

На правах рукописи

Андреенков Олег Владимирович



**ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ ЗОНЫ ГЕНА *NOTCH*
DROSOPHILA MELANOGASTER МЕТОДАМИ
НАПРАВЛЕННОЙ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ**

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2022

Работа выполнена в лаборатории хромосомной инженерии ФГБУН
Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, г. Новосибирск

Научный руководитель: Демаков Сергей Анатольевич, доктор
биологических наук, директор ФГБУН
Института молекулярной и клеточной
биологии Сибирского отделения Российской
академии наук, г. Новосибирск

Оппоненты: Груntenко Наталия Евгеньевна, доктор
биологических наук, заведующая
лабораторией генетики стресса ФГБНУ
«ФИЦ Институт цитологии и генетики СО
РАН», г. Новосибирск

Чуриков Николай Андреевич доктор
биологических наук, профессор, заведующий
лабораторией эпигенетических механизмов
регуляции экспрессии генов ФГБУН
Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН, г. Москва

Ведущее учреждение: ФГБУН Институт биологии гена РАН, г. Москва

Защита состоится: _____ 2022 г. в 13-00 часов на заседании
диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук
при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
(630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49,
e-mail: ovant@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в
библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО
РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref
Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одной из главных задач биологии является установление взаимосвязей между функционированием генетического аппарата эукариотической клетки и его структурной организацией, наблюдаемой на цитологическом уровне. Функции наследственного аппарата в наибольшей степени реализуются в процессе развития многоклеточного организма, а ключевые этапы этого процесса связаны с работой ограниченного количества генов. Эти гены находятся в центре особых систем передачи информации, позволяющих принимать и передавать сигналы от соседних клеток в процессе морфогенеза. Такие системы передачи информации носят название сигнальных каскадов. Среди них важное место занимает каскад гена *Notch*. Компоненты сигнального пути *Notch* высококонсервативны среди всех билатеральных многоклеточных, а сам рецептор *Notch* является синапоморфией у *Metazoa* (Gazave, 2009). Со времени открытия этого гена в 1919 году на *Drosophila melanogaster* (Mohr, 1919), активные исследования гена *Notch* продолжаются до сих пор.

Современные методы молекулярной генетики открывают уникальные возможности для исследований локуса *Notch* у *D. melanogaster*. В частности, при изучении роли этого гена и его продуктов во взаимодействии различных уровней биологической организации. Локус *Notch* у *D. melanogaster* состоит из тела гена, занимающего около 37 т.п.н. и имеющего развитую экзон-интронную структуру, а также 5'- и 3'-регуляторных областей, занимающих от 1 до 2 т.п.н. Показано, что в 5'-регуляторную зону гена входит инсуляторный элемент, отвечающий за установление автономности локуса от внешних активных цис-элементов генома, таких, как энхансеры. Данная зона гена также отвечает за получение специфических сигналов, активирующих транскрипцию гена.

Активность гена *Notch* связана с установлением межклеточных взаимодействий в процессах морфогенеза через механизмы латерального ингибирования. Нарушения в регуляции транскрипции этого гена приводят к ошибкам развития целого ряда органов, имеющих эктодермальное происхождение. Это связано с тем, что активность генной сети *Notch* на ранних стадиях развития критически важна для выбора судьбы клетки между эпидермальным и нейрональным путями развития. В соответствии с этим, нарушения в регуляции транскрипции гена *Notch* у *Drosophila* приводят к нарушениям развития глаза, крыла, фолликулярных клеток яичника, микро- и макрохет. У человека мутации в компонентах *Notch* каскада вовлечены в патогенез ряда наследственных и соматических заболеваний, включая мультисистемные (Катанаев, 2011).

У дрозофилы цитологическая структура локуса *Notch* неоднородна. На политенных X-хромосомах ядер клеток слюнных желёз *D. melanogaster* тело гена локализуется в диске 3C7, а 5'-регуляторная зона расположена в декомпактизованном хроматине междиска 3C6/C7. Уникальность локуса заключается в существовании небольшой, около 900 п.н., делеции в регуляторной зоне, вызывающей как нарушение цитологической структуры хромосомы в районе локуса, так и проявление нарушений

развития целого организма с образованием комплекса характерных Notch-фенотипов у взрослых мух. Было показано, что это связано с удалением граничного элемента генома. Такие элементы образуют барьеры, защищающие гены от влияния эффекта положения (в терминах классической генетики) или же ограждают промотор гена от влияния удалённых энхансеров и сайленсеров (в терминах молекулярной генетики). Удаление этих барьеров сопровождается изменениями на уровне топологии хромосом.

Использование данных, накопленных за сто лет исследований методами классической генетики, в сочетании с самыми современными молекулярно-генетическими подходами, включая систему CRISPR/Cas9, позволяют глубже понять механизмы регуляции такого жизненно-важного и консервативного гена как *Notch*.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является выявление функционально значимых последовательностей ДНК регуляторной зоны гена *Notch* и изучение их связи со структурой хроматина в эктопическом и нативном окружении. В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Используя систему интеграции последовательностей ДНК междиска в акцепторный транспозон *pIcon*, исследовать влияние различных последовательностей ДНК 5' регуляторной зоны гена *Notch* на структуру хроматина в эктопическом генетическом окружении.

2. Создать линию мух с протяженной делецией регуляторной зоны гена *Notch* в сочетании с *attP* сайтом методом сайт-специфической гомологичной рекомбинации.

3. Получить направленные делеции функциональных элементов регуляторной зоны гена *Notch* и проанализировать их фенотипические проявления.

4. Проанализировать структуру хроматина в линиях с полученными делециями и провести иммунофлюоресцентное исследование состава ряда архитектурных белков в районе 3C6/C7.

Научная новизна. Впервые выявлена короткая последовательность ДНК регуляторной зоны гена *Notch*, необходимая и достаточная для формирования декомпактного состояния хроматина в эктопическом генетическом окружении. Показано сохранение свойств хроматина междискового района 3C6/C7 в эктопическом генетическом окружении. Впервые получена и апробирована система для проведения направленного мутагенеза регуляторной зоны гена *Notch* в линиях мух *D. melanogaster*. С использованием данной системы в регуляторную зону гена *Notch* впервые введён сайт интеграции *attP* фага ΦC31. Получены и охарактеризованы линии мух, несущие направленные делеции регуляторной зоны гена *Notch*.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Результаты данной работы способствуют расширению фундаментальных знаний о регуляции гена *Notch* - одного из важнейших генов развития многоклеточных организмов, включая человека. Полученные результаты представляют интерес для биологов, занимающихся

вопросами развития. Материалы данной диссертационной работы вошли в методические рекомендации по применению инструментов редактирования для модификации геномов животных и культивируемых клеток для специалистов, студентов и аспирантов. Работа является одной из первых, где апробированы новые методы направленной гомологичной рекомбинации в получении мутаций регуляторной области гена *Notch* дрозофилы.

Положения, выносимые на защиту. Ключевые междисковые последовательности сохраняют автономность в эктопическом генетическом окружении. Минимальная последовательность ДНК из 5' регуляторной зоны гена *Notch*, длиной 276 п.н., вызывает образование междиска в эктопическом генетическом окружении. Делеции 5' регуляторной зоны гена *Notch* в сочетании со встройкой в первый интрон вызывают нарушения структуры глаз. Делеция инсуляторного участка в 5' регуляторной зоне гена *Notch* на хромосомном уровне приводит к исчезновению междиска 3C6-7 и сайтов связывания инсуляторных белков в данном районе.

Степень достоверности результатов и апробация работы. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, достоверны, что подтверждается логической обоснованностью выводов и согласованностью с результатами других исследовательских групп. Полученные в ходе работы данные были представлены на Международной конференции «Хромосома», Новосибирск, 2018 и Всероссийской конференции «Дрозофила в генетике и медицине», Гатчина, 2017.

Вклад автора. Основная часть экспериментальной работы и обработка полученных результатов выполнена автором самостоятельно. Электронные микрофотографии препаратов политенных хромосом слюнных желез сделаны В.Ф. Семешным и С.А. Демаковым. Статистическая обработка данных, отдельные клонирования, трансформация части линий дрозофилы проводились Н.Г. Андреевской и Е.И. Волковой.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение), выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 31 рисунком. В списке литературы приведен 136 источник.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК – 5, одна глава в книге, тезисов докладов и материалов конференций – 2.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы состоит из четырех разделов. Первые два раздела кратко знакомят читателя с организацией политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*, а также с положением локуса *Notch* на цитологической карте и со значимостью исследований локуса в истории изучения организации хроматина в

политенных хромосомах. В следующем разделе обзора литературы изложены современные представления о значении гена *Notch* и находящегося под его управлением сигнального каскада в процессах развития и дифференцировки клеток органов нейроэктодермального происхождения у *D. melanogaster*. Заключительный раздел представляет собой подробную ретроспективу исследований 5'-регуляторной и промоторной зоны гена *Notch* у *D. melanogaster*.

Материалы и методы

В главе собраны и подробно описаны использованные в работе инструменты, материалы, методы, линии *D. melanogaster*. Приведены методы генной инженерии, использованные в работе при создании многочисленных векторных конструкций, несущих встройки генетического материала из локуса *Notch* *D. melanogaster*. Описаны разнообразные цитологические методы, использованные при подготовке препаратов политенных хромосом *D. melanogaster*. Приведены методы выделения хроматина из клеточных ядер и их обработки ДНКазой I. Отдельные разделы посвящены подробному описанию методов получения трансгенных линий *D. melanogaster* с использованием Р-элементной трансформации и современных систем направленной гомологичной рекомбинации, включая *CRISPR/Cas9* - индуцированную и *attP/attB φC31* - индуцированную гомологичную рекомбинацию.

Результаты

Работа состоит из двух частей, объединенных исследованием картируемой в междиске 3C6/3C7 политенных хромосом *Drosophila melanogaster* 5' регуляторной зоны гена *Notch* методами сайт-специфичной гомологичной рекомбинации. В первой части работы представлены эксперименты с применением системы сайт-специфичной гомологичной FRT/FLP-рекомбинации между двумя транспозонами. В результате этой работы проведено последовательное встраивание изучаемых последовательностей 5' регуляторной зоны гена *Notch* в конструкцию Icon, расположенную в районе 84F хромосомы 3. Такой подход позволил исследовать степень компактизации хроматина отдельных последовательностей междиска 3C6/3C7 в эктопическом генетическом окружении методом цитологического анализа политенных хромосом. Особенности организации хроматина эктопического междиска анализировали по наличию и расположению сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I (DHS).

Во второй части работы для изучения 5' регуляторной зоны гена *Notch* в его нативном окружении была использована система *CRISPR-Cas9* сайт-специфичных нуклеаз в сочетании с методом гомологичной рекомбинации. Вначале была получена базовая линия, в которой последовательность протяженностью около 4 т.п.н., содержащая 5'-регуляторную зону, первый экзон и начало первого интрона гена *Notch* была заменена на сайт *attP*. Далее этот сайт был использован для введения модифицированных последовательностей регуляторной зоны гена методом *φC31*-опосредованной *attP/attB* рекомбинации. Цитогенетический анализ направленных

делеций, полученных в нативном генетическом окружении гена *Notch*, позволил выявить функциональноважные районы в 5'-регуляторной зоне гена.

Перенос междисковых последовательностей ДНК в эктопическое окружение

Для переноса в эктопическое генетическое окружение были выбраны четыре нуклеотидных последовательности из 5' регуляторной зоны гена *Notch* (Рис. 1). Последовательность ДНК длиной 914 п.н. полностью перекрывается с участком, удаляемым делецией fa^{swb} . Проксимальная часть этой последовательности насыщена сайтами гиперчувствительности к ДНКазе I (Vazquez, Schedl, 2000). Также она содержит участок прямых повторов, с которым связывали образование междиска 3C6/3C7 (Rykowski et al., 1988; Ramos et al., 1989). По данным проекта modENCODE (Celniker, 2009), в этом же районе находится участок с минимальной нуклеосомной плотностью.

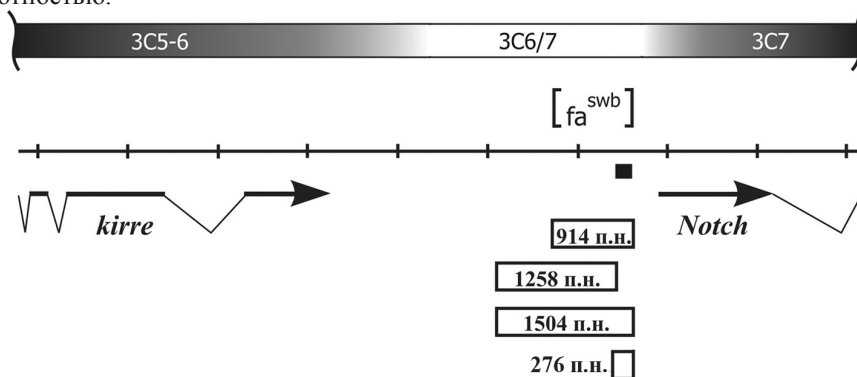


Рис. 1 Последовательности ДНК 5' регуляторной зоны *Notch*, использованные для переноса в район 84F генома дрозофилы (в новое эктопическое окружение).

Поэтому мы выбрали вторую последовательность, длиной 1258 п.н., которая не включает около 250 п.н. проксимальной части первой последовательности, но в остальной своей части перекрывается с ней и превышает её по длине. Это позволило ответить на вопрос о существенной важности проксимальной части для образования компактного состояния хроматина.

Третья выбранная для анализа последовательность ДНК имела длину 276 п.н. и представляла собой только проксимальную часть первой последовательности. Четвертая последовательность представляла собой тандемный повтор трёх копий первой последовательности ДНК в 914 п.н.

По единой схеме данные фрагменты ДНК клонировали в вектор pFRTV(3) (Горчаков и др., 2003). Затем полученные конструкции использовали для трансформации дрозофилы. Использовали линию *Ki Δ2-3* с источником транспозазы Р-элемента в третьей хромосоме. В потомстве отбирали мух с фенотипом *mini-white*, несущих встройку конструкции во второй хромосоме. Полученные линии мух

использовали как донорные в FRT-FLP-опосредованной рекомбинации с акцепторной линией, несущей вставку вектора pICon(dV) в районе 84F. Таким способом были синтезированы линии мух, несущие вставки последовательностей из 3C района в акцепторную конструкцию pICon(dv) в районе 84F. Встраивание подтверждали результатами ПЦР с использованием праймеров на последовательность транспозона pICon(dV) и материал вставки из 3C района.

Был проведен электронно-микроскопический анализ политенных хромосом слюнных желез в линиях со вставками последовательностей из междиска 3C6/C7 в районе 84F. На рисунке 2 приведены электронные микрофотографии препаратов политенных хромосом слюнных желез личинок третьего возраста исследуемых линий (pICon(dV)[v⁺]{3C}/TM6, Nu Tb), где {3C} – вставка генетического материала из района 3C.

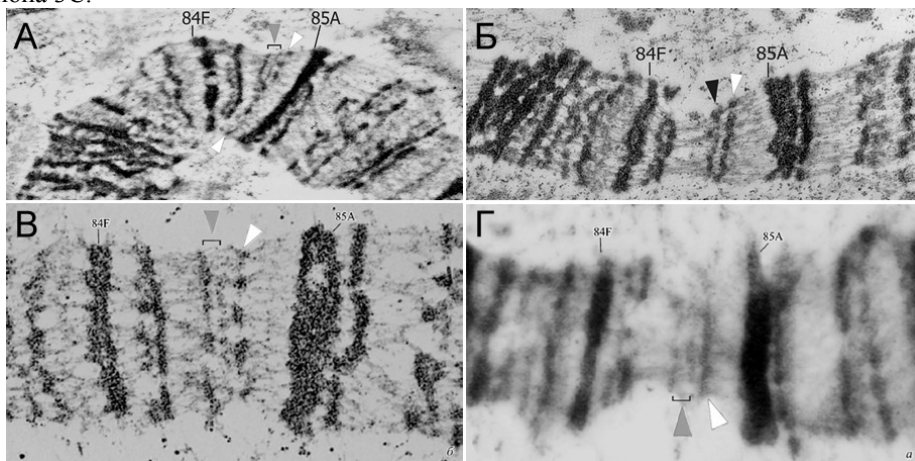


Рис. 2 Электронные микрофотографии района 84F со вставками последовательностей ДНК из района 3C6/C7 в конструкцию pICon(dV) в районе 84F. **А.** Трансгенная линия pICon(dV)[v⁺]{3C}/TM6, Nu Tb в одном из гомологов содержит вставку транспозона с фрагментом ДНК длиной 914 п.н. Можно видеть новую структуру, образованную материалом транспозона, состоящую из двух тонких дисков и междиска между ними. Гомологичная хромосома TM6, Nu Tb не содержит вставки транспозона, можно видеть только нативный диск 84F11-12. **Б.** Вставка фрагмента ДНК длиной 1258 п.н. Здесь и далее представлены гомозиготы по вставке транспозона с материалом 3C. Черным треугольником отмечен диск, состоящий из материала транспозона pICon(dv) с фрагментом ДНК длиной 1258 п.н. из междиска 3C6/C7. Не происходит расщепления плотного генетического материала транспозона. **В.** Вставка трёх tandemных копий фрагментов ДНК длиной 914 п.н. каждый. **Г.** Вставка последовательности ДНК длиной 276 п.н..

Белыми треугольниками отмечен эндогенный диск 84F11-12. Серыми треугольниками и скобкой отмечен новый междиск, образованный в результате вставки фрагментов ДНК из междиска 3C6/C7 в составе диска, состоящего из материала транспозона pICon(dv).

Встраивание в район 84F транспозона с фрагментом ДНК из междиска 3С6/7 длиной 1258 п.н. не приводит к образованию нового междиска. Во всех остальных случаях перенос материала междиска 3С6/С7 вызывал появление эктопического междиска в месте встройки. Минимальной последовательностью ДНК, достаточной для образования деконденсированного состояния хроматина в месте встройки, в наших экспериментах стала последовательность длиной 276 п.н. (Рис. 2Г). Таким образом, генетический материал проксимальной к гену *Notch* части последовательности, удаляемой делецией *fa^{swb}*, является необходимым и достаточным для формирования цитологической картины междиска в месте его присутствия в хромосомах *D. melanogaster*.

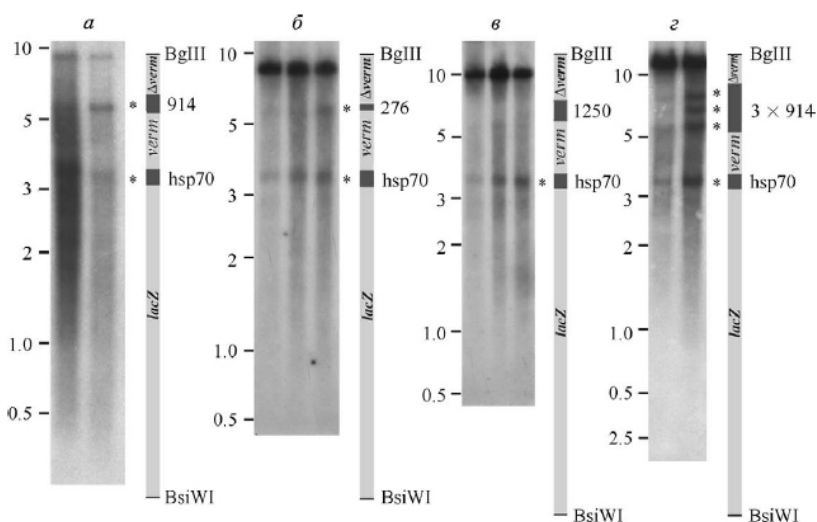


Рис. 3 Результаты Саузерн-блот анализа с αP^{32} -меченым зондом на *lacZ* после обработки различными концентрациями ДНКазы I материала из района 3С6/С7 в составе транспозона pICon(dv) в районе 84F. **а)** Фрагмент 914 п.н.: дорожка 1 – без добавления ДНКазы I, дорожка 2 – после обработки ДНКазой I. Здесь и далее- нумерация дорожек слева направо. **б)** Фрагмент 276 п.н.: дорожка 1 – без добавления ДНКазы I, дорожка 2 – обработка ДНКазой в низкой концентрации, дорожка 3 – обработка ДНКазой в высокой концентрации. **в)** Фрагмент 1258 п.н.: дорожка 1 – без добавления ДНКазы I, дорожка 2 – обработка ДНКазой в низкой концентрации, дорожка 3 – обработка ДНКазой в высокой концентрации. **г)** Тандемный повтор из трех копий фрагмента 914 п.н.: дорожка 1 – без добавления ДНКазы I, дорожка 2 – обработка ДНКазой. Слева- маркер молекулярного веса (в т.п.н.). Справа – молекулярно-генетическая карта транспозона в районе встройки.

Во всех полученных линиях была изучена взаимосвязь декомпактного состояния хроматина, образующегося в месте встройки последовательностей ДНК из междиска 3С6/С7, с присутствием сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I. Для этого мы провели обработку ядер клеток СЖ личинок ДНКазой I с последующей саузерн-блот

гибридизацией обработанной ДНК с радиоактивно-мечеными зондами, представленными фрагментами ДНК из транспозона. Линии мух, содержащие различные встройки последовательностей ДНК, происходящих из междиска 3C6/C7, дают следующие картины распределения сайтов гиперчувствительности к ДНКазеI (Рис. 3).

В каждой линии присутствует отчетливо выраженный (в дальнейшем мажорный) ДНКазеI гиперчувствительный сайт, связанный с наличием в транспозоне промотора гена теплового шока *hsp 70*. В линиях, содержащих встройку фрагментов ДНК длиной 914 п.н. и 276 п.н., отмечается появление дополнительного мажорного ДНКазеI гиперчувствительного сайта. В линии со встройкой последовательности длиной 1258 п.н. этот сайт отсутствует, что полностью соотносится с характером распределения гиперчувствительных сайтов в 5' области гена *Notch*. Обработка ДНКазойI ДНК из линии мух с тремя повторами материала 914 п.н., выявляет три новых ДНКазеI гиперчувствительных сайта, разделенных приблизительно 800 п.н. участками, что соответствует ожидаемой картине распределения гиперчувствительных сайтов в трех тандемных повторях последовательности *fa^{swb}*.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении характерных структурных особенностей организации хроматина междиска 3C6/C7 в новом генетическом окружении.

Направленный мутагенез регуляторной зоны гена *Notch*

*Создание базовой линии, содержащей делецию регуляторной зоны гена *Notch*.*

Для того, чтобы направленно изменять последовательность регуляторной зоны гена *Notch*, мы использовали систему *CRISPR/Cas9* в сочетании с методом гомологичной рекомбинации (Gratz, 2014).

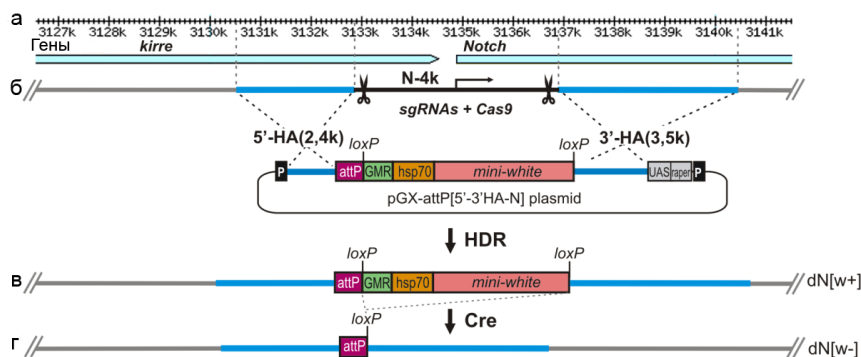


Рис. 4 Схема замещения регуляторной области гена *Notch* сайтом *attP* с помощью гомологичной рекомбинации, индуцированной двухцепочечными разрывами ДНК в системе *CRISPR/Cas9*.

а – молекулярно-генетическая карта локуса *Notch* с положением известных генов;

б – положение сегментов геномной ДНК и гомологичных им фрагментов ДНК 5'-HA(2,4k) длиной 2,4 т.п.н. и 3'-HA(3,5k) длиной 3,5 т.п.н. в составе вектора для рекомбинации отмечено голубыми линиями, а

удаляемый фрагмент N-4k – жирной черной линией. Ножницами обозначены сайты-мишени комплекса gRNA/Cas9.

в – ДНК донорного вектора и векторов, кодирующих gRNA инъецировали в эмбрионы *vasa*-Cas9 для получения мух *dN*[w+], содержащих вместо регуляторной области гена *Notch* *attP* сайт и ген окраски глаз *mini-white*.

г – *mini-white* был удалён по *loxP*-сайтам с помощью Cre-рекомбиназы и получена линия мух *dN*[w-], содержащая в целевом районе только *attP* сайт.

На первом этапе мы получили базовую линию *dN/FM0*, в которой регуляторная зона и первый экзон гена *Notch* были заменены на сайт *attP* (Рис. 4). Для проведения гомологичной рекомбинации с применением CRISPR/Cas9 системы в 5' области гена *Notch* были подобраны таргетные последовательности в 20 п.н. с РАМ сайтами для специфического распознавания нуклеазой Cas9. Донорная плазмида *pGX-attP{3'-5' Notch}*, содержала последовательности, фланкирующие зону создаваемой делеции, вспомогательные элементы - репортерный ген *mini-white* под управлением промотора гена *hsp70* с *GMR* энхансером, окруженный *loxP*-сайтами для Cre-опосредованной рекомбинации (далее *AE*) и сайт *attP*. Была проведена трансформация мух линии с источником нуклеазы *Cas9* смесью плазмид-источников направляющих РНК *pU6-BbsIchiRNA+3'*, *pU6-BbsIchiRNA+5'* и донорной плазмиды *pGX-attP{3'-5' Notch}*.

Получена базовая линия *dN/FM0*, в которой около 4 т.п.н. промоторной зоны гена *Notch* были заменены на сайт *attP*. Используя базовую линию, мы создали ряд направленных делеций регуляторной зоны гена *Notch* (Рис.5). Мы получили делецию *fa^{swb}*, используя наш подход, чтобы показать, что для образования мутантного фенотипа *fa^{swb}* не требуется присутствия каких-либо дополнительных элементов кроме делеции. Одновременно это позволило использовать эту делецию, как контроль, показавший, что в нашей искусственной системе удаление того же участка приводит к аналогичным фенотипическим изменениям. Также мы показали, что регуляторная зона гена *Notch* чрезвычайно чувствительна даже к минорным изменениям нуклеотидной последовательности. Дополнительно мы получили линии, содержащие делеции в регуляторной зоне гена (Рис.5).

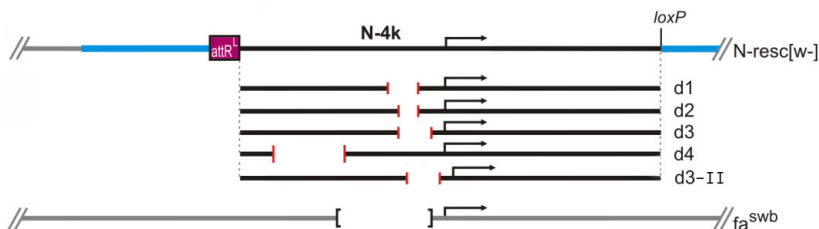


Рис. 5 Схема взаиморасположения полученных в работе направленных делеций 5'-регуляторной зоны гена *Notch*.

Мы проанализировали фенотипы полученных линий мух. Все линии, не несущие *AE*, не демонстрировали каких-либо отклонений от нормы в строении глаз, крыльев, расположении щетинок и т.д. В то же время, на фоне присутствия *AE* между

делециями наблюдались явные различия по влиянию на фенотип носителей. Наибольшие различия наблюдались при содержании и ведении линий на пониженной температуре (18°C). У самцов мутантный фенотип был более выражен, чем у самок.

Наиболее яркие отличия наблюдались в строении глаз мух (Рис.6).

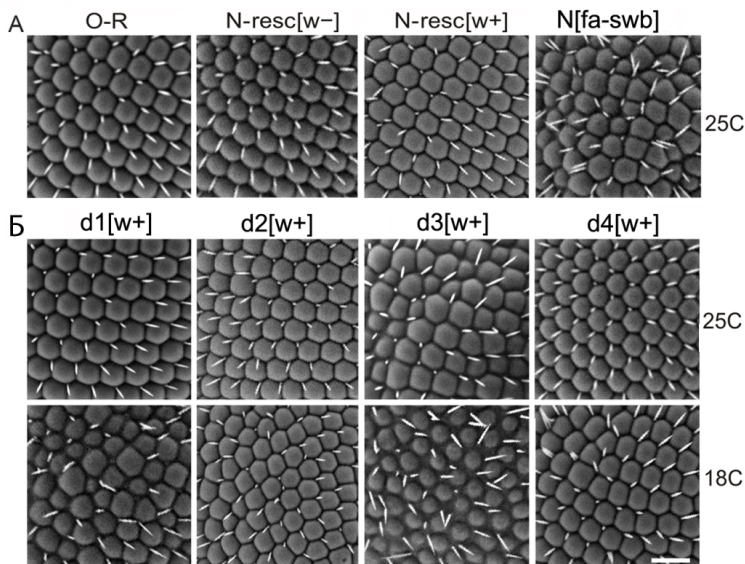


Рис. 6 Растровая электронная микрофотография поверхности глаза гемизиготных самцов. Линии с делециями и *AE* выращивали при температуре 25°C и 18°C. Глаза самцов линий *N-resc[w+]* и *N-resc[w-]* демонстрируют минимальные нарушения порядка расположения фасеток и роста щетинок. Фенотипы *d1[w+]*, *fa-swb* и особенно *d3[w+]* характеризуются сильными нарушениями.

Для проверки эффекта полученных делеций на фоне отсутствия нормальной копии гена *Notch* мы скрестили самок линии *dN[w-]/FMO* с самцами линий, содержащих полученные делеции, и анализировали фенотип трансгетерозиготных самок (Рис. 7). В линиях с хромосомой без *AE* (дикий тип *OR*, *d1-4[w-]*, *resc-dN[w-]*) трансгетерозиготные самки имели нормальные глаза, иногда небольшие вырезки на крыльях и слабо выраженные дельтавидные жилки (как в исходной линии *dN[w-]/FMO*)

Трансгетерозиготные самки, содержащие хромосомы с *AE* (*w+*) (*N-resc[w+]*, *d1-4[w+]*) против базовой делеции, демонстрировали плеiotропный эффект. Такие самки были стерильны, имели пониженную жизнеспособность и множественные морфологические нарушения: грубые глаза, избыточное количество макрохет на тораксе, нарушения структуры и формы крыльев, искривленные *tibia*. Выраженность эффектов сильно зависела от делеции в регуляторной зоне *Notch*.

Все фенотипы, по-видимому, связаны со встройкой *AE* в первый интрон, так как проявляются и у самок *resc-dN[w+]/dN[w-]*. Наличие делеций в сочетании со встройкой *AE* практически не влияет на интенсивность проявления большинства этих признаков за исключением фенотипа глаз.

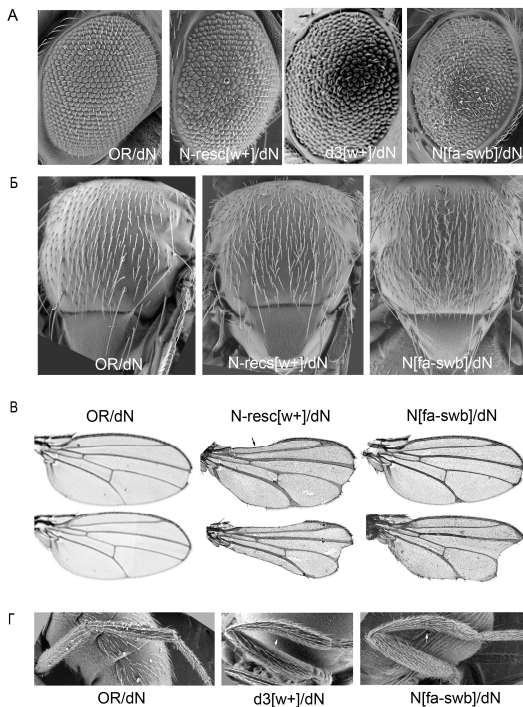


Рис. 7 Плейотропный эффект у самок-трансгетерозигот по базовой делеции *dN*. (А) Дефекты порядка расположения фасеток. (Б) Увеличение числа макрохет на тораксе мух линии *fa^{swb}/dN* (фенотип “hairy”). (В) На крыле видны утолщенные и дельтавидные жилки, а также вырезки в апикальной части крыла и на кастальном крае крыла. У самок линии *N-resc[w+]/dN* наблюдаются вырезки на кастальном крае. Показаны предельные для каждой линии варианты фенотипа. (Г) Искривленные *tibia* (голени).

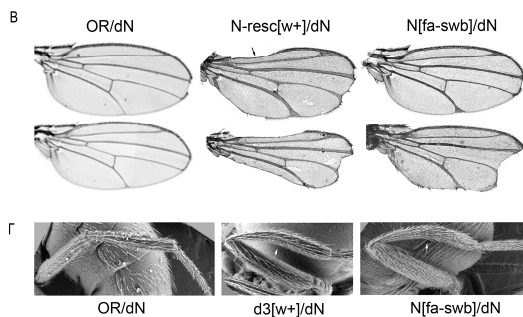


Рис. 8 Инvertированное изображение полутонкого среза глаза трансгетерозиготной самки линии *d1[w+]/dNotch,4kb,w-*. Стрелками показаны омматидии с увеличенным числом фоторецепторов и слитые омматидии.

Мы провели анализ полутонких цитологических срезов глаз трансгетерозиготных мух ряда полученных линий. Так как самки генотипа $d3[w+]/dN[w-]$ появлялись с очень низкой частотой, доступным для исследований объектом с самыми большими нарушениями оказались самки генотипа $d1[w+]/dN[w-]$. На срезах обнаруживается неупорядоченное расположение омматидиев, искажение формы омматидиев, их слияние и изменение числа фоторецепторов в отдельных омматидиях (Рис. 8).

Для того, чтобы проверить удаляют ли полученные делеции зону предполагаемого инсулятора (Vazquez, Schedl, 2000), мы провели иммуноокрашивание политенных хромосом полученных линий на инсуляторные белки CHROMATOR и dCTCF (Vogelmann et al., 2014). Оказалось, что при сравнении с контрольным 3С районом X хромосомы линии дикого типа OR, в линиях с делецией $d3$ и N^{fa-swb} отсутствуют сигналы локализации этих инсуляторных белков, в то время как в остальных линиях рисунок локализации не изменен (Рис. 9).

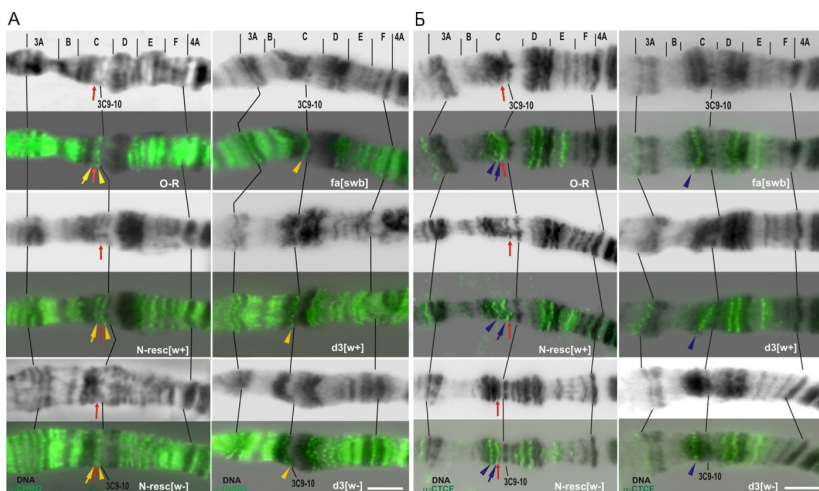


Рис. 9 Непрямое иммуноокрашивание инсуляторных белков CHROMATOR (А) и dCTCF (Б) в цитологическом районе 3С политенной X хромосомы клеток слюнных желез. Сигналы CHROMATOR (CHRO) и CTCF (зеленая окраска). Красными стрелками отмечен тонкий диск 3С7, где локализуется тело гена *Notch*. Желтые и синие стрелки указывают на сигналы иммунолокализации CHRO и dCTCF, соответственно, в междиске 3С6/С7. Желтые и синие треугольники указывают на соседние сигналы CHRO и dCTCF как на референсные. OR- линия дикого типа; $fa[swb]$ - fa^{swb} делеция. N-resc[w+] и N-resc[w-]-линии мух с фрагментом N-4k с AE и без AE элемента, соответственно; $d3[w+]$ и $d3[w-]$ -делеция $d3$ с AE и без AE элемента, соответственно. В верхней части столбцов указаны границы цитологических районов в соответствии с картой (Bridges, 1938). На разных изображениях одни и те же маркерные диски соединены линиями. Длина масштабного отрезка соответствует 5 мкм (Volkova et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы использовали современные методы направленной генетической рекомбинации как инструмент для исследования 5' регуляторной зоны гена *Notch*. Для этого в первой части работы потенциально функционально значимые последовательности регуляторной зоны, локализованные в междиске 3C6/3C7 X хромосомы, переносили в район 84F хромосомы 3. В ряде случаев это привело к возникновению «искусственного» междиска в другом генетическом окружении. Полученные данные позволили найти минимальную последовательность ДНК из 5' регуляторной зоны гена *Notch*, длиной 276 п.н., вызывающую образование междиска. В эктопических междисках, судя по распределению сайтов гиперчувствительности к нуклеазе, организация хроматина, по всей видимости, сохраняет особенности, характерные для нативного междиска 3C6/C7.

Во второй части работы мы использовали систему CRISPR/Cas9 сайт-специфичных нуклеаз в сочетании с методом гомологичной рекомбинации. В результате была получена базовая линия мух, в которой последовательность протяженностью около 4 т.п.н., содержащая 5' регуляторную зону, первый экзон и начало первого интрона гена *Notch*, была заменена на сайт *attP*. Полученная базовая линия стала универсальным инструментом для исследования регуляторной зоны гена *Notch D. melanogaster* методом направленного мутагенеза: *attP* сайт был использован для введения модифицированных последовательностей регуляторной зоны гена методом ФС31-опосредованной *attP/attB* рекомбинации. Для контроля была получена линия мух с полноразмерным фрагментом (N-resc[w+]), содержащая вставку вспомогательного элемента в первый интрон гена. Делеции в сочетании со встройкой в первый интрон гена приводили к нарушению структуры глаз. Максимальные нарушения наблюдались в линии с делецией предполагаемого инсуляторного элемента. Различия в фенотипах полученных нами делеций в сочетании со встройкой в первый интрон указывают на возможные взаимодействия последовательностей первого интрона с регуляторной зоной гена. Были созданы линии мух, несущие модифицированный и точный аналог делеции *fa-swb*. Летальность модифицированной делеции указывает на положение критически важных для экспрессии гена *Notch* коротких последовательностей регуляторной зоны. У трансгетерозигот по некоторым делециям на фоне базовой делеции наблюдались нарушения развития органов-мишеней сигнального каскада Notch. Удаление предполагаемой инсуляторной последовательности в 5' регуляторной зоне гена *Notch* вызвало исчезновение междиска 3C6/C7 в линиях с делециями d3 и *fa-swb*. Мы показали, что эти мутации также приводят к удалению сайтов связывания инсуляторных белков CHROMATOR и dCTCF в междиске 3C6/7.

Созданная базовая линия в дальнейшем может использоваться для получения новых направленных мутаций 5' регуляторной зоны гена *Notch*. В перспективе необходимо исследовать тканеспецифичную экспрессию гена *Notch* в полученных линиях с делециями методами количественного ПЦР-анализа и вестерн-блот-анализом, используя существующие доступные на рынке антитела.

ВЫВОДЫ

1. Впервые реализован подход, при котором в состав трансгенной конструкции, локализованной в районе 84F, переносятся различные фрагменты междиска 3C6/C7. Это позволяет анализировать структуру эктопического междиска в постоянном генетическом окружении.

2. Показана автономность формирования междиска при переносе последовательностей в эктопическое генетическое окружение. Найдена минимальная последовательность ДНК из 5' регуляторной зоны гена *Notch*, длиной 276 п.н., вызывающая образование междиска. Показано, что в эктопическом междиске сохраняются сайты гиперчувствительности к ДНКазе I.

3. Получена базовая линия мух, в которой фрагмент 4 т.п.н., включающий промоторную область, первый экзон и часть первого интрона гена *Notch*, заменен на сайт attP. В результате создана *in vivo* система, позволяющая проводить направленный мутагенез в 5' регуляторной зоне гена *Notch*.

4. С помощью attP/attB интеграции трансгенных конструкций получены линии мух с полноразмерным фрагментом (N-resc[w+]) и различными делециями в районе. Генетический анализ показал, что присутствие вспомогательного элемента трансгенного конструкта в первом интроне в комбинации с делециями оказывает существенное влияние на экспрессию гена *Notch*: в гомозиготном состоянии вызывает нарушения структуры глаз, а в трансгетерозиготе с делецией по базовой линии наблюдается плейотропный эффект в тканях-мишенях гена *Notch*. Максимальные нарушения наблюдались в линии с делецией d3-[w+], удаляющей инсуляторную последовательность.

5. Удаление предполагаемой инсуляторной последовательности 5' регуляторной зоны гена *Notch* вызывает исчезновение междиска 3C6/C7. Встройка вспомогательного элемента в первый интрон гена, напротив, вызывает расширение междиска 3C6/C7. Было показано, что делеции d3 и N^{fa-swb} удаляют сайты связывания инсуляторных белков CHROMATOR и dCTCF в междиске 3C6/7.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Volkova E.I., Andreyenkova N.G., **Andreyenkov O.V.**, Sidorenko D.S., Zhimulev I.F., Demakov S.A. Structural and functional dissection of the 5' region of the *Notch* gene in *Drosophila melanogaster* // Genes. 2019. V. 10. P. 1037
2. **Andreyenkov O.V.**, Volkova E.I., Andreyenkova N.G., Demakov S.A. The study of the regulatory region of the *Drosophila melanogaster Notch* gene by new methods of directed genome editing. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. с. 199-202.
3. **Андреев О.В.**, Волкова Е.И., Семешин В.Ф., Жимулев И.Ф., Демаков С.А. Структурные особенности организации хроматина междиска 3C6/C7

политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Цитология. 2013. Т.55. с. 198-203.

4. **Андреенков О.В.**, Волкова Е.И., Демаков С.А., Семешин В.Ф., Жимулев И.Ф. Декомпактное состояние хроматина междиска из района 3С6/С7 политенных хромосом *D. melanogaster* определяется короткой последовательностью ДНК // Доклады Академии Наук. 2010. Т. 431. с. 119-122.
5. Демаков С.А., **Андреенков О.В.**, Беркаева М.Б., Ватолина Т.Ю., Волкова Е.И., Квон Е.З., Семешин В.Ф., Жимулев И.Ф. Функциональная организация междисков политенных хромосом дрозофилы. // Генетика. 2010. Т. 46. с. 1421-1423.

Глава в книге:

6. Андреенков О.В., Волкова Е.И., Демаков С.А. Применение CRISPR/Cas9 для получения в геноме *Drosophila melanogaster* направленных делеций и введения сайта интеграции из системы *attP/attB* фага $\phi C31$. В кн. Методы редактирования генов и геномов (отв. ред. Закиян С.М., Медведев С.П., Дементьева Е.В., Власов В.В.). Новосибирск: Издательство СО РАН, 2020, гл. 8, с. 117-131.

Список тезисов, опубликованных по теме диссертации:

7. **Андреенков О.В.**, Андрееenkova Н.Г., Волкова Е.И., Демаков С.А. Получение направленных делеций в регуляторной зоне гена *Notch* с использованием CRISPR/Cas-опосредованного метода редактирования геномов // Международная конференция «Хромосома». Россия. Новосибирск. 2018. Материалы. с. 92.
8. Андрееenkova Н.Г., **Андреенков О.В.**, Волкова Е.И., Демаков С.А., Мальцева С.В. Исследование регуляторной зоны гена *Notch Drosophila melanogaster* методом CRISPR/Cas9-индуцированной гомологичной рекомбинации // Всероссийская конференция «Дрозофила в генетике и медицине». Гатчина. 2017. Сборник тезисов. с. 58.