

ГОНЧАРОВ
НИКОЛАЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМОСОМНОЙ
НЕСТАБИЛЬНОСТИ И НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ
ТРАНСМИССИИ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 –клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Владивосток – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном
учреждении высшего образования
«Дальневосточный федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Кумейко Вадим Владимирович**

Официальные оппоненты:

Лебедев Игорь Николаевич, доктор биологических наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Научно-исследовательский институт медицинской генетики, заместитель директора по научной работе, руководитель лаборатории цитогенетики

Шкрыль Юрий Николаевич, кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий и биомедицины

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им А.А. Харкевича Российской академии наук

Защита диссертации состоится «15» мая 2020 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/50-goncharov-nikolaj-vladimirovich>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук



Ващенко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Трансмиссия хромосом во время клеточного деления обеспечивается согласованной работой множества молекулярных детерминант, к которым относятся белки кинетохорного комплекса и митотического цитоскелета, компоненты центромерного хроматина и его эпигенетические модификации. Нарушение работы этих элементов приводит к хромосомной нестабильности и образованию анеуплоидных клеток.

Явление хромосомной нестабильности характерно для злокачественных новообразований и может достигать порогового уровня, за которым прекращается деление клеток и рост опухоли (Janssen, 2009). Медикаментозное увеличение хромосомной нестабильности в опухолевых клетках используется в терапии некоторых форм рака. Для этого применяют препараты, которые препятствуют функционированию комплексов, отвечающих за образование и стабилизацию кинетохора. Мишенями для подобного рода препаратов служат молекулярные детерминанты, а именно продукты экспрессии генов, вовлечённые в процессы стабилизации трансмиссии хромосом.

Таким образом, важной фундаментальной задачей является поиск новых молекулярных детерминант, участвующих в трансмиссии хромосом в клетках человека, и выявление препаратов-кандидатов, способных вызывать хромосомную нестабильность.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день доказано участие приблизительно 400 генов в трансмиссии хромосом человека, тогда как при исследовании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* было обнаружено 937 таких генов (Stirling et al., 2011, 2012). Поскольку митоз – эволюционно древний и консервативный процесс, можно предположить, что в геноме человека есть неописанные гены-регуляторы сегрегации хромосом, ортологичные генам дрожжей.

Химические соединения, способные нарушать механизмы сегрегации хромосом являются перспективными препаратами-кандидатами для противоопухолевой терапии (Janssen, 2009). Такие химические соединения блокируют работу молекулярных детерминант, вовлечённых в процессы стабилизации трансмиссии хромосом, и приводят к хромосомной нестабильности. Множество молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека остаются неизвестными (Stirling et al., 2011, 2012).

Для детекции хромосомной нестабильности в человеческих клетках необходимо создание удобной тест-системы, позволяющей производить массовый скрининг генов и продуктов их экспрессии, участвующих в трансмиссии хромосом, и выявлять химические соединения, способные вызывать хромосомную нестабильность. Удобными экспериментальными моделями для создания подобной тест-системы являются клеточные линии с искусственными хромосомами человека (human artificial chromosome, НАС), представляющие собой синтетическую модель кинетохор-центромерного комплекса.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является разработка тест-системы для количественной оценки уровня хромосомной нестабильности и поиск новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Сконструировать тест-систему на основе клеточной линии с искусственной хромосомой человека, позволяющую проводить идентификацию молекулярных детерминант, вовлеченных в трансмиссию хромосом.
2. Провести поиск генов и белков, не идентифицированных ранее в качестве молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека.
3. Апробировать созданную тест-систему для поиска новых препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность.

Научная новизна. В ходе данной работы разработана тест-система на основе искусственной хромосомы человека, позволяющая осуществлять высокоэффективный массовый поиск новых генов, участвующих в процессе хромосомной трансмиссии, и проводить скрининг препаратов-кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность. Производительность данной системы позволяет в течение 72 ч осуществить скрининг нескольких сотен генов или препаратов с целью выявления их вовлеченности в процесс трансмиссии хромосом. Данная система может быть совместима с различными приборами для анализа флуоресценции, такими как проточные цитофлуориметры, лазерные сканирующие микроскопы, высокопроизводительные системы микроскопии и автоматического анализа изображений (high-content imaging).

Данные, полученные с применением разработанной тест-системы в ходе выполнения работ по теме диссертационного исследования, представляют собой точные количественные характеристики уровня хромосомной нестабильности, возникающей после подавления экспрессии генов-кандидатов, а также в результате действия различных природных экстрактов, примененных с целью апробирования системы для поиска препаратов, влияющих на трансмиссию хромосом.

В ходе выполнения данной работы в результате скрининга молекулярной библиотеки, включающей 714 миРНК, таргетированных на кодирующие последовательности протеинкиназ, была доказана связь генов *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1* и *TRIO* с процессом митотической трансмиссии хромосом. Была обнаружена способность экстрактов из листьев *Punica granatum* вызывать хромосомную нестабильность.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты данного исследования пополняют существующий список молекулярных детерминант трансмиссии хромосом человека и позволяют расширить понимание того, как изменились в процессе эволюции функции генов, регулирующих процессы хромосомной трансмиссии, а также установить их роль в сегрегации хромосом. Обнаружение новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом человека позволяет обновить список потенциальных мишеней для

противоопухолевых препаратов. Выявление мутаций в обнаруженных генах может быть использовано для ранней диагностики некоторых форм рака. Дальнейшее использование созданной тест-системы для анализа препаратов-кандидатов и подробное изучение механизмов зафиксированного эффекта экстракта из *P. granatum* может стать основой для создания новых лекарственных средств для терапии онкологических заболеваний.

Методология и методы диссертационного исследования. В данном диссертационном исследовании применены классические и современные методы молекулярной и клеточной биологии. Для получения рекомбинантных клеточных линий были использованы методы молекулярного клонирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), трансфекции и селекции эукариотических клеток. Расшифровку нуклеотидных последовательностей (секвенирование) проводили по методу Сэнгера. Анализ данных реализован с помощью специализированного программного обеспечения и статистических программ. Для конструирования искусственной хромосомы человека применяли методы рекомбинации плазмидного вектора через сайт *LoxP*. Для анализа флуоресценции были использованы методы проточной цитофлуориметрии, лазерной сканирующей микроскопии, высокоэффективной автоматизированной микроскопии. Для подавления экспрессии генов был использован метод РНК-интерференции. Потерю белкового продукта в клеточной популяции после РНК-интерференции оценивали с помощью вестерн-блоттинга.

Личный вклад автора. Экспериментальная часть, представленная в результатах работы, выполнена непосредственно автором в полном объеме. Личный вклад автора заключается в выполнении работ по конструированию тест-системы и ее апробации для скрининга генов и препаратов-кандидатов, выполнении обработки и анализа экспериментальных данных, участии в обсуждении результатов, подготовке иллюстраций и написании научных публикаций, материалов конференций, выступлении с докладами на конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Тест-система НТ1080 НАС/dGFP на основе клеточной линии, содержащей искусственную хромосому человека с укороченным временем деградации флуоресцентного репортера, позволяет количественно оценивать уровень хромосомной нестабильности и проводить поиск препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность.
2. Тест-система НТ1080 НАС/dGFP позволяет проводить скрининг библиотек малых интерферирующих РНК и идентифицировать молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом человека.
3. Нокаун генов *BUB1*, *BUB1B*, *IRAK*, *TAOK1*, *TRIO*, *PNCK*, *PINK1* вызывает хромосомную нестабильность.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов работы обеспечивается использованием современных методов молекулярного клонирования и конструирования искусственных хромосом человека, применением апробированных методик, использованием взаимодополняющих методов исследования, применением статистических

методов при обработке экспериментальных данных. Повтор результатов при дополнительных экспериментах и достаточный объем выборок позволили всесторонне проанализировать полученные результаты и определили их достоверность. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы базируются на экспериментальных данных, приведенных в виде рисунков, фотографий и таблиц.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на Школе-конференции для молодых ученых «Future Biotech», Звенигород, Россия, февраль 2014; на VI Международной школе-конференции для молодых ученых по молекулярной генетике «Геномная и системная биология», Москва, Россия, февраль 2014; на Конференции студентов и аспирантов Школы биомедицины «Биомедицина, биотехнология и биомедицинские системы», ДВФУ, Владивосток, Россия, 2015; на Международной конференции «Nuclear Structure and Genome Integrity», НИИ, Бетезда, США, февраль 2016; на Международной конференции «Future of Biomedicine 2017», Владивосток, Россия, сентябрь 2017; на Региональной конференции для молодых ученых «Дни науки 2018», ДВФУ, Владивосток, Россия, 2018; на Международной конференции «The 44th FEBS Congress», Краков, Польша, 2019; на Международной конференции «Future of Biomedicine 2019», Владивосток, Россия, сентябрь 2019.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК, и 5 тезисов научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, основных глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 27 рисунков и 14 таблиц.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н. В.В. Кумейко за организацию работы, предоставление прекрасной экспериментальной базы лаборатории, обучение и поддержку на всех этапах выполнения диссертационного исследования, руководителям научной группы «Структура и функция генома» Лаборатории молекулярной фармакологии Национального института рака США д.б.н. В. Ларионову и д.б.н. Н. Куприной за возможности освоения новых методов и выполнения важных экспериментов, обучение и всестороннюю поддержку при подготовке диссертации, к.б.н. М.А. Лисковых за методические указания, помощь в реализации экспериментальной части диссертации и ознакомление с текстом рукописи, к.б.н. А.М. Каганскому за предоставление коллекции экстрактов из объектов биоты. Выражаю благодарность коллективу Лаборатории биомедицинских клеточных технологий Школы биомедицины ДВФУ за рекомендации, критические замечания и помощь при проведении экспериментов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Процесс трансмиссии хромосом обеспечен согласованной работой многих систем, которые поддерживают стабильность генома на разных этапах клеточного цикла. В главах обзора литературы подробно рассмотрены группы генов и различные последовательности центромерной и перицентромерной ДНК, белковые комплексы и эпигенетические сигнальные системы, обеспечивающие стабильность трансмиссии хромосом. Все молекулярные процессы описаны на примерах модельных организмов, среди которых: *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Pan troglodytes* и клеточные линии человека. В обзоре литературы рассмотрены различные последовательности ДНК центромерного и перицентромерного гетерохроматина, белковые комплексы и эпигенетические модификации, охарактеризована их роль в формировании структур кинетохора и митотического расхождения хромосом. В тексте обзора раскрыты молекулярные механизмы хромосомной нестабильности, описаны модели и методы для анализа хромосомной нестабильности, приведены последние сведения о развитии технологии искусственных хромосом человека.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Трансформация клеток бактерий. Для сборки и клонирования рекомбинантного вектора p264-GFP-GFP-CDT1-GEMININ использовали штамм *Escherichia coli* DH5 α . Трансформацию производили методом электропорации, для селекции использовали твердую питательную среду LB с добавлением ампициллина, согласно классическому протоколу (Weaver, Chizmadzhev, 1996). ПЦР бактериальных колоний проводили с использованием ДНК-полимеразы Taq (Thermo Fisher Scientific, США) и специально сконструированных праймеров, фланкирующих целевые продукты лигированных плазмид.

2.2 Выделение ДНК. Выделение плазмидной ДНК производили по протоколу из набора для выделения плазмидной ДНК (Plasmid Miniprep, Thermo Fisher Scientific, США). Выделение хромосомной ДНК из культуры клеток CHO и HT1080 производили с помощью набора для выделения геномной ДНК GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически, с помощью спектрофотометра NanoPhotometer Pearl Design Edition UV/Vis.

2.3 Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Секвенирование фрагментов осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по методике производителя на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности собирали и визуально проверяли на наличие ошибок с помощью программы SnapGene Viewer 3.2.1 (SnapGene software, GSL Biotech, snapgene.com).

2.4 Получение клеточной линии HT1080 HAC/dGFP. В HPRT-дефицитные клетки рака яичника китайского хомячка (CHO, JCRB0218), несущие tetO-HAC, трансфицировали вектор p264-GFP-GFP-CDT1-GEMININ. Встраивание последовательности интереса происходило посредством Cre-опосредованной рекомбинации вектора в последовательность искусственной хромосомы и восстановления гена HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase). Селекцию проводили с использованием питательной среды F12 (Gibco, США), содержащей селективную добавку HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine). Экспрессию исследуемых генов анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 700 Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия). Конструкцию HAC/dGFP, собранную в клетках CHO, переносили по протоколу микроклеточно-опосредованного переноса хромосом (перевод с англ., microcell-mediated chromosome transfer, ММСТ) (Liskovykh et al., 2016).

2.5 Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Для визуализации искусственной хромосомы человека в метафазном и интерфазном хроматине использовали синтетические олигонуклеотиды пептидной нуклеиновой кислоты (peptide nucleic acid, PNA) связанные с флуорофором FITC. Зонд PNA был подобран на последовательность tetO в составе искусственных хромосомы. Для гибридизации получали препараты метафазных пластинок, окрашенные DAPI по методике (Evans et al., 1964). Сигнал от зонда детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olimpus BX63.

2.6 Обработка клеточной линии HT1080 HAC/dGFP препаратами природных экстрактов для анализа хромосомной нестабильности. Клетки линии HT1080 HAC/dGFP обрабатывали различными концентрациями экстрактов, растворенных в питательной среде DMEM. Через 24 ч инкубации заменяли среду на DMEM без бластицидина и культивировали в течение 72 ч.

2.7 Трансфекция миРНК. Трансфекцию миРНК проводили по протоколу реверстрасфекции, клетки рассаживали в конfluence 300 клеток на мм² на планшеты, содержащие миРНК. Для рассадки клеток использовали автоматизированную систему Multidrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Scientific, США). Далее клетки инкубировали в течение 20 ч при 37°C, 5% CO₂, после чего их помещали в полную среду DMEM на 72 ч.

2.8 Проточная цитофлуориметрия. Анализ флуоресценции клеток HT1080 HAC/dGFP проводили на проточном цитофлуориметре BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences, США). Репортными сигналами служил зеленый флуоресцентный белок GFP с максимумом возбуждения при длине волны 488 нм и DRAQ7™ (Biolegend, USA) с максимумом возбуждения при 695 нм. Анализ клеточного цикла с помощью Hoechst 33342 проводили использованием C-Flow BC, применяя проточный сортировщик клеток moFloAstrios EQ. Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали лазером с длиной волны 355 нм. Анализировали

1×10^4 событий на образец, данные анализировали с помощью программного обеспечения Kaluza, Beckman Coulter.

2.9 Конфокальная микроскопия и высокопроизводительный автоматизированный имиджинг. Соотношение GFP-положительных клеток HT1080 HAc/dGFP после трансфекции миРНК определяли автоматизированным сканированием многолуночных планшетов. Живые клетки анализировали системой высокоэффективной микроскопии на платформе Cell iQ в формате покадровой съемки в фазовом контрасте и флуоресцентном режиме с автоматизированным распознаванием образов. Фиксированные и окрашенные клетки снимали с помощью конфокального микроскопа с системой автоматизированного имиджинга Yokogawa CV7000S с объективом Olympus 40× (NA 0,95) PlanApoChromat, дихроичным зеркалом 405/488/561/640 и 16-разрядной камерой sCMOS (2550 × 2160 пикселей). Для канала DAPI использовали лазер с длиной волны 405 нм. Для канала GFP использовали лазер с длиной волны 488 нм. Каналы DAPI и GFP были получены последовательно в одной фокальной плоскости в 9 полях зрения на лунку. Изображения были сохранены в виде 16-битных файлов формата TIFF.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Создание тест-системы на основе искусственной хромосомы человека tetO–HAc для массового скрининга факторов, вызывающих хромосомную нестабильность

В качестве системы для детекции хромосомной нестабильности в данной работе была получена клеточная линия человеческой фибросаркомы HT1080, несущая искусственную хромосому человека (tetO–HAc), чувствительную к факторам, влияющим на трансмиссию хромосом.

Для визуализации искусственной хромосомы в клеточном цикле мы использовали подход Сакэ-Савано с соавторами (Sakaue-Sawano et al., 2008, 2013). В основе данного метода лежит экспрессия коротких пептидных последовательностей белков – регуляторов клеточного цикла FUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator), находящихся в общих рамках считывания с кодирующими последовательностями флуоресцентных белков, деградирующих в такой системе каждый клеточный цикл. Сенсоры клеточного цикла CDT1 и GEMININ приводят к протеасомной деградации любого белка, связанного с их C-концевыми последовательностями, причем время активного функционирования каждого из них строго связано с продолжительностью различных фаз клеточного цикла. CDT1 экспрессируются в течение периода G1, тогда как GEMININ – в периодах S, G2 и M. Таким образом, экспрессируя в клетке химерный флуоресцентный белок вместе с C-концевыми пептидами GEMININ или CDT1, можно визуализировать весь клеточный цикл.

Поскольку GFP связан с каждым из сенсоров клеточного цикла, то флуоресцентный сигнал детектируется только в период, когда сенсор находится в нуклеоплазме, согласно

сигналу ядерной локализации. Экспрессия генов *GFP-CDT1* и *GFP-GEMININ* в клетках человеческой фибросаркомы HT1080 продемонстрирована на Рисунке 1. Как видно из результатов, флуоресценция GFP имеет ядерную локализацию, а период флуоресценции соответствует изменению фаз клеточного цикла: G1 для *GFP-CDT1* (Рисунок 1А) и G2, S и M для *GFP-GEMININ* (Рисунок 1Б). Продолжительность флуоресценции составила 8–9 ч для каждого из рекомбинантных белков. При этом в клетках, экспрессирующих оба химерных белка, происходит визуализация всего клеточного цикла (Рисунок 1В). Данный результат демонстрирует корректность сборки рекомбинантных конструкций.

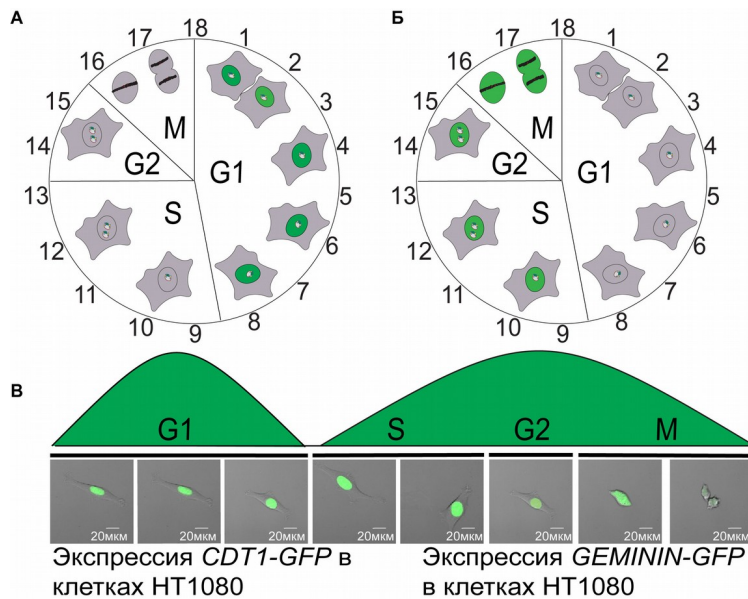


Рисунок 1 – Экспрессия сенсоров клеточного цикла в клетках HT1080. А – экспрессия вектора рCX-GFP-CDT1 в клетках HT1080 в течение клеточного цикла; Б – экспрессия рCX-GFP-GEMININ в клетках HT1080 в течение клеточного цикла; В – экспрессия шаттл-вектора р264-GFP-CDT1-GFP-GEMININ в клетках HT1080 в течение клеточного цикла.

Задачей создания рекомбинантных белков в данной работе является демонстрация потери НАС под действием тестируемых нами факторов. Поэтому кодирующие последовательности данных рекомбинантных белков были помещены в состав искусственной хромосомы человека.

На Рисунке 2 представлена схема *LoxP*Cre-рекомбинации шаттл-вектора и пустой искусственной хромосомы в клетках CHO (Chinese hamster ovary). Как видно на Рисунке 2А, последовательность искусственной хромосомы имеет половину гена *HPRT*, полноразмерная последовательность которого, экспрессируясь, обеспечивает резистентность при культивировании клеток в селективной среде с содержанием НАТ (huroxanthine-aminopterin-thymidine). После рекомбинации (Рисунок 2А) произошло восстановление последовательности *HPRT*, и шаттл-вектор был интегрирован в состав искусственной хромосомы (Рисунок 2А). Восстановление *HPRT* позволило провести селекцию клонов, содержащих последовательности интереса в составе искусственной хромосомы, и получить необходимое количество клеток CHO для проведения завершающего этапа сборки системы – переноса полученной хромосомы в клеточную линию HT1080 с помощью протокола

микрочлеточно-опосредованного переноса хромосом (перевод с англ., microcell-mediated chromosome transfer, ММСТ).

На Рисунке 2Б показана схема переноса искусственной хромосомы в клетки-реципиенты HT1080 с помощью протокола ММСТ. Для подтверждения корректности переноса и наличия искусственной хромосомы в клетках донорах и реципиентах, CHO и HT1080 соответственно, была проведена гибридизация *in situ* препаратов метафазных пластинок. В качестве маркера мы использовали зонд PNA, меченый FITC, на последовательность tetO в составе искусственной хромосомы, данная последовательность уникальна по отношению к остальным последовательностям нативных хромосом линии HT1080. На Рисунке 2В слева видно, что клетки-реципиенты имеют четкий сигнал зеленой флуоресценции (FITC), исходящий от комплекса tetO в последовательности искусственной хромосомы и флуоресцентной метки PNA–FITC. После осуществления переноса из клеток CHO в клетки HT1080 в них также наблюдается сигнал от последовательности tetO, которая является свидетельством наличия искусственной хромосомы в клетках HT1080 (Рисунок 2В).

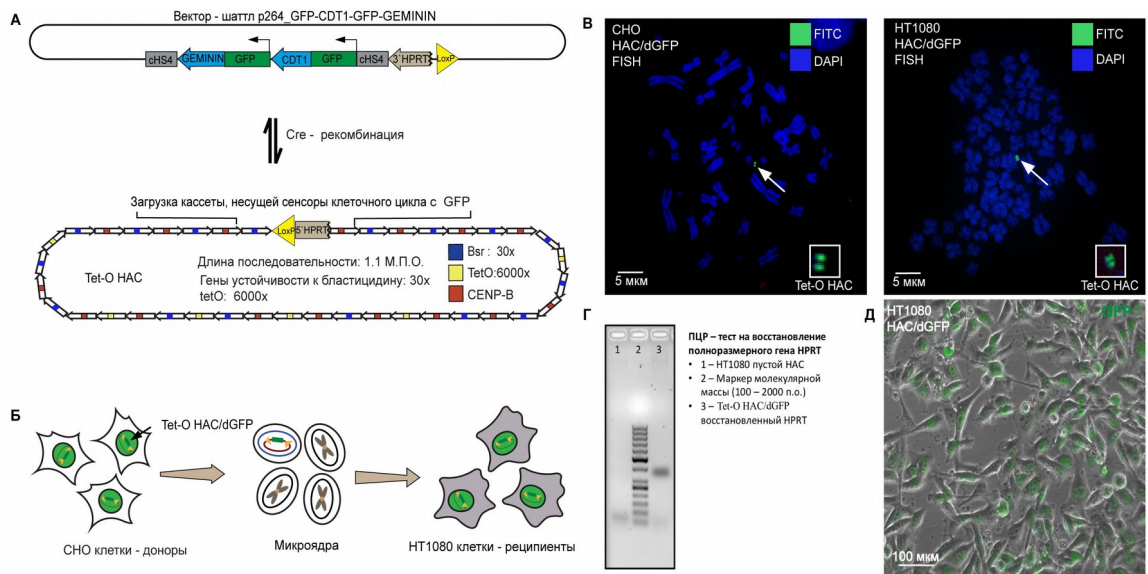


Рисунок 2 – Получение рекомбинантной клеточной линии HT1080 с искусственной хромосомой человека и системой сенсоров клеточного цикла GFP–CDT1и GFP–GEMININ. А – Cre-опосредованная рекомбинация через сайт loxP, для помещения шаттл-вектора p264-GFP–CDT1-GFP–GEMININ в состав искусственной хромосомы в клетках CHO; карты искусственной хромосомы (Alphoid^{tetO} – HAC) и вектора p264–GFP–CDT1-GFP–GEMININ; Б – схема протокола переноса искусственной хромосомы человека из клеточной линии CHO в клеточную линию HT1080; В – снимок метафазы клеток CHO и HT1080 и FISH на последовательность tetO в искусственной хромосоме человека; Г – ПЦР восстановленного в результате Cre-loxP рекомбинации полноразмерного гена селективного маркера HPRT; Д – снимок популяции клеток HT1080 HAC/dGFP после проведения ММСТ.

После проведения ММСТ клетки HT1080 были подвергнуты селекции в присутствии селективного антибиотика бластицидина. Гены устойчивости к бластицидину (*BSR*) локализованы в последовательности НАС (Рисунок 2А) и позволяют провести селекцию клеток с искусственной хромосомой. После селекции был выбран клон с наиболее стабильной экспрессией GFP и использован для дальнейших экспериментов.

Таким образом, нами была получена линия человеческой фибросаркомы HT1080, которая содержит искусственную хромосому человека (НАС), в которой экспрессируются сенсоры клеточного цикла *GFP-CDT1* и *GFP-GEMININ*. Для упрощения названия системы сенсоров клеточного цикла мы используем аббревиатуру dGFP (destabilized green fluorescence protein). Далее в тексте работы созданная клеточная линия будет называться HT1080 НАС/dGFP (или тест-система).

Экспрессия GFP с сенсорами клеточного цикла должна позволить детектировать потерю искусственной хромосомы непосредственно после развития хромосомной нестабильности. При действии на клеточную популяцию химических веществ, вызывающих хромосомную нестабильность, или при подавлении экспрессии важных для процесса сегрегации хромосом генов происходит нарушение хромосомной трансмиссии и потеря флуоресценции утратившими НАС клетками. По соотношению GFP-позитивных и GFP-негативных клеток в популяции можно определять уровень хромосомной нестабильности.

Трансфекция миРНК с последующим нокдауном генов, участвующих в трансмиссии хромосом, приводит к хромосомной нестабильности и вызывает потерю НАС/dGFP. Ядра клеток, которые утратили НАС/dGFP после обработки миРНК против продукта экспрессии гена-мишени, теряют зеленое свечение. Потерю флуоресценции можно оценить путем анализа изображений, полученных с помощью эпифлуоресцентной, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, высокопроизводительной автоматизированной микроскопии, а также методом проточной цитофлуориметрии. Использование конфокальной микроскопии в сочетании с высокопроизводительным автоматизированным имиджингом позволяет применять тест-систему для высокопроизводительного скрининга библиотек миРНК на 384-луночных планшетах, что обеспечивает высокую производительность и возможность увеличить количество повторов в экспериментах. На Рисунке 3 представлена схема эксперимента по анализу хромосомной нестабильности с помощью системы HT1080 НАС/dGFP. Каждая отдельная лунка 384-луночного планшета содержала пул миРНК против продуктов экспрессии одного гена интереса. Каждую лунку планшета снимали в 9 полях зрения, а трансфекция была выполнена в 3 повторах, таким образом, подсчет флуоресцентных событий производился путем анализа 27 независимых изображений (Рисунок 3), что позволяло получать статистически достоверные данные. В качестве

негативного контроля мы использовали пул неспецифических миРНК, что позволяет исключить артефакты трансфекции.

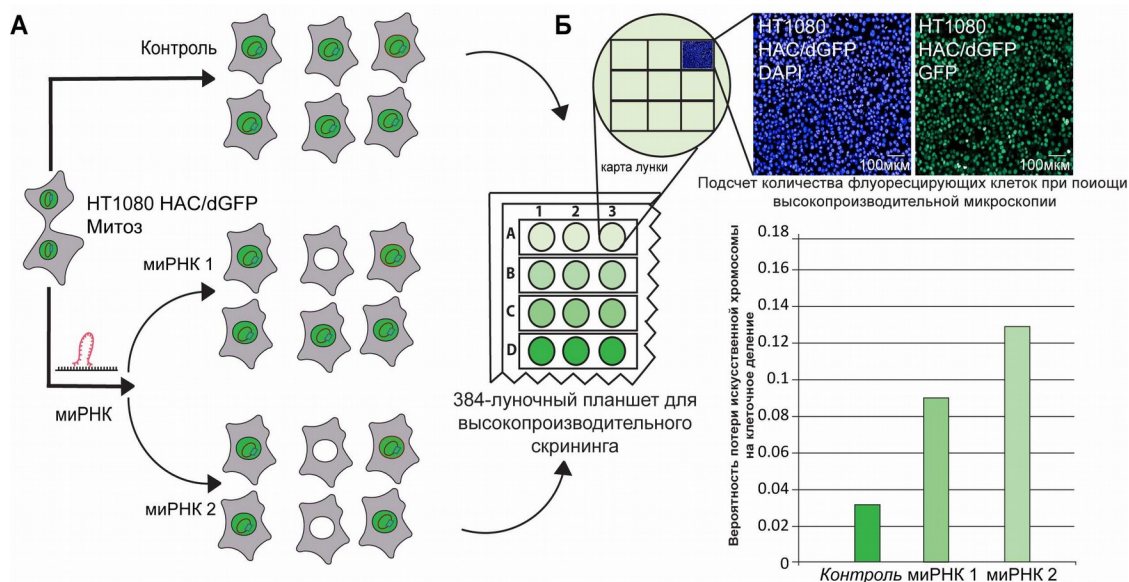


Рисунок 3 – Общая схема эксперимента с клеточной линией HT1080 HAC/dGFP для проведения высокопроизводительного скрининга библиотек миРНК. А – схема потери флуоресценции GFP клетками после нокадауна генов интереса. Контрольная популяция необработанных клеток демонстрирует равномерную зеленую флуоресценцию; клетки, потерявшие искусственную хромосому в результате нокадауна гена интереса, теряют зеленое свечение; Б – масштабирование посадки клеток на 384-луночный планшет и детекция флуоресценции DAPI и GFP. Фактическое количество и долю клеток с HAC/dGFP можно измерить с помощью лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии (LSM) в сочетании с высокопроизводительным автоматизированным имиджингом или применением проточной цитометрии. Интерпретация данных осуществляется в виде вероятности потери искусственной хромосомы на клеточное деление.

3.2 Поиск новых генов, вовлеченных в процесс хромосомной трансмиссии

На основе анализа наиболее важных белков, участвующих в формировании пространственной структуры центрального гетерохроматина и образовании кинетохорного комплекса, был составлен список генов, нокадаун которых должен приводить к сбоям при расхождении хромосом во время митоза. Данные гены были использованы в качестве положительных контролей, среди них: *CENPA*, *AURKB*, *CENPN*, *SKA3*, *OIP5*. На Рисунке 4 продемонстрирована вероятность потери искусственной хромосомы после нокадауна выбранных генов. Рисунки 4А и 4Д иллюстрируют результаты, полученные с помощью метода проточной цитофлуориметрии, а на Рисунках 4Б и 4Е представлены результаты, полученные с помощью высокоэффективного скрининга на автоматизированном конфокальном микроскопе Yokogawa CV7000 Imaging. На Рисунках 4В и 4Ж приведены результаты, полученные с помощью FISH. По результатам сравнения данных, полученных с

помощью 3 методов, мы можем заключить, что подавление экспрессии генов *SKA3* и *OIP5* оказало наиболее достоверный эффект на развитие хромосомной нестабильности, что подтверждает результаты нашей ранее опубликованной работы с применением другой тест-системы (Kim et al., 2016). Результаты данного эксперимента позволяют использовать данные гены в качестве положительного контроля для проведения дальнейшего скрининга.

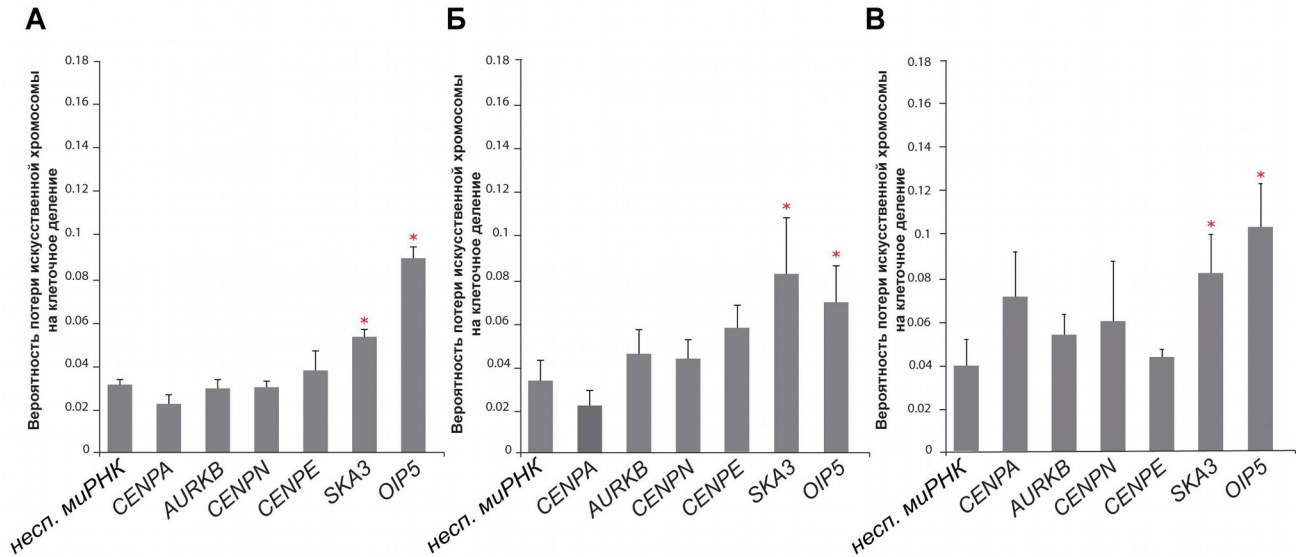


Рисунок 4 – Подбор положительного контроля для проведения скрининга генов-кандидатов. Показана вероятность потери искусственной хромосомы в клетках HT1080 HAc/dGFP через 72 ч после нокдауна контрольных генов методом проточной цитофлуориметрии (А), конфокальной микроскопии (Б) и гибридизации *in situ* (В). Красная звездочка указывает на статистическую значимость ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифическая миРНК).

Чтобы сформировать список генов для проведения скрининга, был проведен поиск генов, которые соответствуют двум критериям, сформулированным нами для выполнения данной работы:

1. Ген-кандидат – это ортолог гена дрожжей *S. cerevisiae* или *S. pombe*, для которого есть хотя бы одно упоминание в литературе о его вовлеченности в процессы сегрегации хромосом или репликации ДНК у дрожжей.
2. Не должно быть упоминаний в литературе, что ген-кандидат играет роль в сегрегации или репликации хромосом в клетках человека.

На Рисунке 5А показаны результаты анализа 28 генов-кандидатов из числа ортологов в человеческом геноме. По результатам можно сказать, что наиболее сильный и

статистически значимый эффект на формирование хромосомной нестабильности оказывает подавление экспрессии гена протеинкиназы С эпсилон (*PRKCE*) (выделена зеленым).

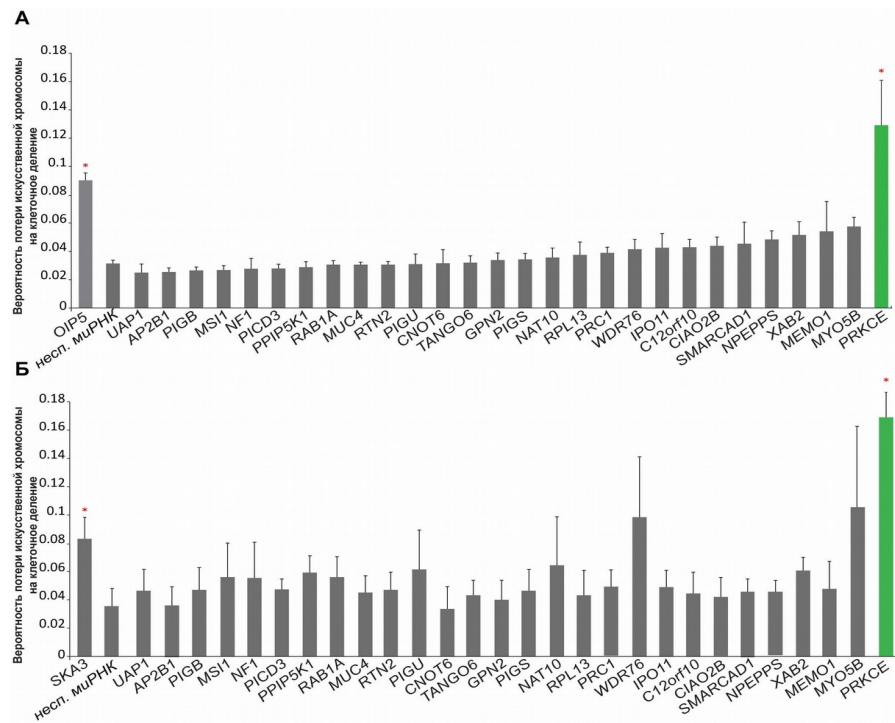


Рисунок 5. Результаты скрининга генов-кандидатов, полученные при помощи метода проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии с системой автоматизированного имиджинга. А – вероятности потери искусственной хромосомы в клетках HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна генов-кандидатов, полученные методом проточной цитофлуориметрии; Б – вероятности потери искусственной хромосомы в клетках HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна генов-кандидатов, полученные методом высокопроизводительной микроскопии. Красная звездочка указывает на статистическую значимость ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифическая миРНК).

Рисунок 5Б демонстрирует результаты анализа тех же 28 генов методом высокоэффективного скрининга на системе Yokogawa CV7000 Imaging. Небольшие различия в данных проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии можно объяснить разностью объемов выборок. Это связано с тем, что метод проточной цитофлуориметрии позволяет учитывать нескольких десятков тысяч клеток, а при проведении высокоэффективного скрининга количество клеток ограничено площадью лунки планшета и составляет не больше 10000 на лунку. Тем не менее, по результатам скрининга, проведенного с применением 2 методов, можно однозначно говорить о зафиксированном эффекте на потерю флуоресценции GFP, что может быть объяснено возникновением хромосомной нестабильности, вызванной подавлением экспрессии гена протеинкиназы С эпсилон.

Результаты скрининга дрожжевых ортологов и тот факт, что антисмысловые РНК против кодирующей последовательности протеинкиназы С эпсилон показали наибольший эффект на развитие хромосомной нестабильности, доказывают чувствительность данной системы для проведения скрининга по выявлению новых генов хромосомной нестабильности. Роль протеинкиназы С эпсилон при формировании структур кинетохора была описана в работе Пайка и Паркера (Pike, Parker, 2016), что служит подтверждением работоспособности созданной тест-системы.

В данной работе мы применили клеточную линию NT1080 HAC/dGFP для проведения высокопроизводительного скрининга генов на предмет их вовлеченности в процесс митотической трансмиссии хромосом, продукты которых стали мишенями для библиотеки антисмысловых РНК. В качестве инструмента для скрининга была использована библиотека интерферирующих РНК против мРНК генов протеинкиназ человека. По результатам подсчета соотношения GFP-положительных и GFP-негативных клеток, а также дальнейшего расчета вероятности потери искусственной хромосомы на одно клеточное деление нами было выявлено 35 возможных кандидатов среди генов данной библиотеки, показавших статистически достоверные различия по отношению к контролю (Рисунок 6).

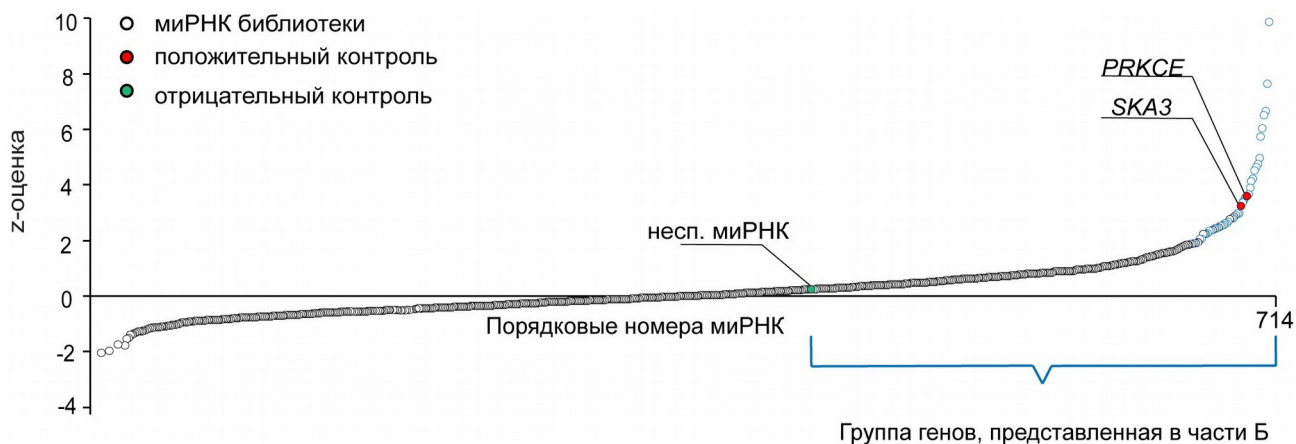


Рисунок 6 – Результаты высокоэффективного скрининга библиотеки протеинкиназ с помощью высокопроизводительной конфокальной микроскопии. Средняя интенсивность флуоресценции GFP в лунках 384-луночного планшета через 72 ч после нокдауна с помощью библиотеки миРНК против транскриптов генов протеинкиназ. Посчитана вероятность потери искусственной хромосомы на клеточное деление через 72 ч после нокдауна генов с помощью библиотеки миРНК. Синим обозначены точки, имеющие статистическую значимость ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифические миРНК).

Для подтверждения результатов, полученных при высокопроизводительном скрининге библиотеки миРНК, мы использовали трансфекцию дополнительными миРНК, подобранными на независимые участки мРНК 35 генов-кандидатов. Данный подход был применен, чтобы избежать неспецифического воздействия миРНК на нецелевые

транскрипты. На Рисунке 7 представлены 8 генов-кандидатов, результаты нокадауна которых приводят к возникновению хромосомной нестабильности. Для каждого из 8 генов был выполнен иммуноблотинг, который позволил подтвердить отсутствие белкового продукта подавляемого гена в клетках, трансфицированных миРНК (Рисунок 7Б).

Кроме того, на рисунке 7 представлен результат FISH-анализа – непосредственный подсчет метафазных пластин, имеющих и не имеющих сигнал от гибридизационного зонда PNA на последовательности *tetO* в составе искусственной хромосомы (Рисунок 7А). Данные об уровне потери искусственной хромосомы были дополнительно подтверждены с помощью высокопроизводительной конфокальной микроскопии.

Таким образом, с помощью миРНК-опосредованного нокадауна генов-кандидатов, подтвержденного иммуноблотингом и FISH-гибридизацией, мы можем сказать, что нокадаун генов *IRAK*, *BUB1*, *BUB1B*, *PINK1*, *TAOK1*, *STK38*, *TRIO*, *PNCK*, *PRKCE* вызывает хромосомную нестабильность.

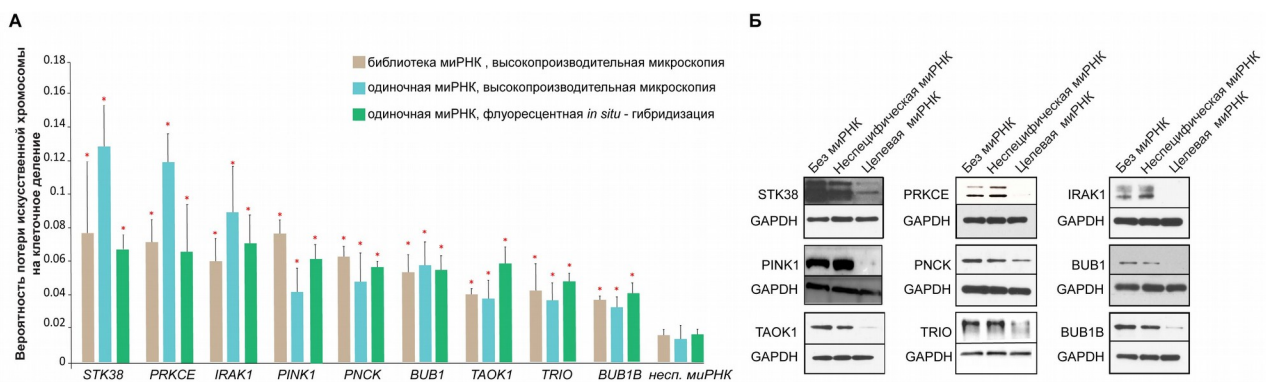


Рисунок 7 – Подтверждение результатов скрининга с помощью методов флуоресцентной гибридизации *in situ* и иммуноблотинга. А – вероятность потери искусственной хромосомы на одно клеточное деление после нокадауна генов-кандидатов миРНК из библиотеки и дополнительными миРНК; подтверждение полученного результата с помощью гибридизации *in situ* и высокопроизводительной конфокальной микроскопии; Б – иммуноблотинг через 72 ч после нокадауна-генов кандидатов; Красная звездочка указывает на статистическую значимость ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифическая миРНК).

3.3 Апробация созданной тест-системы для скрининга лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность

Для проведения апробации клеточной линии HT1080 HAC/dGFP для скрининга препаратов-кандидатов, способных влиять на уровень хромосомной нестабильности, была проведена серия экспериментов с применением библиотеки экстрактов из объектов живой природы. Для этого был применен принцип, аналогичный тому, что был использован для

идентификации генов хромосомной нестабильности (Рисунок 8). Вещества-кандидаты, вызывающие хромосомную нестабильность, приводят к потере НАС, вследствие чего происходит потеря флуоресценции утратившими НАС клетками. В данном случае детекцию хромосомной нестабильности проводили с использованием флуоресцентного планшетного ридера с функцией имиджинга и проточной цитофлуориметрии (Рисунок 8Б). В качестве положительного контроля был использован ингибитор деполимеризации микротрубочек – таксол в концентрации 10 нМ, что соответствует значению IC 50 для клеток HT1080 (Lee et al., 2013) (Рисунок 8).

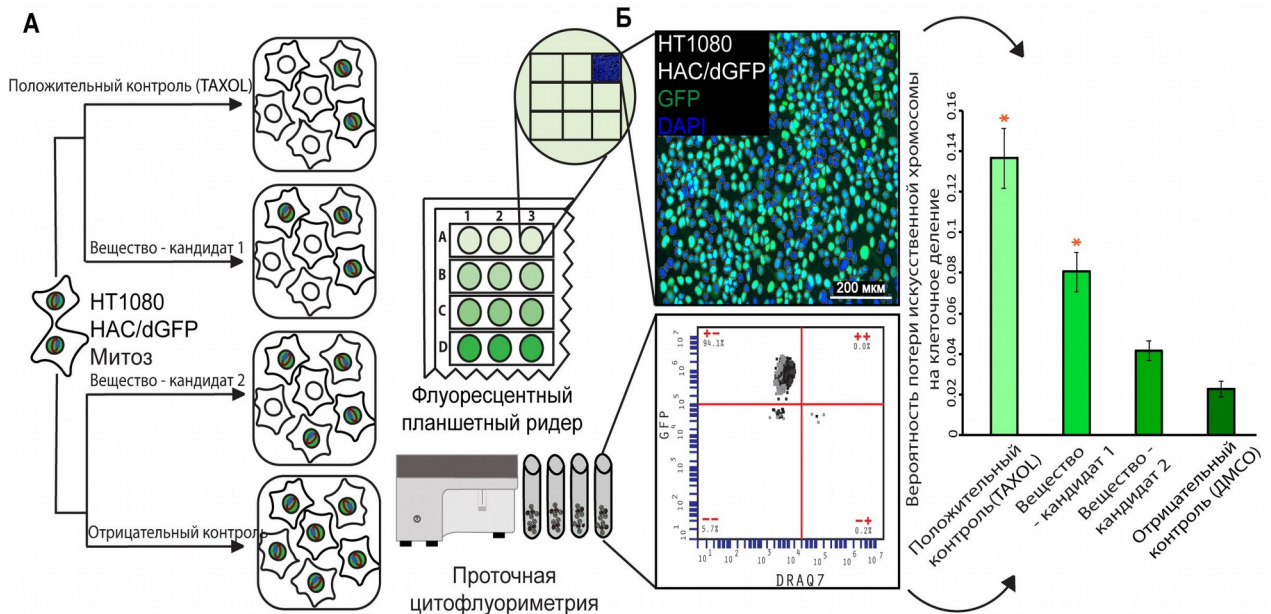


Рисунок 8 – Схема эксперимента для поиска лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность, с помощью клеточной линии HT1080 HAC/dGFP. А – организация контрольных и экспериментальных точек скрининга лекарственных кандидатов; Б – визуализация потери флуоресценции с использованием флуоресцентного планшетного ридера с функцией имиджинга и проточной цитофлуориметрии, с последующей интерпретацией данных в виде расчета вероятности потери НАС на одно клеточное деление.

В клетках, обработанных таксолом, происходит образование микроядер и возникает хромосомная нестабильность (Dumontet, 2010). Ранее таксол уже применяли в качестве положительного контроля для определения уровня хромосомной нестабильности в системах с НАС (Lee et al., 2013). Для проведения скрининга высушенные экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения маточных растворов, разбавляемых затем средой для культивирования до конечной концентрации, при которой концентрация ДМСО

(0,2%) не токсична для клеток. В качестве отрицательного контроля использовали 0,2% ДМСО в питательной среде.

В соответствии с описанными выше принципами мы выполнили поиск лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность, и провели ее количественную оценку (Рисунок 9). В качестве препаратов для скрининга мы использовали уникальную коллекцию экстрактов с потенциальными противораковыми свойствами. Экстракты были выделены из различных представителей биоты: *Punica granatum*, *Acalypha* sp., *Dombeya* sp., *Eugenia* sp., *Agaricus* sp., *Pleurotus* sp., *Lotrochota* sp. и *Neopetrosia* sp.

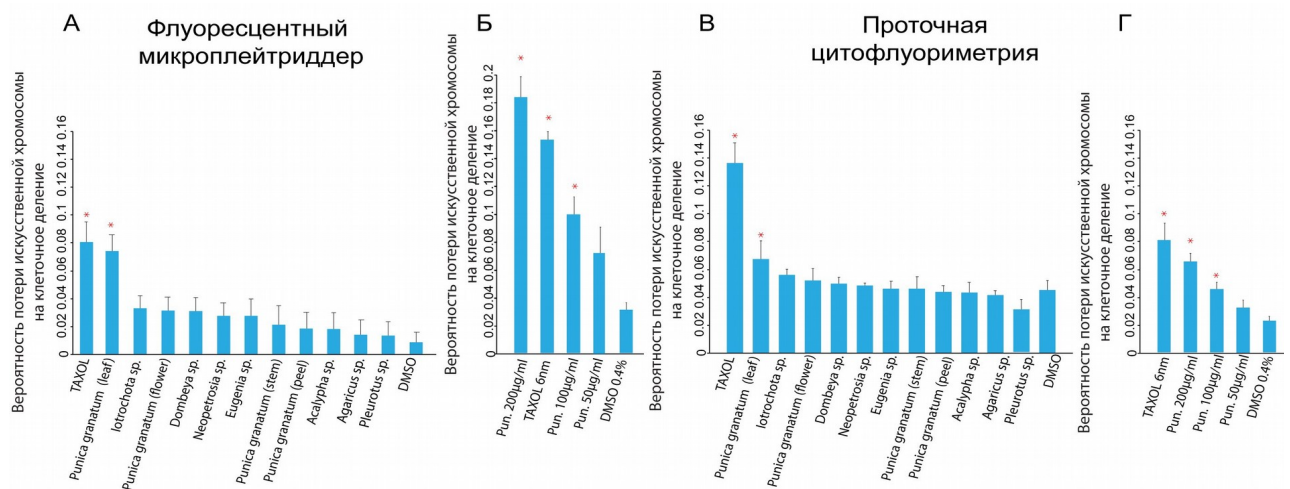


Рисунок 9 – Результаты скрининга фармакологических кандидатов. А – вероятность потери искусственной хромосомы человека под действием тестируемых экстрактов (флуоресцентный планшетный ридер); Б – вероятность потери искусственной хромосомы человека под действием различных концентраций экстракта из листьев *P. granatum* (флуоресцентный планшетный ридер); В – вероятность потери искусственной хромосомы человека на одно клеточное деление под действием коллекции природных экстрактов (проточная цитофлуориметрия); Г – вероятность потери искусственной хромосомы человека на одно клеточное деление под действием различных концентраций экстракта из листьев *P. granatum* (проточная цитофлуориметрия). Красная звездочка указывает на статистическую значимость ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательным контролем (DMSO 0,4%).

Таким образом, мы наблюдали дозозависимый эффект экстракта из листьев *P. granatum* на развитие хромосомной нестабильности. Для подтверждения данных, полученных с помощью флуоресцентного планшетного ридера с функцией имиджинга, был использован метод проточной цитофлуориметрии (Рисунок 9В, Г). Результаты, полученные с применением обоих методов, показали, что достоверный высокий уровень хромосомной

нестабильности наблюдали при концентрациях экстракта от 200 мкг/мл через 24 ч действия препарата.

Для выявления возможных цитостатических эффектов экстракта из листьев *P. granatum* был выполнен опыт с использованием высокопроизводительной прижизненной микроскопии и отслеживанием изменения скорости пролиферации клеток с помощью цейтраферной съемки в системе высокопроизводительной автоматизированной микроскопии. Для этого на клетках линии HT1080 HAc/dGFP и иммортализованной клеточной линии пигментированного эпителия RPE1 исследовали влияние различных концентраций (50, 100, 200 и 400 мкг/мл) экстракта из листьев *P. granatum*. Была выявлена дозозависимая антипролиферативная активность экстракта в отношении клеток HT1080 и RPE1 через 24 ч инкубации при регистрации поведения клеток в течение 5 сут (Рисунок 10).

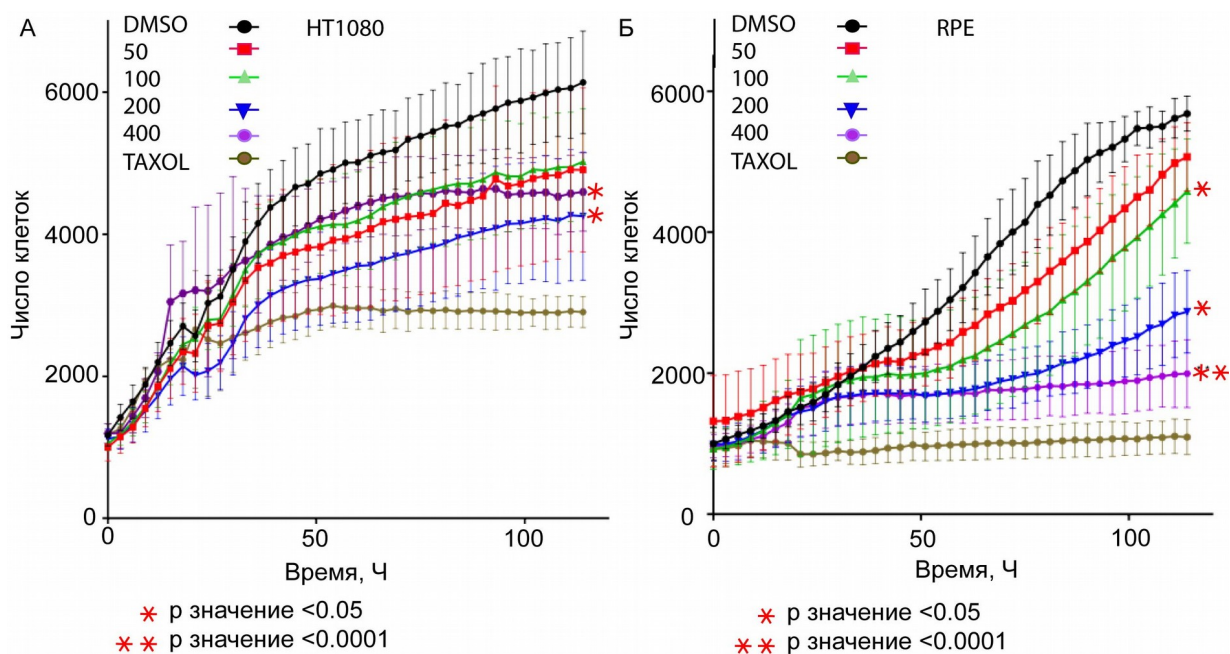


Рисунок 10 –Динамика численности клеток HT1080 HAc/dGFP и RPE1 после воздействия различных концентраций экстракта листьев *P. granatum*. А – клеточная линия HT1080; Б – клеточная линия RPE1.

Для установления возможных причин замедления клеточной пролиферации под действием тестируемого экстракта был выполнен анализ клеточного цикла линий HT1080 HAc/dGFP и RPE1 после обработки экстрактом листьев *P. granatum* в различных концентрациях (Рисунок 11). Данные проточной цитофлуориметрии с использованием

красителя Hoechst 33342 показали, что под действием экстрактов из листьев *P. granatum* происходит блок клеточного цикла в фазах G2/M.

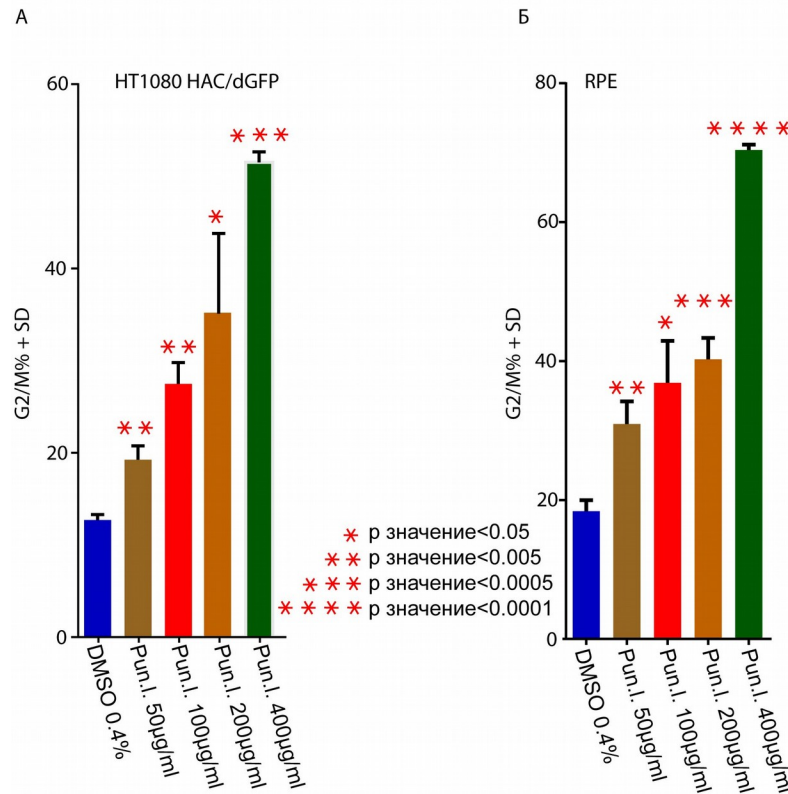


Рисунок 11 – Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии и использования Hoechst 33342. А – доля клеток HT1080 HAC/dGFP в фазе G2/M после обработки экстрактом из листьев *P. granatum*; Б – доля клеток RPE1 в фазе G2/M после обработки экстрактом из листьев *P. granatum*.

Чтобы определить, на какой стадии клеточного цикла, G2 или M, происходит остановка клеточного цикла, был проведен анализ митотического индекса клеток RPE1 и HT1080 после обработки экстрактом в концентрациях 50, 100, 200 и 400 мкг/мл. Результаты показали, что с увеличением концентрации число митозов уменьшается. Отсюда следует, что остановка клеточного цикла происходит на стадии G2, что увеличивает вероятность того, что клеточный цикл блокируется в контрольной точке G2-митоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании разработана тест-система НТ1080 НАС/dGFP, представляющая собой клеточную линию фибросаркомы НТ1080, несущую искусственную хромосому человека. Данная тест-система имеет флуоресцентную индикацию и позволяет идентифицировать гены и продукты их экспрессии, участвующие в процессе хромосомной трансмиссии, а также проводить скрининг препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность. Данная система позволяет получать в течение 72 ч данные о результатах скрининга нескольких сотен генов или препаратов, анализируемых в качестве факторов, вызывающих хромосомную нестабильность.

В ходе данной работы был проведен скрининг 28 генов человека, имеющих ортологи в клетках дрожжей, которые участвуют в митотической трансмиссии хромосом. В результате скрининга было показано, что подавление экспрессии гена протеинкиназы С эпсилон (*PRKCE*) приводит к хромосомной нестабильности.

Использование конфокальной микроскопии в сочетании с высокопроизводительным автоматизированным имиджингом позволяет применять тест-систему для скрининга библиотек миРНК. Для демонстрации возможности высокопроизводительного скрининга был проведен анализ библиотеки миРНК против кодирующих последовательностей протеинкиназ человека, включающей 714 пулов миРНК. В ходе выполнения данного скрининга впервые была обнаружена связь генов *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1* и *TRIO* с процессом митотической трансмиссии хромосом.

Тест-система НТ1080 НАС/dGFP была апробирована для поиска лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность. В результате было показано, что экстракт из листьев граната обыкновенного (*P. granatum*) в концентрациях от 200 мкг/мл достоверно вызывает высокий уровень хромосомной нестабильности. Эти данные позволяют использовать тест-систему НТ1080 НАС/dGFP для поиска новых соединений, вызывающих хромосомную нестабильность.

Идентификация новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом человека имеет решающее значение для понимания механизмов регуляции митоза. Анализ роли каждого гена хромосомной нестабильности, идентифицированного в этом исследовании, в сложном процессе передачи хромосом будет предметом будущих исследований. А дальнейшее изучение эффектов компонентов экстракта из листьев *P. granatum* на трансмиссию хромосом и регуляцию клеточного цикла может обеспечить создание новых терапевтических подходов, направленных на борьбу с раковыми клетками.

ВЫВОДЫ

1. На основе клеточной линии, содержащей искусственную хромосому человека, сконструирована тест-система HT1080 HAC/dGFP, позволяющая количественно и в короткие сроки (72 ч) идентифицировать уровень хромосомной нестабильности и выявлять молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом.
2. С использованием разработанной системы обнаружены новые молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом человека – гены *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1*, *TRIO* – и продукты их экспрессии.
3. Показано, что сконструированная тест-система позволяет проводить скрининг препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность. С применением системы установлено, что экстракт из листьев граната обыкновенного (*Punica granatum*) вызывает хромосомную нестабильность при значительном снижении пролиферативной активности и увеличении доли клеток в периоде G2 клеточного цикла.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Kim J.H., Lee H.S., Lee N.C., **Goncharov N.V.**, Kumeiko V., Masumoto H., Earnshaw W.C., Kouprina N., Larionov V. Development of a novel HAC-based «gain of signal» quantitative assay for measuring chromosome instability (CIN) in cancer cells // *Oncotarget*. 2016. V. 7, № 12. P. 14841–14856.
2. Liskovykh M., **Goncharov N.V.**, Petrov N., Aksenova V., Pegoraro G., Ozbun L.L., Reinhold W.C., Varma S., Dasso M., Kumeiko V., Masumoto H., Earnshaw W.C., Larionov V., Kouprina N. A novel assay to screen siRNA libraries identifies protein kinases as required for chromosome transmission // *Genome Research*. 2019. V. 29, № 10. P. 1719–1732.

Работы в материалах всероссийских и международных конференций:

3. Mikhailova V., **Goncharov N.**, Shved N., Tiasto V., Belousov A., Chichinkas E., Kouprina N., Larionov V., Kumeiko V., Kagansky A. A new application of HAC/dGFP *in vitro*

assay for screening of the compounds inducing chromosome instability // Future of Biomedicine 2019 Conference, 17–22 September 2019, Vladivostok, Russia. Abstract book. – Vladivostok: Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2019. P. 78.

4. **Goncharov N.**, Liskovykh M., Belousov A., Kouprina N., Kumeiko V., Larionov V. Development of a new high-throughput assay of siRNA libraries for identification of genes inducing chromosome instability (CIN) in cancer cells // 44th FEBS Congress «From Molecules to Living Systems», 6–11 July 2019, Krakow, Poland. – FEBS Open Bio. 2019. V. 9, № S1. P. 340.

5. **Гончаров Н.В.**, Лисковых М., Карп Т.Д., Белоусов А.С., Николас КО Ли, Хи Шеунг Ли, Куприна Н., Ларионов В., Кумейко В.В. Новые молекулярные детерминанты нестабильности трансмиссии хромосом человека и тест-система для ее идентификации // Дни науки [Электронный ресурс]: сборник материалов научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Владивосток, 16 апреля – 18 мая 2018 г.). Ч. 1. Материалы Школы биомедицины и Школы искусств и гуманитарных наук ДВФУ. – Владивосток: Изд-во Дальневосточного федерального ун-та, 2018. С. 13. Режим доступа: <https://www.dvfu.ru/science/publishing-activities/catalogue-of-books-fefu/>.

6. **Goncharov N.**, Liskovykh M., Karp T., Belousov A., Kouprina N., Mikhailova V., Tiasto V., Kagansky A., Kumeiko V., Larionov V. Development of a new high-throughput assay for screening drug inducing chromosome instability (CIN) in cancer cells // Future of Biomedicine 2017 Conference, 11 September 2017, Vladivostok, Russia. Abstract book. – Vladivostok: Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2017. P. 86.

7. **Гончаров Н.В.**, Николас КО Ли, Хи Шеунг Ли, Куприна Н., Ларионов В. Модификация искусственной хромосомы человека для оценки уровня хромосомной нестабильности // VI Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология», 16– 21 ноября 2014 г., Звенигород, Россия. Тезисы докладов. – М.: Институт молекулярной генетики РАН, 2014. С. 19.

ГОНЧАРОВ НИКОЛАЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМОСОМНОЙ
НЕСТАБИЛЬНОСТИ И НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ
ТРАНСМИССИИ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук