

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАН**

УТВЕРЖДАЮ

Председатель СПбНЦ РАН  
Академик Ж.И. Алферов



**ОТЧЕТ**

по Государственному заданию СПбНЦ РАН в 2014–2016 гг.

по теме № 79:

**«Дивергенция генетического материала в  
эволюции филогенетических ветвей эукариот»**

Научный руководитель проекта

академик РАН Инге-Вечтомов С.Г.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname, positioned above a horizontal line.

Санкт-Петербург

2014

## Список исполнителей

Г.А. Журавлева– профессор, д.б.н., СПбГУ, зав. лаб.

Л.А.Джапаридзе – с.н.с., кбн, СПбНЦ РАН

Н.И. Абрамсон, зав.лаборатории молекулярной систематики, к.б.н, ЗИН РАН

В.Г. Кузнецова, гл.н.с., зав. отд. кариосистематики, дбн, проф., ЗИН РАН

С.Е. Москаленко– с.н.с., к.б.н, СПбГУ.

О.М. Землянко– м.н.с., СПбГУ

Н.А. Петрова, вед. научн. сотр., дбн, старший научн. сотр., ЗИН РАН

В.А. Лухтанов, вед. научн. сотр., дбн, доцент, ЗИН РАН

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ, СОДЕРЖАНИЕ ..... | 1  |
| РЕФЕРАТ .....                         | 3  |
| ВВЕДЕНИЕ .....                        | 5  |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ I .....                | 6  |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ II .....               | 10 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ III .....              | 12 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....                       | 14 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 15 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ .....                      | 19 |



## Реферат

Объем отчета: 29 стр. , иллюстраций - 10, таблиц - 1, приложений - 1, количество частей отчета -8, количество использованных источников – 56.

**Ключевые слова:** Кариотип, цитогенетика, кариосистематика, FISH, теломерные последовательности, рибосомные гены, агрегация белков, амилоиды, прионы, терминация трансляции, молекулярная филогения, систематика, митохондриальная ДНК, ядерная ДНК, молекулярные маркеры, филогеография

**Модельные объекты исследования** - паразитические простейшие, грызуны из подсемейства полевочьих, были представители 9 отрядов насекомых: Mantophasmatodea (мантофазматиды) Psocoptera (сеноеды), Mallophaga (пухоеды), Anoplura (пухоеды), Homoptera (цикадовые, кокциды и псиллиды), Heteroptera (клопы и пелоридииды), Lepidoptera (бабочки), Neuropteran (муравьиные львы и аскалафы), Hymenoptera (перепончатокрылые) и Diptera (хируномиды), а также дрожжи-сахаромицеты.

**Основная цель проекта** - характеристика различных типов изменений генетического материала на нескольких уровнях: геномном, хромосомном и геномном с использованием различных таксономических групп организмов, претерпевших эволюционную дивергенцию в разные периоды эволюции.

**Основные задачи** исследования заключались в том, чтобы охарактеризовать: (1) макро- и микроэволюционные преобразования генетического материала на разных иерархических уровнях; (2) дивергенцию генома за счет хромосомных перестроек различного типа и полиплоидизации генетического материала; (3) эволюцию пространственной организации белковых молекул.

### **Методология проведения работы:**

Использовали методы классической цитогенетики (разные типы хромосомного бэндинга), методы молекулярной цитогенетики (FISH и GISH), молекулярно-генетические методы (анализ последовательностей митохондриальных и ядерных генов), методы молекулярной филогенетики и филогеографии.

### **Результаты работы:**

В результате выполнения проекта было показано, что: (1) в юго-восточном Забайкалье обитает два криптических вида узкочерепных полевок; (2) норвежский лемминг пережил максимум последнего оледенения в локальном рефугиуме в Скандинавии; (3) у пресноводных рыб распространены смешанные инвазии разными видами трипаносом; (4)



паразитические перепончатокрылые утратили теломерную последовательность (TTAGG)<sub>n</sub>, сохранившуюся в большинстве отрядов насекомых, в том числе у жалящих Hymenoptera; (5) энигматический подотряд Coleorrhyncha (Hemiptera) характеризуется голокинетическими хромосомами и по комплексу цитогенетических особенностей близок к полужесткокрылым насекомым (Heteroptera); (6) вид бабочек *Agrodiaetus peilei* является гибридным и возник в результате гибридизации между близкими видами *A. karindus* и *A. morgani*; (7) двойные замены соседних полярных незаряженных аминокислотных остатков на заряженные в одном из пяти олигопептидных повторов N-домена Sup35p оказывают влияние на структуру прионных агрегатов Sup35p.

Результаты проведенных исследований могут быть использованы при разработке курсов лекции по эволюционной биологии, молекулярной генетике, зоологии позвоночных и беспозвоночных, зоогеографии в ВУЗах и при разработке природоохранных мероприятий. Полученные данные вносят вклад в изучение и сохранение биоразнообразия. Молекулярные и цитогенетические методы дают возможность анализировать дополнительные фенотипические признаки и являются мощным инструментом таксономии и филогенетики. Цитогенетические методы, с помощью которых выявляются хромосомные и геномные перестройки, используются также для мониторинга состояния природных популяций насекомых в условиях антропогенного воздействия.



## Введение

*Актуальность.* Современные подходы к мониторингу и сохранению биоразнообразия с неизбежностью требуют объединения традиционных направлений, накопивших огромный опыт отражения разнообразия классическими методами, с бурно развивающимися подходами к описанию биоразнообразия с помощью молекулярных маркеров. Сегодня без применения последних уже практически невозможно представить дальнейшее развитие таких областей знания как систематика, популяционная экология, филогенетика. Изучение биологического разнообразия является фундаментальной научной проблемой, решение которой реализуется в рамках комплекса таксономических, морфологических, цитогенетических и молекулярно-генетических исследований и обеспечивает прогресс по всему спектру биологических наук. Особую актуальность имеет изучение таксономического разнообразия насекомых как самого многочисленного и доминирующего во всех наземных экосистемах класса животного мира, в настоящее время насчитывающего уже до полутора миллионов видов, относящихся к 30 различным отрядам. В настоящее время, наряду с традиционными методами и подходами к изучению биоразнообразия, систематики, эволюции и филогении насекомых активно ведется работа по внедрению методов классической цитогенетики и современных методов молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического анализа. Показано, что молекулярные и цитогенетические методы поставляют новые признаки и являются мощным инструментом таксономии и филогенетики. Цитогенетические методы, с помощью которых выявляются хромосомные и геномные перестройки, используются также для мониторинга состояния природных популяций насекомых в условиях антропогенного воздействия.

*Новизна.* Новизна исследований заключается, прежде всего, 1) в уточнении филогении и на основе этого пересмотра системы в ряде таксонов, 2) в создании новой уникальной коллекции тканей и ДНК, связанной с основной фондовой коллекцией ЗИН РАН и рядом других фондовых хранилищ и 3) в принципиально новом подходе к выбору молекулярного маркера, адекватному таксономическому уровню группы, биоразнообразию и филогении которой исследуется. Последний подход остается практически не разработанным в мировой литературе, посвященной данному направлению исследований.



## Основная часть

### I. Макро- и микроэволюционные преобразования генетического материала на разных иерархических уровнях.

#### (1) Разнообразие и филогения простейших.

Объединение классических методов таксономических исследований и сбора материала для молекулярно-генетического анализа и мониторинга биоразнообразия, можно считать главным направлением в разработке стратегии сохранения биоразнообразия как в настоящее время, так и в долгосрочной перспективе. Сегодня уже невозможно представить дальнейшее развитие таких дисциплин как систематика и филогенетика, экология и популяционная биология без применения молекулярных методов. Однако, широкое увлечение молекулярными методами привело к смещению оценок и часто однобокой трактовке полученных результатов. Сегодня как никогда важно учесть накопленный классическими дисциплинами опыт и применить сбалансированный подход с учетом данных новейших методик.

##### 1. Биоразнообразие трипаносоматид

Результаты исследования трипаносом, обитающих в крови 8 видов пресноводных рыб из бассейна Днепра показали что разнообразие этих паразитов больше, чем это представлялось ранее (нами были обнаружены 14 форм, различающихся по последовательностям гена 18S рРНК от 0.16 до 10.83 %). Кроме того, мы **впервые продемонстрировали** наличие в природных популяциях рыб смешанных трипаносомных инвазий.

##### 1.1. Ревизия рода *Wallaceina*.

Проведена ревизия рода *Wallaceina*. Данный род был описан в пору, когда систематика семейства трипаносоматид была наиболее запутанной, а в основе выделения таксонов лежал классический подход, основанный на описании морфотипов. Род *Wallaceina* был выделен на основе присутствия уникального варианта строения эндомастигот. Наши молекулярно-генетические исследования показали, что все четыре описанные вида *Wallaceina* оказались очень близки между собой и к другим еще не описанным изолятам и находятся внутри клады *Leishmaniinae*, в то время как недавно описанные виды формируют самостоятельную кладу. Наши результаты морфологического и молекулярного-филогенетического анализа четко продемонстрировали что все валласейны, которые кластеризуются с лейшманиями являются разными изолятами одного и того же вида, который мы относим к *Crithidia brevicula* Frolov, Malysheva, 1989



Для *Wallaceina* spp. филогенетически отстоящих от рода *Crithidia*, мы предлагаем новое родовое название *Wallacemonas* Kostygov et Yurchenko, 2014 (Рис.1-2, Табл.1)

**Таблица 1. Культуры трипаносоматид, использованные в работе.**

| Изолят | Все известные названия таксона  | Хозяин                            | Место и год выделения      |
|--------|---|-----------------------------------|----------------------------|
| KV-1   | <i>Blastocrithidia gerricola</i> *  | <i>Gerris lacustris</i>           | Калининградская обл., 1981 |
| BM-33  | <i>Blastocrithidia miridarum</i>  | <i>Leptopterna dolabrata</i>      | Псковская обл., 1985       |
| CL8    | * <i>Leptomonas</i> sp.   | <i>Nabis limbatus</i>             | Ленинградская обл., 1984   |
| F2     | <i>Leptomonas</i> sp.   | <i>Nabis flavomarginatus</i>      | Сев. Карелия, 1986         |
| F5     | <i>Leptomonas</i> sp.   | <i>Nabis flavomarginatus</i>      | Сев. Карелия, 1986         |
| F6     | <i>Leptomonas</i> sp.   | <i>Nabis flavomarginatus</i>      | Сев. Карелия, 1986         |
| F7     | <i>Leptomonas</i> sp.   | <i>Nabis flavomarginatus</i>      | Сев. Карелия, 1986         |
| F8     | <i>Leptomonas</i> sp.   | <i>Nabis flavomarginatus</i>      | Сев. Карелия, 1986         |
| Nbr    | <i>Wallaceina brevicula</i> +<br><i>Crithidia brevicula</i><br><i>Crithidia allae</i><br><i>Proteomonas brevicula</i><br><i>Proteomonas allae</i> | <i>Nabis brevis</i>               | Псковская обл., 1986       |
| ZK     | <i>Wallaceina inconstans</i> +<br><i>Proteomonas inconstans</i>   | <i>Calocoris sexguttatus</i>      | Псковская обл., 1986       |
| 101    | <i>Wallaceina podlipaevi</i> +<br><i>Leptomonas peterhoffi</i> *  | <i>Nabis flavomarginatus</i>      | Ленинградская обл., 1980   |
| Wg     | <i>Wallaceina vicina</i> +  | <i>Limnoporus rufoscutellatus</i> | Ленинградская обл., 2000   |



## 1.2. Исследование биоразнообразия симбионт-содержащих трипаносоматид.

По сравнению с близкородственными таксонами, разнообразие эндосимбионт-содержащих трипаносоматид остается недостаточно изученным, только 2 новых вида было описано за прошедшие 25 лет и к настоящему времени и число известных видов достигло 6. Причины такой плохой представленности группы, возможно, кроются либо в их редкости, либо в восприимчивости их симбионтов к антибиотикам, которые традиционно используются для культивации флагеллят. Мы описали выделение, культивирование, привели морфологические и молекулярные характеристики нового эндосимбионт-содержащего вида, *Kentomonas sorsogonicus* sp. n. Новый, выделенный нами род *Kentomonas* gen., имеет много сходных черт с родами *Angomonas* и *Strigomonas*, такие как присутствие обширной системы периферийных митохондриальных ветвей, нарушающих корсет субпеликулярных микротрубочек, большой и свободно уложенный кинетопласт. Наши результаты также позволяют объединить всех эндосимбионт-содержащих трипаносоматид в новое подсемейство *Strigomonadinae* subfam. n (**Рис.3**)  
Подробнее опубликовано в Votynka et al., 2014.

## (2). Анализ биоразнообразия и филогенетических связей в подсемействе полеvoчьих (*Arvicolinae*, *Cricetidae*, *Rodentia*).

### 2.1. Исследования криптического видообразования

Результаты широкомасштабного исследования филогеографии узкочерепной полевки (*Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis*) на основе анализа изменчивости митохондриального гена цитохром б в изолированных популяциях, позволили нам выдвинуть гипотезу о существовании на юго-востоке Забайкальского края криптического вида. Мы проанализировали изменчивость вышеуказанного гена у 164 экземпляров из 50 местонахождений по всему ареалу (**Рис. 4**)

Полученные филогеографический паттерн четко показывает разделение на 4 основных митохондриальных клады с дальнейшим подразделением (**Рис. 5**).

Уровень генетической дифференциации между кладами оказался необычайно высоким даже для видового уровня: 6-11%. Самый поразительный результат данного исследования – в обнаружении невероятно высокой скорости мутирования цитохром б у данного вида. Наши оценки показывают, что скорость мутирования составляет  $3.19 \cdot 10^{-5}$ , что на порядок величин больше известных значений для видов рода *Microtus*. Оценка времени дивергенции базальной дифференцировки внутри вида приходится на период 0.8 Муа. Эта оценка совпадает с известной палеонтологической летописью. Наибольшее генетическое разнообразие обнаружено в южной Сибири, где представлены все 4



митохондриальных клады, при этом 3 из них распространены исключительно на этой территории. Пространственный характер генетической изменчивости в популяциях узкочерепной полевки внутри самой большой митохондриальной клады указывает на нормальную или ступенчатую модель распространения на север и юго-запад из Алтайского региона в среднем плейстоцене. И палеонтологические данные и генетическая изменчивость в современных популяциях говорит в пользу того, что вид был чрезвычайно многочислен на большем протяжении плейстоцена и мы предполагаем, что увлажнение климата и широкое наступление лесов на границе плейстоцен-голоцена способствовало сокращению численности вида и фрагментации ареала этого типичного представителя тундро-степной фауны. Но несмотря на это, мы до сих пор наблюдаем высокое генетическое разнообразие в изолированных фрагментах бывшего ареала. Наибольшая генетическая дивергенция (11%) и самое раннее ответвление от общего ствола отмечено для линии из юго-восточного Забайкалья. Этот факт дал нам основание предполагать, что эта клада возможно, представляет собой криптический вид (Petrova et al., 2014). Для проверки данной гипотезы был проведен мультилокусный анализ ядерных генов у образцов из всех ранее выделенных внутривидовых митохондриальных генетических линий. Кроме того, были проведены морфологический и гибридологический анализы, а также выделена ДНК и получены сиквенсы цитохром *b* из образцов типовой серии (голотип и паратипы) узкочерепной полевки Радде, описанной Бихнером из юго-восточного Забайкалья в 1881 г, позднее сведенной в синонимы. Для этого нами были разработаны специальные праймеры для амплификации коротких перекрывающихся фрагментов цитохрома *b* общей длиной в 1010 пн (Рис.6).

Анализ всего комплекса данных однозначно подтвердил нашу гипотезу и позволил снова закрепить видовой статус за узкочерепной полевкой Радде (*Lasiopodomys raddei*). **Таким образом**, было окончательно установлено, что в юго-восточном Забайкалье обитает два слабо различимых морфологически, но очень сильно дивергировавших генетически, вида узкочерепных полевок. Кроме того, было установлено, что плейстоцен был наиболее благоприятным периодом для существования узкочерепных полевок, а с начала потепления климата в голоцене и по настоящее время продолжается сокращение и фрагментация ареала вида и в данном случае мы имеем дело с начальным периодом формирования рефугиумов вида.

## 2.2. Исследование происхождения норвежского лемминга (*Lemmus lemmus*).

.Совместно с зарубежными коллегами из разных стран Западной Европы были исследованы генетически образцы ископаемых остатков настоящих леммингов из местонахождений позднего плейстоцена Западной Европы, центра Русской Равнины и



Северного Урала, все местонахождения находятся намного южнее современного ареала леммингов. Анализ полученных данных показал очень значительные генетические отличия между современным норвежским леммингом и плейстоценовыми леммингами юга и запада Европы и Русской равнины (**Рис. 7**), **таким образом** отвергая гипотезу о постплейстоценовом проникновении норвежского лемминга в Скандинавию. . Полученные данные указывают на то, что норвежский лемминг пережил максимум последнего оледенения в локальном рефугиуме в Скандинавии (по результатам опубликована статья в *Molecular ecology*- Lagerholm et al., 2014)

## **II. Дивергенция генома за счет перестроек и/или полиплоидизации генетического материала.**

Цель работы заключалась в изучении кариотипов и хромосомном картировании рибосомных генов и теломерных последовательностей ДНК у модельных представителей каждого отряда и использовании хромосомных маркеров для разработки системы и изучения эволюции таксонов насекомых разного ранга.

В работе использовали методы классической цитогенетики (разные типы хромосомного бэндинга), методы молекулярной цитогенетики (FISH и GISH) и методы молекулярной филогенетики (анализ последовательностей митохондриальных и ядерных генов).

За отчетный период изучены кариотипы 54 видов насекомых из перечисленных выше отрядов, представляющих три крупных подразделения класса Insecta – Polyneoptera (мантофазматиды), Paraneoptera (сеноеды, пухоеды, вши, цикадовые, псиллиды, кокциды, клопы и пелоридииды) и Oligoneoptera (муравьиные львы, аскалафы, бабочки, хирономиды и и перепончатокрылые). Хромосомы недавно описанного отряда Mantophasmatodea (мантофазматиды) и энigmatического подотряда Coleorrhyncha (пелоридиид) описаны впервые. Показано, что по цитогенетическим особенностям мантофазматиды близки к ортоптероидному комплексу семейства (Orthopteroidea), а колеоринхи – к отряду Heteroptera (полужесткокрылые насекомые). У цикадовых получены первые данные для семейства Myerslopiidae, которое по признакам кариотипа сближаются с цикаделлоидами (Cicadelloidea). Разработаны и опубликованы в виде коллективной монографии протоколы FISH (**Рис.8**), которые были успешно использованы для изучения молекулярной структуры теломер и картирования рибосомных генов на хромосомах модельных представителей каждого отряда. Показано, что представители трех основных филогенетических ветвей паразитических перепончатокрылых (Ichneumonoidea, Chalcidoidea и Cynipoidea) утратили теломерный повтор TTAGG,



характерный для большинства изученных до настоящего времени перепончатокрылых и рассматриваемый как анцестральный для насекомых и для членистоногих животных в целом (Рис.9). У чешуекрылых, с использованием методов филогеографии и цитогенетики изучена эволюционная история голубянки *Agrodiaetus ripartii* (Lycaenidae) в Центральной Европе. Показана роль Балканского рефугиума как центра, из которого в послеледниковое время происходило расселение бабочек. Опровергнута гипотеза об антропогенном происхождении современных популяций *A. ripartii* Восточной Европы. Проведен молекулярно-филогенетический анализ бабочек-толстоголовок рода *Spialia*. Получены новые данные по кариотипам семейств Lycaenidae, Pieridae и подсемейства Ithomiinae (Nymphalidae). У сеноедов проводилась цитогенетическая обработка сборов из Башкортостана, а у пухоедов – из Московской области. У хирономид *Chironomus riparius* и *Ch. piger* из армянской популяции выявлены межвидовые гибриды. Показано, что в результате возвратных скрещиваний хромосомы первого вида замещаются хромосомами второго вида, при этом у гибридов второго поколения третья пара хромосома унаследована от *Ch. riparius*, а 7 других хромосом – от *Ch. piger*.

Основное направление исследований - изучение сравнительной цитогенетики насекомых, представляющих почти все крупные подразделения класса Insecta. Нами впервые разработаны и опубликованы в виде коллективной монографии [1] оригинальные протоколы флюоресцентной гибридизации ДНК *in situ* (метод FISH) для картирования на хромосомах рибосомных генов и теломерных последовательностей ДНК. Проведено физическое (хромосомное) картирование геномов у представителей всех основных отрядов насекомых. Для большинства групп такие данные получены впервые. Впервые для насекомых адаптирован метод геномной гибридизации ДНК (GISH), позволяющий выявлять случаи межвидовой гибридизации в природе. По молекулярным данным построены филогении нескольких таксонов чешуекрылых, равнокрылых и полужесткокрылых насекомых.

Особое внимание в исследованиях уделяется изучению молекулярной структуры теломер в хромосомах насекомых. Теломеры – это терминальные участки хромосом, защищающие хромосомы от разрушения и обеспечивающие стабильность их структуры. ДНК теломерных районов образована короткими мотивами (сочетаниями) нуклеотидов, которые повторяются тысячи и миллионы раз. Сравнительное изучение этих мотивов в разных группах организмов показало, что они эволюционно стабильны и, появившись однажды в эволюции, маркируют таксоны и филогенетические ветви высокого ранга. У животных известно три основных типа коротких теломерных повторов: TTAGGG, TTAGGC и TTAGG. Первоначально считалось, что повтор TTAGG имеется у всех



членистоногих. Однако более детальные исследования показали, что его нет у некоторых ракообразных и некоторых пауков, а у насекомых он преобладает, но в отдельных группах не выявляется [2, 3]. У насекомых с неполным превращением из группы отрядов Paraneoptera (Psocoptera, Phthiraptera, Thysanoptera, Hemiptera), являющихся объектами нашего изучения, преобладающим и вероятно исходным является мотив TTAGG [2]. Среди Hemiptera у цикадовых (подотряд Auchenorrhyncha) обнаружен мотив TTAGG [1-3], в то время как у клопов (подотряд Heteroptera) он характеризует только базальные таксоны, в то время как в эволюционно продвинутых ветвях мотив другой, хотя его точная структура пока не выявлена [4]. В связи с этим интересно изучить организацию теломер в энigmatическом отряде Zoraptera и в подотряде Coleorrhyncha («живые ископаемые»), родственные связи которого не ясны. Такие исследования были начаты в рамках настоящего проекта [5].

### III. Эволюция пространственной организации белковых молекул.

**Анализ прионизации фактора терминации трансляции eRF3 с использованием модельного объекта дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.** На предыдущих этапах проекта мы использовали ген *GSPT2*, кодирующий фактор терминации трансляции 2 класса у млекопитающих, для изучения базальной радиации мышевидных грызунов и филогенетических связей в подсемействе полевоочьих. У дрожжей *S. cerevisiae* фактор терминации трансляции eRF3, кодируемый геном *SUP35*, гомологом *mGSPT2*, способен переходить в прионную форму, называемую  $[PSI^+]$ , и за это превращение отвечает N-концевой домен белка. Механизм передачи прионов от одного организма к другому заключается в их способности индуцировать конформационные изменения определенных клеточных полипептидов. При переходе в прионную конформацию Sup35p образует в клетке фибриллярные агрегаты, это приводит к его инактивации. Ранее нами была получена серия мутаций в участке гена *SUP35*, кодирующем N-терминальный домен белка Sup35. Известно, что именно этот участок отвечает за прионизацию Sup35p, или возникновение приона  $[PSI^+]$ . Общепринятой моделью укладки прионной формы белка является модель суперскладчатой  $\beta$ -структуры. Согласно этой модели,  $\beta$ -слои отдельных мономеров ориентированы перпендикулярно оси фибриллы. Молекулы при этом располагаются «в регистре», т.е. ровно друг под другом. Стабилизация всей структуры осуществляется за счет водородных связей между аминокислотными остатками. С помощью экспериментов *in silico* были предсказаны положения мутаций в гене *SUP35*,



которые должны нарушать укладку амилоида и приводить к нарушению прионизации. Ранее с помощью сайт-специфического мутагенеза мы получили и проанализировали эффект следующих мутаций: *sup35-M1* YQ(46-47)KK; *sup35-M2* QQ(61-62)KK; *sup35-M3* QQ(70-71)KK; *sup35-M4* QQ(80-81)KK; *sup35-M5* QQ(89-90)KK) [6]. В ходе выполнения проекта в текущем году мы охарактеризовали фибриллы, образованные мутантными белками *in vitro*. Для этой цели была сконструирована серия плазмид на основе pET21b-SUP35NM. Эти плазмиды были предназначены для сверхэкспрессии NM домена Sup35p или его мутантных вариантов в клетках *E. coli*. Согласно полученным нами данным, все мутантные белки Sup35NMp не отличаются по скорости формирования агрегатов. Исключением является только Sup35NM-M5p, агрегаты которого появлялись значительно медленнее по сравнению с другими Sup35NMp (**Рис. 10А**). Все мутантные белки формировали SDS-устойчивые агрегаты. Для проверки того, что эти агрегаты являются фибриллярными, мы использовали просвечивающую электронную микроскопию. Анализ препаратов осуществляли с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM Jeol-2100 на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Во всех случаях нам удалось обнаружить фибриллы, образованные Sup35NMp (**Рис. 10Б**). Результаты сравнения фибрилл, образованных мутантными белками, по ширине продемонстрировали, что все агрегаты достоверно шире по сравнению с контрольным вариантом (белок дикого типа) (**Рис. 10В**). Это доказывает, что исследуемые мутации действительно оказывают влияние на структуру агрегатов Sup35p. Поскольку процесс агрегации белка *in vitro* ничем не ограничивается, длина фибрилл теоретически должна определяться преимущественно скоростью присоединения к ней новых молекул белка, и, в меньшей степени, интенсивностью появления затравок (спонтанно формирующихся небольших агрегатов). При очень высокой эффективности образования этих затравок средняя длина фибриллы может оказаться ниже при одинаковых скоростях агрегации белка. Согласно полученным нами результатам, фибриллы Sup35NM-M1p и Sup35NM-M2p короче по сравнению с Sup35NMp, в тоже время белок Sup35NM-M4p образует более длинные агрегаты (**Рис. 10Г**).



## Заключение

Поставленные задачи выполнены в полном объеме. Полученные данные оригинальны, отличаются новизной и получены с использованием современных методов и технологий цитогенетического и молекулярного анализа. Данные опубликованы в рецензируемых журналах, в основном, англоязычных и индексируемых в Web of Science и Scopus.

### Основные результаты:

1) у пресноводных рыб распространены смешанные инвазии разными видами трипаносом, балантидиумы из лягушек представляют собой монофилетическую группу, а три рода симбионт-содержащих трипаносоматид имеют общее происхождение и обладают рядом морфологических синапоморфий.

2) обнаружено и подтверждено существование криптических видов узкочерепных полевок на юге-востоке Забайкальского края.

3) отвергнута гипотеза о постплейстоценовом проникновении норвежского лемминга в Скандинавию с юга Европы и Русской Равниныю. Полученные данные указывают на то, что норвежский лемминг пережил максимум последнего оледенения в локальном рефугиуме в Скандинавии.

4) разработаны и опубликованы в виде коллективной монографии (приложение) протоколы FISH для картирования геномов полужесткокрылых насекомых.

5) с использованием метода FISH проведено хромосомное картирование рибосомных генов и изучена молекулярная структура теломер у модельных видов мантофазматид, цикадовых, псиллид, клопов, бабочек, муравьиных львов и наездников. Показано впервые, что представители основных филогенетических ветвей паразитических перепончатокрылых (Ichneumonoidea, Chalcidoidea и Cynipoidea) утратили теломерный повтор TTAGG, характерный для большинства изученных до настоящего времени перепончатокрылых и рассматриваемый как анцестральный для насекомых и для членистоногих животных в целом.

6) с использованием методов филогеографии и цитогенетики изучена эволюционная история бабочки-голубянки *Agrodiaetus ripartii* в Центральной Европе. Показана роль Балканского рефугиума как центра, из которого в послеледниковое время происходило расселение бабочек.

7) показано, что двойные замены соседних полярных незаряженных аминокислотных остатков на заряженные в одном из пяти олигопептидных повторов N-домена Sup35p оказывают влияние на структуру прионных агрегатов Sup35p.



## Список литературы:

1. «Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes», 2014, CRC Press, Taylor and Francis Group, 526 p, Ed. I. Sharakhov <http://www.crcpress.com/product/isbn/9781466598164>
2. Frydrychova, R., Grossmann, P., Truba, P., et al. 2004. Phylogenetic Distribution of TTAGG Telomeric Repeats in Insects, *Genome*, 47: 163–178.
3. Лухтанов В. А. и Кузнецова В. Г. 2010. Что гены и хромосомы говорят о происхождении и эволюции насекомых и других членистоногих? *Генетика*. 46(9): 1258–1265
4. Grozeva S., Kuznetsova V.G., Hartung V. 2014. First cytogenetic study of Coleorrhyncha: Meiotic complement of *Xenophyes cascus* (Hemiptera: Peloridiidae). *European Journal of Entomology*. 111(2): 303-306.
5. Kuznetsova VG, Grozeva SM, Anokhin BA. 2012. The first finding of (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric repeat in chromosomes of true bugs (Heteroptera, Belostomatidae). *Comp Cytogenet* 6(4):341–346. doi:10.3897/compcytogen.v6i4.4058/
6. Bondarev S.A., Shchepachev V.V., Kajava A.V., Zhouravleva G.A. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion [PSI<sup>+</sup>] stability and propagation. *J. Biol. Chem.* 2013, 288(40):28503-13.

## Список печатных работ, выполненных при поддержке программы:

### Главы в монографии:

1. Grozeva S., B. A. Anokhin, and V. G. Kuznetsova "Bedbugs (Hemiptera)" pp. 285-386. Глава в книге «Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes», 2014, CRC Press, Taylor and Francis Group, 526 p, Ed. I. Sharakhov.
2. Kuznetsova V. G., A. Maryańska-Nadachowska, and T. Karamysheva. "Spittlebugs (Hemiptera)" pp. 351-380. Глава в книге «Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes», 2014, CRC Press, Taylor and Francis Group, 526 p, Ed. I. Sharakhov.

### Вышедшие статьи:

3. Petrova T., E.S. Zakharov, R. Samiya and N. I. Abramson. Phylogeography of the narrow-headed vole *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Cricetidae, Rodentia) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences: an echo of Pleistocene prosperity. 2014. *J Zoolog Syst Evol Res* doi: 10.1111/jzs.12082
4. Lagerholm V.K., E. Sandoval-Castellanos, D. Ehrich, N. I. Abramson, A. Nadachowski, D. C. Kalthoff, M. Germonpre, A. Angerbjorn, J. R. Stewart and L. Dalen. On the origin of the Norwegian lemming. 2014. *Molecular Ecology* (2014). doi: 10.1111/mec.12698.
5. Chistyakova, L., Kostygov, A., Kornilova, O., Yurchenko, V. Reisolation and redescription of *Balantidium duodeni* Stein, 1867 (Litostomatea, Trichostomatia). *Parasitol. Res.*, 2014, in press. PMID: 25185665. doi:10.1007/s00436-014-4096-1.
6. Votýpka J., Kostygov A. Yu., Kraeva N., Grybchuk-Ieremenko A., Tesařová M., Grybchuk D., Lukeš J., Yurchenko V. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing



- trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. Protist, 2014, in press. DOI: 10.1016/j.protis.2014.09.002/
7. Grozeva S., Kuznetsova V.G., Hartung V. 2014. First cytogenetic study of Coleorrhyncha: Meiotic complement of *Xenophyes cascus* (Hemiptera: Peloridiidae). European Journal of Entomology. 111(2): 303-306. IF 1,076
  8. Gokhman V.E., Anokhin B.A., Kuznetsova V.G. 2014. Distribution of 18S rDNA sites and absence of the canonical TTAGG insect telomeric repeat in parasitoid Hymenoptera. Genetica. 142: 317-322. DOI 10.1007/s10709-014-9776-3. IF 1,746
  9. Golub N.V., Kuznetsova V.G., Rakitov R.A. 2014. First karyotype data on the family Myerslopiidae (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadomorpha). Comparative Cytogenetics 8(4): (в печати) IF 1.211.
  10. Przybyłowicz Ł., Lukhtanov V., Lachowska-Cierlik D. 2014. Towards the understanding of the origin of the Polish remote population of *Polyommatus (Agrodiaetus) ripartii* (Lepidoptera: Lycaenidae) based on karyology and molecular phylogeny. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 52(1): 44-51. (doi: 10.1111/jzs.12040). IF 1,910.
  11. Петрова Н.А., Жиров С.В., Арутюнова К.В., Арутюнова М.В. 2014. О возможности спонтанной межвидовой гибридизации в природе представителей сиблинг-видов *Chironomus riparius* Kieffer и *Chironomus piger* Strenzke из Армении (Diptera, Chironomidae). Цитология. 56(2): 170-174.
  12. Бондарев С. А., Е. Д. Широколобова, Н. П. Трубицина, Г. А. Журавлева. Изменение свойств приона [PSI<sup>+</sup>] при комбинировании аминокислотных замен в N-домене белка Sup35. Молекулярная биология, 2014, том 48, № 2, с. 314-321.
  13. Moskalenko S., Murina O., Askinazi O., Zhuravleva G. A Search for New Factors that Affect Translation Termination. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2014, Vol. 4, No. 2, pp. 131–136 in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
  14. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G., Derkatch I.L. Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. Prion. 2014. V. 8. Issue 3. P. 1-14.

#### Подано в печать:

15. Grybchuk-Ieremenko A., Losev A., Kostygov A., Lukeš J., Yurchenko V. High prevalence of trypanosome co-infections in freshwater fishes. Folia Parasitol., 2014.
16. Palkopoulou E., M. Baca, N. I. Abramson, P. Socha, A. Nadachowski, S. Prost, M. Germonpré, P. Kosintsev, S. Vartanyan, D. Ponomarev, J. Nyström, P. Nikolskiy, C. Jass, Y. Litvinov, D. C. Kalthoff, S. Grigoriev, J. R. Stewart, P. Węgleński, A. Stankovic, L. Dalén. 2015. Palaeogenetic analyses reveal wide-spread Pleistocene range fluctuations in the collared lemming. Biological J. of Linnean Society.
17. Petrova T.V., A.S. Tesakov, Yu.M.Kovalskaya and N.I.Abramson. 2015. Cryptic speciation in the narrow-headed vole *Lasiopodomys gregalis* (Rodentia: Cricetidae) in Transbaikalia: molecular, morphological and behavioral lines of evidence. 2015. Molecular ecology.
18. Михайлова П., Петрова Н.А. Биоиндикация по политенным хромосомам хирономид (Diptera, Chironomidae). Глава в кн. «Биологические методы оценки состояния окружающей среды» изд-во СПбГУ
19. V. Kuznetsova and D. Aguin-Pombo “Comparative cytogenetics of Auchenorrhyncha: a Review” глава в книге “Leafhoppers of the World” Eds. Michael J Webb and John S. Badmin
20. D. Aguin-Pombo, J.A.J. Breeuwer and V. Kuznetsova “Parthenogenesis in Cicadellidae and comparison with Other Auchenorrhyncha” глава в книге “Leafhoppers of the World” Eds. Michael J Webb and John S. Badmin.”
21. Jankowski T., Anokhin B. Phylum Cnidaria. Глава в кн. “Keys to the Palaearctic Fauna”. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, 4th Edition.
22. Kuznetsova V., Maryanska-Nadachowska A., Anokhin B., Aguin-Pombo D. Evidence for TTAGG telomeric repeats and rRNA gene clusters in leafhoppers of the genus *Alebra* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). European J. Entomology
23. Lukhtanov V.A., Shapoval N.A., Anokhin B.A., Kuznetsova V.G. Homoploid hybrid speciation and genome evolution via chromosome sorting. Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences.



24. Lukhtanov V. Chromosome number evolution in skippers (Lepidoptera, Hesperiiidae) of the world fauna. *Comparative Cytogenetics*
25. Жиров С.В., Петрова Н.А. Кариотипы и морфология личинок трех видов хирономид (Diptera, Chironomidae) из водоемов южной части острова Кунашир (Дальний Восток, Россия). *Энтомологическое обозрение*
26. Кармоков М., Белянина С.И., Жиров С.В., Петрова Н.А. Кариотип *Stictochironomus crassiforceps* (Kieffer) (Diptera, Chironomidae) из разных частей Палеарктики. *Энтомологическое обозрение*
27. Михайлова П., Петрова Н.А. Цитологическая изменчивость политенных хромосом хирономид (Diptera, Chironomidae) как биоиндикация загрязнений окружающей среды. *Цитология и генетика*, Киев.
28. Журавлева Г.А. Рождение и смерть генов. *Генетика*. 2015.

#### Тезисы:

29. Petrova T. & N. Abramson. Phylogeography of the narrow-headed vole *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Cricetidae, Rodentia) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *The 14th Rodens et Spatium— Book of abstracts*, 2014, с.60.
30. Bodrov S.. Systematics and phylogeny of the Asian mountain voles, genus *Alticola* (Rodentia, Cricetidae) inferred from multilocus data. *The 14th Rodens et Spatium— Book of abstracts*, 2014, с.62.
31. Abramson N., T. Petrova & S. Bodrov. Cryptic diversity, taxonomic and phylogenetic discrepancies and new distribution borders in vole species highlighted by wide scaled phylogeographic studies in Eastern Palearctic. *The 14th Rodens et Spatium— Book of abstracts*, 2014, с 98.
32. Abramson N.I. Evolutionary history, phylogeny and systematics of voles and lemmings: contribution from molecular data". *Molecular phylogenetics (MolPhy-4)*. P.1
33. Бодров С.Ю.. Филогения рода Скальных полевок по молекулярным данным. Материалы научно-практической школы «Высокопроизводительное секвенирование: получение, анализ данных и их использование в филогенетике». 28 сентября-12 октября 2014г. МГУ, Москва, с. 11-12.
34. Петрова Н.А., Жиров С.В. 2014. Кариология личинок хирономид (Diptera, Chironomidae) о. Кунашир (Курильская гряда). Тезисы докладов. VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014 г. С. 16-17
35. Кузнецова В.Г. Происхождение и роль редких самцов в партеногенетических популяциях псиллид (Homoptera, Psylloidea) северо-восточной Европы: цитогенетический и молекулярный анализ. Тезисы докладов. VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014 г. С. 7-8.
36. Гохман В.Е., В.Г. Кузнецова и Б.А. Анохин. Разнообразие и эволюция хромосомной локализации повторяющихся последовательностей ДНК у паразитических перепончатокрылых (Hymenoptera). Материалы II Международной конференции "Современные проблемы биологической эволюции". 11-14 марта 2014, Москва, с. 67-70.
37. Вершинина А.О., Лухтанов В.А. 2014. Динамика эволюционных преобразований хромосомных чисел бабочек голубянок рода *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae) // Материалы II Международной конференции "Современные проблемы биологической эволюции", Москва, 11-14 марта 2014 г., С. 64
38. Lukhtanov V.A., Shapoval N.A., Anokhin B.A., Kuznetsova V.G. 2014. Homoploid hybrid speciation and genome evolution via chromosome sorting. 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Turku, Finland, August, 11-14, 2014. p. 33
39. Lukhtanov V.A., Novikova A., Zakharov E. 2014. DNA-barcoding survey revealed necessity of taxonomic revision of Israeli butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea). 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Turku, Finland, August, 11-14, 2014. p. 83
40. Dinca V., Backstrom N., Dapporto L., Friberg M., Hornett E., Lukhtanov V.A., Marec F., Olofsson M., Sichova J., Vila R., Wiklund C. 2014. Leptidea Wood White butterflies as an



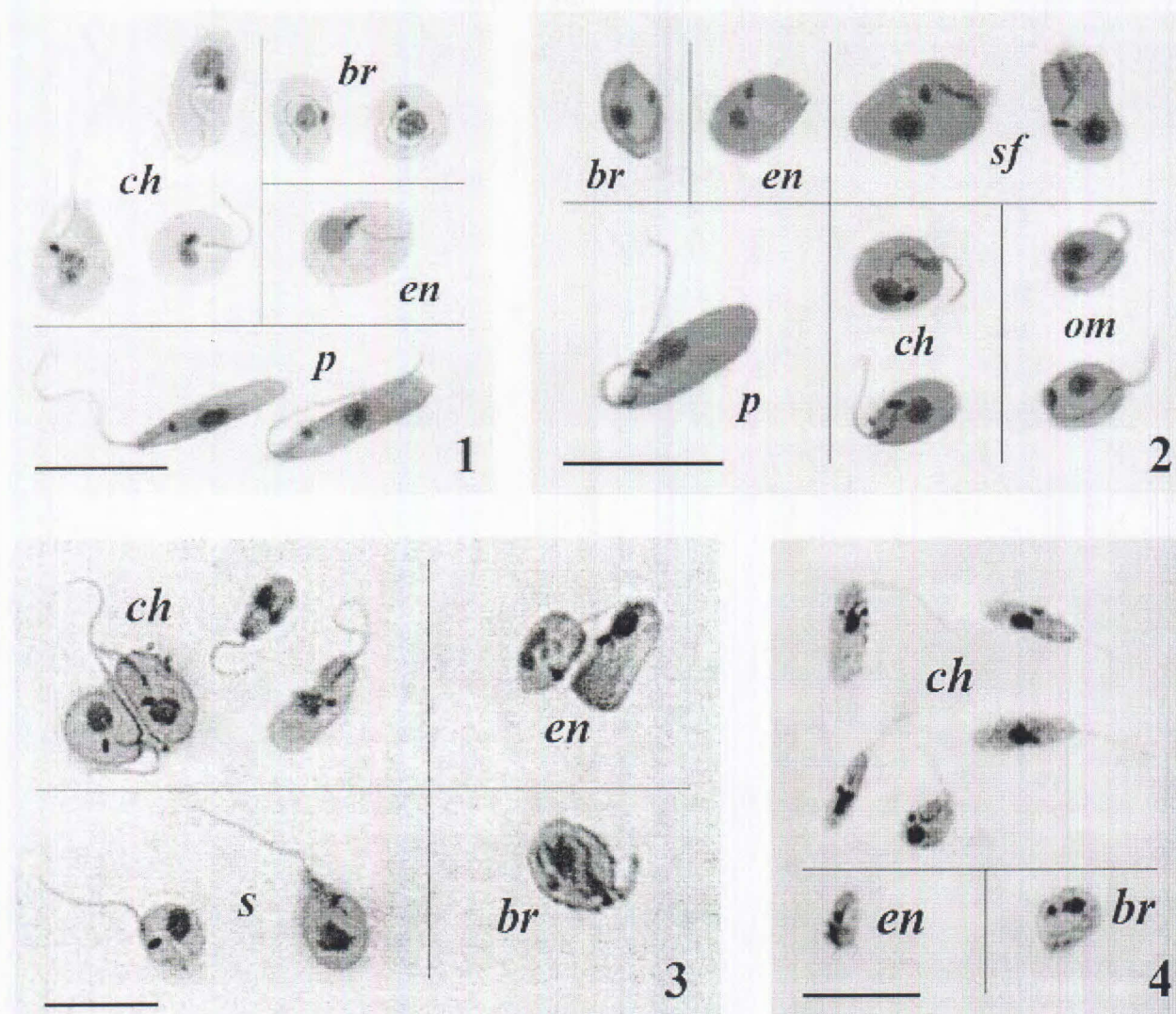
- emerging model to study speciation. 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Turku, Finland, August, 11-14, 2014. p. 30
41. Talavera G., Lukhtanov V.A., Pierce N., Vila R. 2014. Making phylogenetically comprehensible the hyperdiverse Polyommata butterflies. 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Turku, Finland, August, 11-14, 2014. p. 84
  42. Vershinina A.O., Lukhtanov V.A. 2014. Cytogenetic mechanisms and evolutionary dynamics of chromosome number evolution in butterflies (Insecta: Lepidoptera). 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Turku, Finland, August, 11-14, 2014. p. 85
  43. Vishnevskaya M.S., Lukhtanov V.A., Dantchenko A.V., Saifitdinova A.F. 2014. Hidden diversity of Caucasian blues of the *Polyommatus (Agrodiaetus) ripartii* species complex (Lepidoptera, Lycaenidae): Assessing species taxa by chromosomal and molecular data. 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Turku, Finland, August, 11-14, 2014. p. 85
  44. Vershinina A.O., Lukhtanov V.A. 2014. Comparative phylogenetics in studying butterfly chromosome evolution. Modern Phylogenetic Comparative Methods and their Application in Evolutionary Biology, Seville, Spain, November, 11-15, 2014. p. 50
  45. Bondarev S.A., Shirokolobova E.D., Trubitzina N.P., Zhouravleva G.A. Modification of [PSI<sup>+</sup>] prion properties by combining amino acid changes in the N-terminal domain of Sup35 protein. International Prion Congress – Prion 2014. May 27-30, Trieste, Italy. Prion. V.8 suppl. P.34.
  46. Инге-Вечтомов С.Г. От хромосомной теории – к матричному принципу. Тезисы докл. VI съезда ВОГиС. Ростов-на-Дону. 2014. С.28. Журавлева Г.А. Рождение и смерть генов. Тезисы докл. VI съезда ВОГиС. Ростов-на-Дону. 2014. С.4.
  47. Трубицина Н.П., С.А. Бондарев, Г.А. Журавлева Влияние нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на свойства приона [PSI<sup>+</sup>] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Тезисы докл. VI съезда ВОГиС. Ростов-на-Дону. 2014. С.56.
  48. Бондарев С.А., Н.П. Трубицина, Г.А. Журавлева Изменение свойств приона [PSI<sup>+</sup>] с помощью сайт-специфического мутагеназа. Тезисы докл. VI съезда ВОГиС. Ростов-на-Дону. 2014. С.30.
  49. Белоусов М.В., С.А. Бондарев, Г.А. Журавлева. Оптимизация условий разрушения амилоидных фибрилл Sup35NMr ультразвуком. 1 Междисциплинарная конференция «Современные решения для исследования природных, синтетических и биологических материалов», Санкт-Петербург, Россия, 20–22 октября 2014, с.106.
  50. Матвеев А.Г., Г.А. Журавлёва. Использование методов флуоресцентной микроскопии для изучения факторов, влияющих на поддержание прионов дрожжей. 1 Междисциплинарная конференция «Современные решения для исследования природных, синтетических и биологических материалов», Санкт-Петербург, Россия, 20–22 октября 2014, с.112.





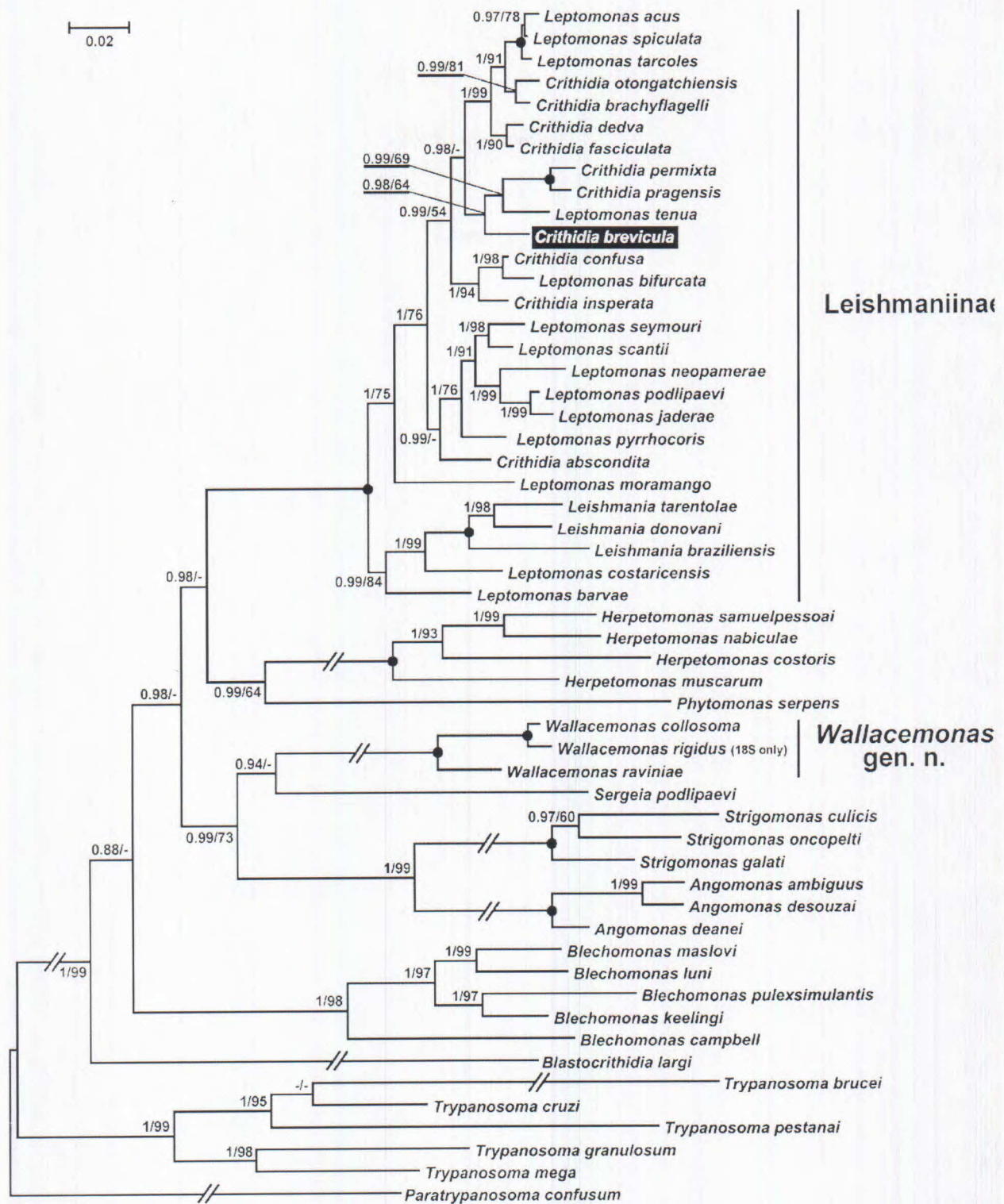


Приложения: рис. 1-10



**Рис.1.** Морфология клеток, выделенных в культуру из изолятов, окраска по Гимза. Изоляты: 1 - "F" серии, 2 - CL8; 3 - KV-1, и 4 - BM-33. *ch* — хоаномасстиготы; *br* — брохомасстиготы; *en* — обычные эндомасстиготы; *p* — промасстиготы; *sf* — клетки с укороченными флагелла; *s* — сферомасстиготы; *om* — опистоморфы. Масштаб 10μm.





**Рис.2.** Филогенетическое дерево исследованных изолятов, построенное методом максимального правдоподобия по конкатенированной матрице генов 18S rRNA + gGAPDH. Длина ветвей пропорциональна количеству замен на сайт. Двойным штрихом перечеркнуты ветви 50% от оригинальной длины. Цифры у ветвей – апостериорные вероятности и поддержки бутстрепа соответственно. V Значения меньше 0.5 и 50% заменены прочерком. Узлы с апостериорной вероятностью 1.0 и 100% поддержкой



бутстрепа помечены черными кружками. Дерево укоренено по *Paratrypanosoma confusum*. Масштаб: количество замен на сайт. Все исследованные изоляты представляют один таксон, *Crithidia brevicula* (выделен жирным шрифтом). Подробнее опубликовано в Kostygov et al., 2014.

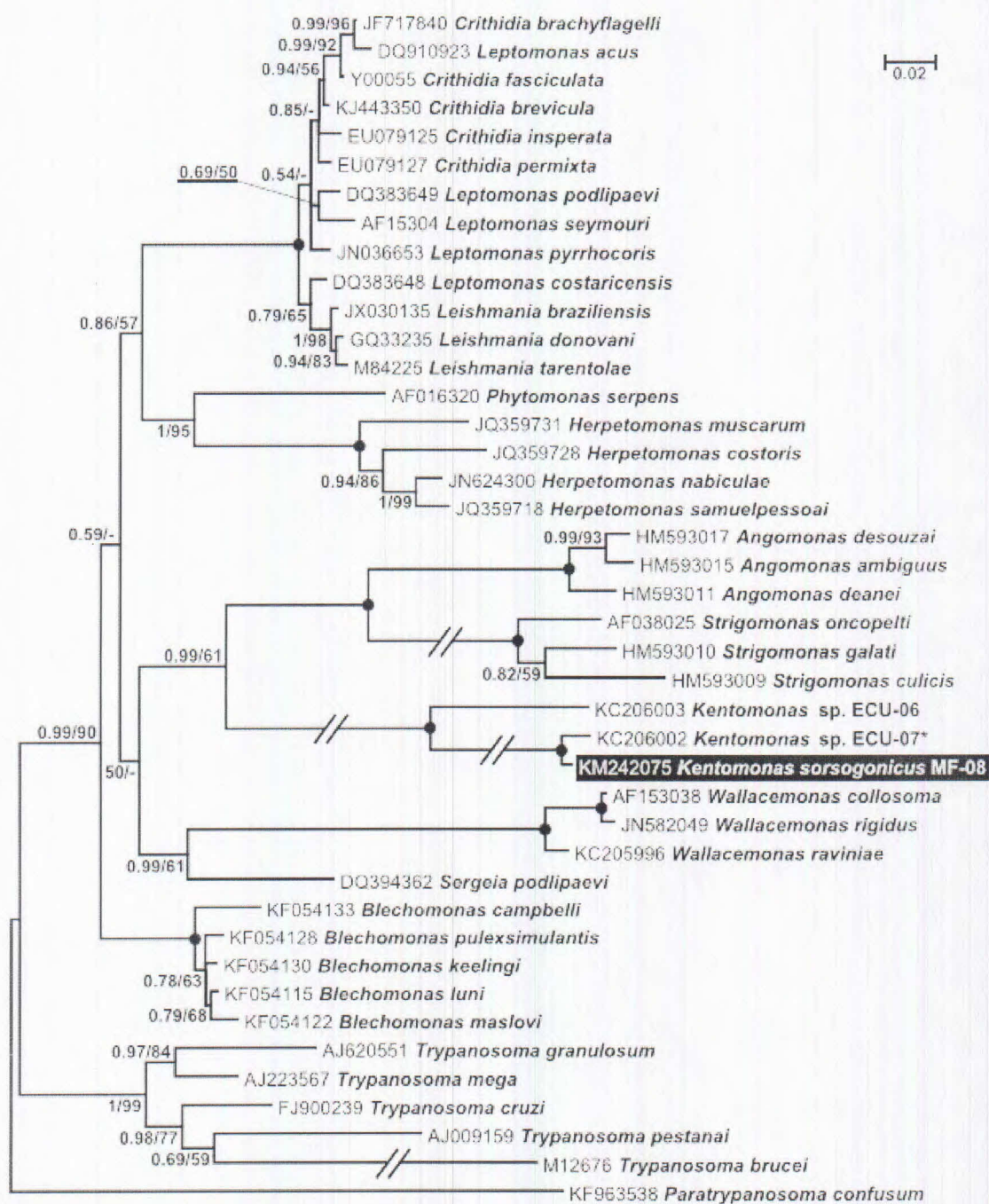


Рис.3. Филогенетическое дерево трипаносоматид на основе гена 18S rRNA, построенное по методу Баеса. Названия видов для сиквенсов извлеченных из Генбанка указаны.



Новые виды, описанные нами, выделены жирным шрифтом. Баесовы апостериорные вероятности (5 миллионов поколений) и поддержки бутстрепа (метод максимального правдоподобия – 1000 реплик) приведены под ветвями. Прочерки поставлены около узлов с поддержкой ниже 50% или другой топологией. Черные кружки обозначают узлы со 100% поддержкой бутстрепа и Баесовой вероятностью в 1.0. Ветви дважды перечеркнутые косыми линиями показаны в масштабе 50% от их оригинальной длины. Звездочкой показан образец со смешанным заражением. Дерево укоренено по *Paratrypanosoma confusum*. Линейка масштаба показывает количество замен на сайт.



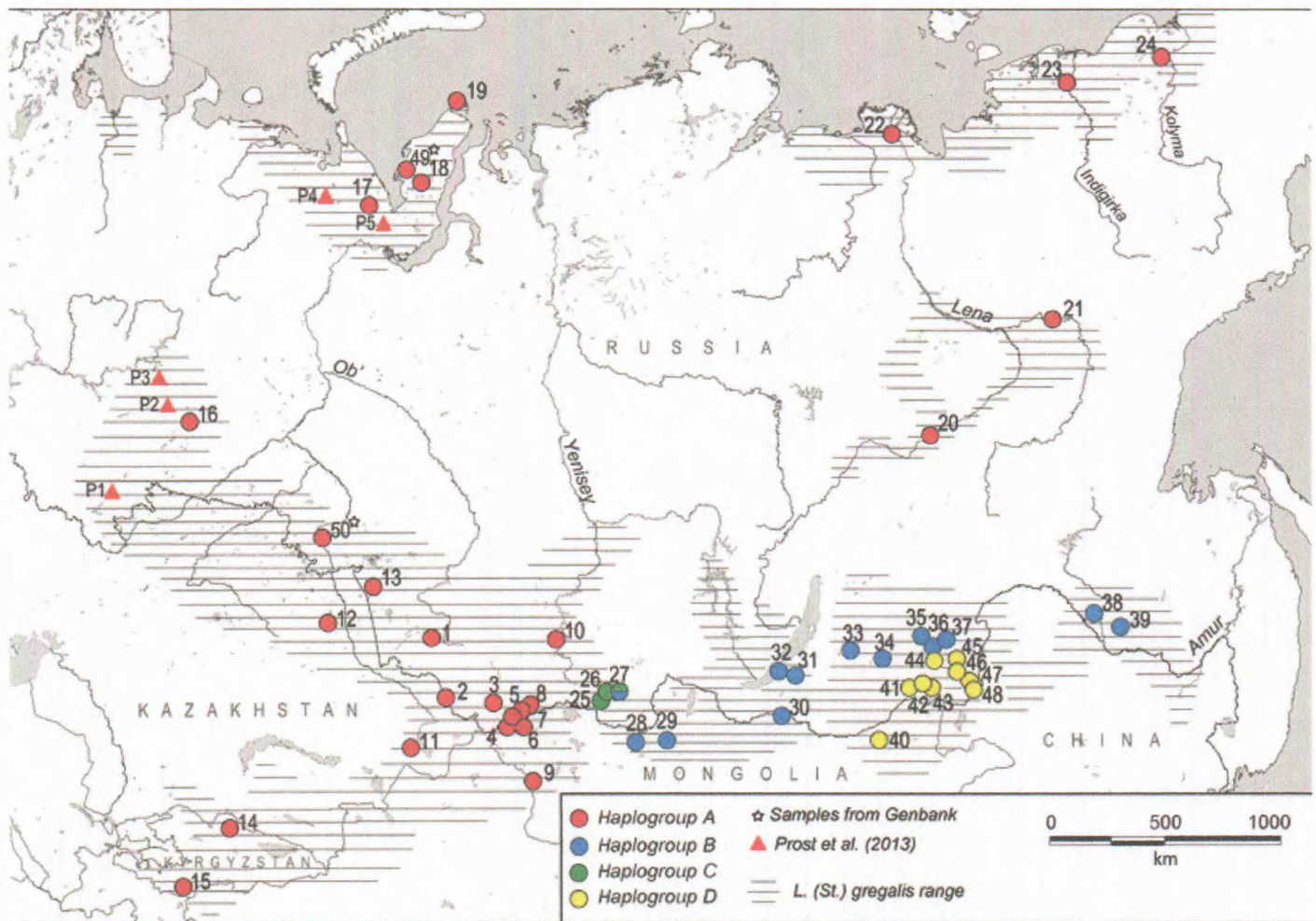
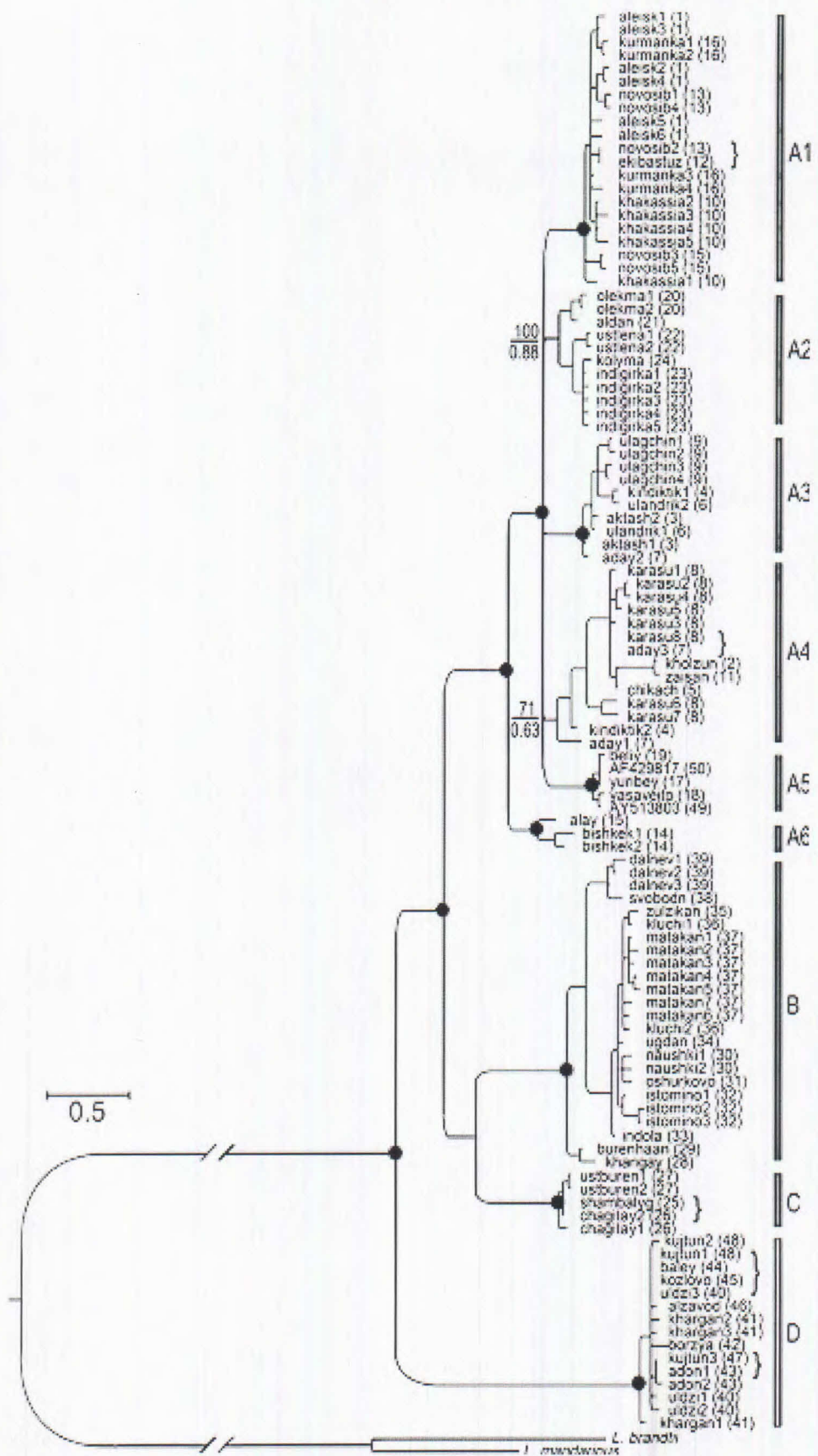


Рисунок 4. Точки сбора материала по узкочерепной полевке. Ареал показан горизонтальной штриховкой. Цветом обозначены 4 митохондриальных гаплогруппы. Треугольниками обозначен позднплейстоценовый материал из Генбанка Prost et al. (2013).





**Рис.5.** Баесово дерево для узкочерепной полевки, построенное по данным анализа изменчивости цитохром б. Гаплотипы общие для разных точек сбора объединены скобками. Цифры над ветвями – поддержки бутстрепа для анализа максимального правдоподобия, под ветвями – Баесовы апостериорные вероятности. Черные кружки показывают узлы со 100% поддержкой в обоих анализах.





Рисунок 6. Места посадки праймеров для амплификации цитохрома б из музейных типовых экземпляров 19-го века.

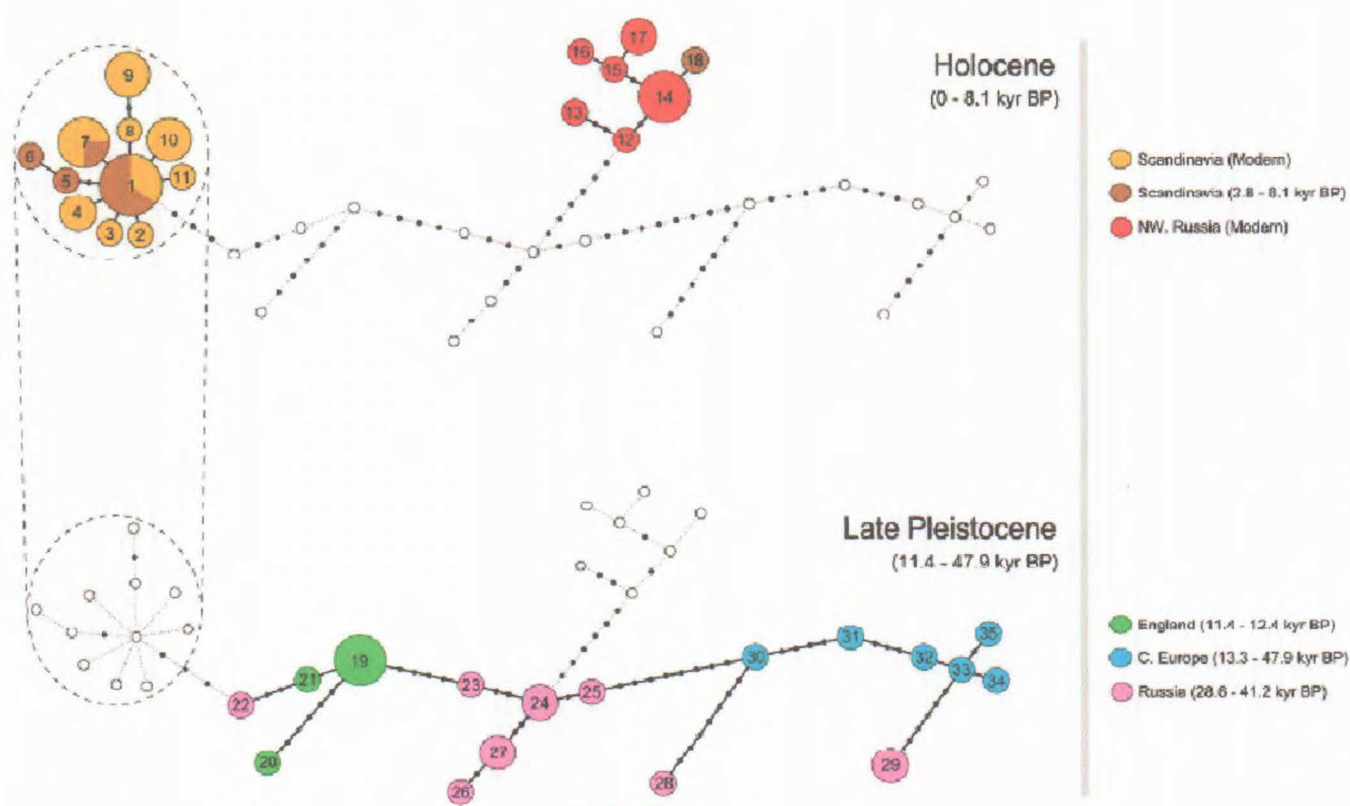


Рисунок 7. Последовательные временные срезы генетической изменчивости, полученные из образцов леммингов: желтым цветом обозначены образцы из современной Скандинавии, коричневым субфоссильные (2-4 тысячи лет назад) из Скандинавии, красным цветом – современные образцы сибирского лемминга с северо-запада России, фиолетовые кружки- позднплейстоценовые образцы с центра и юга Европейской России (28-40 тыс лет), голубые – образцы из Центральной Европы (13- 40 тыс. Лет), зеленые из Англии (11-12 тыс.лет).





Рисунок 8. Коллективная монография. «Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes», 2014, CRC Press, Taylor and Francis Group, 526 p, Ed. I. Sharakhov  
<http://www.crcpress.com/product/isbn/9781466598164>

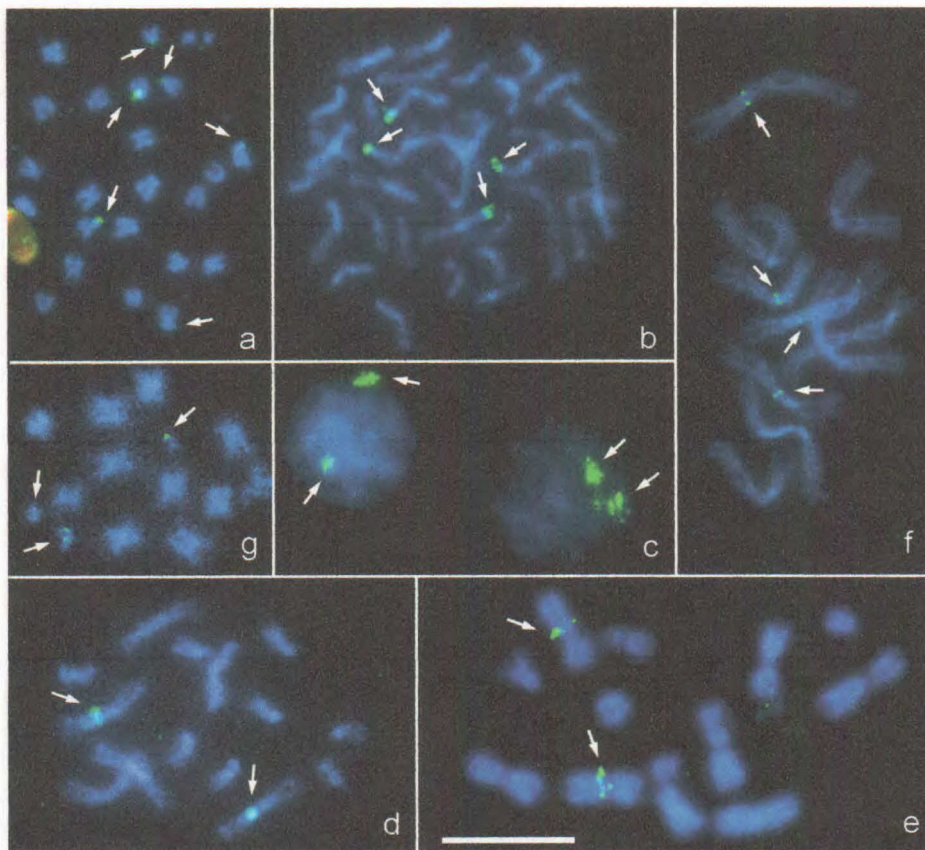


Рисунок 9. FISH с рибосомной 18S DNA и теломерной (TTAGG)<sub>n</sub> пробами на хромосомах паразитических перепончатокрылых насекомых из надсемейств Ichneumonoidea, Chalcidoidea и Cynipoidea, Зеленые сигналы указывают на локализацию генов 18S RNA. Теломерных сигналов нет, что указывает на отсутствие повтора TTAGG в хромосомах изученных видов.



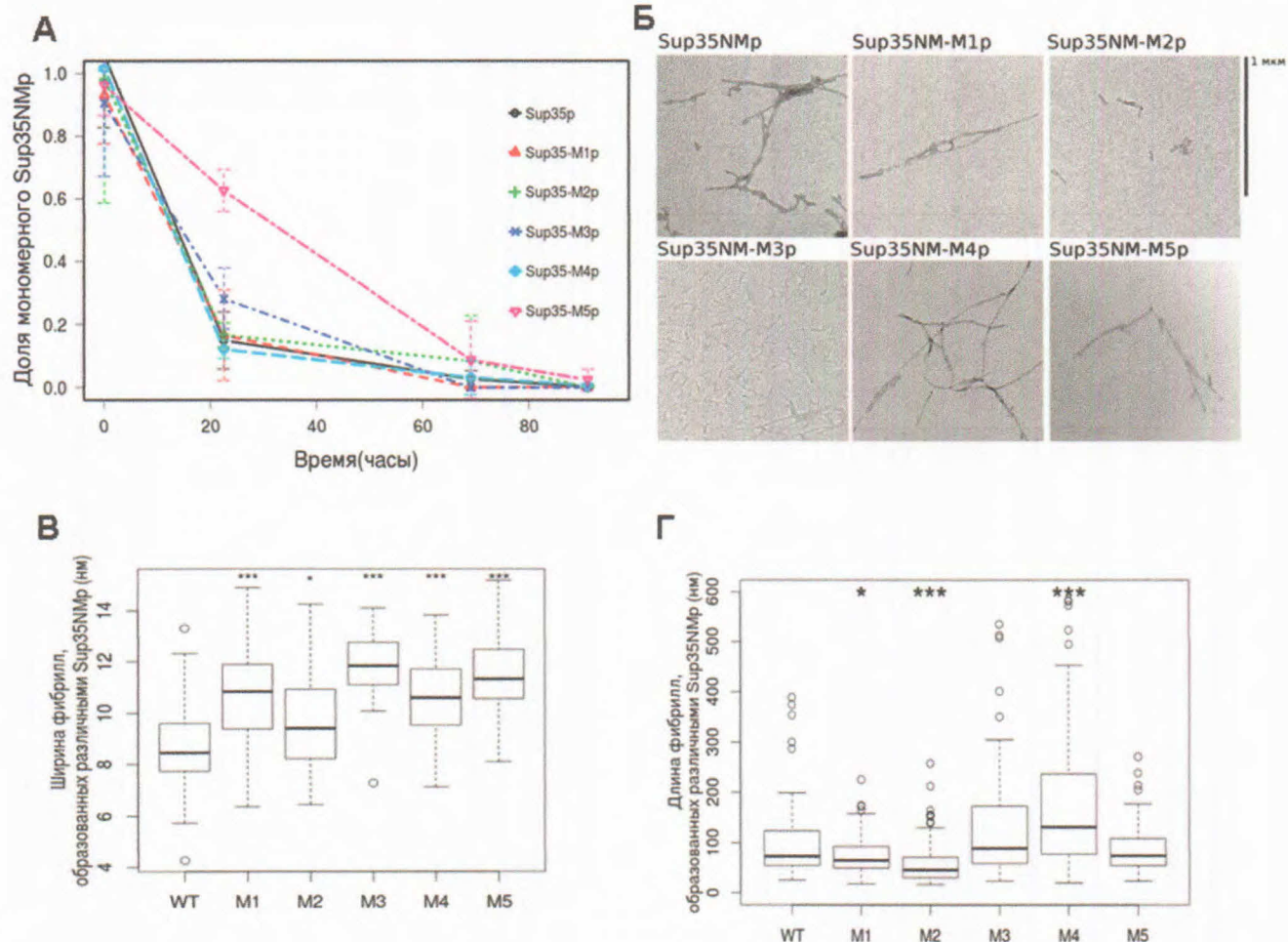


Рисунок 10. Характеристики агрегации мутантных белков Sup35. А.. Сравнение динамики образования агрегатов различных вариантов Sup35NMp показывает, что белок NM-M5 медленнее образует агрегаты *in vitro*. Доля мономерного белка рассчитывалась как отношение количества мономерного белка к общему. Каждый эксперимент проводился в трех повторностях, на графике представлены средние значения. Для каждой точки отложено среднеквадратичное отклонение. Б. Все мутантные белки Sup35NM образуют фибриллы *in vitro*. Представлены микрофотографии агрегатов Sup35NMp. Образцы покрашены 1% уранил ацетатом согласно методике позитивного контрастирования. В.Г. Сравнение линейных характеристик фибрилл, образованных различными вариантами Sup35NMp. Представлены распределения значений ширин (В) и длин (Г) фибрилл. Достоверные отличия по сравнению с белком дикого типа отмечены «\*» (\*- $p < 0,05$ , \*\*\*- $p < 0,001$ ).