

УДК: 57.084:58.282+577.21

NEUROSPORA CRASSA КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ, УСПЕШНО ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В ЭПИГЕНЕТИКЕ.

Аликова А.В.¹, Золотарёва Л.Ю.¹, Бакаушина В.С.¹, Захарчук А.Ю.¹

¹ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский» университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Россия, Волгоград, e-mail: AlikovaAV1504@yandex.ru

Представлены основные преимущества в использовании живых организмов в качестве модельных объектов в научных биологических исследованиях. В первую очередь модельными становятся организмы, содержание и разведение которых в лабораторных условиях не представляет особого труда и существенных затрат. Нейроспора густая считается одним из самых успешных модельных организмов, так как она обладает рядом преимуществ, которые выделяют ее среди других модельных объектов. *Neurospora crassa* как модельный объект используется в исследованиях по всему миру, в частности в выяснении молекулярных событий, участвующих в циркадных ритмах, эпигенетике и молчании генов, клеточной полярности, слиянии клеток, а также многих аспектах клеточной биологии и биохимии. *Neurospora* оказалась особенно полезной для исследований по фотобиологии, популяционной биологии, морфогенезу, митохондриальному импорту, репарации и рекомбинации ДНК, метилированию ДНК и другим процессам. Описано исследование, в котором выясняется роль метилирования в процессе развития организма и клеточной дифференцировки. Было выяснено, что в условиях азотного голодания метилирование ДНК становится одним из механизмов регуляции активности генома при формировании репродуктивных структур организма.

Ключевые слова: модельный объект, модельный организм, нейроспора густая, метилирование.

NEUROSPORA CRASSA AS A MODEL OBJECT SUCCESSFULLY USED IN EPIGENETICS.

Alikova A.V.¹, Zolotareva L.Y.¹, Bakaushina V.S.¹, Zakharchuk A.Y.¹

¹FSBEI HE VolgSMU Of the Ministry of Healthcare of the Russia – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Volograd State Medical University» Of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation direction of preparation “Biology”, Russia, Volgograd, e-mail: AlikovaAV1504@yandex.ru

The main advantages of using living organisms as model objects in scientific biological research are presented. First of all, organisms become model organisms, the maintenance and breeding of which in laboratory conditions does not present much work and significant costs. The dense neurospore is considered one of the most successful model organisms, since it has a number of advantages that distinguish it from other model objects. *Neurospora crassa* is used as a model object in research around the world, in particular in the elucidation of molecular events involved in circadian rhythms, epigenetics and gene silencing, cellular polarity, cell fusion, and many aspects of cell biology and biochemistry. *Neurospora* has proven particularly useful for research in photobiology, population biology, morphogenesis, mitochondrial import, DNA repair and recombination, DNA methylation, and other processes. A study is described that clarifies the role of methylation in the development of the organism and cell differentiation. It was found that under nitrogen starvation conditions, DNA methylation becomes one of the mechanisms for regulating genome activity during the formation of the reproductive structures of the organism.

Key words: model object, model organism, dense neurospore, methylation.

Введение

Модельные организмы необходимы для изучения свойств, процессов и механизмов живой природы. Главное преимущество данных объектов состоит в их интенсивном изучении, что позволяет накапливать большое количество научных данных по строению, функциям и свойствам модельных организмов. Это необходимо для успешного дальнейшего использования их в лабораторных исследованиях и научных экспериментах.

Применение организмов в качестве модельных объектов в лабораторных экспериментах позволяет проводить исследование биохимических, физиологических, молекулярно-генетических и прочих свойств организмов, в частности человека. Использование модельных объектов, основано на общности происхождения всех живых организмов и сохранении в поколениях общих свойств хранения, передачи и реализации наследственной информации, а также единых механизмах биохимических процессов, протекающих в клетках.

В первую очередь модельными становятся организмы, содержание и разведение которых в лабораторных условиях не представляет особого труда и существенных затрат. Также учитываются такие свойства, как короткое время генерации, возможность проведения генетических манипуляций над организмом, положение его на филогенетическом древе и др.

Нейроспора густая считается одним из самых успешных модельных организмов, так как она обладает рядом преимуществ, которые выделяют ее среди других модельных объектов. Культивирование организма не требует больших усилий и затрат. Это быстро размножающийся, неприхотливый аскомицет, растущий на минимальной культуральной среде, содержащей сахар, источники азота, минеральные ионы и витамины роста. Образующийся в ходе быстрого роста мицелий густой, обильно ветвящийся. Клетки гиф одноядерные, обладающие трёхслойной клеточной стенкой (β -1,3 \rightarrow 1,6-глюкановый, белково-хитиновый, белковый слои), имеющей толщину чуть больше 100 нм.

Геном *Neurospora crassa* полностью секвенирован. Известно, что состоит он из семи хромосом (порядка 40 млн. а. о.) с примерно 10 000 предсказанными генами, кодирующими белки. Важно, что лишь около 10% этого генома состоят из повторяющейся ДНК, и, помимо тандемного порядка из приблизительно 70 копий сегмента рДНК длиной около 9 т.н., кодирующего три большие рРНК, большая часть повторяющейся ДНК состоит из инактивированных перемещающихся элементов [4].

Эти и другие особенности объясняют активное использование *Neurospora crassa* как модельного объекта в исследованиях по всему миру, в частности в выяснении молекулярных событий, участвующих в циркадных ритмах, эпигенетике и молчании генов, клеточной

полярности, слиянии клеток, а также многих аспектах клеточной биологии и биохимии. *Neurospora* оказалась особенно полезной для исследований по фотобиологии, популяционной биологии, морфогенезу, митохондриальному импорту, репарации и рекомбинации ДНК, метилированию ДНК и другим процессам.

Общая характеристика Нейроспоры густой

Нейроспора густая (лат. *Neurospora crassa*) - это разновидность плесени для красного хлеба из филума Ascomycota. Характерные бороздки на спорах, которые являются особенностью для данного рода плесенных грибов, послужили поводом для названия *Neurospora*, что обозначает по-гречески «нервная спора». *N. crassa* встречается главным образом в тропиках и субтропиках, являясь в основном почвенным видом. Отличается особой термоустойчивостью [5].

Исследуя *N. crassa* ученые Д.У.Бидл и Э.Л.Тейтем предложили гипотезу “один ген - один фермент” (один ген кодирует синтез одного специфического белка-фермента). Данное открытие стало значимым в генетике и молекулярной биологии, что послужило поводом для использования *Neurospora* как модельного объекта в этих областях науки [2].

Жизненный цикл *N. crassa* гаплофазный. Преобладает конидиальное («бесполое») спороношение. На гифах развиваются микроконидии и артроконидии, скопления ярко окрашенных (розовых или оранжевых) конидий. Плодовые тела представлены светло окрашенными перитециями. В асках образуется всегда ровно 8 спор, располагающихся линейно, что облегчает визуальную интерпретацию культуры [1].

Нейроспора густая как модельный объект

Одно из исследований, проведенных с использованием *Neurospora crassa* в качестве модельного объекта было связано с особенностью данного организма, как и любого аскомицета, размножаться двумя путями – бесполом и половым. В данной работе крайне важным был тот факт, что фазы развития *N. crassa* четко различимы морфологически, а их смена регулируется совершенно определенными факторами среды. Исключая или добавляя определенные элементы питания, можно отслеживались соответствующие изменения морфогенеза данного аскомицета.

Обычно жизненный цикл *N. crassa* начинается с того, что спора прорастает на подходящем субстрате, образуя мицелий. При росте в поверхностной культуре ветвящиеся гифы гриба покрывают среду, в состав которой входит агар-агар, равномерной белой пленкой. В оптимальных условиях мицелий способен расти со скоростью 10 см в день. При

бесполом развитии на мицелии через несколько дней образуются воздушные гифы, на которых формируются круглые вегетативные споры макроконидии, обладающие характерной оранжевой окраской, которая обусловлена присутствием каротиноидных пигментов, в частности нейроспороксантина. Мицелий со временем также становится оранжевым. При половом развитии на мицелии образуются протоперитеции. Через сутки они увеличиваются в размере, темнеют и превращаются в перитеции. Спустя несколько дней в них созревают черные половые споры - аскоспоры.

Известно, что процессы развития и клеточной дифференцировки контролируются энзиматическим метилированием азотистых оснований ДНК (в основном цитозина). Использование Нейроспоры густой в данном исследовании объясняется тем, что геном *N.crassa* метилирован слабо, содержание 5-метилцитозина у гриба варьирует по мере превращения прорастающей конидии в вегетативный мицелий, что говорит о наличии определенной связи между уровнем метилирования ДНК и генной экспрессией. Метилирование ДНК для *N.crassa* не столь обязательный процесс и получение жизнеспособных мутантов с его нарушением является существенной проблемой для данного организма.

В качестве инструментов для оценки возможного участия метилирования ДНК в регуляции путей развития *N.crassa* исследователями были выбраны специфические ингибиторы этого процесса - 5-азацитидин и метотрексат. Встраивание в молекулу ДНК 5-азацитидина вместо цитидина делает ее недоступной для ферментов метилтрансфераз, и таким образом нарушается нормальный процесс метилирования остатков цитозина. Метотрексат проявляет ингибирующее действие на более широкий круг реакций метилирования, в частности на биосинтез пуринов и тимина. Помимо этого, обработка клеток 5-азацитидином может вызывать активацию так называемых молчащих генов, модификацию хроматина и ингибирование различных стадий транскрипции, что, возможно, происходит вследствие деметилирования ДНК [4].

После трех суток роста в темноте целлофановый диск с мицелием гриба переносили на свежую без азотную среду, в которую предварительно добавляли 5-азацитидин. Спустя сутки одну часть содержащихся в темноте чашек Петри освещали в течение двух минут синим светом (именно такой режим оптимален для запуска формирования протоперитециев на среде с дефицитом азота), а другую - использовали в качестве контроля (продолжали держать в темноте). Через двое суток под бинокулярным микроскопом при красном свете подсчитывали количество образовавшихся протоперитециев, а еще через два дня темновой

инкубации культур с чашек смывали конидии и определяли их количество, для чего предварительно высеивали их на полноценную среду.

В условиях азотного голодания добавление 5-азацитидина приводило к ингибированию формирования протоперитециев и увеличению выхода конидий. Влияние синего света и ингибитора ДНК-метилирования на образование вегетативных спор было очень сильным. Так, свет подавлял конидиогенез более чем в 100 раз, а обработка 5-азацитидином в этих условиях приводила к более чем 700-кратному возрастанию количества конидий по сравнению с контрольным мицелием. Таким образом, после обработки мицелия 5-азацитидином, как в темноте, так и после действия света, образование протоперитециев сопровождалось обратно пропорциональным уменьшением количества конидий.

Накопление в клетках *N.crassa* каротиноидных пигментов - часть программы индивидуального развития этого организма. Образование каротиноидов сопровождает процесс конидиогенеза и, хотя генетическое нарушение синтеза пигментов не препятствует формированию спор, их отсутствие у мутантов заметно снижает устойчивость конидий к действию ультрафиолета. Ингибиторы метилирования ДНК влияют на фотокаротиногенез гриба гораздо слабее, чем на образование репродуктивных структур. Обработка мицелия *N.crassa* 5-азацитидином приводила к стимуляции фотокаротиногенеза, но не более чем на 30%, а дальнейшее повышение его концентрации тормозило не только этот процесс, но и рост клеток. Интересно, что метотрексат - антиметаболит фолиевой кислоты и ингибитор более широкого спектра действия - действовал практически так же.

Было выяснено, что в условиях азотного голодания метилирование ДНК становится одним из механизмов регуляции активности генома при формировании репродуктивных структур грибов. Его влияние затрагивает ранние этапы выбора полового или бесполого пути развития *N. crassa* и в меньшей степени распространяется на контроль активности генов, экспрессия которых происходит на поздних стадиях дифференцировки. Принимая во внимание низкую степень метилирования ДНК *N.crassa*, можно предположить, что лишь небольшая часть генома ответственна за выбор грибом полового или бесполого пути развития [4].

Заключение

Исследования, проводимые с участием Нейроспоры густой, доказывают, что данный организм является успешным модельным объектом. Главным ее преимуществом считается простота культивирования, так как этот аскомицет неприхотлив, способен расти на минимальной культуральной среде и при этом давать большое количество культуры.

Neurospora crassa как модельный объект используется в биологических исследованиях по всему миру, в частности в выяснении молекулярных событий, участвующих в циркадных ритмах, эпигенетике и молчании генов, клеточной полярности, слиянии клеток, а также многих аспектах клеточной биологии и биохимии. *Neurospora* оказалась особенно полезной для исследований по фотобиологии, популяционной биологии, морфогенезу, митохондриальному импорту, репарации и рекомбинации ДНК, метилированию ДНК и другим процессам.

Список использованной литературы:

1. Горленко М.В. Жизнь растений. В 6-ти тт. Т. 2. Грибы / Под ред. проф. М. В. Горленко // Просвещение. - 1976. — С. 146—147.
2. Мюллер Э. Микология / Э. Мюллер, В. Лёффлер// Мир. 1995.
3. Потапова Т. Тайны нейроспоры / Т. Потапова // «В мире науки». - 2004. — № 9. – С. 44 - 53
4. Филиппович С. Ю., Бачурина Г. П., Крицкий М. С. Супермодель нейроспора // Природа. – 2004. – № 3. – С. 49-54
5. Perkins, D. *Neurospora*: a model of model microbe /. D. Perkins // Nature Reviews Genetics. – 2002. - № 3. - P. 397–403.