

## Подсекция «Молекулярная биология»

### Устные доклады

#### Оценка влияния сверхэкспрессии нуклеолина на чувствительность клеток HeLa к обработке этопозидом

*Агеева Л.В., Глухов С.И., Рубцов М.А.*

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет,  
Россия, Москва  
lyly.ag@gmail.com*

Применение в химиотерапии онкологических заболеваний ингибиторов ДНК-топоизомеразы II (топоизомеразных ядов) нередко приводит к развитию так называемых «обусловленных лечением» или «вторичных» лейкозов, ассоциированных с хромосомной транслокацией t(8;21)(q22;q22), затрагивающей гены *AML1* и *ETO*. Под действием топоизомеразных ядов в ДНК образуются двунитевые разрывы, которые могут стать причиной дальнейшей хромосомной перестройки. Очевидно, что для этого необходима «встреча» концов разрывов в ДНК разных хромосом в одном ядерном компартменте, где и происходит репарация поврежденной ДНК. Ранее в нашей лаборатории было показано, что вследствие обработки клеток Jurkat ингибитором ДНК-топоизомеразы II этопозидом увеличивается вероятность нахождения гена *ETO* на поверхности ядрышка. Также было показано увеличение частоты взаимодействия участка хроматина, содержащего ген *ETO*, с мажорным белком ядрышка нуклеолином. Целью настоящей работы было установление возможной роли нуклеолина в процессах, происходящих при обработке клеток этопозидом. Мы транзистентно трансфицировали клетки HeLa плазмидой, обеспечивающей сверхэкспрессию нуклеолина. Двунитевые разрывы ДНК детектировали методами «комета-теста» и электрофореза в пульсирующем поле.

Мы показали, что фрагментированность ДНК в клетках, сверхэкспрессирующих нуклеолин, выше, чем в контрольных клетках. Следовательно, сверхэкспрессия нуклеолина приводит к увеличению чувствительности клеток HeLa к обработке этопозидом. Поскольку известно, что нуклеолин обладает активностями гистонового шаперона и участвует в ремоделировании хроматина, можно предположить, что его сверхэкспрессия приводит к общей или локальной деконденсации хроматина, т.е. к увеличению числа сайтов в ДНК, доступных для посадки и расщепления ДНК-топоизомеразой II. Дополнительные сведения о возможных функциях белков ядрышка в процессах образования и репарации двунитевых разрывов ДНК могут быть полезны для понимания механизмов образования хромосомных перестроек, а также для поиска новых методов лечения онкологических заболеваний.

Работа выполнена при частичном финансировании из средств ГК П1339 и 16.740.11.0629 (Министерство образования и науки Российской Федерации), гранта 10-04-00305-а (РФФИ), гранта компании Carl Zeiss и Гранта Президента РФ (МК-222.2011.4).

#### Профиль интенсивности транскрипции хлоропластных оперонов в растениях ячменя при воздействии различных факторов

*Алейникова А.Ю., Зубо Я.О., Кузнецов В.В.*

*ИФР РАН, Россия, Москва  
anastasia\_ale@mail.ru*

В растениях носителями генетической информации наряду с ядром являются также митохондрии и хлоропласты. Однако в отличие от ядерных генов, гены пластид сгруппированы в полицистронные кластеры, имеющие общую регуляторную область и транскрибируемые с единого промотора. В настоящее время механизмы регуляции транскрипции генов в составе хлоропластных оперонов у высших растений не изучены, хотя это исключительно важно для понимания регуляции биогенеза хлоропластов. Объектом исследования служили первые настоящие листья ячменя сорта «Луч» (*Hordeum vulgare* L.) разного возраста (3-, 9- и 18-дневные растения) и мутантные растения ячменя *albostrians* (*Hordeum vulgare* cv «Haisa»). Из

листьев выделяли интактные хлоропласты и проводили run-on транскрипцию. В качестве гибридационных проб использовали амплифицированные фрагменты ДНК, выровненные по размеру и содержанию ГЦ пар нуклеотидов. Пробы были подобраны на пять хлоропластных оперонов: *rpoB-rpoC1-rpoC2*, *psaA-psaB-rps14*, *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA*, *atpB-atpE-trnV-intr-ndhC-ndhK-ndhJ*, *rrn16-trnI-trnA-rrn23-rrn4,5-5S*. По результатам экспериментов на растениях ячменя разного возраста можно сделать вывод, что возраст не оказывает существенного влияния на профиль транскрипции генов изученных оперона, хотя интенсивность транскрипции всех генов значительно сокращается с возрастом. Это согласуется со снижением тотальной интенсивности транскрипции в более старых тканях, по сравнению с молодыми. Аналогично, интенсивность транскрипции оперонов снижалась под действием гормонов, однако профиль транскрипции менялся. На основании этого, можно предположить, что экзогенные гормоны специфически влияют на транскрипцию генов в хлоропластных оперонах, что может быть связано с разной чувствительностью к ним элементов транскрипционной машины хлоропласта (начиная с полимераз и заканчивая стабильностью транскриптов). С увеличением времени синтеза реакции *in vitro* транскрипции уровень транскрипции проб возрастал, однако значимых изменений в профиле транскрипции изучаемых оперонов при этом не наблюдалось.

### **Анализ полиморфизма длины амплифицируемых фрагментов ДНК с рибосомными праймерами для *Puccinia graminis* в системе «паразит-хозяин» под воздействием теплового шока**

*Байдарова Елена Дмитриевна*

*Московский государственный университет им. Ломоносова, биологический факультет,*

*кафедра молекулярной биологии, Россия, Москва*

*elena.baydarova@gmail.com*

При секвенировании минорных ПЦР-фрагментов IGS-1 спейсеров осенних спор 2010 года возбудителя стеблевой ржавчины злаков *P.graminis* оказалось, что они содержат участки, гомологичные мобильным элементам, которые находятся на третьей хромосоме злаков и окружают гены устойчивости растения к грибам. Известно, что активность мобильных элементов возрастает в ответ на различные стрессовые воздействия, одним из которых является тепловой шок. Возможно, именно тепловая аномалия лета 2010 года спровоцировала вспышку транспозиционной активности мобильных элементов, зафиксированную в нашей лаборатории в рибосомных IGS-1 спейсерах стеблевой ржавчины.

В данной работе растения ржи, зараженные спорами *P.graminis*, подвергали тепловому шоку (2ч, +36°C). Гетерогенность амплификации межгенных спейсеров IGS-1 проверяли методом ПЦР с праймерами Q и Y, комплементарными флангам генов *P.graminis* 28S и 5S рРНК, соответственно.

В результате, помимо характерных для этого спейсера мажорных ПЦР-продуктов IGS-1 *P.graminis*, мы обнаружили дополнительные минорные продукты, размерами от 200 п.о. до 580 п.о. Интересно, что минорные продукты также наблюдались и в контрольном незараженном грибом растительном образце, подвергнувшись тепловому шоку, что может свидетельствовать о вспышке транспозиционной активности мобильных элементов в растении-хозяине в ответ на оба стрессовых воздействия – как на грибную инфекцию, так и на тепловой шок.

В совокупности с ранее полученными данными о постепенном накоплении в ряду повторных заражений растений миноров IGS-1 спейсеров сходных размеров в спорах *P.graminis*, представленные данные свидетельствуют в пользу горизонтального переноса мобильных элементов из растения-хозяина в гриб под воздействием теплового шока и метаболитов паразита.

Хотелось бы выразить искреннюю благодарность моему руководителю Малеевой Ю. В.

## **Роль межхромосомной коммуникации в регуляции экспрессии генов *white* и *mini-white D. melanogaster***

**Былино Олег Валерьевич**

*Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета  
имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва*

*bylino@gmail.com*

Пространственная организация хромосом внутри интерфазного ядра и их взаимодействия рассматриваются в настоящее время как один из важных механизмов регуляции экспрессии генов. Межхромосомная коммуникация впервые была обнаружена у дрозофилы и позднее у многих других организмов, в том числе и у человека. Вместе с тем роль межхромосомной коммуникации в регуляции экспрессии генов изучена недостаточно. В качестве модели использовали конструкции на основе Р-элемента, содержащие репортерные трансгены *mini-white* и *white*, экспрессию которых изучали в различном геномном положении. Обнаружили, что неаддитивная активация экспрессии (трансактивация) пары копий *mini-white* зависит от пространственной близости трансгенов на гомологичных хромосомах и наблюдается на расстоянии порядка 30-50 т.п.н. между копиями. Проанализировав экспрессию репортеров в составе конструкций различного типа, мы выяснили, что трансактивация возникает вследствие воздействия на *mini-white* эндогенных энхансеров. Мы показали, что в присутствии собственного энхансера гена трансактивация возможна на расстоянии порядка 60-80 т.п.о. Вместе с тем, мы обнаружили, что трансактивация не характерна для эндогена *white* на X-хромосоме и полноразмерного локуса *white*, помещенного в составе Р-элемента на аутосомы. Мы предполагаем, что трансактивация *mini-white* является следствием эффекта положения репортера в геноме и возникает при случайном воздействии DPE-(downstream core promoter element)-зависимых энхансеров на DPE-содержащий промотор *mini-white*. Близость к такому энхансеру и разреженная структура хроматина определяют степень активации *mini-white*. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что собственный энхансер гена, взаимодействуя со своим промотором, препятствует активации этого промотора другими энхансерами. Это может служить одним из механизмов ограничения действия энхансеров и поддержания правильной регуляции при плотном расположении коэкспрессирующихся генов. Полученные результаты расширяют представления о значении межхромосомной коммуникации в регуляции экспрессии генов у дрозофилы, а также пополняют сведения о свойствах гена *white* дрозофилы.

## **Максикольцевая локализация генов гРНК: образование эволюционно стабильных структур редактируемых доменов криптогенов трипаносоматид**

**Герасимов Евгений Сергеевич, Ефимова Надежда Сергеевна**

*Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

*jalgard@yandex.ru*

Особенностью редактирования в митохондриях трипаносоматид является участие в нем коротких молекул РНК, называемых гидовыми, которые являются факторами специфичности, определяющими место и число вставляемых нуклеотидов. Редактируемый участок криптогена, называемый редактируемым доменом, у разных криптогенов, а также в ряде случаев у одного криптогена разных видов, может иметь разную длину, так что в его редактирование вовлекается разное количество гРНК. В большинстве случаев гены гРНК кодируются миникольцевой компонентой генома. Однако существует несколько гРНК, гены которых располагаются на максикольце.

Путем установления первичных структур редактируемых доменов криптогенов представителей разных филогенетических групп трипаносоматид, преимущественно гомоксенных, и сравнения их с известными, нами было показано, что криптогены можно условно разделить на три варианта организации. Одним из вариантов является криптоген с коротким эволюционно постоянным по структуре и длине редактируемым доменом. Такие криптогены обычно редактируются 1, реже 2 гРНК исключительно максикольцевого

происхождения. Согласно одной из моделей, уменьшение длины редактируемого домена происходит в результате ретропозиции частично отредактированной мРНК в максикольцо с последующей утратой классов миниколец, кодирующих соответствующие гены гРНК. Ввиду невозможности утраты генов гРНК, расположенных на максикольце, ретропозиция в случае криптогенов с максикольцевыми гРНК не происходит. Образуется эволюционно стабильная структура, характерная, например, для криптогенов *sub*, ND7, COII.

Гены гРНК на максикольце были идентифицированы у *Leishmania tarentolae* и *Crithidia fasciculata*, а также фрагментарно у нескольких других видов. При этом у первых двух видов часть генов гРНК собрана в кластеры на границах дивергентной и консервативной областей. В нашей работе мы идентифицировали аналогичные кластеры у нескольких видов лейшманий и показали их способность редактировать соответствующие криптогены. Также у нескольких гомоксенных видов гРНК были локализованы в межгенных областях максикольца.

Наши результаты предполагают, что максикольцевое расположение генов гРНК приводит к формированию особого типа структуры криптогена, имеющего эволюционно консервативный короткий редактируемый домен.

### **Метод идентификации ДНК - связывающих белков и его применение для изучения системы репарации ДНК Молликут.**

*Горбачев Алексей Юрьевич*

*ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, лаборатория протеомного анализа, Москва, Россия*

*augorbachev@gmail.com*

Молликуты являются обособленной группой грамположительных бактерий, отличительными чертами которой является малый размер генома, отсутствие клеточной стенки и паразитический образ жизни. У Молликут отсутствуют ферменты нескольких систем репарации ДНК. В частности, неизвестно, какие белки микоплазм узнают ДНК – мисматчи, образующиеся из-за ошибок репликации ДНК.

Для идентификации белков, участвующих в поддержании геномной стабильности у микоплазм, мы использовали усовершенствованный нами метод двумерного электрофоретического разделения с последующей масс-детекцией белковых пятен методом MALDI-TOF.

Комплексы белков с ДНК – мисматчами разделяли в нативных условиях с добавлением флуоресцентно меченой ДНК для торможения ДНК-связывающих белков в геле (EMSA). Для дальнейшего разделения белков, связывающих ДНК-мисматчи проводили электрофорез во втором направлении в денатурирующих условиях.

В результате, в клеточном экстракте *Mycoplasma gallisepticum* мы идентифицировали белок, способный связывать ДНК, содержащую неспаренные основания, а также однонуклеотидные вставки/делеции. Этим белком оказался гистоноподобный белок ХУ *M. gallisepticum* (mgHU). Мы получили рекомбинантный mgHU белок и показали его функциональную активность. Таким образом, в нашей работе впервые показана способность гистоноподобного белка mgHU, гомологичного HU белку *E. coli* связывать ДНК-мисматчи.

Кроме того, в клеточном экстракте *Spiroplasma melliferum* мы идентифицировали белковые факторы, способные специфически связывать и защищать от действия нуклеаз одноцепочечную ДНК. При этом *hesA* белок – один из ключевых белков рекомбинации, связывающий оцДНК, не функционален у *S. melliferum*. Идентифицированными белками оказались белки, кодируемые в плазидах, гомологичные SSB белку *E. coli*. Мы получили рекомбинантные SSB белки и показали их функциональную активность.

## Создание тест-системы для оценки рекомбиногенной активности противораковых лекарственных препаратов

*Ефимова В.С., Котов В.Р., Рубцов М.А.*

*Кафедра молекулярной биологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,  
119234, Москва, Ленинские горы д.1 стр.12*

*vera33-22@mail.ru*

Ингибиторы ДНК-топоизомеразы II традиционно являются одним из основных классов химиотерапевтических препаратов, применяемых для лечения онкологических заболеваний. Однако эти препараты имеют существенный побочный эффект. Так, известно, что под действием ингибиторов ДНК-топоизомеразы II в клетке образуется большое количество двухцепочечных разрывов, некорректная репарация которых нередко приводит к возникновению хромосомных транслокаций, ассоциированных с так называемыми «вторичными» лейкозами. Сегодня очевидно, что теоретически оценить эффективность противоракового агента как «лечащего рак», либо вызывающего его, невозможно, поэтому необходимо определять обе эти активности экспериментально. И определяют их либо испытаниями на лабораторных животных, либо тестами в минимальных *in vitro* системах. Недостатки первого метода – длительность и высокая стоимость; второго – низкая достоверность, так как учитывается влияние, в лучшем случае, нескольких участников клеточного метаболизма.

Целью настоящей работы явилось создание тест-системы для *in vivo* определения рекомбиногенной активности противораковых лекарственных препаратов. На основе плазмиды рсDNA 3.1 СТ-GFP, была создана модельная генетическая конструкция, в которой промотор (Pcmv) и репортерный ген (GFP) разделены вставкой, фланкированной сильными негомологичными сайтами связывания/расщепления эукариотической ДНК-топоизомеразы II. При транзientной трансфекции в культивируемые клетки человека линии HEK293 «разделяющая вставка», представляющая собой либо «бессмысленную» открытую рамку считывания, либо кодирующую последовательность гена красного флуоресцентного белка mCherry, должна блокировать экспрессию GFP. Однако, в случае обработки клеток, несущих данный конструкт, ингибитором ДНК-топоизомеразы II может происходить рекомбинация между сайтами связывания/расщепления топоизомеразы, в результате чего должна происходить делеция «разделяющей вставки» и активироваться экспрессия GFP. Таким образом, интенсивность флуоресценции GFP в обработанных клетках будет прямо свидетельствовать о рекомбиногенности того или иного препарата. Работа выполнена при частичном финансировании из средств ГК П1339 и 16.740.11.0629 (Министерство образования и науки Российской Федерации), гранта 10-04-00305-а (РФФИ), гранта компании Carl Zeiss и Гранта Президента РФ (МК-222.2011.4).

## Роль заместителей боковых групп 4,11-антратиофен-5,10-диона на стабилизацию теломерного G-квадруплекса и избирательность связывания.

*Ильинский Н.С.*

*Московский физико-технический институт (государственный университет),*

*Россия, Долгопрудный*

*ilinsky\_nick@mail.ru*

Антрациклиновые антибиотики и их аналоги – основной класс препаратов, применяющихся для противоопухолевой химиотерапии. Модификация антрациклинов направлена на борьбу с множественной лекарственной устойчивостью и уменьшение побочных эффектов. Новые антратиофендионы с различными боковыми заместителями синтезированы в НИИИНА им. Г.Ф. Гаузе. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина показаны их цитотоксичность и ингибирующее действие на теломеразу. В данной работе изучено взаимодействие препаратов с дуплексом и G-квадруплексом ДНК. Предпочтительное связывание с G-квадруплексом гарантирует специфичность токсического действия на опухолевые клетки.

Изучено взаимодействие четырех лигандов с двуцепочечной тимусной ДНК и внутримолекулярным теломерным G-квадруплексом. Методом безызлучательного переноса энергии (FRET) между красителями, ковалентно связанными с 5'- и 3'- концами теломерного олигонуклеотида, определена стабильность структуры ДНК, комплекса квадруплекс-лиганд без и в присутствии конкурирующих агентов.

Показано сильное связывание ( $K_a \approx 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) малых молекул с теломерным квадруплексом в физиологических условиях. Константа ассоциации с дуплексом на порядок ниже. Ранее было показано, что соединения данного ряда разрушают G-квартеты квадруплекса. Методом FRET определено, что добавление агентов не раздвигает концы теломерного G-квадруплекса, то есть соединения не изменяют положения сахарофосфатного остова. Лиганды стабилизируют плавление такой структуры на  $10 \div 20^\circ\text{C}$ . При добавлении к смеси лиганд-квадруплекс дуплекса ДНК концентрацией в 10 раз превышающей концентрацию квадруплекса температура полуперехода уменьшается на  $5 \div 10^\circ\text{C}$ . Так качественно определено, что связывание лиганд-квадруплекс выдерживает десятикратную конкуренцию с дуплексом ДНК.

Лиганды изученного ряда проявляют специфичность к G-квадруплексу, причем в разной степени, в зависимости от боковых заместителей. Планируется тестирование модификаций лучших из рассмотренных веществ для поиска соединений с большей селективностью. Определен характер воздействия соединений на структуру теломерного G-квадруплекса.

### **Взаимодействие производных тетракаатионного порфирина с G-квадруплексом ДНК промоторного участка с-Мус онкогена.**

*Ковалева О.А.*

*Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный  
oksanakov2005@yandex.ru*

Одним из современных направлений в противоопухолевой терапии является создание препаратов направленных на ингибирование онкогенов семейства мус. Экспрессию онкогенов можно ингибировать за счет стабилизации G-квадруплексной структуры их промоторов. G-квадруплексы – это структурные единицы ДНК, поддерживающие стабильность теломер и участвующие в регуляции экспрессии генов.

Соединение-прототип 5,10,15,20-тетраakis(4-N-метилпиридиний)порфирина (ТМРyP4) известно как лиганд, специфичный к G-квадруплексным структурам. Химические модификации этого соединения направлены на повышение избирательности.

В данной работе изучено сродство к промотору онкогена с-Мус новых, синтезированных в Ивановском государственном химико-технологическом университете, модификаций ТМРyP4: (1) 5,10,15,20-тетраakis(N-карбоксиметил-4-пиридиний)порфирина и (2) 5,10,15,20-тетраakis(N-этоксикарбонилметил-4-пиридиний)порфирина. Взаимодействие новых соединений с G-квадруплексными структурами образованными последовательностью промотора онкогена с-Мус исследованы с использованием ряда оптических методов.

Определены константы связывания соединений (1) и (2),  $K_a = 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  и  $K_a = 1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  соответственно, что в 10 раз выше, чем с двойной спиралью ДНК смешенной последовательности. Стехиометрия взаимодействия – одна молекула лиганда на одну молекулу с-Мус. Взаимодействие с соединениями не приводит к изменениям в структуре молекулы с-Мус. При взаимодействии новых производных порфирина с квадруплексной структурой промотора с-Мус онкогена наблюдается снижение интенсивности флуоресценции со значительным изменением формы спектра.

В данной работе установлено предпочтительное связывание новых производных порфирина с G-квадруплексными структурами. Обнаруженные свойства новых производных ТМРyP4 в комплексе с различными структурами ДНК позволяет получить новую информацию о физике процесса связывания, а также о механизме противоопухолевого действия этих соединений.

## Исследование редактирования первичных транскриптов криптогенов G4 и rps12 у простейших семейства *Trypanosomatidae*

*Мерцалов Григорий Валентинович, Герасимов Евгений Сергеевич*

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,*

*Россия, Москва*

*mertsalovgrigoriy@gmail.com*

У простейших семейства *Trypanosomatidae* ключевую роль в реализации генетической информации играет посттранскрипционное редактирование пре-матричной РНК: в определенных сайтах первичного транскрипта встраиваются или удаляются блоки уридилловых нуклеотидов. У *Trypanosoma brucei* известно, что редактирование транскриптов ряда криптогенов, в частности, G4, приводит к образованию различных вариантов зрелой мРНК. Задача данной работы - определить наличие редактирования и его альтернативных вариантов для первичных транскриптов криптогенов G4 и rps12 у других представителей семейства. Для решения поставленной задачи используются методы выделения РНК из культур различных простейших (например, *Leptomonas rigidus*), последующей обратной транскрипции и амплификации полученной кДНК. Далее, полученная смесь кДНК лигируется в вектор для трансформации клеток *E. coli*, и впоследствии отбираются клоны, содержащие плазмиду со вставкой ожидаемой длины,.

В результате сравнения последовательностей из разных клонов было показано редактирование первичных транскриптов криптогенов G4 и rps12, определены сайты редактирования и количество добавленных и удаленных уридилловых нуклеотидов. В отредактированных транскриптах находятся протяженные открытые рамки считывания. Однако в базах данных не было найдено белков со значительной гомологией с предполагаемыми белковыми продуктами. Наиболее интригующим результатом являются наблюдаемые различия в последовательности близкой к 3'-концу области транскриптов одного криптогена. Различия проявлялись не только в количестве уридилловых, но и других нуклеотидов – адениловых и гуаниловых. Результаты биоинформатического исследования транскриптов могут свидетельствовать об уникальности данных белков либо о том, что среди проанализированных последовательностей не представлена полностью отредактированная мРНК. Однако полученные результаты доказывают, что редактирование, в частности добавление всего нескольких нуклеотидов, не уничтожает, но изменяет существующую рамку считывания на новую. Различия в количестве уридилловых нуклеотидов позволяют предположить альтернативные варианты редактирования. Для интерпретации наличия в последовательностях различающихся блоков аденинов и гуанинов требуются дальнейшие исследования.

## Определение минимального участка связывания рибосомного белка L4 на мРНК S10-подобного оперона археи *Methanococcus jannaschii*

*Михайлина А.О., Сарских А.В., Костарева О.С.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки*

*Институт белка РАН, Пущино, Россия*

*lisenok020388@mail.ru*

Известно, что экспрессия 11 генов S10 оперона *Escherichia coli* регулируется белком L4 на уровне трансляции и транскрипции; участок связывания белка L4 расположен в некодирующей лидерной 172-нуклеотидной области мРНК, расположенной с 5'-конца от первого гена – S10. В археях область S10-подобного оперона отличается от бактериальной, она короче и первым геном является ген рибосомного белка L3 (*rpl3*), причём 5'-нетранслируемая область мРНК *rpl3* не содержит детерминант, похожих на участок связывания бактериального белка L4. Ранее нами было показано, что добавление архейного рибосомного белка L4 *Methanococcus jannaschii* (MjaL4) в бесклеточную сопряжённую систему транскрипции-трансляции *in vitro* специфически ингибирует синтез белка MjaL3 с плазмиды, кодирующей 200-нт лидерную область мРНК (НТО) и ген белка MjaL3 (*rpl3*).

Целью данной работы является определение минимального участка связывания белка MjaL4 на мРНК белка L3 *M.jannaschii* (MjaL3). В работе использовались методы генной инженерии и метод оценки эффективности ингибирования синтеза одного белка другим в сопряжённой системе транскрипции-трансляции *in vitro*.

Нами были созданы две генетические конструкции, несущие гены фрагментов мРНК MjaL3, которые содержат 5'-НТО меньшей длины (150 и 50 нт) и ген *rpl3*. Было показано, что MjaL4 в сопряжённой системе транскрипции-трансляции ингибирует синтез MjaL3 с обеих конструкций, что свидетельствует о том, что участок связывания белка L4 расположен в области, включающей 50-нт НТО и начало структурной части гена *rpl3*. Для уточнения участка связывания белка MjaL4 в пределах структурной части гена *rpl3* нами были созданы несколько генетических конструкций, которые кодируют фрагменты мРНК различной длины с вариациями длин 5'-НТО и структурной части гена *rpl3*. Данные фрагменты будут использованы для определения констант диссоциации комплексов MjaL4-мРНК методом связывания на фильтрах. Таким образом, мы получим количественную оценку стабильности комплексов MjaL4 с минимальным фрагментом мРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Программы МКБ РАН.

### **Анализ генофонда двуполого вида *Darevskia valentini* по данным аллельного разнообразия микросателлитных локусов**

**Можаровская Людмила Валентиновна<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский педагогический государственный университет»,  
Россия, Москва

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена  
Российской академии наук, Россия, Москва  
*milamozh@yandex.ru*

Двуполый вид *Darevskia valentini* является «отцовским видом» для партеногенетических гибридных видов *Darevskia armeniaca* и *Darevskia unisexualis*. Ранее было показано, что у данных партеногенетических видов на фоне видоспецифических ДНК-фингерпринтных паттернов выявляется генетическая неоднородность по некоторым микросателлитным маркерам. Наблюдаемая разница в подвижности фрагментов ДНК может быть вызвана различными причинами: мутациями в сайтах рестрикции, изменением длины микросателлитного кластера, а также мутациями в участках ДНК, прилежащих к микросателлитному кластеру. Для изучения природы наблюдаемого явления был проведен ряд экспериментов по монолокусному ПЦР-анализу микросателлитных локусов. В настоящей работе получены и проанализированы экспериментальные данные по молекулярной структуре и изменчивости микросателлитных локусов у представителей двуполого вида рептилий *Darevskia valentini*. С помощью монолокусного ПЦР, используя пары праймеров, подобранные для локусов Du215 (Ac по AY574978), Du281 (Ac по AY442143) и Du323 (Ac по AY574977) *Darevskia unisexualis*, проведен анализ аллельного полиморфизма ортологичных локусов в шести популяциях *Darevskia valentini*. Установлено, что изучаемые локусы являются полиморфными и представлены в популяциях несколькими аллельными вариантами. При секвенировании полученных ПЦР продуктов было показано, что обнаруженные аллельные варианты отличаются между собой одиночными нуклеотидными заменами, а также размером и составом микросателлитного кластера. Полученные данные могут дать новую информацию о происхождении и о филогенетических связях в группе ящериц рода *Darevskia*, а также установить генетический вклад каждой из шести исследованных популяций в генофонд двуполого вида *Darevskia valentini* с помощью математической модели генетико-популяционной структуры.



## **Влияние экспрессии гена цитоинсектотоксина СІТ1а в культуре клеток НЕК293 на развитие *C. trachomatis***

**Полина Н.Ф.<sup>1</sup>, Кострюкова Е.С.<sup>1</sup>, Василевский А.А.<sup>2</sup>**

*1 – ФБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва,*

*2 – УРАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.*

*Овчинникова, Москва*

*nady27@rambler.ru*

Антимикробные пептиды обнаружены у широкого ряда организмов: бактерий, грибов, растений, животных. Их использование при лечении инфекционных заболеваний имеет ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками. Пептиды обладают более широким спектром антимикробного действия, а возникновение резистентности у микроорганизмов к пептидам является маловероятным событием. Яд паука *Lachesana tarabaevi* представляет собой комплекс биологически активных веществ, среди которых особое место занимают пептиды, обладающие высокой антибактериальной активностью. Так, ранее нами было показано, что при экспрессии цитоинсектотоксина СІТ1а из яда паука *Lachesana tarabaevi* в культуре клеток НЕК293 наблюдалось подавление развития хламидийной инфекции. В данной работе изучалось влияние экспрессии гена СІТ1а в культуре клеток на развитие инфекции *C. trachomatis* на различных стадиях жизненного цикла.

В ходе работы культуру клеток НЕК293 трансфецировали экспрессирующим вектором, содержащим ген пептида СІТ1а из яда *L. tarabaevi*, находящийся под контролем тетрациклин-зависимого промотора цитомегаловируса человека. Далее проводили заражение культуры клеток элементарными тельцами *C. trachomatis*. Индукцию экспрессии гена пептида проводили через 1 час и через 16 часов после заражения. Затем через 48 часов оценивали степень ингибирования развития хламидийной инфекции при помощи реакции прямой иммунофлуоресценции антителами, специфичными к ЛПС хламидий. Через 72 часа после заражения определяли титр дочерних элементарных телец. В результате было показано, что при экспрессии гена пептида СІТ1а на разных фазах развития *C. trachomatis* эффективное подавление инфекции наблюдается на стадии образования незрелых включений. Пептиды из яда паука могут рассматриваться как потенциальные агенты для лечения хламидийной инфекции.

## **Влияние неорганических полифосфатов на конформацию пептида АК187-196 глюкантрасферазы Bgl2p - амилоида клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae***

**Рекстина Валентина Владимировна, Безсонов Евгений Евгеньевич**

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Россия, Москва*

*vrexтина@gmail.com*

Bgl2p – мажорный белок клеточной стенки дрожжей со свойствами амилолида – устойчив к обработке детергентами и протеиназами, способен образовывать фибриллы. Условия формирования амилоидов клеточной поверхности низших эукариот малоизучены. Существует гипотеза о возможном влиянии полианионов (например, неорганических полифосфатов) на процесс амилоидообразования. Для проверки этой гипотезы и получения ответа на вопрос, стимулируют или ингибируют полифосфаты процесс амилоидообразования, в качестве модели в работе использовали пептид АК187-196, соответствующий по последовательности амилоидогенному участку Bgl2p; в качестве полианионов использовали неорганические полифосфаты с длиной цепи 155. Конформационные изменения в пептиде регистрировали с помощью метода собственной флуоресценции остатков триптофана; количество амилоидных фибрилл оценивали при помощи спектроскопии с применением специфических красителей тиофлавина Т и Конго Красного; морфологию амилоидов визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии после окрашивания тиофлавином Т. Было обнаружено, что в отсутствие полифосфатов пептид АК187-196 в растворе образует амилоидные фибриллы, которые устойчивы к действию протеиназы К. При исследовании влияния рН среды инкубации

на процесс амилоидообразования пептида было показано, что наибольшее количество амилоидных фибрилл в растворе наблюдается в диапазоне рН от 4.0 до 8.0, при этом степень контакта остатков триптофана с водой уменьшается по сравнению с кислой и щелочной областями значений рН исследованного диапазона. Продемонстрирована обратимость влияния полифосфатов на образование пептидом АК187-196 амилоидных структур. Ионная сила раствора не влияет на изучаемый процесс. Гипотеза о влиянии полифосфатов на процесс амилоидообразования подтверждена с использованием в качестве модели пептида Vgl2p АК187-196. Показано, что полифосфаты стимулируют его амилоидообразование.

Работа поддержана грантами Carl Zeiss в рамках Программы поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых ВУЗов России (МГУ 16/11КЦ), РФФИ 10-04-01821-а), Федерального агентства по науке и инновациям (02.740.11.0295). Авторы благодарят своих научных руководителей, профессоров Кулаева И.С. и Калёбину Т.С., за всестороннюю поддержку.

### **Участие аппарата Гольджи и эндосом в доставке амилоидного белка Vgl2p в клеточную стенку дрожжей**

*Сабириянов Фанис Альбертович, Плотникова Татьяна Александровна*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический*

*факультет, Россия, Москва*

*biophoenix@mail.ru*

Белки разной степени гликозилирования являются важным структурным компонентом клеточной стенки (КС) дрожжей. Часть белков КС дрожжей используют «классический» путь транспорта от места их синтеза (рибосомы) к клеточной поверхности через эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи (АГ) и эндосомы. Существуют, однако, примеры белков, которые используют для транспорта к клеточной поверхности, так называемые, «неклассические» пути, при которых белки минуя АГ и эндосомы (например – Hsp150,  $\alpha$ -фактор). Недавно в нашей лаборатории было обнаружено, что в КС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* присутствуют белки со свойствами амилоидов, наиболее изученным из которых является глюкантрансфераза Vgl2p, мажорный и консервативный белок, который является высокоиммуногенным и детектируется на поверхности практически всех видов дрожжей. Информация о том, как амилоидные белки достигают клеточной поверхности дрожжей в литературе отсутствует. Данную работу мы посвятили изучению роли АГ и эндосом в процессе транспорта Vgl2p к клеточной поверхности. Комбинируя классические методы молекулярной биологии, такие, как Pulse-chase анализ, Western blot анализ, а также применяемый в нашей лаборатории способ очистки Vgl2p с помощью избирательной депротенизации изолированных КС, нам удалось разработать методический подход, позволяющий детектировать скорость доставки Vgl2p в КС дрожжей. Используя эту методику, мы сравнили скорости доставки Vgl2p в КС дрожжей *S. cerevisiae* в норме и при добавлении в среду культивирования Брефелдина А – ингибитора работы АГ. Данные показали, что нарушение функционирования АГ приводит к задержке доставки Vgl2p в КС. Аналогичным способом мы сравнили скорости доставки Vgl2p в КС в диком типе и мутантном штамме с делецией гена *ARL1*, в котором нарушен транспорт белков через эндосомы. Было установлено, что скорость доставки Vgl2p в этом мутанте также снижается, по сравнению с диким типом. Полученные данные свидетельствуют о том, что амилоидный белок Vgl2p транспортируется к клеточной поверхности с участием АГ и эндосом.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01821-а и грантом «Федерального агентства по науке и инновациям» 02.740.11.0295. Автор благодарит своих научных руководителей чл.-корр. РАН Кулаева И.С. и профессора Калёбину Т.С.

## **Референсные гены кукурузы (*Zea mays* L.) при раневом и окислительном стрессах**

***А. Ф. Сафина<sup>1</sup>, В. Ю. Горшков<sup>2</sup>, Я. Ю. Топоркова<sup>2</sup>, Ю. В. Гоголев<sup>2</sup>***

*Казанский (Приволжский) федеральный университет<sup>1</sup>, Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН<sup>2</sup>, Россия, Казань  
anita-safina@mail.ru*

Серьезной проблемой при оценке уровня экспрессии генов является невозможность абсолютного выравнивания анализируемых образцов традиционными способами. Поэтому на сегодняшний день единственный грамотный подход для оценки экспрессии интересующих исследователя генов заключается в сопоставлении уровня экспрессии целевого гена (т.е. экспрессия которого изучается) и генов со стабильным уровнем экспрессии, которые также называют генами референсными и зачастую являются генами «домашнего хозяйства». Отправной точкой в любых исследованиях, касающихся изучения особенностей экспрессии генов, является грамотный подбор референсных генов, позволяющих адекватно интерпретировать экспериментальные данные. Следует заметить, что референсные гены подобраны лишь у единичных растительных объектов (пшеница, картофель, ячмень).

Цель настоящей работы заключалась в разработке тестовой системы для выявления стабильно экспрессирующихся генов кукурузы (*Zea mays* L.) при раневом и окислительном стрессах. На основе данных литературы были выбраны «гены-кандидаты», которые у ряда видов растений охарактеризованы как стабильно экспрессирующиеся. В число кандидатов входили следующие гены: актина, тубулина, глицеральдегид-3- фосфат дегидрогеназы, фактора элонгации и контроля клеточного деления. Используя Всемирную базу данных нуклеотидных последовательностей (NCBI), были найдены гомологичные гены у кукурузы и выбраны наиболее оптимальные праймируемые области для амплификации участков ДНК при помощи ПЦР. С помощью пакета программ Vector NTI Advance 9 были сконструированы праймеры, которые затем были экспериментально протестированы. На амплифицируемую область были сконструированы флуоресцентные зонды TaqMan, необходимые для проведения количественного ПЦР-анализа в реальном времени. Расчет стабильности экспрессии генов провели при помощи программы GeNorm.

При помощи разработанной тестовой системы и программы GeNorm были выбраны стабильно экспрессирующиеся гены кукурузы. На этой основе была оценена динамика экспрессии генов компонентов сигнальных систем растений.

## **Белковые профили плазмы крови человека с выявленным колоректальным раком**

***Смирнов Кирилл Сергеевич, Дунаева Вера Борисовна,***

***Романова Юлия Александровна***

*студент, бакалавр*

*ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Россия, Гатчина  
sk.sightless@gmail.com*

Для диагностики колоректального рака (КР) на ранней стадии актуальным направлением является поиск биомаркеров в плазме крови. В настоящей работе мы проводили сравнение белковых профилей образцов плазмы, полученных от здоровых людей и пациентов с выявленным КР.

Образцы крови были предоставлены СПбГМУ им. академика И.П. Павлова. После осаждения форменных элементов центрифугированием при 4500 g проводили аффинную хроматографию образцов плазмы, после чего отобранные фракции подвергали одномерному и двумерному электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле (2DPAGE).

Очистка от таких мажорных белков, как иммуноглобулин G и альбумин, включала два последовательных хроматографических этапа с использованием следующих носителей: белок-А-сефароза и сефароза Cibacron blue. Обработанные таким способом образцы посылали на 2DPAGE для сравнения их протеомных профилей. Путем сравнения полученных гелей с двумерными картами, хранящимися в базах данных, с помощью программы CAROL идентифицировано более 20 белков, в т.ч. ранее предложенный биомаркер КР –

аполипопротеин А1. Обнаружены отличия в протеомных профилях по ряду неидентифицированных белков (их MW 17.1, 18.2, 18.9, 17.1 кДа и pI 6.5, 7.0, 7.3, 7.9 соответственно). Решение данной задачи предполагает использование масс-спектрометрического анализа.

Таким образом, разработана процедура подготовки образцов плазмы крови для последующего сравнения их протеомных профилей после 2DPAGE. Идентификация конкретных зон, отличающихся в образцах плазмы крови больных и здоровых людей, дает перспективу разработки метода диагностики КР.

### **Повышение эффективности аденовирусной трансдукции с помощью рекомбинантного гистона**

*Соловьева Валерия Владимировна*

*Младший научный сотрудник*

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, НОЦ фармацевтики, Казань, Россия*

*solovyovavv@gmail.com*

Генетическая модификация стволовых клеток репликационно дефектными вирусами повышает эффективность переноса и экспрессии рекомбинантных генов, что позволяет контролировать вирусную инфекцию и иммунный ответ организма к вирусным векторам. Актуальной проблемой остается разработка подходов повышения вирусной трансдукции, не оказывающих токсического действие на клетки и применимых в клинике. Ранее нами было показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 повышает эффективность лентивирусной трансдукции и не оказывает токсического действия на клетки-мишени в широком диапазоне исследуемых концентраций.

Цель работы — исследование влияние рекомбинантного гистона Н1.3 на эффективность инфицирования клеток рекомбинантными аденовирусами.

Влияние гистона Н1.3 на аденовирусную инфекцию исследовали на модели рекомбинантного репликационно дефектного аденовируса 5 типа, экспрессирующего зелёный флуоресцентный белок GFP (Ad5-EGFP). Для получения рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP проводили субклонирование гена *egfp* из вектора pDONR221\_EGFP в вектор pAd/CMV/V5-DEST по технологии GateWay® (Invitrogen), с последующей продукцией рекомбинантного аденовируса в клетках линии HEK293A. Полученным аденовирусом Ad5-EGFP трансдуцировали клетки линии HeLa с добавлением или без добавления гистона Н1.3. Анализ эффективности аденовирусной трансдукции определяли по экспрессии инфицированными клетками GFP с помощью проточной цитофлуориметрии.

Показано, что добавление гистона Н1.3 в культуральную среду повышало эффективность вирусной трансдукции клеток линии HeLa на 60% по отношению к клеткам, трансдуцированным только Ad5-EGFP без добавления Н1.3.

Благодарности: научному руководителю, д.б.н., доценту кафедры генетики КФУ Ризванову Альберту Анатольевичу. Работа частично финансирована Институтом Стволовых Клеток Человека (г. Москва).

### **Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии**

*М.М. Цыганов, А.Г. Щербакова, Н.В. Литвяков*

*НИИ онкологии СО РАМН, Россия, г. Томск*

*Tziganov@sibmail.com*

Лекарственную устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам считают одной из наиболее важных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Наиболее часто ее связывают с повышением экспрессии энергозависимых АВС-транспортёров лекарств, которые осуществляют выброс цитостатических препаратов из опухолевых клеток.

**Материалы и методы.** В исследование включены 82 больных раком молочной железы (РМЖ) T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub> в возрасте от 28 до 61 года с морфологически верифицированным диагнозом, с комбинированным лечением, включающим 2-4 курса неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). Схемы НАХТ: FAC, CAF, CAxeloda (циклофосфан, доксорубин, фторурацил, кселода), таксотер. Эффективность НАХТ оценивалась инструментальными методами (УЗИ, маммография) по критериям ВОЗ. мРНК, выделяли из биопсийного опухолевого материала до лечения и операционного материала после НАХТ. Оценку экспрессии проводили при помощи qRT-PCR и выражали в процентах по отношению к гену-рефери фермента *GAPDH*.

**Результаты.** Как показали исследования, средний уровень экспрессии генов МЛЮ в опухоли до лечения и после НАХТ статистически не различался. Начальный уровень экспрессии генов МЛЮ (предсуществующая МЛЮ) не был связан с эффектом НАХТ, но изменение их экспрессии в процессе химиотерапии (адаптивная МЛЮ) ассоциировано с эффектом НАХТ. При антрациклин-содержащих схемах (CAF, FAC и CAx) эффект терапии взаимосвязан с изменением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCG1*, *MVP* и *GSTP1*. У пациенток со стабилизацией и прогрессированием заболевания в процессе проведения химиотерапии наблюдается повышение уровня их экспрессии. У пациенток с частичной регрессией опухоли – происходит снижение экспрессии генов МЛЮ.

С эффективностью таксотера ассоциированы адаптационные изменения других генов МЛЮ, в частности у больных, у которых отмечались стабилизация или прогрессирование опухолевого процесса, повышается экспрессия генов *MVP*, *ABCG2* и *ABCC2*, тогда как снижение их экспрессии в процессе НАХТ было сопряжено с частичной регрессией.

**Выводы.** Таким образом, нами впервые обнаружен факт взаимосвязи с эффективностью НАХТ не уровня, а вектора изменения экспрессии генов МЛЮ: *ABCB1*, *ABCC2*, *MVP*, *ABCG1* и *GSTP1* в опухоли в процессе лечения, т.е. не «предсуществующей» или естественной МЛЮ, а адаптивной (приобретенной и/или индуцибельной) множественной лекарственной устойчивости.

## **Роль интерференции транскриптов в регуляции экспрессии генов системы «кворум сенсинга» у *Pectobacterium atrosepticum***

**Шлыкова Л.В.<sup>1</sup>, Даминова А.Г.<sup>2</sup>, Горшков В.Ю.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Казанский Приволжский (Федеральный) Университет, Россия, Казань  
*persent\_89@mail.com*

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Россия, Казань

В результате исследований, выполненных в последние годы, у разных организмов было показано наличие значительного числа цис-кодируемых антисмысловых транскриптов, которые образуются вследствие перекрытия генов, транскрибирующихся с комплементарных цепей. Хотя доля генов, перекрывающихся «хвост к хвосту», в некоторых геномах бактерий достигает 4-6%, физиологическая роль этого феномена остается неизученной.

Нами обнаружено, что в геноме *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) гены регуляторной системы «кворум сенсинга» (*expI-expR*) перекрываются 3'-концевыми участками, что может приводить к взаимодействию транскриптов этих генов. В отличие от классической схемы кворум-регуляции, у *Pba* белок ExpR не влияет на экспрессию гена *expI* (Burr et al, 2006). Поэтому мы предположили, что регуляторная роль принадлежит не ExpR-белку, а *expR*-транскрипту.

Для проверки этого предположения нами была скорструирована рекомбинантная плаزمиды на основе экспрессирующего вектора pET51, которая содержала в себе локус *expI-expR*. Ген *expR* был помещен под индуцируемый промотор, а *expI* конститутивно транскрибировался со своего собственного промотора. Полученная таким образом плаزمиды была трансформирована в *E. coli* BL21 Tuner. Добавление индуктора (ИПТГ) в культуру штамма *E. coli* BL21 Tuner, несущего плазмиду pET-51:*expI/R*, приводило к уменьшению концентрации АГЛ в культуральной жидкости. Две нонсенс-мутации ниже стартового кодона *expR* не оказывали видимого эффекта на продукцию АГЛ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм «кворум-сенсинг» регуляции у *Pba* отличен от известной модели *Vibrio fischeri* и осуществляется посредством взаимодействия антисмысловых транскриптов генов *expI* и *expR*. Перекрывание генов 3'-концевыми участками широко распространено среди прокариот и может вносить существенный вклад в регуляцию транскрипции большого числа бактериальных генов. В связи с этим, явление РНК-интерференции представляет большой интерес для изучения.