22 levels of all three rRNAs were approximately 6-fold higher than in the normal control. So, in this family case with 13p+ in father and son excessive NOR activity and elevated rRNA levels coincided with ID.

Thus, the aim of our further study was to extend an amount of investigated people and examine rRNA expression levels in patients with ID and acrocentric chromosomes with p-arms enlargement and in healthy controls.

First, we performed statistical evaluation of acrocentric chromosomes with NOR region p-arm enlargement in 56 patients with ID and 32 healthy controls. In the ID group, $37.5 \pm 5.9\%$ had enlarged p-arms in acrocentric chromosomes vs $34.4 \pm 8.4\%$ of people in the healthy group (not statistically significant). This finding shows that this feature itself is not directly connected with an increased probability of ID development, although it can be thought to represent a risk factor. Then we analyzed distribution of acrocentric autosomes with enlarged p-arms. Chromosome 13 had more frequent p-arm enlargement compared to other chromosomes in both groups, but the distribution differed from those in patients with ID and healthy donors. Thus, this chromosome tends toward preferential p-arm enlargement among all analyzed people with acrocentric chromosome heteromorphisms.

Thereafter, we examined 18S, 28S and 5.8S rRNA levels in blood samples of 12 ID patients with enlarged p-arms of acrocentric chromosomes and 13 healthy controls. The control group included samples with and without acrocentric chromosome heteromorphism. The mean 28S rRNA and 5.8S rRNA levels were substantially and statistically significantly higher in ID patients ($p \leq 0.01$) compared with the control group, being near to 6-fold elevated when normalized to the same one healthy reference control. The 18S rRNA did not exhibit a statistically significant difference between ID patients and healthy controls, although the value for ID patients tended to be higher ($p = 0.12$). All healthy controls showed no statistical significance in rRNA levels in relation to the presence of heteromorphic acrocentric chromosomes. The obtained results support our proposed relationship between RNA levels and ID. However, elevated rRNA expression is not the only factor playing a role. The 28S/18S rRNA ratio in ID patients also tends to be increased compared to healthy controls, but this is evidently the case only for a subset of the patients. Thus, changes in rRNA maturation processes may also take place and be connected with ID development.

Our results show that acrocentric chromosome p-arm enlargement itself is not sufficient to cause ID although may be thought to represent a risk factor. The crucial control point is rRNA expression and, namely, its correct regulation, expression and maturation. However, triggers and mechanisms of pathological processes in these cases wait to be revealed.

The study is supported by Russian Science Foundation Grant 15-15-10001.

Spatial-temporal organization of replication in polytene chromosomes of *Drosophila*

Tatyana D. Kolesnikova, Fedor P. Goncharov, Igor F. Zhimulev

Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Russia

Although polytene chromosomes have remained a cytogenetic model of choice for approximately a century, accurate genomic coordinates have been identified only for a handful of morphological elements of polytene chromosomes. We identify the genomic coordinates of the most compact, so-called “black” bands across the entire chromosome 2R. These bands encompass ~60% of DNA in the euchromatic arms and are the main structures visible by light microscopy. These results allowed us to compare replication timing between polytene chromosomes in salivary glands and chromosomes from cultured diploid cell lines and to uncover a significant similarity between these two types of chromosomes. This similarity is based on the peculiar partitioning of the *Drosophila* genome into alternating domains with permanently active genes and the domains that are subject to tissue-specific regulation. These domains strongly vary in size and are typically shorter than several hundred kilobase pairs. On the basis of the previous and new original data, we developed a model that associates (1) organization of the *Drosophila* genome, (2) replication timing in polytene cells, and (3) replication timing in diploid cells.

Financial support: Russian Science Foundation grant #14-14-00934.

TRF4, the novel TBP-related protein of *D. melanogaster*, in the course of evolution acquired the new functions in the ER-associated processes in the cytoplasm

Kurshakova M.M.¹, Kopytova D.V.¹

¹ Institute of Gene Biology RAS, Moscow

Investigation of the functions of TBP-related proteins makes contribution to the understanding of the mechanisms of chromatin assembly and transcription regulation in higher eukaryotes. The *trf4* gene, coding for the novel TBP-related protein, was found in the *D.melanogaster* genome. *trf4* homologs were found in the genomes of various *Drosophila* species but not in the genomes of other species. The predicted TRF4 protein has a distant homology with the TBP-like domains of TBP and TRF2 and is evolutionarily conserved among *Drosophila* species, which indicates its functional significance. TRF4 is expressed at all stages of development and many tissues of *D. melanogaster* with high levels of its expression being observed in testes. Amino acid sequence of TRF4 has mutations in promoter-binding and nuclear localization signal sequences. TRF4 is detected in the cytoplasm and is concentrated at the endoplasmic reticulum (ER) region of the cell. TRF4 was copurified with the proteins taking part in the processes proceeding in the ER, such as protein folding, proteolysis, and lipid droplet formation. Therefore, the change in the subcellular localization of TRF4 correlates with its new function in the processes associated with ER function. It can be proposed that *trf4* gene is an example of homolog neofunctionalization by protein subcellular relocation (PSR) pathway, where the subcellular relocation of gene product of duplicated gene lead to its new functions in ER-associated processes.

Genome-wide analysis of gene regulation mechanisms during *Drosophila* spermatogenesis

Petr P. Laktionov (1), Daniil A. Maksimov (1), Stanislav E. Romanov (1),

Polina A. Antoshina (1), Olga V. Posukh (1), Helen White-Cooper (2), Dmitry E. Koryakov (1),

Stepan N. Belyakin (1)

1 Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

2 School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, UK

During *Drosophila* spermatogenesis, testis-specific meiotic arrest complex (tMAC) and testis-specific TBP-associated factors (tTAF) contribute to activation of hundreds of genes required for meiosis and spermiogenesis. Intriguingly, tMAC is paralogous to the broadly expressed complex Myb-MuvB (MMB)/dREAM and Mip40 protein is shared by both complexes. tMAC acts as a gene activator in spermatocytes, while MMB/dREAM was shown to repress gene activity in many cell types. Our study addresses the intricate interplay between tMAC, tTAF, and MMB/dREAM during spermatogenesis. We used cell type-specific DamID to build the DNA-binding profiles of Cookie monster (tMAC), Cannonball (tTAF), and Mip40 (MMB/dREAM and tMAC) proteins in male germline cells. Incorporating the whole transcriptome analysis, we characterized the regulatory effects of these proteins and identified their gene targets. This analysis revealed that tTAFs complex is involved in activation of *achi*, *vis*, and *topi* meiosis arrest genes, implying that tTAFs may indirectly contribute to the regulation of Achi, Vis, and Topi targets. To understand the relationship between tMAC and MMB/dREAM, we performed Mip40 DamID in tTAF- and tMAC-deficient mutants demonstrating meiosis arrest phenotype. DamID profiles of Mip40 were highly dynamic across the stages of spermatogenesis and demonstrated a strong dependence on tMAC in spermatocytes. Integrative analysis of our data indicated that MMB/dREAM represses genes that are not expressed in spermatogenesis, whereas tMAC recruits Mip40 for subsequent gene activation in spermatocytes. Discovered interdependencies allow to formulate a renewed model for tMAC and tTAFs action in *Drosophila* spermatogenesis demonstrating how tissue-specific genes are regulated.

Poly(ADP-ribose) polymerase 1 in regulation of DNA repair and longevity

O.I. Lavrik^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090, Russia

e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Key words: PARP1, PARP2, poly(ADP-ribose), BER, NER, role of PARP1 in longevity

The phenomenon of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent poly(ADP-ribosyl)ation catalyzed with PARP1 was discovered long time ago, but it is still unclear how this post-translational modification governs a multitude of cellular processes. PARP1 interacts with numerous nuclear proteins including histones, and orchestrates chromatin decondensation in response to DNA damage. Relaxation of chromatin opens access to damages for DNA repair proteins. When interacting with the damaged DNA, PARP1 catalyzes the synthesis of a long branched poly (ADP-ribose) polymer (PAR) by using NAD⁺ as a substrate. PAR can be attached to the acceptor amino acid residues of nuclear proteins or to PARP1 itself. This process leads to reorganization of the functional protein complexes involved in base excision repair (BER) and in nucleotide excision repair (NER). The aim of the present research was to investigate the role of poly (ADP-ribosyl)ation in regulation of BER and NER and to search new targets of PARylation catalyzed with PARP1 and PARP2. The activities of BER and NER systems were investigated in cells of long-living animal *Heterocephalus glaber* (*H. glaber*) in comparison with cells of *Mus musculus* (mouse). Biochemical and immunochemical approaches, RT-PCR, fluorescence titration methods, atomic force microscopy (AFM), light-scattering technique were applied to reveal PARP1 interactions with BER and NER proteins as well as with DNA intermediates of BER containing breaks or apurinic/apyrimidinic sites [1]. PARP1 and PARP2 activities regulate BER and NER processes. The new mechanism of stimulation of PARP1 activity by multifunctional protein YB-1 which involved in BER was found. The level of poly(ADP-ribose) synthesis, was higher in the cells of *H. glaber* in comparison with mouse cells as well as *H. glaber* cell extracts displayed higher level of PARP1 covalent binding to DNA probes containing chemically reactive groups [3]. The results obtained show the key role of PARP1 in regulation of BER and NER processes and the new mechanisms of stimulation of PARP1 activity by oncoprotein YB-1. The data show the elevated activity of PARP-1 in cells of long-living mammals that can speak in favor of the various roles of PARP1 in longevity and aging.

Acknowledgements: This work was supported by grant from RSF (14-24-00038).

References

- [1] Khodyreva SN, Lavrik OI. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair. *Mol Biol (Mosk)*. 2016, 50(4):655-673.
- [2] Alemasova EE, Naumenko KN, Kurgina TA, Anarbaev RO, Lavrik OI. The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors. *Oncotarget*. 2018, 9(34):23349-23365.
- [3] Evdokimov A, Kutuzov M, Petruseva I, Lukjanchikova N, Kashina E, Kolova E, Zemerova T, Romanenko S, Perelman P, Prokopov D, Seluanov A, Gorbunova V, Graphodatsky A, Trifonov V, Khodyreva S, Lavrik O. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Agin*. 2018, in press.

EPIGENETIC SILENCING OF X-LINKED CNV BY SKEWED X-INACTIVATION IN WOMEN WITH A HISTORY OF PREGNANCY LOSS

Lebedev I.N.^{1,2}, Kashevarova A.A.¹, Skryabin N.A.¹, Pavlova K.A.², Zatula L.A.²,
Minaycheva L.I.¹, Tolmacheva E.N.^{1,2}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

The reason for incomplete penetrance of the large-scale chromosomal copy number variation (CNV) in human genome is not fully recognized. One of the possible mechanism may be related to genetically and developmentally determined epigenetic chromatin modifications. Recent data provide evidence, that skewed X-chromosome inactivation (sXCI) is associated with X-linked disease manifestation, cancer or adverse reproductive outcomes. Moreover, extremely sXCI with involvement of more than 95% of one of the parental homologues is linked with an advanced incidence (>4-times) of idiopathic recurrent pregnancy loss based on meta-analysis of 12 datasets (Su et al., 2015). At the same time, sXCI may have a protective effect for woman health by suppressing X-linked lethal gene mutations or CNVs. Therefore, one can suggest, that inheritance of these CNVs from maternal side by embryo may be incompatible with its normal development. If this true, the male embryos or female embryos with random X-inactivation are in the elevated risk group in such families.

To test this hypothesis, X-inactivation status was estimated in blood lymphocytes from 120 women with a history of pregnancy loss by classical methylation-specific assay at the AR locus. Extremely sXCI was observed in 8% of women. Their karyotypes were further analyzed by aCGH using SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K Microarray Kit (Agilent Technologies, USA). CNVs confirmation studies were performed on AriaMX Real Time PCR System (Agilent Technologies, USA) with DNA samples from mother's blood lymphocytes and extraembryonic tissues of her spontaneous abortions.

Two women in this group had pathogenetically significant CNVs. In one case woman with sXCI had delXq24, 239 kb in size, affected 8 genes (*SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, *SLC25A5*, *CXorf56*, *UBE2A*, *NKRF*, *SEPT6*, *MIR766*). This deletion was confirmed by Real-Time PCR both in mother and her spontaneous abortion with 46,XY karyotype. The mother, 29 years old, had a history of 5 miscarriages, 1 induced abortion and 1 healthy female child. DelXq24 encompassing *UBE2A* gene was revealed previously in two unrelated boys with mental deficiency, heart defects, dysmorphic features (Thunstrom et al., 2014) and related to X-linked syndromic mental retardation, Nascimento type (MIM 300860). The X-inactivation study in both patients' mothers confirmed

extremely sXCI (99%). Xq24 deletions were also among the most common deletions in HER2-positive breast cancer with involvement of X-linked *SLC25A43*, *SLC25A5-AS1*, and *SLC25A5* genes (Gabrielson et al., 2016). Products of affected genes are involved in cell proliferation, differentiation and post-transcriptional regulation of gene expression. Knockdown of *SLC25A43* in non-tumor cells significantly inhibited cell cycle progression during G1-S transition and reduce proliferation rate. Probably a lack of these genes expression leads to the shifting to sXCI in healthy deletion carriers but associated with their adverse pregnancy outcomes.

Another woman had two CNVs: dupXp22.33, 715 kb in size, with involvement of 5 genes (*PLCXD1*, *GTPBP6*, *PPP2R3B*, *LINC00685*, *SHOX*) and dupXq28, 782.7 Kb in size, with involvement of 16 genes (*VBPI*, *RAB39B*, *CLIC2*, *TMLHE-AS1*, *H2AFB2*, *H2AFB3*, *H2AFB1*, *F8A1*, *F8A3*, *F8A2*, *MIR1184-3*, *MIR1184-2*, *MIR1184-1*, *SPRY*, *VAMP7*, *IL9R*). Her female embryo with normal 46,XX karyotype revealed a random X-inactivation in extraembryonic tissues, that may reduce a chance for survival.

Our data are applicable to the understanding of molecular mechanisms responsible for the coordinated control of the expression level of X-linked loci significant for early embryo development by combination of epigenetic (X-inactivation) and cytogenetic (CNVs) processes. They will provide new strategies for preimplantation genetic diagnosis in women with recurrent pregnancy loss and sXCI.

This study is supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant 18-015-00437_a.

SECALOTRITICUM HYBRIDS AS A NEW MODEL FOR STUDYING THE ACTIVITY OF GENES ENCODING CENTROMERE-SPECIFIC PROTEIN CENH3

Y.A. Lipikhina¹, E.V. Evtushenko¹, O.M. Lyusikov², I.A. Gordei², A.V. Vershinin¹

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090*

²*Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, 220072*

The ultimate goal of remote hybridization is to make hybrids use as much of each of their parent's natural genetic potential or genetic diversity as they have. Of critical importance for increasing genetic diversity and developing hybrids with selective value could be the synthesis of rye-wheat amphiploids (\times *Secalotriticum*, \times *Secalotriticum* Rozenst = *Secale* L. \times *Triticum* L.), with rye as the maternal form and wheat as the pollinator. Crosses like these are normally difficult to achieve due to incompatibility, and so rye-wheat amphiploids are not well studied. It was found by researchers of the Laboratory of Plant Cytogenomics of the Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus that the use of triticale as an intermediate agent donating wheat genomes in crosses with rye is efficient for overcoming progamic incompatibility of the original species. New hybrids, with rye as the maternal plant and triticale as the paternal source of the wheat genome, are collectively called secalotriticum. Secalotriticum represents better settings for enhancing the expression of the rye genetic systems and the manifestation of its valuable adaptive traits.

Differential staining of chromosomes revealed that the secalotriticum forms developed by crossing the parental tetraploid rye cv. Verasen' (RRRR, $2n=4x=28$) to triticale cv. Mikhas' and Dubrava (AABBR'R', $2n=6x=42$) followed by backcrossing are cytologically stable hexaploids (RRAABB, $2n=6x=42$) without between-genome chromosome substitutions. We explored the expression of the main forms of centromere-specific histone *CENH3* in the hybrids. The coding sequences of the N-terminal tails (NTT) of the α forms of wheat and rye *CENH3* share a high percentage (99%) of nucleotide identity; however, a few positions display elevated levels of polymorphism. The NTT of α CENH3 in secalotriticum hybrids features a still higher percentage of nucleotide substitutions and, consequently, amino acid substitutions at such positions and the predominance of CENH3 forms typical of rye.

This research was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 18-54-00013) and the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project B18R-170).

THE CENH3 GENE ENCODING CENTROMERE-SPECIFIC HISTONE H3: ACTIVITY IN TRITICALE

Y.A. Lipikhina¹, E.V. Evtushenko¹, P.I. Steepochkin², A.V. Vershinin¹

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090*

²*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090*

Remote hybridization often causes genome rearrangements, which may lead to elimination of one of the parents' chromosomes even after successful fertilization and combining two genomes in the hybrid cell. Crosses between wheat and rye species proved to be by far the most successful remote hybridization events in that the progeny is reproducible and the allopolyploid hybrids – triticales (*Triticum x Secale*, (\times *Triticosecale* Wittmack)) – can be introduced in breeding practice.

Centromeres regulate faithful chromosome segregation during cell division. CENH3, a specialized modification of histone H3, is a permanent component of centromeric chromatin. CENH3 consists of a conserved C-terminal domain (HFD) and a more variable N-terminal tail (NTT), which plays an important role as CENH3 is incorporated to centromeric chromatin during cell division. This work provides the results of a cytogenetic analysis of triticales (AABBDDRR, $2n=8x=56$), developed by crossing the isogenic line of hexaploid wheat *T. aestivum* cv. Triple Dirk D (AABBDD, $2n=6x=42$) and the rye *S. cereale* cv. Korotkostebel'naya 69 (RR, $2n=2x=14$) and a comparative analysis of the expression of the main forms of *CENH3* in the parental species and hybrids. The coding sequences of the NTT of the α forms of wheat and rye *CENH3* are 213 bp in length each and have 99% nucleotide identity. The amino acid sequences of CENH3 from the parental rye cultivar possess specific positions with nonsynonymous amino acid substitutions that make them differ from those in wheat. All rye-specific amino acids are also present in the α CENH3 forms observed in the hybrid cells and the presence of these amino acids in the hybrids serves as a measure of expression of the parental *CENH3* in the hybrids. This suggests that triticales, with their hybrid genomes, express *CENH3* copies that are typical of each of the parents.

This research was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 17-04-00748) and the Russian Fundamental Scientific Research Program (project 0310-2018-0010).

Regulation of rRNA transcription by SUMO pathway

Yicheng Luo¹, Elena Fefelova² and Alexei A. Aravin^{1,2}

¹ Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, CA USA

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 123182, Russia

Similar to other organisms, the genome of *Drosophila melanogaster* contains many copies of identical rDNA units organized in extended arrays. It is believed that only fraction of available rDNA units are expressed in each cell, however, molecular mechanisms responsible for selection of active rDNA units and silencing of inactive rDNA remain poorly understood. We studied regulation of expression of normal rDNA and units damaged by integration of retrotransposons and found that their expression is strongly regulated by SUMO pathway.

This work was supported by grants from the Ministry of Education and Science of Russian Federation (14.W03.31.0007)

DOUBLESEX PROTEIN IS ASSOCIATED WITH GENE ACTIVATION IN *DROSOPHILA* MALES

Maksimov D.A.¹, Antoshina P.A.^{1,2}, Kalashnikova D.A.¹, Posukh O.V.¹, Belyakin S.N.^{1,2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

vift@mcb.nsc.ru

Doublesex (Dsx) proteins are known to control somatic sex differentiation in *Drosophila*, but mechanism underlying this process is still unknown. There are many indirect evidences that these proteins may work as transcription activators or repressors.

We found that in *Drosophila* males sex-specific isoform of Dsx binds to regulatory regions of active genes. This was achieved by comparison of its binding profiles in two different terminally differentiated tissues – fat body and accessory glands. It was found that Dsx binds to promoters and 5'UTR of most active genes in each tissue. Interestingly, this Dsx-related activation was not a feature only of the genes related with sex-specific function in each tissue – all actively transcribed genes tend to bind with this protein. Moreover, change of transcription level of individual genes between these two tissues correlates with variation in Dsx binding – the more active a gene becomes, the more it is bound with this protein. But this correlation was only one-sided. Indeed, tissue-specific binding of Dsx to a gene was not always accompanied by its activation.

Based on our observations we conclude that Dsx protein in *Drosophila* males may work as a common factor allowing gene activation by other specific activators.

This work was supported by the grant from Russian Foundation for Basic Research (16-04-01463).

Genome-wide analysis of SU(VAR)3-9 distribution in chromosomes of *Drosophila melanogaster*

Daniil A. Maksimov^{#1}, Petr P. Laktionov^{#1}, Olga V. Posukh¹, Stepan N. Belyakin^{1,2},
Dmitry E. Koryakov^{*1,2}

1 Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk 630090, Russia

2 Novosibirsk State University, Novosibirsk 630090, Russia

These authors contributed equally to the work

Histone modifications represent one of the key factors contributing to proper genome regulation. One of histone modifications involved in gene silencing is methylation of H3K9 residue. Present in the chromosomes across different eukaryotes, this epigenetic mark is controlled by SU(VAR)3-9 and its orthologs. Despite SU(VAR)3-9 was discovered over two decades ago, little is known about the details of its chromosomal distribution pattern. To fill in this gap, we used DamID-seq approach and obtained high-resolution genome-wide profiles for SU(VAR)3-9 in two somatic (salivary glands and brain ganglia) and two germline (ovarian nurse cells and testes) tissues of *D. melanogaster*. Analysis of tissue and developmental expression of SU(VAR)3-9-bound genes indicates that in the somatic tissues tested, as well as in the ovarian nurse cells, SU(VAR)3-9 tends to associate with transcriptionally silent genes. In contrast, in the testes SU(VAR)3-9 shows preferential association with testis-specific genes, and its binding appears dynamic during spermatogenesis. In somatic cells, the mere presence/absence of SU(VAR)3-9 binding correlates with lower/higher expression. No such correlation is found in the male germline. Interestingly, transcription units in piRNA clusters (particularly flanks thereof) are frequently targeted by SU(VAR)3-9, and *Su(var)3-9* mutation affects the expression of select piRNA species. Our analyses suggests a context-dependent role of SU(VAR)3-9. In euchromatin, SU(VAR)3-9 may serve to fine-tune the expression of individual genes, whereas in heterochromatin, chromosome 4, and piRNA clusters, it may act more broadly over large chromatin domains.

Summary of mammalian B chromosome sequencing

Alexey Makunin

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

B chromosomes (Bs) represent the most stable type of supernumerary chromosomes. They persist in populations for many generations and often demonstrate preferential behaviour in mitotic and meiotic cell divisions. Here, we summarize the data from isolated B chromosome sequencing we performed in mammals: two canids (fox and Chinese raccoon dog), two cervids (Siberian roe deer and grey brocket deer), and three rodents (collared lemming, yellow-necked field mouse, and Korean field mouse). In all species B chromosomes originated independently and incorporated copies of multiple genomic regions. Genes found on Bs are often involved in cell division and differentiation, and, unexpectedly, neuron development. Several genes are reused in distinct lineages. Evolutionary changes of B chromosomes include pseudogenization, amplification, and repetitive DNA accumulation. Most of the described properties are shared with B chromosomes in plants, insects, and fish. In this context, we discuss the features of B chromosome evolution and further developments in the field.

Using multiple reference genomes to identify phylogenetically informative markers for amplicon sequencing: an example from *Anopheles* mosquitoes

Alex Makunin

Wellcome Sanger Institute, Cambridge, United Kingdom

Anopheles is a diverse and highly evolvable genus of mosquitoes primarily known as malaria transmission vectors. Current genome diversity research is heavily biased towards a few major vector species, largely in Africa. Efforts towards malaria eradication require efficient surveillance instruments with broad scope in order to target both major and minor vector species from all endemic regions including South-East Asia and South America. Previously, whole-genome sequencing was performed for 16 *Anopheles* species representing both whole genus phylogeny and major vectors worldwide. Here, we use this comparative genomics dataset to search for phylogenetically informative markers throughout the entire nuclear genome. We select the most informative markers that are flanked by highly conserved regions suitable for primer design. The dataset is further filtered based on marker discriminative power, functional annotation, genomic position, and applicability to other dipterans. From this final set, we aim to construct a high-throughput low-cost amplicon sequencing panel suitable for 1) assigning accurate species identification to samples from diverse locations, 2) identifying previously unknown species, and 3) revealing population structure without prior knowledge of mosquito identity.

Mitochondrial Genome Surgery

Mazunin I.O.

Laboratory of Molecular Genetics Technologies, Immanuel Kant Baltic Federal University,
Kaliningrad, Russia, IMazunin@kantiana.ru

Different approaches such as mitochondrially targeted restriction endonucleases, zinc-finger nucleases (ZFNs), TAL effector nucleases (TALENs), have been developed to manipulate mitochondrial DNA (mtDNA) haplotype level in a cell. All the approaches are based on specific protein-nucleic acid interactions and their ability to cut out target mtDNA. Moreover, the development of sequence specific ZFNs and TALENs is laborious and technically challenging. RNA-guided endonucleases (RGEN) is an alternative method that utilizes a short guide RNA (gRNA) to recognize DNA, bind an endonuclease, and induce site specific cleavage. We expected that both RNA and protein parts of the RGEN systems require modifications for its effective import and functioning within the mitochondrion. There is no available experimental support for the application of any RGENs to mtDNA because there have been no evidence that the gRNA species could cross the mitochondrial membrane. But at the same time there are several published determinants for RNA import into human mitochondrion.

Here, we present mitochondrially modified RGEN/SpCas9 and RGEN/AsCpf1 which localize in mitochondrion and level down copy number of mtDNA. Current work is a proof-of-concept for this approach with possibility of further improvement of the system and making it more effective against pathological mtDNA. Further replacement of 20-bp of target-specific sequence in the plasmid vector encoded modified gRNA will allow the RGEN complex to eliminate different pathogenic mtDNA mutations.

To increase RNA import efficiency we have decided to encode the RNA moieties into a DNA structure and import it into mitochondrion using the TOM/TIM protein pathway. We would like to present the system called mitoTALE which, as we think, could deliver dsDNA molecules into the mitochondrion. The system includes two parts: the modified DNA-binding protein (recombinant protein which consists of a TAL effector fused with a mitochondrial target signal in its N-tail) and a binding site at the 5'-end of the imported dsDNA molecules. Imported dsDNAs are supposed to be expressed inside of the mitochondrion as functional genetic code, and could be used as a DNA template for homology-directed recombination or/and additional genetic material.

So here we are presenting and discussing our research on mitochondrially modified RGEN technologies and mitoTALE system for DNA delivery into mitochondrion in the context of mtDNA level manipulation as a potential future strategy for therapeutic intervention in selected mitochondrial diseases. This work was supported by the Russian Science Foundation [grant numbers 17-75-20015].

Cytomixis in male meiosis: monocots vs dicots

Mursalimov S., Loginova D, Silkova O., Deineko E.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Cytomixis is the migration of nuclei or their fragments between plant cells. Such migration is most frequently observed between male meiocytes; this process has been so far described in over 400 plant species. It is well known that polyploidization is the major mechanism of adaptation and speciation in plants. The production of unreduced gametes is believed to be the dominant process involved in the origin of polyploid plants. In the plant male meiosis, the unreduced microspores and further gametes, may be formed in different ways, and cytomixis is assumed to be one of them. We analyzed cytomixis in dicot (tobacco) and monocot (wheat, rye and their hybrids) plants.

Cytological features of cytomixis were studied in tobacco, an ancient allotetraploid, and newly formed wheat-rye hybrids using immunostaining and FISH. It was shown that both tobacco and rye plants have a high level of cytomixis in their male meiosis, however the level of cytomixis in wheat plants is rather low. In this context study of cytomixis in wheat-rye substitution lines (1Rv(1A), 2R(2D), 5R(5D), 6R(6A) etc.) has a special interest because it provides a possibility to find an individual rye chromosome that has “cytomixis genes”.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research [16-34-60007 mol_a_dk] and the Russian Academy of Science [0324-2018-0019].

Molecular mechanism of piRNA-guided transcriptional repression

Maria Ninova¹, Yung-Chia Ariel Chen¹, Baira Godneeva², Alexei A. Aravin^{1,2}
and Katalin Fejes Tóth¹

¹California Institute of Technology, Division of Biology and Biological Engineering, Pasadena, USA

²Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Regulation of transcription is the main mechanism responsible for precise control of gene expression. In many eukaryotes, small RNA guides in complex with a member of the Argonaute protein family identify targets of transcriptional repression. This strategy is employed to protect genomes from the activity of transposable elements, and in animals involves a distinct clade of Argonautes, Piwi proteins, and their associated piwi-interacting RNAs (piRNAs). In *Drosophila*, Piwi-induced transcriptional repression is associated with the establishment of repressive chromatin marks by the histone methyltransferase SetDB1, however how the Piwi/piRNA complex recruits this effector to chromatin targets is poorly understood. We identified a new player in piRNA-guided transcriptional silencing encoded by the *Su(var)2-10* gene. *Su(var)2-10* is required for transcriptional silencing and deposition of repressive chromatin marks on transposons and it physically associates with the Piwi/piRNA target recognition complex. *Su(var)2-10* belongs to a conserved family of proteins that function as SUMO ligases and we found that the SUMO pathway is essential for the repressive function of *Su(var)2-10*.

This work was supported by grants from the Ministry of Education and Science of Russian Federation (14.W03.31.0007)

CYTOGENETIC ANALYSIS OF SMALL MAMMALS (EULIPOTYPHLA, LAGOMORPHA AND RODENTIA) FROM THE QINGHAI-TIBET PLATEAU, CENTRAL CHINA AND THE FIRST KARYOTYPE DESCRIPTION FOR TWO SPECIES

© Svetlana V. Pavlova and Boris I. Sheftel

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russia, swpavlova@mail.ru

The small mammals of the Qinghai-Tibet Plateau are of great interest for cytogenetic due to the lack of a karyotype description for some species. We have collected the material for the karyological analysis from 6 localities in Central China (September 2017): four of them (ShangTan, Wu Jiao-Xiang, Chuanzhusi, Ruo Er Gai (Dzege)) are located along the western part of the Qin-Ling Ridge, and the Lianhuashan and Taiseshan - on the eastern slope of Qinghai -Tibet Plateau. The extreme distance between the locations was 1300 km. Three localities (ShangTan, Lianhuashan and Taiseshan) are located in the southern part of Gansu Province, and the others in the northern part of Sichuan Province.

Cytogenetic analysis was carried out for 13 species of small mammals, representing three orders (Eulipotyphla, Lagomorpha and Rodentia) ($N = 26$). All five studied insectivorous species were representatives of the family Soricidae. The karyotype of **lesser white-toothed shrew** *Crocidura suaveolens* ($N=1$) had the typical structure and $2n = 40$, $NFa = 46$.

Taxonomy of the genus *Blarinella* is contradictory. At present, most researchers believe (Hoffmann, Lunde 2008) that there are 3 species distributed in China (*B. griselda*, *B. quadraticauda*, *B. wardi*) and three different karyotypes were described for this genus (Ye et al., 2006, Moribe et al., 2007, Sheftel et al., 2017). But the examined karyotype had very different chromosome number and structure ($2n = 48$, $NF = 62$). Analysis of the morphological features allowed us to assume that the studied specimen is **the Asiatic short-tailed shrew** *Blarinella quadraticauda* ($N=1$). Further research is needed to clarify taxonomic status for species within this genus. The karyotypes of **the Chinese mole shrew** *Anourosorex squamipes* ($N=2$) did not differ from that described earlier from Sichuan province ($2n = 48$ and $NFa = 92$). It should be noted that the closely related species (*A. yamashinai*) inhabiting Taiwan has $2n = 50$ ($NFa = 96$) due to the presence of an additional pair of subtelocentric autosomes (Motokawa et al., 2009). The karyotype of **the Gansu shrew** *Sorex cansulus* ($N=1$) had $2n = 42$, $NFa = 70$, and apparently it does not differ from the karyotypes of the shrews of the group *Sorex caecutiens*. **The lesser striped shrew** *Sorex bedfordiae* ($N=5$) was characterized by chromosome polymorphism. Shrews from distant parts of the range differed in $2n$ as well as in the number of chromosomal arms, but now we are not able to determinate the type of polymorphism clearly. Some authors had explained the variation in the chromosome number by the presence of B chromosomes (Motokawa et al., 2009). We analyzed

five karyotypes from three locations and all of them had $2n=26$, but the number of arms varied from 45 to 46.

By morphological features, a collected pika (family Ochotonidae) was defined as **the black-lipped pika *Ochotona curzoniae*** (N=1), however the diploid number of chromosomes was 50. The only karyotype description for this species shows that it is $2n = 46$, NF = 68 (Tan and Bai 1987). Thus, further detailed analysis of the karyotype using differential staining is necessary in order to understand what we are dealing with - an incorrect definition of the species by the authors on the basis of morphological features or is it chromosomal polymorphism.

Karyotypes of five species of the family Cricetidae were analyzed. In **the lacustrine vole *Alexandromys limnophilus*** (N=3), the diploid number of chromosomes was 38 (NF = 58), which corresponds to the previously described karyotype (Courant et al., 1999). In the karyotypes of **the Eva's red-backed vole *Caryomys eva*** (N=2) and **the Inez's red-backed vole *Caryomys inez*** (N=3), the diploid number of chromosomes was the same $2n = 54$, but the number of chromosomal arms varied NF = 56 and 60, respectively, which coincides with the literature data (Yang et al., 1998). In **the long-tailed dwarf *Cricetulus longicaudatus*** (N=1) and **the greater long-tailed *Tscherskia triton*** (N=1) hamsters, karyotypes did not differ from those previously known for these species, $2n = 24$ and $2n = 28$, respectively (Orlov, Bulatova 1983).

Karyotypes of two representatives of the genus Apodemus, family Muridae, **the South Chinese field mouse *Apodemus draco*** (N=1) and **the Chevrier's field mouse *Apodemus chevrieri*** (N=1) had $2n = 48$ in both cases. It should be noted that no B chromosomes were detected in the examined karyotypes.

Thus, the cytogenetic analysis showed that all the specimens of rodents, the lesser white-toothed shrew and the Chinese mole shrew have the chromosome set and karyotype structure which are typical for the species. Karyotypes of the Gansu shrew and the Asiatic short-tailed shrew were described for the first time. The lesser striped shrew, the Asiatic short-tailed shrew and black-lipped pika require additional studies of karyotypes to clarify the species taxonomic status and the presence of intraspecific chromosomal polymorphism.

The work was supported by the Russian-Chinese grant of RFBR 17-54-53085 GFEN_a.

Roles of *Drosophila* NSL complex components in mitosis

Pavlova GA¹, Popova JV¹, Andreyeva EN¹, Yarinich LA¹, Lebedev MO^{1,2}, Razuvaeva AV^{1,2},
Dubatolova TD¹, Alekseeva AL¹, Pellacani C³, Somma MP³, Pindyurin AV^{1,2}, Gatti M³

¹Institute of Molecular and Cell Biology, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³IBPM CNR and Department of Biology and Biotechnology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

gerapavlova@gmail.com

The *Drosophila* nonspecific lethal (NSL) complex is a major transcriptional regulator that controls the expression of most *Drosophila* housekeeping genes. Genome-wide RNAi screens in *Drosophila* S2 cells have previously shown that components of the NSL complex (Rcd1 and Rcd5) are required for proper mitotic chromosome segregation and centrosome behavior. In addition, studies on the human orthologues of Rcd1 (KANSL3) and Rcd5 (MCRS1) revealed that during mitosis these proteins re-localize from the chromatin to the minus ends of the spindle microtubules (MTs), playing roles in spindle assembly and chromosome segregation. However, the molecular mechanisms underlying the mitotic roles of these proteins are currently unknown.

Here, we analyzed the mitotic functions of three components of the *Drosophila* NSL complex (Rcd1, Rcd5 and MBD-R2) in greater detail; we performed RNAi in S2 cells against the genes encoding these proteins and examined the ensuing mitotic phenotypes. We detected defects in centriole duplication after RNAi against each of these genes; moreover, both Rcd1-, Rcd5-depleted cells, but not *MBD-R2* RNAi cells, displayed pericentriolar material (PCM) fragmentation. We also found that cells depleted of each of these proteins exhibit defects in chromosome alignment at metaphase and frequent mitotic figures containing chromosomes with unseparated sister chromatids associated with elongated ana-telophase spindles. These peculiar mitotic figures have been previously observed in cells depleted of centromere or kinetochore components such as Cid, Ndc80, Nuf2 and Kmn1. Consistent with these results, we found that cells depleted of Rcd1, Rcd5 or MBD-R2 exhibit reduced levels of the centromere component Cid (the *Drosophila* orthologue of CENP-A) and the kinetochore component Ndc80. Interrogation of the published datasets and quantitative RT-PCR experiments revealed that transcription of many genes encoding centromere and kinetochore proteins is substantially reduced in Rcd1-, Rcd5- or MBD-R2-depleted cells. These cells also displayed diminished transcription of genes involved in centriole duplication (i.e., *asl*, *Sas-4* and *Sas-6*). These findings strongly suggest that reduced transcription of these genes impairs both kinetochore assembly and centriole duplication.

We also examined S2 cell lines that stably express Rcd1-eGFP, Rcd5-eGFP or MBD-R2-eGFP fusion proteins. In interphase cells, as expected, all fusion proteins localize in the nucleus. When cells entered mitosis, Rcd1-eGFP and Rcd5-eGFP showed very similar behaviors; in prometaphase and metaphase, they accumulated at the centrosomes. In telophase cells, they concentrated in the daughter nuclei, in the centriole/centrosome and in the midbody, the structure that connects the two daughter cells during late cytokinesis. In interphase cells MBD-R2-eGFP was enriched in the nucleus like Rcd1-eGFP and Rcd5-eGFP, but during mitosis MBD-R2-eGFP was associated with the chromosomes, but not with the centrosomes or other mitotic structures. These results clearly show that when cells enter mitosis at least some of the components of the NSL complex relocate from chromatin to specific mitotic structures. However, establishing whether these proteins have direct mitotic functions is a difficult task. Currently, our results only indicate that the enrichments of Rcd1 and Rcd5 at the centrosome help to keep together the PCM components.

This work was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (14.Z50.31.0005) and by a Russian Science Foundation grant (16-14-10288).

Direct roles of the Sf3A2 and Prp31 splicing factors in mitotic chromosome segregation

Pellacani C.², Bucciarelli E.², Renda F.¹, Hayward D.³, Palena A.², Chen J.³, Bonaccorsi S.¹, Wakefield JG.³, Gatti M.^{1,2} and Somma MP.²

¹ Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “C. Darwin” and ² Istituto di Biologia e Patologia Molecolari (IBPM) del CNR, Sapienza, Università di Roma, P.le A. Moro 5, 00185 Roma, Italy

³ Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Exeter, Stocker Road, Exeter, EX4 4QD, UK

Several genome-wide screens carried out both in *Drosophila* and human cells have shown that RNAi-mediated depletion of many different splicing factors (SFs) results in a variety of mitotic defects. However, it is currently unclear whether these mitotic abnormalities reflect defective splicing of specific pre-mRNAs or a direct role of the SFs in mitosis. Here we report that the conserved Sf3A2 and Prp31 SFs play direct mitotic functions in both *Drosophila* and human mitosis. We show that depletion of these SFs affects spindle formation and disrupts chromosome segregation in both *Drosophila* and HeLa cells. Injections of anti-Sf3A2 and anti-Prp31 antibodies into *Drosophila* embryos disrupt mitotic division within 1 minute, arguing strongly against a splicing-related mitotic function of these factors. We also demonstrate that both SFs bind the spindle microtubules (MTs) and the Ndc80 complex, the kinetochore-associated protein assembly that mediates kinetochore-MT interaction during mitosis. In Sf3A2- and Prp31-depleted cells, the Ndc80 level is normal but the protein is not tightly associated with the kinetochores. In HeLa cells, the Ndc80/HEC1 level is also normal; its interactions with SF3A2 and PRP31 are restricted to the M phase and require the presence of the spindle MTs. We noticed that in human cells depleted of these SFs, Ndc80/HEC1 diffuses along the kinetochore associated MTs (k-fibers). Collectively, our results indicate Sf3A2 and Prp31 regulate interactions among kinetochores, k-fibers and the Ndc80 complex.

Tethering of insulator proteins results in decompaction of condensed bands in the *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes

Galina V. Pokholkova, Sergei A. Demakov, Oleg V. Andreenkov, Natalia G. Andreenkova, Elena I. Volkova, Oksana V. Antonenko, Elena S. Belyaeva, Igor F. Zhimulev

¹Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Insulator proteins are central to domain organization and gene regulation in the genome. We used ectopic tethering of CHROMATOR (CHRIZ/CHRO) and dCTCF to pre-defined regions of the genome to dissect the influence of these proteins on local chromatin organization, to analyze their interaction with other key chromatin proteins and to evaluate the effects on transcription and replication. Specifically, using UAS-GAL4DBD system, CHRO and dCTCF were artificially recruited into highly compacted polytene chromosome bands that share the features of silent chromatin type known as intercalary heterochromatin (IH). This led to local chromatin decondensation, formation of novel DHSes and recruitment of several open chromatin proteins. CHRO tethering resulted in the recruitment of CP190 and Z4 (PZG), whereas dCTCF tethering attracted CHRO, CP190, and Z4. Importantly, formation of a local stretch of open chromatin did not result in the reactivation of silent marker genes *yellow* and *mini-white* immediately adjacent to the targeting region (UAS), nor did RNA polII become recruited into this chromatin. The decompacted region retained late replicated, similarly to the wild-type untargeted region.

Financial support: RFBR grant # 17-00-00284

CHROMOSOMAL VARIABILITY AND KARYOTYPIC EVOLUTION IN ISLAND POPULATIONS OF CHANNID AND GOBIOID FISHES (ACTINOPTERYGII, PERCIFORMES)

Prazdnikov D.V.

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

pdvfish3409@rambler.ru

Representatives of channid and gobioid fishes have a wide geographical distribution, including isolated island populations. Appearing in the early Eocene and Miocene representatives of these groups of fish has passed a long evolution, reflected in karyotypic diversity. In gobioid fishes the diploid number of chromosomes varies from $2n=29$ to $2n=56$, and the fundamental arm number (NF) from 38 to 96. In addition, a high karyotypic variety is increased due to the occurrence of chromosomal polymorphism involving various types of rearrangements. In channids, there is also a significant chromosomal heterogeneity - $2n=32-112$, $NF=46-116$. The evolutionary dynamism in channid fishes is due to different chromosomal rearrangements, as well as polyploidy. Given the variability and fragmentation of populations of a number of species of channid and gobioid fishes, we first carried out karyological studies of previously unexplored populations from Phu Quoc Island (Vietnam).

A karyological analysis of the island populations of channids (*Channa lucius* and *C. striata*) showed that they are characterized by different levels of chromosomal variability and types of chromosome rearrangements. For *C. lucius* is characterized by interpopulation chromosomal variability - $2n=48$ ($NF=50-51$). Populations of *C. lucius* from various rivers differ in the number of two-armed chromosomes, which is associated with the appearance in a single population of an unpaired metacentric chromosome. The karyotype of these fish consists of 3 meta- and 45 subtelo- and acrocentric chromosomes. Interpopulation differentiation of karyotypes in *C. lucius* is due to chromosomal rearrangement, which changes the position of the centromere, probably by pericentric inversion. Comparisons of the studied chromosome complements of *C. lucius* with continental populations show differences in the structure of karyotypes.

For another species of channid fishes - *C. striata* was found chromosomal polymorphism associated with Robertsonian translocation. In the population of this species are present two kariomorphs: $2n=44$ ($NF=48$) and $2n=43$ ($NF=48$). Preservation in the polymorphic population of *C. striata* heterozygote by translocation may be due to the fact that in kariomorph with $2n=43$ ($3m+2sm+38st/a$) not disturbed normal course of meiosis and formed viable gametes. For the continental populations of *C. striata* is characteristic the interpopulation variability of the

karyotypes - $2n=44-40$ (NF=58-46), however intrapopulation chromosomal polymorphism has not been detected to date. At the same time, in different populations, there are kariomorphs that are characteristic of the polymorphic population of *C. striata* from Phu Quoc Island.

Among the island populations of gobioid fishes have been studied karyotypes of three species have been studied: *Butis butis*, *B. gymnopomus* and *Psammogobius biocellatus*. Distinction of karyotype *B. butis* from Phu Quoc Island in comparison with the previously studied karyotype from another locality (Fijian Islands) is the presence of an unpaired submetacentric chromosome ($1sm+45st/a$; NF=47). A feature of the karyotype of another studied species - *B. gymnopomus* ($2n=46st/a$; NF=46) is associated with the presence of a marker pair of large subtelocentric chromosomes. For island population of *P. biocellatus* is characterized by polymorphism: $2n=46$ ($12st+34a$) and $2n=46$ ($20st+26a$). Chromosomal variability in gobioids from Phu Quoc Island is due to various types of rearrangements: pericentric inversions and centromere repositioning with the appearance of neocentromeres.

Prospective age of isolation of the ichthyofauna Phu Quoc Island from the mainland is not less than 9.000 years. Seasonally variable biotopes of the tropical island, features of fish biology, as well as populations isolation led to the emergence of polymorphism and fixation of chromosomal rearrangements. All this in a relatively short period of time increased the divergence of chromosome complements of channid and gobioid fishes. The main direction of karyotypic evolution of the studied groups of fish is an increase the fundamental arm number and a change the morphology of chromosomes with the formation of subtelocentric elements as a result of pericentric inversions and rearrangements leading to the appearance of neocentromeres.

The author is grateful to the administration of the Vietnam-Russia Tropical Center for the organization and financial support of field researches in Phu Quoc Island and also to all participants of the expedition for help in collection of the material.

Evolution of X chromosome in the order Cetartiodactyla

Anastasia A. Proskuryakova^{1,2}, Anastasia I. Kulemzina¹, Polina L. Perelman^{1,2},
Alexey I. Makunin¹, Natalya A. Lemskaya¹, Violetta R. Beklemisheva¹, Denis M. Larkin³,
Marta Farre³ Anna V. Kukekova⁴, Oliver A. Ryder⁵, Stephen J. O'Brien⁶,
Alexander S. Graphodatsky^{1,2}

¹ *Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Lavrentjeva ave 8/2, Novosibirsk 630090, Russia*

² *Novosibirsk State University, Pirogova str. 1, Novosibirsk 630090, Russia*

³ *The Royal Veterinary College, Royal College Street, University of London, Royal College Street, London NW1 0TU, UK*

⁴ *The University of Illinois at Urbana-Champaign, W. Gregory Drive Urbana 1207, IL 61801, USA*

⁵ *Zoological Society of San Diego, Conservation and Research for Endangered Species, San Pasqual Valley Road 15600, Escondido, CA 92027, USA*

⁶ *Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, Saint-Petersburg State University, Sredniy Av. 41A, Saint-Petersburg 199034, Russia*

The X chromosome in eutherian mammals is characterized by the remarkably high level of conservation. On the contrary, the X chromosome in Cetartiodactyla displays variation in morphology and G-banding pattern. Previously by G-banding and localization of microdissection probes and several bacterial artificial chromosomes (BAC) clones were identified that X chromosome has undergone multiple rearrangements during Cetartiodactyla speciation. For detail investigation of the evolution of this sex chromosome, we have selected 26 BAC clones from cattle CHORI-240 library evenly distributed along the cattle X chromosome. BAC clones were located by fluorescent in situ hybridization on metaphase chromosomes selected species from key cetartiodactyl branches. High-resolution maps were obtained in a representative range of species from different families: pig (Suidae), gray whale (Eschrichtiidae), pilot whale (Delphinidae), hippopotamus (Hippopotamidae), Java mouse deer (Tragulidae), pronghorn (Antilocapridae), Siberian musk deer (Moschidae), giraffe (Giraffidae). To trace the X chromosome evolution during fast radiation in large families, we mapped more than one species in Cervidae (moose, Siberian roe deer, fallow deer and Pere David's deer) and Bovidae (musk ox, goat, sheep, sable antelope, nilgau, gaur, saola, and cattle). We have identified three major conserved synteny blocks and rearrangements in different cetartiodactyl lineages. Based on this data reconstructed the structure of putative ancestral cetartiodactyl X chromosome. We demonstrate that intrachromosomal rearrangements such as inversions and centromere reposition are main drivers of cetartiodactyl's chromosome X evolution.

The work was supported by the Russian Science Foundation (RSF, 16-14-10009).

What was useful for us in the Neanderthal genome? An example of DNA regions regulating circadian clocks and sleep

Putilov A.A.^a, Donskaya O.G.^a, Zakharenko L.P.^b

^a Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

^b Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Introduction. For several hundred thousand years, our own species had evolved in near equatorial regions of Africa whereas the Neanderthals had lived in the northern part of Eurasia. Our ancestors had interbred with Neanderthals in the very beginning of their out-of-African dispersal. A weak but widespread selection against Neanderthal genes slowly removed them from our genome. However, from 2% to 8% of the DNA of all living non-African people comes from different to us species. The natural cycles of night and day, and their length, are stable in near-equatorial Africa. In contrast, they vary with latitude and season in Eurasia. Therefore, seasonality seemed to become a new and very powerful environmental factor shaping adaptation of Eurasians during, at least, 50 thousand years. We tested the suggestion that a polygenic latitude-dependent adaptation to seasonal variation in day length at higher latitudes can, at least partly, cause the latitudinal and racial differences in morning-evening preference (chronotype or diurnal type). We additionally tried to confirm the previously reported finding (Dannemann and Kelso, 2017) pointing at a contribution of Neanderthals to chronotypological variation in modern humans.

Methods. To identify the genetic-based signatures of such adaptation, geographic variation in allele frequencies of more than 28 hundred genetic variants was analyzed using data from 5 African and 11 Eurasian populations of the 1000 Genomes Project. The geographic variation in allele frequencies in the set of 34 polymorphisms-associates of chronotype was compared with variation in 26 other sets of polymorphisms. The number of polymorphisms chosen to represent some other sets was also limited to 34. In particular, 34 most reliable or/and most strongly associated polymorphisms were chosen from the original reports of GWASs that yielded the associates of type 2 diabetes, body mass index, sleep traits, bipolar disorder, schizophrenia, amyotrophic lateral sclerosis, and skin pigmentation. Moreover, two sets of 34 SNPs were additionally included in the analysis from a meta-analysis of such genetic associates of traits/diseases to represent polymorphisms associated simultaneously with two traits/diseases and SNPs showing the signs of recent positive selection (i.e., extended haplotypes due to selective sweeps). Nine other sets from our previous publications (Dorokhov et al., 2018; Putilov et al., 2018) were included in the present analysis as well as 8 additional sets of polymorphisms representing 8 pseudogenes.

Results. Comparison of geographic variation in allele frequencies in the set of 34 polymorphisms-associates of chronotype with variation in 26 other sets supported our predictions concerning

direction and significance of differences between these sets in fraction of polymorphisms with the signatures of latitude-dependent adaptation. We found that such signatures as a correlation of allele frequency with latitude and a heightened level of population differentiation in Eurasia compared to Africa were more common in the set of 34 associates of chronotype than in the sets of loci hinted by GWASs of most other traits/diseases, sampled from pseudogenes and from protein-coding regions of either circadian clock genes or reference genes. Moreover, the results supported the prediction of non-significance of difference from the sets of loci representing other traits shaped by latitude-dependent adaptations, such as skin pigmentation. It was also noted that, among 34 polymorphisms-associates of chronotype, the strongest correlate of latitude was a variant rs75804782 near *ASBI* (minor allele C) located within one of the longest introgressions of the Neanderthal's genome into the genomes of Eurasians. Only T allele of rs75804782 was found in African populations, and a gradual increase in frequency of the Neanderthal's C allele with latitude was the major cause of the emergence of highly significant correlation.

Discussion. The present results, in particular, suggested that, among 34 associates of chronotype, the strongest correlation with latitude was found for a SNP introgressed in the genomes of Eurasians from the Neanderthal's genome. These results on geographic variation in allele frequency of rs75804782 are in full agreement with the results previously reported in publication of Dannemann and Kelso (2017) who used in their analysis the frequencies of rs75804782 alleles provided by another dataset (the Simons Genome Diversity Panel). The practical important application of such results might be the aiming future candidate gene studies on examination of association between chronotype and loci harboring latitude-dependent adaptations. This promising approach to prioritization of polymorphisms-markers of this trait desires further development and testing.

Conclusion. We provided evidence suggesting that non-coding regions of Neanderthal DNA are playing an important role today in the influencing our ability to adjust the parameters of our circadian rhythms and sleep-wake patterns to seasonal variation in environmental conditions. The most remarkable finding in this respect was that a variant introgressed in the genomes of Eurasians from the Neanderthal's genome (allele C of rs75804782 near *ASBI*) appeared to be the strongest correlate of latitude among 34 chronotype-associated polymorphisms.

Acknowledgements. AAP and OGD were supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (grant number 16-06-00235-a). LPZ was partially funded by the Federal Research Program (the project number 0324-2018-0016).

References

- Dorokhov V.B., Puchkova A.N., Taranov A.O., Slominsky P.A., Tupitsina A.V., Vavilin V.A., Ivanov I.D., Nechunaev V.V., Kolomeichuk S.N., Morozov A.V., Budkevich E.V., Budkevich R.O., Dementrienko V.V., Sveshnikov D.S., Donskaya O.G., Putilov A.A. An hour in the morning is worth two in the evening: association of morning component of morningness-eveningness with single nucleotide polymorphisms in circadian clock genes. *Biological Rhythm Research*, 2018, 49: DOI: 10.1080/09291016.2017.1390823 (online: <http://dx.doi.org/10.1080/09291016.2017.1390823>)
- Dannemann M, Kelso J. The contribution of Neanderthals to phenotypic variation in modern humans. *Am J Hum Genet*, 2017, 101: 578-589.
- Putilov A.A., Dorokhov V.B., Poluektov M.G. How have our clocks evolved? Adaptive and demographic history of the out-of-African dispersal told by polymorphic loci in circadian genes. *Chronobiology International*, 2018, 35: Doi: 10.1080/07420528.2017.1417314 (online link: <http://dx.doi.org/10.1080/07420528.2017.1417314>).

Construction of red fox chromosomal fragments from the short-read genome assembly

Halie M. Rando¹, Marta Farré², Jennifer L. Johnson¹, Jaebum Kim³, Guojie Zhang^{4,5,6}, Polina L. Perelman⁷, Natalya A. Serdyukova⁷, Anastasiya V. Kharlamova⁸, Yury Herbeck⁸, Rimma G. Gulevich⁸, Anastasiya V. Vladimirova⁸, Lyudmila N. Trut⁸, Aleksander S. Graphodatsky⁷, Stephen J. O'Brien^{9,10}, Denis M. Larkin², Anna V. Kukekova¹

¹ *Department of Animal Science, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA*

² *Department of Comparative Biomedical Science, Royal Veterinary College, London NW1 0TU, United Kingdom*

³ *Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea*

⁴ *China National Genebank, BGI -Shenzhen, 518083, Shenzhen, Guangdong, China*

⁵ *Section for Ecology and Evolution, Department of Biology, Universitetsparken 15, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark*

⁶ *State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, 650223, Kunming, China*

⁷ *Institute of Molecular and Cell Biology of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Russia*

⁸ *Institute of Cytology and Genetics of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630090, Russia*

⁹ *Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, St. Petersburg State University, 41A Sredniy Prospekt, St. Petersburg 199034, Russia*

¹⁰ *Guy Harvey Oceanographic Center, Halmos College of Natural Sciences and Oceanography, Nova Southeastern University, 8000 North Ocean Drive, Ft Lauderdale, Florida 33004 USA*

The genome of a red fox (*Vulpes vulpes*) was recently sequenced and assembled using next-generation sequencing. The assembly is of high quality, with 94X coverage and a scaffold N50 of 11.8 Mbp, but is split into 676,878 scaffolds of which some likely contain assembly errors.

Fragmentation and misassembly hinder accurate gene prediction and down-stream analysis such as the identification of loci under selection. Therefore, assembly of the genome into chromosome-scale fragments was an important step towards developing this genomic model. Scaffolds from the assembly were aligned to the dog reference genome and compared to the alignment of an outgroup genome (cat) against the dog to identify syntenic sequences among species. The program Reference-Assisted Chromosome Assembly (RACA) then integrated the comparative alignment with the mapping of the raw sequencing reads generated during assembly against the fox scaffolds. The 128 sequence fragments RACA assembled were compared to the fox meiotic linkage map to guide the construction of 40 chromosomal fragments. This computational approach to assembly was facilitated by prior research in comparative mammalian genomics, and the continued improvement of the red fox genome can in turn offer insight into canid and carnivore chromosome evolution.

IN VIVO DAMID MAPPING UNCOVERED DYNAMIC CP190 CHROMATIN BINDING LANDSCAPE IN COURSE OF DROSOPHILA SPERMATOGENESIS

Romanov Stanislav E., Posukh Olga V., Maksimov Daniil A., Belyakin Stepan N.,
Laktionov Petr P.

Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Russia

romanov@mcb.nsc.ru

Insulators are regulatory elements that control promoter-enhancer interactions and limit the spread of chromatin marks along the chromosome. They function through the interaction with specific insulator proteins. *In vitro* studies have demonstrated a highly conservative pattern of insulator proteins interaction with chromatin in various cell types. At the moment little is known about insulator protein redistribution during differentiation and their influence on expression of tissue-specific genes.

CP190 is one of the major insulator proteins in *D. melanogaster*. The binding regions of CP190 are shown to serve as genome targets for a couple of several transcription factors in *D. melanogaster*, such as mitosis genes repressor dREAM. Paralogous to dREAM, testis-specific complex tMAC plays a critical role in massive activation differentiation genes during germ cells development. The mechanism of tMAC interaction with genomic targets remains unclear. Taking into account tMAC and dREAM resemblance, we proposed that CP190 may play a role in tMAC recruitment to chromatin in the male germline.

To test this hypothesis we mapped CP190 chromosome binding sites *in vivo* in *D. melanogaster* male germ cells using DamID-seq approach. The profile contains about 15 thousand binding sites (FDR <5%). As was expected, CP190 colocalizes with tMAC complex in male germline chromatin. Moreover, CP190 is located in half of known binding sites of testis-specific transcription activator tTAF, which accompanies tMAC during massive gene activation in spermatocytes. In addition CP190 was enriched at the promoters of tMAC and tTAF target genes (P-value <0.001). Using published data on CP190 distribution in somatic cells, we found that, unlike in the male germline, CP190 is depleted at the promoters of spermatocyte differentiation genes and genomic regions that are bound by tTAF or tMAC in male germ line cells.

To analyze CP190 chromatin binding dynamics through the development of male germ cells, we performed germline-specific DamID-Seq of CP190 in *bam* mutant testes that contain only early developmental stages of male germ cells and *mip40* and *can* mutant testes mostly filled with the germ cells that started terminal differentiation. The obtained profiles contain 9-11 thousand CP190 binding sites (FDR <5%), but only about 30% all peaks were conservative through the all spermatogenesis stages. Interestingly, CP190 seems to lack its affinity with putative tTAF and

tMAC genome targets in both spermatogonia and undifferentiated spermatocytes. Thus, CP190 demonstrate the association with tMAC and tTAF target genes in male germ line only in presence of both transcription activators. In general, CP190 is associated with promoters of 3-4 thousand genes in each profile, 1200 of them are tMAC and tTAF-independent and remain bound by CP190 through all the stages of spermatogenesis. As it was previously mentioned, there are an overall tendency for CP190 to bind near promoters of transcriptionally active genes.

Our results indicate involvement of insulators in the regulation of tissue-specific genes in the spermatogenesis of *D.melanogaster*. CP190 *in vivo* DamID mapping indicates a highly variable pattern of the insulator protein interaction with chromatin in course of cell differentiation.

THE DYNAMICS OF INTRANUCLEAR LOCALIZATION OF DAXX PROTEIN IN MOUSE EARLY EMBRYOGENESIS

Zhuldyz Sailau,^{a,*} Dmitriy S. Bogolyubov,^b Irina O. Bogolyubova^b

^a*St. Petersburg State University, 7-9 Universitetskaya Emb., St. Petersburg, 199034, Russia*

^b*Laboratory of Cell Morphology, Institute of Cytology RAS, 4 Tikhoretsky Ave., St. Petersburg, 194064, Russia*

**E-mail: zhuldyz.ks@mail.ru*

It is well-known that chromatin remodeling plays an important role in the regulation of gene expression. Nowadays, chromatin-remodeling proteins, especially the members of SWI/SNF family, are in the spotlight of researchers, as violations of their normal functioning are linked with the pathogenesis of a number of diseases, including cancer. At the same time, data based on the localization and possible functions of chromatin-remodeling proteins in early mammalian embryogenesis remain extremely scarce, although significant changes in transcriptional activity and structural re-organizations of the nucleus occur during this period. Earlier, we studied the distribution of the chromatin-remodeling protein ATRX (α -thalassemia / mental retardation syndrome X-linked) in early mouse embryogenesis and found that ATRX localizes only to certain heterochromatin zones in the nucleus of early embryos, whereas many other zones are not stained with ATRX antibody. We assume that such heterogeneity of the heterochromatic compartment may be due to the presence/absence of the main functional partners of ATRX. One of them is the histone H3.3 chaperone DAXX (Death-associated protein 6), which, in conjunction with ATRX, participates in the maintenance of the heterochromatin structural organization. Using immunostaining methods at the light-optical and ultrastructural levels, we studied the distribution of DAXX protein and its colocalization with ATRX in the nucleus of pre-implantation mouse embryos at the zygotic-morula stages.

We found that intranuclear DAXX distribution changes significantly in early mouse embryogenesis. Initially, at the zygote stage, DAXX is detected only on the periphery of the nucleolus precursor bodies (NPBs) in both male and female pronuclei. In the late two-cell stage, DAXX concentrates not only at the periphery of the NPBs, but also elsewhere in the nucleoplasm. At the morula stage, a diffuse labeling of DAXX predominates again, and only few small zones of a higher concentration of DAXX are observed in association with the periphery of the nucleoli. Thus, the most noticeable regions of DAXX localization are present at the end of the two-cell stage.

In the studied stages, DAXX is associated with heterochromatin regions of the embryo nucleus, intensely stained with DAPI. We presume that in early mouse embryogenesis, as in the nucleus of differentiated cells, DAXX is involved in maintaining the spatial organization of

transcriptionally inactive chromatin. To test this assumption, we carried out a parallel detection of newly synthesized RNA transcripts using microinjections of BrUTP and DAXX with antibodies. As expected, there were no zones of colocalization of fluorescent signals in this case.

According to data based on differentiated cells, the involvement of DAXX in the regulation of the structural and functional status of chromatin implies close relationships between DAXX and the chromatin-remodeling protein ATRX. We analyzed the colocalization of these proteins in the nucleus of pre-implantation mouse embryos. The areas of colocalization of DAXX and ATRX were found only at the two-cell stage, but the colocalization was not absolute. Both confocal and electron-microscopic images showed the heterochromatin zones that contained DAXX, but did not contain ATRX and, conversely, ATRX localization zones where DAXX was absent.

In conclusion, in all studied stages of mouse early development, DAXX is associated with transcriptionally inactive heterochromatin and initially located around the periphery of the NPBs. The most noticeable regions of DAXX localization are present at the end of the two-cell stage, most likely due to the formation of chromocenters, which is characteristic for this stage of mouse embryogenesis. The features of DAXX and ATRX colocalization in the nucleus of early mouse embryos suggest that DAXX is involved in the formation of heterochromatin compartments in the early stages of mammalian embryogenesis, including mechanisms that do not require its cooperation with ATRX.

The work was supported by the granting program "Molecular and cellular biology" of the Russian Academy of Sciences.

Chromosome organization and dynamics in *Anopheles* species and their hybrids

Igor V. Sharakhov^{1,2,3}, Jiangtao Liang¹, Phillip George¹, Nicholas Kinney²,

Alexey V. Onufriev^{3,4}

¹Department of Entomology, Virginia Tech, Blacksburg, USA

²Laboratory of Ecology, Genetics and Environmental Protection, Tomsk State University, Russia

³Genomics Bioinformatics and Computational Biology, Virginia Tech, Blacksburg, VA, 24061, USA

⁴Department of Computer Science, Virginia Tech, Blacksburg, VA, 24061, USA

Inter-species crosses in the *Anopheles gambiae* complex often produce sterile F1 hybrid males confirming Haldane's rule of sterility or inviability of the heterogametic sex. The reasons why mosquito hybrid males are sterile while hybrid females are fertile are unknown. Studies on chromosome organization and dynamics will address questions of how chromosomes behave in the germ line of different species and inter-species hybrids. To investigate possible cytological causes of hybrid male sterility, we performed crosses between laboratory strains of *An. merus* and either *An. gambiae* or *An. coluzzii*. Using X-specific and Y-specific FISH probes, we followed the process of meiosis in each species and their F1 hybrid males. Unlike parental species, sex chromosomes in meiosis of male hybrids did not pair, meiosis was arrested and primary spermatocytes divided by mitosis. As a result, we discovered a novel phenotype – X+Y bearing diploid immature sperm – caused by the failure of the reduction division in meiosis of male hybrids. Compared with chromosomes of parental species, chromosomes in hybrid males showed various degrees of insufficient condensation suggesting malfunction of chromosomal proteins. Sex chromosomes displayed drastic differences in molecular organization of heterochromatin between *An. merus* and either *An. gambiae* or *An. coluzzii*. We hypothesize that the collapse of meiosis in hybrid males is caused by the divergence of X-Y pairing sites in heterochromatin of sex chromosomes between sibling species. We also studied chromosome organization in salivary glands and ovarian nurse cells of pure species and hybrid females. Our confocal analysis of 3D chromosome organization in *An. merus*, *An. gambiae* and *An. coluzzii* using oligopainting of euchromatic loci found no significant inter-species differences in the numbers of chromosome-nuclear envelope interaction or in inter-chromosomal contacts. Despite the presence of large areas of asynapsis, both autosomes and X chromosomes showed some degrees of pairing in hybrid females. We hypothesize that any region of autosomes and X chromosomes can participate in pairing of homeologous chromosomes thus facilitating the normal progress of meiosis in hybrid females.

Genomic divergence and chromosomal differentiation in the malaria mosquito *Anopheles messeae sensu lato*

Maria V. Sharakhova^{1,2}, Anastasia N. Naumenko¹, Dimitriy A. Karagodin³,
Andrey I. Yurchenko⁴, Mikhail I. Gordeev⁵, Anton V. Moskaev⁵, Olga I. Martin¹,
Elina M. Baricheva³, and Igor V. Sharakhov^{1,2}

¹Virginia Polytechnic and State University and Fralin Life Science Institute, Blacksburg, USA

²Laboratory of Ecology, Genetics and Environmental Protection, Tomsk State University, Russia

³Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

⁴Institute of Biodiversity Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, UK

⁵Department of Ecology, Moscow Regional State University, Moscow, Russia

A dominant malaria vector, *Anopheles messeae sensu lato* (*s.l.*), is a highly polymorphic species with a wide distribution throughout Eurasia. Five highly polymorphic inversions associated with geographical distribution of the species have been reported. A sister species, *An. daciae*, was discriminated from *An. messeae sensu stricto* (*s.s.*) based on five fixed nucleotide substitutions in the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal DNA. However, genome-wide genetic divergence and chromosomal differentiation between two species remained unexplored.

In this study, we analyzed ITS2 sequences and karyotypes in 289 larvae specimens of *Anopheles* from three locations: Novokosino, Noginsk and Yegoryevsk of the Moscow region. We identified high abundance of both *An. messeae s.s.* and *An. daciae* in these populations. Five individual genomes for each species were sequenced from the Yegoryevsk population. Our study determined five previously described nucleotides in ITS2 of *An. messeae s.s.* whereas the ITS2 sequence in *An. daciae* had both *An. messeae* and *An. daciae* variants present simultaneously in the first three positions of each individual. Fixed differences between *An. messeae s.s.* and *An. daciae* were found only in the last two positions. Only one mosquito was identified as a hybrid between *An. messeae s.s.* and *An. daciae* based on heterogeneous substitutions in all five positions. Our genome sequence comparison has demonstrated the genome-wide divergence between the two species. Fst analysis demonstrated that the divergence was extremely high on the X chromosome. A cytogenetic comparison of *An. messeae s.s.* and *An. daciae* samples demonstrated that two species significantly differ from each other by the frequencies of the polymorphic inversions (Figure 1). Inversion X1 was fixed in *An. messeae s.s.* but was polymorphic in all *An. daciae* populations. Frequencies of 3 polymorphic autosomal inversions were higher in *An. messeae s.s.* than in *An. daciae*. Rare inversions X4 and 2R4* were found in heterozygote only in *An. messeae* and *An. daciae*, respectively. Each of the populations demonstrated distinct species composition suggesting different ecological preferences of the two species.

This study revealed the genetic differentiation between *An. messeae s.s.* and *An. daciae* that is seen at both genomic and chromosomal levels. The study also determined different ecological preferences of the two species. The research was partially supported by the Russian Science Foundation grant No 15-14-20011 and RFBR grant No 18-04-01117A.

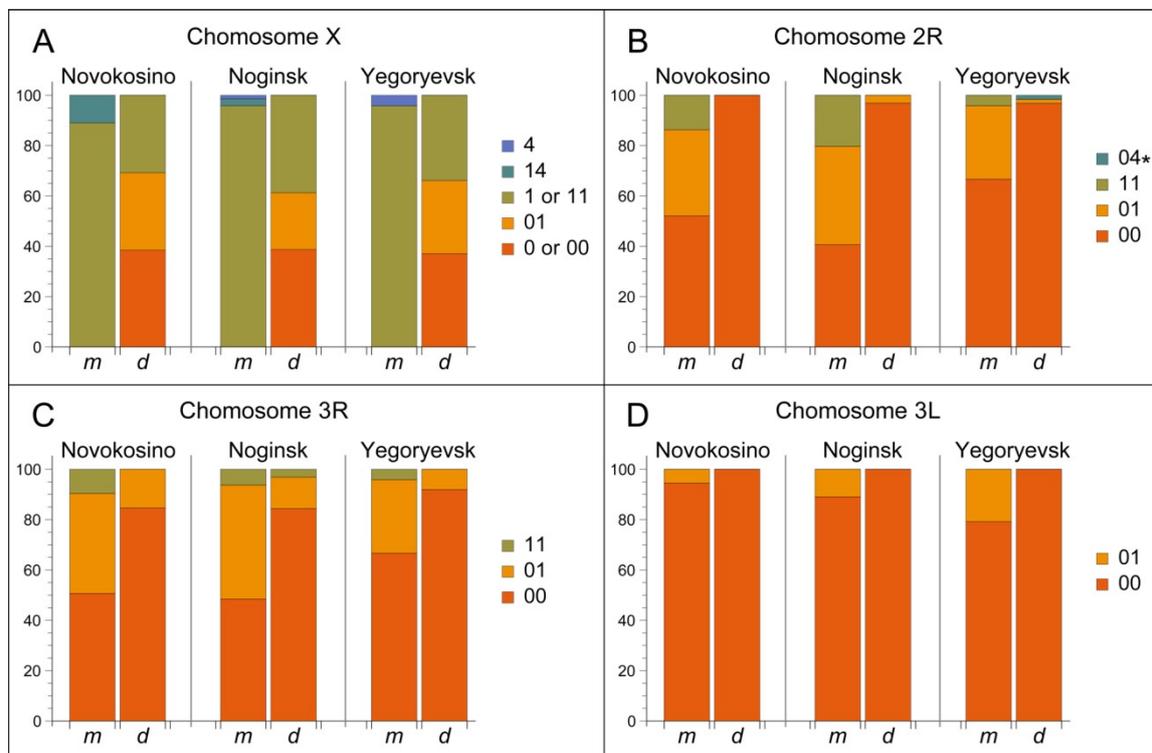


Figure 1. Inversion frequencies for *An. messeae* and *An. daciae* in Novokosino, Noginsk and Yegoryevsk populations. Frequencies of inversions: X0, X1 and X4 (A); 2R1 and 2R4* (B); 3R1 (C); and 3L1 (D) are shown by charts. Proportions of standard, inverted and heterozygote arrangements are shown by different colors.

MOLECULAR AND GENETIC ORGANIZATION OF BANDS AND INTERBANDS IN THE DOT CHROMOSOME OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Darya S. Sidorenko¹, Ivan A. Sidorenko², Tatyana Yu. Zyкова¹, Tatyana D. Kolesnikova¹,
Fedor P. Goncharov¹, Igor F. Zhimulev^{1, 3}

1 Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk, Russia

2 Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia

3 Laboratory of structural, functional and comparative genomics of the Novosibirsk State
University, Novosibirsk, Russia

demidova.daria@mcb.nsc.ru

The fourth chromosome smallest in the genome of *Drosophila melanogaster* differs from other chromosomes in many ways. It has high repeat density in conditions of a large number of active genes. Gray bands represent a significant part of this polytene chromosome. Specific proteins including HP1a, POF and EGG establish the epigenetic state of this unique chromatin domain.

In order to compare maps of localization of genes, bands, and chromatin types of the fourth chromosome we performed FISH analysis of 38 probes chosen according to the model of four chromatin types. It allowed clarifying the dot chromosome cytological map consisting of 16 loose gray bands, 11 dense black bands, and 26 interbands. We described the relation between chromatin states and bands. Open aquamarine chromatin mostly corresponds to interbands and it contains 5'UTRs of housekeeping genes. Their coding parts are embedded in gray bands substantially composed of lazurite chromatin of intermediate compaction. Polygenic black bands contain most of dense ruby chromatin, and also some malachite and lazurite. Having an accurate map of the fourth chromosome bands and its correspondence to physical map we found that DNase I hypersensitivity sites, ORC2 protein, and *P*-elements are mainly located in open aquamarine chromatin, while element 1360, characteristic of the fourth chromosome, occupies band chromatin types. POF and HP1a proteins providing special organization of this chromosome are mostly located in aquamarine and lazurite chromatin. In general, band organization of the fourth chromosome shares the features of the whole *Drosophila* genome.

Financial support: RFBR grant #17-00-00284

Synaptonemal Complex Analysis in Spermatocytes of Three *Nothobranchius* Fish Species with X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y Sex Chromosome System

S. A. Simanovsky^{1*}, V. E. Spangenberg², S. N. Matveevsky², T. B. Demidova¹,
K. G. Ordzhonikidze^{1,2}, O. L. Kolomiets and E. Yu. Krysanov¹

¹ A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow

² Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow

**sergey.a.simanovsky@gmail.com*

Annual killifish genus *Nothobranchius* includes 76 species and has one of the most variable diploid number of chromosomes among all other genera of vertebrates. It ranges from $2n = 16$ (NF = 30) in *N. rachovii* to $2n = 50/49$ (NF = 50) in *N. brieni*. This dramatic variation of karyotypes in *Nothobranchius* species may be related to extreme conditions in their natural habitat, ephemeral pools in East Africa. In the majority of species from this genus, heteromorphic sex chromosomes were not detected with the conventional methods of cytogenetics. However, a multiple sex chromosome system X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y was found in the following 6 species, in which males have one chromosome less than females: *N. lourensi* ($2n=28/27$), *N. guentheri* ($2n=36/35$), *N. janpapi* ($2n=38/37$), *N. thierryi* ($2n=44/43$), *N. ditte* ($2n=40/39$) and *N. brieni* ($2n=50/49$).

In this study, we investigated prophase I of meiosis in *N. ditte*, *N. guentheri* and *N. janpapi* males with the X₁X₂Y sex chromosome system using synaptonemal complex analysis. We employed transmission electron microscopy, immunofluorescence analysis with antibodies against proteins SYCP3 (lateral elements of SCs) and MLH1 (a recombination marker), as well as fluorescent *in situ* hybridization with a telomere probe to describe X₁X₂Y sex trivalents in *N. ditte*, *N. guentheri* and *N. janpapi* males. Our results and molecular phylogenetics data for genus *Nothobranchius* suggest that the multiple sex chromosome system X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y emerged independently in these species. To the best of our knowledge, this is the first study of a multiple sex chromosome system in fishes with the use of immunofluorescence analysis of synaptonemal complexes.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00638.

The Evolution of Primate Centromeres

Roscoe Stanyon, Department of Biology, University of Florence, Italy

Francesca Bigoni, Natural History Museum, University of Florence

In this presentation we will discuss the important role that centromeres have held in throughout the history of comparative cytogenetics. A convenient starting point is Robertsonian translocations (1916) also called whole-arm or centric-fusion translocations, but also includes centric fissions. For more than 50 years Robertsonian transformations were considered the primary mechanism behind chromosome evolution. In addition to counting diploid numbers ($2n$) Matthey (1945) added a count of chromosome arms (nombre fundamental, FN). For Matthey both diploid number and FN could go up or down, but the centromere remained a central role in chromosome diversity. Later whole karyotype fissioning was proposed as a saltative mechanism of genome evolution (cf. Giusto&Margulis, 1981). However, astutely Matthey remarked, “all these interpretations are complete conjecture and will remain so until the nature of the centromere...is better understood”. As is well known, chromosome banding and painting characterized two periods of renewed interest in comparative cytogenetics. Banding showed that changes in FN were not always due to inversions, but often to increases in heterochromatin, however, banding proved limited in comparing phylogenetically distant or highly rearranged genomes. Painting mapped chromosome homology at the DNA level and showed that differences in diploid numbers were often due to non-Robertsonian rearrangements. Painting was mostly limited to tracking translocations (inter-chosomal changes), but FISH with cloned DNA or regional probes (including microdissection) could effectively reveal intra-chromosomal rearrangements and determine marker order of chromosomes. BAC-FISH was particularly useful in determining the marker order of chromosomes in many primate species. BAC clones can be found which encompassed breakpoints (splitting backs) or which flanked breakpoints. Comparative analyses of marker order in various primate species showed that centromere were often found in different genomic contexts without any change in marker order (i.e. no inversion). These repositioned centromeres are known as Evolutionary New Centromeres (ENC) and are a frequent and common mechanism of chromosome evolution not identified by sequencing. Recent progress in clinical neocentromeres and evolutionary neocentromeres shows that they are epigenetically determined. A neocentromere is initially void of the complex repeat structure around the centromere whereas old, deactivated centromeres gradually loose their repeat structure. We know that species can also be polymorphic for neocentromeres. We will discuss polymorphic centromere location in the orangutan and in two species of Cercopithecini monkeys. We will also show how neocentromeres can explain changes in FN, which were previously reported as due to inversions. Finally we will discuss how centromere repeat DNA can be vital to promoting adaptation.

Epigenetic mechanisms of speciation

Vladimir N. Stegnyy

Tomsk State University, Tomsk, Russia

Epigenetic mechanisms of speciation are considered: heterochromatic modifications and changes in the spatial organization of chromosomes in germinative cell systems. The value of a lamina, topoisomerase II, a polypurine DNA track in the attachment of chromosomes to a nuclear envelope is elucidated. It is postulated that the main event leading to the species-specific fixation of gene mutations, chromosomal mutations and heterochromatin modifications in speciation is the rearrangement of the spatial organization of chromosomes in the nucleus. The change in interchromosomal relationships associated with the reorganization of the system of chromosomal bonds with the nuclear envelope and the rearrangement of the chromocenter apparatus of the interphase nucleus is estimated as a systemic mutation directly related to speciation. Substantiates the idea of the evolutionary significance of hard inbreeding under extreme temperature conditions of the environment for the process of formation of adaptive genetic variation and speciation. The major manifestations of “paradoxical” effect hard inbreeding are as follows: 1) structural and functional reorganization of the genome generative (reproductive) system; 2) activation of mobile genetic elements. This can lead to the generation of different types of mutations (gene, chromosomal, genomic, systemic) and modifications of heterochromatin. The study of genetic aspects of speciation and adaptation, revealed several genetic parameters that distinguish species evolutionarily labile (with a low level of specialization), which are "generators" of speciation and species evolutionarily conserved (specialized), occupying the terminal units phylogenetic lines. In the evolutionary development of the taxon in the horizontal direction (cladogenesis or adaptive radiation) features a small genomes specialized for each step of speciation are gradually replaced in the process of progressive specialization in the alternative signs (evolutionarily conserved), reaches its maximum expression in the terminal types.

Integrative Cytogenetics of the Sea Lamprey Chromosome Elimination

Vladimir Timoshevskiy, Nataliya Timoshevskaya, and Jeramiah Smith

University of Kentucky, Biology Department, Lexington, KY, US, 40506

vti224@uky.edu

The sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is one of few vertebrate species that reproducibly eliminated larger fractions of its genome during normal embryonic development. These elimination events are initiated at the 6th embryonic cleavage and result in the loss of ~20% of the lamprey's genome from essentially all somatic cell lineages (these same sequences are retained in the germline). Available evidence suggests that DNA elimination acts as a permanent silencing mechanisms preventing the somatic expression of a specific subset of "germline" genes. This germline-specific DNA is lost in the form of large fragments, including entire chromosomes. However, reconstruction of eliminated regions has proven challenging due to the complexity of the lamprey karyotype (84 small pairs of somatic chromosomes and ~100 pairs of germline chromosomes) and the exceedingly high repeat content of the genome and even higher repeat content of eliminated fragments.

We applied integrative approach aimed at further characterization of the large-scale structure of eliminated segments, including:

- 1) developing DNA-probes that selectively labels eliminated chromosomes by laser capture microdissection;
- 2) *in silico* identification of germline-enriched repeats;
- 3) determining the chromosomal location of specific repetitive sequences in germline metaphases using multicolor FISH;
- 4) verification of specificity to eliminated chromosomes by 3D DNA-DNA-hybridization on lagging anaphases in whole embryos.

Our integrative approach allowed us identify multiple repetitive elements that are found exclusively on the eliminated (germline-specific) chromosomes and resulted in the identification of 12 chromosomes that appear to be programmatically eliminated during early embryogenesis. These chromosomes differ in size, morphology, and the localization of five germline-specific repetitive elements, which in its turn was used for developing cytogenetic map of eliminated karyotype. The fidelity of germline-specific repetitive elements and their distinctive patterning in elimination anaphases is taken as evidence that these sequences might contribute to the specific targeting of chromosomes for elimination and in molecular interactions that mediate their decelerated poleward movement in chromosome elimination anaphases.

Evolution of recombination rate in geckos (Gekkota, Squamata, Reptilia)

Tishakova K.V.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Meiotic recombination generates genetic and phenotypic diversity of individuals in the population, and provides correct segregation of chromosomes during the first meiotic division. There are different hypotheses, which consider recombination rate as an adaptive characteristic, and associate it with phylogeny, ecology and population structure. Many of these hypotheses are supported only by mathematical models due to paucity of empirical data. Most direct cytological data on recombination rates were obtained for mammals. However, mammals usually have high karyotypic variation between species, which contributes to the variability in the recombination rate. Squamate reptiles and geckos (Gekkota) in particular are better models for studying the evolution of recombination, since they have evolutionary conservative karyotypes.

In the present work, we studied recombination rates in six species of two large families of geckos: Diplodactylidae и Gekkonidae. We examined synaptonemal complexes (SC) and recombination nodules in the pachytene spermatocytes using immunolocalization of SYCP3 (main protein of the lateral elements of the SC), MLH1 (mismatch repair protein marking the late recombination nodules), and centromere proteins. The comparative analysis showed that *Rhacodactylus auriculatus* from the family Diplodactylidae has the greatest number of crossover events per cell ($29,6 \pm 2,9$). This species diverged early than the other species. In the karyotypes of *Paroedura bastardi*, *Paroedrura picta*, *Hemidactylus triedrurus*, *Gekko vittatus* we identified one homeologous chromosome and compared its recombination patterns in each species. In *P. bastardi*, *H. triedrurus* and *G. vittatus* the homeologs had the same SC length and number of the MLH1 foci. The distribution of the recombination nodules along the homeologs was similar for all species.

Thus, species of family Gekkonidae demonstrate conservative recombination landscape. It is likely to be maintained by a stabilizing selection. The difference of recombination patterns between *R. auriculatus* and other species can be due to different morphology of chromosomes and different ecology of the species.

The study was supported by the RFBR (18-34- 00182, 16-04- 00087) and the Federal Agency for Scientific Organizations via the Institute of Cytology and Genetics (Grant # 0324-2018-0019)

Polyploidy and genome evolution of ray-finned fishes

Vladimir A. Trifonov^{1,2}, Daria A. Andreyushkova¹, Svetlana A. Romanenko^{1,2},
Maria A. Pobedintseva^{1,2}, Dmitry Yu. Prokopov^{1,2}, Larisa S. Biltueva¹,
Violetta R. Beklemisheva¹, Anna S. Druzhkova¹, Alexey I. Makunin¹,
Alexander S. Graphodatsky^{1,2}

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Russia*

E-mail: vlad@mcb.nsc.ru

After two events of whole genome duplication (WGD), occurred in the common vertebrate ancestor, most vertebrate groups retained the ploidy level and did not reshape their genome in such a drastic way. However, two vertebrate lineages – ray-finned fishes and amphibians - represent interesting exceptions, where recurrent polyploidization is not rare. We applied low-pass sequencing of chromosome specific libraries to identify homologous and paralogous regions in paleopolyploid genomes of acipenserids and discovered a 360 mln years conservation of those blocks with chromosomes of the spotted gar. We postulate that the methods of chromosome specific library sequencing can be applied for building initial chromosome syntenic maps of paleopolyploid species. These data may be useful for distinguishing paralogous regions, which are difficult to study by modern genome sequencing techniques. After defining major WGD events in Acipenseriformes and teleosts, we superimposed WGD events onto the calibrated phylogenetic tree of ray-finned fishes and analysed the consequences of polyploidization including rediploidization, gene loss and retention, influence on sex determination etc. We discuss potential polyploidization effects on diversity and adaptation of fishes paying special attention to meiosis features.

Financial support: RSF grant No. 18-44-04007

SELF-ORGANIZATION OF DROSOPHILA CHROMATIN INTO TOPOLOGICALLY-ASSOCIATING DOMAINS

Sergey V. Ulianov^{1,2}, Ekaterina E. Khrameeva^{3,4}, Vlada S. Zakharova^{1,2}, Aleksandra A. Galitsyna^{1,4}, Kirill E. Polovnikov^{4,5}, Mariya D. Logacheva², Elena A. Mikhaleva⁶, Egor S. Vassetzky⁷, Aleksey A. Gavrilov¹, Pavel Kos⁵, Alexander Chertovich⁵, Mikhail S. Gelfand^{3,4}, Yuri Y. Shevelev⁶, Sergey V. Razin^{1,2}

¹ Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

² M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

³ Institute for Information Transmission Problems (the Kharkevich Institute) of the Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia

⁴ Skolkovo Institute of Science and Technology, 143026 Skolkovo, Russia

⁵ Physics Department, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁶ Department of Molecular Genetics of Cell, Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

⁷ Institut Gustave Roussy, CNRS, Villejuif 94805, France

Drosophila chromosomes are partitioned in large self-interacting domains (Topologically Associating Domains, TADs) separated by boundary regions or inter-TADs. How this spatial organization of chromatin is established and supported is not clear. We have performed Hi-C analysis on four *Drosophila* cell lines of different origins and annotated TADs using the Armatus software. Contrary to the previous studies, we did not observe a strong enrichment of TAD borders/inter-TADs with CTCF deposition sites, and instead another insulator protein Su(Hw) was preferentially present within the TADs. However, *Drosophila* inter-TADs harbor active chromatin and constitutively transcribed (house-keeping) genes. The tissue-specific genes reside preferentially in TADs and their transcription appears to correlate with a partial de-compaction of the TADs. Pairwise comparison of the cell lines demonstrated that, in some cases, activation of transcription within a TAD resulted in splitting of this TAD (i.e. in generation of a new boundary/inter-TAD). We proposed that integral features of active chromatin determine the TAD boundaries. Of particular importance may be the high level of histone acetylation that directly influences the ability of nucleosomes to interact with each other. Using computer simulations we demonstrated that polymers composed of long blocks of non-acetylated (capable to interact with each other) nucleosomes interspersed with shorter blocks of acetylated (incapable to interact with each other) nucleosomes adopts spatial configuration closely resembling organization of chromosomes in TADs. The important role of histone acetylation in determining TAD profiles was further confirmed by experiments with chemical inhibition of histone acetylases and histone deacetylases in S2 cells.

An important question is whether TADs are present in individual genome or represent a population average. To address this question we have developed a methodology allowing construction of Hi-C maps for individual cells. Using this modified Hi-C protocol we have constructed HiC maps for 20 drosophila cells (line DmBG3c2). In the best cell we have captured ~10% of the theoretically available contacts. To analyze these sparse contact matrices, we have developed program tools allowing us to take into account the noise by comparing maps from individual cells with artificially generated random matrices. The results of our analysis demonstrate that contact chromatin domains do exist in individual chromosomes and are organized hierarchically. Importantly, using a number of statistical approaches we show that the observed profile of contact chromatin domains cannot be explained by random fluctuations. We also show that these domains do not coincide in randomly selected pairs of individual cells but tend to occupy some preferential positions in the genome as revealed by the comparison of several cells. Finally, we show that genomic regions that frequently harbor the contact domain borders possess specific epigenetic signatures.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Russian Science Foundation grant #14-24-00022.

Cytogenetic characterization of two *Graphiurus* species (Rodentia) from South Africa through C banding, FISH with 18-28S rDNA and telomeric (TTAGG)_n probes

Sara Vlah¹, Vanessa Milioto¹, Mazzoleni Sofia^{1,2}, Michail Rovatsos², Dumas Francesca*¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Palermo (STEBICEF), Italy

²Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University, Prague, 12844, Czech Republic

*francesca.dumas@unipa.it

Keywords: South African dormice, karyotype, repetitive DNAs, chromosomal evolution

We analyzed two *Graphiurus* species using conventional and molecular cytogenetic approaches in order to characterize their genomes and gather useful evolutionary information for these poorly studied taxa. In particular, we analyzed the genome organization of *Graphiurus platyops* and *Graphiurus ocellaris* through G banding and DAPI inverted chromosome in order to reconstruct the karyotype. We also analyzed the organization of repetitive DNAs through C banding, and Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) mapping of rDNA 18-28S and telomeric (TTAGG)_n probes. The karyotypes both have a diploid number of 2n=46; in *G. platyops*, the karyotype is made up of 12 metacentric/submetacentric pairs, 5 subtelocentric and 5 acrocentric autosomal chromosomes, while in *G. ocellaris* there are no acrocentric chromosomes but 10 subtelocentric pairs. In both species, the X chromosome is medium-sized and metacentric, and the Y is the smallest element of the set.

Constitutive heterochromatin detected by C banding is scarce and restricted only at the centromeric region in the two species, and it is more evident on the 5 acrocentric pairs in *G. platyops*; these results mean that centromeres are characterized by low constitutional heterochromatin, in agreement with other previous studies of close phylogenetic taxa.

The rDNA probe mapping revealed the nuclear organizer regions (NORs) located at the terminal ends of the p arms of the subtelocentric chromosome pairs 16, 17 on both specimens, while other loci were taxa-specific, in particular at terminal ends of the p arm of six subtelomeric chromosome pairs 15, 19, 20, 22 in *G. ocellaris*, and at terminal ends of the p arms of subtelomeric chromosome pair 8, and with a lesser intensity at the terminal ends of chromosome 1 q arms in *G. platyops*. Even if some NORs are located on homologous chromosomes, the presence of new localizations of rDNA sequences on different chromosomes led us to support the idea that different mechanisms are responsible for their dispersion.

The telomeric probe mapping in the genome of the species analyzed showed, as expected, signals at the terminal edge of chromosomes and ITS (Interstitial Telomeric Sequences) at centromeric positions of almost all bi-armed chromosomes. This result, together with faint centromeric C bands, led us to hypothesize that fusions are the primary mechanism responsible for chromosomal evolution in these species.

This study provides the karyotype of the two species for the first time and highlights the remarkable genome evolutionary dynamism presented by these species.

Su(var)* GENES AND THE IDENTIFICATION OF NEW CHROMATIN REGULATORS IN *DROSOPHILA

Walther, M., Sanger, P., Puri, D.¹, Gebhardt, K., Beuch, S.¹, Kessler, J., Jenuwein, T.¹, Reuter, G.

Developmental Genetics, Institute of Biology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, D-06120 Halle, Germany

¹Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Stubeweg 51, D-79108 Freiburg, Germany,

reuter@genetik.uni-halle.de

Heterochromatin is important for genome integrity, maintenance of cell identity and stability of gene expression programs. During the last 15 years several epigenetic factors controlling heterochromatin formation and maintenance have been described. In particular, screens for *Su(var)* mutations of PEV (position effect variegation) in *Drosophila* have proven instrumental in identifying heterochromatin components conserved in higher eukaryotes. However until now only about 25% of the about 100 *Su(var)* loci have been molecularly defined.

For systematic genetic and molecular dissection of unknown *Su(var)* genes we isolated more than 300 new EMS induced *Su(var)* mutations in isogenic backgrounds allowing a genome-wide sequencing approach for rapid mapping of novel *Su(var)* genes.

Complementation analysis allowed identification of new mutant alleles for known SU(VAR)s including the H3K9 methyltransferase SU(VAR)3-9, the H3K9me2/3 binding protein SU(VAR)2-5 (HP1), the H3K4 demethylase SU(VAR)3-3 (LSD1) and the SU(VAR)3-7 zinc finger protein. Sequence analysis identified interesting new mutations including the first point mutation within the SU(VAR)3-9 chromo domain.

Combining genetic complementation and mapping analysis with genome-wide sequencing, caps marker mapping and candidate gene analysis of about 30 novel *Su(var)* genes were identified. The genes encode factors of molecular and epigenetic processes associated with cell signaling, the control of heterochromatin specific H3K9me2 indexing, the control of genome wide histone deacetylation, band and interband specific proteins and functions putatively involved in RNA dependent processes.

Most of the *Su(var)* mutations were selected in a sensitized genetic background allowing identification of mutations modifying different alternative silencing processes. Analysis of their effect on a series of PEV rearrangements revealed significant differences in epigenetic control of alternative silencing processes within the *Drosophila* genome.

Identification of novel *Su(var)* genes will not only contribute to further understanding of the molecular basis of heterochromatin and gene silencing in *Drosophila* because many of the newly characterized pathways might also operate in higher eukaryotes.

Karyotypic instability in macrostomid evolution

Kira S. Zadesenets (1), Lukas Schärer (2) & Nikolay B. Rubtsov (1,3)

(1) The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Lavrentiev ave., 10, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

(2) Evolutionary Biology, Zoological Institute, University of Basel, Basel, CH-4051, Switzerland

(3) Novosibirsk State University, Pirogova str., 2, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

Specimens of the species belong to *Macrostomum* genus were collected from natural populations and maintained under standard laboratory conditions as outbred and inbred cultures. Karyotyping of the single worms was performed with special technique in order to accurately description of the karyotypes of individual specimens. For detailed comparative analysis of chromosomes, microdissected DNA libraries were generated and chromosome painting was performed. For detection of intrachromosomal rearrangements, FISH of labeled unique DNA fragments with metaphase chromosomes was carried out.

The whole genome duplication followed with chromosome rearrangements was revealed in some species from *Macrostomum* genus. They appeared to be hidden tetra- or even hexaploids. In species showed whole genome duplication, high level of karyotypic instability was observed in the worms from natural populations and especially from laboratory cultures. Karyotypic abnormalities included variable chromosome numbers and structural chromosome rearrangements. For analysis of karyotypic diversity and chromosome rearrangements chromosome painting with microdissected DNA probes derived from metaphase chromosomes and their regions was performed. For more detailed study of worm chromosomes, microdissected DNA libraries we sequenced and analyzed. Draft of *Macrostomum lignano* genome was applied as referent genome.

Results obtained in this study allowed us suggesting that genomes of some macrostomid species recently went through the whole genome duplication and nowadays they are on the evolutionary stage of genome and karyotype destabilization. The study of the mechanisms underlying genome evolution in macrostomids will allow clarifying the process taking place after the whole genome duplication on the first stage of global genome reconstruction.

Supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR research project No. 16-34-60027 mol_a_dk).

DNA REPAIR-DEFICIENT CELLS: FROM DISEASE MODELS TO GENOTOXICITY TESTING TOOLS

Dmitry O. Zharkov

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

DNA repair is a group of several intertwined pathways responsible for restoring genome integrity after DNA damage. Of the major DNA repair pathways, base excision repair deals mostly with non-bulky base lesions, nucleotide excision repair, with bulky adducts, mismatch repair corrects DNA polymerase errors, while recombination repair and non-homologous end joining fix double-strand breaks. Mutations in human DNA repair genes are associated with highly penetrant cancers and, less often, with neural manifestations. Knockout animal models deficient in various DNA repair activities, usually show phenotypes ranging from elevated cancer rate to embryonic lethality. Historically, cells derived from xeroderma pigmentosum patients were the first repair-deficient mammalian cells investigated, and were crucial to prove that xeroderma pigmentosum is indeed caused by a loss of nucleotide excision repair. Since then, many DNA repair-deficient cell lines were established from human patients and knockout animals, and, since recently, made by genomic engineering methods. Here, I review the instrumental role of DNA repair-deficient cells in today's studies of cancer and related diseases, the basic understanding of genome dynamics, and biotechnological applications.

The work is supported by Russian State funded budget project (VI.62.1.5, 0309-2016-0003).

A Portrait of Functional Organization of the *Drosophila* Genome - Polytene Chromosomes

Igor F. Zhimulev^{1,3}, Tatyana Yu Zykova¹, Victor G. Levitsky², O. Antonenko,
Elena S. Belyaeva¹

1 Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

2 Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

3 Laboratory of structural, functional and comparative genomics of the Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Generally, densely packed chromatin in polytene chromosomes forms black bands, moderately condensed regions form grey loose bands, whereas decondensed regions of the genome appear as interbands. Recent progress in the annotation of the *Drosophila* genome and epigenome has made it possible to compare the banding pattern and the structural organization of genes, as well as their activity. This was greatly aided by our ability to establish the borders of bands and interbands on the physical map, which allowed to perform comprehensive side-by-side comparisons of cytology, genetic and epigenetic maps and to uncover the association between the morphological structures and the functional domains of the genome.

These studies largely conclude that interbands contain 5'-ends of housekeeping genes that are active across all cell types. Interbands are enriched with proteins involved in transcription and nucleosome remodeling, as well as with active histone modifications. Notably, most of the replication origins map to interband regions. As for grey loose bands adjacent to interbands, they typically host the bodies of housekeeping genes. The bipartite structure composed of an interband and an adjacent grey band functions as a standalone genetic unit. Finally, black bands harbor tissue-specific genes with narrow temporal and tissue expression profiles. Thus, the uniform and permanent activity of interbands combined with the inactivity of genes in bands forms the basis of the universal banding pattern observed in various *Drosophila* tissues.

Financial support: Russian Science Foundation grant #14-14-00934

Interband architecture in *Drosophila* polytene chromosomes

T.Yu. Zykova¹, V. G. Levitsky², Igor F. Zhimulev^{1,3}

1 Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

2 Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

3 Laboratory of structural, functional and comparative genomics of the Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Recently we created the model of four chromatin states based on the modENCODE data. We applied the data on proteins characteristic of genetically active material (chromatin) localization to develop a chromatin classification based on compaction degree varying from minimum (aquamarine chromatin, corresponds to the interbands) to maximum (ruby chromatin, corresponds to black solid bands). According to calculations there approximately five thousand interbands in *D. melanogaster* chromosomes but only 33 were accurately localized on the molecular and cytological maps of the *Drosophila* genome.

As it was shown, interbands possess diverse genetic structure. Most of the interbands studied comprised one gene with only one alternative transcriptional start, other interbands contained one gene with several alternative promoters, two or more unidirectional genes, and genes located “head-to-head”. Also some of interbands we observed had complicated organization with three or more unidirectional and bi-directional oriented genes localized in them.

Given that all interbands correspond to aquamarine chromatin and possess common properties such as localization of 5'-UTR genes with ubiquitous activity, ORC and insulin proteins (CHRIZ, BEAF and others), P-insertions, DHSs, Broad promoters, RNA pol II, and various proteins characteristic of open chromatin, the analysis of interband architecture is of particular interest. It was shown that all these characteristics localize in the promoter region of genes located in interbands and this region is most likely critical for forming open chromatin fragments, which we observe as interbands in polytene chromosomes.

Financial support: RFBR grant # 17-00-00284

Белок CG17337 необходим для прохождения митоза и участвует в контроле клеточной смерти у *Drosophila melanogaster*

The CG17337 protein is involved in mitosis progression and cell death control in *Drosophila melanogaster*

Андреева Е.Н.^{1*}, Огиенко А.А.¹, Кожевникова Е.Н.^{1,2}, Иванкин А.В.¹, Яринич Л.А.¹, Павлова Г.А.¹, Попова Ю.В.^{1,2}, Алексеева А.Л.¹, Дубатолова Т.Д.¹, Копыл С.А.¹, Пиндюрин А.В.¹

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: andreeva@mcb.nsc.ru

В настоящее время пристальное внимание уделяется изучению белков, играющих роль в метаболизме белков и пептидов. Такие белки могут являться опухолевыми супрессорами. В частности, изменение активности гена *CNDP2*, кодирующего у человека белок семейства металлопептидаз M20, приводит к стимулированию пролиферации клеток и является биомаркером при раковых заболеваниях. В данной работе мы пытались прояснить функцию белка дрозофилы CG17337, являющегося ортологом белка человека *CNDP2*. Для этого мы получили специфические поликлональные антитела к белку CG17337, при помощи которых определили нативную локализацию белка в культивируемых клетках и органах дрозофилы. Ранее было показано, что ген *CG17337* экспрессируется повсеместно, однако его белковый продукт был найден только в гемолимфе дрозофилы как внеклеточный белок. Мы обнаружили, что белок CG17337 детектируется как в цитоплазме, так и в ядрах клеток дрозофилы. С помощью подхода Fly-FUCCI в сочетании с конфокальной микроскопией было показано, что обогащение клеток нервных ганглиев белком CG17337 происходит на стадии G2 митоза. Мы также получили линию мух с полной делецией гена *CG17337* методом направленного мутагенеза при помощи технологии CRISPR/Cas9, а также создали трансгенную линию мух, несущую геномную копию гена *CG17337* для экспериментов по спасению фенотипа. Мы проанализировали последствия инактивации гена *CG17337* на уровне клеток и целого организма. Мы показали, что ген *CG17337* является доминантным и гаплонедостаточным. Отсутствие белка CG17337 у мух не снижает их жизнеспособности и, напротив, увеличивает продолжительность жизни у самок. У личинок отсутствие белка CG17337 приводит к 2-х кратному увеличению митотического индекса в нервных ганглиях, сходные данные были получены и для культивируемых клеток S2. При этом мы не наблюдали ни повышения уровня гиперплазии, ни образования опухолей. Наши данные указывают на то, что снижение количества белка CG17337 как в культивируемых клетках

S2, так и на организменном уровне ведет к нарушению митотического клеточного цикла, в то время как нарушений эндоцикла не было отмечено. Неожиданным результатом оказалось практически полное отсутствие дегенерирующих яйцевых камер в оогенезе на стадиях 7-9 у мутантных самок в процессе старения. Клеточная гибель на этих стадиях оогенеза возникает в результате нарушения развития, действия различных негативных факторов и особенно усиливается при голодании. В большинстве тканей дрозофилы клеточная гибель регулируется генами *rpr*, *hid*, *grim* и *skl*, однако эти гены не задействованы в индукции клеточной гибели в оогенезе на стадиях 7-9. Предполагается, что на этом этапе оогенеза существуют другие пути запуска клеточной гибели. Таким образом, наши данные свидетельствуют в пользу того, что белок CG17337 дрозофилы является компонентом хроматина и цитоплазмы и необходим для правильного прохождения митоза, а также участвует в контроле клеточной смерти.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ #16-04-01598.

Получение направленных делеций в регуляторной зоне гена *Notch* с использованием *CRISPR/Cas*-опосредованного метода редактирования геномов

Андреенков О.В., Андреенкова Н.Г., Волкова Е.И., Демаков С.А.

Институт Молекулярной и Клеточной Биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ген *Notch* является ключевым регулятором сигнального пути, задействованного в дифференцировке клеток нейроэктодермы *Drosophila*. При этом механизмы регуляции экспрессии гена *Notch* на сегодняшний день остаются неизученными. Мы использовали *CRISPR/Cas*-опосредованный метод направленного редактирования геномов для получения серии делеций в регуляторной зоне гена *Notch*. Для этого мы создали трансгенную линию мух, в которой 4-kb участок промоторной зоны гена был заменен на *attP*-сайт. Это позволяет вводить любые направленные мутации в промоторную зону гена и использовать полученные трансгенные линии мух для исследования регуляции экспрессии гена. Используя имеющиеся данные о возможном расположении сайтов связывания различных белков хроматина, о нуклеосомной организации района, а также о влиянии известной делеции *Fa^{swb}* на рисунок политенных хромосом слюнных желез, мы создали трансгенные линии мух, несущие делеции возможных функционально важных элементов регуляторной зоны гена *Notch*. При создании этих линий мы использовали вспомогательные элементы векторной конструкции, которые в последующем удаляли из генома трансгенных мух с помощью *lox/Cre*-опосредованной рекомбинации. Мы обнаружили синергетическое действие некоторых из полученных делеций с введенными в первый интрон гена *Notch* вспомогательными элементами, что говорит о существовании взаимодействий между промоторной зоной гена и первым интроном. Также мы обнаружили исчезновение связывания инсуляторных белков CTCF и CHRIZ, связанное с некоторыми из делеций в регуляторной зоне гена. Были изучены межаллельные взаимодействия делеций регуляторной зоны и описаны фенотипические проявления всех полученных линий, а также показано влияние полученных делеций на цитологическую структуру района 3C6-7, где локализован ген *Notch*.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-14-00934

Выявление паралогичных районов в геноме стерляди (*Acipenser ruthenus*)

Андреюшкова Д.А.¹, Макунин А.И.¹, Романенко С.А.^{1,2}, Билтуева Л.С.¹, Беклемишева В.Р.¹,
Дружкова А.С.^{1,2}, Гусельников С.В.^{1,2}, Сердюкова Н.А.¹, Графодатский А.С.^{1,2},
Трифонов В.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

² Новосибирский государственный университет

Современные представители семейства Осетровые (*Acipenseridae*) имеют большое число хромосом ($2n=110-380$), что является результатом одного или нескольких раундов полногеномной дупликации (whole genome duplication, WGD). Для понимания эволюционных процессов, связанных с полиплоидизацией, важной задачей является выявление и исследование паралогичных хромосом и хромосомных районов, образовавшихся в результате удвоения генома.

Стерлядь (*Acipenser ruthenus*) является палеотетраплоидом и имеет 120 хромосом в диплоидном наборе. Данный представитель семейства Осетровые был использован ранее для получения хромосомспецифичных микродиссекционных библиотек [1].

В рамках данной работы с помощью молекулярно-цитогенетических (флуоресцентная *in situ* гибридизация) и биоинформатических (обработка анализ данных, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования) методов анализа хромосомспецифичных библиотек стерляди были обнаружены паралогичные районы некоторых хромосом данного вида и выявлены синтенные районы между геномами стерляди и пятнистой панцирной щуки (*Lepisosteus Oculatus*) [2], а также хромосомные перестройки, имевшие место после WGD осетровых.

Работа поддержана грантами РФФИ №14-14-00275 и РФФИ №15-29-02384.

Литература:

1. S.A. Romanenko *et al.* (2015) Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting, *Mol Cytogenet*, **8**: 90.
2. I. Braash *et al.* (2016) The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons, *Nature genetics*, **48**: 427-437.

Эволюция X хромосомы малярийных комаров группы *Maculipennis*

Артемов Г. Н.¹, Коханенко А. А.¹, Величевская А. И.¹, Бондаренко С. М.¹, Стегний В. Н.¹,
Шарахова М. В.^{1,2}, Шарахов И. В.^{1,2}

¹ Томский государственный университет, Томск, Россия

² Политехнический институт и Государственный университет Вирджинии, Блэксбург, США

Малярийные комары *Anopheles* группы *Maculipennis* широко распространены в Евразии и Северной Америке. Отдельные представители данной таксономической группы, такие как *An. sacharovi*, *An. labranchiae* и *An. atroparvus*, являются переносчиками возбудителя малярии, которая является причиной гибели около полумиллиона человек в год. Эволюция малярийных комаров связана с изменением их способности переносить малярийный плазмодий, поэтому важно выявить закономерности такой трансформации, а также определить ее генетические основы. Скорость эволюции X хромосомы у малярийных комаров значительно выше, чем у аутосом (Neafsey et al., 2015). Целью настоящей работы было проследить изменения порядка генов в X хромосоме в ходе эволюции малярийных комаров группы *Maculipennis*.

Ранее на основе данных анализа хромосомных перестроек в аутосомах (Стегний, 1991) и полногеномного анализа (Sharakhov et al., unpub) и было построено филогенетическое древо для 10 видов малярийных комаров группы *Maculipennis*. Нами были выбраны для анализа 7 видов комаров: *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, *An. messeae*, *An. sacharovi*, *An. beklemishevi* из Палеарктической фауны и *An. quadrimaculatus* из Неарктической фауны. *An. atroparvus* - единственный вид из группы *Maculipennis* для которого существует физическая карта генома. Поскольку для остальных видов группы физических карт геномов не разработано мы локализовали от 13 до 24 генов, расположенных на расстоянии 1 млн п.н. друг от друга. К каждому маркеру были синтезированы флуоресцентно-меченные ДНК-пробы, которые гибридизовали с хромосомами близких видов с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Для того чтобы исключить из анализа перемещения генов, не связанные с хромосомными перестройками, мы выделили пять (A, B, C, D, E) синтенных блоков, включающих 13-18 генов, которые были обнаружены у всех проанализированных видов комаров. Анализ в GRIMM/MGR показал, что у видов *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* и *An. messeae* все синтенные блоки оказались в одинаковом порядке и ориентации. Сравнение порядка генов, не входящих в состав выделенных синтенных блоков, подтвердило отсутствие крупных перестроек у *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, но не у *An. messeae* у которого три маркера сильно меняли свое положение. Мы

сравнили *An. atroparvus* и *An. messeae*, введя дополнительные три маркера и перегруппировав синтенные блоки (дополнительный блок F и отдельный маркер G). Оказалось, что всего две больших вложенных инверсии (G-B-C-D-F и B-C-D) отличают *An. messeae* от *An. atroparvus*.

При сравнении *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis* были выявлены перестройки внутри синтенного блока E у *An. atroparvus*, *An. labranchiae* и *An. maculipennis*. В этом сравнении в качестве исходного порядка был выбран вариант *An. atroparvus*, так как порядок генов блока E не отличался от *An. messeae*. Оказалось, что от исходного типа *An. maculipennis* отличается одной инверсией, а *An. labranchiae* тремя.

X-хромосома филогенетически наиболее удаленных видов претерпела в основном небольшое число крупных перестроек: одна инверсия у *An. beklemishevi* (C-D-E) и одна инверсия у *An. quadrimaculatus* (A-B-C-D) по сравнению с исходным типом, в качестве которого опять выступает *An. atroparvus*. Лишь *An. sacharovi*, который филогенетически ближе к *An. atroparvus*, чем последние два вида, различают три перекрывающиеся инверсии. Возможно, это связано с более высокими темпами эволюции этого вида комара.

Проведенный нами анализ продемонстрировал фактически отсутствие промежуточных типов порядка генов в X хромосомах изучаемых видов. Наиболее близким к предковому оказался тип X хромосомы характерный для видов *An. atroparvus*, *An. labranchiae*, *An. maculipennis*, *An. messeae* и *An. quadrimaculatus*. Тогда как *An. sacharovi* и *An. beklemishevi* образуют отдельные независимые ветви, в каждой из которых независимо возник специфический набор перестроек. В целом полученные результаты согласуются с филогенетической схемой (Стегний, 1991; Sharakhov et al., unpub).

Сравнение порядка генов у *An. atroparvus* (подрод *Anopheles*) и внешних групп - *An. gambiae* (подрод *Cellia*) и *An. albimanus* (подрод *Nissorhynchus*) в целом продемонстрировало разрушения синтенных блоков в ходе эволюции. Следует, однако, отметить что наиболее устойчивыми синтенными блоками в группировке *Anopheles-Cellia* являются B, который сохраняется полностью и E, разделенный на две части у *An. gambiae*. В группе *Anopheles-Nissorhynchus* сохраняются группы сцепления из C, D и E. Определение причин сохранения/разрушения тех или иных групп сцепления генов требует дальнейшего изучения генетического содержания синтенных блоков.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 15-14-20011.

Влияние соматического окружения на миграцию предшественников зародышевых клеток в эмбриогенезе *Drosophila melanogaster*

Ахметова К.А.^{1,2}, Хрущева А.С.^{3,1}, Дорогова Н.В.¹, Баричева Э.М.¹, Фёдорова С.А.^{1,3}.

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», Новосибирск, 630090, e-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

² Университет Алабамы в Бирмингеме, Бирмингем, 35294, США

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090

Миграция клеток – консервативный процесс, требующий сложной пространственно-временной регуляции. В миграции клеток задействованы множественные факторы, участвующие в ее активации, преобразовании сигналов, перестройке цитоскелета и мембран и межклеточных взаимодействиях. Все это требует выскоординированного действия множества генов как внутри самих мигрирующих клеток, так и в окружающих их тканях.

Миграция предшественников зародышевых клеток (ПЗК) в эмбриогенезе является ключевым начальным этапом формирования гонад дрозофилы. Во время гастрюляции ПЗК в виде консолидированной группы клеток пассивно переносятся с заднего полюса эмбриона в карман средней кишки за счет инвагинации клеточного слоя. Далее ПЗК индивидуализируются, приобретают амебоидную форму и активно мигрируют сквозь стенку первичной кишки. Затем ПЗК разделяются на 2 группы и объединяются с клетками мезодермального происхождения, формируя парные зачаточные гонады.

Проведенный нами анализ миграции ПЗК у мутантов с преждевременной миграцией показал, что сигнал инициации миграции поступает в ПЗК из окружающих соматических тканей и зависит от зиготической экспрессии транскрипционного фактора GAF. Анализ данных по паттерну экспрессии зиготических генов, регулируемых GAF, выявил 17 генов-кандидатов, участвующих в инициации регуляции миграции ПЗК. Среди них есть гены, кодирующие как сигнальные молекулы и рецепторы (*Rolling pebbles*, *Ptp4E*), так внеклеточный матрикс (например, *Laminin A*, *Mew*) и другие.

Таким образом, соматическое окружение ПЗК может влиять на них как регуляторно, активируя миграцию при помощи сигнальных молекул, так и структурно, формируя субстрат для перемещения.

Работа поддержана грантами РФФИ 18-34-00321 мол_а и гос. заданием 0324-2018-0019.

The impact of the somatic tissue environment on primordial germline cells migration during *Drosophila* embryogenesis

Akhmetova K.A., Khrushcheva A.S., Dorogova N.V., Baricheva E.M., Fedorova S.A.

Особенности гигантских хромосом *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae) из озера Заводское у Климова (район, затронутый чернобыльским следом) Брянской области

С.И. Белянина

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия, microtus43@mail.ru

The features of giant chromosomes of *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae) from the lake Zavodskoe Klimovsk district (region with Chernobyl's pollution) Bryansk oblast

S.I. Belyanina

После чернобыльской аварии необходим мониторинг состояния генофондов популяций организмов, обитающих на затронутых радиоактивным выбросом территориях. Среди гидробионтов хорошим объектом для этого являются хирономиды, личинки которых обладают гигантскими хромосомами в клетках слюнных желез, в частности широко распространенный в пресных водоёмах вид *Chironomus plumosus*. Кариофонд этого вида хорошо изучен из многих популяций как в России, так и в других странах.

Цель нашей работы – изучение особенностей хромосом *Chironomus plumosus* из озера Заводское Климовского района Брянской области в 2016 году и сравнение кариофонда этой популяции с кариофондом чернобыльской популяции *Ch. plumosus*, изученной Н.А. Петровой [1991] в течение трех лет после аварии. Климовский район Брянской области сравнительно близок от чернобыльской зоны – на расстоянии примерно более 200 километров.

Изучены кариотипы 25 личинок, собранных в декабре 2016 года в озере Заводское у Климова. В пробах бентоса этот вид необычно малочисленен (преобладал другой вид – *Chironomus balatonicus*). Материал фиксировали на месте сбора в спирт-уксусной смеси (3:1). Готовили из клеток слюнных желез личинок препараты гигантских хромосом, окрашенных ацетоорсеином. Использована цитофотокарта хромосом *Ch. plumosus* с маркировкой отделов по Ф.Л. Максимовой (1976) и примененная Н.А. Петровой (1991) при анализе хромосом *Ch. plumosus* из чернобыльской зоны.

При исследовании хромосом учитывали состояние их дисковой структуры, морфологию предтеломерных районов. Отмечали функциональное состояние таких активных в норме локусов хромосом, как кольцо Бальбиани в плече В хромосомы I, ядрышковый организатор и кольца Бальбиани в хромосоме IV; регистрировали появление

спонтанных пуфов, не характерных для генома этого вида, а также отмечали частоты различного рода хромосомных перестроек в кариотипах.

В целом дисковая структура хромосом четкая, но встречены кариотипы с плохо окрашенными, растянутыми и разрыхленными хромосомами, а у одной личинки наблюдался распад хромосом на хромомемы, носящий мозаичный характер. Теломерные районы хромосом только у нескольких особей с гранулярной структурой, у некоторых они с разрывами, у большинства же личинок теломеры хромосом разрыхлены в разной степени. Характерны теломерные контакты длинных хромосом между собой. В хромосоме III наблюдались дубликации центромерного участка как в гомо- так и гетерозиготном состояниях (такое же явление было отмечено Н.А. Петровой (1991) для этого вида из зоны Чернобыля).

Ядрышковый организатор и кольца Бальбиани в хромосоме IV всегда активны, при этом в районе ядрышка отмечался выброс гетерохроматиновых частиц. Кольцо Бальбиани в хромосоме I всегда полностью инактивировано. В длинных хромосомах наблюдались спонтанные пуфы, как в гомозиготном, так и в гетерозиготном (эктопическая генная экспрессия в одном из гомологов хромосомы) состояниях. В хромосоме II плечо D у одной личинки было почти полностью распуфлено (вакуолизация целого плеча). В ряде клеток одной и той же слюнной железы зарегистрированы структурно малые морфологические изменения разных отделов хромосом, связанные с перестройкой одного или нескольких дисков.

В кариофонде климовской популяции у четырех особей (16%) стандартный порядок дисков (у этого вида из Чернобыля по Н.А. Петровой (1991) такой порядок не встречен), остальные – с семью типами парацентрических (в гомо- и гетерозиготном состояниях) инверсиями и одной перицентрической. Инверсии встречены как одиночно, так и в сочетаниях друг с другом. Частоты встречаемости инверсионных порядков: A22 – 16%, A12 – 44%, B22 – 12%, B12 – 8%, C12 – 12%, D12 – 8%, E12 – 12%. Среднее число гетерозиготных инверсий на особь – 0.84 (в чернобыльской популяции по Н.А. Петровой – 0.97). Один тип перицентрической инверсии отмечен нами только у одной особи – в плече F хромосомы III.

В-хромосомы в климовской популяции *Ch. plumosus* не обнаружены (в чернобыльской популяции по Н.А. Петровой отмечена повышенная частота особей с В-хромосомой в кариотипе).

В целом состояние кариофонда *Chironomus plumosus* из Климовского района Брянской области сходно с состоянием кариофонда чернобыльской популяции (за исключением отсутствия В-хромосом в кариотипах).

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АЛЬФА-ЧАСТИЦ В КРАТКОСРОЧНОМ ТЕСТЕ НА ДРОЗОФИЛЕ

Бияшева З.М., Тлеубергенова М.Ж., Зарипова Ю.А.

MODELING OF ALPHA-PARTICLES EPIGENETIC EFFECTS IN SHORT-TERM TEST ON DROSOPHILA

Biyasheva Z.M., Tleubergenova M.Zh., Zaripova Yu.A.

Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, НИИ проблем биологии и биотехнологии, Казахстан, г. Алматы

E-mail: zaremabiya@gmail.com

Известно, что более 50% ионизирующего излучения от природных источников обусловлено радоном и продуктами его распада. Активно исследуются генотоксические и канцерогенные эффекты действия радона. Особый интерес представляет оценка последствий облучения на радоноопасных территориях, к которым относится и Алматинская область ввиду наличия большого количества тектонических разломов, усиливающих эманацию радона. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлось изучение генетических эффектов воздействия сверхнормативных доз радона на модели альфа-излучения.

Облучение не столько влияет на рост клетки, сколько на ее способность к дифференцированию. Исследователи обнаружили, что у животных облучение, в первую очередь, приводит к возникновению фенкопий, соматических мутаций, морфозов и модификаций. Перечисленные повреждения возникают, скорее всего, в результате изменения состава веществ клетки. Современная генетика относит такие события к эпигенетическим, именно они, в первую очередь, затрагивают регуляторные процессы онтогенеза. Эпигенетическая изменчивость, как правило, не связана с изменчивостью первичной последовательности ДНК, но обусловлена изменением генетического материала. Эта изменчивость касается так называемых условных мутаций – это мутации регуляторных генов, ответственных за образование признаков внутривидового сходства. Одной из характерных черт условных мутаций является доминантный тип их проявления. Другими особенностями этих же мутаций является асимметрия и их нестабильность в поколениях. В настоящее время для описания эпигенетической изменчивости используются термины «морфоз» и «модификация». Условные мутации часто поддерживаются в культурах со сцепленными X-хромосомами, где мутантная X-хромосома передается по отцовской линии.

В этой тест-системе нами были исследованы эпигенетические эффекты альфа-частиц, источником которых в природе в основном является радон и его дочерние продукты распада. В эксперименте в качестве источника альфа-частиц использовали изотоп плутония-

^{238}Pu), генерирующий излучение с энергией около 5500 кэВ. В эксперименте в первом поколении (F_1) были обнаружены уродства, или морфозы, которые можно назвать «лучевыми синдромами» или мутациями, проявление которых схоже с плейотропным действием генов. Доля морфозов в эксперименте составила 1,8%, а в контроле 0,4%. В данном опыте морфозы у мушек дрозофилы первого и второго поколений выглядели как черные пятна, или меланомы на различных частях тела имаго; «генерализованные» меланомы; закрученные, изогнутые крылья; укороченное крыло; пузырь на одном крыле; отсутствие одного крыла, деформация торакса, прерывание и нарушение рисунков тергитов, нарушение распределения глазных фасеток и волосков; отсутствие пигментации второй и третьей ног.

Статистический анализ методом Хи-квадрат показал достоверность различия эксперимента и контроля при $P \leq 0,01$. На основании этого можно считать, что альфа-частицы, которые в окружающей среде в основном генерируются радоном и его изотопами, обладают мутагенным влиянием проявляющимся, в основном, в формировании морфозов или уродств.

Судьба ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в процессе миелоидной дифференцировки и роль специфической субъединицы РНФ10

Вирясова Г.М., Татарский В.В., Шейнов А.А., Георгиева С.Г., Сошникова Н.В.*

*- so2615nat@gmail.com

Федеральное государственное бюджетное учреждение институт биологии гена РАН, Москва

Нейтрофилы составляют 65-70% всей лейкоцитарной фракции крови человека. Их основная функция – участие в неспецифическом иммунном ответе на патогены. Нейтрофилы дифференцируются из мультипотентных предшественников по миелоидному пути. В процессе этой дифференцировки клетки выходят из митотического цикла, существенно меняются паттерны экспрессирующихся генов и структура хроматина, что приводит к изменениям формы ядра. На молекулярном уровне эти программы реализуются с помощью активации специфических транскрипционных факторов, которые взаимодействуют с коактиваторными комплексами, одним из которых является хроматин-ремоделирующий комплекс РВАФ. Регуляция работы хроматин-ремоделирующих комплексов осуществляется за счет смены субъединичного состава, специфичного для различных клеток организма. Комплекс РВАФ является коактиватором экспрессии многих генов, и в первую очередь генов, участвующих в поддержании пролиферативного статуса многих типов клеток, в том числе и стволовых клеток крови. Однако ничего не известно о работе комплекса в процессе миелоидной дифференцировки и его участии в активации специфических генов нейтрофилов.

В нашей работе мы изучили качественные и количественные изменения субъединичного состава РВАФ комплекса в процессе миелоидной дифференцировки, выяснили роль РВАФ комплекса при активации специфических миелоцитарных генов CD66 a/b/d. В качестве модели дифференцировки клеток по миелоидному пути мы использовали линию раковых клеток HL60, которую сравнивали с конечно дифференцированными нейтрофилами человека, выделенными из крови здоровых доноров. При обработке АТРА (all-trans-retinoic acid) клетки линии HL60 на четвертый день приобретали многие признаки, характерные для нейтрофилов. Снижалась их пролиферативная активность, при этом увеличивалась экспрессия генов – ингибиторов клеточного цикла P21 и P27, и снижалась экспрессия циклинов E1 и D1. К шестому дню дифференцировки ядра клеток сильно сегментировались, увеличивалось количество апоптотических клеток, то есть проявлялись специфические для нейтрофилов свойства. Также при дифференцировке HL60 увеличивалась экспрессия специфичных для нейтрофилов генов CD66a/b/d, кодирующих поверхностные рецепторы.

Дифференцировка по миелоидному пути сопровождается существенными структурными изменениями хроматина, поэтому мы измерили экспрессию генов субъединиц комплекса РВАF в процессе дифференцировки HL60 и сравнили их с нейтрофилами. В процессе дифференцировки экспрессия субъединиц РВАF комплекса в клетках HL60 снижалась на уровне РНК и на уровне белка, и становилась совсем низкой, но константной в нейтрофилах. При этом по результатам коиммунопреципитаций субъединиц комплекс РВАF сохранял свою целостность и функциональность при дифференцировке. В нейтрофилах субъединицы комплекса локализовались в активно транскрибируемом хроматине, который также маркировался антителами к активной элонгирующей РНК-полимеразе II.

Одна из самых интересных специфических субъединиц РВАF комплекса РHF10 представлена в виде четырех изоформ (продуктов одного гена) в клетках. Изоформы отличаются структурно и функционально и влияют на паттерны ремоделируемых генов всего РВАF комплекса. Мы выяснили, что в процессе миелоидной дифференцировки тотальное количество РHF10 снижалось, однако также происходила смена изоформ РHF10 в комплексе. РHF10-P1 изоформа, характерная для активно пролиферирующих клеток, заменялась на РHF10-Ss изоформу, детектируемую в конечно дифференцированных нейтрофилах.

Мы изучили влияние РВАF комплекса на экспрессию генов, активирующихся в процессе дифференцировки. Уровень тотального РHF10 на промоторах специфических CD66a/b/d генов, а также промоторах генов-ингибиторов клеточного цикла P21 и P27 не менялся, что позволило сделать вывод, что в активации CD66 и P21 генов участвует РВАF комплекс в предсобранном состоянии, включающий изоформу РHF10-Ss. Уровень всех остальных субъединиц РВАF комплекса (коровых и специфических), а также активной формы РНК-полимеразы II возрастал. То есть при миелоидной дифференцировке до сигнала активации комплекс РВАF, содержащий РHF10-Ss, локализуется на промоторах в предсобранном состоянии, и в процессе активации количество РВАF комплекса возрастает.

Данная работа была поддержана грантом РФФ № 18-14-00303

Оптимизация исследования хромосомной патологии у плода при развивающейся и «замершей» беременности

Гайнер Т.А. ^{1,2}, Матвеева В.Г. ¹, Каримова О.Г. ^{1,2}

¹Общество с ограниченной ответственностью «Центр персонализированной медицины», Новосибирск

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Бесплодие и невынашивание беременности представляют собой серьезные проблемы в акушерско-гинекологической практике. Частота выкидышей составляет около 25% всех беременностей. Среди форм невынашивания беременности особое место занимает неразвивающаяся («замершая») беременность - гибель эмбриона или плода с длительной задержкой его в полости матки. Причинами «замершей» беременности могут быть изменения свертываемости крови, иммунологические нарушения, эндокринные факторы и инфекционные агенты, но основную роль играют хромосомные нарушения у плода. В большинстве случаев причиной их возникновения у плода являются нарушения сегрегации хромосом во время образования и созревания половых клеток у одного из родителей либо ошибки при оплодотворении (в 80% случаев это оплодотворение яйцеклетки двумя сперматозоидами).

Проблема кариотипирования плода не решается эффективно в большинстве цитогенетических лабораторий РФ. На результативность влияет количество и качество взятого материала, условия и время транспортировки до лаборатории и уровень разрешения G-дифференциального окрашивания, позволяющего точно идентифицировать все хромосомы набора.

В цитогенетической лаборатории (ЦГЛ) ООО «Центр персонализированной медицины» показатель успешных исследований существенно превысил таковой по европейским стандартам качества для цитогенетических исследований. Он составил 96% в исследованиях ворсин хориона при «замершей» беременности (по европейским стандартам - 90%), 100% для пренатальной диагностики (ПД) (по европейским стандартам – 90% для исследований ворсин хориона и 98% для амниотической жидкости). Это обеспечено следующими факторами: материал доставляли в лабораторию из операционной максимально быстро, ворсины тщательно отбирали с помощью стереомикроскопа, использовали собственные модификации методов культивирования клеток и приготовления препаратов

(на одну из них получен патент РФ), анализ проводили в 100% случаев на G-окрашенных хромосомах.

В ЦГЛ за три года (2015-2017 гг) было выполнено 209 исследований кариотипа плода. Из них 110 исследований ворсин хориона при «замершей» беременности (106 результативных) и 99 исследований кариотипа плода при развивающейся беременности (все результативные). В исследованиях ворсин хориона при «замершей» беременности патология выявлена в 72 случаях (68% - один из самых высоких показателей по РФ). Типы патологии представлены на рис. 1.

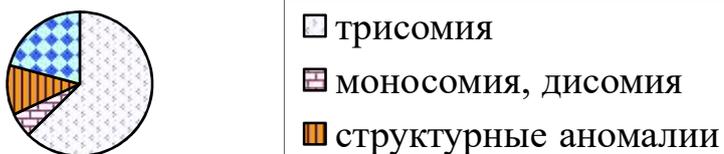


Рис. 1. Основные типы патологии, выявленной при исследовании ворсин хориона («замершая» беременность).

Наиболее часто встречающиеся аномалии – это трисомии – 45 случаев (62,5%) (рис. 2). Большинство случаев трисомии (наличие лишней хромосомы в кариотипе) и моносомии (отсутствие какой либо хромосомы) можно обнаружить исключительно у абортированных плодов. Для человека существует небольшое количество моносомий и трисомий, совместимых с рождением живого ребенка. Это трисомии половых хромосом, а из аутосом – трисомии хромосом 13, 18, 21, крайне редко – хромосом 8, 9 и 22, вызывающие тяжелые пороки развития. Реже всего выявлялась моносомия хромосомы X - 4 случая (5,5%). Не выявлено случаев моносомий по аутосомам, которые не встречаются у живых младенцев, и даже в тканях плодов они выявляются крайне редко, так как приводят к гибели эмбрионов на ранних стадиях развития. Триплоидия (присутствие в клетке трех гаплоидных наборов хромосом) встретилась в 15 случаях (21%), структурные нарушения – в 8 случаях (11%). Из 99 выполненных исследований кариотипа плода при развивающейся беременности в 19 случаях материалом для исследования были ворсины хориона, в 77 случаях – амниотическая жидкость, в 3 случаях – пуповинная кровь. Выявлено 9 случаев патологии, что составляет 9% (7 количественных аномалий и 2 структурных). Известно, что процент хромосомной патологии у плода, выявляемый при проведении ПД, уменьшается при увеличении срока беременности вследствие гибели плодов с тяжелой патологией на более ранних сроках. Исследование ворсин хориона проводили в 11-15 нед., поэтому процент выявленной патологии высок - 21% (4 случая). В амниоцентезах, выполненных в 16-20 нед., патология была обнаружена в 7% (5 случаев). Чаще других синдромов при проведении пренатальной

диагностики встречаются трисомии, среди которых на первом месте стоит синдром Дауна - 4 случая. Были также выявлены: трисомия хромосомы X, мозаичная трисомия хромосомы 7, триплоидия. Из структурных аномалий хромосом были выявлены инверсия (рис. 3) и робертсоновская транслокация.

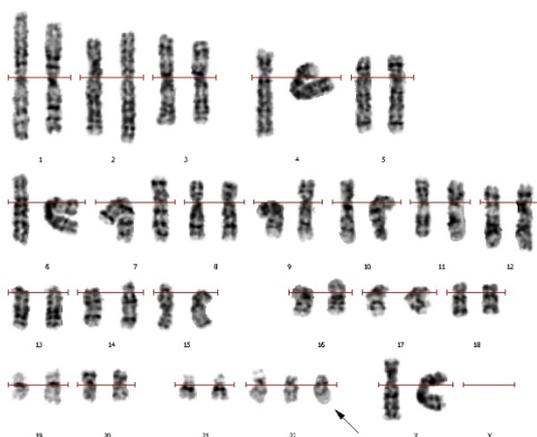


Рис. 2 Кариограмма эмбриона с трисомией хромосомы 22 («замершая» беременность, 7-8 нед.). Материал: ворсины хориона. G-дифференциальное окрашивание. Кариотип: 47,XX, +22.

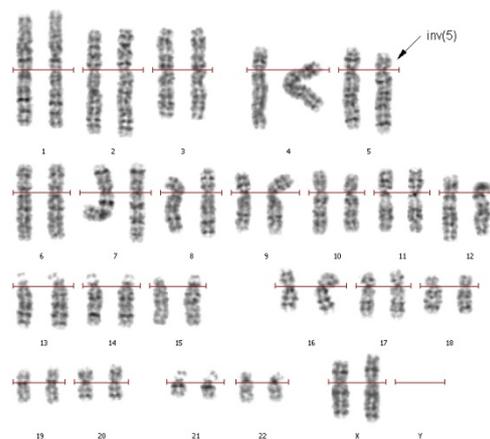


Рис. 3 Кариограмма плода с инверсией хромосомы 5. Материал: амниотическая жидкость. G-дифференциальное окрашивание. Кариотип: 46,XX,inv(5)(p15.1q12) pat.

В заключение отметим, что исследование кариотипа эмбриона / плода позволяет выявить самую частую причину «замершей» беременности и внести коррективы в репродуктивный статус семьи.

Хроматин-ремоделирующий фактор GAGA регулирует различные типы миграции при формировании половых клеток самок дрозофилы

Галимова Ю.А.², Хрущева А.С.^{3,1}, Дорогова Н.В.¹, Огиенко А.А.², Фёдорова С.А.^{1,3}

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», Новосибирск, 630090, e-mail:foundmelater@gmail.com*

² *Институт Молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090*

³ *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090*

GAGA-фактор (GAF) дрозофилы, кодируемый геном *Trithorax-like*, является одним из белков, который контролирует согласованную коллективную экспрессию генов. Он регулирует активность генов-мишеней через эпигенетический механизм, связанный с организацией и ремоделированием хроматина, что обеспечивает доступность регуляторных сайтов для аппарата транскрипции. В сферу регуляции GAF попадает широкий спектр генов, участвующих в большом разнообразии фундаментальных клеточных процессов. Было показано, что GAGA-фактор необходим для эмбриогенеза, оогенеза, сперматогенеза, развития глаза и крыла, формирования дорзальных выростов эмбриона.

В данном исследовании показана роль белка GAF в миграции клеток зародышевого и соматического пути при формировании гонад и оогенезе дрозофилы. Молекулярно-генетическая природа этого процесса эволюционно консервативна, и имеет высокую гомологию в разных клеточных типах и у различных организмов. Аналогичные процессы происходят при движении мезенхимальных клеток и их производных, а также опухолевых клеток, образующих метастазы.

Гонадогенез у самок дрозофилы – является удобной экспериментальной моделью для изучения механизмов и факторов миграции. Мы показали, что миграция трех типов клеток половой системы самок находится под контролем фактора GAGA.

GAF определяет миграцию примордиальных клеток в раннем эмбриональном развитии.

Клетки-предшественницы зародышевого пути (примордиальные) проходят через стенку первичной кишки, перемещаются между клетками эндодермы, разделяются на две группы и объединяются с мезодермальными клетками. Используя мутантов по гену *trl*, мы показали, что недостаток GAF приводит к ранней активизации программы миграции и преждевременному перемещению примордиальных клеток внутрь эмбриона. Клетки, рано

отделившиеся от общей группы, мигрируют эктопически, дезориентируются и не участвуют в формировании гонад.

GAF влияет на миграцию фолликулярных клеток в среднем и позднем оогенезе. У взрослой дрозофилы при формировании яйцевой камеры происходит несколько событий, связанных с миграцией фолликулярных клеток. В частности, в миграции участвуют две группы специализированных клеток, отделившихся от фолликулярных: бордюрные и центрипетальные. Бордюрные клетки (БК) обособляются от фолликулярных эпителиальных клеток на переднем конце яйцевой камеры (8-9 стадии) и перемещаются в направлении ооцита. Достигнув его, эти клетки поворачиваются на 90° и мигрируют к дорзальной стороне ооцита, где впоследствии формируют микропиле. Центрипетальные клетки (ЦК) образуются из эпителиальных клеток, расположенных в месте контакта ооцита и питающих клеток. В процессе миграции они формируют монослой, изолирующий ооцит. Как показывают наши исследования, оба типа миграции являются зависимыми от белка GAGA и нарушаются при его недостатке.

Как движение примордиальных клеток, так и фолликулярных являются примерами активной клеточной миграции, которая контролируется группой консервативных генов. Многие из этих генов являются мишенями GAF, и изменяют свою экспрессию на фоне мутаций. Анализ информационных ресурсов Flybase и данные по *in situ* гибридизации из проекта Беркли позволили отобрать потенциальные мишени GAF (по наличию GAGA-сайтов в регуляторных районах). Наибольший интерес представляет выборка генов, которая является общей для всех типов активно мигрирующих клеток. По нашим данным в эту группу входят гены, кодирующие белки с разнообразными клеточными функциями: транскрипционные факторы, актин-связывающие, клеточной адгезии, везикулярного трафика, рецепторы тирозин-киназы и Noch-сигнального пути (*ultraspiracle*, *mysospheroid*, *Epidermal growth factor receptor*, *capping protein beta*, *Rab5*, *Rho1*, *Lissencephaly-1*, *Delta*, *shotgun*).

Таким образом, через регуляцию экспрессии целой группы нижестоящих генов-мишеней, GAF вовлекается в широкий спектр реакций и механизмов, обеспечивающих клеточную миграцию. Дальнейшее исследование молекулярного окружения GAGA-фактора позволит получить дополнительную информацию о генетической системе регуляции и цитологических механизмах клеточной миграции.

Работа поддержана грантами РФФИ 18-34-00321 мол_a и гос.заданием 0324-2018-0019.

Su(Hw) инсулятор блокирует транскрипцию, специфическую сборку хроматина и продукцию коротких РНК при попадании в кластеры рiРНК в герминальных тканях *Drosophila*

Глухов* С.И., Радион* Е.И., Рязанский С.С., Калмыкова А.И.

*равное участие

Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Россия, Москва

Взаимодействующие с белком Рiwi короткие некодирующие (рi)РНК синтезируются с использованием геномных матриц, именуемых рiРНК кластерами. Последовательности рiРНК кластеров обогащены дефектными копиями мобильных элементов (МЭ). Основная роль рiРНК - контроль активности мобильных элементов в гонадах. Транскрипция специфичных для герминальных клеток рiРНК кластеров регулируется неканоническими механизмами, обеспечивающими синтез протяженных транскриптов - предшественников рiРНК. В составе последовательностей полноразмерных мобильных элементов могут присутствовать инсуляторные участки. Одним из наиболее изученных инсуляторов, принадлежащих мобильным элементам является супрессор Hw (Su(Hw)), связывающийся с последовательностью транспозона *gypsy*. Инсуляторные комплексы способны ограничивать активность энхансеров или осуществлять барьерную функцию при распространении хроматина в смежных областях генома, что выражается в регуляции транскрипции определенных локусов генома. Целью нынешней работы является исследование влияния инсуляторного комплекса Su(Hw) на функционирование кластеров рiРНК в герминальных тканях *Drosophila*.

Нами было показано, что трансгенная конструкция P{SUPor-P}, несущая участок связывания SuHw белка из ретротранспозона *gypsy*, и, расположенная в эндогенном перицентромерном (42AB) или теломерном (*HeT-A* ретротранспозон) кластерах существенно нарушает целостность рiРНК кластера. При этом отсутствует продукция коротких РНК последовательностями трансгена, а также не формируется специфический хроматин, свойственный кластерам рiРНК и содержащий гомолог гетерохроматинового белка 1 (HP1) – Rhino и триметилирование гистона H3 по остатку девятого лизина (H3K9me3). В тоже время мутация *Su(Hw)* восстанавливала нормальное функционирование обоих рiРНК кластеров, что выражалось в обнаружении H3K9me3 модификации и связывании белка Rhino с последовательностью трансгена P{SUPor-P}, а также в накоплении трансген-специфичных рiРНК в яичниках мутантных мух. Показано, что сборка инсуляторного комплекса внутри кластера рiРНК влияет на синтез рiРНК предшественников в процессе сквозной транскрипции кластеров.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что сборка инсульторного комплекса доминирует или опережает в процессе развития сборку хроматина рiРНК кластеров в герминальных тканях. Данные также позволяют предположить наличие селекции, направленной на определенный состав МЭ в кластерах, что важно для поддержания функционального состояния рiРНК кластеров.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01107 А

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ PCID2 И NUDC DROSOPHILA MELANOGASTER IN VITRO

А.А. Глухова, Д.В. Копытова

Институт биологии гена РАН, Москва, anyapochta6@gmail.com, d_dmitrieva@mail.ru

В процессе транспорта мРНК из ядра в цитоплазму клеток участвуют множество белков и белковых комплексов. У *Drosophila melanogaster* одним из участников этого процесса является белок PCID2. Данный белок связывает мРНК, находясь в составе ядерного транспортного комплекса, и через NPC выходит с ней в цитоплазму, меняя при этом партнеров в составе транспортного комплекса. Транспортировку вышедших в цитоплазму мРНК-частиц осуществляют молекулярные белки-моторы, а также различные адаптерные белки, необходимые для взаимодействия мРНК и моторных белков с участием элементов цитоскелета. На предварительном этапе мы почистили комплекс PCID2 из цитоплазмы и выявили его взаимодействие с белком NudC (nuclear distribution protein). Мы считаем, что комплекс PCID2-NudC принимает непосредственное участие в транспорте мРНК в цитоплазме. Также мы предполагаем, что белок NudC является одним из адаптеров, осуществляющих связывание мРНК и молекулярных моторов. Однако, остается неизвестным, как именно, и на каком этапе транспорта происходит взаимодействие между белками PCID2 и NudC, и какова функция данного комплекса. Основываясь на предложенной нами гипотезе, мы будем исследовать взаимодействие между белками PCID2 и NudC, чтобы прояснить детали транспорта мРНК-частицы в цитоплазме.

Для проверки данной гипотезы, мы поставили первичную цель: изучить домены белков PCID2 и NudC. Для осуществления данной цели нами была поставлена задача создать генетические конструкции, содержащие в себе последовательности доменов белков PCID2 и NudC, слитые с 6-His (гистидиновыми) эпитопами, а также их полноразмерные последовательности, слитые с GST-эпитопами. В рамках выполнения данной задачи мы показали методом иммунопреципитации, что белки PCID2 и NudC взаимодействуют друг с другом. Кроме того, мы проверили способность данных белков к димеризации. На следующем этапе мы условно разделили белок PCID2 на домены: N-концевой, C-концевой (WD-домен) и располагающийся между ними «средний» (далее обозначается как MID (middle)) домен. Причем, MID- и WD-домены вместе составляют функциональный PCI-домен. Также для исследования нами был разделен на домены и белок NudC. Мы поделили его на N- и C-концевой домены. Затем на основе нуклеотидных последовательностей указанных доменов были построены генетические конструкции, состоящие из плазмид pET22b, pET28a и pGEX, в составе которых находились последовательности доменов и

полноразмерных белков PCID2 и NudC в одной рамке считывания с 6-His- и GST-тагами. Данные конструкции были собраны при помощи метода молекулярного клонирования. После чего были подобраны условия экспрессии, и экспрессированы соответствующие полноразмерные белки PCID2-GST, NudC-GST и пептиды N-PCID2, MID-PCID2, C-PCID2, N-NudC, C-NudC в бактериальной системе *E.coli* в штамме BL-21. После этого были приготовлены бактериальные лизаты, из которых были почищены на колонках с Ni-NTA-сефарозой и GST-сефарозой полноразмерные белки и выделенные нами домены белков PCID2 и NudC в растворимой форме. Также для исследования доменов белков PCID2 и NudC была поставлена еще одна задача: исследовать взаимодействия полученных полноразмерных белков и доменов между собой методом Pull Down.

Таким образом, нами была осуществлена сборка, последующая экспрессия и очистка полноразмерных белков и доменов PCID2 и NudC. Данные эксперименты предшествуют анализу белок-доменных взаимодействий методом Pull Down в *in vitro* системе.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00151).

Белок HIPPI1 взаимодействует с инсулятором Su(Hw), но не участвует в Su(Hw)-зависимой репрессии у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.34/5

Уровень транскрипции эукариотических генов определяется активностью трех классов регуляторных элементов: энхансерами, репрессорами и инсуляторами. Факторы транскрипции связываются с последовательностями этих регуляторных элементов и обеспечивают координированную экспрессию генов в разных типах клеток и на разных стадиях развития. Многие транскрипционные факторы способны проявлять различные регуляторные активности в зависимости от структуры сайта связывания и геномного окружения. Механизм этого явления пока остается не выясненным.

Мы исследуем механизм многофункциональности регуляторных белков на примере инсуляторного белка дрозофилы Su(Hw) (Suppressor of Hairy-wing). Энхансер-блокирующая и барьерная функции инсулятора Su(Hw) изучены достаточно подробно. Также было показано, что в яичниках этот белок функционирует как репрессор транскрипции нейроспецифичных генов, и его активность определяет фертильность самок. Однако Su(Hw) может выступать и в качестве активатора транскрипции, например, стимулируя экспрессию генов, входящих в состав ретротранспозона *МДГ4* (*gypsy*), или гена *yellow*, промотор которого ослаблен. Мы предполагаем, что разнообразие регуляторных функций белка Su(Hw) зависит от того, какие белки способны взаимодействовать с ним в конкретном месте связывания. Недавно был обнаружен новый партнер белка Su(Hw) – белок HIPPI1. Было показано, что белок HIPPI1 локализуется на более чем на 80% сайтов связывания белка Su(Hw), т.е. потенциально способен взаимодействовать с ним. HIPPI1 гомологичен белку Chromodomain on Y (CDY), который является репрессором транскрипции. Эти данные позволяют предположить, что HIPPI1 может опосредовать Su(Hw)-зависимую реессию в ооцитах.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы изучили механизм взаимодействия белка HIPPI1 с Su(Hw)-зависимым инсуляторным комплексом. С помощью дрожжевой двугибридной системы нами впервые доказано, что С-концевой домен белка HIPPI1 способен напрямую взаимодействовать с С-концевым доменом белка Su(Hw). N-концевой домен белка HIPPI1 взаимодействует с ещё одним компонентом Su(Hw)-инсулятора – белком CP190. В этом взаимодействии со стороны CP190 задействованы М-домен и цинковые пальцы белка. Кроме того, белок HIPPI1 способен димеризоваться. Полученные в дрожжевой двугибридной

системе результаты были подтверждены в экспериментах по иммунопреципитации белка HIPPI с компонентами Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса, а также с помощью соосаждения белков на глутатионсефарозе.

С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 мы получили маленькую делецию в промоторной области гена *hipp1*, которая полностью инактивирует его. Оказалось, что полное отсутствие белка HIPPI не влияет как на жизнеспособность мух, так и на транскрипцию нейроспецифичных генов в ооцитах.

С помощью иммунопреципитации хроматина мы показали, что белок HIPPI присутствует на инсуляторных сайтах генома и на Su(Hw)-связывающих сайтах в промоторных областях модельных нейроспецифичных генов. Отсутствие белка HIPPI не влияет на связывание основных компонентов Su(Hw)-зависимого комплекса, белков Su(Hw), CP190 и Mod(mdg4)-67.2, ни с инсуляторными сайтами генома, ни с промоторами модельных нейроспецифичных генов. Однако привлечение белка HIPPI в состав Su(Hw)-инсулятора в значительной степени опосредовано белком CP190.

Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что белок HIPPI напрямую взаимодействует с Su(Hw)-зависимым белковым комплексом, но не участвует в механизме Su(Hw)-зависимой репрессии в ооцитах дрозофилы. В настоящее время мы продолжаем работу по выяснению роли белка HIPPI в формировании и функционировании инсулятора Su(Hw).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00295).

The HIPPI protein interacts with the insulator Su(Hw) but does not participate in Su(Hw)-dependent repression in fruit fly *Drosophila melanogaster*

Golovnin A.K., Melnikova L.S., Erokhin M.M., Molodina V.V.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ НА ЭКСПАНСИЮ УВЕЛИЧЕННОГО ПОВТОРА (ЦГГ)_n В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Грищенко И.В.¹, Пурвиньш Я.В.¹, Юдкин Д.В.¹

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

E-mail: framira@mcb.nsc.ru

Синдром ломкой X хромосомы – основная причина наследственной моногенной умственной отсталости. Это заболевание было обнаружено еще в 1941 году, однако только через 50 лет была обнаружена мутация, ответственная за его развитие – экспансия тринуклеотидных повторов (ЦГГ)_n в 5'UTR гена *FMRI*. Синдром ломкой X-хромосомы далеко не единственное заболевание, обусловленное экспансией тринуклеотидных повторов. Например, для болезни Гентингтона характерно значительное увеличение количества триплетов (ЦАГ)_n в гене *HTT*, для миотонической дистрофии I типа – триплетов (ЦТГ)_n в гене *DMPK*. На сегодняшний день известно более 30 заболеваний, ассоциированных с экспансией. Важно отметить, что основы патогенеза данных заболеваний различны, общим является наблюдаемая экспансия повторов и примерно одинаковое пороговое количество повторов в норме.

Механизм экспансии повторов остается неизвестным. На сегодняшний день считается, что основную роль в развитии экспансии играют ошибки в жизненно важных для клетки процессах – репликации, репарации и рекомбинации. Ошибки могут быть связаны с тем, что каждая из нитей ДНК, несущая удлиненный повтор, может образовывать альтернативные вторичные структуры. Особенностью промоторной области гена *FMRI* является то, что его кодирующая цепь содержит (ЦГГ)_n повтор, а матричная цепь содержит (ЦЦГ)_n повтор. Таким образом, кодирующая цепь может формировать G-квадруплекс, а матричная цепь i-мотив.

Поскольку выяснено, что экспансия интенсивно происходит в ооцитах и клетках мозга, которые не подвергаются делению, можно утверждать, что ошибки во время репликации не являются основным источником экспансии повторов. В неделящихся клетках механизмом, обуславливающим экспансию, может быть эксцизионная репарация, в частности репарация, ассоциированная с транскрипцией.

Известно, что премутантный аллель гена *FMRI* имеет повышенный уровень экспрессии и при этом он наиболее склонен к экспансии повторов. Данная работа посвящена изучению влияния активной транскрипции на модель премутантного (ЦГГ)_n повтора в клеточной линии человека с использованием рекомбинантных конструкций. В ходе экспериментов мы встроили фрагмент, несущий повтор премутантной длины в

экспрессирующий вектор под индуцируемый промотор. Далее была проведена трансфекция клеток линии HEK293A и оценен уровень экспансия после индукции промотора. Это первая экспериментальная система доставки расширенного непрерывного (CGG) n повторения в клетках человека. Результаты, продемонстрированные здесь, могут указывать на возможное участие хроматинового окружения при изменении размера повтора. Когда плазида не интегрирована в геном, в промоторной области не образуются нуклеосомы. Также нет регуляции транскрипции на уровне хроматина, что может повлиять на активацию TCR.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00336.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИСТОРИИ ЧУКЧЕЙ: НАХОДКИ ПО ДАННЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Дрёмов С.В., Нажмиденова А.М., Каманова Е.П., Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

E-mail: stasundr@mcb.nsc.ru

Несмотря на многочисленные и тщательные исследования эволюционных процессов, связанных с колонизацией крайнего северо-востока Азии и Северной Америки, остаётся множество нерешённых вопросов о времени и маршрутах миграций людей. Изучение генетической истории чукчей – народа, чья история непрерывно связана с Берингией – предоставляет дополнительные сведения о событиях, происходивших на этой обширной территории в течении голоцена.

В настоящей работе изучали генофонд чукчей путём секвенирования полных последовательностей мтДНК ($n = 27$). Митогеномы были классифицированы по гаплогруппам A2a, A2b, C4b, C5a, D2a, D4b1a2a1 и G1b, описано 8 новых гаплотипов. Впервые детально изучены гаплотипы чукчей относящиеся к гаплогруппе G1b. Полученные данные объединяли с ранее опубликованными митохондриальными геномами ныне живущих представителей коренных народов Сибири и Северной Америки, а также с мтДНК, выделенной из антропологических останков, обнаруженных по обе стороны от Берингова пролива. В результате филогеографического анализа были получены возрастные оценки для гаплогрупп. Примечательно, что даты коалесценции для гаплогрупп A2a, A2b, C4b, D2a и D4b1a2a1 хорошо коррелируют с результатами радиоуглеродного анализа древних образцов. Так как до сих пор не обнаружены древние ДНК из гаплогрупп G1b и C5a, а потому для них отсутствуют датировки, полученные физическими методами.

Наше исследование значительно дополняет знания об изменчивости мтДНК у чукчей, не только позволяет более точно оценить взаимоотношения с азиатскими эскимосами, канадскими и гренландскими инуитами, коряками и юкагирами, но и проследить связь материнских филогенетических линий с представителями культур Бирнирк, Туле, Дорсет, Саккак и вплоть до Морской архаической культуры и неолита Трансбайкала.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10222).

Изучение природы «незаконных» гибридов, лишенных хромосомы III и регистрируемых в альфа-тесте для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Жук А.С.^{1,2}, Степченко Е.И.^{1,2}, Инге-Вечтомов С.Г.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Учреждение Российской академии наук Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург

Альфа-тест – уникальный метод, позволяющий с использованием модельных микроорганизмов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, регистрировать генетическую активность эндогенных и экзогенных факторов, которые вызывают различные по своей природе изменения генетического материала: потерю целой III хромосомы или её плеча, рекомбинацию, конверсию, генные мутации и первичные повреждения ДНК по изменению фенотипа клетки. Альфа-тест основан на использовании системы генетической регуляции клеточного типа и особенностей переключения типов спаривания у гетероталлических дрожжей *S. cerevisiae*. В норме клетки только противоположных типов спаривания α и a могут скрещиваться с образованием диплоидных зигот a/α . Клеточный тип гаплоидных клеток находится под контролем локуса типа спаривания *MAT*, который расположен в правом плече хромосомы III. При нарушении экспрессии локуса *MAT* в результате его физической утраты, мутации или временного повреждения клетка α типа переключает свой тип спаривания на противоположный и приобретает фенотип a . Факт подобного переключения типа спаривания можно зафиксировать по способности таких клеток образовывать гибриды с клетками a типа спаривания. Анализ фенотипа «незаконных» гибридов при условии использования штаммов с маркированными плечами хромосомы III позволяет установить какое из учитываемых в альфа-тесте генетических нарушений стало причиной гибридизации клеток исходно одинакового типа спаривания – α . Для маркирования левого плеча хромосомы III чаще всего используют рецессивную мутацию *his4*, а для маркирования правого плеча – рецессивные мутации *thr4* или *leu2*.

Одним из наиболее частых генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, является потеря хромосомы III. Такие гибриды выявляют по следующим фенотипическим признакам: они ауксотрофны по гистидину, треонину и лейцину, если родительские штаммы несли комплементарные маркеры *his4*, *thr4* и *leu2*, а также имеют тип спаривания α . Доля гибридов, лишенных хромосомы III, от общего числа «незаконных» гибридов, возникающих спонтанно или под действием генотоксических воздействий, составляет 30 - 50 %. До сих пор не было ясно на каком этапе до или после формирования «незаконного» гибрида происходит потеря хромосомы III, и может ли клетка, потерявшая хромосому, вступить в

гибридизацию. Ответ на вопрос о происхождении «незаконных» гибридов, лишенных хромосомы III, важен для адекватной интерпретации результатов альфа-теста. Для того чтобы проверить гипотезу о том, что потеря хромосомы III может являться первичным событием, которое приводит к переключению типа спаривания и образованию «незаконного» гибрида, мы применили подход, заключающийся в индукции направленной потери хромосомы III без применения агентов, повреждающих ДНК. Мы исследовали эффект индукции потери хромосомы III путем встраивания регулируемого галактозного промотора (*pGALI*) в её центромеру. В альфа-тесте индукция транскрипции в центромере хромосомы III приводит к наиболее сильному (в 5000 раз), из когда-либо наблюдавшегося нами, возрастанию частоты «незаконной» гибридизации, т.е. не менее 5% всех клеток культуры, выращенной на среде с галактозой, теряют хромосому III, а потеряв ее, проявляют фенотип типа спаривания α и вступают в «незаконное» скрещивание.

Таким образом, можно представить два возможных механизма возникновения «незаконных» гибридов, лишенных III хромосомы. В первом случае потеря хромосомы может происходить после завершения гибридизации уже в диплоидной зиготе в результате нетождественной репарации, устраняющей первичное повреждение ДНК (например, однонитевой или двунитевой разрыв), которое и привело к временному переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ и индуцировало образование «незаконного» гибрида. Согласно второй модели, получившей экспериментальное подтверждение в данной работе, потеря хромосомы III может являться первичным событием, которое приводит к «переключению» типа спаривания. Потеря хромосомы III в ходе митотического роста дрожжевой культуры может произойти как в результате нарушений репарации, так и клеточных структур, контролирующей сегрегацию хромосом при делении, например, цитоскелета и веретена деления.

На основе полученных нами данных можно сделать вывод о том, что клетки, потерявшие хромосому III, могут скрещиваться, а «незаконные» гибриды без хромосомы III могут возникать в альфа-тесте несколькими способами: потеря хромосомы III может происходить как до, так и после образования «незаконных» гибридов.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00130 мол_а и программой Президиума РАН № 41 «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России».

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ СВЯЗЫВАНИЯ ХРОМОСОМ С ЯДЕРНОЙ ЛАМИНОЙ В ХОДЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ДРОЗОФИЛЫ

*А.А. Ильин¹, В.В. Шлома^{2,3}, О.М. Оленкина¹, В.В. Ненашева¹, Ю.А. Абрамов¹,
А.В. Пиндюрин², Д.А. Максимов^{2,3}, П.П. Лактионов^{2,3}, С.Н. Белякин^{2,3}, Ю.Я. Шевелев¹*

¹ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва

²ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

³Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Связанные с ядерной ламиной участки хромосом, – т.н. ламина-ассоциированные домены (ЛАДы), картированы у дрозофилы пока лишь в культуре клеток Kc167. Чтобы выяснить, как изменяется структура ЛАДов в ходе развития организма, мы провели DamID-картирование геномных участков, взаимодействующих с ламином Dm0, и идентифицировали ЛАДы на двух последовательных стадиях дифференцировки герминальных клеток семенников дрозофилы – в сперматогониях и в сперматоцитах. ЛАДы в сперматогониях покрывают большую часть генома, чем в сперматоцитах (50.5% против 42.5%), что согласуется с началом экспрессии в сперматоцитах более тысячи генов. Как и ожидалось, в сперматогониях 85% экспрессирующихся генов находится вне ЛАДов. Однако вопреки ожиданиям, в сперматоцитах лишь около 50% генов, специфично экспрессирующихся на этой стадии, попадает в меж-ЛАДы. Интересно, что половина из них оказывается в меж-ЛАДах уже на стадии сперматогониев, хотя в них еще не экспрессируется. Таким образом, у дрозофилы, как и у млекопитающих (Peric-Hurkes et al. 2010), утрата связи с ламиной часто предшествует началу геной экспрессии.

Оказалось, что в сперматогониях и в сперматоцитах X-хромосома самцов соответственно в 1.6 и в 2.2 раза сильнее связана с ламином Dm0 в ЛАДах, чем аутосомы. Это может отражать меньшее расстояние до ядерной оболочки у X-хромосомы, чем у аутосом. Чтобы проверить это предположение, в сперматогониях и в сперматоцитах был проведен двуцветный FISH, в котором в качестве зондов использовались хромосомы X и 2L, а ядерная ламина была окрашена антителами к ламину Dm0. Определяли расстояния от центров масс хромосомных территорий до оболочки в 3D с помощью IMARIS. Выяснилось, что в сперматогониях центр масс единственной X-хромосомы в 1.4 раза ближе к оболочке, чем центр масс двух спаренных гомологов 2L-хромосомы. Для 7% ядер, в которых 2L-гомологи были не спарены, расстояния между их центрами масс и оболочкой были примерно такими же, как и у X-хромосомы. В сперматоцитах центр масс у спаренных гомологов 2L был в 1.8 раза дальше от оболочки, чем у X-хромосомы. Таким образом, преимущественное связывание X-хромосомы с ламином согласно DamID хорошо коррелирует с приближенностью центров масс X-хромосом к оболочке по FISH. Мы предполагаем, что это объясняется существованием конкуренции между ЛАДами за связывание с оболочкой. Очевидно, что поверхность оболочки, прилежащая к хромосомной территории спаренных 2L-гомологов менее, чем в 2 раза больше, чем поверхность оболочки, прилежащая к X-хромосоме. При этом, общая длина

ЛАДов у 2L-гомологов в два раза больше, чем у X-хромосомы. Отсюда следует, что конкуренция между ЛАДами X-хромосомы за связывание с оболочкой меньше, чем конкуренция между ЛАДами двух гомологов 2L. В результате, в каждой отдельной клетке связывается БОльшая доля ЛАДов X, чем ЛАДов 2L, и X-хромосома оказывается ближе к оболочке, чем 2L-аутосома.

Известно, что несколько компонентов комплекса дозовой компенсации в герминальных клетках семенников дрозофилы не экспрессируются. Однако анализ, проведенный на основе данных RNA-seq (Laktionov et al. 2018) для семенников *bam*^{Δ86} мутантов, содержащих размноженную стадию сперматогониев, показал, что отношение медианной экспрессии аутосомных генов к X хромосомным равно 1.4. При полном отсутствии дозовой компенсации это отношение было бы равно 2. Интересно, что в сперматогониях метилирование X-хромосомы Dam-метилазой оказалось в 1.4 раза выше, чем метилирование одной дозы аутосом, что указывает на повышенную доступность хроматина X-хромосомы. Таким образом, в сперматогониях может происходить частичная дозовая компенсация (в 1.43 раза) по неканоническому механизму, но при этом X-хромосома сильнее связана с ядерной ламинной, чем аутосомы, что на первый взгляд должно способствовать репрессии ее генов, а не их гиперактивации. Альтернативная гипотеза предполагает эволюцию индивидуальных промоторов X-хромосомных генов, приведшую к усилению их экспрессии и частичному выравниванию их экспрессии с аутосомными генами.

Чтобы прояснить вопрос о существовании в сперматогониях механизма дозовой компенсации, действующего на хромосомном уровне, мы клонировали сперматогоний-специфичный промотор гена *stil* в вектор для Р-элемент зависимой трансформации дрозофилы (перед геном, кодирующим бета-галактозидазу) и получили независимые инсерции этой конструкции в случайные места генома X-хромосомы и аутосом. Затем мы измерили уровень экспрессии репортерного гена, встроенного в X-хромосому (3 встройки) и в аутосомы (10 встроек). Оказалось, что средний уровень экспрессии гена-репортера при встройках в X-хромосому приблизительно в 2.7 раза больше, чем у аутосомных встроек. Этот предварительный результат указывает на существование в сперматогониях дрозофилы механизма дозовой компенсации, действующего на хромосомном уровне.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №18-34-00140 (мол_a), №16-04-01764 (а), № 17-00-00183 (КОМФИ).

ANALYSIS OF THE DYNAMIC OF CHROMOSOME INTERACTIONS WITH THE NUCLEAR LAMINA DURING *DROSOPHILA* SPERMATOGENESIS

*A.A. Ilyin*¹, *V.V. Shloma*^{2,3}, *O.M. Olenkina*¹, *V.V. Nenasheva*¹, *Y.A. Abramov*¹, *A.V. Pindyurin*²,
D.A. Maksimov^{2,3}, *P.P. Laktionov*^{2,3}, *S.N. Belyakin*^{2,3}, *Y.Y. Shevelyov*¹

¹Institute of Molecular Genetics, RAS, Moscow

²Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk

³Novosibirsk State University, Novosibirsk

Биология теломер в процессе оогенеза и раннего развития *Drosophila*

А. Калмыкова, Е. Радион, М. Кордюкова, В. Моргунова

Институт молекулярной генетики РАН, пл. акад. Курчатова 2, 123182 Москва

Telomere biology in the *Drosophila* germline and in early development

A. Kalmykova, E. Radion, M. Kordyukova, V. Morgunova

Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences, Kurchatov sq. 2, 123182

Moscow, Russia

e-mail: allakalm@img.ras.ru

Биология теломер в герминальных тканях представляет особый интерес, т.к. именно на этом этапе развития происходит наследуемое удлинение теломер. Используя *Drosophila*, как модельный объект, мы исследуем механизмы, контролирующие транскрипцию теломерных повторов и поддержание теломерного хроматина в процессе оогенеза и раннего развития. Теломеры *Drosophila* поддерживаются с помощью транспозиций на концы хромосом специализированных ретротранспозонов *HeT-A*, *TART* и *TANRE*. Теломерный хроматин в герминальных тканях обладает особой структурой, т.к. в его формировании участвует система коротких РНК, Piwi-interacting RNA (piRNA), специфичная для гонад животных. Мы показали, что piRNA, комплементарные теломерным ретротранспозонам, необходимы для привлечения на теломеру белка HP1 и его ортолога Rhino, а также гетерохроматиновой модификации гистона H3, триметилированного по лизину 9. Тканеспецифичная особенность теломерного хроматина состоит в том, что теломерные ретротранспозоны и субтеломерные повторы формируют единый piRNA-продуцирующий домен, в то время как в соматических тканях субтеломерные районы формируют Поликомб-зависимый неактивный домен. Нарушение системы piRNA приводит к потере гетерохроматиновых компонентов теломер и к перемещению теломер от периферии ядра в его центральную часть. По-видимому, ядерная локализация теломер меняется в результате активации транскрипции теломерных повторов. Мы рассматриваем транскрипты основного теломерного ретротранспозона *HeT-A* как сигнальные молекулы, которые устанавливают связь между состоянием теломеры и судьбой клетки. Мы показали, что *HeT-A* РНК существует в тесном взаимодействии с кодируемым ей РНК-связывающим белком Gag *HeT-A*, что приводит к появлению рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов в герминальных тканях и раннем развитии. На ранних этапах оогенеза РНП *HeT-A* образуют вблизи теломер сферические структуры, которые предположительно являются интермедиатами ретротранспозиций и участвуют в удлинении теломер. Интересно то, что значительная часть жизненного цикла теломерных РНП в процессе оогенеза и раннего развития происходит вне ядра, в цитоплазме. Показано,

что РНП HeT-A взаимодействуют с белком-переносчиком мРНК, Egalitarian (Egl), который обеспечивает транспорт РНП HeT-A из питающих клеток в ооцит с помощью динеинового мотора. Во время первых часов развития материнские РНП HeT-A, в комплексе с белком Egl, локализуются вблизи centrosом, центров организации микротрубочек. Удержание Egl, который в норме необходим для формирования осей развивающегося эмбриона, обильными HeT-A РНП может быть одной из причин остановки развития, наблюдаемой при нарушении piRNA пути. С помощью масс-спектрометрии проведен анализ клеточных партнеров теломерных РНП в 0-2-часовых эмбрионах и выявлены белки, участвующие в митотическом контроле. Исследование белков-партнеров теломерных РНП в раннем развитии важно для понимания механизма, обеспечивающего связь дисфункциональных теломер с регуляцией клеточного цикла.

Работа поддержана грантом РФФ 16-14-10167.

Атипичное взаимодействие эндоплазматического ретикулума с ядерной оболочкой

Киселева Е.В.^{1*}, Струнов А.А.¹, Болдырева Л.В.², Андреева Е.Н.², Павлова Г.А.², Gatti M.³, Пиндюрин А.В.²

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*

³ *Университет La Sapienza, Рим, Италия*

* ekiseval11@gmail.com

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) состоящий из сети разветвленных мембран и трубочек, пронизывающих всю цитоплазму имеет тесную функциональную связь с ядерной оболочкой. На стадии интерфазы он обеспечивает прямую доставку фосфолипидов растущей ядерной оболочке, сливаясь с наружной мембраной ядра. На разных стадиях митоза ЭПР служит резервным депо компонентов разбирающейся ядерной оболочки, организует свободное пространство для перемещения делящихся хромосом и участвует в формировании оболочек ядер дочерних клеток. ЭПР является многофункциональным компартментом и входящие в состав его мембран белки регулируют многие внутриклеточные процессы. Нарушение экспрессии генов, кодирующих эти белки, может инициировать появление неспецифических свойств мембран ЭПР, в частности формирование аномальных агрегатов тесно контактирующих многослойных мембран. Целью нашей работы являлось исследование динамики мембран ЭПР и ядерной оболочки в клетках культуры дрозофилы S2 на разных стадиях митоза с использованием электронной микроскопии. Проведенный на срезах большого количества клеток S2 детальный морфологический и морфометрический анализ длины внутриклеточных мембран позволил обнаружить не описанное ранее необычное их поведение, включающее формирование 4-х-слойной ядерной оболочки на стадии ранней прометафазы и ее распад на стадии поздней прометафазы (1). На серийных срезах клеток доказано прямое участие мембран ЭПР в формировании этой структуры, путем параллельного их расположения вблизи и вдоль ядерной оболочки, а затем непосредственного слияния с наружной мембраной ядра до начала ее разборки. Конфокальная микроскопия с использованием антител к компоненту ядерной ламины, белку Lamin Dm0, выявила его присутствие в оболочке ядра до стадии поздней прометафазы. На стадии метафазы длинные мембраны ЭПР ограничивали область нуклеоплазмы с хромосомами, а на стадии анафазы – принимали участие в формировании оболочки дочерних ядер. Мы предполагаем, что наблюдаемый впервые процесс формирования необычных 4-х-слойных мембран ядерной оболочки в клетках S2, происходит, возможно, с участием микротрубочек и создает временные условия «закрытого митоза»,

обеспечивающего свободное перемещение хромосом и взаимодействие микротрубочек с кинетохорами на стадии прометафазы. Обсуждается встречаемость 4-х-слойных фрагментов ядерной оболочки в некоторых опухолевых клетках, а также при нарушении метаболизма белка липина, входящего в состав мембран ЭПР (2).

1. Strunov et al., 2018, BMC Biol, 16(1):68
2. Makarova et al., 2016, Curr Biol, 26(2):237–243

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских научных учреждениях (договор № 14.Z50.31.0005) и РФФИ (грант 16-14-10288).

Регуляция экспрессии копий рибосомной ДНК, содержащих инсерции ретротранспозонов

М.С. Клёнов, Е.А. Фефелова, А.Д. Столяренко, Е.А. Михалева, В.А. Гвоздев

Институт Молекулярной генетики РАН, Москва

Кластеры рибосомной ДНК (рДНК) в клетках эукариот обычно состоят из сотен повторяющихся единиц – генов рДНК, из которых только часть транскрипционно активны. Неизвестно, чем именно определяется выбор активных и репрессированных копий рДНК. У *Drosophila melanogaster* некоторые копии рДНК содержат инсерции ретротранспозонов R2, которые встраиваются исключительно в строго определенный сайт в последовательности 28S рРНК. Инсерции R2 обнаружены в значительной части генов рДНК: от 15 до 40% в разных линиях дрозофилы. Эти транспозоны не имеют собственного промотора, и при транскрипции их последовательность входит в состав предшественника пре-рРНК, а затем может вырезаться при процессинге. Таким образом, транспозоны R2 используют для своей экспрессии самый мощный клеточный аппарат транскрипции, а именно - РНК-полимеразу I. Тем не менее, гены рДНК с инсерциями R2 обычно демонстрируют очень низкий уровень транскрипции по сравнению с активными копиями неинсертированных генов рДНК. Следовательно, R2-содержащие копии подвергаются избирательной репрессии, что предотвращает распространение транспозона в рДНК и образование aberrантных молекул рРНК. Однако механизм, с помощью которого клетка распознает и репрессирует копии рДНК, содержащие R2, остается невыясненным. В этой работе мы начали исследовать систему подавления инсертированных рДНК. Мы обнаружили, что хроматин копий рДНК со вставками R2 значительно обогащен модификацией H3K9me3, характерной для гетерохроматина, а также белком HP1a. Мы показали, что R2 обладают антисмысловой транскрипцией, которая является источником антисмысловых коротких РНК. Однако, нарушения системы сайленсинга с помощью коротких РНК (siРНК и piРНК) или белка HP1a приводят лишь к слабому возрастанию экспрессии полноразмерных вставок R2, однако препятствуют накоплению рРНК с короткими фрагментами транспозона. В то же время, мутации в гене, кодирующем небольшой белок, взаимодействующий с комплексом инициации транскрипции РНК-полимеразы I, вызывает увеличение транскрипции всех копий R2 в сотни раз. Таким образом, нами впервые выявлен фактор, различающий транскрипционно активные и неактивные копии рДНК в рибосомном кластере.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ 16-04-01524 А).

Исследование функций фактора сборки и ремоделирования хроматина CHD1

у дрозофилы

Конев А.Ю., Тютюнник А.А., Ильина Ю.А., Барановская И.Л., Гненная Ю.А., Шалаев А.В.
НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ

CHD1 является первым АТФ – зависимым фактором сборки хроматина, для которого продемонстрировано участие в сборке хроматина *in vivo* (Konev et al, Science, 2007). При исследовании морфологии политенных хромосом нуль-мутантных гену *Chd1* личинок мы обнаружили, что в то время как самки имеют в целом нормальную структуру хромосом, X-хромосома нуль-мутантных по гену *Chd1*[1] самцов становится измененной. Обнаружено, что именно прямое привлечение белка CHD1 непосредственно к подвергающейся дозовой компенсации X-хромосоме самцов дрозофилы необходимо для поддержания ее нормальной структуры. CHD1 является единственным фактором сборки и ремоделирования хроматина, для которого выявляется специфическое привлечение к подвергающейся дозовой компенсации X-хромосоме самцов. Наши исследования свидетельствуют о существовании специфичного механизма привлечения CHD1 к X-хромосоме самцов, отличного от механизмов привлечения этого белка к другим сайтам в геноме в процессе активной транскрипции. Мы показали, что локализация белка CHD1 и белков комплекса MSL в X-хромосоме самцов практически полностью совпадают. Сочетание делеций одного из генов, кодирующих вариантный гистон H3.3 - His3.3B с нуль-мутациями по гену *Chd1* приводит к синтетической летальности, т.е. при снижении количества гистона H3.3, *Chd1* становится существенным геном. Мы обнаружили, что делеция одного из двух генов, кодирующих вариантный гистон H3.3 приводит к усилению влияния мутаций *Chd1* на структуру X-хромосомы самцов, тогда как введение в генотип таких особей дополнительной копии гена гистона H3.3 приводит к супрессии этого эффекта. Показано, что экспрессия каталитически не активной формы белка CHD1, и экспрессия белка дикого типа под действием драйвера P{GawB}AB1 приводит к появлению в хромосомах многочисленных деконденсированных районов, ярко окрашиваемых антителами на белок CHD1 и РНК-полимеразу II. Проведено детальное картирование деконденсированных участков хромосом и изучено изменение характера пуффирования в ходе развития дрозофилы. Повышенная экспрессия как нативной, так и каталитически не активной форм белка CHD1, приводит к деконденсации строго определенных участков хромосом. Показано, что сверх-экспрессия белка как нативной, так и доминант-негативной форм белка CHD1 приводит к нарушению нормального характера пуффирования и смещению пуфковых паттернов, характерных для различных пуфковых стадий. Привлечение каталитически не активной формы CHD1 вызывает задержку регрессии ряда

регулируемых в развитии экдизон-индуцируемых пухов и нарушение своевременной репрессии транскрипции определенных регулируемых в развитии генов. Нами обнаружено, что сверх-экспрессия белка CHD1 дикого типа приводит к деконденсации гетерохроматиновых районов политенных хромосом и 4й хромосомы. Привлечение CHD1 к гетерохроматиновым последовательностям приводит к отсутствию в деконденсированных районах линкерного гистона H1 и увеличению в политенных хромосомах степени репликации локализованных в X-хромосоме повторяющихся последовательностей. Результаты наших исследований свидетельствуют, что, возникающие при сверх-экспрессии CHD1 изменения структуры хромосом связаны с не только с его ремоделирующей активностью, но и с повышенным привлечением взаимодействующих с CHD1 белков к определенным сайтам в геноме.

Внутриклеточная локализация и механизм транспорта рибонуклеопротеиновых комплексов теломерного ретротранспозона *HeT-A* в герминальных тканях и раннем эмбриогенезе *Drosophila*

Кордюкова М.Ю., Моргунова В.В., Оловников И.А., Комаров П.А., Миронова А.А., Оленкина О.М., Калмыкова А.И.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Теломеры представляют собой комплекс нуклеиновых кислот и белков, защищающих концы линейных хромосом эукариот от слияния и деградации. Изучение теломерного комплекса в оогенезе и процессе раннего развития очень важно для понимания механизмов, которые обеспечивают сохранность генетической информации в ряду поколений.

Уникальным свойством теломер дрозофилы является то, что они состоят из ретротранспозонов типа LINE, *HeT-A*, *TART* и *TANRE*, среди которых *HeT-A* наиболее многочисленный. Теломеры дрозофилы, хотя и отличаются структурно от теломеразного типа теломер, функционально аналогичны теломерам других видов. Теломерные повторы у дрозофилы транскрибируются, как и у других видов. Экспрессия теломерных ретротранспозонов в яичниках дрозофилы находится под контролем piРНК (Piwi interacting RNA) пути, который негативно регулирует длину теломер. Известно, что теломерные транскрипты взаимодействуют с различными белками, участвуя не только в поддержании структуры теломер млекопитающих, но также в важных сигнальных путях. Однако функциональное значение данных комплексов в процессе оогенеза и нормального развития до сих пор изучено недостаточно.

Ранее было показано, что механизмы поддержания целостности концов хромосом тесно связаны с сайленсингом теломерных повторов. При разрушении теломерного комплекса в процессе оогенеза у дрозофилы, длинные теломерные РНК аккумулируются в половых клетках, транспортируются в эмбрион и формируют скопления у митотических полюсов, что сопровождается высоким уровнем эмбриональной смертности. Данная работа посвящена исследованию биогенеза рибонуклеиновых комплексов, состоящих из транскриптов и белков, кодируемых основным теломерным ретротранспозоном *HeT-A*. Основной целью было понять, как дисфункция теломер (гиперэкспрессия *HeT-A*) может влиять на процесс раннего развития. Мы использовали трансгенную систему для экспрессии *HeT-A* Gag, слитого с HA эпитопом под контролем UAS регуляторного элемента, которая позволяет специфично детектировать белок и очищать его вместе со связанной РНК и белками. В виду активности piРНК пути *HeT-A* Gag практически не выявляется в яичниках природных линий. Однако на фоне герминального нокдауна компонента piРНК пути *spnE*

происходит гиперэкспрессия *HeT-A* Методом РНК-иммунопреципитации было показано, что транскрипты *HeT-A* ассоциированы с белком *HeT-A* Gag, который они кодируют, как в яичниках дрозофилы, так и в ранних эмбрионах. Это взаимодействие происходит по принципу цис-предпочтения, т.е. белок связывается с РНК-матрицей, которая его кодирует. РНК *TART* также присутствует в данном комплексе, что говорит о том, что *HeT-A* РНП – многокомпонентный комплекс. Было показано, что *HeT-A* РНП в германии яичников имеют сферическую форму, *HeT-A* Gag локализован на поверхности сферы, а *HeT-A* РНК – внутри. Эти сферы предположительно являются интермедиатами комплекса элонгации теломер. На поздних этапах оогенеза сферические *HeT-A* РНП детектируются в ядрах питающих клеток, однако только немногие из них колокализуются с теломерами. В цитоплазме питающих клеток часть РНП представляют собой большие скопления неправильной формы. Таким образом, *HeT-A* РНК и *HeT-A* Gag формируют РНП различного типа на разных стадиях оогенеза.

При нарушении *piRNA* пути *HeT-A* Gag и *HeT-A* РНК аккумулируются в ооците начиная с ранних этапов оогенеза. Известно, что Egalitarian (*Egl*) является основным транспортным белком, который обеспечивает транспорт и локализацию материнских РНК на различных стадиях оогенеза дрозофилы. Нами было показано, что в яичниках с двойным нокаутом *egl* и *piwi* (компонента *piRNA* пути) наблюдается нарушение специфической локализации *HeT-A*. Было выявлено взаимодействие *Egl* и *HeT-A* Gag методом ко-иммунопреципитации и колокализация этих белков в цитоплазме питающих клеток и ооцита яичников с нокаутом *spnE*, а также в ооцитах яичников мух природной линии *GIII*. Эти результаты свидетельствуют о том, что *Egl* участвует в транспорте *HeT-A* РНК из питающих клеток в ооцит.

В норме *Egl* равномерно распределен внутри эмбриона, обеспечивая транспорт материнских мРНК. В ранних эмбрионах с нокаутом *spnE* было показано взаимодействие *Egl* и *HeT-A* Gag и их колокализация около centrosom на стадии синтиция. Эктопическая локализация *Egl*, скорее всего, приводит к нарушению транспорта мРНК *nos* и *osk* и к дефектам формирования осей эмбриона, что наблюдается в мутантах *piwi*. Таким образом, избыточные теломерные РНП, которые образуются при дисфункции теломер, взаимодействуют с клеточными факторами, необходимыми для развития, что может быть причиной остановки развития таких эмбрионов. Выявление клеточных партнеров *HeT-A* РНП позволит глубже понять механизмы сигнальных путей между теломерой и клеткой. Работа была поддержана грантом Российского научного фонда №16-14-10167.

Subcellular localization and mechanism of transport of telomeric retrotransposon *HeT-A* ribonucleoprotein particles in the *Drosophila* germline and early embryogenesis

Филогеография и гибридизация врановых птиц Палеарктики

Phylogeography and hybridization of corvid birds in Palearctic

А.П. Крюков

ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

Подведены итоги многолетнего изучения классической зоны гибридизации серой и черной ворон в Западной Сибири. Предполагаемой пониженной плодовитости и/или жизнеспособности гибридов не обнаружено. Доказана положительная ассортативность при скрещивании разных фенотипов в центре зоны, что рассматривается как механизм ограничения и стабилизации ее ширины.

Экологические наблюдения перешли в генетические и позже филогеографические исследования, не обнаружившие различий между серой и черной воронами по кариотипам, аллозимам, RFLP и ядерным генам. Митохондриальные маркеры показали вместо ожидаемой подвидоспецифичности глубокую дифференциацию по двум генам в пределах ареала восточной черной вороны. Только полногеномное секвенирование позволило получить четкие картины разобщения подвидов по SNP и проанализировать пики дифференциации - так называемые «островки видообразования». В каждой из зон вторичного контакта обнаружены специфические участки генома с признаками отбора, ограничивающего поток генов через гибридные зоны.

Картина сравнительной филогеографии восьми широкоареальных видов птиц семейства врановые выявила у пяти из них (ворона, грач, галка, сорока и голубая сорока) глубокую дифференциацию на западные и восточные группы гаплотипов, с близкими дистанциями. У ворона, кукушки и кедровки такой картины не обнаружено. Это различие можно объяснить экологическими предпочтениями: лесные птицы второй группы могли сохраниться в едином плейстоценовом рефугиуме, в отличие от видов открытых пространств первой группы. У голубой сороки генетическая и фенотипическая дивергенция достигает видового уровня. Столь же значительно различаются митохондриальные гаплотипы у западной и восточной групп подвидов обыкновенной сороки. На сети гаплотипов группа западных подвидов отличается от восточных на 63 и более замен, а восточная подразделяется на 2 подгруппы без географической приуроченности каждой. Существовавший в Забайкалье разрыв ареала сороки заполняется на наших глазах и приводит, по предварительным данным, к «репродуктивному самоуничтожению» ввиду стерильности гибридов.

Данное сообщение обобщает итоги работы большого коллектива, основные члены которого: E. Haring (Австрия), H. Suzuki (Япония), J.B.W. Wolf (Швеция), В.Н. Блинов и Л.Н. Спиридонова (Россия).

TRF4, новый TBP-подобный белок *D. melanogaster*, в ходе эволюции приобрел новые функции в процессах, ассоциированных с ЭПР, в цитоплазме

Куршакова М.М.¹, Копытова Д.В.¹

¹ Институт Биологии гена РАН, Москва

Исследование функций TBP-подобных белков вносит вклад в понимание механизмов организации хроматина и регуляции транскрипции у высших эукариот. Ген *trf4*, кодирующий новый TBP-подобный белок, был найден в геноме *D. melanogaster*. Гомологи *trf4* обнаружены в геномах других видов *Drosophila*, но не найдены в геномах других организмов. Предсказанный белок TRF4 проявляет вырожденную гомологию с TBP-подобными доменами TBP и TRF2 и эволюционно консервативен у различных видов *Drosophila*, что свидетельствует о его функциональной значимости. TRF4 экспрессируется на разных стадиях развития и в различных тканях *D. melanogaster*, высокий уровень экспрессии наблюдается в семенниках. В аминокислотной последовательности TRF4 изменены последовательность, связывающаяся с промотором, и последовательность сигнала ядерной локализации. TRF4 детектируется преимущественно в цитоплазме и сконцентрирован в области эндоплазматического ретикулума (ЭПР). TRF4 соочищается вместе с белками, которые принимают участие в процессах, протекающих в ЭПР, таких как фолдинг белков, протеолиз, образование липидных капель. Таким образом, изменения внутриклеточной локализации TRF4 коррелируют с его новыми функциями в ассоциированных с ЭПР процессах. Можно предположить, что *trf4* - пример неофункционализации гомолога путем изменения внутриклеточной локализации белка, при котором релокализация продукта дублированного гена способствовала появлению у него новых функций в процессах, связанных с ЭПР.

Маркерные хромосомы, выявленные у пациентов с интеллектуальной недостаточностью

Лемская Н.А.¹, Телепова А.С.², Романенко С.А.^{1,2}, Максимова Ю.В.^{3,4}, Шорина А.Р.⁴, Юдкин Д.В.¹

¹ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Новосибирск, Россия

⁴ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», Новосибирск, Россия

В случае социально значимых патологий, таких как умственная отсталость, в небольшом проценте случаев выявляются грубые (числовые и структурные) хромосомные aberrации. Однако основная часть визуализируемых хромосомных перестроек нуждается в описании и типировании. Среди них особую позицию занимают Маркерные Хромосомы (МХ). Они могут быть как сверхчисленными по отношению к нормальному кариотипу, так и заменяющими какую-либо хромосому. Малые маркерные хромосомы относительно распространены, встречаются в популяции с частотой 1/4000 и при амниоцентезе с частотой 1/2500. В 86% случаев, маркерные хромосомы происходят из акроцентрических хромосом, в частности 65% происходят из хромосомы 15, в то время как дериваты хромосомы 13, 14, 21 и 22 составляют всего 7%.

Определение природы маркерных хромосом всегда представляет значительные трудности, однако используя микродиссекцию хромосом - микроманипуляционное выделение аномальной хромосомы, с последующим мечением и гибридизацией *in situ*, эта проблема была решена. В случае выявления МХ необходимо установить ее происхождение (возникшие *de novo* и наследуемые) и тип геномной мутации (мозаичные и немозаичные) для того, чтоб понять вероятность появления в семье рецидива кариотипической патологии.

В работе было проанализировано три клинических случая. Выявлены МХ происходящие из хромосом 15 и X. Показано наличие активных генов рРНК и *Xist*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00826).

Поведение хромосом в профазе мейоза у пшенично-ржаных гибридов F₁

Логинова Д.Б., Журавлева А.А. *, Силкова О.Г.

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН

*rogovaja_@mail.ru

Пшенично-ржаные гибриды *Triticumaestivum* L. x *Secalecereale* L. (4x=28) являются хорошей моделью для изучения механизмов мейоза у растений с полигаплоидным геномом. На сегодняшний день нашей группой описаны типы поведения хромосом в мейозе пшенично-ржаных гибридов, в том числе описано деление подобное митозу, которое приводит к формированию нередуцированных гамет и восстановлению фертильности у гибридов. Деление подобное митозу характеризуется митотической организацией центромеры, формированием биполярного веретена деления и расхождением сестринских хроматид в первом делении мейоза. Поведение хромосом в мейозе определяется цепью событий в профазе мейоза. Цель данной работы - провести анализ поведения хромосом в профазных ядрах пшенично-ржаных гибридов F₁ с различными паттернами поведения хромосом в мейозе. Профазные ядра мейоцитов были проанализированы с помощью методик FISH с центромерными и теломерными зондами и иммуноокрашивания с anti-CENH3 у стерильных (2R(2D)xR) и частично фертильных (1Rv(1A)xR, 6R(6A)xR) гибридов. Выявлено, что у стерильных (2R(2D)xR) и частично фертильных (1Rv(1A)xR, 6R(6A)xR) пшенично-ржаных гибридов на стадии лептотены теломеры образовывали структуру «букета», который локализовался вблизи ядрышка, а центромеры имели вытянутую форму и располагались по всей поверхности ядра. Однако, у частично фертильных гибридов были обнаружены мейоциты на стадии лептотены, в которых теломеры распределялись дугообразно, либо объединялись в несколько (чаще всего 2-3) кластеров. Число мейоцитов, в которых наблюдались структуры, отличные от «букета», варьировало между пыльниками. В ядрах мейоцитов, находящихся, предположительно, на стадии перехода к мейотическому делению и в ранней лептотене наблюдалось 10-12 сигналов локализации центромерных зондов, что может свидетельствовать о формировании кластеров центромер, в отдельных случаях число сигналов могло составлять 8, еще реже (единичные случаи) - 7. В интерфазе и на всех стадиях профазы преимущественно наблюдалось 28 сигналов локализации центромерного зонда, но можно было наблюдать и 21 - 27 сигналов. Иммуноокрашивание с anti-CENH3 на стадии лептотены у гибрида 2R(2D)xR выявило его специфическую локализацию на центромерах унивалентных хромосом и центромере бивалента, который был сформирован гомологами ржи 2R2R. Посредством 3D реконструкции ядра было идентифицировано 28 кинетохоров, 26 из них имели вытянутую форму с бороздкой, позволяющей визуально

различить сестринские хроматиды, последние два имели округлую форму (без бороздки) и, плотно прилегая друг к другу, образовывали общую структуру. Локализация anti-CENH3 в первом случае может трактоваться как митотическая (back-to-back), во втором – мейотическая (side-by-side).

Таким образом, нами выявлены особенности в динамике хромосом у пшенично-ржаных гибридов с различными паттернами мейоза, а также обнаружены различия в архитектуре кинетохоров бивалента и унивалентов в профазе мейоза.

Благодарности: ЦКП микроскопического анализа биологических объектов; работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-01014.

Дифференциальная экспрессия генов в нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с задержкой интеллектуального развития и реципрокными микроделециями и микродупликациями в субсегменте 3p26.3

М.Е. Лопаткина¹, В.С. Фишман², М.М. Гридина², Н.А. Скрябин¹, Т.В. Никитина¹,
А.А. Кашеварова¹, Л.П. Назаренко¹, О.Л. Серов², И.Н. Лебедев¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ, наб. реки Ушайки, 10, Томск, Россия, 634050

²Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, пр. ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, Россия, 630090

Актуальность. Активно изучаемые в настоящее время синдромы реципрокных микроделений и микродупликаций обусловлены микроструктурными аберрациями хромосом и характеризуются разнонаправленным изменением копийности одного и того же участка ДНК [Crespi V. et al., 2009]. Изучение данных заболеваний дает возможность проследить, как влияет на фенотип пациента увеличение или уменьшение числа копий определенных генов, и сделать предположение об их роли в патогенезе хромосомного синдрома. Исследование случаев реципрокных микроделений и микродупликаций, затрагивающих единственный ген, позволяет детальнее изучить патогенез данных состояний.

В наших предварительных исследованиях пациентов с идиопатическими интеллектуальными расстройствами было выявлено два случая уникальных реципрокных хромосомных мутаций в регионе 3p26.3 [Kashevarova A.A. et al., 2014]. В области перестройки был локализован единственный ген *CNTN6*, экспрессирующийся преимущественно в ЦНС и рассматриваемый в настоящее время в качестве кандидатного гена для интеллектуальных нарушений, аутизма, синдрома дефицита внимания и гиперактивности, шизофрении и биполярного расстройства [Oguro-Ando A. et al., 2017]. Настоящее исследование было направлено на полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с интеллектуальными расстройствами и дупликацией и делецией гена *CNTN6*.

Материалы и методы. Две линии ИПСК от одного пациента с дупликацией *CNTN6*, две линии ИПСК от пациента с делецией *CNTN6* и три линии ИПСК, полученные от двух здоровых индивидов с нормальным кариотипом, были дифференцированы в кортикальные нейроны. Выделенная из полученных нейронов РНК была использована для

полнотранскриптомного анализа на микрочипах SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K Microarray Kit (Agilent Technologies, США). Полученные результаты были использованы в биоинформационном анализе с использованием пакета limma [Ritchie et al., 2015] и уровнем значимости (FDR) 0.05; уровни экспрессии в сравниваемых группах отличались минимум в 2 раза. Для выявления функциональных групп генов был проведен анализ обогащения генов с помощью ресурса WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit.

Результаты. Сравнение уровней экспрессии генов в группе «дупликация *CNTN6* – норма» выявило 384 гипер- и 3138 гипоэкспрессирующихся генов. Было показано, что продукты гиперэкспрессирующихся генов участвуют в регуляции системных процессов, сенсорной чувствительности, детекции химических стимулов, регуляции уровней липопротеинов и обратном транспорте холестерина. Сниженная экспрессия была характерна для генов, продукты которых вовлечены в процессы внутриклеточного транспорта, катаболизм макромолекул, процессинг РНК и организацию генетического материала митохондрий.

Сравнение уровней экспрессии в группе «делеция *CNTN6* – норма» выявило 338 гипер- и 803 гипоэкспрессирующихся гена. Анализ обогащения показал, что продукты гиперэкспрессирующихся генов вовлечены в регуляцию репликации вирусного генома, реакции на вирусную инвазию и ответа на внешние раздражители. Продукты гипоэкспрессирующихся генов участвуют в развитии и формировании нервной системы, нейрогенезе, генерации и дифференцировке предшественников нейронов, регуляции клеточного сигналинга и постсинаптического мембранного потенциала.

В ходе работы были выявлены гены, одинаково изменяющие свою экспрессию как в нейронах с дупликацией, так и в нейронах с делецией гена *CNTN6* (25 гипер- и 402 гипоэкспрессирующихся гена). Продукты гиперэкспрессирующихся генов участвуют в таких биологических процессах, как агрегация, активация и пролиферация Т-клеток, положительная регуляция иммунного ответа, фагоцитоза и уровней липопротеинов в плазме. Продукты гипоэкспрессирующихся генов вовлечены в связанные с развитием ЦНС процессы. Примечательно, что экспрессия 51 гена была снижена в нейронах с делецией и повышена в нейронах с дупликацией *CNTN6*. Продукты данных генов участвуют в ответе на стероидные и глюкокортикоидные гормоны, регулируемом экзоцитозе, развитии костей, регуляции клеточной адгезии и катаболизме липидов мембраны.

Выводы. Наличие множественных фенотипических проявлений у пациентов с хромосомными мутациями в субсегменте 3p26.3, затрагивающими экспрессирующийся в головном мозге ген *CNTN6*, на фоне отсутствия изменений копийности других генов указывает на плейотропное действие данного гена. Примечательно, что нарушение копийности *CNTN6* влияет на изменение экспрессии целого ряда других генов,

непосредственно не вовлеченных в перестройку. При этом продукты данных генов участвуют в ключевых для развития мозга биологических процессах. В дальнейшем, проведение более тщательного анализа поможет сузить круг дифференциально экспрессирующихся генов, что позволит детальнее изучить молекулярные и клеточные механизмы патогенеза данных реципрокных синдромов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ «Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза хромосомных болезней» (№ 14-15-00772).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОАКТИВАТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ НА ТРАНСПОРТ мРНК НА МОДЕЛИ ЭКДИЗОН-ИНДУЦИРУЕМОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Мазина М.Ю.^{1*}, Воробьева Н.Е.¹

¹ - Группа динамики транскрипционных комплексов, ФГБУН Институт биологии гена РАН, г. Москва.

* - magadovam@yandex.ru

Ранее в своей работе мы описали ранне-поздние гены экдизонового каскада *DHR3* и *Hr4* как удобную модельную систему для транскрипционных исследований в культуре клеток S2 дрозофилы [1]. С использованием данной модели для первых 20 минут с момента активации транскрипции мы изучили кинетику привлечения 20 коактиваторных комплексов на промоторы генов *DHR3* и *Hr4*, определили кинетику изменений, вносимых ими в хроматин, и оценили влияние коактиваторов на связывание с промоторами *DHR3/Hr4* и фосфорилирование РНК-полимеразы II [2]. Появление мРНК *DHR3/Hr4* активируемых генов в цитоплазме происходит в ходе более поздних этапов активации транскрипции (>20 минут с момента активации). Так как для некоторых коактиваторов транскрипции известно участие в транспорте мРНК активируемых генов в цитоплазму [3], нас заинтересовала возможность исследования влияния коактиваторов транскрипции на транспорт мРНК активируемых генов нашей модельной системы. Мы провели активацию транскрипции генов *DHR3* и *Hr4* на фоне РНК-интерференции коактиваторов транскрипции и выделили ядерную и цитоплазматическую мРНК до активации и через 30 и 60 минут после активации транскрипции 20-гидроксиэкдизоном. Ранее мы показали, что большинство изучаемых нами коактиваторов транскрипции влияют на уровень транскрипции модельных генов [2], поэтому для оценки влияния коактиватора на транспорт мРНК мы сравнивали соотношение мРНК цитоплазма/ядро в контрольных клетках и клетках с нокаутом (РНК-интерференцией) коактиваторов. Мы обнаружили, что все исследованные коактиваторы транскрипции в различной степени необходимы для нормального транспорта мРНК активируемых генов из ядра в цитоплазму. Наибольшее влияние на транспорт мРНК (снижение соотношения мРНК цитоплазма/ядро через 30 и 60 минут после активации в 2 и более раз) продемонстрировали комплексы, модифицирующие хроматин (Set1, DART1), и комплексы, участвующие в элонгации транскрипции (NELF, FS(1)h/Brd4, DSIF). В будущем мы планируем проверить описанные данные с использованием альтернативных методов (РНК-FISH).

Данная работа поддержана грантом Президента РФ для государственной поддержки молодых кандидатов наук МК-5803.2018.4.

1. Mazina, M. Yu., Nikolenko, J. V., Fursova, N. A et al. (2015) Early-late genes of the ecdysone cascade as models for transcriptional studies. *Cell Cycle*, 14 (22): 3593-601.
2. Mazina M. Yu., Kovalenko E. V., Derevyanko P. K. et al. (2018) One signal stimulates different transcriptional activation mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1861 (2): 178-189.
3. Kurshakova M. M., Krasnov A. N., Kopytova D. V. et al (2007) SAGA and a novel *Drosophila* export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J*, 26 (24): 4956-65.

Молекулярные механизмы активации транскрипции экдизон-зависимых генов

Мазина М.Ю.¹, Коваленко Е.В.¹, Миронов И.Д.¹, Николенко Ю.В.², Краснов А.Н.², Воробьева Н.Е.¹

¹ Группа динамики транскрипционных комплексов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, Москва, Россия, 119334

² Группа изучения связи транскрипции и транспорта мРНК, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, Москва, Россия, 119334

Адрес для корреспонденции: vorobyeva@genebiology.ru

Молекулярные механизмы активации транскрипции до сих пор остаются недостаточно исследованными для большинства генов дрозофилы. Общая цель исследований нашей научной группы является создание детальной экспериментальной модели активации транскрипции экдизон-зависимых генов. В модельной системе, разработанной нами для S2 клеток дрозофилы мы обнаружили, что экдизон-зависимая активация представляет собой совокупность процессов стимуляции этапов инициации и элонгации транскрипции (механизмы рекрутирования РНК полимеразы II и механизм паузы РНК полимеразы II). Нами была описана роль ряда комплексов-коактиваторов транскрипции сначала для двух модельных экдизон-зависимых генов дрозофилы, а затем и для других генов. Мы обнаружили, что экдизон-зависимые гены S2 клеток, не смотря на их неактивный статус, находятся в состоянии высокой степени готовности к будущей транскрипции генов. Их промотор и другие регуляторные элементы содержат значительное количество всех исследованных нами коактиваторов в неактивном состоянии гена. Активация транскрипции приводит к незначительному росту уровня связывания большинства коактиваторов с регуляторными элементами экдизон-зависимых генов. Часть полученных нами результатов была подтверждена в экспериментах на уровне организма (в сравнительных исследованиях различных стадий развития дрозофилы). Оказалось, что экдизон-зависимые гены в процессе развития также, как и в S2 клетках продолжают активно использовать механизм паузы РНК полимеразы II для своей регуляции. Их активация на стадиях развития, сопровождающихся пиком экдизона, протекает не за счет стимуляции рекрутирования дополнительного количества РНК полимеразы II, а за счет стимуляции фосфорилирования соответствующего фермента. Мы связываем данный эффект с особой ролью экдизоновых генов в развитии. Действительно, данные гены многократно активируются и репрессируются в процессе онтогенеза. Механизм паузы РНК полимеразы II по-видимому является предпочтительным типом регуляции генов подобного типа. Данная работа была поддержана грантом РФФИ №17-04-01713, работа Мазиной М.Ю. была поддержана грантом Президента РФ для молодых кандидатов наук МК-5803.2018.4.

Воздействие малого белка теплового шока Hsp67Bc на приспособленность *Drosophila melanogaster* в нормальных и стрессовых условиях

Малькеева Д.А., Фёдорова С.А., Киселева Е.В.

ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск

Белки теплового шока (HSP) – класс белков, экспрессия которых, как правило, усиливается при воздействии на организм стрессовых факторов, и основными функциями которых являются фолдинг белков, предотвращение их агрегации и устранение белков с неправильной конформацией и их агрегатов. HSP присутствуют у всех живых организмов и необходимы для поддержания их жизнеспособности как в стрессовых, так и в нормальных условиях окружающей среды. Hsp67Bc относится к семейству малых HSP, основной функцией которых является предотвращение агрегации повреждённых белков для их последующего фолдинга другими HSP. Hsp67Bc является функциональным ортологом HSPB8 человека и участвует в процессе макроаутофагии (Carra et al., 2010). По сравнению с такими малыми HSP как Hsp22 и Hsp27 белок Hsp67Bc остаётся мало изученным, и его дальнейшее исследование представляет большой интерес.

Посредством неточного вырезания *P*-элемента из области промотора гена *hsp67Bc* нами была получена линия *D. melanogaster* с почти полной делецией этого гена. У полученных мух наблюдалось более резкое снижение плодовитости в нормальных условиях (25 °C) и при повышенной температуре (29 °C) по сравнению с контрольной линией (*D. melanogaster*, полученных из той же линии мух с *P*-элементом, у которых в процессе его вырезания соседние участки ДНК не были затронуты). Так, 4-дневные самки с делецией *hsp67Bc* в нормальных условиях откладывали в среднем по 13,2 яйца в сутки, тогда как для контроля это значение составляло 17,2 яйца/сут; через 3 недели эти значения составили 2,9 и 12,6 яйца/сут, соответственно. Таким образом, плодовитость самок, не экспрессирующих *hsp67Bc*, снизилась за это время в 4,5 раза, а контрольных мух – в менее чем 1,4 раза. При 29 °C плодовитость самок за 2 недели с делецией снизилась с 16,4 яйца/сут у 4-дневных мух до 1,6 (примерно в 10 раз), в то время как у контроля – с 22,0 до 6,4 (менее чем в 3,5 раза). При этом продолжительность жизни мух с делецией *hsp67Bc* была достоверно выше, чем у контроля. При повышенной температуре она составила 30,9±6,4 дня у самок и 28,4±5,6 дня у самцов с делецией по сравнению с 23,6±8,7 дня у контрольных самок и 18,4±6,0 дня у самцов ($p < 2,7 \times 10^{-7}$ для самок и $p < 2,8 \times 10^{-17}$ для самцов). В нормальных условиях продолжительность жизни самок с делецией *hsp67Bc* составила 64,3±14,3 дня, самцов – 66,3±12,0 дня, тогда как в контроле эти значения составили 46,9±13,7 и 46,6±9,8 дня, соответственно ($p < 1,4 \times 10^{-10}$ для самок и $p < 1,7 \times 10^{-17}$ для самцов). Нами также было

проведено исследование выживаемости мух в условиях окислительного стресса (на корме, содержащем 3% пероксида водорода). У *D. melanogaster* с делецией наблюдалась устойчивая тенденция к снижению продолжительности жизни по сравнению с контрольной линией: $2,2 \pm 0,6$ дня по сравнению с $2,6 \pm 0,8$ дня.

Таким образом, отсутствие гена, кодирующего малый белок теплового шока Hsp67Bc, улучшает приспособленность мух *D. melanogaster* в условиях мягких продолжительных физиологических стрессов, но усиливает их чувствительность к острым стрессовым воздействиям.

Carra S., Boncoraglio A., Kanon B., Brunsting J. F., Minoia M., Rana A., Vos M. J., Seidel K., Sibon O. C., Kampinga H. H. 2010. Identification of the *Drosophila* ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases. *J. Biol. Chem.* 285 : 37 811—37 822.

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОВ СПЕРМАТОГЕНЕЗА И ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА У СЛЕПУШОНОК (*ELLOBIUS, RODENTIA*), УТРАТИВШИХ Y ХРОМОСОМУ

Матвеевский С.Н.¹, Коломиец О.Л.¹, Богданов А.С.², Ахвердян М.Р.³, Баклушинская И.Ю.²

MALE-SPECIFIC GENES RESCUE AND FEATURES OF MEIOSIS IN MOLE VOLES (*ELLOBIUS, RODENTIA*) LACKING A Y CHROMOSOME

Matveevsky S., Kolomiets O., Bogdanov A., Hakhverdyan M., Bakloushinskaya I.

¹Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

²Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

³National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden

irina.bakl@gmail.com

Половые хромосомы слепушонок *Ellobius* демонстрируют необычайно широкий для млекопитающих спектр эволюционных изменений: классические XY♂ / XX♀; атипичные X0♂ / X0♀, и уникальные, известные только для слепушонок XX♂ / XX♀. Для реконструкции эволюционной истории рода *Ellobius* были проанализированы особенности поведения половых хромосом в мейозе и отсекуены фрагменты гена *Sry* (sex-determining region Y), гена фактора сперматогониальной пролиферации *Eif2s3y*, находящегося у прочих видов млекопитающих на Y хромосоме, а также его гомолога, расположенного на X хромосоме *Eif2s3x*, для всех пяти видов рода. В соответствии с предыдущими исследованиями (Just et al., 1995; Mulugeta et al., 2016) нами не было выявлено какой-либо *Sry*-подобной последовательности для самцов и самок всех видов, утративших Y хромосому: *E. lutescens*, *E. tancrei*, *E. talpinus* и для не изученных ранее *E. alaicus*. Впервые показано наличие высококонсервативного фрагмента (HMG box) гена *Sry* не только у самцов, но и у самок *E. fuscicapillus*. Короткие фрагменты HMG box (138 п.н.) обнаружены во всех исследованных образцах *E. fuscicapillus* за исключением одной самки; фрагменты большей длины (203 п.н.), т.е. полный HMG box, выявлен у другой самки. По-видимому, *Sry* представлен в геноме и самцов, и самок этого вида несколькими копиями и, возможно, перешел в состояние псевдогена. Ранее было показано, что *E. fuscicapillus*, единственный вид слепушонок, сохранивший Y хромосому, имеет ген *Sry* только у самцов, что характерно для большинства видов млекопитающих (Just et al., 1995). По-видимому, тогда в анализе были использованы образцы самки, не имевшей в геноме копии этого гена. Судя по нашим данным по изменчивости гена *Sry* и данным по делеции в структуре энхансера гена *Sox9* у *E. fuscicapillus* (Bagheri-Fam et al., 2012), оба гена, являющиеся ключевыми для детерминации пола у плацентарных, могут быть не функциональными у *E. fuscicapillus*. Для гена фактора сперматогониальной пролиферации *Eif2s3y* и его гомолога *Eif2s3x* нами не было выявлено

различий для самцов и самок одного вида, но показаны межвидовые различия.

Реконструкция филогенетических отношений пяти видов слепушонок рода *Ellobius* методом байесовской оценки обратной вероятности по данным секвенирования фрагмента гена *Eif2s3y* показывает хорошую поддержку ветвления для всех видов рода *Ellobius* с четким разделением на два кластера, соответствующих современным под родам. Мы предполагаем, что Y хромосома была потеряна слепушонками дважды, независимо в под родах *Bramus* и *Ellobius*, а не у общего предка всех видов слепушонок, как полагают Mulugeta et al. (2016); единственным общим для всех слепушонок событием была делеция в структуре энхансера гена *Sox9*. После этого в одной эволюционной ветви (под род *Ellobius*) произошла транслокация фрагмента Y хромосомы без гена *Sry*, затем Y хромосома была утрачена, а X хромосома – дублирована. В настоящее время у видов этой ветви, т.е. у *E. talpinus*, *E. tancrei* и *E. alaicus*, наблюдается полный синапсис XX хромосом в мейозе самок и частичный – у самцов. В под роде *Bramus* фрагмент Y хромосомы с геном *Sry* был дублирован и транслоцирован на X хромосому, это подтверждается наличием гена *Sry* у самок *E. fuscocapillus*. Возможно, что у второго вида под рода *Bramus*, *E. lutescens*, транслоцированный фрагмент был меньше, и не содержал гена *Sry*, в результате после утраты Y хромосомы в геноме самок и самцов обнаружены лишь другие гены (*Eif2s3y*, *Usp9y*, *Ssty*), обычно локализованные на Y хромосоме (Mulugeta et al., 2016, Matveevsky et al., 2017). Независимость перестроек половых хромосом у слепушонок подтверждают и описанные ранее различия морфологии X хромосом (Kolomiets et al., 1991). Субметацентрические X хромосомы *E. fuscocapillus* и *E. lutescens* отличаются по рисунку G-band как между собой, так и от акроцентрических X хромосом *E. tancrei*, *E. talpinus* и *E. alaicus*. В отличие от других видов млекопитающих, половые XY хромосомы *E. fuscocapillus* претерпевают ранний полный десинапсис во время профазы I. У *E. lutescens*, в зиготенепакитене осевые элементы утолщаются и на единственной X хромосоме формируются шпильки, в которых видны участки, сходные по структуре с синаптонемным комплексом. У самцов всех видов слепушонок в профазе мейоза I формируются половые тельца, характерные для млекопитающих.

Возникновение видоспецифических особенностей мейоза, как мы полагаем, стало одним из ключевых событий эволюции слепушонок, геном которых подвержен дестабилизации из-за значительной изменчивости половых хромосом, генов детерминации пола и аутосом.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 17-04-00618 и № 15-29-02649.

Белки CP60 и BEAF подвергаются посттрансляционной SUMO-модификации

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.34/5

В геноме *Drosophila melanogaster* белки CP60 и BEAF часто обнаруживаются на границах транскрипционных доменов. Однако в настоящее время функциональная роль белков CP60 и BEAF фактически не описана. Очень мало известно об их белковых партнёрах и практически нет данных о механизме и значении их посттрансляционной модификации.

Посттрансляционная модификация белков необходима для успешного протекания многих клеточных процессов. Она регулирует функции белков, изменяя их способность связываться с другими белками или влияя на их стабильность и внутриклеточную локализацию. Ковалентная модификация белков является быстрым и энергетически выгодным механизмом обратимого изменения функции белка. Среди эукариот широко распространена посттрансляционная модификация белков-субстратов белками, относящимися к семейству убиквитина. Недавно были открыты белки SUMO (от *Small Ubiquitin like Modifier*), которые также участвуют в посттрансляционной модификации белков. Важнейшими ядерными субстратами для SUMO-модификации (сумолирования) являются транскрипционные факторы.

Ранее было доказано, что включение белка Mod(mdg4)-67.2 в состав «инсуляторных телец» – внутриядерных скоплений белков Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса – полностью зависит от процесса его сумолирования, а ключевую роль в образовании «инсуляторных телец» играет белок CP190.

Проведённый нами анализ распределения белков CP60 и BEAF в S2 клетках показал, что как и белки Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса, они образуют дискретные скопления внутри ядра. Такие скопления частично, но не полностью, колокализуются с белком CP190, маркирующим «инсуляторные тельца». Мы предположили, что, как и белки Su(Hw)-инсулятора, CP60 и BEAF могут привлекаться в состав регуляторных комплексов посредством сумолирования.

Для проверки этого предположения в дрожжевой двугибридной системе (ДДС) мы протестировали взаимодействие белков CP60 и BEAF с белком Ubc9, E2-лигазой, осуществляющей перенос SUMO к целевому белку. Мы показали, что белки CP60 и BEAF способны напрямую взаимодействовать с белком Ubc9. Для взаимодействия белка BEAF с белком Ubc9 необходима последовательность BEAF от 200 до 280 ак. Для осуществления взаимодействия между белками CP60 и Ubc9 необходима последовательность CP60 от 420

до 440 ак. Далее с помощью методов биоинформатики в составе аминокислотных последовательностей белков CP60 и BEAF, необходимых для их взаимодействия с белком Ubc9, были найдены отдельные консенсусные последовательности, близкие по структуре к каноническим сайтам сумолирования. Затем мы создали конструкции с точечными мутациями в этих последовательностях, и с помощью ДДС доказали их роль во взаимодействии с белком Ubc9. Кроме того, оказалось, что мутации в консенсусных сайтах сумолирования приводят к частичной потере способности белков CP60 и BEAF димеризоваться.

Таким образом, нами впервые получены принципиально новые данные о механизме прямого взаимодействия белков CP60 и BEAF с белком Ubc9, т.е. о возможности посттрансляционной модификации белков CP60 и BEAF белками SUMO. Мы предполагаем, что с помощью SUMO-конъюгации белки CP60 и BEAF могут включаться в состав внутриядерных белковых конгломератов – «спеклов». В спеклах происходит предварительная сборка регуляторных комплексов, в работе которых участвуют CP60 и BEAF. И уже в таком преассоциированном состоянии в определённой ткани и на нужной стадии развития белковый комплекс привлекается на специфичные сайты ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ – проект № 16-04-00580-а.

Proteins CP60 and BEAF are posttranslationally modified by SUMO protein

Melnikova L.S., Golovnin A.K., Kostyuchenko M.V., Molodina V.V.

Динамика нестабильности кольцевых хромосом при репрограммировании соматических клеток

Никитина Т.В.¹, Васильев С.А.^{1,2}, Распопова М.А.³, Мензоров А.Г.^{4,5}, Кашеварова А.А.^{1,2}, Хабарова А.А.⁴, Гридина М.М.⁴, Яковлева Ю.С.^{1,3}, Лебедев И.Н.^{1,3}

¹ – НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, г. Томск

² – Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ – Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

⁴ – ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

⁵ – Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Введение. Возникающие в результате слияния двух концов одной хромосомы кольцевые хромосомы характеризуются повышенной митотической нестабильностью, степень которой зависит от размера хромосомы, генного состава делецированного региона и структуры (последовательности) сайтов разрыва. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) отличаются сниженным порогом перехода к апоптозу или дифференцировке при нарушениях целостности генома, слабостью митотических контрольных точек и репарацией двуцепочечных разрывов преимущественно по механизму гомологичной рекомбинации. Сочетание этих особенностей может приводить к повышенной нестабильности наследования кольцевых хромосом в ряду клеточных поколений в ИПСК, поэтому целью данного исследования было оценить стабильность кариотипов в линиях ИПСК с кольцевой хромосомой.

Материал и методы. Материалом исследования послужили фибробласты пациента с кариотипом 46,XY(r13) и полученные из них шесть линий ИПСК. Репрограммирование осуществляли путем экзогенной экспрессии транскрипционных факторов KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC человека с использованием лентивирусных векторов LeGO. В качестве фидера при выращивании ИПСК использовали инактивированные эмбриональные фибробласты мыши, применяли механическое пассирование. Кариотип клеток устанавливали при стандартном GTG-анализе, а также с помощью метафазной и интерфазной FISH с центромероспецифичным зондом 13/21 и зондом на дистальную часть длинного плеча хромосомы 13 (13q34), находящимся в области делеции (RP11-569D9).

Результаты. В фибробластах был обнаружен значительный по частоте клон клеток с моносомией по хромосоме 13 (38-54% клеток на разных пассажах). Дисомные клетки составляли 62-45% (по данным интерфазной FISH), однако метафазный анализ позволил установить, что от 8% до 31% таких клеток несли не кольцевую хромосому, а ее дериват – небольшой центромерный фрагмент (маркерную хромосому).

Кариотипы шести полученных линий ИПСК оказались весьма различными. В линии iTAF6rc4 преобладали клетки с маркерной хромосомой (86-46%), частота клеток с кольцевой 13 варьировала от 5% до 44% на разных пассажах, с незначительным содержанием моносомных клеток (менее 9%). Линия iTAF6rc6 на 13 и 17 пассажах состояла преимущественно из клеток с кольцевой хромосомой 13 (80-88%) и клеток с кариотипом 45,XY,-13 в качестве минорного класса, маркерные хромосомы в этой линии не были обнаружены. 95% клеток из линии iTAF6rc13 на 11 пассаже несли маркерную хромосому – дериват хромосомы 13 – при полном отсутствии клеток с r(13). Учитывая клональное происхождение линий ИПСК, возможно, данная линия произошла от исходной клетки с маркерной хромосомой, либо фрагментация кольцевой хромосомы имела место в процессе репрограммирования или на ранних пассажах. В линии iTAF6rc23 на 6 и 14 пассажах преобладали клетки с кольцевой хромосомой 13 (65-82%), клетки с маркерной хромосомой зарегистрированы только на ранних пассажах. Линия iTAF6rc25 на 3 и 7 пассажах отличалась низкой частотой клеток с кольцевой хромосомой, преобладающими были клетки с кариотипами 46,XY,-13,+mar и 45,XY,-13, на 13 пассаже клетки с кольцевой хромосомой не зарегистрированы. В линии iTAF6rc36 большинство содержало маркерную хромосому (58%), далее по частоте встречаемости шли моносомные клетки (25%), а клетки с кольцевой хромосомой были редкими (5%).

Заключение: Кольцевая хромосома 13 нестабильна при репрограммировании и/или на ранних пассажах в ИПСК, причем может происходить как потеря кольцевой хромосомы, так и ее фрагментация.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10231.

Влияние генетического фона в линиях дрозофилы на результаты исследований на примере линии #6458 из Bloomington Drosophila Stock Center

The influence of genetic background in Drosophila fly lines on results on example of line #6458 from Bloomington Drosophila Stock Center

Огиенко А.А.¹, Яринич Л.А.¹, Федорова Е.В.², Лебедев М.О.¹, Андреева Е.Н.¹, Пиндюрин А.В.^{1,2} и Баричева Е.М.²

¹ - Лаборатория клеточного деления, Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

² - Лаборатория механизмов клеточной дифференцировки, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

Миграция бордюрных клеток (БК) в ходе оогенеза дрозофилы является популярной моделью для изучения инвазивной миграции эпителиальных клеток *in vivo*. Одним из инструментов для изучения этого процесса является драйвер *slbo-Gal4* в составе линии #6458 из Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC). Этот драйвер позволяет направленно индуцировать экспрессию целевых генов в БК, и часто используется для маркирования этих клеток в ходе их миграции. В настоящей работе было обнаружено, что трансген, несущий *slbo-Gal4* драйвер, в линии #6458 локализуется в гене *chickadee (chic)*, который кодирует актин-связывающий белок Profilin, задействованный в миграции клеток. Наличие трансгена в гене *chic* приводит к нуль-мутации последнего, летальной в гомозиготе. Чтобы понять какой эффект эта нуль-мутация, названная *chic⁶⁴⁵⁸*, может оказывать на миграцию БК мы проанализировали этот процесс у мутантов по гену *twinfilin (twf)*, также кодирующему актин-связывающий белок. Оказалось, что добавление мутации *chic⁶⁴⁵⁸* к гетероаллельным комбинациям по гену *twf* (*twf^{EP3701}/twf^{A10}* и *twf^{EP3701}/twf^{A02}*) значительно «спасает» эффект мутаций по гену *twf*. При использовании новых драйверов *slbo-Gal4*, полученных в ходе данной работы, в которых трансген *slbo-Gal4* интегрирован в другие районы генома, спасение фенотипа мутаций по гену *twf* не происходит. Это указывает на то, что гены *twf* и *chic* взаимодействуют в ходе миграции БК, при этом действуют антогонистически.

В дополнение к трансгену *slbo-Gal4*, встроенному в ген *chic*, линия #6458 несет еще два идентичных трансгена UAS-GFP вместо ожидаемого одного. При этом геномная локализация ни одного из трансгенов UAS-GFP не совпадает с ожидаемой, основанной на имеющемся ранее описании линии #6458. Кроме того,стройка одного из трансгенов UAS-GFP, ассоциирована с геномной дупликацией размером ~14,5 т.п.н, затрагивающей пять генов, уровень экспрессии которых может быть нарушен. Мы обнаружили точно такую же

комбинацию двух идентичных трансгенов UAS-GFP в линии #1521 из BDSC, которая, по-видимому, является исходной для нескольких разных линий, включая #6458.

Таким образом, в нашей работе было показано, что линия #6458 из BDSC имеет более сложный генетический состав, чем считалось ранее. Наши данные о том, что мутация *chic*⁶⁴⁵⁸ в линии #6458 в некоторых случаях может значительно влиять на результаты исследований биологии БК, подчеркивают необходимость подробного описания используемых в работе трансгенных линий мух. Наше исследование представляет собой конкретный пример более общей проблемы, заключающейся в том, что любое изменение генома (включая инсерции трансгенных конструкций) является мутацией, потенциально способной оказывать эффект на изучаемый процесс.

Изучение рекрутирования TRF2 на промоторы генов

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

Институт биологии гена РАН, Москва

Транскрипция является одним из важнейших этапов реализации генетической информации. В процессе транскрипции выделяют 3 стадии - инициацию, элонгацию и терминацию. В классическом случае инициация транскрипции включает в себя рекрутирование базальных факторов транскрипции на коровую часть промотора, которое в свою очередь начинается со связывания TBP (TATA-binding protein) с TATA-боксом. Однако, только около 30% РНК-полимераза II-зависимых генов у *D. melanogaster* имеют TATA-бокс. Паралоги TBP, такие как TRF1 (TBP-related factor 1) и TRF2, могут замещать TBP, формируя альтернативные комплексы. TRF1 связывает подобные TATA-боксу последовательности и вместе с Brf1 регулирует транскрипцию с РНК-полимераза III-зависимых промоторов. TRF2 определяет работу большей части генов домашнего хозяйства, в частности связанные с репликацией, клеточным циклом и белками рибосом. Однако, в отличие от TBP и TRF1, TRF2 не обладает ДНК-связывающей активностью, поэтому его рекрутирование на промотор осуществляется за счёт взаимодействий с ДНК-связывающими белками. Согласно литературным данным, известно лишь несколько из них – белки DREF и M1BP.

Ген *trf2* кодирует две белковые изоформы – «короткую» и «длинную». Длинная изоформа отличается от короткой наличием дополнительного протяжённого N-концевого домена. Чтобы выявить новые возможные рекрутеры TRF2 на промоторы генов нами был осуществлён скрининг в дрожжевой двугибридной системе фрагментов TRF2 против библиотеки белков с цинковыми пальцами (ZnF). Мы обнаружили, что TRF2 способен взаимодействовать с множеством ZnF-белков как посредством C-концевого домена, общего для обеих изоформ, так и через специфичный для длинной изоформы N-концевой домен. Это предполагает, что две изоформы TRF2 могут рекрутироваться на промоторы разными наборами ДНК-связывающих транскрипционных факторов и составлять разные комплексы. С другой стороны, длинный N-концевой домен не консервативен среди *Drosophilidae* и состоит из повторов, что свидетельствует о его недавнем возникновении в эволюции.

Для выяснения необходимости для выживания и функциональности взаимодействующих доменов TRF2 нами была получена с помощью системы редактирования генома CRISPR/cas9 линия мух, позволяющая заменять последовательность гена различными производными.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-24-00166.

Выделение древней ДНК, секвенирование, генотипирование и видовая идентификация некоторых представителей древних кошачьих

Осипов Г.В.¹, Васильев С.К.⁴, Тиунов М.П.², Гимранов Д.О.³, Уфыркина О.В.², Воробьева Н.В.¹, Дружкова А.С.¹, Графодатский А.С.¹.

¹Институт молекулярной и клеточной биологии, СО РАН, Новосибирск

²ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток

³Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург

⁴Институт археологии и этнографии, СО РАН, Новосибирск

В настоящее время в лабораториях по всему миру ведется исследование геномов различных животных, являвшихся предшественниками современных видов. Довольно интересным представляется изучение филогении и популяционной генетики хищных видов, в частности, относящихся к семейству кошачьих (Felidae). Прежде чем лидирующее место в пищевой цепи занял человек, дикие кошки являлись самыми опасными и успешными хищниками из наземных млекопитающих. В настоящее время, однако, ДНК древних кошачьих фактически не изучена.

В данной работе мы выделили ДНК из 10 костных образцов представителей семейства кошачьих, датированных, в основном, поздним плейстоценом. Образцы были получены на Алтае, в Красноярском крае и на Дальнем Востоке. После выделения древней ДНК и получения индексированных библиотек для секвенирования нового поколения, была проведена процедура обогащения целевыми фрагментами с использованием биотинилированной митохондриальной ДНК современной рыси иммобилизованной на магнитные микросферы со стрептавидином. После отбора по длине и квантификации библиотек, проведено секвенирование на платформе Illumina MiSeq. Полученные прочтения прошли отбор по качеству, удаление контаминаций и выравнивание на референсные мт-геномы. Данные секвенирования полных митохондриальных геномов были использованы для генотипирования и видовой идентификации древних кошачьих, а также для установления филогенетических взаимоотношений с современными представителями этих семейств.

Согласно результатам филогенетического анализа последовательностей мтДНК, выделенных из костных образцов древних кошачьих возрастом 30-35 тыс. лет, установлено, что образцы №1-8, обнаруженные в низовье р. Чумыш (Алтайский край), принадлежат к пещерным львам. Также наши данные подтверждают выводы Росса Барнетта с соавт. о том, что пещерные львы являются отдельным видом, а не подвидом современных львов. Образец №9 является представителем базальной линии бенгальских кошек северной (индокитайской) ветви, о чем свидетельствует его соответствующее положение на филогенетическом древе. На основе базального положения образца на филогенетическом древе по отношению к современным леопардам установлена видовая принадлежность образца №10 – он принадлежит к ветви современного леопарда, но является представителем предковой популяции.

Тандемные повторы в геноме китайского хомячка (*Cricetulus griseus*) и близких видов
Остромышенский Д.И.^{1}, Иванова Н.Г.¹, Вакурин А.А.², Картавцева И.В.², Подгорная О.И.^{1,3}*
¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН,
Владивосток; ³СПбГУ, Санкт-Петербург
* necroforus@gmail.com

Тандемные повторы (ТП, или сателлитная ДНК) являются главной частью конститутивного гетерохроматина и составляют 10-20% генома млекопитающих. Несмотря на такое обилие в геноме и критические функции для клетки, которые, по всей видимости, выполняют ТП, они являются наименее изученным компонентом генома. Известно, что ТП являются крайне переменными, вплоть до видоспецифичности. Для наблюдений за быстрой изменчивостью ТП в качестве модельного организма использовали виды-двойники: китайского хомячка (китайский хомячок) *Cricetulus griseus* (2n=22) (лабораторная линия биоресурсной коллекции ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) и барабинский хомячок *C. barabensis* (2n=20), а также филогенетически далекий - золотистый хомячок *Mesocricetus auratus* (2n=44). Кариотип *C. griseus* представлен 11 парами хромосом хорошо различающимися по размеру и строению, что позволяет дифференцировать пары крупных и средних по размеру хромосом без дифференциального окрашивания.

Ранее разработанные методы (Komissarov et al., 2011; Михеев и др., 2015) позволили нам *in silico* найти ТП в трех сборках генома *C. griseus*, доступных в базах данных. В результате работы, была дана оценка содержания семейств ТП в геноме путем выравнивания исходных ридов полногеномного секвенирования *C. griseus*, доступных в базах данных, на найденные поля ТП. Всего найдено около 100 семейств ТП. Для дальнейшего анализа использовали ТП, найденные в геномной сборке Cgr1.0 (WGS project APMK01), сделанной на основе секвенирования ДНК сортированных хромосом, что позволило предсказать распределение ТП по хромосомам. Идентичность семейства CG-33A и клонированного ТП SAU1.5. (Faravelli et al., 1998) подтверждает адекватность параметров поиска ТП.

Предсказания биоинформатики нуждаются в проверке *in situ*. С помощью FISH (флуоресцентной гибридизации *in situ*) 11 наиболее представленных в геноме ТП картировали на хромосомах *C. griseus*. Для гибридизации использовали короткие синтетические одноцепочечные олигонуклеотидные зонды, специфичные для каждого исследуемого семейства ТП. Распределение сигнала для всех исследованных семейств ТП сильно отличалось от предыдущих изученных в нашей группе животных (домовая мышь, свинья, сирийский хомяк). Все зонды к ТП, кроме одного (CG-24B) дают сильный сигнал в центромерном (ЦЕН) районе 5-й пары хромосом и более слабый в ЦЕН одной из других пар,

обычно - на мелких метацентрических хромосомах. Зонд к CG-24B дает сигнал только в ЦЕН 7-й хромосомы. Только два ТП — CG-84A и CG-25B дают сигнал больше чем на половине хромосом. ТП CG-84A расположен в ЦЕН 7-ми пар хромосом с максимальным сигналом на паре мелких метацентриков. На половых хромосомах сигнал отсутствует. ТП CG-25B дает сигнал также на 7 парах хромосом с сильным сигналом на 5-й и 10-й парах хромосом. Сила сигналов варьирует у разных проб, свидетельствуя о количественном различии содержания ТП на разных хромосомах.

Сравнение распределения одних и тех же ТП на хромосомах *C. barabensis* и гибридов *C. barabensis* x *C. griseus* ($2n=21$) показало, что в большинстве случаев распределение сигнала зондов к ТП такое же как и для *C. griseus* — сильный сигнал в блоке ЦЕН гетерохроматина одной пары хромосом (гомологичной 5-й паре *C. griseus*). Различия касаются ТП, присутствующих у *C. griseus* больше чем на двух парах хромосом. ТП CG-84A у *C. barabensis* и *C. barabensis* x *C. griseus* дает сигнал только на паре хромосом, гомологичной 5-й паре *C. griseus* и на половых хромосомах. ТП CG-25B у *C. barabensis* дает сильный сигнал на паре хромосом, гомологичной 5-й паре *C. griseus* и слабый на одной паре мелких метацентриков. У гибридов картина распределения этого ТП сходна с *C. griseus*.

У *Mesocricetus auratus* ни один из ТП *C. griseus* не дал сигнала на хромосомах, а также не был найден в собранном геноме и исходных ридях полногеномного секвенирования. В отличие от домашней мыши или сирийского хомяка, ни одна проба к ТП не дает сигнала на всех хромосомах, что свидетельствует об отсутствии общего для всего генома мажорного ТП. Причиной этого могут быть особенности кариотипа *C. griseus*, препятствующие гомогенизации ТП между хромосомами. Китайский хомячок оказался уникальным как по кариотипу, так и по составу классифицированных и картированных *in situ* ТП.

Литература:

1. Komissarov A.S., et al. BMC Genomics. 2011. 12 : 531.
2. Михеев Д.Ю. и др. Цитология. 2015. 57(2): 95 - 101
3. Faravelli et al. Cytogenet Cell Genet . 1998. 83:281–286

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №18-34-00238) и МКБ (грант № 01.2.01457147).

Вклад последовательностей ДНК, располагающихся в районе терминации транскрипции, в уровень экспрессии генов

Input of DNA sequences located in the transcription termination region in gene expression level

Пиндюрин А.В.¹, Болдырева Л.В.¹, Иванкин А.В.¹, Лещенко А.Е.^{1,2}, Омелина Е.С.¹, Яринич Л.А.^{1,2}, Лебедев М.О.^{1,2}, Кожевникова Е.Н.¹

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: a.pindyurin@mcb.nsc.ru

Экспрессия генов, которая является определяющим процессом в жизнедеятельности всех организмов, сложным образом регулируется на всех этапах развития. У эукариотических организмов значительный вклад в активность генов вносит процессинг (созревание) мРНК. В настоящий момент роль регуляторных районов гена, расположенных в его 5'-области и преимущественно ассоциированных с началом транскрипции, изучена значительно лучше, чем районов, расположенных в 3'-области гена и большей частью связанных с терминацией транскрипции. Одной из причин этого является отсутствие подходов, позволяющих систематически идентифицировать функциональные элементы, расположенные после сигнала(ов) полиаденилирования и не входящие в последовательности зрелых (полиаденилированных) транскриптов.

Для систематического функционального анализа участков ДНК в 3'-области модельного репортёрного гена мы впервые использовали модификацию мультиплексного анализа MPFA (Massively Parallel Functional Assay), позволяющего одновременно измерять уровень транскрипционной активности большого числа (до десятков тысяч) трансгенов. А именно, был исследован район гена, располагающийся в области терминирующих транскрипцию сигналов и не входящий в состав мРНК. Мы установили, что мутации в этом районе способны как полностью подавлять экспрессию вышерасположенного репортёрного гена, так и усиливать её более чем в 100 раз. Таким образом, можно предполагать, что количественный вклад областей терминации транскрипции генов в регуляцию транскрипционной активности генома сопоставим с таковым от энхансерных элементов. Выявленные мотивы ДНК, которые усиливают экспрессию репортёрного гена, могут быть использованы при разработке генно-инженерных конструкций в биотехнологии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ #16-14-10288.

Популяционная генетика осетровых Сибири

Побединцева М.А.^{1,2}, Макунин А.И.¹, Кичигин И.Г.¹, Кулемзина А.И.¹, Сердюкова Н.А.¹, Романенко С.А.^{1,2}, Воробьева Н.В.¹, Интересова Е.А.^{3,4}, Корентович М.А.⁵, Зайцев В.Ф.³, Мищенко А.В.⁶, Заделенов В.А.⁷, Юрченко А.А.⁸, Щербаков Д.Ю.⁹, Графодатский А.С.^{1,2}, Трифонов В.А.^{1,2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирское отделение государственного научно-производственного центра рыбного хозяйства ФГБНУ Госрыбцентр, Новосибирск, Россия

⁴ Томский государственный университет, Томск, Россия

⁵ Государственный научно-производственный центр рыбного хозяйства ФГБНУ Госрыбцентр, Тюмень, Россия

⁶ Ульяновский государственный педагогический университет, Ульяновск, Россия

⁷ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экологии рыбохозяйственных водоемов», Красноярск, Россия

⁸ Центр Геномной Биоинформатики им. Ф.Г.Добржанского Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

⁹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

Популяционная генетика позволяет ответить на многие вопросы, связанные с эволюцией и демографической историей видов. Особую важность представляют исследования уязвимых видов, поскольку они имеют большое приложение для природоохранных мероприятий. Представители семейства осетровых являются ценными промысловыми рыбами. Считают, что происхождение этой группы можно отнести к Триасовому периоду. К современному семейству осетровых относится 25 видов, они все занесены в Красную книгу, многие виды находятся на грани исчезновения. На территории России обитает 11 видов. Для всех видов осетровых характерно позднее половое созревание, не ежегодный выход на нерест и чувствительность к разнообразным внешним факторам. В последние годы активно развивается аквакультурное разведение таких видов осетровых как стерлядь и сибирский осетр, что усиливает необходимость контролировать состояние популяций этих видов рыб.

Целью данной работы является оценка генетического разнообразия стерляди и сибирского осетра в реках Сибири по последовательности контрольного района митохондриальной ДНК, а также выяснение филогенетических отношений между основными гаплогруппами обоих видов, основанное на анализе полных митохондриальных геномов.

В ходе работы собрана обширная коллекция материала представителей двух видов осетровых, обитающих в Сибири. Впервые описано 98 новых гаплотипов для стерляди (*Acipenser ruthenus*) и 43 для сибирского осетра (*A. baerii*). Оценено генетическое разнообразие обоих видов в бассейнах рек Сибири. Показана изоляция популяций обоих видов между разными речными бассейнами. Оценено время расхождения основных гаплогрупп внутри обоих видов. Сравнение популяционных характеристик двух видов показало более уязвимый статус вида *A. baerii*. Впервые установлены филогенетические взаимоотношения между основными гаплогруппами стерляди и сибирского осетра по последовательностям полных митохондриальных геномов.

Работа поддержана грантом РФФ № 18-44-04007

Ранее неизвестные функции белка NON3 у *Drosophila melanogaster*

Ю.В.Попова^{1,2*}, Г.А. Павлова¹, Е.Н.Андреева¹, А.А. Огиенко¹, А.А. Юшкова^{1,3},
А.В. Иванкин¹, Е.Н. Кожжевникова^{1,2}, А.В. Пиндюрин^{1,2,3}

¹ Институт Молекулярной и Клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия

* e-mail: popova@mcb.nsc.ru

Ранее было показано, что часть белков, которые являются компонентами ядрышка и необходимы для биогенеза рибосом, также участвуют в процессе формирования веретена деления в культивируемых клетках *Drosophila* S2 [1]. Однако молекулярные механизмы этого процесса в настоящее время до конца не исследованы. Целью нашей работы является изучение роли белка NON3 (Novel nucleolar protein 3) *D. melanogaster* в кинетохор-зависимом росте микротрубочек.

Используя метод неточной эксцизии Р-элемента, мы создали ряд новых мутаций по гену *Non3*: (1) две нуль-мутации (делеции в 500 п.н. и 1000 п.н.) являются ранними эмбриональными рецессивными летальными; (2) три гипоморфные мутации (с неполной эксцизией Р-элемента в гене *Non3*) доживают до стадии имаго и полустерильны; (3) точная эксцизия Р-элемента полностью жизнеспособна и фертильна (условный контроль). Все мутации были проверены секвенированием ДНК.

Для изучения роли белка NON3 в сборке веретена деления нами была проведена процедура РНК-интерференции (РНК-и) в культивируемых клетках *Drosophila* S2 с последующим проведением коллемеидной обработки. Снижение уровня белка NON3 в клетках после РНК-и проверяли при помощи вестерн-блот анализа с использованием полученных нами специфичных поликлональных антител. Мы обнаружили, что снижение количества белка NON3 после РНК-и в культивируемых клетках *Drosophila* S2 приводит к: (1) формированию короткого веретена деления, (2) повышению доли метафазных клеток, у которых при наличии выровненных на экваториальной пластинке хромосом наблюдается дезорганизованное веретено деления и (3) появлению псевдо-анателофазных клеток (в таких клетках веретено деления выглядит как на последних стадиях деления, однако сестринские хроматиды не разошлись к полюсам веретена деления). Также было показано, что снижение уровня белка NON3 влияет на повторный рост микротрубочек от кинетохоров после коллемеидной обработки.

Снижение количества белка NON3 как в клетках нервных ганглиев личинок, так и в культивируемых клетках S2 влияет на привлечение белка CID (*Drosophila* CENP-A, необходим для сборки кинетохоров) в центромерные районы хромосом.

В целом, полученные данные позволяют заключить, что ген *Non3* является жизненно важным и предполагать, что влияние белка NON3 на кинетохор-зависимый рост микротрубочек может быть обусловлено посредством регуляции связывания белка CID с центромерами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ #18-34-00699

Список литературы:

1. Moutinho-Pereira S. et al. (2013). Genes involved in centrosome-independent mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 19808-19813.

ИЗУЧЕНИЕ ДРЕВНЕЙ ДНК ИСКОПАЕМЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ALCES*

Попова К.О.

Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия, Новосибирск

popova.ksenia@mcb.nsc.ru

Анализ древней ДНК дает возможность сравнить компоненты геномов и митохондриальную ДНК ископаемых животных с аналогичными данными по современным представителям родственных видов, выстроить их филогенетические отношения и отследить динамику изменения популяций, что имеет большое значение для понимания механизмов эволюции. В коллекциях археологов широко представлены костные останки представителей отряда Китопарнокопытные (*Cetartiodactyla*). За некоторыми исключениями эти уникальные образцы на уровне ДНК фактически не исследовались.

Изучение ДНК древних лосей до сих пор не проводилось. Современные лоси (семейство *Alces*) появились в среднем плейстоцене, и по палеонтологическим данным в позднем плейстоцене шло их активное формообразование. В настоящее время, однако, лоси представлены двумя видами: лось европейский *Alces alces* (68 пар хромосом) и лось американский *Alces americanus* (70 пар хромосом) характеризующимися крайне низким уровнем генетического разнообразия. Ареал европейского лоса – Европа и Западная Сибирь до Енисея, американского – Восточная Сибирь, Северная Америка. Примерное время дивергенции 75-100 тыс. лет назад. Существует мнение, что низкое разнообразие современных лосей обусловлено их прохождением через «бутылочное горлышко» до дивергенции. В коллекции ИАиЭ СО РАН нами были выбраны образцы, принадлежащие к казанцевскому межледниковому периоду (между 128 000 и 117 000 лет назад) и каргинскому - 40-50 тысяч лет назад, что позволяет исследовать мтДНК древних лосей до и после предполагаемого времени дивергенции.

В ходе данной работы с помощью двойного гибридационного обогащения и высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina мы секвенировали значительную часть (74-97%) митохондриальной ДНК девяти древних лосей казанцевского периода. Было получено филогенетическое древо в сравнении с современным евроазиатскими лосями. Полученные результаты показывают резкое отличие древних лосей казанцевского периода от современных, однако, ситуация осложняется полным отсутствием в базе данных мтДНК современных американских лосей (*Alces americanus*) и минимальным наличием европейских.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ НА ЭКСПАНСИЮ (ЦГГ)_n ПОВТОРОВ НОРМАЛЬНОЙ ДЛИНЫ В МОДЕЛЬНЫХ ЛИНИЯХ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ

Пурвиньш Я.В., Юдкин Д.В., Грищенко И.В.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

E-mail: yana.purvinsh@gmail.com

Экспансия тринуклеотидных повторов является одной из форм нестабильности генома и заключается в резком увеличении числа копий внутригенных последовательностей ДНК. Данная мутация является причиной ряда нейродегенеративных заболеваний человека, таких как синдром ломкой X-хромосомы, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз и др. Механизм экспансии повторов остается неизвестным, а заболевания, связанные с экспансией повторов, неизлечимыми. Одним из распространенных заболеваний, связанных с экспансией повторов является синдром ломкой X-хромосомы. Развитие данного синдрома связано с экспансией тринуклеотидных повторов (ЦГГ)_n в 5'-UTR гена *FMRI*, что приводит к гиперметилированию промотора, как следствие, прекращению экспрессии гена *FMRI* и резкому сокращению продукции белка FMRP. Данный белок является РНК-связывающим и ответственным за нормальную дифференцировку и функционирование нейронов. Одна из гипотез возникновения экспансии повторов заключается в том, что экспансия происходит во время репарации ДНК. Показано, что уровень транскрипции значительно выше в аллелях гена *FMRI*, с увеличенным повтором, что указывает на то, что репарация, ассоциированная с транскрипцией, вероятно, является одной из причин экспансии. Кроме того, повторы образуют альтернативные вторичные структуры ДНК, которые затрудняют репликацию и транскрипцию. При образовании одноцепочечных участков при транскрипции повтор формирует вторичную структуру и останавливает движение РНК-полимеразы II, что включает механизм TCR. Проскальзывание ДНК-полимеразы в месте образования вторичных структур при TCR может являться причиной экспансии повторов. Поскольку (ЦГГ)_n-повтор присутствует как в клетках пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, так и в клетках здоровых людей, однако его увеличение происходит только у пациентов, можно предположить, что экспансия повторов обусловлена вероятными нарушениями работы системы репарации именно у пациентов.

Целью нашей работы являлось создание молекулярной модели повтора (ЦГГ)_n длины, характерной для нормального аллеля гена *FMRI*, и исследование его экспансии при активной транскрипции в immortalized В-лимфоцитах пациентов с синдромом

ломкой X-хромосомы с помощью вектора, несущего соответствующую конструкцию. В ходе работы был сконструирован ДНК-вектор, содержащий вставку ЦГГ-повторов, была проверена его работоспособность и проведена трансфекция клеточных линий immortalized В-лимфоцитов пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и здорового контроля, а также исследовано изменение длины ЦГГ-повтора в векторе при активной транскрипции с течением времени.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00336.

ВЕРИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПАРТНЕРОВ БЕЛКА P1TA КАК КОМПОНЕНТОВ АРХИТЕКТУРНОГО КОМПЛЕКСА D. MELANOASTER

Пчелинцева П.В., Сабиров М.С., Максименко О.Г., Георгиев П.Г.

Институт Биологии Гена РАН, Москва

Хроматин в ядрах эукариотических организмов имеет сложную структурную организацию, которая тесно связана с программой реализации генетического материала. Поддержание архитектуры хроматина и регуляция экспрессии генов – взаимосвязанные процессы. Они происходят в ядре благодаря большому набору белков, многие из которых способны связывать ДНК и в то же время взаимодействовать с другими белками. В настоящее время подобные белки называют архитектурными. Архитектурные белки, непосредственно взаимодействующие друг с другом напрямую или через определенные кофакторы, участвуют в создании и поддержании сложной и многообразной пространственной организации хроматина.

Архитектурный белок P1ta – инсулятор-связывающий белок, содержащий в своём составе кластер из 10 цинковых пальцев C2H2-типа, ответственных за связывание со специфичной последовательностью ДНК и ZAD-домен, необходимый для гомодимеризации. Этот белок взаимодействует с универсальным кофактором CP190 и обладает энхансер-блокирующим действием, посредством гомодимеризации может самостоятельно обеспечивать дистанционные взаимодействия. P1ta участвует в осуществлении барьерной активности некоторых границ Vithorax-комплекса, а также локализуется на некоторых границах топологически ассоциированных доменов.

Важным шагом в описании свойств изучаемого белка является выявление комплексов, компонентом которых он является. С целью получения данной информации была произведена аффинная очистка белковых комплексов с использованием специфичных антител к белку P1ta с последующим масс-спектрометрическим анализом. Результатом данного анализа стало обнаружение среди предполагаемых партнеров белка P1ta компонентов самых разных в функциональном плане комплексов. Особый интерес для нас представляла группа белков, содержащих в своем составе кластеры цинковых пальцев, поскольку такие белки могут потенциально выполнять архитектурную функцию. В состав выявленной группы белков входит инсулятор-связывающий белок Su(Hw), а также белки с неизвестными функциями CG2199, CG12391 и D19B. В рамках данной работы мы задались целью проверить полученные данные масс-спектрометрического анализа и установить прямые белок-белковые взаимодействия внутри предполагаемого комплекса.

Используя анализ в дрожжевой двугибридной системе были установлены следующие парные взаимодействия: CG12391 — CG2199, CG2199 — CP190. Прямых контактов изучаемой группы белков с белком Pita установлено не было. Выявленные взаимодействия дают возможность предполагать, что комплекс может формироваться посредством белка CP190, с которым взаимодействуют белки Pita и Su(Hw).

Данные масс-спектрометрического анализа были верифицированы в экспериментах коиммунопреципитации с использованием антител к белку Pita, с последующей гибридизацией элюированного Pita-содержащего комплекса с антителами к белкам изучаемой группы. Во всех случаях мы детектировали присутствие белков изучаемой группы в комплексе с белком Pita.

Полученные результаты дают основание к дальнейшему и более детальному изучению данной группы белков в свете их возможного функционирования в составе единого комплекса для установления и поддержания архитектуры хроматина.

Работа проводится при поддержке гранта РФФИ № 18-54-74009.

Роль системы piРНК в поддержании структуры хроматина теломерного ретротранспозона *TART* у *Drosophila*

The role of piRNA system in maintaining of chromatin structure of telomeric retrotransposon TART in Drosophila

Радион Е.И., Шмитко А.О., Оленкина О.М., Комаров П.А. и Калмыкова А.И.

Институт молекулярной генетики Российской академии наук

radion-radion.90@mail.ru

Теломера представляет собой нуклеопротеиновую структуру, присутствующую на концах линейных хромосом. В геномах большинства организмов теломерные последовательности образованы короткими тандемными повторами, вносимыми ферментом теломеразой. Однако существуют альтернативные механизмы поддержания длины теломер. Так, теломеры *Drosophila* состоят из ретротранспозонов *HeT-A*, *TAHRE* и *TART*, перемещающихся только на конец линейных хромосом. Теломерные элементы отличаются друг от друга по своей структуре: *TART* и *TAHRE* содержат две открытые рамки считывания (ОРС) – *gag* и *pol*, в то время как *HeT-A* имеет только ОРС *gag*. В то же время элемент *HeT-A* наиболее представлен в теломерах *Drosophila*. Считается, что неавтономный элемент *HeT-A* использует для перемещений ревертазу *TART* и/или *TAHRE*. Еще одной интересной характеристикой теломерных элементов *Drosophila* является то, что все они имеют длинные 5'- и 3'- нетранслируемые области (5'- и 3'-НТО). Более того, в 5'- и 3'-НТО *TART* присутствуют прямые неконцевые повторы, содержащие промоторы в различных ориентациях.

Важной проблемой является регуляция экспрессии теломерных элементов. В герминальных тканях их экспрессия регулируется системой piРНК сайленсинга, подавляющего экспрессию мобильных элементов (МЭ) на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. piРНК образуются из особых локусов генома – кластеров piРНК, содержащих дефектные копии МЭ и расположенных в гетерохроматиновых областях генома. Помимо HP1 и H3K9me3 – распространенных гетерохроматиновых меток, хроматин piРНК кластеров обогащен белком Rhino, специфичным только для герминальных piРНК кластеров.

Существующие данные указывают на то, что механизмы регуляции *HeT-A* и *TART* различны, что, по-видимому, связано с выполнением ими различных теломерных функций. Например, нарушения пути piРНК-сайленсинга приводят к гиперэкспрессии теломерных элементов, однако в разной степени – наибольшая активация наблюдается для *HeT-A* и *TAHRE* (примерно в 1000 раз), в то время как экспрессия *TART* активируется в несколько раз. Это поднимает вопрос о степени вовлеченности системы piРНК сайленсинга в

регуляцию теломерного элемента *TART*. Возможно, что помимо системы рiРНК-сайленсинга активность *TART* также регулируется и другими системами, однако это только предстоит изучить.

Мы поставили перед собой задачу охарактеризовать вклад рiРНК пути в регуляцию экспрессии *TART*. Мы воспользовались линиями мух, несущими в геноме трансгенную конструкцию, в составе которой имеется фрагмент 3'-НТО *TART-B*, содержащий промоторы в прямой и обратной ориентации. Ретротранспозон *TART-B* является одним из представителей семейства теломерных элементов *TART*. Фрагмент *TART-B* в трансгене прилегает к репортерному гену *LacZ*, лишенному собственного промотора. Использовались варианты трансгена с прямой и обратной ориентацией фрагмента *TART-B*. Для оценки роли рiРНК-сайленсинга в контроле экспрессии *TART-B*, мы изучали изменения экспрессии и структуры хроматина трансгенов в диком типе и на фоне нарушений работы рiРНК системы. Оценка изменений экспрессии *LacZ* при дисфункции рiРНК пути показала, что экспрессия изменяется лишь в трансгене с обратной, но не прямой ориентацией фрагмента *TART-B*. Более того, подобная динамика изменений наблюдалась и для структуры хроматина – нарушения рiРНК пути приводили к сильному падению обогащения белками HP1 и H3K9me3 хроматина трансгена в области гена *LacZ* только в случае обратной ориентации фрагмента *TART-B*. Таким образом, вероятно, выбор способа регуляции экспрессии и структуры хроматина трансгена определяется ориентацией вставки, содержащий промоторную область теломерного элемента *TART-B*. Для объяснения полученных результатов мы предположили, что в исследуемом фрагменте *TART-B* присутствует инсулятор, функционирующей в определенной ориентации. Действительно, известна способность инсуляторов действовать ориентированно, а также взаимодействовать друг с другом, изолируя фланкированный участок от воздействия внешних факторов хроматина. Также известно, что ген *mini-white*, входящий в состав трансгенной конструкции, имеет в своем составе инсулятор *wari*. Мы предполагаем, что именно взаимодействие *wari* с предположительным инсулятором в последовательности фрагмента *TART-B* изолирует промотор *TART-B* от репортерного гена *LacZ* в определенной ориентации фрагмента *TART*.

Помимо трансгенной модели, мы также изучали изменения структуры хроматина в области промотора эндогенных копий элемента *TART-B* в ответ на нарушения работы рiРНК-пути. Наблюдаемые результаты соответствовали полученным на трансгенной модели – изменения структуры хроматина данной области при нарушении работы системы рiРНК сайленсинга не наблюдалось, в отличие от *HeT-A* повторов, что подтверждает существование особой структуры хроматина в промоторе *TART*.

Работа поддержана грантами РФФИ №18-34-00415 (работа на трансгенной модели) и РНФ №16-14-10167 (изучение эндогенного элемента *TART*).

Роль белков Asp и Patronin в формировании митотического веретена деления у *Drosophila*

Разуваева А.^{1,2}, Павлова Г.¹, Попова Ю.^{1,3}, Яринич Л.^{1,2}, Лебедев М.^{1,2}, Андреева Е.¹, Андерс А.^{1,2}, Гатти М.⁴, Пиндюрин А.^{1,2,3}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Университет La Sapienza, Рим, Италия

Правильное формирование функционального веретена деления в centrosom-содержащих клетках требует скоординированных действий белков, взаимодействующих с микротрубочками (МТ). Эти белки можно условно разделить на три группы: (1) белки, взаимодействующие с боковой стенкой МТ (например, белок Dgt6, являющийся субъединицей комплекса аугмин), (2) белки, ассоциированные с плюс-концами МТ, и (3) белки, связывающиеся с минус-концами МТ (например, белки Asp и Patronin). В то время как роль белков, связывающихся с плюс-концами МТ, достаточно хорошо изучена, точные функции белков, связывающихся с минус-концами МТ, до сих пор остаются неясными. Мы проанализировали взаимодействия между белками Asp, Patronin и Dgt6 в процессе сборки митотического веретена деления *Drosophila*, и полученные результаты позволяют предположить модель их взаимодействия для обеспечения правильной сборки и функционирования веретена.

Чтобы понять роль белков Asp, Patronin и Dgt6 мы выполнили РНК-интерференцию (РНКи) против генов, кодирующих эти белки, и изучили последующие митотические фенотипы в культивируемых клетках *Drosophila* S2. Кроме того, были получены линии S2 клеток, которые экспрессируют гибридные белки Asp-eGFP и Patronin-eGFP.

Мы установили, что гибридный белок Patronin-eGFP преимущественно ассоциирован с кинетохорными МТ во время митоза, демонстрируя схожий с белком Dgt6 паттерн локализации. Гибридный белок Asp-eGFP, напротив, накапливается на минус-концах МТ веретена деления, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными. Результаты РНКи вместе с данными о локализации eGFP-гибридных белков позволяют предположить, что белки Asp и Patronin функционируют, по крайней мере, частично независимо друг от друга. Двойная РНКи против генов *asp* и *Patronin* приводила к более сильному фенотипу, чем РНКи отдельных генов. А именно, в случае двойной РНКи мы наблюдали нарушение разделения сестринских хроматид и блокировку митоза на стадии метафазы.

Полученные нами данные позволяют предполагать, что белки Asp и Patronin вовлечены в различные пути формирования веретена деления. Они также указывают на то, что белок Patronin специфически связывается с минус-концами МТ, формирующимися на стенках уже существующих МТ аугмин-зависимым способом, и стабилизирует их.

Работа поддержана грантом РФФИ (18-34-00688).

Внутрихромосомные перестройки в эволюционно консервативных синтенных блоках полевок

Романенко С.А.^{1,2}, Федорова Ю.Е.², Сердюкова Н.А.¹, Графодатский А.С.^{1,2}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

rosa@mcb.nsc.ru

Эволюционно-консервативные сегменты являются основой хромосомной организации геномов позвоночных. Однако их структура может изменяться за счет внутрихромосомных перестроек, таких как инверсии и центромерные сдвиги. Полномасштабной оценки представленности внутрихромосомных перестроек в эволюции позвоночных до сих пор не проводилось.

Полевковые (*Arvicolinae*), как молодой, но очень богатый видами и кариотипически разнообразный таксон, являются удобной моделью для изучения внутрихромосомных перестроек. С помощью FISH набора районспецифичных зондов на хромосомах 28 видов мы проанализировали эволюцию нескольких консервативных синтенных блоков предкового кариотипа *Arvicolinae*. Было показано, что эволюция консервативных сегментов сопровождалась множественными, ранее не выявленными внутрихромосомными перестройками. Для разных блоков предкового кариотипа показано преобладание различных типов перестроек. В среднем у современных видов полевок зафиксировались в консервативных сегментах в ходе эволюции одна-две специфичных внутрихромосомные перестройки.

По-видимому, внутрихромосомные перестройки в консервативных синтенных блоках являются основной эволюционной силой преобразования геномов у быстро эволюционирующих групп, сопровождая видообразование.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 16-14-10009.

О ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ В ВЫБОРЕ ЭЛИМИНИРУЕМОГО ГЕНОМА В ХОДЕ РАННЕГО ГАМЕТОГЕНЕЗА МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК КОМПЛЕКСА *PELOPHYLAX ESCULENTUS*

Рюмин С.С.^{1*}, Дедух Д.В.¹, Хмилевская М.², Розенблут-Кошчисты В.², Коленда К.², Казмерчак М.², Огельска М.², А.В. Красикова¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

² Университет Вроцлава, Польша

* sergriumin@yandex.ru

Межвидовые гибриды животных, как правило, стерильны и не способны дать плодовитое потомство. Это объясняется хромосомным конфликтом – разницей в количестве и первичной организации хромосом двух разных геномов, сосуществующих в одном ядре. Эти различия могут приводить к нарушениям конъюгации ортологичных хромосом в ходе мейоза, процессов их расхождения и, в итоге, к остановке мейоза или формированию функционально неактивных анеуплоидных гамет. Тем не менее, были обнаружены группы близкородственных видов, межвидовые гибриды которых способны преодолеть этот репродуктивный барьер. Это достигается путем изменений раннего гаметогенеза – избирательной элиминации одного и эндорепликации оставшегося родительского генома в клетках зародышевой линии – и переходом к клональным или полуклональным стратегиям передачи генома. Однако, цитологические механизмы этих процессов остаются недостаточно изученными.

Удобной моделью для изучения изменений гаметогенеза межвидовых гибридов животных является комплекс зеленых лягушек *Pelophylax esculentus*, который представлен двумя родительскими видами – озёрной лягушкой *P. ridibundus* (RR, 2n=26) и прудовой лягушкой *P. lessonae* (LL, 2n=26), и их естественным гибридом – съедобной лягушкой *P. esculentus*, существующей в виде диплоидной (RL, 2n=26), двух триплоидных (RLL/RRL, 3n=39) и тетраплоидной (RLLL, 4n=52) форм.

Для того, чтобы охарактеризовать закономерности в выборе элиминируемого и эндореплицируемого геномов при формировании гамет у диплоидных и триплоидных гибридов *Pelophylax esculentus*, мы провели серию искусственных лабораторных скрещиваний отловленных гибридных особей друг с другом и с особями родительского вида. Для полученных в ходе скрещиваний головастиков были идентифицированы геномные композиции путем детекции интерстициальных сайтов теломерного повтора (TTAGGG)_n и перицентромерного тандемного повтора RrS1 методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Результаты идентификации геномов головастиков, полученных в результате

лабораторных скрещиваний, показали, что диплоидные гибридные формы (RL-геномная композиция) в большинстве случаев клонально передают в гаметы геном *P. ridibundus*. Напротив, триплоидные гибридные особи (LLR-геномная композиция) в большинстве случаев сохраняют и передают в гаметы геном *P. lessonae*.

При анализе морфологии диссектированных гонад гибридных головастиков с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии мы обнаружили DAPI-позитивные тельца (микроядра) в цитоплазме клеток зародышевой линии, что не наблюдается в гонадах особей родительских видов. Микроядра различаются по размеру, их количество варьирует от 1 до 3 на отдельную зародышевую клетку. В результате иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью поликлональных CREST-антител против белков кинетохора мы показали наличие кинетически активной центромеры в составе микроядер. 95% проанализированных микроядер содержат только один хромоцентр, что может свидетельствовать об элиминации хромосом по отдельности или о топологической кластеризации центромер нескольких хромосом в составе одного микроядра. Для выявления типа элиминируемого генома в составе микроядер мы провели на диссектированных гонадах головастиков 3D-FISH с зондами к перичентромерному повтору RrS1, специфичному для хромосом *P. ridibundus*, но не хромосом *P. lessonae*. В гонадах как диплоидных, так и триплоидных гибридных головастиков были обнаружены 2 популяции микроядер – микроядра, включающие в свой состав повтор RrS1, и микроядра без этого повтора. Однако, распределение микроядер по этим 2 популяциям у ди- и триплоидных гибридов различно. Так, в результате анализа гонад 36 диплоидных гибридных головастиков мы показали, что только в 15% микроядер присутствуют центромеры хромосом *P. ridibundus*. Таким образом, мы можем заключить, что приблизительно 85% микроядер содержали геном *P. lessonae*. Анализ гонад 23 триплоидных гибридных головастиков с геномной композицией LLR показал, что приблизительно 80% микроядер содержали центромеры *P. ridibundus*.

Мы можем заключить, что хромосомы одного родительского вида элиминируются последовательно в клетках зародышевой линии диплоидных и триплоидных гибридов, посредством формирования микроядер. У большинства диплоидных гибридов (RL) происходит избирательная элиминация генома *P. lessonae*, в то время как у большинства триплоидных гибридов (LLR) происходит избирательная элиминация генома *P. ridibundus*, что соответствует результатам лабораторных скрещиваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-34-00514\18). Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ: «Обсерватория экологической безопасности» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Влияние нокаута генов *ADAMTS1* и *THBS1* на формирование радиационно-индуцированного ответа клеток на повреждение ДНК

Савченко Р.Р.^{1*}, Васильев С.А.¹, Фишман В.С.², Мурашкина А.А.³, Дорофеева А.В.⁴, Сухих Е.С.⁵, Лебедев И.Н.¹

¹*НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН*

²*Институт цитологии и генетики СО РАН*

³*Национальный исследовательский Томский государственный университет*

⁴*Сибирский государственный медицинский университет*

⁵*Томский областной онкологический диспансер*

*E-mail: savchenko_renata@mail.ru

Effects of *ADAMTS1* and *THBS1* genes knockout on the radiation-induced DNA damage cellular response

Savchenko R.R.^{1*}, Vasilyev S.A.¹, Fishman V.S.², Murashkina A.A.³, Dorofeeva A.V.⁴, Sukhikh E.S.⁵, Lebedev I.N.¹

¹*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center RAS, Tomsk, Russia*

²*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

³*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

⁴*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

⁵*Tomsk Regional Oncology Center, Tomsk, Russia*

*E-mail address: savchenko_renata@mail.ru

Воздействие ионизирующего излучения вызывает значительные повреждения в клетках человека, наиболее губительными из которых являются повреждения ДНК. Несмотря на известные механизмы репарации ДНК, роль в поддержании стабильности генома других косвенных участников радиационно-индуцированного клеточного ответа остается недостаточно изученной. Проведенные нами ранее эксперименты позволили выявить связь дифференциальной экспрессии генов *ADAMTS1* и *THBS1* со спонтанным уровнем фокусов γ H2AX и частотой радиационно-индуцированных микроядер в лимфоцитах периферической крови человека и в фибробластах экстраэмбриональной мезодермы. С целью анализа влияния нокаута данных генов на формирование радиационно-индуцированного ответа соматических клеток человека на повреждение ДНК в модельной системе *in vitro*, на основании опухолевой линии HeLa с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 были созданы нокаутные по генам *ADAMTS1* и *THBS1* клеточные линии. В

нокаутных клеточных линиях была проведена оценка эффективности посева и клональной выживаемости после воздействия ионизирующего γ -излучения, оценка уровня спонтанных фокусов γ H2AX и 53BP1, рассматриваемых в качестве маркеров процессов репарации двунитевых разрывов ДНК, и анализ частоты радиационно-индуцированных микроядер. В попытке выявить механизмы влияния изучаемых генов на формирование радиационно-индуцированного клеточного ответа, с помощью экспрессионных микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression v2 8 \times 60K (Agilent technologies, USA) был проведен анализ транскрипционного профиля в нокаутных клеточных линиях до облучения и после воздействия γ -излучения в дозе 2 Гр.

Клеточная линия с нокаутом гена *THBS1* характеризовалась снижением эффективности посева до облучения по сравнению с интактной линией HeLa в 1,4 раза ($p = 0,0002$). Клеточная линия с нокаутом *ADAMTS1* характеризовалась снижением клональной выживаемости по сравнению с исходной линией HeLa в 1,9 раза ($p = 0,014$). Таким образом, нокаут данных генов по-разному влияет на выживаемость и способность к формированию колоний не облученных и облученных клеток. Нокаут изучаемых генов не влиял на уровень спонтанных фокусов γ H2AX и 53BP1, однако в клеточной линии с нокаутом *ADAMTS1* наблюдалось статистически значимое увеличение частоты микроядер ($21,7 \pm 7,5 \%$) по сравнению с интактной линией HeLa ($5,0 \pm 1,0 \%$, $p = 0,019$). Полнотранскриптомный анализ позволил выявить большое число дифференциально экспрессирующихся генов, пять из которых (*TOP2A*, *RFC3*, *TXNRD2*, *PRKDC*, *SPTBN1*) повышали свою экспрессию в клеточной линии HeLa после облучения, но не активировались при нокауте генов *ADAMTS1* и *THBS1*. Таким образом, в исходной линии HeLa после воздействия радиации активируются базовые системы защиты клеток за счет повышения экспрессии генов антиоксидантной защиты (*TXNRD2*) и точности репликации ДНК (*TOP2A*, *RFC3*, *PRKDC*), в то время как при нокауте *ADAMTS1* и *THBS1* экспрессия данных генов не повышается. Возможно, при нокауте *ADAMTS1* это приводит к репликационному стрессу, возникновению двунитевых разрывов ДНК в S- и G2-фазах и как следствие, повышению частоты микроядер в митозе.

Исследование выполнено при поддержке Гранта Президента РФ № МК-5944.2018.4.

ЗАГАДКА ТРАНСКРИПЦИИ НА ЛАТЕРАЛЬНЫХ ПЕТЛЯХ ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ПТИЦ

Сайфитдинова А.Ф., Галкина С.А., Кулак М.М.

Санкт-Петербургский государственный университет

Санкт-Петербургский союз ученых, Санкт-Петербург, Россия

saifitdinova@mail.ru

В ооцитах птиц, как и многих других животных, на стадии диплотены профазы первого деления мейоза хромосомы приобретают вид, напоминающий бутылочные ёршики, или ламповые щетки (ЛЩ). Это сходство обусловлено высокой степенью деспирализации хроматина и присутствием вдоль хромосомной оси большого числа латеральных петель, ассоциированных с многочисленными транскриптами и белками аппарата транскрипции и созревания РНК. Высокая степень деконденсации, наряду с сохранением осевой структуры хромосом, делает ЛЩ уникальным модельным объектом для высокоразрешающего картирования последовательностей и верификации данных сборки геномов. Присутствие плотно расположенных РНП на боковых петлях позволяет детально исследовать организацию латеральных петель и многие функционально значимые белки транскрипции, однако природа и биологическое значение феномена ЛЩ до сих пор остаются загадкой. Различные этапы дифференцировки и созревания гамет сопровождаются транскрипцией, в результате которой происходит накопление полиаденилированной РНК в виде гетерогенных ядерных РНП частиц, а также запасание рибосом. На основании морфологических исследований долгое время было принято считать, что у организмов с гипертранскрипционным типом оогенеза интенсивность транскрипции достигает своих максимальных значений именно в диплотене первого деления мейоза на стадии ЛЩ. Данные высокоразрешающего картирования уникальных и повторяющихся последовательностей ДНК методом FISH, а также исследование динамики включения предшественников синтеза нуклеиновых кислот с последующей визуализацией их флуорохромами методом клик-реакции свидетельствуют о том, что транскрипцию на ЛЩ нельзя рассматривать как источник РНК для развития будущего эмбриона у птиц. Было установлено, что кодирующие и некоторые повторяющиеся последовательности, такие как, кластеры рибосомных генов и генов гистосовместимости, также как и последовательности, участвующие в дифференцировке гонад на хромосоме Z, а также некоторые повторяющиеся последовательности на хромосоме W никогда не формируют латеральных петель на стадии ЛЩ. У курицы поступление в ооцит РНК обеспечивается фолликулярными клетками. В составе латеральных петель обнаруживаются повторяющиеся последовательности,

характеризующиеся наиболее высоким уровнем дивергенции как популяционной, так и внутри одной особи, именно эти последовательности входят в состав гетерохроматина в соматических клетках. В ходе гаметогенеза происходит ремоделирование генома, сопровождающееся удалением большинства эпигенетических сигналов, что приводит к активации транскрипции в том числе мобильных элементов и может иметь катастрофические последствия. По-видимому, в этот момент приводится в действие альтернативный защитный механизм, который останавливает транскрипцию определенных последовательностей и как бы «замораживает» на хромосомах морфологически выраженные латеральные петли. Дополнительно, такие структуры могут быть объектом для локального повышения уровня ко-транскрипционного мутагенеза и вносить вклад в поддержание стабильного уровня изменчивости генома в популяциях. Это может объяснить биологическое значение и широкое распространение ЛЩ у разных систематических групп животных.

Настоящее исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 16-04-01823а). Для выполнения исследования было использовано оборудование ресурсного центра ЦКП «Хромас» Научного парка СПбГУ и финансовая поддержка СПбГУ (мероприятие 4, проект № 1.40.1625.2017).

ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ МУТАНТНЫХ ФОРМ *CALENDULA OFFICINALIS* L.

Саматадзе Т.Е.¹, Хазиева Ф.М.², Юркевич О.В.¹, Свистунова Н.Ю.², Амосова А.В.¹,
Муравенко О.В.¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

²ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений", Москва

tsamatadze@gmail.ru

Полиморфизм – любое разнообразие форм одного и того же вида организмов. Полиморфизм способствует адаптации к гетерогенным условиям и расширению экологической ниши, обуславливает высокую эволюционную пластичность. Для сравнительного анализа геномов растений исследование организации хромосом и их внутри- и межвидового полиморфизма по-прежнему остаётся актуальным.

Впервые с использованием анализа мейоза, C/DAPI-дифференциального окрашивания, Ag-ЯОР-окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH анализа) проведено исследование мутантных форм ноготков лекарственных (*Calendula officinalis* L.), полученных после воздействия мутагенов ДМС (диметилсульфат) и ДЭС (диэтилсульфат) в различных концентрациях и дана их хозяйственная оценка. Выявлено, что повышенные концентрации мутагенов оказывают угнетающее действие на рост растений, в особенности ДЭС 0,05 – на 20%. Показано, что ДМС показал наибольшую эффективность по сравнению с ДЭС, что проявилось в увеличении количества соцветий и побегов, повышением махровости соцветий. Урожайность сухих соцветий в варианте с ДМС практически в два раза превышает контрольные, а в варианте с ДЭС - в 1,5 раза. Полученные данные показали, что обработка семян ДМС в концентрации 0,04%, является предпочтительней, чем 0,08%, а растения, выращенные из семян, обработанных мутагеном ДМС, характеризовались более высокими показателями по количеству соцветий, махровости соцветий, урожайности соцветий и семян.

Обнаружено, что оба вида мутагена оказали воздействие на мейотическое деление, начиная с профазы первого деления мейоза. В метафазе II и анафазе I у всех форм ноготков, в основном, встречались клетки с нормальным расхождением хромосом к полюсам (16:16), хотя также были обнаружены клетки с нарушениями (отставание хромосом, хаотическое расхождение хромосом, мосты, фрагменты хромосом и т.д.). Во втором делении мейоза были обнаружены клетки с линейными тетрадами, пентады, гексады, а также тетрады с

микроядрами. Процент микроспороцитов с нарушениями в метафазе I и анафазе I у растений, обработанных ДЭС, был несколько выше, чем у растений, обработанных ДМС.

Изучение рисунка Ag-ЯОР-окрашивания у всех изучаемых сортов и мутантных форм ноготков, показало наличие Ag-положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 1 и 9. На хромосоме 1 всегда наблюдался более крупный Ag-ЯОР. В интерфазных ядрах и у сортов и у мутантных форм ноготков при этом наблюдалось от одного до четырех Ag-окрашенных ядрышек.

FISH анализ выявил у всех изучаемых форм локализацию 45S рДНК разной интенсивности на двух спутничных хромосомах 1 и 9. У сорта Золотое море выявлен минорный сайт 45S рДНК, расположенный медианно в коротком плече хромосомы 7. На длинном плече хромосомы 10 выявлен сайт 5S рДНК с сигналом высокой интенсивности, колоколизированный с минорным сайтом 45S рДНК. У сорта Райский сад минорный локус 45S рДНК отсутствует. На длинном плече хромосомы 10 выявлен сайт 5S рДНК с сигналом высокой интенсивности. У мутантных форм наблюдался полиморфизм по наличию минорного сайта 45S рДНК, расположенный медианно в коротком плече хромосомы 7. А также у мутантных форм выявлен полиморфизм сайтов 45S рДНК на хромосомах 1 и 9.

Таким образом, с использованием молекулярно-цитогенетических методов впервые идентифицированы все хромосомы в кариотипах *C. officinalis* и проведен сравнительный анализ геномов сортов и их мутантных форм, что позволило не только дать их биоморфологическую характеристику, но и охарактеризовать эти растения на уровне генома. Полученные результаты могут быть успешно использованы в практике при анализе селекционного материала, а также для дальнейшего включения их в селекционный процесс с целью получения фармацевтического сырья, взамен импортных аналогов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-016-00167.

Регионы гомозиготности в экстраэмбриональных тканях абортусов из семей с привычным невынашиванием беременности

Скрябин Н.А., Васильев С.А., Никитина Т.В., Жигалина Д.И., Бабушкина Н.П., Савченко Р.Р., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н.

НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ РАН, Томск

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) – это самопроизвольное прерывание беременности два и более раз подряд. Частота ПНБ составляет около 2% от числа беременностей. Одной из основных причин спонтанных прерываний беременности являются числовые хромосомные аномалии. Тем не менее, этиологические факторы у 40% абортусов от женщин с ПНБ остаются невыясненными. Одной из причин может являться гомозиготизация рецессивных мутаций за счет однородительской дисомии или феномена потери гетерозиготности (Loss of Heterozygosity, LOH) (Robberecht et al., 2012; Niida et al., 2018).

Материалы и методы. В настоящем исследовании был проведен поиск участков с отсутствием гетерозиготности в экстраэмбриональных тканях 16 парных абортусов первого триместра беременности от 8 женщин с ПНБ. У всех абортусов был нормальный кариотип по результатам метафазного кариотипирования и сравнительной геномной гибридизации на метафазных пластинках (сCGH). В работе были использованы микрочипы SurePrint G3 Human CGH + SNP 4 × 180K (Agilent Technologies). Результаты визуализированы с использованием программы Cytogenomics (Agilent Technologies). Некоторые из выявленных гомозиготных участков были верифицированы с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение. Всего было идентифицировано 30 областей с LOH в экстраэмбриональных тканях 10 абортусов (1p31.2-p31.1, 1q41-q42.13, 2q23.3-q24.2, 3p14.1-p13, 3q26.31-q26.33, 4p14-p12, 4q13.2-q21.1, 5p13.3-p13, 6q14.1, 7q21.11-q21.13, 7q31.2-q31.31, 7q31.33, 8q11.21-q11.23, 9q33.2-q34.11, 10p12.31-p12.1, 10q21.1, 11p15.3-p15.1, 11p12, 12q12, 14q21.1, 14q21.1-q21.2, 14q31.3-q32.12, 17q22-q24.1, 18q12.1-q12.2, 22q12.3-q13.31). Несколько регионов с LOH наблюдались у более чем одного эмбриона: четыре участка были обнаружены у двух эмбрионов (1q41-q42.13, 7q21.11-q21.13, 10q21.1, 11p12) и один регион – у трех эмбрионов (18q12.1-q12.2). У двух абортусов от одной супружеской пары были идентифицированы два одинаковых LOH (1q41-q42.13 и 7q21.11-q21.13).

В результате секвенирования по Сэнгеру в гомозиготных регионах были идентифицированы единичные гетерозиготные аллели. Это свидетельствует в пользу того, что выявленные нами гомозиготные участки хромосом не являются результатом *de novo* потери гетерозиготности, а представляют собой так называемые Runs of Homozygosity

(РОН). Такие гомозиготные участки возникают, когда от каждого родителя наследуются идентичные гаплотипы. Это может быть результатом близкородственного брака, однако в настоящий момент есть данные, свидетельствующие о том, что РОН являются распространенным явлением даже у не родственных индивидов (Ceballos et al., 2018). Для РОН характерна популяционная специфичность и данных об их распространенности в Российских популяциях на настоящий момент нет. Также недостаточно данных об эффектах РОН или их ассоциациях с фенотипическими признаками.

Одним из механизмов, посредством которого РОН могут играть роль в этиологии невынашивания беременности, может быть присутствие импринтированных генов. В регионах с идентифицированными РОН было обнаружено пять предположительно импринтированных генов в соответствии с базой данных Geneimprint: *OBSCN*, *HIST3H2BB*, *LMX1B*, *CELF4* и *FAM59A*. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что РОН могут играть роль в этиологии ПНБ с нормальным кариотипом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-10229.

Дерепрессия соматических мобильных элементов у *Drosophila* приводит к нарушению дифференцировки герминальных клеток яичников из-за снижения числа предшественников эскортных клеток

Олеся Соколова¹, Елена Михалева¹, Сергей Харитонов¹, Юрий Абрамов¹, Михаил Кленов¹

¹ Отдел молекулярной генетики клетки, Институт молекулярной генетики, РАН, Москва, Россия

Экспрессия мобильных генетических элементов в герминальных и соматических клетках яичников *Drosophila* контролируется с помощью piRNA-пути. Нарушение биогенеза piRNA в соматических эскортных клетках, которые являются клетками ниши и контролируют правильную дифференцировку герминальных клеток, приводит к серьезным дефектам оогенеза.

Мы показали, что при нарушении локуса *flamenco*, самого протяженного соматического piRNA-кластера, наблюдается снижение количества соматических эскортных клеток ниши и накопление герминальных недифференцированных клеток, т.е. наблюдается формирование герминального опухолевого фенотипа. Мутации *flamenco* четко демонстрируют, что дерепрессия мобильных элементов в соматических клетках ниши приводит к появлению опухолей в герминальных клетках.

При активации мобильных элементов образуется большое количество двухцепочечных разрывов в ДНК, что приводит к нарушению оогенеза и стерильности. Ранее было показано, что в герминальных клетках яичников дефекты оогенеза, связанные с нарушением piRNA-пути, супрессируются мутациями в генах чек-поинт киназ *chk2* и *atm*. Мутации в этих генах ослабляют контроль целостности ДНК и позволяют клеткам с двухцепочечными разрывами преодолевать чек-поинт. Мы показали, что в соматических клетках яичников при одновременном нарушении системы чек-поинт и piRNA-пути наблюдаются серьезные дефекты оогенеза, в отличие от герминальных клеток, где оогенез практически восстанавливается. Мы предполагаем, что соматические клетки ниши более чувствительны к повреждениям ДНК, вызванных дерепрессией мобильных элементов.

Мы показали, что мутации в локусе *flamenco* нарушают ранние этапы оогенеза на личиночной стадии, приводя к уменьшению количества эскортных клеток и появлению опухолевого фенотипа у взрослых мух. Гибель эскортных клеток или уменьшение их скорости деления не были обнаружены у взрослых мух. Наши результаты показывают необходимость сайленсинга мобильных элементов в соматических клетках ниши для правильного протекания процессов оогенеза.

ГИБРИДИЗАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ МЕЙОЗА У РАЗНОХРОМОСОМНЫХ СЛЕПУШОНОК *ELLOBIUS TANCREI* (MAMMALIA, RODENTIA)

Тамбовцева В.Г.¹, Матвеевский С.Н.², Коломиец О.Л.², Баклушинская И.Ю.¹

HYBRIDIZATION AND A MEIOTIC PUZZLE: A CASE OF *ELLOBIUS TANCREI*

Tambovtseva V.¹, Matveevsky S.², Kolomiets O.², Bakloushinskaya I.¹

¹Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

²Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

lynx1994@gmail.com

Робертсоновские транслокации (Rb) являются наиболее распространенными хромосомными мутациями у млекопитающих (King, 1993). Тенденция к слиянию акроцентрических хромосом с образованием метацентрических отмечена у насекомоядных, хищных, приматов, грызунов. Появление Rb метацентриков приводит к нарушениям нормального хода мейоза у гибридов разных хромосомных форм и, соответственно, диверсификации этих форм.

Особенно значительные проблемы возникают при монобрахиальной гомологии, т.е. гомологии Rb метацентриков только по одному из плеч. У таких гибридов в профазе I мейоза образуются сложные цепочки, обусловленные частичной гомологией хромосом, входящих в их состав. При этом в прицентромерных областях Rb метацентриков, как правило, сохраняются протяженные участки асинопсиса.

Ранее считалось, что наличие монобрахиальной гомологии является абсолютным барьером и ведет к полной стерильности гибридов, потому что расхождение хромосом из мультивалентов не может быть равновесным, в результате формируются анеуплоидные гаметы и нежизнеспособные зиготы, фертильность гибридов снижается вплоть до стерильности (Baker, Vickham, 1986). Однако в последнее время для разных групп животных показано существование форм и видов с монобрахиально гомологичными метацентриками (Nunes et al., 2011; Potter et al., 2017). Концепция мейотического драйва (Sandler, Novitski, 1957) позволяет объяснить не равновероятное наследование Rb метацентрика и соответствующих ему акроцентриков. Многолетнее изучение природной хромосомной изменчивости у слепушонок *Ellobius tancrei* дает основание предположить, что гибридизация и мейотический драйв могут быть теми механизмами, которые ведут к образованию новых хромосомных форм и видов (Ляпунова и др., 1984, 2010). Для проверки этой гипотезы мы провели инбредные скрещивания двух форм слепушонок с одинаковыми $2n=50$, $NF=56$ и двумя парами Rb метацентриков, в том числе монобрахиально гомологичными. При таком скрещивании гибриды первого поколения имеют также $2n=50$, $NF=56$, но все четыре Rb метацентрика оказываются разными: Rb(9.13), Rb(2.18), Rb(5.9) и

Rb(4.12). Из-за монобрахиальной гомологии у гибридов первого поколения образуются не 4 тривалента, а 2 тривалента и тетравалент (Matveevsky et al., 2015, 2017). После 10 лет селекции, несмотря на резкое снижение плодовитости в первом поколении, мы получили 9 поколений гибридов. Начиная со второго поколения, гибриды имели кариотипы с различным числом хромосом и комбинациями Rb транслокаций, отличающиеся от родительских. Анализ G-окраски метафазных хромосом показал, что из четырёх Rb метацентриков, встречающихся в кариотипах особей изучаемой линии, три [Rb(9.13), Rb(2.18) и Rb(4.12)] имеют тенденцию к фиксации в ряду поколений и лишь один Rb(5.9) – явную отрицательную динамику. Наибольшее преимущество имеет мелкий метацентрик Rb(9.13). Эти данные подтверждают гипотезу о ведущей роли мейотического драйва в гомозиготизации Rb-хромосом, хотя динамика этого процесса различается для разных транслокаций. Исследование препаратов мейоза методом световой микроскопии позволило отследить, как по мере выхода Rb метацентриков в гомозиготное состояние число сложных фигур в мейозе уменьшается. Наиболее сложная картина мейоза наблюдается в F1, однако уже в F3 отмечены особи, гомозиготные по одной-двум транслокациям, и минимальными отклонениями от нормального ходом мейоза. Анализ формирования синаптонемного комплекса был проведен для гибридов четвертого и седьмого поколений. Показано, что несмотря на наличие гетерозигот и монобрахиально гомологичных Rb метацентриков, происходит синапсис и рекомбинация гомологичных участках. Таким образом, некоторое количество клеток успешно проходит редукционное деление и обеспечивает наличие сбалансированных гамет. Мы полагаем, что проведенный нами эксперимент воспроизводит процессы, происходящие в естественных условиях, и дает основания считать мейотический драйв основным механизмом, обеспечивающим диверсификацию и быструю фиксацию возникающих хромосомных форм в природе.

Хромосома 4 и детерминация пола у домашней курицы

(Chromosome 4 and sex determination in *Gallus gallus domesticus*)

Трухина А.В.¹, Леоке Д.Ю.², Некрасова А.А.¹, Смирнов А.Ф.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург,
trukhina_ant@mail.ru

² Биологическая станция "Рыбачий" ЗИН РАН, Калининградская область, dleoake@mail.ru

К настоящему моменту накоплены общие представления о детерминации пола у позвоночных животных (рыбы, амфибий, рептилии, млекопитающие). Дана общая схема его определения и у птиц. В основном она базируется на знаниях, собранных в экспериментах на домашней курице *Gallus gallus domesticus*. У изученных групп животных выявлены два механизма определения пола (генетический и средовой), а также известен ряд полоопределяющих генов и предложены эпигенетические механизмы детерминации пола.

Формирование признаков пола у животных происходит в результате наложения двух процессов: дифференцировки гонады после первичной детерминации пола и ее заселения первичными половыми клетками, вступающими в мейоз на разных этапах развития у самцов и самок. Считают, что гены, кодирующие ключевые генетические факторы, контролирующие детерминацию пола у животных, располагаются в половых хромосомах. Но это верно лишь отчасти. Так, например, большинство генов, участвующих в дифференцировке пола, располагаются в аутосомах. Гены, участвующие в детерминации пола не исключение, и могут также находиться не только в половых хромосомах. Для их активации достаточно одного фактора, который распознается клеткой как сигнал для определения и дифференцировки пола. Таким «сигналом» может быть половой гормон (андрогены и эстрогены), или вещества, вырабатываемые первичными половыми клетками во время или после миграции по кровеносным сосудам, а также факторы, гены которых расположены в половых хромосомах. В геноме млекопитающих, такой фактор был найден и обозначен как SRY. Он расположен в хромосоме Y и отвечает за развитие организма по мужскому типу. У птиц этот фактор считают утерянным.

Кроме того, при изучении кариотипов разных видов животных было описано как минимум четыре системы хромосомного определения пола: XX/XY (дрозофила, млекопитающие), ZZ/ZW (тутовый шелкопряд, птицы), гапло-диплоидная система определения пола (пчелы, муравьи) и система определения пола с множественными половыми хромосомами (утконос). У большинства из изученных видов животных кариотип состоит из большого количества хромосом, однако существуют и такие животные, у которых в кариотипе всего лишь одна хромосома. Например, у самки муравья-бульдога в

ядре две хромосомы, а у самца только одна. В данном случае бессмысленно говорить о наличии у них половых хромосом. Здесь пол определяется просто: гаплоидным или диплоидным набором хромосом, а ключевой полоопределяющий ген представлен одной или двумя копиями.

В геноме курицы до сих пор ищут и не могут найти в половых хромосомах фактор, который отвечает за детерминацию пола. В настоящее время существует несколько гипотез, предполагающих механизм детерминации пола у птиц: 1) пол определяет фактор, ген которого расположен в *W* – хромосоме; 2) пол определяет фактор, ген которого расположен в *Z* – хромосоме; 3) пол определяется действием половых гормонов на соответствующие им рецепторы. Проведенный нами анализ генов, расположенных в *X*-хромосоме у человека и в хромосоме 4 у курицы (из базы данных NCBI) дает нам основание предложить еще одну гипотезу: хромосома 4 принимает непосредственное участие в детерминации пола у птиц, вместе с *Z* и *W*-хромосомами. За это предположение говорят следующие факты: в хромосоме 4 расположен ген *SOX3*, ближайший гомолог гена *SRY* у млекопитающих, в этой же хромосоме есть ген *AR* (кодирует андрогеновый рецептор), а также хромосома 4 курицы и хромосома *X* человека имеют протяженный участок гомологии, включающий более 20-ти генов.

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-01321а).

Влияние новой короткой изоформы секурина (РТТG1) на пролиферацию и ее возможная роль в митозе

Effect of new minor isoform of securin (РТТG1) on proliferation and its potential role in mitosis

А. Н. Уварова^{1,2}, А. М. Шварц^{1,3}, Д. Э. Демин^{1,3}

¹*Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва;* ²*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва;* ³*Московский физико-технический институт, Москва*

Секурин (РТТG1) – это протоонкоген, контролирующий расхождение сестринских хроматид в митозе, блокируя преждевременное разрезание сепаразой когезина. В начале анафазы секурин взаимодействует с комплексом стимуляции анафазы (APC), убиквитинилируется и деградирует. В этом взаимодействии основную роль играют D-бокс (61–68 а.о.), мутация которого приводит к замедлению деградации белка в митозе, и два ТЕК-бокса (71–73 и 94–96 а.о.), облегчающие убиквитинилирование. Один ТЕК-бокс и D-бокс кодируются экзоном 3, а второй ТЕК-бокс – экзоном 4.

В ряде клеточных линий человека нами была обнаружена новая короткая изоформа мРНК секурина, в которой отсутствуют экзоны 3 и 4. Новая изоформа белка, как и полноразмерная, имеет С-концевой участок (а.о. 118–199), отвечающий за ингибирование сепаразы. Это позволяет предполагать, что новая изоформа РТТG1 также блокирует сепаразу, а вследствие отсутствия основного сайта деградации может блокировать сепаразу в анафазе, когда полноразмерный белок уже разрушен.

Изучение роли короткой изоформы РТТG1 в митозе представляет интерес в связи с возможным вкладом новой формы секурина в формирование анеуплоидии.

Предварительные результаты показывают, что при крайне низких концентрациях эмбриональной телячьей сыворотки в среде (порядка 0,1%) сверхэкспрессия как короткой изоформы, так и полноразмерного белка секурина приводит к увеличению пролиферации нейрональных клеток эмбриональной почки НЕК293. Однако, при более высоких концентрациях сыворотки (около 1%) короткая изоформа РТТG1 ускоряет клеточный цикл слабее полноразмерного белка. Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект может быть связан с удлинением времени митоза в результате блокирования сепаразы и в случае более высоких концентраций сыворотки сильнее выражен из-за меньшей длины цикла.

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований №18-34-00628

УЧАСТИЕ БЕЛКА MEPI DROSOPHILA MELANOGASTER В ПРИВЛЕЧЕНИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ХРОМАТИН

Федорова Т.Н., Бабоша В.А., Георгиев П.Г., Максименко О.Г.

Институт Биологии Гена РАН, Москва

Структура хроматина неразрывно связана с процессами активации или репрессии транскрипции генов. Регуляция на уровне компактизации/декомпактизации хроматина, изменения положения нуклеосом, внесения определенных химических модификаций на хвостах гистонов важна для обеспечения тонкой регуляции экспрессии генов, и любые нарушения на этом уровне приводят к разбалансировке генной экспрессии и, как следствие, различным нарушениям на уровне целого организма. Комплексы, ремоделирующие хроматин, представляют собой многокомпонентные сложные системы, способные модулировать положение нуклеосом и вносить или снимать определенные гистоновые метки. Одним из основных комплексов такого типа у эукариот является Mi-2/NuRD. Исследования показали, что комплексы Mi-2/NuRD не только передвигают нуклеосомы посредством АТФ-зависимого ремоделирования хроматина, но также содержат субъединицы, деацетилирующие гистоны и связывающие метилированную ДНК. По сравнению с другими типами хроматин-ремоделирующих комплексов, объединение функций ремоделирования хроматина и деацетилирования/деметиления гистонов является уникальной особенностью Mi-2/NuRD. Комплексы NuRD облегчают сборку как открытого, так и закрытого хроматина в зависимости от геномного контекста. Поэтому NuRD в определенном геномном окружении функционирует либо как коактиватор, либо как ко-репрессор транскрипции гена. У дрозофилы был очищен один из вариантов Mi-2 комплекса, названный dMec. Уникальным компонентом данного комплекса является консервативный белок MEPI, который отвечает за профиль связывания всего комплекса на хроматиновых сайтах. Показано, что данный тип комплекса критически необходим для соматической дифференцировки на этапе перехода из раннего эмбриогенеза в поздний. До сих пор отсутствует единая концепция, объясняющая, каким образом данный комплекс в зависимости от геномного контекста способен работать либо как активатор либо как репрессор транскрипции. Решение этой проблемы требует более глубокого понимания этапов сборки Mi-2/NuRD на хроматине, включающих установление связей с различными регуляторными белками. Мы предполагаем, что структурообразующим компонентом данного комплекса является белок MEPI, способный напрямую взаимодействовать с разными белками. MEPI, достаточно крупный белок, в составе которого присутствуют 7 цинковых пальцев C2H2-типа, однако не способные специфично связывать протяженные

ДНК-мотивы. Согласно нашей гипотезе, при помощи неструктурированных участков белка и/или цинковых пальцев МЕР1 формирует множество контактов с ДНК-связывающими белками, которые и обеспечивают специфичное позиционирование МЕР1-содержащего комплекса на хроматине. При этом, в зависимости от геномного контекста, через МЕР1 на хроматин могут привлекаться белковые комплексы с разными активностями (активаторы или репрессоры транскрипции). С другой стороны, МЕР1 может напрямую связываться и с белками-регуляторами активности энхансеров, тем самым осуществляя контроль уровня транскрипции генов-мишеней. В рамках проверки такой гипотезы мы провели поиск белков-партнеров белка МЕР1 путем скрининга среди ДНК-связывающих белков. В результате нами найдено 6 ранее неизвестных ДНК-связывающих партнера белка МЕР1, которые могут выступать потенциальными рекрутерами dMec-комплекса на хроматин. Нами были локализованы участки взаимодействия с данными белками, а также с ранее описанными белками-регуляторами, Ttk69 и GAF. В результате мы обнаружили, что Ttk69 и GAF, а также один из ДНК-связывающих белков, CLAMP, взаимодействуют со средней неструктурированной частью белка МЕР1. Остальные ДНК-связывающие белки (Grau, Hb, CG12299, CG30020) связываются с С-концевыми цинковыми пальцами белка. Такой результат свидетельствует о возможности одновременного взаимодействия белка МЕР1 и с ДНК-связывающимися модулями и с белками-регуляторами работы энхансеров. При этом взаимодействие с белком Mi-2 у белка МЕР1 реализуется при участии N-концевой части белка. В настоящее время для детальной характеристики этапов сборки МЕР1-содержащего комплекса на хроматине создаются мутантные версии белка, экспрессирующиеся в дрозофиле. На такой модели будет возможно исследовать этапы сборки функционального МЕР1-содержащего комплекса на модельных регуляторных элементах *in vivo* и детально описать механизм функционирования комплекса.

Работа проводится при поддержке гранта РФФИ № 18-04-01272.

О РОЛИ ЛИЧИНОК РОДА *CHIRONOMUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE) В БИОИНДИКАЦИИ ВОДОЕМОВ

Филинкова Т.Н.

Уральский государственный педагогический университет, г. Екатеринбург
filink_572mail.ru

Для выявления последствий загрязнения водной среды применяются разнообразные тест-системы, и особую роль здесь играют личинки хирономид, являющиеся важной частью зообентоса и имеющие политенные хромосомы. В данной работе на основе изучения видового состава и хромосомного полиморфизма представителей рода *Chironomus* из шести озер (Агашкуль, Иткуль, Карагуз, Силач, Сунгуль и Беликуль) Челябинской области представляется возможным сделать вывод, подтверждающий значение личинок хирономид в биоиндикации пресных водоемов.

Сбор личинок рода *Chironomus*, их фиксацию на кариологический анализ и изготовление микропрепаратов политенных хромосом производили по общепринятым методикам. В пяти озерах (Агашкуль, Иткуль, Карагуз, Силач и Беликуль) симпатрично обитали личинки *Chironomus plumosus* Linnaeus, 1758 и *Ch. entis* Shobanov, 1989 с долей личинок *Ch. entis* 9.71-26.8%. В оз. Сунгуль отмечены только личинки *Ch. plumosus*, при том, что проба содержала 112 особей. Изучение хромосомного полиморфизма челябинских водоемов также выявило другие отличительные особенности популяции *Ch. plumosus* из оз. Сунгуль, в которой среднее число гетерозиготных инверсий (ГИ) на особь составило 1.04, в других челябинских озерах - 0.22-0.55; доля особей с ГИ - 69.64%, в других озерах - 22.00-52.24%; количество личинок с двумя и более ГИ в кариотипе - 25%, в других челябинских озерах такие личинки отсутствовали или их доля равнялась 2.98%. По нашим данным, популяция *Ch. plumosus* из оз. Сунгуль отличается высокой частотой (0.54) особей с ГИ pluV1.2 от всех изученных нами уральских популяций, где данный показатель равняется 0.02-0.39. ГИ pluV1.2 является одной из основных в популяциях и считается экологической (Петрова, Ильинская, Кайданов, 1996).

Отличительные особенности популяции *Ch. plumosus* из оз. Сунгуль, видимо, объясняются функционированием на его берегах в 1946-1955 годы в рамках Советского атомного проекта секретного объекта - лаборатории «Б», в которой под руководством Н.В. Тимофеева-Ресовского в природных условиях и модельных системах изучали распределение и судьбу различных излучателей, вводимых в почву, грунт и пресные водоемы (Емельянова, Гаврильченко, 2000). После закрытия лаборатории «Б» был проведен большой объем работ по ликвидации радиоактивных загрязнений ее деятельности, охранный режим с данной

территории сняли в 2009 г. Известно, что ионизирующие излучения вызывают у хирономид в кариотипе разнообразные изменения (Keyl, 1959; Кикнадзе, Сиирин, 1991; Петрова, 1991, 2013; Кикнадзе и др., 1993; Michailova, Petrova, 1994; Петрова и др., 1994; Голыгина и др., 1996; Петрова, Михайлова, 1996; Petrova, Michailova, 1996; Голыгина, 1999; Кикнадзе, Истомина, 2000; Гундерина, 2001; Белянина, 2012, 2014, 2015), способные сохраняться в популяциях через 60-90 поколений после воздействия радиации (Кикнадзе, Истомина, 2000).

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА CG9890, СОДЕРЖАЩЕГО ДОМЕНЫ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ

Н.А. Фурсова, А.Н. Краснов

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

В ходе предыдущих исследований мы обнаружили, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании ориджинов репликации. В ходе данного проекта мы изучаем взаимодействие ENY2 с еще одним белком CG9890, который содержит домен цинковых пальцев, как и Su(Hw). Мы предполагаем, что по аналогии с Su(Hw), белок CG9890 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя, таким образом, регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. В ходе данного проекта было подтверждено взаимодействие с белком ENY2. Анализ внутриклеточной локализации CG9890 показал, что этот белок локализован преимущественно в ядре. С помощью полно-геномного анализа ChIP-Seq была определена локализация белка CG9890 в геноме дрозофилы. Установлено, что сайты посадки изучаемого белка в геноме преимущественно ассоциированы с промоторными областями генов. С использованием нескольких биоинформатических подходов нам удалось продемонстрировать наличие геномной колокализации белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов SAGA и ORC, а также комплекса ремоделирования хроматина dSWI/SNF. Биохимическими методами также показано взаимодействие с комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TPO. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось. Кроме того, мы установили, что сайты посадки белка CG9890 в геноме являются областями с низкой нуклеосомной плотностью. Таким образом, CG9890 взаимодействует с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не взаимодействует с комплексом AMEX, участвующем в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на работу CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла. Кроме того, CG9890 взаимодействует с комплексом ORC, который необходим для позиционирования точек начала репликации. Возможно, CG9890 может также принимать участие в синхронизации транскрипции и репликации. Таким образом, белок CG9890 может являться новым регуляторным фактором дрозофиллы, участвующим в привлечении вышеуказанных комплексов на промоторы определенной группы генов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-02193.

Судьба ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в процессе миелоидной дифференцировки и роль специфической субъединицы РНФ10

Хамидуллина А.И., Татарский Е.В., Георгиева С.Г., Штиль А.А., Сошникова Н.В., Татарский В.В.*

*- tatarskii@gmail.com

ФГБУ НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

Эпигенетические ингибиторы – низкомолекулярные вещества являются важной частью противоопухолевой терапии. Ингибирование процессов метилирования ДНК, метелирования, деметилирования и ацетилирования гистонов активно используется в клинике или тестируется в клинических и доклинических испытаниях. Все больше внимания в качестве мишени привлекают к себе комплексы, считывающие эти метки и комплексы ремоделирования хроматина. Мутации в хроматин-ремоделирующих комплексах SWI/SNF человека – BAF и РВАФ обнаруживаются в 20% человеческих опухолей и коррелируют с негативным прогнозом. В то же время эти мутации создают уязвимости для терапии, например, к ДНК-повреждению, ингибированию гистонеметилтрансферазы EZH2 и Bcr-Abl в случае мутаций ARID1A. Изменения в экспрессии компонентов комплексов и его состава также могут способствовать опухолевой прогрессии. В то время как часть компонентов комплекса являются опухолевыми супрессорами, другие компоненты могут обладать онкогенной функциями, особенно в случае инактивирующих мутаций супрессорных белков. Специфический компонент РВАФ комплекса белок РНФ10 экспрессируется в всех клетках, и необходим для поддержания пролиферации клеток-предшественников. Этот компонент экспрессируется в виде четыре изоформ (РНФ10-Pl, -Ps, -Sl, -Ss), обладающими разными функциями и отличающимися доменной организацией.

Мы изучили свойства РНФ10 в опухолевых клетках. Экспрессия РНФ10 коррелирует с уровнем с-Мус, но не уровнем β -катенина на панели опухолей рака толстой кишки. В нетрансформированных первичных клетках РНФ10 экспрессируется во всех фазах клеточного цикла, кроме покоящихся (G0) клетках, и его экспрессия увеличивается при обработке факторами роста (EGF, FGF) и/или гиперэкспрессии с-Мус. При увеличении клеточной плотности происходит изменение экспрессии изоформ РНФ10 с длинных изоформ РНФ10-l на изоформы РНФ10-s у которых отсутствуют 47 аминокислот на N-конце, что коррелирует с подавлением циклина D1 и увеличением p27. В клетках первичных фибробластов человека, с гиперэкспрессией p27, наблюдается увеличение синтеза всех изоформ РНФ10. Нокаут β -катенина и с-Мус в клетках линий рака толстой кишки SW620 приводит к подавлению экспрессии всех изоформ РНФ10. Ингибирование РНФ10 в

опухолевых клетках различного происхождения сопровождается повышением уровня p21 и/или p27, задержкой клеток в G1 фазе клеточного цикла, снижением скорости роста клеток и индукцией клеточного старения.

Таким образом, субъединица p10 оказывает существенное влияние на прогрессию клеточного цикла, взаимодействуя с активаторами и супрессорами клеточного цикла, влияя на их экспрессию и активацию.

Данная работа была поддержана грантом РФФ № 18-14-00303

УЧАСТКИ ПРОТЯЖЕННОЙ ГАПЛОТИПИЧЕСКОЙ ГОМОЗИГОТНОСТИ В ХРОМОСОМАХ ПОПУЛЯЦИЙ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ И УРАЛА

Хрунин А.В., Хворых Г.В., Лимборская С.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, г. Москва, Россия

khrunin@img.ras.ru

Структура генетического разнообразия, наблюдаемая в популяции (этнической группе), является отражением путей ее исторического становления в ходе взаимодействия с другими популяциями и условиями среды обитания. Существование паттернов протяженной гомозиготности в отдельных участках генома может быть свидетельством действия на них естественного отбора. Нами был осуществлен поиск таких участков в полногеномных данных по однонуклеотидному полиморфизму нескольких популяций европейской части России и северного Урала (русские из центральных и северных районов, ижемские и прилузские коми, вепсы, ханты и манси) с использованием теста на протяженную гаплотипическую гомозиготность (iHS) (Voight et al., 2006). Тест основан на том, что естественный отбор по какому-либо маркеру приводит к гомозиготизации участка генома вокруг мишени отбора за счет того, что одновременно отбираются все полиморфизмы, сцепленные с мишенью (весь гаплотип). Расчеты проводились с использованием программного пакета RENN 2.0. В дальнейший анализ отбирались полиморфизмы, значения индексов iHS которых были выше 0.999 перцентиля. Для удобства сравнения весь геном был разделен на неперекрывающиеся фрагменты длиной 100 kb. Количество выявленных в популяциях полиморфизмов с высокими значениями iHS варьировало от 456 до 538, которые, в свою очередь, распределились в составе 193–364 отдельных 100 kb участков, установленных в каждой из популяций. Многие участки включали лишь по одному полиморфизму. Максимальные же их количества были зафиксированы в большинстве популяций в участках, расположенных на 6 хромосоме, в регионе локализации генов главного комплекса гистосовместимости. Исключением являлись популяции ханты и манси, в которых лидерами по числу найденных мишеней отбора выступали участки других хромосом. Популяции ханты и манси занимали особое положение также и в том отношении, что, ранее у них, в отличие от всех других популяций, нами не было обнаружено существенных различий в генетической структуре (использовались методы анализа главных компонент и ADMIXTURE анализа). Однако с позиций сравнительного анализа найденных участков-мишеней различия между ханты и манси оказались значительными и сопоставимыми с таковыми между другими популяциями.

Генная аннотация отобранных полиморфизмов была проведена с помощью программного пакета SnpEff. Функциональный анализ с использованием инструмента WebGestalt (метод ORA) выявил около 20 биологических процессов (в терминах генной онтологии), обогащенных найденными генами. Однако большая часть этих процессов соотносилась лишь с одной популяцией – популяцией вепсов, а наиболее представленными среди них были ассоциации, связанные с функционированием сердечнососудистой системы (регуляция циркуляции крови и деятельности сердца). В популяциях же ижемских и прилузских коми, русских из центральных районов, а также манси, не было обнаружено биологических процессов, статистически значимо обогащенных генами-мишенями, и поэтому выявленные в них участки-кандидаты могут рассматриваться как независимые точки приложения действия отбора (Cardona et al., 2014).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00635).

Молекулярная структура 5'нетранслируемой области гена *FMR1* и тяжесть симптомов у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы

Юдкин Д.В.¹, Грищенко И.В.¹, Максимова Ю.В.², Шорина А.Р.³

¹ ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

² ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

³ ГБУЗ НСО Городская клиническая больница №1

Синдром ломкой X-хромосомы является наиболее распространенной причиной наследственной умственной отсталости у человека. Механизм развития синдрома основан на экспансии ЦГГ-повтора в 5' нетранслируемой области гена *FMR1* расположенного в X-хромосоме. В норме ген содержит не более 50 триплетов. Если размер повтора становится более 200 триплетов, то формируется аллель, называемый полной мутацией и развивается синдром. Экспансия повторов приводит к метилированию и гетерохроматинизации промоторного района гена *FMR1* с последующим подавлением работы гена. Отсутствие белка FMRP, кодируемого этим геном, приводит к нарушению формирования нейронов и умственной отсталости. Размер повтора у пациентов может варьировать от 200 до 2000 и более триплетов. Дополнительно у носителей такого аллеля встречается соматический мозаицизм и соматическая экспансия. Женщины, носительницы мутантного аллеля в добавок к мозаицизму также имеют вторую хромосому X со вторым аллелем гена. Кроме того метилирование промоторной области может происходить не во всех клетках и ранее показано, что некоторые пациенты имеют небольшой уровень экспрессии гена *FMR1*. Мы исследовали зависимость клинических симптомов пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы от размера повтора, соматического мозаицизма и уровня метилирования промоторной области гена *FMR1*. Образцы периферической венозной крови были собраны у пациентов, обратившихся в Городскую клиническую больницу №1 с соблюдением этических норм и после подписания информированного добровольного согласия. Из крови выделяли ДНК, синтезировали тракты ЦГГ повторов и проводили фрагментный анализ полученных образцов. Анализ метилирования промоторной области гена *FMR1* проводили с помощью метилчувствительных рестриктаз с последующей ПЦР. Клинические данные были получены по результатам психиатрического обследования пациентов. В результате была исследована зависимость тяжести симптомов заболевания от размера повтора, уровня метилирования и соматического мозаицизма по размеру повтора и уровню метилирования.

Роль белка NON3 (Novel Nucleolar protein 3) в формировании прицентромерного гетерохроматина у *Drosophila melanogaster*

Юшкова А.А.^{1,2}, Огиенко А.А.¹, Попова Ю.В.^{1,3}, Пиндюрин А.В.^{1,2,3}, Андреева Е.Н.^{1*}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский Государственный Университет, Россия

³Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: andreeva@mcb.nsc.ru

Ядрышко – немембранная клеточная органелла в ядре эукариот, играющая ключевую роль в биогенезе рибосом. Ряд белков ядрышка участвуют и в других важных клеточных процессах, в частности, в митозе. В данной работе проводится функциональная характеристика малоизученного белка NON3 (Novel Nucleolar protein 3) *Drosophila melanogaster*, относящегося к высококонсервативному BRIX–домен–содержащему семейству белков. Как у дрожжей, так и у человека белок ядрышка RPF2 (ортолог NON3) принимает участие в процессинге предшественника рибосомной РНК. Показано, что снижение количества белка NON3 в культивируемых клетках S2 дрозофилы влияет на формирование веретена деления, но задействованный при этом молекулярный механизм неизвестен. Ранее в нашей лаборатории белки NON3 и HP1 (Heterochromatin protein 1) были идентифицированы при помощи масс–спектрометрического анализа в составе комплексов с белком гетерохроматина SUUR (Suppressor of Under–Replication). В рамках работы впервые охарактеризованы фенотипы мутаций по гену *Non3*, создана плазмидная конструкция и получена линия трансгенных мух для эктопической экспрессии рекомбинантного белка NON3–eGFP под контролем последовательности UAS. Обнаружено, что в клетках дрозофилы белок NON3 является компонентом хроматина и локализуется в ядрышке, перицентрическом гетерохроматине и плечах хромосом. Выявлено, что в прицентромерных районах хромосом белок HP1 почти не выявляется у мутантов по гену *Non3*, поскольку снижен уровень метилирования гистона H3K9, необходимого для связывания HP1 в перицентрическом гетерохроматине. Известно, что отсутствие HP1 влияет на кинетохор–зависимый рост микротрубочек веретена деления. Таким образом, мы предполагаем, что изменение состава прицентромерного гетерохроматина у мутантов по гену *Non3* приводит к нарушению формирования веретена деления.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ #18-34-00699