

ПОДСЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ»

Устные доклады

Influence of nucleoid-associated proteins on genome compaction in *E. coli*

Июа М. Flyamer (Илья Михайлович Флямер)

Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, Moscow

Genomes are large structures that must be dramatically compacted to fit into cells, and this genome folding must be carefully orchestrated to ensure that the DNA is accessible for transcription and replication.

The process of genome compaction in bacteria is poorly understood. Among the many factors that influence DNA folding in bacteria are the nucleoid-associated protein (NAPs) NAPs interact with DNA in different ways: they wrap it, bridge, bend, loop and form supercoiled structures.

Our work focused on the NAPs H-NS and Fis. The first is a global transcription regulator that primarily silences genes to which it binds. H-NS also facilitates DNA bridging and supercoil formation. Unlike H-NS, Fis can both activate and repress gene expression. Unlike H-NS, there is no known selectivity to Fis binding. Similarly to H-NS, Fis facilitates DNA bridging and DNA topoisomeric structure control. A well-known difference between H-NS and Fis concerns their abundance in different phases of bacterial growth: H-NS is constantly present, but Fis can't be detected in the lag- and stationary phases of bacterial population growth.

We analysed the influence of H-NS and Fis on genome compaction in *E. coli* using the *parS/parB* system to label specific genomic loci with a ParB-GFP fusion protein. We recorded the movement of fluorescent loci *in vivo*, and tracked loci to estimate their motility both in wild-type cells and H-NS and Fis null mutants. We expected to observe an increase in loci motility in the NAP null mutants, as we hypothesised that the DNA would be less constrained. As expected, loss of Fis did increase loci motility, however, our data suggest that loss of H-NS causes a decrease in motility. We do not yet know the reason for such different effects, and further experiments are required to fully understand the influence of the NAPs on chromosome folding.

Investigating the effects of PKA phosphorylation on the cytoplasmic functions of the P-body protein Pat1b

Nadezhda A. Fursova (Фурсова Надежда Андреевна)

Moscow State University, Faculty of Biology, Russian Federation, Moscow,

mrs.hope@yandex.ru

P-bodies are cytoplasmic foci in eukaryotic cells where many processes of post-transcriptional gene regulation take place. Pat1 is a component of P-bodies, with functions in translational repression and mRNA decay. Recently a key regulatory mechanism of P-body formation was found in yeast. It involves PKA phosphorylation of the Pat1b protein which leads to P-body disassembly and has long-term survival effects on stationary phase cells.

To assess the effect of PKA phosphorylation on the cytoplasmic functions of Pat1b in vertebrates we constructed two novel mutant Pat1b proteins and tested them in two types of model organisms – human somatic cells and *X. laevis* oocytes.

The tethered function assay in HEK-293T cells was conducted to assess an effect of mutations on the Pat1b RNA-related functions. Moreover, we performed immunofluorescence microscopy in HeLa cells transfected with wild type and both mutant proteins to visualize any effects of these mutations on the P-bodies formation. Microinjection of mRNA in *Xenopus* oocytes was used to investigate the role of PKA phosphorylation on Pat1b functioning in translational control of maturation.

For the tethered function assay we have found that the post-transfection time influences the fold repression of reporter mRNA translation for tested proteins. We assume that it is connected with a different total phosphorylation level in cells of varying confluence. Data of immunofluorescence microscopy indicate that Pat1b phosphorylation leads to the disassembly of P-bodies.

Using *Xenopus* oocytes system we show that expression of xPat1b T480E mutant protein leads to an increased maturation rate and expression of both xPat1b T480A mutant and xPat1a (which naturally lacks this PKA site) proteins cause a delay in oocyte maturation.

Altogether, we were able to demonstrate that PKA phosphorylation of human and *Xenopus* Pat1b influences P-bodies formation. Our future plans are to continue investigation of its possible links with the quiescent cell state.

Исследование мутантных копий внеклеточной митохондриальной ДНК в моче облученных крыс

Абдуллаев Серажутдин Абдуллаевич

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия,
abdullaev.iteb@rambler.ru*

В последнее десятилетие значительно возрос интерес к исследованиям внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях при изучении механизмов развития различных патологий. Методом ПЦР в режиме реального времени было исследовано изменение общего количества копий трансрентальной (преодолевшей почечный барьер) внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) наряду с ядерной ДНК (вк-ядДНК) в моче крыс, после их рентгеновского облучения в дозах 3 и 5 Гр, и в зависимости от пострadiационного времени (от 6 часов до 30 дней). У этих же животных в моче анализировали уровень мутантных копий вк-мтДНК. Мутации определяли по расщеплению CEL-I эндонуклеазой (фермент, расщепляющий неспаренные основания) гетеродуплексов, получаемых путем гибридизации ПЦР-ампликонов вк-мтДНК (Cyt-B - регион) облученных и контрольных образцов. Результаты показали, что уровень общего количества мтДНК и яДНК в моче облученных крыс зависит как от пострadiационного времени, так и от дозы облучения. Так, максимальное количество копий мтДНК и яДНК регистрировалось на 12-24-е часы после их облучения. Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК в 2-3 раза выше, по сравнению таковым вк-ядДНК. Анализ уровня мутантных копий вк-мтДНК показал, что гетеродуплексы, полученные гибридизацией продуктов ПЦР мтДНК до облучения (контроль) и в разные сроки после облучения, расщепляются CEL I эндонуклеазой в большей степени, чем гетеродуплексы, полученные путем смешивания продуктов ПЦР мтДНК контрольного образца. Это указывает на наличие радиационно-индуцированных мутаций в участках вк-мтДНК. Показано, что мутагенез мтДНК имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения. Максимальный уровень мутантных копий мтДНК (гена Cyt-B) приходится на 3-е сутки после облучения. Полученная динамика изменений количества копий общей мтДНК и мутантных копий мтДНК в моче указывает на то, что из тканей облученных животных в пострadiационный период в мочу элиминируются мутантные копии мтДНК. Наблюдаемая элиминация может рассматриваться как результат избирательной деградации митохондрий, несущих мутантные копии ДНК, так и продолжающейся клеточной гибели в тканях облученных животных. Повышенное содержание циркулирующей внеклеточной мтДНК с мутациями в моче можно рассматривать как потенциальный маркер для оценки результативности радиотерапии опухолей, уровня генотоксического груза при радиационном поражении организма и воздействия других

генотоксических агентов. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-31070.*

Репортерная система для анализа активности транскрипционных факторов в эукариотических клетках

^{1,2}Бондарева Ольга Александровна, ²Бобровский Павел Александрович, ³Аниканов Николай Андреевич, ²Полина Надежда Федоровна, ²Манувера Валентин Александрович
¹Московский физико-технический институт (ГУ), Москва, Россия; ²НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия; ³Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, synchronika@gmail.com

«Золотым» стандартом для изучения клеточного ответа является репортерный анализ с использованием генетических конструкций, в которых активируемый транскрипционный фактор контролирует экспрессию репортерного гена. Однако этот метод имеет недостатки, связанные с процессом детекции активации транскрипционных факторов. К ним относятся ограниченное число репортерных белков и незащищенность их от воздействия посттранскрипционных механизмов. Для исключения этих недостатков мы разработали репортерную систему, основанную на использовании протеотипических пептидов (ptr) — пептидов, регулярно и с высокой вероятностью детектируемых с помощью масс-спектрометрического анализа. Была получена серия генетических конструкций на основе плазмидных векторов, несущих в своем составе сайт связывания транскрипционного фактора, минимальный промотор, последовательность, кодирующую протеотипический пептид и ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Далее была проведена валидация системы на примере транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией – HIF и GATA. Трансфицированные клетки линии HEK293 были обработаны CoCl_2 , модельным веществом для индукции гипоксии. При помощи флуоресцентной микроскопии была зарегистрирована активация факторов HIF и GATA. Затем был проведен белковый электрофорез в денатурирующих условиях и трипсинолиз. Детекция ptr производилась методом tandemного масс-спектрометрического анализа, совмещенного с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (LS-MS/MS) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Разработанная репортерная система может быть использована не только для детекции, но и для количественного анализа активируемых транскрипционных факторов. В перспективе возможно применение для анализа клеточного ответа на лекарственные препараты или токсичные вещества, а также для исследования функций самих транскрипционных факторов и их роли в развитии различных заболеваний.

Изучение специфического модуля РВАФ комплекса, ремоделирующего хроматин у млекопитающих

Валиева Мария Евгеньевна, Сошникова Н.В., Бречалов А. В., Георгиева С. Г.
Институт биологии гена РАН, лаборатория факторов транскрипции эукариот, Россия, Москва, durnoreuko-maria@rambler.ru

Ремоделирующий хроматин РВАФ комплекс состоит из коровой части, в состав которой входит АТФ-аза, и четырех специфических белков PHF10, BRD7, BAF180 и BAF200 отвечающих за связывание с хроматином. Белковые комплексы, участвующие в регуляции экспрессии генов, часто не имеют постоянного состава, и их субъединицы могут входить в

состав нескольких комплексов. Целью работы было определить, включаются ли специфические субъединицы PBAF в другие комплексы или являются характерными только для данного ремоделирующего комплекса PBAF.

В результате данной работы были получены и очищены с помощью афинной хроматографии поликлональные антитела к одной из субъединиц – BAF180, охарактеризована специфичность данных антител, определена их рабочая концентрация. С помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток была показана ядерная локализация белка BAF180 в клетках человека линии HEK293.

В экспериментах по сосаждению соответствующими антителами белков, составляющих специфический модуль, выяснилось, что не все субъединицы полностью истощают друг друга из лизата клеток. Например, не удается истощить PNF10 за антитела к другим специфическим белкам. А PNF10, в свою очередь, истощая себя, не полностью истощает другие белки. Для остальных исследуемых субъединиц показано, что они находятся в едином модуле. А именно, три белка — BAF180, BAF200 и BRD7 истощают себя и друг друга из экстрактов клеток HEK293.

Таким образом, можно утверждать, что BAF180, BAF200 и BRD7 являются постоянными субъединицами модуля комплекса PBAF и в HEK293 тесно взаимодействуют друг с другом. PNF10, в основном, тоже находится в модуле, но также, вероятно, входит либо в состав другого комплекса, либо может существовать самостоятельно. Полученные данные указывают на возможность наличия дополнительных функций для белков комплекса PBAF.

Количественное сравнение митохондриальной ДНК одиночных клеток астроцитов из разных отделов головного мозга крысы

Васильев Александр Александрович, Можей Олег Игоревич

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Кафедра Молекулярной физиологии и биофизики, Россия, Калининград, otherlife@bk.ru

В настоящее время очень активно ведутся работы, в ходе которых выявляют особенности генной экспрессии астроцитов из разных отделов мозга. Митохондрии, как органеллы выполняющие, прежде всего, энергообразующую функцию, являются важным объектом исследования, они могут дать ответ на некоторые энергозависимые механизмы, происходящие в астроцитах разных отделов головного мозга.

Для определения количества копий мтДНК в астроцитах, проводили цифровую капельную пцр на одиночных клетках из разных отделов головного мозга крысы. В качестве целевого гена использовали митохондриальный ген ND5, ген бета актина был использован как референсный.

Было показано, что количество мтДНК отличается в зависимости от отдела головного мозга. Данные были составлены на основе анализа 10 отдельных клеток астроцитов, из четырёх отделов мозга. Среднее значение для каждого из отделов головного мозга следующее: кора – 7829, мозжечок – 9253, ствол мозга – 8995, гиппокамп – 9460. для сравнения выборок использовался параметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Результаты статистического анализа показывают что: число копий мтДНК в астроцитах коры полушарий головного мозга статистически отличается от мозжечка, ствола мозга и гиппокампа. Число копий мтДНК в астроцитах трёх других локализаций статистически не отличается между собой.

Биологический смысл различия количества мтДНК в астроцитах в зависимости от их локализации, вероятно, в том, что различные области головного мозга требуют разное количества энергии. Однако митохондрии принимают участие и в процессах передачи сигнала.

Не исключено, что различное количество мтДНК свидетельствует о различном количестве митохондрий, отражает общую функциональную гетерогенность в астроцитах головного мозга.

Нуклеосом-специфичные остановки РНК-полимеразы в присутствии разрывов в нетранскрибируемой цепи ДНК

Герасимова Надежда Сергеевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, shordome@gmail.com

Нарушение сахарофосфатного остова одной из цепей ДНК – одно из наиболее часто возникающих в клетке повреждений. Разрыв матричной цепи *in vitro* вызывает остановку транскрибирующей РНК-полимеразы, однако такого не наблюдается при нарушениях комплементарной цепи. В то же время *in vivo* у эукариотических организмов ДНК организована в хроматин, что может влиять на наблюдаемые эффекты.

Ранее в лаборатории в экспериментальной системе с использованием «минимальных» моонуклеосомных матриц, транскрибируемых *in vitro*, было показано, что одноцепочечный разрыв (ник) в нетранскрибируемой цепи оказывает влияние на скорость элонгации РНК-полимеразы только в том случае, когда ДНК находится в составе нуклеосомы.

Так, эксперименты с точно позиционированной нуклеосомой показали, что наличие ника в начале нуклеосомной ДНК вызывает остановку РНК-полимеразы. В работе ингибирующий эффект ников на транскрипцию нуклеосом был детально охарактеризован с использованием матриц, содержащих одиночные разрывы ДНК в различных положениях на нематричной цепи нуклеосомной ДНК. Присутствие ников вызывает остановку РНК-полимеразы в положениях, расположенных ниже по течению относительно положений ников. Места остановки фермента имеют выраженную 10-пн периодичность. Эффективность зависит от положения разрыва относительно места остановки.

Предполагается, что такой эффект связан с механизмом элонгации через нуклеосомную ДНК, а именно с формированием интермедиатов, в которых фермент оказывается остановленным в петле ДНК на гистоновом октамере. По предлагаемой модели, разрыв одной цепи уменьшает напряжение в структуре ДНК, вызванного транскрипцией, и замедляет раскрытие петли и дальнейшую элонгацию транскриптов. Остановка РНК-полимеразы в клетках может приводить к активации системы репарации. Поэтому мы предполагаем, что обнаруженный эффект в живых организмах может приводить к ускорению репарации разрывов некодирующей цепи ДНК, которые в других случаях могут оставаться незаметными для системы репарации из-за взаимодействия с гистонами.

Работа поддержана грантом № 11.034.31.0009 в рамках постановления №220 Правительства Российской Федерации.

Характеристика субдоменной организации слитого локуса альфа-бета-глобиновых генов *Danio rerio*

Долгушин Константин Владимирович, Петрова Наталья Валентиновна

ФГБУН Институт биологии гена, Российская Академия наук, Лаборатория структурно-функциональной организации хромосом

В рамках теории доменной организации генома структурно-функциональной единицей генома является домен – ген и его регуляторные элементы. Домен слитых α - β -глобиновых генов рыб является интересной моделью как для изучения регуляторных систем, так и с эволюционной точки зрения. У теплокровных α и β глобиновые гены сегрегированы и расположены в разных местах генома, представляя собой домены, устроенные и регулируемые принципиально различным образом. Домен слитых α - β -глобиновых генов *Danio rerio* близок по

своей структуре к организации предкового локуса, в его составе четко выделяются два субдомена, обладающих дифференцированным, стадиейспецифичным паттерном экспрессии. Основная задача работы – продемонстрировать что эмбриональные и взрослые субдомены разнородны по своей природе, а возможно изолированы не только функционально, но и структурно.

Для изучения структурно-функциональной организации слитого домена и субдоменов использовали сопоставление ДНКазной чувствительности хроматина различных локусов в составе домена, выделенного из хроматина фибробластов. Кроме того, с использованием метода нативной иммунопреципитации изучали распределение активирующих и репрессирующих модификаций гистонов на протяжении всего локуса, включая участок между эмбриональным и взрослым субдоменами. В этих экспериментах использовали хроматин, выделенный из взрослых и эмбриональных эритроцитов и фибробластов *Danio rerio*.

По уровню чувствительности к ДНКазе I в клетках, не экспрессирующих глобины, слитый локус показывает гетерогенный характер конденсированности структуры. Распределение активирующих модификаций во взрослых и эмбриональных эритроцитах носит альтернативный стадиейспецифичный характер. Во взрослых эритроцитах маркирован локус взрослых генов, в эмбриональных – эмбриональный локус. Во взрослых эритроцитах субдомен ацетилированных гистонов H3 и H4 выходит за границы локуса взрослых генов, вероятно границы локуса и субдомена не совпадают; в эмбриональном локусе накапливаются модификации H3K9me2, H3K27me3, обеспечивая стадиейспецифичную репрессию субдомена. В эмбриональных эритроцитах границы локуса эмбриональных генов совпадают с границами субдомена ацетилированных гистонов H3 и H4; в хроматине взрослого локуса накапливается модификация H3K27me3, характерная для репрессии белками группы Polycomb. В фибробластах остаточный уровень ацетилирования взрослого и эмбрионального локусов не отличается.

Мы показали, что структура слитого домена α - β -глобиновых генов *Danio rerio* является неоднородной. Различие в ДНКазной чувствительности субдоменов в неэритроидных клетках позволяет предполагать использование различных механизмов репрессии субдоменов. Функциональная стадиейспецифичная изоляция субдоменов сопровождается их структурным обособлением. Полученные данные позволяют предполагать наличие геномных регуляторных элементов, сегрегирующих субдомены.

Работа финансирована из грантов РФФИ, Программа президиума РАН МКБ 12-0493110-НЦНИЛ, РФФИ, Программа президиума РАН МКБ 12-00313.

Генетический полиморфизм трематод рода *Leucochloridium*

Жукова Алина Александровна, Токмакова Арина Сергеевна

Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, alina.pospelova@zooherzen.org; Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет, Санкт-Петербург, Россия, arina.tokmakova@gmail.com

В настоящее время при уточнении таксономического статуса организмов и при оценке внутривидовой изменчивости молекулярное генотипирование играет роль «последней инстанции». Молекулярно-генетический анализ рДНК спорист трематод р. *Leucochloridium* подтвердил объективность морфологических критериев видовой идентификации *L. paradoxum* и *L. perturbatum* (Жукова и др., 2012). Основными среди последних признаются форма и окраска отростков спорист (Вакке, 1980). Задачей выполняемой работы является определение полной

нуклеотидной последовательности кластера генов рРНК, что позволит осуществить анализ филогенетических связей внутри р. *Leucochloridium*.

Работа осуществляется на препаратах ядерной ДНК из коллекции Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. Герцена. Генетический материал получен из спорозит *L. paradoxum*, *L. perturbatum* и *L. vogtianum*, собранных в районе пос. Вырица (Ленинградская область). Спорозиста, определённая, как *L. vogtianum* резко отличается по форме отростков от других видов р. *Leucochloridium* (Гинецинская, 1968). Они имеют непигментированные пузырчатые покровы, лишь к вершине приобретающие коричневую окраску.

Исследование внутривидового и межвидового полиморфизма последовательностей рДНК трематод р. *Leucochloridium* проводится на ампликонах, включающих ITS1 и ITS2, используемых в работе, как видоспецифические маркеры. В качестве генотипического маркера используется участок рДНК, кодирующий 18S рРНК, 5.8S рРНК, 28S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры трематод (ITS1 и ITS2). Ампликоны участков рДНК всех образцов получали в ПЦР, направляемой специфическими праймерами. Дизайн праймеров осуществляли самостоятельно, используя собственные данные секвенирования и аннотированные в GeneBank последовательности рДНК *Leucochloridium sp.*

Анализ ITS1 и ITS2 рДНК спорозит *L. paradoxum* и *L. perturbatum* одинаковой окраски выявил 100% гомологию, а межвидовые различия этих участков ДНК составили 2,6% и 6,7% соответственно. Также выявлены точечные замены нуклеотидов в цепи ДНК (SPN) на консервативных участках, кодирующих 5,8S и 28S рРНК между *L.vogtianum* и другими представителями трематод рода *Leucochloridium*.

Выявленные полиморфизмы генов рибосомных РНК трематод р. *Leucochloridium*, наглядно идентифицируемые на схемах вторичных структур, могут служить основой для разработки алгоритма генотипирования данных организмов. В совокупности с определением полной нуклеотидной последовательности кластера генов рРНК они позволят осуществить анализ филогенетических связей рода *Leucochloridium* и построить дендрограмму генетических различий трематод.

Эффект *Alu* РНП и *scAlu* РНП на инициацию трансляции в эукариотических *in vitro* системах

Иванов Александр Владимирович

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия, alekzivanov@gmail.com

Мобильные генетические элементы человека в основном представлены *Alu* элементами, которых насчитывается около 1,3 млн. копий, что составляет 10% генома человека. Значительная часть *Alu* элементов транскрибируется, производя *Alu* РНК и продукт ее дегградации – *scAlu* РНК. Данные некодирующие РНК специфично связываются с белковым гетеродимером SRP 9/14. По имеющимся данным, *Alu* РНП комплексы ингибируют инициацию трансляции на некэпированных безлидерных мРНК в бесклеточных системах трансляции. Нашей задачей было установить механизм данного явления. Для этого мы измеряли влияние *Alu/scAlu* РНП на уровень трансляции в лизате ретикулоцитов кролика (RRL). В качестве матриц использовали мРНК содержащую люциферазу и различные 5'лидеры. Помимо этого методом toe-print оценивали влияние РНП комплексов на сборку инициаторного комплекса на различных матрицах в реконструированной *in vitro* системе трансляции эукариот.

Нами было установлено, что *scAlu* РНП ингибирует трансляцию в RRL на мРНК, содержащих внутренние сайты посадки рибосом (IRES) – CrPV (вирус паралича сверчка)

иEMCV (вирус энцефаломиелокардита). В тоже время, *Alu/scAlu* РНП не влияют на инициацию экзпированных мРНК с лидерами генов β -актина и *BRCA1*. Однако, трансляция люциферазы с лидером β -актина с искусственной 5'(CAA)₄ последовательностью, снимающей экз-зависимость, подавлялась *scAlu* РНП. В реконструированной системе как *Alu* РНП, так и *scAlu* РНП ингибировали сборку инициаторного комплекса на неэкзпированной мРНК с лидером β -глобина. На матрицу с CrPV лидером эффект оказывал только *Alu* РНП. Из полученных результатов мы предположили, что *Alu/scAlu* РНП мешают загрузке только неэкзпированных мРНК в рибосому.

Функциональный анализ главного регуляторного элемента домена α/β -глобиновых генов *Danio rerio*

Ковина Анастасия Павловна, Петрова Наталья Валентиновна

Институт биологии гена РАН, лаборатория структурно-функциональной организации хромосом, Россия, Москва, anastasiya.kovina@mail.ru

У теплокровных животных α - и β -глобиновые гены расположены на разных хромосомах и их экспрессия регулируется с привлечением разнящихся механизмов, в частности, экспрессия α -глобиновых генов теплокровных находится под контролем главного регуляторного элемента (α MRE), который лежит на значительном расстоянии от глобиновых генов в интроне соседнего гена домашнего хозяйства *NPRL3*. У холоднокровных животных α - и β -глобиновые гены соседствуют, причем, оставаясь сцепленными друг с другом, могут быть расположены в двух локусах. В главном локусе тропической рыбы *Danio rerio* слитый домен α - и β -глобиновых генов подразделяется на два субдомена, эмбрионально-личиночный и взрослый, различающихся по времени экспрессии в индивидуальном развитии. Кластеризованные α - и β -глобиновые гены *Danio rerio* соседствует с геном *C16orf35*, который является гомологом консервативного гена домашнего хозяйства *NPRL3* высших позвоночных. В пятом интроне этого гена был обнаружен главный регуляторный элемент (MRE), который является эритроид-специфическим энхансером домена слитых α - и β -глобиновых генов, однако, роль MRE в регуляции экспрессии отдельных глобиновых генов и отдельных субдоменов не продемонстрирована.

Целью работы является изучение роли MRE в регуляции транскрипции глобиновых генов, экспрессирующихся на разных стадиях. Экспериментальная задача состоит в оценке уровня промоторной активности геномных элементов, расположенных между α - и β -глобиновыми генами главного локуса *Danio rerio* и изучении энхансерной активности MRE по отношению к промоторам глобиновых генов, расположенных в разных субдоменах. Функциональную активность геномных элементов оценивали в экспериментах по определению уровня транскрипции репортерного гена, находящегося под контролем исследуемых участков домена в составе транзистентно трансфецированных генетических конструкций.

Было показано, что геномные элементы, расположенные между взрослыми и эмбриональными α - и β -глобиновыми генами, обеспечивают значительное увеличение транскрипции репортерного гена люциферазы по сравнению с контролем, т.е. обладают выраженной промоторной активностью. Изменение ориентации двунаправленных промоторов в большинстве случаев не влияло на уровень экспрессии репортерного гена. Продемонстрировано, что MRE повышает активность всех исследуемых промоторов в составе конструкторов, т.е. является энхансером. Максимальную энхансерную активность MRE проявлял в отношении одного из взрослых двунаправленных промоторов, тогда как в отношении всех эмбриональных промоторов активность была менее выраженной. Это позволило предположить,

что эмбриональный и взрослый субдомены разделены регуляторным элементом, модулирующим активность MRE. Таким элементом мог быть потенциальный сайт связывания одного из инсуляторных белков (CTCF), расположенный на границе субдоменов перед первым эмбриональным геном. Мы показали, что делеция этого элемента приводила к увеличению уровня экспрессии репортерного гена в составе конструктора. Таким образом, был проведен функциональный анализ регуляторных геномных элементов слитого домена α - и β -глобиновых генов *Danio rerio*. Охарактеризован ряд однонаправленных и двунаправленных промоторов взрослых и эмбриональных генов. Кроме того, была продемонстрирована энхансерная активность MRE в отношении промоторов глобиновых генов эмбрионального и взрослого субдоменов. Был обнаружен регуляторный элемент, возможно, вовлеченный в переключение эритропоэза с эмбрионально- личиночного на взрослый тип.

Исследование влияния функциональных доменов муцина MUC1 на метастатический потенциал опухолевых клеток человека *in vitro*

**Кондратенко Юлия Дмитриевна, Рубцов Михаил Александрович,
Сыркина Марина Сергеевна**

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии,
Россия, Москва, azzzkita@gmail.com*

Изучение механизмов метастазирования – одна из ключевых задач, стоящих сегодня перед исследователями раковых заболеваний. Известно, что важную роль при метастазировании играют молекулы, находящиеся на поверхности клеток, и способные изменять их адгезионные характеристики. К числу таких молекул относится муцин MUC1 – мембранный гликопротеид, локализация и гликозилирование которого изменяются при злокачественном перерождении клеток. Предположения об участии муцина MUC1 в процессе метастазирования высказывались с тех пор, как было показано, что для многих линий опухолевых клеток увеличение экспрессии MUC1 коррелирует с увеличением метастатического потенциала. Однако механизм влияния MUC1 на способность опухолевых клеток к метастазированию остается не выясненным.

Методами генетической инженерии на основе экспрессионного вектора pEGFP-N3 были созданы экспрессионные конструкции, кодирующие различные комбинации функциональных фрагментов муцина MUC1, а также маркеры для идентификации синтезируемых химерных белков (FLAG-эпитоп и EGFP). Данными конструкциями были трансфицированы культивируемые клетки линии HT-29, характеризующиеся низким уровнем экспрессии эндогенного муцина MUC1. В результате нами были получены клеточные модели, стабильно экспрессирующие различные варианты химерных муцинов. Было установлено, что уровень экспрессии рекомбинантных белков в клетках полученных линий в 10 раз превышает уровень экспрессии эндогенного муцина MUC1.

Метастатический потенциал клеток модельных линий оценивали в системе *in vitro* с использованием метода трансэндотелиальной миграции. Было показано, что экспрессия фрагментов экстрацеллюлярного домена муцина MUC1 приводит к увеличению доли клеток, способных преодолевать эндотелиальный барьер. Кроме того, был идентифицирован фрагмент, экспрессия которого приводит к наибольшему увеличению доли мигрировавших клеток.

В результате работы нами были созданы клеточные модели для исследования влияния различных функциональных доменов муцина MUC1 на способность опухолевых клеток к метастазированию. Был идентифицирован фрагмент экстрацеллюлярного домена муцина MUC1, оказывающий наиболее значительное влияние на увеличение метастатического потенциала в системе *in vitro*.

Работа выполнена при частичном финансировании из средств ГК 16.740.11.0629, 8800 (Министерство образования и науки Российской Федерации) и гранта 12-04-31721-мол-а (РФФИ).

Локализация протоонкогена *MLL* относительно территории 11 хромосомы внутри ядра в условиях ингибирования топоизомераз

Ломов Николай Андреевич, Рубцов Михаил Александрович

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Россия, Москва,
lomov13@gmail.com*

Ингибиторы ДНК-топоизомераз находят широкое применение в химиотерапии рака, но использование этих веществ часто ведет к возникновению вторичных, или обусловленных лечением, лейкозов. Обработка клеток ингибиторами ДНК-топоизомераз приводит к возникновению двуцепочечных разрывов ДНК и межхромосомным перестройкам, в результате чего образуются онкогены. Чтобы лучше понять механизм перестроек, мы обрабатывали клетки линии Jurkat топоизомеразными ядами и изучали пространственное распределение протоонкогена *MLL* относительно хромосомных территорий, где он в норме локализован. Для этого применялась технология трехмерной флуоресцентной гибридизации *in situ* (3D-FISH) с последующей реконструкцией и компьютерным анализом трехмерных изображений.

В нашей работе мы наблюдали, что при обработке клеток ингибиторами ДНК-топоизомеразы I камптотецином ген *MLL* часто оказывается за пределами хромосомной территории. Такая же ситуация возникает и после обработки клеток ингибитором ДНК-топоизомеразы II этопозидом, причем в некоторых случаях разрыв происходил внутри кластера точек разрыва (breakpoint cluster regions, bcr) гена *MLL*. При этом один из концов разрыва оказывался вне хромосомной территории. Полученные результаты свидетельствуют, что при возникновении двуцепочечного разрыва ДНК один из образовавшихся концов для репарации покидает хромосомную территорию. Это подтверждает гипотезу, согласно которой разрыв ДНК является первичным событием по отношению к перемещению участка хромосомы, необходимому для встречи генов-партнеров по хромосомным перестройкам.

Белок NCAPP контролирует синтез пектинметилэстеразы клеточной стенки растений

¹Поздышев Денис Валерьевич, ²Ершова Н.М., ³Шешукова Е.В.

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия; ²Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия; ³Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия

Атака патогена и повреждение клеточных стенок растения приводит к каскаду событий: (а) повышение экспрессии пектинметилэстеразы (ПМЭ), белка клеточной стенки, осуществляющего деметилирование пектина с образованием метанола; (б) активизация ПМЭ приводит к резкому выбросу в среду газообразного метанола; (в) метанол, в свою очередь, индуцирует ряд генов, метанол-индуцируемых генов (МИГов), среди которых *МИГ-21*, *1,3-β-глюканаза* и *non-cell-autonomous pathway protein (NCAPP)*. Повышенная экспрессия этих генов обеспечивает устойчивость интактных листьев того же и соседних растений к бактериальным патогенам, а также сопровождается усилением межклеточного транспорта, способствующего распространению вирусов по растению. Наши наблюдения свидетельствуют о том, что синтез мРНК МИГов в ответ на метанольный сигнал является временным и строго регулируется, поскольку состояние постоянной клеточной мобилизации истощает биосинтетические ресурсы

клетки. Мы предполагаем, что существует механизм, возвращающий систему к исходному состоянию, т.е. к состоянию до атаки патогена. Целью данного исследования и является поиск механизма обратной связи между экспрессией ПМЭ, стимулированной патогеном, и МИГов.

Как уже отмечалось, среди МИГов, вызывающих устойчивость растительной клетки к бактериям, был обнаружен ген, кодирующий NCAPP. Это представитель класса белков, которые переносят белки, функционирующие за пределами клетки собственного синтеза (белки NCAP, non-cell-autonomous proteins). В этой работе с помощью метода транзientной экспрессии, а также стабильной трансформации растений *Nicotiana benthamiana*, нами было показано, что NCAPP играет важную роль в осуществлении обратной связи с ПМЭ. NCAPP действует как конкурентный ингибитор ферментативно активной ПМЭ. Повышенный уровень белка NCAPP в клетке уменьшает количество зрелой ПМЭ в клеточной стенке и, наоборот, понижение синтеза NCAPP приводит к накоплению ПМЭ и повышенной эмиссии растением метанола.

Полученные данные позволяют нам предложить механизм обратной связи, где NCAPP, индуцированный метанолом, осуществляет подавление синтеза ПМЭ и, следовательно, снижение эмиссии растением метанола. Этот механизм является одним из ключевых компонентов системы регуляции иммунного ответа растения на атаку патогена.

Участие белка DDX5 в ответе клетки на тепловой стресс.

Пономарцев Никита Вячеславович

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, ponomartsev@yandex.ru

Генетический материал эукариотических организмов включает в себя, помимо генов и известных регуляторных элементов, большие массивы некодирующей ДНК. В районе центромеров и перичентромеров некодирующая ДНК представлена сателлитной ДНК (сатДНК). СатДНК представляет собой протяженные тандемно-повторяющиеся последовательности ДНК, которые составляют у человека 10% генома. СатДНК входит в состав конститутивного гетерохроматина и долгое время считалась не транскрибирующейся. Однако, начиная с 80-х годов, стало появляться большое количество работ, в которых демонстрировали транскрипцию сатДНК у различных организмов. Функциональное значение и механизм запуска транскрипции сатДНК до сих пор остаются неясными. Известно, что транскрипты сатДНК в клетке образуются при дифференцировке, пролиферации, канцерогенезе и стрессе. При тепловом шоке запускается транскрипция сатДНК класса 3 (HS3, Human satellite 3), транскрипты которой связаны с образованием ядерных стресс-телец (Яст), которые представляют собой рибонуклеопротеиновые структуры состоящие из РНК и РНК-связывающихся белков. Маркерным белком Яст является HSF1 (Heat shock factor 1) [1]. Предполагается, что эти структуры нужны для репрограммирования генной экспрессии в ответ на стресс. Одним из предполагаемых участников активации транскрипции HS3 также является белок DDX5, относящийся к семейству DEAD-бокс содержащих РНК-хеликаз. Показано, что он связывается с HS3 и ко-локализуется с ним во время его транскрипции. Мы предположили, что белок DDX5 вовлекается в ответ клетки на тепловой стресс, активируя транскрипцию HS3 и участвуя в сборке Яст.

В работе мы использовали клетки моноцитарной лимфомы линии U937 человека. Клетки подвергали тепловому воздействию в течение 1 ч при 43°C. Мы оценивали динамику транскрипции HS3 и гена *ddx5* с помощью методов ОТ-ПЦР. Динамику экспрессии белка DDX5 анализировали с помощью методов иммуноцитохимии и проточной цитометрии. Мы инактивировали DDX5 методом трансфекции клеток siРНК инактивирующей мРНК *ddx5*, и

оценили влияние инактивации DDX5 на транскрипцию HS3 и сборку ЯСт, маркером которых является белок HSF-1, иммуноцитохимическими методами и последующей конфокальной микроскопией. Нами показано, что увеличение концентрации белка DDX5 и транскриптов HS3 происходит в первые 15 минут теплового воздействия. Сразу после 1 ч теплового воздействия и в течение 2 ч после теплового воздействия белок DDX5 образует гранулы в ядрах клеток, которые перекрываются полностью или частично с гранулами HSF-1. Инактивация белка DDX5 приводила к снижению концентрации HS3 транскрипта. Также в клетках с инактивированным DDX5 не наблюдалось сборки ЯСт, определяемой по образованию гранул HSF-1. Таким образом, согласно нашим данным, белок DDX5 участвует в ответе клетки на тепловой стресс, участвуя в транскрипции HS3 и в стресс индуцируемой сборке ЯСт.

Молекулярные аспекты рН-сенсорной функции астроцитов

Сотников Егор Борисович, Туркин Андрей Викторович

*Балтийский федеральный университет имени Им. Канта, Россия, Калининград,
sotnikovegor94@gmail.com*

Астроциты играют важную функциональную роль в рН гомеостазе головного мозга через регуляцию ионного обмена $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Из различных подтипов sodium bicarbonate cotransporters (NBC), главных транспортеров HCO_3^- в астроцитах, были выделены транспортеры, которые являются наиболее важными для оптимального мозгового уровня рН: NBCe1, NBCn1 и NBCe2. Внутриклеточный уровень HCO_3^- у астроцитов регулируется электрогенным транспортом HCO_3^- с помощью NBCe1 в ответ на повышение внеклеточных ионов K^+ . Высокий уровень HCO_3^- , в свою очередь, инициирует активацию растворимой аденилатциклазы, предоставляя субстраты для обеспечения энергетических функций астроцитов.

Целью исследования являлось обнаружение функциональной гетерогенности астроцитов ствола мозга и астроцитов коры головного мозга, с помощью экспрессии гена NBC.

В опыте использовали 248 одиночных клеток астроцитов, из них 140 выделено из ствола мозга, а 108 из коры головного мозга. Экспрессия генов отдельных астроцитов была определена с помощью ПЦР в реальном времени для следующих транспортеров: NBCe1 (Slc4A4), NBCe2(Slc4A5) и NBCn1(Slc4A7), а также для аденилатциклазы (AC). Данные были проанализированы с помощью $2\Delta\text{Ct}$ метода.

Было показано, что экспрессия генов NBCn1, NBCe1 и NBCe2 в одиночных астроцитах коры головного мозга выше, чем в одиночных астроцитах ствола мозга (NBCn1: 1,19, NBCe1: 1,28, NBCe2: 3,01); экспрессия AC была ниже в одиночных астроцитах коры головного мозга по сравнению с одиночными астроцитами ствола мозга (AC: -1,39). Наибольшей статистической достоверностью обладают данные полученные по экспрессии генов NBCe1(отклонение: 0,45) и NBCe2(отклонение:0,57), а вот данные NBCn1(отклонение: 1,01) и AC(отклонение:1,14) наименее точные.

Наши данные противоречат существующей гипотезе о вовлечении аденилатциклазы в гомеостаз рН и, как следствие, в рН-сенсорную функцию астроцитов. Также эти данные доказывают существование функциональной гетерогенности в астроцитах ствола мозга и коры головного мозга, основанной на уровне экспрессии гена NBC.

Влияние аминокислотной замены в экстрацеллюлярной части $\alpha 7$ нейронального никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR) на специфичность взаимодействия с ацетилхолином и никотином

Спирова Екатерина Николаевна, Оджомоко Люси Очиенговна

МГУ имени М.В.Ломоносова, ИБХ им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, kattya_spirova@mail.ru

Нейрональные nAChR широко представлены в органах центральной нервной системы (ЦНС). Холинергические иннервации в ЦНС, действуя через nAChR, регулируют процессы высвобождения медиатора, возбудимости нейронов, что влияет на ряд физиологических и когнитивных функций. Наиболее широко среди нейрональных nAChR в ЦНС представлен подтип $\alpha 7$. Дисфункцию $\alpha 7$ nAChR связывают с такими заболеваниями как шизофрения, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, никотиновая зависимость. $\alpha 7$ nAChR является мишенью для многих лекарств, следовательно, механизмы связывания с лигандами и пространственная структура рецептора представляют интерес для изучения.

Химерный рецептор $\alpha 7$ /GlyR (цитозольный и трансмембранный домены глицинового типа) является удобной моделью для исследования экстрацеллюлярного домена $\alpha 7$. Использование $\alpha 7$ /GlyR облегчает некоторые этапы проведения эксперимента. На основании компьютерного моделирования была выдвинута гипотеза, что замены тирозина-168 или глутамата-189 экстрацеллюлярного домена на аланин (Y168A или E189A) окажут влияние на специфичность взаимодействия $\alpha 7$ /GlyR с агонистами. Используя метод сайт-направленного мутагенеза, в последовательность ДНК, кодирующую $\alpha 7$ /GlyR, ввели мутации Y168A, либо E189A. Экспрессия химеры и мутантов проводилась в ооцитах *Xenopus laevis* (Daudin, 1802). Методом двухэлектродной фиксации потенциала оценивались изменения амплитуды тока ооцитов в ответ на действие ацетилхолина и никотина.

В ходе исследования было выявлено, что значение параметра EC50 (концентрация лиганда, при которой достигается амплитуда тока, равная половине от максимальной) мутантов Y168A и E189A для ацетилхолина уменьшилось на 38% и 49%, соответственно, а для никотина уменьшилось на 49% и 43%, соответственно, по сравнению с $\alpha 7$ /GlyR. Полученные результаты дают основание полагать, что введение аланинового остатка в 168 или 189 положения экстрацеллюлярного домена увеличивает сродство $\alpha 7$ /GlyR к данным агонистам. Предположительно, тирозин-168 и глутамат-189 не играют большой роли в связывании с экстрацеллюлярным доменом $\alpha 7$ nAChR ацетилхолина и никотина, т.к. мутации в этих положениях не привели к уменьшению аффинности к агонистам.

Разнообразие вариантов матричной РНК и белка DR3/LARD при герпесвирусной инфекции

Старикова Вера Дмитриевна

ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной, Россия, Нижний Новгород, homulichka@rambler.ru

В инициации внешнего пути апоптоза принимает участие «рецептор смерти» DR3/LARD. Данный рецептор отличается высоким структурно-функциональным полиморфизмом на разных уровнях реализации генетической информации (мРНК, белок). Стоит отметить, что вклад различных вариантов DR3/LARD в модуляцию клеточной гибели при герпесвирусной инфекции различной этиологии ранее не исследовался.

Материалом исследования явились цельная кровь и сыворотка здоровых волонтеров, а также пациентов с герпесвирусной инфекцией. В работе использовались разработанные нами

варианты методов ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР в реальном времени, проточной цитофлуориметрии и ИФА.

С помощью «гнездового» варианта ОТ-ПЦР показано, что в крови с различной частотой выявлялись 4 формы мРНК DR3/LARD (2 мембранные формы - LARD1a, DR3 β ; 2 растворимые формы - LARD3, solubleDR3 β). У герпес-инфицированных лиц мРНК solubleDR3 β детектировалась в 1,7 раза реже, чем у здоровых волонтеров, причем только у лиц, инфицированных вирусом ветряной оспы (ВВО) ($p < 0,05$).

Детекция экспрессии мРНК мембранных вариантов (LARD1a, DR3 β) и мРНК растворимых вариантов DR3 (LARD3 и solubleDR3 β) проводилась с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. В результате в крови герпес-инфицированных лиц было выявлено снижение экспрессии мРНК растворимых форм (LARD3 и solubleDR3 β) в 1,5 раза по сравнению со здоровыми волонтерами только при инфицировании ВВО ($p < 0,05$).

При использовании метода проточной цитофлуориметрии для оценки плотности экспрессии рецептора DR3 на мембране лимфоцитов крови не было выявлено изменений в данном показателе у здоровых волонтеров, а также у герпес-инфицированных лиц.

С помощью двухсайтового твердофазного варианта ИФА был определен сывороточный уровень растворимых вариантов белка DR3. Показано, что уровень растворимых вариантов DR3 при ВЭБ-инфекции значительно превышал показатель здоровых волонтеров.

Таким образом, герпесвирусная инфекция сопровождалась изменениями в частоте детекции мРНК DR3/LARD и белка данного рецептора по сравнению со здоровыми волонтерами. В значительной мере изменения касались ВВО и проявлялись в снижении уровня экспрессии мРНК растворимых вариантов (LARD3, solubleDR3 β), вызванном преимущественно падением встречаемости мРНК solubleDR3 β . Изменения в сывороточном содержании белка DR3 при ВЭБ-инфекции обусловлены либо вкладом других растворимых вариантов, либо усилением шеддинга молекул с клеточных мембран.

Стендовые доклады

Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with chronic gastritis in Kazakh population

Imanbekova M., Kulmambetova G., Logvinenko A., Sukashev A.

National Center of Biotechnology, Astana, Kazakhstan; National Research Medical Center, Astana, Kazakhstan

Long persists inflammation is one of the most important factors in the development of chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Polymorphisms of inflammatory cytokine genes are associated with individual differences in gastric mucosal cytokine mRNA level, which result in differences in gastric mucosal inflammation, acid inhibition and gastroduodenal disease risk. The aim of this study is to evaluate the associations between inflammatory cytokines single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and chronic gastritis development in Kazakh population.

Genomic DNA was extracted from gastric biopsies from patients with chronic gastritis. We genotyped six polymorphisms of IL-1B C511T (rs16944), IL-1B T31C (rs1143627), IL-1RN (rs380092), TNF-A G308A (rs1800629), IL-10 G1082A (rs1800896) and IL-10 C819T (rs1800871) in case-control study of 181 chronic gastritis patients and 260 sex- and age-matched healthy controls. For data analysis we used SeqScape v.2.6 software package. The test for Hardy-Weinberg equilibrium was performed using web program (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>) of genotype frequencies in the selected allelic variants. All calculations were performed using DeFinetti online tool (Institute of Human Genetics, Germany, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwal.pl>).

We found a significant association between the IL-1RN *2/*2 (2 repeats of 86 bp) and IL-1RN 2/L genotypes and increased risk of chronic gastritis [P= 8.418e-08, OR=5,39, 95% confidence interval (CI)=2,783-10,436; P=0.007, OR=1.91, CI=1,133-3,221, respectively]. This genotypes show enhanced suppression of gastric acid secretion, which results in more rapid development of gastric atrophy, and a consequently greater risk of developing gastric cancer. Earlier Furuta T. and colleagues found an association with the IL-1RN gene 2 allele in the Japanese population. Also we found increasingly risk of gastritis development with IL-10-819 TT genotype [P=0.0031, OR=2.83, CI=1,59-5,09]. This SNP associated with reduced IL-10 mRNA expression and influence the clinical course of gastric inflammation. Genotyping other genetic variants showed no association with risk of chronic gastric.

Our results indicate that the IL-1RN 2/2, IL-1RN 2/L and IL-10-819 TT gene polymorphisms are associated with chronic gastritis, may be served as a predictive factor for gastroduodenal disease development within Kazakh population.

Изучение экспрессии генов *tnf* и *lta* в модели спонтанной В-клеточной лимфомы Атретханы Камар-Сулу Нияз Кызы

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии;
Институт молекулярной биологии, лаборатория молекулярных механизмов иммунологии
Москва, Россия, kama1205@mail.ru*

Фактор некроза опухолей (ФНО) - цитокин, который был открыт благодаря своей противоопухолевой активности. Главные физиологические функции ФНО связаны с защитой организма от некоторых инфекций и иммунорегуляцией, в частности, контроле воспаления. Лимфотоксины (ЛТ) альфа и бета – родственные ФНО цитокины, для которых недавно была показана проонкогенная роль в нескольких экспериментальных моделях канцерогенеза (рак простаты, гепатоклеточная карцинома) при передаче сигнала через ЛТ-бета рецептор. Основная цель настоящей работы – исследовать возможную роль продукции ФНО и ЛТ опухолевыми клетками в развитии В-клеточной лимфомы у мышей.

В качестве экспериментальной модели были выбраны генетически модифицированные мыши, у которых происходила активация онкогена Tag вируса SV40 в В-клетках (за счет вырезания ингибирующей транскрипцию Tag последовательности при активации Стрекомбиназы), что приводила к спонтанному возникновению В-клеточных лимфом у этих животных в течение 8 месяцев. Клетки первичной лимфомы от таких мышей пересаживали RAG-дефицитным мышам, которые развивали вторичные лимфомы в течение двух-трех недель. В полученных образцах первичных и вторичных лимфом экспрессию генов ФНО и лимфотоксина оценивали методом количественного ПЦР в реальном времени. При этом анализировали как исходный образец опухолевых клеток, так и фракцию CD19+ спленоцитов, обогащенную методом магнитной сепарации.

В ходе работы было проанализировано 18 образцов первичных и вторичных В-клеточных лимфом и показано, что уровень экспрессии в них более чем на порядок снижен по сравнению с контрольными образцами. В качестве контролей были выбраны активированные или неактивированные спленоциты и В-клетки из наивных мышей дикого типа. Активированные клетки имели повышенный уровень экспрессии генов ФНО и лимфотоксина в ответ на ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат). Полученные данные свидетельствуют о том, что в клетках лимфомы происходит значительное снижение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов ФНО и лимфотоксина, что может быть следствием их дедифференцировки, характерной для многих других типов опухолей.

Работа была осуществлена при поддержке гранта РФФИ №11-04-91320.

Новая мутация в 22 экзоне COL4A5 гена, обуславливающая раннее развитие синдрома Альпорта

Байкара Баршагуль Тенизбайкызы

Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Астана

Синдром Альпорта является наследственным заболеванием, которое приводит к почечной недостаточности, потере слуха и зрения. В основе заболевания чаще всего лежит генетический дефект, приводящий к патологии коллагена IV типа, входящего в состав базальной мембраны клубочков. Три гена, кодирующие коллаген IV типа – COL4A3, COL4A4 и COL4A5, обуславливают X-сцепленные и аутосомные формы синдрома Альпорта.

В исследование была включена одна казахская семья. Пробандом являлась 5-летняя девочка с хроническим нефритическим синдромом. У нее развилась гематурия, нейросенсорная тугоухость и обнаружена ангиопатия сосудов сетчатки.

По данным наследственности старший брат девочки умер от гломерулонефрита в возрасте 12 лет, у мамы пиелонефрит и тугоухость. Бабушка девочки по материнской линии и сестра мамы умерли от болезни почек и артериальной гипертензии.

Было проведено определение мутаций в гене COL4A5 в исследуемой семье, где наблюдался доминантный тип наследования, по X-сцепленному варианту. С каждым исследуемым проводилась беседа о планируемых генетических исследованиях, и подписывалось информированное согласие. Далее проводился забор венозной крови и выделение ДНК. Проведено генотипирование на основе прямого секвенирования полного гена COL4A5 в исследуемой семье.

По результатам генотипирования у обоих членов семьи обнаружена ранее не описанная мутация в 25 экзоне 1922G>A, приводящая к замене глицина на глутаминовую кислоту в 641 положении. Исследуемые являются носителями гетерозиготного аллеля мутации.

Следует отметить, что у мамы легкая течение заболевания, чем у пробанда. Этот факт можно объяснить тем, что только у около 75% заболевших женщин с X-сцепленной формой в конечном итоге развивается протеинурия; хроническая почечная недостаточность развивается примерно у 15% женщин в возрасте 40 лет и около 30% в возрасте от 60 лет. Другими словами, фенотипическая экспрессия X-сцепленных форм у женщин сильно зависит от случайной инактивации в X-хромосоме.

Так как мутации в гене COL4A5 приводят к изменениям α -цепи коллагена IV типа, обнаруженная нами замена аминокислоты (Gly641Glu) возможно находится в функциональной значимой части гена. В результате можно сделать вывод, что мутация Gly641Glu, является патогенной и ассоциирована с ювенильным типом наследственного нефрита, для которого характерно раннее развитие хронической почечной недостаточности.

Нами планируется продолжение исследований по изучению полиморфизмов в гене COL4A5 у других членов семьи и проведение корреляционного анализа фенотипических проявлений синдрома Альпорта и генетических характеристик.

Выявление протеомных маркеров рака молочной железы
Гутовский Алексей Олегович, Бакакина Ю.С., Содель Д.Л., Молчан М.М.,
Колеснёва Е.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Беларусь, Минск,
aleksei.gutovski@gmail.com

Огромную роль в успешном лечении рака молочной железы (РМЖ) играет своевременная диагностика. Одним из кардинальных направлений современных исследований в диагностической онкомедицине является скрининг в биологических жидкостях белков-маркеров, продуцируемых клетками опухоли. Однако до настоящего времени белки-маркеры РМЖ, обладающие высокой специфичностью, обнаружены не были.

В данной работе были исследованы образцы первичной культуры клеток, полученные из опухолей 26 пациенток с диагнозом РМЖ (люминальный А подтип – 9, люминальный Б – 3, Her-2/neu-позитивный – 1, триплет-негативный – 13), 13 пациенток с диагнозом фиброаденома и 10 здоровых доноров.

Для изучения протеома и секретома культуры клеток РМЖ разных молекулярных подтипов и фиброаденомы были получены соответствующие протеомные карты.

При сравнении протеомных карт культуры клеток РМЖ и фиброаденомы обнаружено, что протеомные профили отличаются в зависимости от подтипа опухоли. Так, белки культуры клеток фиброаденомы и белки культуры клеток РМЖ люминального А подтипа имеют схожие протеомные профили. На протеомных картах белков культуры клеток РМЖ люминального Б, Her-2/neu позитивного и триплет-негативного подтипов наблюдались значительные изменения по сравнению с протеомными картами клеток фиброаденомы и клеток РМЖ люминального А подтипа. Эти результаты соотносятся с тем, что злокачественные опухоли молочной железы триплет-негативного и Her-2/neu позитивного подтипов характеризуются наихудшим прогнозом и наименьшей выживаемостью вследствие высокой пролиферативной активности и степени злокачественности.

Обнаружено, что протеомные профили белков культуры клеток и секретируемых белков отличаются между группами пациентов с РМЖ, фиброаденомой и здоровыми донорами, а также в зависимости от подтипа опухоли. Проведен скрининг потенциальных маркеров развития опухоли среди секретируемых белков культуры клеток РМЖ разных молекулярных подтипов и фиброаденомы. Белки, по которым наблюдались отличия, были идентифицированы как гаптоглобин, сывороточный амилоидный белок А, α 2-HS-гликопротеин и кластерин.

Авторы выражают благодарность научному руководителю к.б.н., доценту Дубовской Л.В. за помощь в планировании работы и обсуждении результатов.

Выделение новой рибонуклеазы *V. altitudinis* с использованием рекомбинантного штамма-продуцента *V. megaterium* PV370

Дудкина Елена Владимировна, Гальцова Алина Константиновна, Ульянова Вера Владимировна, Шах Махмуд Раихан, Веришнина Валентина Ивановна,
Ильинская Ольга Николаевна

Федеральное Государственное Автономное Образовательное учреждение; высшего профессионального образования; «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»,
Россия, Казань, lenatimonina@rambler.ru

В настоящее время перспективным исследованием в терапии злокачественных новообразований является поиск и изучение механизма действия ферментов – рибонуклеаз, обладающих избирательной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам.

Наиболее известным представителем микробных рибонуклеаз (РНКаза), является РНКазы *Bacillus pumilis* 7P – биназа (12 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI 9,5), которая селективно ингибирует рост клеток аденокарциномы легких человека A549 и лейкоза Касуми. Естественным аналогом биназы является рибонуклеаза *B. altitudinis*, которая отличается по первичной последовательности от биназы лишь одной заменой аминокислоты: аланина (Ala₁₀₆) на треонин (Thr₁₀₆). Высокая степень гомологии новой РНКазы с биназой предполагает наличие у нее схожих цитотоксических свойств, которые на сегодняшний день остаются не изученными. В связи с этим целью данной работы явилось выделение новой рибонуклеазы *B. altitudinis* с использованием рекомбинантного штамма-продуцента *B. megaterium* PV370.

Ген рибонуклеазы *B. altitudinis* амплифицировали с плазмиды pLS1 и клонировали в вектор pDG148 под контроль сильного промотора P_{спас}, индуцируемого изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Жидкостную хроматографию быстрого разрешения проводили на колонке Mono S/1 (BioRad, США) с использованием системы FPLC BioLogic DuoFlow фирмы (BioRad, США).

На первом этапе клонирование гена РНКазы *B. altitudinis* проводили с использованием штамма *E. coli* DH5α, полученной генно-инженерной конструкцией трансформировали штамм *B. megaterium* PV370. Вид *B. megaterium* был выбран в качестве штамма – продуцента за счет ряда преимуществ, обуславливающих его широкое использование в биотехнологии. Микроорганизм не синтезирует в среде щелочных протеаз, клеточная стенка не содержит эндотоксинов, трансформированные плазмиды высокостабильны и не элиминируются. Анализ клонов выявил трансформантов *B. megaterium* PV370, у которых добавление ИПТГ в 3-4 раза увеличивало РНКазную активность относительно контроля, что говорит об успешно проведенном клонировании. Фермент был выделен и очищен с использованием жидкостной хроматографии быстрого разрешения в линейном градиенте NaCl от 0 до 1M. РНКазы элюировалась при концентрации NaCl в 20 mM натрий-фосфатном буфере около 0.3 M. Выход фермента по активности на этой стадии составил 27%.

Создание экспрессионной системы на основе *B. megaterium* PV370, где ген РНКазы находится под контролем P_{спас}-промотора, индуцируемого ИПТГ, позволило нам сократить время синтеза фермента и в несколько раз увеличить выход белка в сравнении с природным продуцентом. Результаты проведенной работы могут служить основой для последующего выделения и очистки рекомбинантного белка – рибонуклеазы *B. altitudinis* в препаративных количествах с целью исследования его биологических свойств.

Изучение активности и специфичности промоторов генов *SPARC* и *SNAII* человека в нормальных и опухолевых клетках

Кондратьева Лия Германовна

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, Liakondratyeva@yandex.ru

В солидных опухолях человека злокачественные клетки находятся в стромальном микроокружении. Генно-терапевтическое таргетирование клеток стромы может приводить к эффективному подавлению роста соседних злокачественных клеток. Успешное использование генно-терапевтических конструкций при лечении опухолей зависит от силы и специфичности промотора, контролирующего экспрессию терапевтического гена.

Целью настоящей работы было клонирование разных вариантов промоторных областей генов *SNAII* и *SPARC* человека, обладающих высокой активностью в опухолевой строме и изучение их активности и специфичности. Промоторные области этих генов были клонированы

в репортерные конструкции с геном люциферазы *Photinus pyralis*. Были проведены транзистентные трансфекции клеточных линий фибробластов и опухолевых клеток поджелудочной железы линий Panc1 и MiaPaCa. Это позволило оценить активность и специфичность промоторов и выбрать из них наиболее перспективные варианты для создания генно-терапевтических конструкций.

Среди трех вариантов промотора SPARC: SP1 – имеющего координаты -1167/+77 от точки старта транскрипции, SP2 – -1167/+31, SP3 - -120/+77, наиболее активным в опухолевых культурах клеток Panc1 и MiaPaCa оказался самый короткий промоторный вариант SP3. Активность промотора SNAIL в тех же культурах более чем в два раза превысила активность самого сильного из промоторов SPARC. В клетках фибробластов самым активным вариантом промотора SPARC оказался наиболее длинный фрагмент SP1 и его активность стала сравнима с активностью промотора SNAIL. Наименее активным оказался промотор SP2, что, скорее всего, связано с тем, что в нем закодирована не полная последовательность первого нетранслируемого экзона гена SPARC, играющего важную роль в регуляции транскрипции. В тоже время варианты SP1 и SP3, показавшие относительно высокую активность в экспериментах, несут первый экзон полностью. Самый длинный промотор SP1 активен в мезенхимальных клетках, возможно, за счет присутствия обоих GGA-боксов - ключевых регуляторных элементов промотора SPARC, связывающих необходимые транскрипционные факторы и обеспечивающих специфичность. В то время как достаточно сильный короткий вариант SP3 кодирует только первый GGA-бокс, необходимый для высокой транскрипционной активности промотора.

Дипептид восстанавливает иммуногенез в селезёнке

Кузнецова Екатерина Петровна

Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций, отделение медицинской физики и биоинженерии, Россия, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Россия, Санкт-Петербург, wmailkuz@gmail.com

С возрастом продукция Т-клеток в тимусе уменьшается, и часть его функций делегируется селезенке, менее подверженной возрастным изменениям. Целью исследования явилось изучение влияния пептида KE на экспрессию маркеров иммунных клеток в селезенке при старении.

Органотипические культуры клеток селезёнки были разделены на 2 группы: контрольная (добавление физиологического раствора) и экспериментальная (добавление дипептида KE в концентрации 0,05 нг/мл). Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела CD4, CD5, CD8 и CD20 (1:30, Novocastra).

В контрольной группе в культурах, полученных от старых животных, экспрессия CD4 составила $5,15 \pm 0,68\%$, что в 4,7 раза больше по сравнению с «молодыми» культурами ($1,1 \pm 0,38\%$). В контрольной группе в культурах, полученных от старых животных, экспрессия CD5 составила $8,43 \pm 0,80\%$, что в 20 раз больше по сравнению с «молодыми» культурами клеток ($0,42 \pm 0,08\%$). Площадь экспрессии CD8 в «старых» культурах клеток в контроле составила $6,40 \pm 0,45\%$, что в 10,5 раз больше по сравнению с «молодыми» ($0,61 \pm 0,19\%$). Площадь экспрессии CD20 в контроле в «старых» ($0,79 \pm 0,04\%$) и «молодых» ($0,7 \pm 0,16\%$) культурах клеток достоверно не различалась. Пептид KE стимулировал увеличение числа CD4⁺ клеток в «старых» культурах клеток в 4,9 раза ($20,14 \pm 4,44\%$), а в «молодых» культурах – в 3,7 раза ($4,11 \pm 1,30\%$). Под действием KE наблюдалось увеличение числа CD5⁺ клеток в «старых» культурах клеток в 2,4 раза ($20,14 \pm 4,40\%$) и в «молодых» культурах клеток – в 12,6 раза

(5,28±1,1%). Пептид КЕ повышал площадь экспрессии маркера CD8 в «старых» культурах клеток в 4,6 раза (29,57±0,54%) и в «молодых» культурах клеток – в 15,4 раза (9,38±2,8%). Кроме того, под влиянием КЕ происходило увеличение числа CD20⁺ клеток в «старых» культурах клеток - в 9,8 раза (7,76±1,21%) и в «молодых» культурах клеток – в 2,3 раза (1,62±0,43%) по сравнению с контролем.

Увеличение площади экспрессии маркеров CD4, CD5 и CD8 в «старых» культурах клеток в контроле отражает повышение количества Т-хелперов, недифференцированных Т-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов в селезёнке старых крыс. Таким образом, с возрастом в селезёнке иммуногенез усиливается, что свидетельствует о её выраженной компенсаторной роли при старении иммунной системы. Пептид КЕ имеет выраженный иммуномодулирующий эффект. Данный пептид стимулировал пролиферацию Т-хелперов, недифференцированных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в органотипических культурах молодых и старых крыс.

МAMP-индуцированный иммунитет – возможный механизм устойчивости *Nicotiana benthamiana* к бактериям рода *Pectobacterium*

Кузьмич Софья Викторовна, Бадалян О.А., Николайчик Е.А.

Белорусский Государственный Университет, биологический факультет, Минск, Беларусь,
kuzmich.sofya@gmail.com

Pectobacterium atrosepticum – некротрофный фитопатоген растений картофеля *Solanum tuberosum*, вызывающий такие заболевания, как «черная ножка» и мягкая гниль клубней. В отличие от родственной бактерии *P. carotovorum*, которая также является фитопатогенном картофеля, *P. atrosepticum* не вызывает реакцию гиперчувствительности (РГ) на растениях табака *Nicotiana benthamiana*. Для доставки эффекторных белков упомянутые бактерии используют систему секреции третьего типа. На сегодняшний день у *P. atrosepticum* и *P. carotovorum* найден всего лишь один эффекторный белок – DspE.

Растения табака *N. benthamiana* полностью устойчивы к данным бактериям. Одной из возможных причин этой устойчивости является МAMP-индуцируемый иммунитет (МТИ), основанный на детекции консервативных компонентов бактериальной клетки (флагелина, липополисахаридов, EF-Tu). Для индукции МТИ листья *N. benthamiana* инфильтровали суспензией клеток *P. atrosepticum* SCRI 1043 или *P. atrosepticum* SCRI 1043 с инактивированным геном *dspE* (SK1). Через 7 часов после инфильтрации индукторов листья были инфильтрованы клетками *P. carotovorum* так, чтобы области первой и второй инфильтраций частично перекрывались. Через 24 часа после последней инфильтрации в области перекрытия двух областей инфильтрации наблюдалась РГ при использовании в качестве индуктора *P. atrosepticum* дикого типа, тогда как при инфильтрации SK1 гибели клеток растения не происходило, то есть наблюдалась МТИ. Подобный эксперимент был проведен на растениях с инактивированием таких киназ, как SIPK, WIPK и совместно RLK2 и RLK5. Вирус-индуцируемый сайленсинг генов как SIPK, так и WIPK способствовал развитию МТИ при инфильтрации суспензиями клеток *P. atrosepticum* SCRI 1043, а при инфильтрации клетками SK1 и последующем их заражении индикаторным штаммом приводило к отсутствию РГ по всей зоне инфильтрации, а не только в области перекрытия зон инфильтрации индукторного и индикаторного штаммов. Инактивация RLK2 и RLK5 предотвращала развитие МТИ в ответ на инфильтрацию суспензиями клеток штамма-индуктора SK1.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что *RLK2* и *RLK5* участвуют в развитии МТИ, а инактивация *SIPK* и *WIPK* усиливает МТИ. В свою очередь эффекторный белок DspE необходим для подавления МТИ.

Исследование взаимодействия транскрипционного фактора Нох 11 с ДНК

Лимонова Алёна Сергеевна

*МГУ имени М.В.Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Россия, Москва,
limonova-alena@yandex.ru*

Гомеобокс-содержащие гены представляют собой семейство высококонсервативных факторов транскрипции, ответственных за регуляцию развития органов в период эмбрионального развития. Известно, что нарушение созревания Т клеток в кортикальной зоне тимуса, приводящее к развитию острой Т-клеточной лейкемии, сопряжено с повышенной экспрессией и активностью Нох11, относящегося к этому семейству. Знание точных молекулярных механизмов взаимодействия этого фактора транскрипции с ДНК открыло бы возможность прицельной противоопухолевой терапии.

Определение связывания белка с ДНК осуществлялось методом EMSA с использованием меченных радиоактивным фосфором ³²P-АТФ олигонуклеотидов: TAG GGG TCT GTG AGT CAG GAA GCT GTG TC (Cyp26), GCA GGA GGA AGC TGA CTC AGG AAG GGA GG (Rxxra). Для получения лизатов использовались клетки линий NIH 3T3 и 293 Т

По фрагменту ДНК, кодирующему Нох11, заклонированному в вектор pcDNA3, проведён *in vitro* синтез Нох 11 с помощью TNT® Quick Coupled Transcription/Translation system. Эффективность синтеза была подтверждена методом Western blot по стандартной методике. По результатам EMSA с клеточным лизатом определяется связывание олигонуклеотидов Cyp 26 и Rxxra. Снижение интенсивности связывания при добавлении антител к Нох 11 подтверждает специфичность связывания. По результатам EMSA с Нох11, полученным *in vitro*, связывание определяется только с положительным контролем. В остальных случаях присутствует только неспецифичное связывание. Это подтверждается отсутствием изменений в интенсивности связывания при добавлении антител к Нох 11.

Было подтверждено связывание Нох11 с последовательностями ДНК Cyp 26 и Rxxra, определёнными ранее методом Chip-seq *in vivo* в линии мезенхимальных клеток селезёнки. Однако связывание определялось только с применением клеточного лизата. Его отсутствие с применением Нох11, полученного *in vitro*, может свидетельствовать о том, что исследуемый фактор транскрипции связывается с ДНК не отдельно, а в комплексе с другими факторами. Для их определения необходимы дальнейшие исследования.

Создание альтернативного каркасного белка на основе 50S рибосомального белка L35Ae из *Pyrococcus horikoshii*

Ломоносова Анна Викторовна

*ФГБУН Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
Пуцино, Россия, AnnaLomonosova@gmail.com*

Создание искусственных связывающих белков на основе альтернативных каркасных белков (АКБ) является одним из перспективных направлений развития биоинженерии. АКБ характеризуются наличием компактной стабильной структуры-каркаса, а также области, позволяющей заменять аминокислотные остатки без существенного изменения стабильности белка, в целях достижения максимального сходства к мишени. Направленная селекция из комбинаторной библиотеки структур, отличающихся вариабельной частью АКБ, позволяет

получать белки, сравнимые с антителами по селективности и специфичности взаимодействия с антигеном, востребованные в медицине для визуализации, диагностики и лечения заболеваний.

В настоящей работе изучена возможность применения 50S рибосомального белка L35Ae экстремофильной археи *Pyrococcus horikoshii* (L35Ae) в качестве АКБ. Рекомбинантный L35Ae был экспрессирован в *E. coli* и выделен из цитоплазматической фракции. L35Ae обладает высокой термостабильностью (середина перехода при 90°C), умеренной устойчивостью к химической денатурации гуанидин гидрохлоридом (GuHCl, середина перехода при 2.9 M GuHCl), а также склонностью к олигомеризации и агрегации. Методом проточной цитофлуориметрии показано, что L35Ae демонстрирует выраженную способность к взаимодействию с мембранами клеточной линии человека HEK293. Для снижения способности L35Ae к агрегации и взаимодействию с природными мембранами был проведен мутагенез десяти поверхностных аминокислот L35Ae, направленный на снижение доступности растворителю гидрофобных остатков белка, а также снижение избыточного положительного заряда белка, при сохранении его структурной стабильности. Результирующая мутантная форма L35Ae обладает пониженной склонностью к агрегации, отсутствием связывания с поверхностью клеток HEK293, при неизменной термостабильности и незначительно сниженной устойчивости к действию GuHCl (2.2 M). В результате анализа консервативности петлевых участков белков L35Ae разработан дизайн комбинаторной библиотеки структур исследуемого белка с рандомизацией его трех петель по типу NNK. Получена соответствующая фаговая библиотека с разнообразием *ca* $4,4 \times 10^8$. Методом фагового дисплея проведены раунды селекции из полученной комбинаторной библиотеки L35Ae структур, селективным образом взаимодействующих с модельным антигеном, лизоцимом куриного яйца. Равновесные константы диссоциации комплексов двух выбранных из библиотеки структур с лизоцимом составили *ca* 10^6 M^{-1} , по данным метода поверхностного плазмонного резонанса. Устойчивость полученных структур L35Ae по отношению к GuHCl составила 2.2 M и 2.5 M GuHCl.

Совокупность полученных в работе результатов свидетельствует о пригодности мутантной формы белка L35Ae для использования в качестве АКБ без изменений, либо после оптимизации, направленной на достижение дополнительных свойств (снижение склонности к олигомеризации, отсутствие иммуногенности, и пр.).

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине». Выражаю благодарность моим научным руководителям к.ф.-м.н. Пермякову С.Е. и д.б.н., проф. Пермякову Е.А., а также Улитину А.Б., Казакову А.С., Овчинниковой Е.В., Соколову А.С. за неоценимую помощь и консультации при выполнении работы.

Новый метод связывания ДНК с золотыми частицами для эффективной биобаллистической трансформации пшеницы

**¹Мальцева Элина Романовна, ¹Скиба Ю. А., ²Янг Н., ²Искакова Г.А.,
¹Байжуманова С.С.**

¹ Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, Алматы; ² Австралийский центр функциональной геномики растений, Австралия, Аделаид,
elina_m@inbox.ru

Биобаллистическая трансформация широко используется для получения фертильных трансгенных растений пшеницы. Критически важным шагом этого метода является подготовка минимальных экспрессионных кассет гена интереса, а именно использование правильного раствора для покрытия золотых частиц ДНК. Одним из популярных подходов, разработанных компанией Bio-Rad, является добавление спермидина (Spd) и хлорида кальция к раствору

ДНК/золото, однако к недостаткам метода можно отнести разность качества используемого спермидина и очень ограниченное время осаждения раствора ДНК/золото во льду.

Новый упрощенный метод покрытия ДНК золотыми частицами был разработан и модифицирован для получения фертильных трансгенных растений пшеницы с помощью биобаллистической трансформации каллусных культур, полученных из незрелых зародышей. В предложенном методе для осаждения ДНК на золотые микрочастицы смешиваются растворы полиэтиленгликоля (PEG) и магния (Mg) вместо спермидина и CaCl₂, предложенных в протоколе BioRad. Соотношение растворов PEG и Mg было оптимизировано с помощью транзientной GUS экспрессии с использованием суспензионной клеточной культуры пшеницы (*T. monosocum* L.). Новый метод покрытия ДНК золотыми частицами характеризовался более равномерной и воспроизводимой GUS-экспрессией по сравнению с методом, предлагаемым компанией Bio-Rad.

В настоящее время в экспериментах по изучению функциональной генетики, а также для получения растений, свободных от маркеров, предпочтительно получать трансгенные организмы с низкой копийностью трансгена. Для того, чтобы увеличить случаи низкой копийности, для ко-трансформации использовали низкие концентрации минимальных экспрессионных кассет гена интереса и pUbi-hpt. Эффективность трансформации при использовании данного подхода составила от 1.8% до 16.4% со средней величиной в 7.4%; этот показатель оказался в два раза больше, чем при предыдущей крупномасштабной трансформации пшеницы с использованием метода покрытия ДНК золотыми частицами, предлагаемого компанией Bio-Rad.

Разработанный метод рекомендуется применять при стабильной трансформации каллусных культур пшеницы.

Идентификации аллелей *Waxy*-генов казахстанских сортов пшеницы.

Мендеш Асель Мураткызы, Чиркин А.П., Байжуманова С.С.

*Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А.Айтхожина, Казахстан, Алматы,
neobe83@mail.ru*

Во многих странах мира, включая Казахстан, мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является ведущей зерновой культурой. Важным компонентом эндосперма пшеницы, определяющим ее технологические свойства, является крахмал. Он накапливается в виде гранул и представляет собой совокупность двух типов полисахаридов – разветвленного амилопектина, который в среднем составляет 70-80% крахмала и линейной амилозы, составляющей 20-25%. Соотношение между содержанием амилозы и амилопектина определяет мукомольно-хлебопекарные свойства зерна, которые значительно возрастают при уменьшении концентрации амилозы с 20% до 0%. Синтез амилозы осуществляет фермент GBSS (granule-bound starch synthase) – гранул-связанная синтаза крахмала, фермент также известен как *waxy*-протеин, а его кодирующие гены – *waxy*-генами.

Пшеница несет в себе три гомеологичных *Waxy*-гена: *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1*, каждый из которых имеет несколько аллелей.

Цель настоящей работы – отбор, апробация и оптимизация существующих протоколов проведения ПЦР для идентификации наиболее перспективных генотипов пшеницы по аллельным вариантам *Waxy*-генов, а также выявление возделываемых сортов мягкой пшеницы с высокими мукомольно-хлебопекарными и технологическими свойствами зерна.

В исследованиях использовали 30 сортов и линий мягкой пшеницы, преимущественно казахстанской селекции. Геномную ДНК выделяли из проростков пшеницы с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

Аmplификацию геномной ДНК проводили с использованием аллель-специфичных олигонуклеотидов, синтезированных в ЗАО «Синтол» (Москва).

Была проведена оценка возможности применения молекулярных маркеров для идентификации аллелей Waxy-генов в 30 казахстанских сортах мягкой пшеницы.

Аллель-специфичные праймеры, использованные в нашей работе, неоднократно были апробированы ранее, согласно литературным данным.

В результате исследований были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР с праймерами: Wx0, Wx-A1b-MH.

Скрининг 30 казахстанских сортов показал, что в исследуемых образцах, форм с нуль-аллелем по гену WxA1 нет, т.е. по данному гену сорта имеют нормальное содержание амилозы в крахмале (20-30%) без тенденции к снижению.

Планируется изучить аллельное состояние Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 генов всех имеющихся сортов коллекции, как казахстанских, так и коммерческих.

Полученная в данной работе информация позволит выявить наиболее перспективные, низкоамилозные (Waxy) сорта пшеницы, возделывание и применение которых в определенных отраслях пищевой промышленности будет коммерчески выгодным.

Экспрессия эндотелинового рецептора В человека для структурных исследований

Мишин Алексей Викторович, Криволапова А.П., Потапенко А.П., Борщевский В.И.,

Московский физико-технический институт, Факультет общей и прикладной физики,

Москва, Россия, mishinalexej@gmail.com

Эндотелиновый рецептор В - представители семейства родопсиноподобных рецепторов (класс А), сопряжённых с G белком (GPCR)[1]. Их физиологическая роль заключается в регуляции тонуса сосудов как на уровне эпителиальных тканей, так и на уровне гладкомышечной ткани [2]. Данная работа является этапом большого технологического процесса по исследованию этого рецептора, который заключается в том, что необходимо получить гомогенный препарат рецептора, провести его функциональное тестирование, получить кристаллы с хорошими дифракционными свойствами и определить пространственную структуру высокого разрешения для определения механизмов, лежащих в основе ассоциированных с ним дисфункций. Данная информация позволит приступить к рациональному дизайну лигандов с высокой аффинностью, являющихся потенциальными лекарственными средствами. Эта задача является трудновыполнимой из-за амфифильной природы рецепторов (они являются интегральными, трансмембранными белками) и их низкой стабильности [1]. Экспрессия рецептора была проведена при помощи бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых *Spodoptera Frugiperda*. Белок был получен в форме стабильного мономера, связывающего лиганды - агонист и антагонист.

Генотипирование древних и современных лошадей Алтая

¹Неуместова Александра Ильинична, ²Дружкова Анна Сергеевна

¹Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук, Новосибирск, Россия; ²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия, alexn@mcb.nsc.ru

Во время раскопок стоянок древнего человека на территории Алтая найдено множество костных образцов эпохи плейстоцена и голоцена. Их исследование способно пролить свет на проблему доместикации лошади, а также прояснить структуру и эволюцию древних популяций. Однако, за некоторыми исключениями, эти уникальные образцы на уровне ДНК не изучались.

В данной работе мы анализировали костные образцы лошадей возрастом 10 тыс. лет и 40 тыс. лет (из 4.1 и 11.1 литологических слоев Денисовой пещеры, Алтайский край, соответственно). Выделение древней ДНК проходило в специально оборудованном боксе с соблюдением критериев аутентичности для предотвращения контаминаций.

Нашей лабораторией совместно с ЦКП «Геномика» было проведено полногеномное секвенирование лошадей возрастом 10 тыс. лет и 40 тыс. лет с помощью платформ SOLiD и MiSeq. Мы определили, что данные образцы относятся к виду *Equus caballus*, и установили митохондриальный гаплотип лошади возрастом 10 тыс. лет. В настоящее время данный гаплотип не встречается, однако археологические находки показывают, что в период с 10 тыс. лет до н.э. до 500 лет до н.э. он был широко распространен в Евразии. Среди современных пород близкий к нему гаплотип был найден на территории Тывы.

Для сравнения с современными лошадьми мы выделили ДНК 60 образцов и секвенировали контрольный район митохондриальной ДНК 21 лошади из Горного Алтая (Улаганский и Кош-Агачинский районы) и 4 из Новосибирска. Для анализа выбрали фрагмент длиной 274 п.н, расположенный в области 15,494–15,740 пн. По результатам секвенирования особи были отнесены к 7 гаплотипам, два из которых являются типичными для Европы и Малой Азии, а один найден в Европе и на Дальнем Востоке. Остальные гаплотипы распространены повсеместно. Две из исследованных лошадей (Кош-Агач) не относятся ни к одному из ранее описанных гаплотипов.

Гетерогенность алтайской популяции свидетельствует о том, что популяции подвергались минимальному воздействию искусственного отбора и сохранили исходное разнообразие дикой популяции. Поскольку среди современных образцов из Алтая не было найдено гаплотипа древней лошади, необходимо провести анализ большего количества образцов.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ (грант № 14-04-00723).

Вариабельность сериновых тРНК митохондриального генома членистоногих

Раловец Алина Дмитриевна

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, evcat210@gmail.com

Как известно, тРНК относятся к группе наиболее древних и консервативных биомолекул. В митохондриальных геномах обычно содержится 20–22 гена тРНК, кодирующих 18–20 аминокислот, что значительно меньше, чем количество генов тРНК ядерного генома. Учитывая, что геном митохондрий в процессе эволюции утрачивает часть принадлежащих ему генов, было интересно установить, каково возможное происхождение тех генов мит-тРНК, которые представлены в митогеноме более чем одной копией.

Мы получили из GenBank и проанализировали 202 митохондриальных генома членистоногих из 10 различных отрядов, и провели моделирование вторичной структуры пяти полных наборов мит-тРНК для видов *Abidama producta* (Walker); *Acyrthosiphon pisum* Harris;

Neomaskellia andropogonis Corbett; *Pachypsylla venusta* (Osten-Sacken); *Schizaphis graminum* (Rondani) отряда Полужесткокрылые. Оказалось, что гены тРНК-Ser в митохондриальном геноме членистоногих всегда представлены двумя копиями с разной антикодонной специфичностью. В то же время тРНК-Ser обладали наиболее вариабельной вторичной структурой из всех исследованных мит-тРНК. При этом консервативность нуклеотидной последовательности тРНК-Ser оказалась не связанной с консервативностью вторичной структуры. Например, группа тРНК с антикодоном GCU при довольно консервативной первичной структуре показала высокую вариабельность вторичной структуры.

Изучив строение вторичных структур тРНК-Ser как в эволюционно древних (Myriapoda, Protura, Collembola, Ephemeroptera, Thysanura, Orthoptera, Odonata), так и в более молодых таксонах (Hemiptera, Diptera, Lepidoptera), мы обнаружили 8 вариантов антикодонов сериновых тРНК (ACU, AGA, CUG, GAA, UUA, UCU, UGA, GCU). В каждом геноме обязательно присутствовала тРНК-Ser с антикодоном UGA или GCU, что позволило предположить, что эти антикодоны являлись исходными, а остальные возникали в результате однонуклеотидных замен в антикодонах. Однако после анализа нуклеотидных последовательностей генов было выяснено, что образование новых антикодонов явилось, скорее всего, результатом сдвига рамки считывания, так как в последовательностях обнаруживались консервативные участки, содержащие «исходный» антикодон

Кроме того, оказалось, что тРНК с одинаковыми антикодонами у разных организмов могут обнаруживать сходство нуклеотидной последовательности с генами тРНК-Ser^{UGA} либо тРНК-Ser^{GCU}, что также указывает на независимость происхождения разных копий тРНК-Ser даже при наличии в их последовательностях одинаковых антикодонов.

Выбор контрольных генов для профилирования экспрессии генов морской звезды *Asterias rubens*

Садритдинова Асия Фаязовна, Мельникова Н.В.

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Россия, Москва, asiya.bun@gmail.com

Важнейшую роль при транскриптомных исследованиях играет правильный выбор внутреннего (эндогенного) контроля, в качестве которого обычно используют гены со стабильной конститутивной экспрессией. Это обеспечивает получение надёжных результатов при измерении даже незначительных различий в экспрессии исследуемых генов. Для корректной нормализации важно, чтобы экспрессия контрольного гена была максимально постоянна во всех исследуемых образцах, независимо от типа ткани и условий эксперимента. Идентификация контрольных генов является актуальной задачей, поскольку для определенных таксонов подобные работы до сих пор отсутствуют, а применение «стандартных» контрольных генов без предварительной оценки может привести к ошибочным выводам.

В литературе практически отсутствуют данные по молекулярной биологии и генетике иглокожих – важного компонента морских экосистем. Морская звезда *Asterias rubens* L. населяет Белое, Баренцево и Северное моря и является классическим объектом цитологических, гистологических и эмбриологических исследований. Поэтому изучение молекулярно-биологических особенностей этого вида, в том числе, экспрессии генов, представляет собой огромный интерес и имеет большой потенциал. В данной работе проведен поиск стабильно экспрессирующихся генов, которые можно использовать для нормирования транскриптомных данных, полученных, например, методом количественной ПЦР.

Для идентификации стабильно экспрессирующихся генов, морских звезд *Asterias rubens* подвергали стрессовому воздействию высокими температурами (23°C, 25°C, 27°C, 29°C) в течение различных промежутков времени (15 мин., 30 мин, 1 ч., 2ч., 6ч., 12ч, 24ч., 48ч.), после чего возвращали на 30 минут в естественную температуру - 10°C. Для исследования использовали ткани печеночных выростов. Контрольную группу составляли 30 морских звезд, не подвергшихся воздействиюм высоких температур.

Методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina был проведен предварительный анализ экспрессии генов, по результатам которого был составлен список генов с наиболее стабильной экспрессией, большинство из которых относится к генам «домашнего хозяйства». Методом количественной ПЦР нами валидированы данные секвенирования на расширенной выборке образцов – оценивали изменение уровня экспрессии генов *Tubβ*, *Tuba*, *Ef1α*, *GAPDH*, *18S*, *28S*, *Uba52*, *Actin*. Сравнивали пороговые циклы исследуемых генов для контрольных и опытных образцов, оценивая вариабельность экспрессии генов в норме - у организмов при обычных условиях, и в опыте - у организмов, подвергшихся температурному воздействию. Для таких генов, как *EF1α*, *Ubiq*, *GAPDH* и *TubB* уровень экспрессии в норме и при стрессе изменялся в незначительных пределах (не более чем в 2 раза), что позволяет предложить их в качестве контрольных для нормирования количественных транскриптомных данных при исследованиях морских звезд *Asterias rubens*.

Выражаем благодарность научному руководителю, руководителю группы постгеномных исследований ИМБ РАН, к.б.н. Кудрявцевой Анне Викторовной.

Работы по высокопроизводительному секвенированию и ПЦР в реальном времени выполнены на базе ЦКП «Геном» (ИМБ РАН).

Повышение экспрессии гена *NETO2* – молекулярный маркер рака почки

Снежкина Анастасия Владимировна, Дмитриев А.А.

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, Россия, leftger@rambler.ru*

Канцерогенез – сложный многоэтапный процесс перерождения нормальных клеток в злокачественные. Опухолевая трансформация характеризуется комплексными генетическими (соматические мутации, хромосомные aberrации, рекомбинации ДНК) и эпигенетическими (метилование ДНК, гистоновый код, некодирующие РНК) нарушениями, которые приводят к изменению экспрессии онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста. Идентификация чувствительных молекулярных маркеров, в том числе транскриптомных, для выявления онкологических заболеваний является актуальной задачей современной биомедицины. Однако до сих пор не обнаружено «универсальных» специфичных к виду рака онкомаркеров.

Рак почки является социально значимым заболеванием, характеризующимся высокой смертностью. Ежегодно по всему миру выявляют более 190 тыс. новых случаев рака почки и более 90 тыс. человек умирают по причине этого заболевания.

Нами проведен комплексный биоинформатический анализ двух типов транскриптомных данных для рака почки: нуклеотидных последовательностей EST и гибридизации кДНК на микропанелях (Oncomine). Это позволило выявить ген *NETO2*, характеризующий дифференциальной экспрессией, и два вероятно коэкспрессирующихся с ним гена *COX4B* и *NEFL*. Ген *NETO2* кодирует малоизученный трансмембранный белок, относящийся, наряду со своим единственным паралогом *NETO1*, к уникальному подсемейству CUB- и LDLa-содержащих белков. Известно, что белки NETO1 и NETO2 принимают участие в нейрон-специфичных процессах, в частности в образовании регуляторного комплекса с рецепторами

каинатного типа. Методом ПЦР в режиме реального времени проведена количественная оценка относительного уровня мРНК генов *NETO2* (изоформы 1 и 2), *COX4B* и *NEFL* в 30-ти образцах светлоклеточного рака почки (СРП). Показано значительное повышение экспрессии гена *NETO2* в 90% (до 100 раз) и гена *NEFL* в 67% (до 83 раз) образцов СРП. Установлено, что в большинстве случаев повышается уровень мРНК преимущественно изоформы 2 гена *NETO2*. Выявлено сохранение экспрессии гена *COX4NB* в 81% образцов СРП. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень мРНК гена *COX4NB* не связан с уровнем мРНК гена *NETO2*. Таким образом, ген *NETO2* характеризуется значительным повышением экспрессии при светлоклеточном раке почки, что может быть предложено в качестве нового перспективного маркера для данного типа карцином. Нами впервые показана вовлеченность гена *NETO2* в канцерогенез.

Выражаем благодарность руководителю группы постгеномных исследований (ИМБ РАН), к.б.н. Кудрявцевой Анне Викторовне.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований №14-04-32181 мол_а и №13-04-02072-а.

Генотипирование селекционного материала риса с различной устойчивостью к пирикулярриозу (*Magnaporthe grisea*, Herbert Barr)

Токаренко Мария Романовна

Южный федеральный университет, Россия, Ростов-на-Дону, butenkomasha@gmail.com

Рис – основной пищевой продукт более половины населения планеты. Актуальной проблемой для производителей являются болезни риса, снижающие урожай зерна. Распространенным заболеванием является пирикулярриоз, вызываемый грибом *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr. В этой связи, создание сортов, устойчивых к пирикулярриозу - наиболее эффективный путь получения высоких урожаев риса.

Целью работы является идентификация с помощью ДНК-маркеров гомозиготных линий риса с доминантными аллелями 5-ти генов устойчивости к пирикулярриозу *Pi 1*, *Pi 2*, *Pi 33*, *Pi ta*, *Pi b*, так как «пирамидированные» линии с 5 генами устойчивости к пирикулярриозу, демонстрируют большую степень устойчивости, по сравнению с линиями, с единичными генами.

На базе ВНИИЗК им. И.Г. Калининко в анализ были взяты гибриды F₂, полученные в результате гибридизации гомозиготных форм, с доминантными аллелями генов *Pi 1*, *Pi 2*, *Pi 33* и растений с доминантными аллелями генов *Pi ta* и *Pi b*, а так же был отобран контрольный чувствительный к пирикулярриозу образец (гомозиготный по рецессивным аллелям исследуемых генов). В работе исследовали ДНК-маркеры, ассоциированные с 5 генами устойчивости риса к пирикулярриозу *Rm 224*, *Rm 527*, *Rm 72*, *Pi-b*, *Pi-ta*.

Геномную ДНК выделяли из листовой ткани проростков согласно методике. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере PalmCycler (Corbett Research, Австралия). Температурный режим реакций подбирали для каждой пары праймеров с учетом их нуклеотидного состава. Продукты амплификации разделяли в 1,7% агарозном геле. Гели фотодокументировали с помощью системы GelDoc 2000 (BioRad, США).

По результатам амплификации между исследуемыми образцами выявлены аллельные различия. Размеры амплифицированных фрагментов различались по всем изученным праймерам. Удалось выделить один образец риса, гомозиготный по всем 5 доминантным аллелям. Этот генотип представляет особый интерес для дальнейшей селекции. Так же

показано, что с помощью изученных ДНК-маркеров, можно эффективно отбирать образцы с различной степенью пирамидирования генов для их дальнейшей селекции.

Определение экспрессии PR-белков картофеля в тканях клубней

Третьякова Ольга Михайловна

Гродненский государственный университет имени Я.Купалы, факультет биологии и экологии, Гродно, Республика Беларусь, o.tratsiakova@yandex.ru

Одной из актуальных проблем современной молекулярной генетики является изучение механизмов регуляции активности генов, и в частности, генов защитного ответа растений. Как известно, при взаимодействии растений с патогеном происходит активация сложной системы защитного ответа растений, немаловажную роль в которой играют PR-белки.

Целью данной работы стало изучения индукции PR-генов в тканях клубней картофеля при заражении фитопатогенными бактериями: *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* и *Dickeya dadantii*.

Было определено относительное количество копий мРНК генов *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-5*, *PR-5t*, *PR-6*, *PR-10*, *PR-11* и *HIN-1* как без заражения, так и при заражении бактериями *P.carotovorum* 2А, *P.atrosepticum* 36А и *D.dadantii* ENA49. Заражали два сорта картофеля Веснянка (чувствительный сорт) и Скарб (устойчивый сорт) и инкубировали при 18°C, 28°C и 33°C.

Без заражения наибольший уровень экспрессии отмечался для гена *PR-3* у сорта Скарб и *PR-10* у сорта Веснянка. Экспрессия гена *PR-3* у сорта Скарб повышалась с увеличением температуры, также как и экспрессия гена *PR-5t*.

Высокая индукция генов *PR-3* и *PR-10* наблюдалась в тканях клубней сорта Веснянка при заражении бактериями *P.carotovorum*, *P.atrosepticum*, *Dickeya dadantii* и инкубации при 18°C. При более высоких температурах инкубации, уровень экспрессии этих генов резко снижался. Экспрессия гена *PR-5t* напротив стимулировалась при 33°C и резко снижалась при более низких температурах.

Высокая степень индукции гена *PR-3* и *PR-10* при заражении бактериями *Pc* и *Pa* и инкубации при 18°C по сравнению с 33°C была отмечена в тканях клубней сорта Скарб. При заражении бактериями *P.carotovorum*, *P.atrosepticum*, *Dickeya dadantii* уровень экспрессии гена *PR-5t* был значительно выше при инкубации при 33°C по сравнению с 18°C и 28°C.

Таким образом, эксперименты показали, что у картофеля сорта Скарб резистентность к бактериальной мокрой гнили коррелирует с повышенной экспрессией гена *PR-5t*.

Ингибиторы образования биопленок клетками стафилококков на основе фуранонов

Тризна Елена Юрьевна, Курбангалиева А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань, trizna91@mail.ru

В настоящее время многие патогены человека приобрели устойчивость к действию антибиотиков, что объясняет необходимость поиска новых антибактериальных препаратов. *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* являются одними из основных внутрибольничных патогенов, вызывающих инфекции на медицинских имплантатах. Это обусловлено образованием биопленок этими бактериями. В составе биопленок они обладают повышенной устойчивостью к иммунной системе человека, антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам. Поэтому актуальной проблемой является поиск новых препаратов, подавляющих не только рост бактерий, но и образование биопленок.

В последние годы было показано, что галогенизированные фураноны, обладают антимикробными свойствами и подавляют микробную колонизацию на поверхности водорослей. Эти фураноны, уничтожают до 90% болезнетворных бактерий.

Целью работы было идентифицировать производные фуранонов, эффективно подавляющих рост и образование биопленок бактериями *Staphylococcus*.

В Химическом институте КФУ были синтезированы галоген-производные фуранонов. Нами был проведен скрининг соединений эффективно подавляющих рост и образование биопленок бактериями *S. aureus* и *S. epidermidis* более чем в 3 раза. Это фураноны с условными номерами Ф1, Ф6, Ф8, Ф29, Ф35, Ф83.

Минимальная ингибирующая фуранонов Ф8, Ф29, Ф83 составила 25 мкг/мл, тогда как для фуранонов Ф1, Ф6, Ф35 - 5 мкг/мл. Также исследовали цитотоксичность отобранных соединений, в МТС-тесте на клетках линии MCF7 и клетках фибробластов человека. По полученным данным подсчитывали коэффициент цитотоксичности CC_{50} (концентрация вещества, при которой 50% активность снижается в 2 раза). Соединениями с наименьшей цитотоксичностью для обеих линий клеток, были фураноны Ф29 и Ф35.

С помощью электронной микроскопии был установлен цитостатический эффект соединений и их влияние на морфологию клеток. Практически все соединения изменяли морфологию клеток и подавляли их деление при концентрации 10 мкг/мл. Однако, фуранон Ф35 не влиял на морфологию клеток и способность к делению даже при концентрации 50 мкг/мл.

Таким образом, можно сделать вывод, что фуранон Ф35 может быть эффективным агентом, подавляющим образование биопленок бактериями *Staphylococcus*, при этом обладать более слабым эффектом против других бактерий. Кроме того, Ф35 в рабочих концентрациях не оказывает цитотоксического эффекта на клетки эукариот. Следовательно, Ф35 может быть перспективным соединением в сфере медицины, используемым для обработки поверхностей и медицинского оборудования для предотвращения образования биопленок. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31635 мол_а.*

Создание нокаутов Т-клеток человека по рецептору ВИЧ и адгезионным молекулам с помощью нуклеазы Cas9 для оценки роли этих молекул в межклеточной трансмиссии вируса

Шунаева Анастасия Андреевна, Тарасевич Анна Александровна, Мешкова Татьяна Дмитриевна, Круглова Наталья Андреевна

*Лаборатория иммунохимии, ГИЦ Институт иммунологии, Россия, Москва,
ashunaeva@gmail.com*

Заражение ВИЧ приводит к катастрофическому снижению популяции $CD4^+$ Т-клеток, что, как правило, заканчивается развитием СПИДа. Инфекция ВИЧ происходит как свободным вирусом, так и через вирусологический синапс, образующийся между клеткой-продуцентом вируса и клеткой-мишенью. Вирусологический синапс инициируется взаимодействием белка оболочки вируса gp120 с молекулой CD4 (рецептором вируса). К месту контакта привлекаются адгезионные молекулы LFA-1, ICAM-1 и ICAM-3. Чтобы оценить вклад вирусологического синапса в инфекцию вирусом, поставлена задача получить Т-клетки с нокаутами по генам *CD4*, *LFA-1*, *ICAM-1* и *ICAM-3*. Нокаут генов осуществлен с использованием новейшей технологии, основанной на применении guide RNA (gRNA) и геномной нуклеазы Cas9 (относится к CRISPR системе бактериального иммунитета).

Дизайн таргетных последовательностей для gRNA разработали с помощью он-лайн ресурса «CRISPR Design Tool». Мутантный Cas9 (Cas9D10A) с нулевой активностью получили путем замены аспарагиновой кислоты на аланин в десятом положении белка. Для получения нокаута в Т-клеточных линиях СЕМ и Jurkat клетки трансфецировали тремя плазмидами, кодирующими Cas9D10A и две gRNA, специфичные к разным цепям ДНК гена-мишени. Клетки тестировали на наличие нокаутов через неделю после трансфекции методом проточной цитометрии. Клетки, негативные по экспрессии соответствующего антигена, сортировали на приборе FACS Aria II.

В результате анализа генов-мишеней подобраны пары наиболее эффективных последовательностей gRNA. Получен вектор для экспрессии мутантного белка Cas9D10A. Данный мутант при котрансфекции с парой gRNAs, таргетирующих ген в непосредственной близости друг от друга, эффективно нокаутирует ген. Таким образом, получены и проверены на клеточных культурах четыре пары gRNAs, специфичных к *CD4*, *LFA-1*, *ICAM-1*, *ICAM-3*. Эффективность нокаутирования генов с помощью Cas9D10A сопоставима с эффективностью нокаута Cas9 дикого типа и составляет для указанных генов от 5 до 25%.

Полученные Т-клеточные нокауты демонстрируют возможность широкого применения данной технологии для нокаута практически любого гена, а также для других видов редактирования генома человека. Созданные нокауты в дальнейшем будут использоваться для оценки вклада межклеточной инфекции и вирусологического синапса в механизмы распространения ВИЧ-1 *in vivo*.