

ПОДСЕКЦИЯ «ГЕНЕТИКА»

Разработка новых систем экспрессии *cry* гена с целью создания биобезопасных растений, устойчивых к насекомым

Алексеева Н.Г. (Москва, natagenetics@mail.ru), Исаенко Е.В. (Минск, Беларусь)

Одним из важных направлений селекционного процесса является создание сортов растений, устойчивых к насекомым-вредителям. Достаточно эффективным является подход, основанный на переносе в геном растений генов, кодирующих дельта-эндотоксины (*Cry*-белки). В нашей работе использован ген *cry3aM* *Bacillus thuringiensis*, белковый продукт которого проявляет инсектицидные свойства в отношении личинок колорадского жука и последовательность которого была модифицирована для эффективной экспрессии в растениях. Поскольку ген *cry3a* кодирует белок, не обладающий ферментативной активностью, для анализа его экспрессии использовали новый подход, который заключается в конструировании и переносе гибридного гена, в котором последовательность целевого гена *cry3aM* слита в рамке считывания с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу *Clostridium thermocellum*. В ходе работы были сконструированы растительные системы экспрессии, которые содержат нативный и гибридный ген *cry3aM* под контролем различных регуляторных элементов, а именно: конститутивного промотора 35SPHK SAMV и светоиндуцибельного промотора малой субъединицы гена РБФК. Для различной компартиментализации белкового продукта гена *cry3aM* в растительных клетках использовали слияние последовательности целевого гена с последовательностью лидерного пептида гена *rbcS* гороха, обеспечивающего локализацию генных продуктов в хлоропластах растений, а также с последовательностью лидерного пептида гена экстенсина моркови, обеспечивающего перенос генных продуктов в апопласт. Полученные растительные вектора были использованы для трансформации растений картофеля сорта Скарб.

Сравнительные результаты молекулярно-генетического анализа и биотестов первичных трансформантов растений картофеля позволили сделать следующие заключения: целевые гены более эффективно экспрессируются под контролем светоиндуцибельного промотора; лучшие показатели по результатам биотестов получены на линии трансформантов, у которых последовательности целевых генов, слитых с последовательностью, кодирующей лидерный сигнал для выноса в апопласт, контролируются светоиндуцибельным промотором; в трансформантах картофеля, у которых экспрессия целевых генов контролируется светоиндуцибельным промотором, белковые продукты образуются только в листьях трансгенных растений.

На основании полученных результатов предложена новая система экспрессии *cry* генов в растениях. Эта система основана на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) – органах-мишенях для насекомых-вредителей. Основываясь на свойствах репортерного белка лихеназы, входящего в состав гибридных белков, представляется возможным использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах, поскольку эта система является достаточно простой и точной, и не требует больших материальных и временных затрат.

Научный руководитель – д.б.н. И.В. Голденкова-Павлова

Разработка системы праймеров мультиплексной ПЦР для отбора и анализа трансгенных растений

Бердичевец И.Н. (Москва, i_berdichevets@hotmail.ru), Шмишлавилли Х.Р. (Москва), Синдаровская Я.Р. (Киев, Украина), Шелудько Ю.В. (Киев, Украина)

Важным этапом в процессе создания трансгенных растений является эффективный отбор первичных трансформантов, содержащих в геноме вставку целевого гена, а также последующий анализ наследования трансгена в ряду поколений. Простым и экономичным методом для такого исследования является полимеразная цепная реакция. Однако для того, чтобы проанализировать трансформанты необходимо решить ряд задач: оценить качество препарата выделенной геномной ДНК (по амплификации гена домашнего хозяйства), выявить наличие в геноме трансформантов последовательностей целевых генов, селективного гена, репортерного гена, последовательностей регуляторных элементов генетических конструкций и определить отсутствие агробактериальной контаминации (по амплификации генов вирулентности агробактерий). Обычно для этого проводится ряд поочередных ПЦР в уникальных условиях и с использованием праймеров, подобранных к каждой из анализируемых последовательностей, что требует определенных материальных и временных затрат. Для преодоления этих сложностей нами была предпринята попытка разработать систему праймеров мультиплексной ПЦР, позволяющую определять наличие в геномной ДНК растений последовательностей нескольких генов и регуляторных элементов одновременно. Для разработки системы праймеров мультиплексной ПЦР были выбраны следующие гены: селективный ген, гены домашнего хозяйства исследуемых видов растений, гены вирулентности *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGLO, репортерный ген, ряд целевых генов и регуляторных элементов. Праймеры к исследуемым последовательностям были подобраны таким образом, чтобы условия их амплификации были схожими, а амплифицированные фрагменты можно было эффективно разделять в агарозном геле. Далее, были подобраны оптимальные соотношения каждого из праймеров системы и условия мультиплексной ПЦР, при которых происходит амплификация всех целевых последовательностей с одинаковой эффективностью.

Предложенная система праймеров, их оптимальные соотношения и условия мультиплексной ПЦР успешно апробированы на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на трансформантах сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат). Полученные результаты позволяют предложить разработанную систему праймеров, их соотношения и условия мультиплексной ПЦР как основу для эффективного отбора и анализа трансгенных растений.

Научный руководитель работы: д.б.н. И.В. Голденкова-Павлова. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №08-04-90410_укр.

ДНК полиморфизм популяций картофельной минирующей моли и хлопковой совки по ISSR-маркерам

Беседина Е.Н. (Краснодар, katrina7283@yandex.ru)

Картофельная минирующая моль *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae) и хлопковая совка *Helicoverpa armigera* Hbn. (Lepidoptera: Noctuidae) – это вредители, которые по-прежнему наносят значительный урон урожаю картофеля и другим сельскохозяйственным культурам. Для эффективного контроля и управления популяционными процессами у насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур необходимы знания о генетической изменчивости структуры популяций. Одним из современных методов анализа генетического полиморфизма является ПЦР и различные ее модификации, в том числе ISSR-PCR (Inter simple sequence repeats, или

межмикросателлитный анализ ДНК). В задачу нашего исследования входило изучение молекулярно-генетического полиморфизма Краснодарских популяций картофельной минирующей моли и хлопковой совки с помощью метода ISSR-PCR. Основной целью работы являлось оценка наличия в геноме исследуемых видов насекомых повторов ДНК, комплементарных ISSR-праймам, и анализ ДНК полиморфизма популяций по наиболее информативным ISSR-праймам. С этой целью нами были подобраны праймеры: UBC807, UBC810, UBC813, UBC818, UBC826, UBC864, ins1, ins2, UBC880. Из них пять имели динуклеотидный повтор: (AG)₈T; (GA)₈T; (CT)₈T; (CA)₈G; (AC)₈C; три праймера – тринуклеотидный: (ATG)₆; (AGG)₆; (CAC)₆ и один – пентануклеотидный – (GGAGA)₃. Проведенные нами исследования показали, что все праймеры были в разной степени информативны, кроме UBC813, не выявившего ампликоны в ПЦР при анализе ДНК хлопковой совки. Наиболее информативными из них оказались праймеры UBC810, UBC864, ins1. Динуклеотидные праймеры выявляли большее количество маркеров, чем три- и пентануклеотидные. То есть, повторы данного типа встречаются в геноме чешуекрылых более часто. В то же время это зависит от типа праймера и вида насекомого. Так, динуклеотидный праймер UBC818 выявил у картофельной моли только два ДНК-маркера, у хлопковой совки – восемь фрагментов. Праймер UBC810 выявлял более четко детектируемые фрагменты ДНК. В общей сложности по этому праймеру получены 23 ISSR-маркера для картофельной моли и 29 ДНК-маркеров для хлопковой совки с высоким уровнем полиморфизма (для картофельной минирующей моли уровень полиморфизма составил 95,5%, для хлопковой совки – 100,0%). При этом размер ампликонов варьировал от 350 до 2000 пар нуклеотидов, а количество фрагментов на особь колебалось от 2 до 17. Таким образом, Краснодарские популяции картофельной минирующей моли и хлопковой совки генотипированы по ISSR-маркерам. Эти данные в дальнейшем будут использованы при анализе изменчивости внутривидовой структуры вредителей под влиянием трансгенного (Vt) картофеля.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках гранта № 06-04-96737. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.с.-х.н. В.И. Килю за помощь в проведении исследований и подготовке тезисов.

Анализ структуры и экспрессии гомологов генов эррантивирюсов у *Drosophila melanogaster*

Бурмистрова Д.А., Сараллах Р. (Москва, kawtanka05@mail.ru)

Ретровирусы позвоночных проявляют значительное структурно-функциональное сходство с ДКП-ретротранспозонами, одним из типов мобильных генетических элементов, что указывает на их эволюционное родство. Геном модельного объекта *Drosophila melanogaster* – первый геном беспозвоночных, в котором были обнаружены настоящие эндогенные ретровирусы, названные эррантивирюсами. Они относятся к группе ДКП-ретротранспозонов типа *gypsy*, для которого инфекционные свойства продемонстрированы экспериментально. Важным этапом в репликативном цикле ретровирусов является интеграция их генома в геном хозяина. В процессе эволюции интегрированные копии вируса подвергаются деградации. Некоторые ретровирусные гены претерпевают доместикацию. Известно, что у млекопитающих такие гены принимают участие во многих важнейших процессах, таких как функционирование плаценты, клеточные деления, защита от инфекции другими вирусами.

Ранее в геноме дрозофилы был обнаружен гомолог гена *env* ДКП-ретротранспозонов – *Iris*. Мы обнаружили в геноме *D. melanogaster* единственную ОРС, которая кодирует гомолог *gag*, – *CG4680*. Обнаруженный ген мы назвали *Grp* (*Gag related protein*). Известно, что транспозиции *gypsy* контролирует ген *flamenco*. Были исследованы четыре

линии *D. melanogaster*, различающиеся по фенотипу flamenco и активности *gypsy*. Различий в экспрессии генов между линиями, отличающимися инфекционными свойствами, не обнаружено ни на одном из этапов онтогенеза. По-видимому, экспрессия этих генов не связана с фенотипом flamenco и активностью элемента *gypsy*.

Исследование экспрессии генов *Grp* и *Iris* проводили у эмбрионов, личинок 3 возраста и имаго *D. melanogaster*. На эмбриональной и личиночной стадиях развития экспрессия генов *Grp* и *Iris* протекает на очень низком уровне, но значительно повышается на стадии имаго. С целью детального исследования экспрессии генов *Grp* и *Iris* у взрослых мух анализ проводили в разных тканях. Ген *Grp* экспрессируется главным образом в кишке и незначительно в гонадах, для *Iris* характерна экспрессия в каркасе.

Результаты экспериментов показали, что гены *Grp* и *Iris* экспрессируются, по крайней мере, на уровне транскрипции. Более того, экспрессия этих генов не является конститутивной. Подобный характер экспрессии наряду с предполагаемой мембранной локализацией может быть обусловлен участием продуктов этих генов в рецепции ретровирусов. В настоящее время ведутся исследования по изучению белковых продуктов генов *Grp* и *Iris*.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 08-04-00693 и 08-04-97050.

Изучение статуса экспрессии генов X-хромосомы у обыкновенных полевок рода *Microtus*

Вагнер Т.В., Дементьева Е.В. (Новосибирск, sunnysoap@yandex.ru)

На сегодняшний день на неактивной X-хромосоме самок млекопитающих обнаружен целый ряд локусов, избегающих инактивации. Их изучение предоставляет уникальную возможность для понимания процесса инактивации и механизмов, предохраняющих гены от транскрипционного сайленсинга. К настоящему времени транскрипционный профиль неактивной X-хромосомы изучен только у человека, и почти ничего не известно об экспрессии генов на неактивной X-хромосоме у других видов млекопитающих, а также о различиях в транскрипционных профилях X-хромосомы при импринтированной и случайной инактивации, которые наблюдаются в экстраэмбриональных клетках и клетках взрослых особей соответственно.

В настоящей работе был установлен статус экспрессии 10 X-сцепленных генов (*Ddx3x*, *Mid1*, *Nap113*, *Rab9*, *Rbbp7*, *Sb1.8*, *Sybl1*, *Xist*, *Ube1x* и *Utx*) у двух видов полевок рода *Microtus* – *M. arvalis* и *M. rossiaemeridionalis* – в фибробластах и экстраэмбриональных клетках. В фибробластах ген *Xist* транскрибируется исключительно с неактивной X-хромосомы; ген *Utx* стабильно экспрессируется на обеих X-хромосомах; а гены *Ddx3x*, *Rab9* и *Sb1.8* демонстрируют гетерогенную экспрессию, инактивируясь в одних линиях фибробластов и избегая инактивации в других. Остальные гены подвергаются инактивации и экспрессируются только с активной X-хромосомы. В экстраэмбриональных клетках некоторые из инактивирующихся в фибробластах генов экспрессируются с неактивной X-хромосомы, что позволяет предположить менее полную и/или менее стабильную инактивацию в данном типе клеток.

Сходный паттерн распределения модификаций хроматина на неактивной X-хромосоме в процессе мейотической и импринтированной инактивации у обыкновенных полевок

Васькова Е.А. (Новосибирск, zhenyavaskova@yandex.ru)

В сперматогенезе у самцов на стадии пахитены половые хромосомы подвергаются транскрипционному сайленсингу. Неактивное состояние хроматина сохраняется и на

постмейотических стадиях сперматогенеза. В тоже время, на предимплантационных стадиях развития у самок млекопитающих имеет место импринтированная инактивация, когда инактивации подвергается X-хромосома, унаследованная от отца. Существует гипотеза, что X-хромосома в процессе мейотической инактивации сохраняет маркеры неактивного хроматина и переходит в зиготу в преинактивированном состоянии.

В данной работе мы сравнили паттерн распределения модификаций гистонов на неактивной X-хромосоме у полевки *Microtus rossiaemeridionalis* в составе полового тельца и в трофобластных стволовых клетках, где имеет место импринтированная инактивация. Было показано, что в мейотической и в импринтированной инактивации наблюдается сходный паттерн распределения целого ряда модификаций гистонов неактивного хроматина: убиквитинированного гистона H2A, триметилированного гистона H3 по лизину K9. Кроме того, наблюдается ассоциация с гетерохроматиновыми белками HP1 γ и HP1 β . Эти данные подтверждают гипотезу о том, что при импринтированной инактивации X-хромосома, унаследованная от отца, имеет преинактивированное состояние, которое устанавливается в результате мейотической инактивации.

Генно-инженерные подходы для создания молекул-носителей целевых пептидов

Вячеславова А.О. (Москва, alisa.v.o@gmail.com), Голденкова-Павлова И.В.

Последнее время все больше работ посвящено разработке новых технологий для создания безопасных вакцинных препаратов. Одной из таких технологий, предложенной в нашей лаборатории, является метод создания гибридных белков, у которых целевой пептид является внутренним модулем молекулы-носителя. У исследователей в настоящее время имеется ограниченный арсенал таких молекул-носителей, в связи с этим, поиск и разработка новых молекул-носителей для инженерии эффективных субъединичных вакцин являются весьма актуальным.

Мы предложили использовать для этих целей ген, кодирующий термостабильную лихеназу *Clostridium thermocellum*, который имеет ряд преимуществ перед остальными белками-носителями, заключающихся в высокой активности и термостабильности этого фермента, способности к N- и C- концевым достройкам с сохранением основных свойств как белка-носителя – лихеназы, так и встраиваемого пептида. Эти свойства позволяют достаточно легко проводить очистку этого фермента, а также определять количество и сохранность целевых терапевтических пептидов. Проведенный компьютерный анализ трехмерной структуры термостабильной лихеназы позволил выбрать области, которые в дальнейшем могут быть использованы для интеграции последовательностей пептидов. С использованием методов генетической инженерии были сконструированы гены, кодирующие модифицированные и «циклически перестановленные» варианты термостабильной лихеназы. Сравнительный биохимический анализ этих вариантов показал, что модификации не приводят к значительному изменению основных свойств лихеназы: термостабильности и активности. Далее были сконструированы гибридные гены, в которых последовательности, кодирующие целевые пептиды, были встроены в последовательность различных вариантов термостабильной лихеназы. Показано, что такие гибридные белки характеризуются сохранением основных свойств как термостабильной лихеназы, так и целевого пептида.

Таким образом, методы генетической инженерии позволили нам на основе последовательности одного гена создать арсенал генов, кодирующих потенциальные молекулы-носители целевых пептидов, которые в дальнейшем могут быть использованы для разработки современных и эффективных вакцин.

Цитогенетический анализ мейотического мутанта *sy11* ржи *Secale cereale* L.

Голубцов С.В. (Москва, sergey_golubcov@mail.ru)

Мейоз контролируется десятками специфических генов. Исследования генетического контроля мейоза основано на использовании генетических коллекций. Существует несколько коллекций мировой значимости — это коллекции мейотических мутантов кукурузы, арабидопсиса и ржи. Выделяют несколько групп мутаций генов мейоза по их фенотипическому проявлению. Подавляющее большинство изученных мутаций проявляются в профазе I мейоза. Это вызвано тем, что данная стадия насыщена большим количеством событий на клеточном и молекулярном уровнях.

Лаборатория цитогенетики ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН принимает участие в исследовании Петергофской коллекции мейотических мутантов ржи *S. cereale* ($2n=2x=14$), созданной С.П. Соснихиной в С.-Петербургском университете. Все мутации в этой коллекции возникли спонтанно в инбредных линиях. На данный момент в той или иной степени изучено более 20 мутаций, которые представляют собой модель для изучения генетических механизмов регуляции мейоза. В ходе данной работы была исследована ранее неизученная мутация *sy11*. Эта мутация была выделена в инбредной линии ржи и поддерживается в потомствах от самоопыления. Первичный диагностический дефект — наличие унивалентов в метафазе I. Ранее было показано, что данная мутация наследуется моногенно и рецессивно. Изучение мутанта происходило с использованием методов световой и электронной микроскопии. На давленных препаратах материнских клеток пыльцы (МКП) анализировали метафазу I мейоза (M1): учитывалось число пар унивалентов и количество хиазм. На спредированных препаратах МКП под электронным микроскопом изучался синаптонемный комплекс (СК), его структура и аномалии построения.

Проявление мутации в метафазе I выражается в наличии унивалентов (до 4 пар на клетку) в сочетании с открытыми и закрытыми бивалентами. Анализ СК на спредированных препаратах показал, что причиной этого являются нарушения гомологичности синапсиса в профазе I: “переключения” (смена партнёров спаривания) и “складки” (синапсис “на себя”), причём количество явлений негомологичного синапсиса в профазе I примерно соответствует числу пар унивалентов в метафазе I.

Таким образом установлено, что мутация *sy11* относится к группе мутаций, вызывающих гетерологичный синапсис. Эта группа мутаций самая многочисленная. Ранее было изучено проявление и проведено картирование мутаций этого типа *sy2*, *sy6*, *sy7*, *sy8*, *sy10*, *sy18* и *sy19*. Наличие такого числа генов в этой группе говорит о том, что процессы попарного узнавания гомологов и вовлечения их в синапсис, возможно, состоят из нескольких этапов. В дальнейшем планируется проведение тестов на аллелизм мутации *sy11* с другими мутациями из этой группы. В случае отрицательного ответа будет проведено картирование данного гена.

Сравнительное изучение нативных и гибридных генов десатураз *Synechocystis* sp. PCC 6803 с различной субстратной специфичностью в клетках бактерий и растений

Гордукова М.А. (Москва, m.gordukova@mail.ru), Шмишляшвили Х.Р., Демин И.Н.

Хотя единая теория адаптации растений к холодовому стрессу к настоящему времени до сих пор не разработана, известно несколько механизмов, позволяющих растениям переносить низкие температуры. Один из таких механизмов связан с изменением состава мембранных липидов и увеличением текучести мембран. При снижении температуры активируется синтез десатураз, которые отвечают за образование двойных связей в молекулах жирных кислот. Десатурация вызывает увеличение подвижности жирнокислотных «хвостов» в липидах, и, следовательно, сохранение подвижности и связей

белков в липидном бислое в условиях холодого стресса.

В качестве целевых генов были выбраны гены *desA* и *desC* *Synechocystis* sp. PCC 6803, кодирующие десатуразы с различной субстратной специфичностью. Поскольку десатуразы обладают ферментативной активностью, которую можно определить, используя трудоемкие методы, были сконструированы гибридные гены, в которых целевые гены десатураз трансляционно слиты с последовательностью репортерного гена термостабильной лихеназы. Были сконструированы бактериальные экспрессионные вектора, содержащие нативные и гибридные гены десатураз. Полученными векторами были трансформированы клетки *E. coli*. Анализ полученных бактериальных трансформантов позволил заключить, что в составе гибридных белков DesC-LicB и DesA-LicB, как лихеназа, так и десатуразы сохраняют свою активность, при этом активность гибридных белков не отличается от активности белков в нативном состоянии. Далее были сконструированы растительные экспрессионные вектора, несущие нативные и гибридные гены десатураз под контролем конститутивного промотора. Для выяснения роли десатураз в механизмах холодоустойчивости, а также для изучения возможности изменения холодоустойчивости за счет экспрессии гетерологичных генов десатураз были получены экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля. У полученных трансформантов был проведен сравнительный анализ жирнокислотного состава липидов в условиях оптимальных температур. Этот анализ показал, что в трансформированных растениях картофеля синтезируется гетерологичные ацил-липидные десатуразы, которые стимулируют биосинтез мембранных липидов и повышают уровень ненасыщенных ЖК, в частности 18:2 и 18:3. Наши дальнейшие исследования были направлены на то, чтобы определить, коррелирует ли увеличенный уровень ненасыщенных жирных кислот с устойчивостью трансформантов картофеля к стрессовым факторам. Для этого трансформанты картофеля подвергали кратковременному воздействию низких температур и определяли в растениях ряд физиолого-биохимических параметров, таких как уровень образования супероксидного аниона, концентрацию перекиси водорода в исследуемых растениях, активность супероксиддисмутазы и содержание малонового диальдегида. Во всех изученных нами случаях, трансформированные растения подвергались меньшему низкотемпературному стрессу, чем контрольные.

Таким образом, перенос генов десатураз с различной субстратной специфичностью в геном растений картофеля может приводить к увеличению ненасыщенности мембранных липидов и повышению холодоустойчивости растений.

Анализ морфологии и наследования опушения листа у яровых сортов и гибридов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Дорошков А.В. (Новосибирск, lex733@ngs.ru)

Опушение листа имеет большое биологическое значение при адаптации растений к факторам внешней среды, таким как засуха, УФ-облучение, воздействие некоторых токсинов. Оно также участвует в защите от ряда вредителей. Показано влияние опушения покровов на влагоудерживающую способность растений яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.. Существуют данные о том, что сильно опушенные сорта пшеницы значительно более устойчивы к поражению жуком-листоедом *Oulema melanopus* L., а также гессенской мухой *Mayetiola destructor*. Кроме того, опушение листа участвует в ряде физиологических реакций растения. Предполагается, что клетки трихом, основной объём которых вынесен за плоскость эпидермы, увеличивают эффективность работы устьичного аппарата. Трихомы пшеницы представляют собой одноклеточные образования эпидермиса простой конической формы. Длина и плотность трихом значительно варьирует в зависимости от генотипа и условий среды, поэтому опушение листа пшеницы является сложным комплексным признаком. Различные

варианты опушения листа, по всей видимости, связаны с приспособленностью растения к определённым условиям жизни. Распространённый метод оценки степени опушения листа «на ощупь» даёт некоторое представление о плотности опушения и позволяет разделить разнообразие фенотипов на несколько групп. Однако, этого недостаточно для деления на фенотипические классы при сложном наследовании.

Цель данной работы: провести сравнительный анализ морфологии опушения листа различных сортов, а также отдельных генотипов в расщепляющейся популяции, что позволит судить о генетическом контроле данного признака. В настоящей работе для оценки характеристик опушения листа использован метод, основу которого составляет компьютерный анализ микроизображений поперечного сгиба листа. Этот метод позволяет оценивать широкий спектр параметров опушения, таких как плотность опушения, длину трихом, количество трихом определённой длины, а также плотность трихом в зависимости от удаления от границы листа. Проведён детальный анализ опушения как сложного, многомерного, признака на примере пары сортов (Голубка и Балаганка), не различимых по опушению как тактильно, так и визуально. Образцы этих сортов при помощи кластерного анализа были разбиты на группы по сходству характера опушения. С помощью генетического анализа для сортов Саратовская 29 и Голубка показано, что наличие опушения контролируется разным количеством генов. Был проведён кластерный анализ образцов листьев растений по числовым характеристикам опушения, подтверждающий генетические различия между сортами. Также в данной работе проведён многомерный кластерный анализ полиморфизма опушения листа гибридов второго поколения китайского сорта *Hong-Mang-mai* и линии сорта Родина с интрогрессией генов контроля опушения от *Aegilops speltoides*. Сделаны предположения относительно наследования признака.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных при поддержке программы РАН 23, проекта 29, а также НШ-2447.2008.4. Руководитель. ак. РАН Колчанов Н.А. Автор выражает признательность доценту, к.б.н. Пшеничниковой Т.А., а также к.б.н. Афонникову Д.А. за помощь в подготовке тезисов.

Полиморфизм ряда генов нейромедиаторных систем в связи с морфофункциональными особенностями юношей и девушек

Дукова И.В. (Москва, rhino@list.ru)

Развитие сложных поведенческих признаков имеет полигенную природу, при этом на функционирование каждого гена оказывают свое влияние и характеристики среды. Значительный вклад в формирование психических черт личности вносят гены нейромедиаторных систем. В последнее время наблюдается повышенный интерес к изучению связей физических параметров тела человека с определенными генами, белковые продукты которых могут прямо или косвенно участвовать в развитии функций организма. На материалах комплексного антропогенетического обследования 274 студентов МГУ (151 юноша и 123 девушки) изучены связи генов серотонинэргической (SLC6A4, hSERT) и дофаминэргической (DAT1, DRD2) нейромедиаторных систем с морфофункциональными параметрами. Выявлена достоверная ($p < 0,05$) ассоциация общего набора антропометрических признаков с генотипами гена переносчика дофамина DAT1 у девушек. Девушки с генотипом 440/440 имеют тенденцию к хорошему развитию костно-мышечной системы, условно их можно отнести к мезоморфному типу конституции. Согласно ряду литературных данных генотип 440/440 ассоциирован с такими чертами темперамента, как склонность к риску, активность, смелость и высоким показателем «поиска новизны». Представители мезоморфного соматотипа по психосоматической схеме Шелдона характеризуются склонностью к риску, активностью, смелостью, некоторой агрессивностью, таким образом, нами предполагается ассоциация генотипа 440/440 гена переносчика дофамина DAT1 с

мезоморфным типом конституции и подтверждается ряд литературных данных о связи этого генотипа с особенностями темперамента.

После предположений относительно морфологической интерпретации результатов исследования были изучены особенности возможных связей различных вариантов телосложения с генотипами SLC6A4, hSERT, DAT1, DRD2 в объединенной выборке студентов. Выраженность свойств телосложения (эндо-, экто-, мезоморфии) оценивалась по баллам, рассчитанным по методике Б. Хит–Дж. Картера. Достоверные ($p < 0,05$) различия выявлены для гена рецептора дофамина DRD2. Студенты с генотипом A1/A1 характеризуются высокой степенью выраженности экто-, средней выраженностью эндо- и слабой степенью выраженности мезоморфного компонента. Литературные данные об ассоциации генотипа A1/A1 с чертами темперамента достаточно противоречивы, но большинство исследователей характеризует представителей данного генотипа как активных, склонных к риску, несколько агрессивных лиц. Представителям эктоморфного соматотипа, наоборот, соответствует сдержанность, общая заторможенность, некоторая скрытность и склонность к одиночеству. Таким образом, данные об ассоциации генотипа A1/A1 гена рецептора дофамина DRD2 и определенными чертами темперамента не подтвердились.

Исследование регуляторной области гена *Tsix* полевки *Microtus rossiaemeridionalis* *Жукова О.А. (Новосибирск, francisella.olga@gmail.com)*

Большинство генов одной из двух X хромосом самки млекопитающих транскрипционно подавляются в результате процесса, названного инактивацией X хромосомы. Этот процесс контролируется определенным генетическим локусом – центром инактивации (*Xic* – X chromosome inactivation center), содержащим элементы, отвечающие за подсчет числа X хромосом, выбор будущей неактивной хромосомы и инициацию замолкания генов. В этом локусе расположены гены *Xist* и *Tsix*. Ген *Xist* (X inactive specific transcript) кодирует нетранслируемую, ядерную РНК, необходимую для инициации инактивации X хромосомы. Ключевой регулятор экспрессии гена *Xist* – его антисмысловой ген *Tsix*.

Целью данной работы является исследование регуляторной области гена *Tsix* полевки *Microtus rossiaemeridionalis*. С помощью метода DNase I *in vitro* футпринтинга, в области прилегающей к точке старта были выявлены мотивы, с которыми взаимодействуют регуляторные белки. Компьютерный анализ показал наличие множества потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов, часть из которых совпадает с мотивами, определенными экспериментально.

Также изучалась регуляция гена *Tsix* с использованием репортерных конструкций на основе вектора pGL 4.10 *luc2*, что позволило более точно определить регуляторные элементы, влияющие на транскрипцию. Данные конструкции содержат ген люциферазы под контролем различных частей 5'-области гена *Tsix*. Экспрессия репортерных конструкций была исследована в перевиваемой клеточной культуре фибробластов самки линии SD10. В результате были выявлены элементы как положительно влияющие на транскрипцию, так и отрицательно.

Гены и социальное поведение: клонирование *fruitless* у муравья *Кузьменко Т.В. (Москва, kuzmenkotv@gmail.com)*

Каким образом осуществляется регуляция сложных форм поведения живых существ на генетическом уровне? Четкого ответа на этот вопрос пока нет. *Fruitless* – высоко консервативный среди насекомых ген, продуктами которого являются транскрипционные факторы. Для дрозофилы известно, что *fruitless* образует 13 различных транскриптов, часть из которых полоспецифична и определяет некоторые

особенности поведения. Так например, совместная экспрессия самцовоспецифичной формы транскрипта *fruitless* и нейромедиатора октопамина в определенных нейронах мозга определяет способность отличать самцов от самок и запускать характерные паттерны агрессивного поведения по отношению в первым. Таким образом оба компонента (*fruitless* и октопамин) вовлечены в формирование агрессивного поведения. Для некоторых видов муравьев было показано, что увеличение уровня октопамина ведет к повышенной возбудимости и агрессивности рабочих особей, однако роль *fruitless* в этом процессе неизвестна.

Целью данной работы является клонирование гена *fruitless* у муравьев для последующего исследования влияния особенностей его транскрипции на агрессивное поведение. Для этого в базе данных NCBI GenBank были найдены и затем проанализированы все ранее известные последовательности генов *fruitless* других насекомых. Это позволило установить наиболее консервативный участок этого гена, которым оказался ВТВ домен, присутствующий также у некоторых других генов. Основываясь на филогении и сравнительно-геномном анализе, нами был клонирован высоко консервативный фрагмент мРНК гена *fruitless* у муравья. При помощи технологии RACE PCR нам удалось установить последовательность двух альтернативных транскриптов *fruitless* у муравьев *Camponotus maritimus* и *Iridomyrmex humilis*. Использование за основу генома пчелы позволило установить их вероятную экзон-интронную структуру. Дальнейшие исследования уровней и локализации экспрессии транскриптов *fruitless* у особей, принадлежащих к разным видам, кастам, и возрастным категориям, позволят пролить свет на вовлеченность этого гена в молекулярные механизмы регуляции агрессивного поведения у муравьев.

Автор выражает признательность Скоблову М.Ю., Нуждину С.В. и Барановой А.В за помощь в проведении данной работы.

Анализ представленности генотипов *Wolbachia* и гаплотипов митохондриальной ДНК *Drosophila melanogaster* в природных популяциях

Курильщикова А.М. (Новосибирск, kurilshikov@gmail.com), Быков Р.А.

Большой интерес у исследователей вызывает бактерия *Wolbachia pipientis* – эндосимбионт, хозяевами которого являются (по некоторым оценкам) более половины видов членистоногих и некоторые нематоды. Эндосимбионт *Wolbachia* передается в ряду поколений строго вертикально, от материнской особи к потомству, и обладает интересной особенностью – способностью к индукции у хозяина целого спектра репродуктивных аномалий (цитоплазматической несовместимости, андроцида и др.), направленных на увеличение доли инфицированной цитоплазмы в популяции. Инфицированность природных популяций некоторых видов насекомых может достигать 100 %, что говорит о значительном эволюционном успехе этой бактерии. Степень проявления репродуктивных аномалий зависит как от вида-хозяина, так и от штамма бактерии. Например, для симбиотической системы «*Drosophila melanogaster-Wolbachia*» проявление цитоплазматической несовместимости, как правило, слабое или отсутствует.

Проведен анализ природных популяций *D. melanogaster* на предмет инфицированности *Wolbachia*. Согласно существующим данным, в природных популяциях *D. melanogaster* встречается один штамм *Wolbachia* – wMel. Изучение полиморфизма ДНК этого штамма позволило выделить внутри штамма 5 генотипов, обнаруженных в природе: wMel, wMelCS, wMelCS2, wMel2 и wMel3. В настоящей работе было исследовано 163 самки из популяций различных регионов Евразии: Украины, Средней Азии, Сибири и Алтая; 57 самок оказались свободными от *Wolbachia*; 105 – инфицированы генотипом wMel; по одной самке из популяций Средней Азии и Алтая были инфицированы генотипом wMelCS. В предыдущие годы в популяциях Средней Азии и Алтайского региона неоднократно выявлялись редкие генотипы –

wMelCS и wMelCS2. Таким образом, в популяциях Евразии встречается 3 генотипа вольбахии из пяти. Следует отметить, что генотип wMel отличается от генотипов wMelCS и wMelCS2 по четырем районам, в то время как между собой генотипы wMelCS и wMelCS2 различаются только по одному району, что говорит об их относительной эволюционной близости.

Ранее было показано, что существует сопряженность эволюционной изменчивости митохондриальной ДНК вида-хозяина и *Wolbachia*. В митохондриальной ДНК *D. melanogaster* неоднократно обнаруживались полиморфные сайты, имеющие ассоциацию с определенными генотипами вольбахии. В рамках настоящей работы был проведен анализ неинфицированных самок на предмет наличия замены по сайту 2187 (относительно последовательности генома мтДНК линии Oregon-R, GenBank ID: NC_001709) гена первой субъединицы цитохром-оксидазы С. Один из вариантов замены в этом сайте ассоциирован с генотипом вольбахии wMel, другой – с генотипами wMelCS и wMelCS2. Для исследованных популяций *D. melanogaster* было установлено, что все неинфицированные линии имеют вариант замены, сопряженный с самым распространенным генотипом *Wolbachia* – wMel. Можно предположить, что неинфицированные в настоящее время мухи являются потомками ранее инфицированных этим генотипом предков. Косвенно это свидетельствует о том, что для инфицированности генотипом wMel существует положительный отбор. Поскольку для симбиотической системы «*Drosophila melanogaster-Wolbachia*» характерно отсутствие или слабое проявление репродуктивных аномалий и неизвестно мутуалистическое действие бактерии на хозяина, то природа этого отбора остается неясной.

Исследование интегразной активности ретротранспозона *gypsy* у *Drosophila melanogaster*

Маннанова М.М. (Москва, mannanova_m@mail.ru), Нефедова Л.Н., Ким А.И.

Значительную часть генома эукариот составляют мобильные генетические элементы (МГЭ). В последние годы ведутся активные исследования ретротранспозонов *D. melanogaster*, относящиеся к группе *gypsy*. Эти ретротранспозоны характеризуются наличием трех открытых рамок считывания (ОРС), гомологичных ретровирусным генам *gag*, *pol* и *env*. Наиболее хорошо изученным представителем ретротранспозонов группы *gypsy* является *gypsy*. Одним из ключевых ферментов, осуществляющих перемещение ретротранспозона, является интеграза, кодируемая ОРС2. И у ретровирусов, и у ретротранспозонов известен механизм исключения из хозяйской хромосомы за счет гомологичной рекомбинации между длинными концевыми повторами (ДКП). На модельной системе в клетках *E. coli* было доказано, что интеграза *gypsy* способна осуществлять транспозицию МГЭ, встраивая в хромосомы дрозофилы ДНК-копии ретротранспозона *gypsy*, и вырезать их точно, не оставляя следов МГЭ.

С целью изучения активности интегразы фрагмент ОРС2 *gypsy*, кодирующий данный белок, был клонирован в экспрессионном векторе рЕТ-30. Донором нуклеотидной последовательности ОРС2 была хромосомная ДНК линии *D. melanogaster*, содержащая транспозиционно активный *gypsy* и клонированная в составе рекомбинантной плазмиды рUC*gypsy*. Полученной конструкцией, названной рЕТint, трансформировали штамм *E. coli Rosetta*. В результате был получен белок размером около 45 кДа. Для получения активной формы интегразы в виде димера белок предварительно инкубировали с тиоредоксином. Субстратом для изучения эндонуклеазной активности интегразы служила конструкция на основе вектора рBlueScript KS (+) – рBSLTR, несущая ДКП.

Показано, что в результате реакции интегразы с плазмидой рBSLTR *in vitro* происходит преимущественно однонитевое расщепление матрицы. По-видимому, это объясняется тем, что интеграза *in vitro* большей частью остается в мономерной форме, а не в димерной, которая требуется для осуществления двунитевого разрыва. Вырезание из

pBSLTR фрагмента, соответствующего по размеру ДКП, происходит только в том случае, когда в реакционную смесь добавлен бесклеточный экстракт *E. coli*. Очевидно, в присутствии клеточных белков интегративная активность стабилизируется.

Исследование генетического контроля транспозиции мобильного генетического элемента *gypsy* у *Drosophila melanogaster*
Маслов Д.А. (Москва, dim_mas@mail.ru)

Мобильные генетические элементы (МГЭ) составляют существенную и неотъемлемую часть генома эукариотических организмов. МГЭ играют весомую роль в эволюции организмов, влияя на структуру и функцию как отдельных генов, так и генома в целом. Одними из наиболее интересных с точки зрения исследования МГЭ являются ретротранспозоны группы *gypsy*. Их отличительной чертой является наличие функционально активной третьей открытой рамки считывания (ОРС3), отвечающей за инфекционность. Таким образом ретротранспозоны группы *gypsy* являются первыми открытыми ретровирусами беспозвоночных.

Перемещения МГЭ играют важную роль в индивидуальной изменчивости, однако высокая их активность может отрицательно сказаться на организме хозяина. Поэтому в ходе эволюции организмы выработали различные механизмы контроля транспозиций. У *D. melanogaster* контроль за транспозициями *gypsy* осуществляет ген *flamenco*, генетически картированный в районе 20A1-3 X-хромосомы. В этом районе обнаружено скопление дефектных копий мобильных элементов, подавляющее большинство которых транскрибируется в одном и том же направлении. Предполагается, что *flamenco* может являться не истинным геном, а локусом, состоящим из дефектных копий МГЭ. Этот локус ответственен за образование интерферирующих РНК (миРНК), которые регулируют активность *gypsy* и, возможно, других ретротранспозонов путем РНК-интерференции.

Для проведения структурного анализа района X-хромосомы, с которого предположительно осуществляется транскрипция интерферирующей РНК, были исследованы 4 линии мух, различающиеся по статусу *flamenco*: 7k(SS) (фенотип *flamenco*, отсутствует активная копия *gypsy*), 145(MS) (*flamenco*, есть активная копия *gypsy*), 413 (дикий тип, *flamenco*⁺), OreR (*flamenco*, отсутствует активная копия *gypsy*). Заклонированы фрагменты ДНК размером 6 тпн из линий 145 и 7k, а также проведен анализ отдельных фрагментов меньшего размера из всех линий. В линии OreR в анализируемом фрагменте обнаружена вставка размером 173 нуклеотида, которая была локализована и секвенирована. Проводятся исследования, направленные на локализацию старта транскрипции интерферирующей РНК.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 08-04-00693 и 08-04-97050.

Генетические особенности пород овец, разводимых в Калмыкии
Мачкаева Н.Т. (Элиста, machkaewa-nt5@yandex.ru)

Традиционный зоотехнический подход, основанный на генеалогическом анализе структуры стада, должен быть дополнен системой генетического контроля. Использование различных полиморфных систем позволяет контролировать генетическую структуру популяций, пород и стад и оценивать степень генетического сходства. Тем самым в руки селекционера попадает инструмент, позволяющий оценить влияние систем разведения животных на генетическую структуру стад. Разумеется, сравнение генетической структуры разных групп животных не является самоцелью: в совокупности с анализом динамики продуктивных качеств оно служит критерием выбора селекционной стратегии. Традиционно для целей генетического контроля используется анализ полиморфизма по группам крови. Группы крови нами

исследовались по нескольким причинам. Во-первых, в племенной характеристике животного в обязательном порядке должна быть характеристика групп крови. Во-вторых, эти данные представляют научный и практический интерес, как мало изученные в Калмыкии.

Материалом для исследований групп крови овец служили образцы крови полновозрастных маток. В каждой породе было протестировано по 70 овцематок. Кровь бралась из яремной вены в хорошо закрывающиеся пробками пробирки. Антигенные факторы групп крови овец за исключением Да-антигена, определяли гемолитическим тестом по A. Neimann-Sorensen (1957) с некоторыми модификациями.

Анализ данных наших исследований позволяет сделать некоторые выводы. Так, наиболее распространенным у всех овец Калмыкии был антиген О системы R. Наименьшая частота его встречаемости наблюдается у овец породы советский меринос (59,0 %). Остальные породы имели частоту антигена О в пределах 70,2-85,5 %. Наибольший показатель встречаемости данного антигена оказался у овец калмыцкой породы – 85,5 %. Достаточно распространен и антиген – Сb системы С. Практически все овцы грозненской и ставропольской пород имели его (97,0%). Наименьший показатель у овец породы советский меринос (42,5 %) и калмыцких (59,2 %), у овец каракульской породы такой антиген встречался у 65,7 % голов. Четкая межпородная разница в частоте Ма системы М отмечена между овцами каракульской и мериносовых пород. Так, у овец ставропольской и грозненской пород частота Ма составила 6,0 % и 7,0 %. Самой низкой частотой встречаемости характеризуются антигены Ca, Ab и Be. Так, овцы грозненской породы не имели Ab и Ca, овцы ставропольской породы не имели Ca, а калмыцкой – Be. Ничтожно мал фактор Ab и Ca у овец калмыцкой породы, Ab и Be у ставропольских, каракульских и грозненских овец.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Моисейкиной Л.Г. за помощь в подготовке тезисов.

Генофонд хантов: анализ структуры по данным Y-хромосомы

Медведева О.Ф. (Томск, miskamedv@mail.ru), Хамина К.В.

Охарактеризован генофонд хантов, представленных неродственными мужчинами из пос. Русскинские, Сургутского района (N=66) и пос. Казым, Белоярского района (N=46) ХМАО с использованием двух систем генетических маркеров нерекombинирующей части Y-хромосомы – 52 диаллельных и 17 микросателлитных (DYS: 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 394(19), 426, 434, 435, 436, 437, 438, 439). Всего исследовано 112 образцов ДНК. Генотипирование проводилось с помощью стандартных молекулярно-генетических методов – ПЦР, ПДРФ, электрофореза в агарозных и полиакриламидных гелях, секвенирования ДНК, капиллярного гель-электрофореза.

В генофонде хантов выявлено пять гаплогрупп: N1b (N2), N1c1 (N3a), Q*, R1a1 и R1b1b2 (R1b3), что свидетельствует о формировании его на базе ограниченного числа генетических компонент. Показана сильная неоднородность исследованных выборок по составу и частотам различных гаплогрупп. Оценка межпопуляционных различий с помощью точного теста популяционной дифференциации по частотам гаплогрупп и YSTR-гаплотипов выявила достоверные отличия между парами популяционных выборок из разных районов и отсутствие различий между выборками из одного района. В популяционной выборке северных хантов (пос. Казым) с наибольшей частотой (44%) представлена гаплогруппа Q*, в то время как в генофонде южных хантов (пос. Русскинские) ее частота лишь 5%. При этом в генном пуле южных хантов с частотой 24% представлена гаплогруппа R1a1, не найденная у северных. Основу же генофонда обоих популяционных групп составляет гаплогруппа N1b – 67% у южных хантов и 41% – у северных.

Проведен филогенетический анализ линий Y-хромосомы путем составления

индивидуальных гаплотипов по микросателлитным маркерам. С помощью двух различных методов оценено время генерации генетического разнообразия по YSTR-гаплотипам в основных гаплогруппах. Анализ распределения гаплотипов свидетельствует о наличии у хантов локального эффекта основателя по гаплогруппам N1b и R1a1. Проведена оценка генетической дифференциации с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) для двух обследованных популяционных групп (F_{st} составил 20,61%), а также с привлечением двух популяционных выборок по данным литературы (Осипова, 2005; Pimenoff et al., 2008). Анализ F_{st} показал максимальную степень межпопуляционной дифференциации хантов при делении их на три группы в соответствии с географическим местом их проживания (28,41%). Общий уровень генетической дифференциации рассматриваемой системы популяций составил 21,85%. В целом результаты свидетельствуют о сильной генетической подразделенности генофонда хантов. Проведена оценка генетического разнообразия на основании частот диаллельных гаплогрупп и микросателлитных гаплотипов. В целом ханты характеризуются низким уровнем генетического разнообразия, по сравнению с другими южносибирскими этносами: у южных хантов $H=0,49$, у северных $H=0,68$. Проведена оценка относительного вклада различных предковых групп населения в состав разных субпопуляций. Обсуждаются вопросы происхождения и распределения вариантов Y-хромосомы на территории Сибири.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ (06-04-48274, руководитель В.А.Степанов) и гранта Президента Российской Федерации (МК-3362.2008.4, руководитель В.Н. Харьков.).

**Структурные различия терминальных районов хромосом у двух
близкородственных видов бурозубок, *Sorex araneus* и *Sorex granarius* (Soricidae,
Eulipotyphla)**

Минина Ю.М. (Новосибирск, minina_jul@mail.ru)

Согласно современным представлениям, терминальные районы хромосом состоят из теломерных 5'(TTAGGG) n 3' и субтеломерных повторов. Эти районы ответственны за расхождение хромосом в митозе и мейозе, регуляцию клеточного деления, апоптоз и онкотрансформацию, им отводится главенствующая роль в сохранении стабильности хромосом и определяющая роль в эволюции кариотипов. Несмотря на большой интерес многих исследователей к теломерным и субтеломерным районам, их структура практически не изучена у других видов млекопитающих, нежели человек и мышь. Но даже эти немногочисленные данные указывают на принципиальные особенности организации этих районов у разных видов. В настоящей работе представлены данные о структуре терминальных районов хромосом у двух близкородственных видов бурозубок, *S. araneus* и *S. granarius*, в эволюции кариотипов которых ведущую роль сыграли Робертсоновские перестройки. Вид *S. araneus* в нашем исследовании был представлен тремя расами: Новосибирской, Томской и Cordon, различающимися количеством и составом метацентриков.

Кариотипы *S. araneus* и *S. granarius* составлены из практически одинаковых хромосомных плеч, но различаются по количеству акроцентриков и метацентриков. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что размер и структура теломер у *S. araneus* и *S. granarius* принципиально отличаются. В хромосомах *S. granarius* было выявлено два типа теломер: длинные теломеры размером до 300 (в среднем 213) т.п.н., локализованные на коротких плечах всех 32-х акроцентриков, и короткие (3,8 т.п.н.) – на остальных концах хромосом. В отличие от *S. granarius* в хромосомах трех рас *S. araneus* все теломеры оказались близки по размеру и содержали в среднем 6,8 – 15,2 т.п.н. теломерной ДНК. Такой размер теломер укладывается в рамки, характерные для диких видов млекопитающих. Кроме того, в хромосомах *S. araneus* были выявлены

интерстициальные теломерные последовательности (ITS), локализация которых, как правило, была связана с локализацией эволюционных хромосомных перестроек. Частота выявления ITS перичентромерной локализации была тем выше, чем позже в ходе эволюции сформировались метацентрики. Весьма вероятно, что эволюционные точки разрывов при формировании Робертсоновских перестроек были локализованы в теломерах. У *S. granarius* ITS выявлено не было. Мы показали, что длинные теломеры *S. granarius* наряду с теломерными повторами содержат повторы 18S рДНК, которые формируют ЯО районы на коротких плечах 32-х акроцентриков. Непосредственно к этим районам прилегают центромеры. У *S. araneus* ЯО районы были выявлены только в дистальных районах хромосомы *tu* и хромосомных плеч *o* и *q* независимо от того, были ли они акроцентриками или входили в состав метацентриков в разных хромосомных расах вида.

По всей видимости, структура терминальных районов *S. araneus* схожа со структурой терминальных районов общего предшественника *S. araneus* и *S. granarius*. Формирование особой структуры теломер *S. granarius*, возможно, было спровоцировано распадом нескольких метацентрических хромосом в кариотипе предка и явилось результатом реорганизации терминальных районов хромосом.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Н.С. Ждановой

Изучение экспрессии гена ω^3 -десатуразы, *desB*, у мутанта *Synechocystis* sp. PCC 6803 с измененным жирнокислотным составом мембранных липидов

Миронов К.С. (Москва, n7h8m2@gmail.com)

Одной из «мишеней» действия пониженных температур являются биологические мембраны, жесткость которых повышается одновременно со снижением температуры. Это в свою очередь ведет к нарушению барьерной функции мембран, а также к угнетению процессов, локализованных на мембранах. Холоднокровные животные, растения, бактерии (в т.ч. и цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803), вынуждены приспосабливаться к падению внешней температуры лишь посредством изменения уровня экспрессии генов. Среди генов, демонстрирующих усиление экспрессии в этих условиях, особое место занимают гены десатураз жирных кислот (ЖК). Эти ферменты образуют двойные связи в цепях ЖК, таким образом понижая степень насыщенности остатков ЖК в составе липидов мембран, и увеличивая текучесть мембран, что является одной из основных стратегий адаптации живых организмов к пониженным температурам.

У *Synechocystis* sp. PCC 6803 система десатурации ЖК включает четыре ацил-липидных десатуразы: *DesA*, *DesB*, *DesC* и *DesD*, — кодируемых соответствующими генами (*desA*, *desB*, *desC* и *desD*). Эти ферменты образуют двойные связи в положениях Δ^9 (*DesC*), Δ^{12} (*DesA*), Δ^6 (*DesD*), и Δ^{15} (или ω^3 , *DesB*) — для 18-углеродных остатков ЖК. Реакции десатурации происходят последовательно и протекают непосредственно на мембранах.

Влияние текучести мембран на изменение экспрессии индуцируемого холодом гена *desB* изучали у мутанта по генам *desA* и *desD*. В составе липидов этого мутанта были обнаружены лишь остатки мононенасыщенных ЖК, что сопровождалось снижением текучести мембран. Анализ экспрессии *desB*-гена проводили посредством нозерн-блоттинга. При понижении температуры инкубации на 8-12°C клетки дикого типа испытывали холодовой стресс, что характеризовалось чрезвычайно высоким уровнем экспрессии *desB*. Подобное состояние у мутанта наблюдали уже при температурах, сниженных всего лишь на 4-8 °C относительно оптимальной. Последующее уменьшение величины температуры приводило к снижению уровня экспрессии *desB*, что указывало на нарушение путей передачи сигнала холодowego стресса (использование рифампицина

опровергло альтернативную гипотезу об усилении процессов деградации мРНК при пониженных температурах у мутанта). Таким образом, экспрессия гена *desB* у *Synechocystis* sp. PCC 6803 контролируется текучестью липидного бислоя мембран.

Определение и анализ регуляторных районов гена *Xist* у полевки *Microtus rossiaemeridionalis*

Орищенко К.Е. (Новосибирск, keor@bionet.nsc.ru)

Компенсация дозы генов у самок высших млекопитающих происходит за счёт транскрипционной инактивации одной из двух X-хромосом. Инактивация X-хромосомы – это сложный многостадийный процесс, начинающийся в раннем эмбриогенезе и контролируемый определённым генетическим локусом – *Xic* (*X*-chromosome inactivation center). Ген *Xist* (*X* inactivate specific transcript) является ключевым фактором в инициации инактивации. Он экспрессируется только на неактивной X-хромосоме и кодирует гигантскую, (размером более 17 т.н.) нетранслируемую, ядерную РНК, которая, распространяясь по X-хромосоме, приводит к транскрипционному молчанию расположенных в ней генов.

В данной работе исследована регуляторная область гена *Xist* полевки *Microtus rossiaemeridionalis*. В результате анализа 5' области гена *Xist* у семи видов млекопитающих, были обнаружены два наиболее консервативных района. Первый, размером около 100 п.н. (ECR1 – evolution conservative region) соответствует району минимального промотора и второй, размером 80 п.н. (ECR2) располагается в области от -480 п.н. до -400 п.н. относительно точки старта транскрипции у полевки. Для определения ДНК-мотивов, с которыми взаимодействуют регуляторные белки, данные районы были исследованы при помощи метода *in vitro* футпринтинга с ДНКазой I. В реакциях связывания использовался радиоактивно меченый ДНК-зонд и ядерные белковые экстракты, выделенные из перевиваемой клеточной культуры фибробластов линии SD10. В результате в ECR1 было обнаружено девять защищенных районов на “+” цепи и шесть на “-” цепи. В ECR2 на “+” цепи были выявлены шесть защищенных районов.

Для поиска потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов была использована программа MatInspector (www.genomatix.de). В результате в ECR1 обнаружены потенциальные сайты связывания таких широко распространенных транскрипционных факторов как TBP, YY1, SP1, CAAT box связывающего фактора и других. В ECR2 выявлены потенциальные сайты связывания факторов: SRY, ER, RAR, AP1 и других. Часть из обнаруженных сайтов практически полностью перекрывается с защищенными районами определенными в экспериментах по футпринтингу.

Чтобы определить какое влияние на экспрессию гена *Xist* оказывает ECR2 и выявить другие функциональные районы, были построены репортерные конструкции. Различные части 5' области гена *Xist* полевки были амплифицированы при помощи ПЦР с праймерами, содержащими сайты рестрикции, и клонированы в вектор pGL4.10[luc2], содержащий ген люциферазы без собственного промотора. Активность полученных конструкций исследована в клеточной линии SD10, которая представляет собой перевиваемую клеточную культуру фибробластов самки (XX). Показано, что минимальный промотор гена *Xist* у полевки локализуется в районе от -100 п.н. до +67 п.н.. Также, в 5' области в районе от -100 п.н. до -200 п.н. и от -300 п.н. до -400 п.н. могут располагаться репрессоры, а в районах от -200 п.н. до -300 п.н. и от -400 п.н. до -500 п.н. могут располагаться активаторы транскрипции.

Варианты аллелей и генотипов гена *CYP1A2* у работников Кемеровской ГРЭС

Останцева А.В. (Кемерово, annaost81@mail.ru), Макаренко О.С., Воронина Е.Н.

Чрезмерное загрязнение окружающей среды ксенобиотиками сегодня является актуальной проблемой человечества. Источниками ксенобиотиков являются многие отрасли промышленности, в том числе топливно-энергетические комплексы. Основную

роль в метаболизме ксенобиотиков в организме человека играют ферменты биотрансформации. *CYP1A2* конститутивно экспрессируется в печени человека и животных, в 1 интроне данного гена выявлено наличие полиморфизма. Белок CYP1A2 относится к ферментам биотрансформации I стадии и катализирует активацию обнаруженных в сигаретном дыме канцерогенных ариламинов, активирует гетероциклические амины – промутагены, образующиеся при пиролизе пищевых белков. На основании активности в метаболизме ксенобиотиков популяция может быть разделена на два фенотипа: интенсивные метаболизеры-носители мутантного аллеля А гена *CYP1A2* и слабые метаболизеры – носители дикого варианта С.

Общая выборка работников Кемеровской ГРЭС насчитывала 102 человека. Образцы крови обследуемых были получены в ходе планового медицинского осмотра. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Варианты аллелей и генотипов гена *CYP1A2* выявляли методом ПЦР в комплексе с методом изучения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Продукты рестрикции анализировали в 6% полиакриамидном геле с последующей визуализацией в УФ-свете. Мутантный аллель А был представлен у работников ГРЭС с частотой 68,9%, в то время как частота дикого аллеля С была в 2 раза меньше – 31,1%. Гомозиготными по мутантному аллелю, то есть интенсивными метаболизерами, оказались 45,1%. Количество гетерозигот насчитывало 49%. Гомозиготами по дикому (слабые метаболизеры) аллелю были 5,9% выборки. Таким образом, среди работников Кемеровской ГРЭС преобладал мутантный аллель А и генотипы А/А и А/С.

Настоящая статья подготовлена по результатам исследований, проведенных в рамках проекта Российского Фонда Фундаментальных исследований (грант № 07-04-96026). Авторы выражают признательность доктору мед. наук А.Н. Глушкову за помощь в подготовке тезисов.

Структура и экспрессия генов *D.melanogaster* *DIP1*, *CG32500*, *CG32819* и *CG14476*, входящих в локус *flamenco*

*Потапова М.В. (Москва, maria_potapova@mail.ru),
Нефедова Л.Н., Романова Н.И., Кум А.И.*

Мобильные генетические элементы составляют неотъемлемую часть генома эукариот и играют важную роль в его эволюции. В последние годы ведутся активные исследования ретротранспозонов *D.melanogaster*, относящихся к группе *gypsy* и имеющих сходную структуру с ретровирусами позвоночных. У *D.melanogaster* транспозиции *gypsy* контролирует ген *flamenco* (Kim *et al.*, 1994). Он локализован в районе X-хромосомы 20A1-3, в котором помимо скопления дефектных мобильных элементов обнаружено 8 открытых рамок считывания (ОРС), организованных в кластер. Первый ген кластера – ген *DIP1*, кодирующий белок, связывающий днРНК, за ним следуют ОРС с неизвестными функциями: три повтора ОРС *CG32500* и *CG32819*, ОРС *CG14476*. Для проверки гипотезы об участии этих генов в формировании фенотипа *flamenco* проведен анализ их экспрессии на уровне транскрипции в линиях мух с фенотипом *flamenco* и *flamenco*⁺.

Для анализа экспрессии были взяты три линии *D.melanogaster* с фенотипом *flamenco*: 7k(SS), 145(MS), OreR и линия с фенотипом *flamenco*⁺ – 413 (Нефедова и др., 2004). Анализ проведен на трех стадиях развития мух: у эмбрионов, личинок и имаго. Различия в экспрессии между линиями *flamenco* и *flamenco*⁺ выявлены только для гена *DIP1*. Показано, что у мух линии OreR, в отличие от остальных линий, не происходит снижения экспрессии гена *DIP1* на стадии личинок. Обнаружено, что промотор гена *DIP1* в линии OreR содержит вставку размером около 200 п.н., которая, по-видимому, влияет на транскрипцию гена. Полученные данные указывают на то, что в линии OreR фенотип *flamenco* может быть обусловлен изменением экспрессии гена *DIP1*. Отсутствие

различий в экспрессии генов кластера между линиями 7k(SS), 145(MS) и линией 413 указывает на различную природу мутаций *flamenco* в линиях 7k(SS), 145(MS) и OreR.

Проведен компьютерный анализ структуры кластера в геномах 12 секвенированных видов дрозофилы. Показано наличие гомологичных генов кластера во всех исследуемых видах, но только у *D. sechellia* строение данного района X-хромосомы сходно со строением кластера *D. melanogaster*, а именно, есть повторы генов *CG32500* и *CG32819*. Количество генов-ортологов варьирует у разных видов *Drosophila*. Некоторые из них составляют кластер, большая же часть ортологов единично, либо попарно разбросаны по геному. Таким образом, сборка исследуемых генов в кластер, по-видимому, произошла в геноме *D. melanogaster*.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 08-04-00693 и 08-04-97050.

Генетическая гетерогенность клубеньковых бактерий, вступающих в симбиоз с чинной весенней *Lathyrus vernus*

Птицын К.Г. (Уфа, konstantin157@yandex.ru)

Одним из важнейших процессов, от которого зависит биологическая продуктивность почв, является фиксация микроорганизмами азота атмосферы. Проблема биологической азотфиксации является одной из основных проблем в сельскохозяйственной и биологической науке. Продуктивнее всего азот фиксируют клубеньковые бактерии в симбиозе с бобовыми растениями.

С целью исследования гетерогенности клубеньковых бактерий, нодулирующих растения чины весенней внутри одной популяции, нами проведена следующая работа. На территории Кайпановского лесничества Республики Башкортостан (квартал 90, выдел б) на площади 3,2 га была выбрана популяция чины весенней. Внутри данной площади была выбрана делянка, площадью примерно 100 кв.м. Данная делянка условно была разделена на 9 квадратов (3x3), стороной по 10 м. У растений чины весенней, произрастающих на углах данных квадратов и отстающих друг от друга на 10 м были собраны клубеньки, из которых в дальнейшем были выделены чистые культуры клубеньковых бактерий. Таким образом, с 16 растений было собрано примерно 120 клубеньков, из которых в дальнейшем было выделено 117 штаммов бактерий.

С помощью RAPD анализа была определена генетическая гетерогенность выделенных штаммов. Было обнаружено, что выделенные штаммы обладают высокой степенью генетической гетерогенности, что говорит об их принадлежности к разным штаммам. С целью исследования филогении исследуемых штаммов клубеньковых бактерий был проведен ПДРФ анализ гена 16S рНК с использованием мелкощепящих рестриктаз Kzo91 и HaeIII. Было выявлено, что все исследуемые штаммы по 16S ПДРФ профилю являются идентичными. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что с чинной весенней внутри одной популяции вступают в симбиоз клубеньковые бактерии одного вида, но разных штаммов.

В дальнейшем нами планируется секвенировать ген 16S рНК выделенных культур клубеньковых бактерий для выявления их филогенетического положения и видовой принадлежности.

Исследование воздействия УВЧ-излучения на *Allium cepa*

Романовский А.В., Никитин А.Е. (Ярославль, jamper3d@mail.ru)

Перспективно исследовать воздействие УВЧ-излучения, характерным источником которого являются мобильные телефоны, на высоко восприимчивых к нему биологических организмах, таких как микроорганизмы, грибы или растения. Мутации в клетках таких организмов происходят относительно быстро и могут быть отслежены. Растения, являясь эукариотическими организмами, оптимально подходят для анализа

общего биологического действия УВЧ-излучения, так как на них (в отличие от микроорганизмов) регистрируются все типы генетических повреждений: геномные, хромосомные, генные. Некоторые факторы, которые нельзя учесть при эксперименте с животными, могут быть оценены как мутагены только в растительных тест-системах, анализ же других факторов показывает хорошую корреляцию результатов с экспериментами на животных. В качестве тестового объекта исследования был выбран лук *Allium cepa* сорта Штутгартен, характерной особенностью которого является простота выращивания с минимальными затратами реактивов и технических средств. Действие излучения сотового телефона оценивали с использованием ана-телофазного метода учёта частоты хромосомных aberrаций в меристематических клетках проростков корешков лука *A.сера*. Данный метод не требует знания кариотипа и идентификации типов повреждения хромосом, является простым, экономичным и достаточно чувствительным для определения «мутагенен» или «не мутагенен» фактор. Метод позволяет регистрировать хромосомные мутации типа делеций и транслокаций, а также изменение поведения хромосом на веретене деления. Образцы корешков лука были разделены на 3 группы (X – контрольная серия, для определения спонтанного уровня хромосомных aberrаций; XX – серия, облучаемая 3 часа в период проращивания; XXX – серия, экспонируемая облучением в течение 2 недель по 2 часа в сутки и 3 часа в период проращивания). Для оценки мутагенной активности УВЧ излучения мобильных телефонов учитывалось общее количество клеток (около 600), общее число делящихся клеток на стадии ана- и телофазы и число клеток с хромосомными aberrациями. Вычисляли частоту хромосомных aberrаций (ХА) – процент клеток с мутациями от общего числа ана- и телофаз:

$$ХА, \% = \frac{n}{(A+T)} \times 100\%,$$

где n – количество aberrантных ана- и телофаз, $(A+T)$ – общее количество ана- и телофаз на всех анализируемых изображениях.

Для подсчета ХА использовался программно-аппаратный комплекс «Анализатор изображений для световой микроскопии». При умеренном воздействии излучения (3 дня по часу в сутки) частота ХА в образце *A.сера* возрастает на 0,8% по сравнению с самопроизвольным (спонтанным) уровнем мутаций, составляющим $1,1 \pm 0,34\%$, и оказывается равной $1,98 \pm 0,4\%$. При длительном воздействии (2 недели по часу в сутки) излучения частота ХА в образце *A.сера* возрастает на 1,83% по сравнению с самопроизвольным (спонтанным) уровнем мутаций и составляет $2,93 \pm 0,5\%$.

Дифференциация популяций русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) по генетическим маркерам митохондриальной и ядерной ДНК в сравнении с персидским осетром (*Acipenser persicus* Borodin) и сибирским осетром (*Acipenser baerii* Brandt)

Сергеев А.А. (Москва, sergeev_aleksey@mail.ru)

Исследование популяционно-генетической структуры осетровых с помощью молекулярных методов – актуальная задача, имеющая важное прикладное значение. Сохранение и воспроизведение данного ценного биологического ресурса требует пристального изучения взаимоотношений между различными группами осетров.

В работе были проанализированы частоты встречаемости митохондриальных гаплотипов по участку гена контрольного региона (D-петля) у озимой и яровой расы русского осетра из Волги, озимой расы русского осетра из Урала, морских проб русского осетра из Азова и морских проб персидского осетра из Южного Каспия. Исследовались выборки по 100 особей. Было показано, что для русского осетра из Волги и Урала процент особей с baeri-like митохондриальным гаплотипом различается в пределах стандартной ошибки и составляет приблизительно 35%. В выборке персидского осетра

не обнаружено *baeri-like* митохондриального гаплотипа. Для русского осетра из Азова из выборки в 100 особей было найдено два носителя *baeri-like* гаплотипа, что может являться результатом многолетней искусственной интродукции особей из Каспия в Азов. Полученные данные указывают на то, что по такому признаку, как частота *baeri-like* гаплотипа, русский осетр из Каспия значительно отличается как от персидского, так и от русского азовского осетра.

Для сравнения ядерных маркеров была применена разновидность ДНК-фингерпринтинга: AFLP-метод. Для тех же популяций использовались выборки по 16 особей, также были добавлены выборки сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt) из Лены, Оби и Байкала. Было применено 4 пары селективных праймеров. В итоге, при построении дерева генетических дистанций было получено два основных кластера. Первый включает в себя популяции сибирского осетра, причем популяции Лены и Байкала генетически более близки друг к другу по сравнению с Обской популяцией. В другом кластере оказались русские и персидские осетры, однако достоверного разделения их не произошло. Полученные результаты согласуются с представлениями ихтиологов о структуре вида сибирский осетр, а также о генетической близости персидского и русского осетра. Метод отразил адекватную картину и показал целесообразность дальнейших исследований с применением большего количества селективных пар праймеров и расширения выборок, что, видимо, позволит уточнить генетические взаимоотношения между русским и персидским осетром.

Экспрессия генов раннего развития у обыкновенной полевки *Microtus rossisemeridionalis*

Сорокин М.А. (Новосибирск, antares@bionet.nsc.ru)

У плацентарных млекопитающих эмбрион непосредственно перед имплантацией содержит три отдельные популяции клеток – трофобласту, гипобласту и эпибласту. В условиях *in vitro* клетки предимплантационных эмбрионов млекопитающих можно ввести в культуру и получить стабильные клеточные линии. В частности три типа линий обладают свойствами стволовых клеток, это эмбриональные стволовые клетки, клетки экстраэмбриональной энтодермы и трофобластные стволовые клетки. Особый интерес представляют гены, обеспечивающие поддержание стволовых свойств клеток трех вышеупомянутых линий.

Изучали экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc*, *Sall4*, *Gata6*, *Foxa2*, *Hnf4a*, *Cdx2*, *Esrrb* и *Hand1*, у обыкновенной полевки. Известно, что некоторые из этих генов необходимы для поддержания недифференцированного состояния стволовых клеток, а транскрипция остальных – наблюдается в дифференцированных клеточных линиях. Экспрессия исследуемых генов изучена при помощи обратнo-транскриптазной ПЦР в стволовых клетках экстраэмбриональной энтодермы, в трофобластных стволовых клетках, дифференцированных трофобластных стволовых клетках, эмбриональных фибробластах, эмбрионах, а также органах взрослых животных. Картина экспрессии изучаемых генов в органах полевки сильно отличается от таковой у мыши и человека. Обнаружено, что ген *Klf4* транскрибируется в сердце, а *Gata6* – в семенниках полевки. Большинство исследованных генов транскрибируется в толстом кишечнике, что, возможно, связано с интенсивным делением клеток эпителия кишечника и наличием в нем региональных стволовых клеток. Экспрессия гена *Oct4* обнаружена только в эмбрионах, а также гонадах взрослых особей, что согласуется с его ролью в поддержании плюрипотентных клеток.

Автор выражает признательность старшему научному сотруднику, к.б.н. А.И. Шевченко за помощь в подготовке тезисов

Точная локализация гена *Crt* гороха посевного с помощью ген – специфичных молекулярных маркеров

Титов В.С., Кузнецова Е.В., Жуков В.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. (Санкт-Петербург, tit1106@rambler.ru)

В ходе мутационного анализа был обнаружен ген *Crt* гороха посевного (*Pisum sativum*), который участвует в контроле морфогенеза корня и в мутантном состоянии приводит к формированию компактной корневой системы при развитии растения в субстрате высокой плотности (земля и песок). Так как этот ген был идентифицирован путём химического мутационного анализа, для выявления его первичной последовательности требуется точное картирование относительно молекулярных маркеров с последующим позиционным клонированием.

Для точной локализации гена *Crt* были использованы ген-специфичные молекулярные маркеры, применение которых позволяет провести сравнение полученной карты региона локализации гена *Crt* с гомологичным регионом физической карты модельного растения-люцерны (*Medicago truncatula*). При анализе наследования маркеров использовался метод CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence). На выборке F2(SGECrt × 1238) было проанализировано наследование мутантного фенотипа *crt* и ген – специфичных молекулярных маркеров RPL24, Eno1, Paal2, на основании чего ген *Crt* был локализован на верхней части V группы сцепления гороха посевного.

Полученные данные позволили сопоставить построенную карту V группы сцепления гороха с физической картой генома люцерны. Используя синтению геномов бобовых растений, нами был выявлен вероятный регион локализации гомологичного гена у люцерны и обнаружены 2 гена – кандидата на роль *Crt*. В будущем планируется создание молекулярных маркеров на основе генов люцерны для проверки на абсолютное сцепление *Crt* с генами-кандидатами.

Исследование поддержано грантом Президента России (НШ-9644.2006.4), грантами РФФИ (07-04-01171, 07-04-01558).

Разнообразие генофонда хакасов по данным маркеров Y-хромосомы

Хамина К.В. (Томск, chamina@sibmail.com)

Охарактеризована структура генофонда хакасов по составу и частотам гаплогрупп Y-хромосомы, определяемых на основании генотипирования 52 SNP и 17 YSTR-маркеров (DYS: 385a, 385b, 388, 389I, 389II, 390, 391, 392, 393, 394(19), 426, 434, 435, 436, 437, 438, 439). Охарактеризовано 8 популяционных выборок хакасов (N=254) из Аскизского, Таштыпского и Ширинского районов Республики Хакасия.

Наиболее частыми гаплогруппами у хакасов являются N1b(N2), N1c1(N3a), R1a1 и Q. Линии R1b1xM269, C3xM77, N* и O3 представлены единичными образцами. Лишь три гаплогруппы обнаружены во всех группах выборок (N1b, N1c1, и R1a1), при этом их частоты в разных группах значительно отличаются. Оценка межпопуляционных различий с помощью точного теста популяционной дифференциации по частотам гаплогрупп и YSTR-гаплотипов выявила достоверные отличия между парами популяционных выборок из разных районов и отсутствие различий между выборками из одного района. Наиболее частой гаплогруппой у хакасов является N1b, составляющая в выборках Ширинского района более 85%. Максимальная доля гаплогруппы N1c1 представлена в Таштыпском районе (до 30%), R1a1 – в Аскизском (36%). На долю гаплогруппы Q* приходится 30% всех образцов в Таштыпском районе. Проведенный анализ выявил сильную неоднородность изученных популяций по степени генетического разнообразия. Максимальное разнообразие по частотам гаплогрупп показано для выборок Таштыпского района (H=0,75), минимальное – для Ширинского (H=0,32). Результаты факторного и кластерного анализа гаплогрупп и YSTR-гаплотипов

показывают, что наиболее генетически близкими друг другу являются выборки, относящиеся к одному району, при этом наиболее удалены от всех остальных выборки Таштыпского района (несмотря на их географическую близость к Аскизскому району и удаленность от Ширинского). Оценку генетической дифференциации исследованных выборок производили с помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA). При анализе частот гаплогрупп доля различий между популяциями составила 20,25%. Результаты проведенного дисперсионного анализа выявляют очень значительную долю межпопуляционных различий в общей вариабельности хакасского генофонда и свидетельствуют о значительной генетической дифференциации коренного населения Хакасии. В гаплогруппе N1b выявлено пониженное разнообразие и “звездообразная” филогения медианной сети гаплотипов, свидетельствующие о сильном локальном эффекте основателя по этой линии у хакасов. На основании матриц генетических различий по YSTR-гаплотипам в пределах основных гаплогрупп построены филогенетические деревья различных популяций Южной Сибири.

Работа получила финансовую поддержку РФФИ (06-04-48274, В.С.) и гранта Президента Российской Федерации (МК-3362.2008.4, В.Х.). Научный руководитель – канд. биол. наук В.Н. Харьков

Роль генов *HSM3* и *HSM6* в спонтанном и индуцированном мутагенезе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Черненко А.Ю. (Санкт-Петербург, an-cher@mail.ru)

В лаборатории генетики эукариот ПИЯФ РАН была получена линия мутантов *hsm*, выделенных по повышенной частоте спонтанного мутагенеза. Объектами изучения в данной работе являются мутанты по генам *HSM3* и *HSM6*. Ген *HSM3* картирован. Показано, что мутация в данном гене блокирует минорный путь коррекции ошибочно спаренных оснований. Ген *HSM6* также картирован, и долгое время считалось, что он является аллелем гена *POL12*, однако последние полученные нами данные позволяют предположить, что это не так.

Была проведена огромная работа по изучению взаимодействия мутантов *hsm3* и *hsm6* с мутантами по другим репарационным системам. В частности, для мутанта *hsm3* установлено и исследовано порядка 80 взаимодействий. На данный момент последним этапом было исследование взаимодействия мутаций *hsm3* и *hsm6* с мутантами рекомбинационной системы репарации, а также изучение взаимодействия данных мутаций между собой. Проводился учет выживаемости и частоты мутаций УФ-индуцированного мутагенеза, а также учет частоты спонтанных мутаций канаванин-устойчивости. Данные, полученные в экспериментах на двойных мутантах *hsm3rad51* и *hsm3rad59*, позволили определить место гена *HSM3* на *RAD51*-зависимом пути репарации.

Показана гиперчувствительность двойного мутанта *hsm6rad54* к действию УФ, а также высочайший уровень УФ-индуцированного мутагенеза на временах экспозиции всего 3, 5 и 10 секунд, в то время как стандартные времена экспозиции облучения для других штаммов составляют 30, 60 и 90 секунд, в том числе и для одиночных мутантов *hsm6* и *rad54*. Для двойного мутанта *hsm3rad54* таких эффектов не выявлено. Также в процессе изучения взаимодействия мутаций *hsm3* и *hsm6* с мутантом *rad52* было установлено, что в группе генов, контролирующей путь рекомбинационной репарации, первым является ген *XRS2*, а не ген *RAD52*, как считалось ранее. Опыты по изучению спонтанных мутаций канаванин-устойчивости для мутанта *hsm3* и мутанта *hsm3* с плазмидой, несущей доминантный ген *HSM3* с измененным 5'-концом, показали, что мутант *hsm3*[*HSM3*] обладает еще более повышенной частотой спонтанного мутагенеза, чем родительский штамм *hsm3*. Это позволяет предположить, что на С-конце белка *HSM3* локализован домен, контролирующий спонтанный мутагенез.

В дальнейшем планируется исследовать спонтанный мутагенез канаванин-устойчивости для мутантов *hsm6* и *hsm3hsm6*. Следующим же шагом будет переход от генетического анализа к выявлению межмолекулярных взаимодействий и к установлению структуры продуктов генов *HSM3* и *HSM6*, а также изучение участия генов *HSM3* и *HSM6* (и их продуктов) в коррекции искусственных гетеродуплексов ДНК.