

ПОДСЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ»

Особенности транскрипции генов в составе оперонов в хлоропластах растений ячменя разных сортов

Алейникова А.Ю., Зубо Я.О. (Москва, anastasia_ale@mail.ru)

Часто гены, кодирующие белки одного метаболического пути или определяющие близкородственные функции, регулируются согласованно. Экспрессия таких генов начинается и заканчивается или согласованно продолжается в ответ на один и тот же регуляторный сигнал. Гены, объединенные в опероны, транскрибируются с промотора, находящегося на 5'-конце такой группы генов, в виде единственной молекулы РНК, которая в дальнейшем подвергается процессу «созревания». У хлоропластов ячменя большая часть генов пластома входит в состав оперонов. С помощью метода run on транскрипции была изучена интенсивность транскрипции нескольких оперонов пластома растений ячменя разного возраста и сорта. Основой транскрипционной системы служили лизированные хлоропласты, которые были выделены из первых листьев ячменя. В ходе реакции транскрипции (длительность 5-10 мин) во вновь синтезированные молекулы РНК включался радиоактивно-меченный УТФ ($\alpha^{32}\text{P}$ -УТФ), что позволяло в дальнейшем детектировать только вновь синтезированные транскрипты. Ограниченное время реакции практически исключает влияние процессов дегградации РНК на количество синтезированных транскриптов. ДНК пробы были подобраны на внутриоперонные участки перепадов интенсивности транскрипции и выровнены по размеру и GC-составу.

Установлено, что у большинства изученных оперонов гены транскрибируются с различной интенсивностью, причем интенсивность транскрипции может различаться даже в пределах одного гена. Наиболее равномерная транскрипция наблюдалась для *rpo*-оперона, содержащего *rpoB-rpoC1-rpoC2* гены. Необходимо отметить, что это, вероятно, единственный оперон пластома ячменя, состоящий только из генов, кодирующих субъединицы одного белкового комплекса (субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа). Другие опероны, также несущие большинство генов одной функциональной группы, характеризовались различиями в интенсивности транскрипции генов.

В предыдущих исследованиях нами было установлено, что у оперона *rps2-atpI-atpH-atpF-atpA* считывание РНК значительно повышалось (в 7-10 раз) для *atpF* гена по сравнению с предыдущими и последующим геном. Именно эта область и была взята для более подробного изучения. В результате детального изучения было установлено, что пик интенсивности транскрипции приходится на интрон *atpF* гена. Сильную скорость транскрипции показала также проба, приходящаяся на межгенный (*atpH-atpF*) спейсер. Отмечены и значительные изменения в оперонах, содержащих гены, кодирующие компоненты различных функциональных групп хлоропластов. Так оперон *atpB-atpE-trnV-ndhC-ndhK-ndhJ* характеризуется значительно большей интенсивностью транскрипции генов *atpB* и *trnV*, в сравнении с другими генами (превышение в среднем не менее чем в 3 раза). Для оперона *rrn16* интенсивность транскрипции менялась между генами (*rrn16* ген транскрибируется сильнее, чем *trnI* ген). В опероне *psaA* первые два гена транскрибируются равномерно, в то время как *grs14*, который не относится к генам фотосинтетической группы, транскрибируется значительно более активно. Таким образом для нескольких оперонов обнаружен эффект значительного различия интенсивности транскрипции индивидуальных генов. Различий по возрасту и сорту не обнаружено. Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. В.В. Кузнецову за помощь в подготовке тезисов.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов фолатного цикла с предрасположенностью к развитию рака молочной железы в Западно-Сибирском регионе России

Вайнер А.С. (Новосибирск, hamlet85@mail.ru)

Метаболизм фолатов является важным звеном клеточного метаболизма: производные фолиевой кислоты поставляют одноуглеродные фрагменты для таких жизненно важных процессов, как регенерация метионина, превращение уридинмонофосфата в тимидинмонофосфат, биосинтез пуриновых нуклеотидов, метилирование ДНК. Гены фолатного цикла могут быть рассмотрены в качестве генов-кандидатов развития онкологических заболеваний, поскольку недостаточное метилирование ДНК может приводить к инактивации протоонкогенов и нарушению хромосомной сегрегации, а подавление синтеза тимидилата – к ошибочной встройке dUMP и повреждению ДНК.

Целью нашей работы являлось изучение роли аллельных вариантов генов фолатного цикла C677T и A1298C гена MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктазы), A66G гена MTRR (редуктазы метионин-синтазы), G1258A гена MTHFD (метилентетрагидрофолатдегидрогеназы), T833C/844INS68 гена CBS (цистатионин-β-синтазы) и A2756G гена MTR (метионин-синтазы) в формировании предрасположенности к развитию рака молочной железы.

Определение полиморфных вариантов генов MTHFD и CBS проводилось методом ПЦР-ПДРФ анализа, а генов MTHFR, MTRR и MTR – методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплиментарных полиморфной последовательности ДНК. Выборка женщин со спорадической формой рака молочной железы и контрольная группа были сформированы в рамках эпидемиологического исследования, проводимого Алтайским филиалом Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН и Алтайского краевого онкологического диспансера. Все женщины принадлежали к европеоидной расе русской этнической группы и проживали на территории алтайского края РФ. В экспериментальную выборку было включено 670 больных в возрасте от 45 лет (средний возраст – 56 ± 8 лет). Контрольная группа состояла из 480 женщин (средний возраст – 54 ± 13), случайно выбранных из списка доноров крови и не имеющих рака молочной железы. И в контрольной, и в экспериментальной группах распределение генотипов для всех исследуемых полиморфных локусов соответствовало распределению Харди-Вайнберга. Нами не было выявлено статистически значимых различий частоты встречаемости аллелей или генотипов полиморфных локусов исследуемых генов между контрольной группой и группой больных раком молочной железы. Полученные нами результаты могут говорить о том, что данные полиморфизмы не оказывают влияние на развитие рака молочной железы в Западно-Сибирском регионе России.

Узнавание стоп-кодона в археях с универсальным и вариантным генетическими кодами

Елисеев Б. Д. (Москва, eliseev@vega.protres.ru)

В организмах с универсальным генетическим кодом, 61 смысловой кодон используется для кодирования 20 природных аминокислот, а три кодона UAA, UAG и UGA, названные стоп-кодонами, служат для остановки белкового синтеза. Известны организмы с вариантными генетическими кодами, в которых изменены значения некоторых стоп-кодонов. Например, в некоторых археях, таких как *Methanosarcina barkeri* UAG кодирует особую аминокислоту – пирролизин. У этих архей он встречается в ферментах, являющихся ключевыми для использования метиламинов в качестве источника энергии.

Анализ распределения стоп-кодонов в археях группы метаносарцин показал, что UAG, кодирующий пирролизин – редкий кодон в их геноме и до сих пор не найдено ни достоверного примера терминации на этом кодоне. Кроме того, в двух видах пирролизин-содержащих архей *Methanosarcina barkeri* и *Methanosarcina acetivorans* обнаружено два отличных друг от друга фактора терминации первого класса aRF1-1 и aRF1-2.

Мы проанализировали нуклеотидные последовательности генов факторов терминации из архей, которые известны в роде *Methanosarcina*: *M. barkeri*, *M. acetivorans*, имеющих по 2 формы фактора и *M. mazei*, у которой есть только одна форма aRF1. Оказалось, что белки aRF1 формы 2 *M. barkeri* и *M. acetivorans* очень похожи друг на друга по нуклеотидной последовательности. И соответственно формы 1 *M. barkeri* и *M. acetivorans* и белок *M. mazei* также очень похожи. Формы 1 и 2 из одного и того же организма похожи между собой в меньшей степени. Мы предполагаем, что гены обоих форм белка произошли от общего предка, похожего на ген aRF1a *M. mazei*. У предка произошла дупликация гена, одна из этих копий продолжала выполнять функции фактора терминации, вторая потеряла функции и начала эволюционировать быстрее. Возможно, она приобрела другую функцию. Для проверки наших предположений мы сконструировали, выделили химерные белки, содержащие N-домен 1 и 2 форм фактора терминации архей *Methanosarcina barkeri* и M/C-домен eRF1 человека. А также, в качестве контроля, мы получили химерный белок, содержащий N-домен aRF1 архей *Methanococcus maripaludis*, характеризующейся универсальным генетическим кодом и достоверно использующей UAG в качестве стоп-кодона. Эти белки были нами использованы для проверки специфичности узнавания стоп-кодонов в реконструированной эукариотической системе трансляции *in vitro*. В случае aRF1 *Methanococcus maripaludis* было выяснено, что этот белок узнает в использованной системе все три стоп-кодона (UAA, UAG и UGA) и способен индуцировать гидролиз пептидил-тРНК. Таким образом, можно сделать вывод, что механизмы терминации трансляции у эукариот и архей похожи. Было показано, что форма 2 aRF1 *Methanosarcina barkeri* потеряла функциональную активность в терминации трансляции, а форма B1 aRF1 *Methanosarcina barkeri* сохранила функции фактора терминации и узнает все три стоп-кодона, причём UAG, кодирующий в этом организме пирролизин, слабее остальных двух.

Изучение взаимодействия инсуляторов 1A2 и Wari с промоторами генов у *D. melanogaster*

Ерохин М.М. (Москва, yermxbio@yandex.ru)

Геном высших эукариот обеспечивает сложнейшие программы развития и клеточной дифференцировки. Эти программы осуществляются за счет четкой, последовательной активации и инактивации множества генов, белковые продукты которых взаимодействуют друг с другом. Важную роль в регуляции транскрипции играют регуляторные ДНК-элементы. Это энхансеры, которые усиливают транскрипцию; сайленсеры, обеспечивающие репрессивный статус генов; и инсуляторы, для которых показана способность ограничивать активность как энхансеров, так и сайленсеров.

В данной работе мы исследовали свойства двух инсуляторов *D. melanogaster*, 1A2 и Wari, расположенных в геноме с 3'-сторон генов *yellow* и *white*, соответственно. С использованием трансгенной модельной системы мы показали, что 1A2- и Wari-инсуляторы способны взаимодействовать с промоторами генов *yellow* и *white*, соответственно. Исследована специфичность пар инсулятор-промотор в данном взаимодействии. Мы предполагаем, что способность инсуляторов взаимодействовать с промоторами генов играет важную роль в регуляции транскрипции.

Протеолиз фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis*

Каюмов А.Р. (Казань, airat_kayumov@rambler.ru)

Для эффективной ассимиляции источников азота бактерии выработали различные системы регуляции, которые отвечают на изменение доступности азотсодержащих соединений и контролируют экспрессию определенных групп генов. Одним из ключевых белков-регуляторов азотного метаболизма в клетках бацилл является фактор транскрипции TnrA. Он активен в условиях лимитации азотом, и в активном состоянии находится в комплексе с мембраносвязанным белком NrgB, относящимся к регуляторным белкам типа PII. Белки NrgB и NrgA в клетках *B. subtilis* формируют аппарат транспорта аммония в клетки.

Показана регуляция активности фактора транскрипции TnrA путем его внутриклеточного протеолиза. При удалении доступного источника азота фактор TnrA исчезает из клеток в течении 15 минут. В то же время этого не наблюдается в клетках дефектных по генам *nrgA* и *nrgB*. Согласно полученным нами данным, нахождение TnrA в комплексе с белками NrgA и NrgB предотвращает его деградацию. При истощении источника азота в среде локализация белка TnrA становится цитозольной и происходит его протеолиз. Эксперименты по иммунопреципитации показали, что в случае инактивации гена *nrgA* фактор транскрипции TnrA имеет цитоплазматическую локализацию и находится в стабильном комплексе с белком NrgB, и таким образом не подвержен протеолизу. С другой стороны, в штамме дефектном по белку NrgA, фактор TnrA также обнаруживается только в растворимой фракции клеточного экстракта и связан с глутаминсинтетазой. Эксперименты *in vitro* показали, что TnrA способен взаимодействовать с белком NrgB с $K_m = 1$ мкМ. Образование комплекса TnrA-NrgB строго определяется концентрацией АТФ: при концентрации АТФ 0,2 мМ происходил его полный распад, тогда как в случае других трифосфатов требовались концентрации 2-4 мМ. 2-кетоглутарат не оказывал влияния на образование комплекса TnrA-NrgB.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта программы «Михаил Ломоносов» DAAD и Минобрнауки РФ № А/07/71121 и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-152.2008.4.

Получение мутантных форм рецептора EphA1 для исследований в клетках эукариот методами флуоресцентной микроскопии

Корчагина А.А. (Москва, avilis1@yandex.ru)

Эфриновые рецепторы входят в состав обширного семейства с тирозинкиназной активностью. Они участвуют в процессах эмбриогенеза и ангиогенеза, в регуляции межклеточных взаимодействий и миграции клеток. Эфриновые рецепторы представляют собой интегральные мембранные гликопротеины с единственным трансмембранным доменом (ТМ), которые активируются с образованием димерного комплекса. Основной вклад в формирование этого комплекса вносит взаимодействие внеклеточных доменов. Данные, полученные ранее в модельных липидных системах для пептидов, соответствующих ТМ эфринового рецептора A1 (EphA1), позволяют предположить, что он способен участвовать в лиганд-опосредованной димеризации, и, таким образом, влиять на активацию EphA1. Для исследования димеризации EphA1 созданы плазмиды, кодирующие ген полноразмерного рецептора EphA1 в единой конструкции с циановым (EphA1-CFP), либо желтым (EphA1-YFP) флуоресцирующими белками, которые образуют донор-акцепторную пару, широко используемую для исследований с помощью метода резонансного переноса энергии флуоресценции. Для проверки гипотезы об участии ТМ EphA1 в его димеризации предложено создать мутантные формы EphA1-

YFP (EphA1-CFP) с точечными заменами в ТМ рецептора, которые позволят выявить участие отдельных аминокислотных остатков в стабилизации димера. Полученные конструкции будут использованы для исследования димеризации EphA1 в мембране эукариотических клеток с применением методов флуоресцентной микроскопии. В данной работе были препаративно наработаны и выделены плазмиды EphA1-YFP и EphA1-CFP. Определена чистота целевых продуктов методами электрофореза и спектрофотометрии. Показано, что после трансфекции в клетках синтезируются EphA1-YFP и EphA1-CFP, которые, как и ожидалось, транспортируются и накапливаются в плазматической мембране. Предполагается, что димеризация может происходить с участием одного или сразу двух сайтов, присутствующих в составе ТМ EphA1: GLLLG, ALLLG. Для проверки участия в димеризации каждого из этих сайтов ведутся работы по получению 6 мутантов: G558I; G554I; G564I; A560S; G554I, G558I; A550G, A560F. Создание мутантных форм EphA1 проводится методом сайт-направленного мутагенеза в векторе pcDNA3.1(+) и pTagYFP_N. Автор выражает благодарность д.б.н. А.В. Феофанову и к.м.н. О.В. Бочаровой.

Идентификация элементов N-домена фактора терминации трансляции eRF1, ответственных за узнавание стоп-кодонов

Крючкова П.Н. (Москва, polina.krjuchkova@gmail.com)

Терминация трансляции, заключительная стадия биосинтеза полипептидной цепи, происходит в тот момент, когда в А-участке рибосомы оказывается один из трех стоп-кодонов транслируемой мРНК – UAA, UAG или UGA. Ключевую роль в этом процессе играет белковый фактор терминации трансляции eRF1. Он принимает участие в узнавании стоп-кодона и в гидролизе пептидил-тРНК.

Целью настоящей работы является идентификация и характеристика элементов фактора терминации трансляции eRF1, ответственных за узнавание стоп-кодонов.

Получено более 50 мутантных факторов терминации с точечными заменами более чем по 20 позициям в N-доме eRF1 человека. Определена их функциональная активность в реконструированной системе трансляции эукариот. Среди проанализированных белков особо выделяются мутантные eRF1 с заменами по положениям S36, C127, F131, E55 и Y125. При заменах S36T и C127S наблюдается небольшое падение функциональной активности по UAA и UAG. Замены S36I, C127A и F131A приводят к практически полному падению функциональной активности по UAA и UAG стоп-кодонам. Эти данные указывают на важность полярных группировок боковых цепей аминокислот S36 и C127 для узнавания второго А в стоп-кодонах UAA и UAG. При замене F131Y влияние на функциональную активность по этим стоп-кодонам не столь драматично, как при замене F131A, что позволяет предположить, что F131 вступает в стекинг-взаимодействия со вторым А в стоп-кодонах. Для мутантных eRF1 с точечными заменами Y125A, Y125F, E55A, E55Q наблюдается падение активности по UAG, что позволяет предположить, что эти аминокислоты ответственны за узнавание третьего G в стоп-кодоне UAG. Таким образом, на основании полученных данных предполагается, что второй А в стоп-кодонах UAA и UAG узнается аминокислотами F131, S36, C127, а третий G в стоп-кодоне UAG узнается аминокислотами Y125 и E55.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 08-04-01091-а).

Разработка метода изучения активации трансляции инкапсидированной РНК ХВК *in vivo*

Кулёмин С.Е., Смирнов А.А. (Москва, sleiden@yandex.ru)

Ранее в нашей лаборатории было показано, что РНК X-вируса картофеля (ХВК), находящаяся в составе вирусной частицы, не доступна для трансляции *in vitro*. На сегодняшний день известно два пути трансляционной активации инкапсидированной РНК ХВК: фосфорилирование белка оболочки (БО) в составе вирусной частицы или связывание с ней транспортного белка один (ТБ1) ХВК. Следует отметить, что оба механизма исследованы лишь *in vitro*. Нашей задачей является изучение путей трансляционной активации инкапсидированной РНК ХВК *in vivo*.

На сегодняшний день, в литературе описаны две основные модели межклеточного транспорта ХВК, согласно которым, РНК ХВК транспортируется из клетки в клетку в составе вириона или вирусного рибонуклеопротеида, состоящего из РНК, инкапсидированной белком оболочки, и ТБ1. Исходя из полученных результатов, мы предположили, что после перехода транспортной формы в соседнюю клетку происходит ТБ1 – зависимая трансляционная активация находящейся в ее составе РНК. Для исследования этого процесса необходимо иметь возможность детектировать переход транспортной формы в соседнюю незараженную клетку в случае, когда трансляционная активация содержащейся в ней РНК блокирована.

Задачей данной работы является получение вирусного вектора на основе кДНК копии геномной РНК ХВК штамма UK3, содержащего ген БО, слитый с геном красного флуоресцентного белка (red fluorescent protein – RFP), а также ген зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein – GFP). Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют предположить, что БО ХВК транспортируется из клетки в клетку только в составе транспортной формы вируса. Таким образом, данный вирусный вектор позволит нам идентифицировать переход транспортной формы в соседнюю незараженную клетку по флуоресценции RFP слитого с БО, в случае, когда трансляционная активация содержащейся в ней РНК блокирована.

На первой стадии работы необходимо было изучить эффективность накопления БО-RFP в клетках растения. Для этого ген БО, слитый с геном RFP, был помещен под контроль 35S промотора (из вируса мозаики цветной капусты) в бинарный вектор *pCambia-1300 (CAMBIA)*. Данная конструкция была агроинфильтрирована в листья *Nicotiana benthamiana*. Методом флуоресцентной микроскопии была изучена локализация БО-RFP в клетках зоны инфильтрации. Накопление БО-RFP в клетках растения было изучено методом Вестерн-блотт с антителами к БО. Полученные данные позволяют сделать вывод, что БО-RFP эффективно экспрессируется в клетках растения, а значит, может быть использован для создания вирусного вектора.

Нашей следующей задачей является получение вышеописанного вирусного вектора и изучение его способности к репликации и межклеточному транспорту.

Отбор химерных промоторов каулимовирусов полученных методом ДНК-шаффлинга и анализ их активности в трансгенных растениях табака

Кулуев Б.Р. (Уфа, Kuluev@bk.ru)

Одной из важных проблем современной генной инженерии растений является недостаточность силы большинства известных промоторов, используемых для повышенной и конститутивной экспрессии трансгена, особенно это актуально при использовании трансгенных растений в качестве продуцентов физиологически активных веществ. Одним из основных направлений по получению сильных растительных промоторов являются поиск новых природных промоторов каулимовирусов, их модификация, а также получение различных их гибридных форм, как между собой, так и с другими известными растительными промоторами. Нами были впервые исследованы промоторы каулимовирусов георгина и гвоздики, родственные 35S промотору вируса мозаики цветной капусты. Оказалось, что эти новые промоторы не уступают, а промотор вируса мозаики георгина возможно даже превосходит 35S промотор по активности в

трансгенных растениях. Позже методом ДНК-шаффлинга нами было получено множество химерных форм исследованных промоторов как между собой, так и с 35S промотором в различных комбинациях, 6 из которых были отобраны для проведения дальнейших анализов. Амплификаты этих промоторов вначале были клонированы в векторе рKRX, а потом направленно субклонированы в бинарных векторах рСАМВІА 1281Z (D3) и рСАМВІА 1291Z (D4) с репортерным геном GUS. Из химерных между промоторами каулимовирусов цветной капусты и гвоздики было отобрано два варианта: D4/4 и D4/14; между промоторами каулимовирусов цветной капусты и георгина 3 варианта: D4/2, D3/9 и D4/11; между промоторами каулимовирусов гвоздики и георгина только 1 вариант: D4/19. После проведения агробактериальной трансформации листовых дисков табака, хорошо укоренившиеся на селективной среде с гигромицином трансгенные растения отбирали для проведения качественного гистохимического анализа активности репортерного гена GUS. 5-8 растений с устойчивой активностью β-глюкуронидазы, использовали для выяснения и сравнения силы промоторов флюориметрическим методом. Для анализа активности 35S промотора было отобрано 19 хорошо укоренившихся растений, из которых 15 оказались GUS-положительными, количественный GUS-анализ 6 отобранных растений показал силу в среднем $26 \pm 2,8$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹. Для анализа промотора вируса мозаики георгина использовались 6 GUS-положительных растений, количественный анализ которых показал силу в среднем $45 \pm 10,2$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹. Вариант D4/4 дал 50 хорошо укоренившихся растений, из которых оказались GUS-положительными только 18 растений, количественный GUS-анализ 6-ти из них показал цифры в среднем $18 \pm 4,5$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹. По варианту D4/14 было растений всего – 27, GUS-положительных – 22, сила промотора в среднем – $34 \pm 1,6$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹ (8 растений). При анализе варианта D4/2 было отобрано 26 растений, из которых лишь 5 оказались GUS-положительными, которые показали силу в среднем $1 \pm 0,2$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹. 11 из 18 растений оказались GUS-положительными при анализе варианта D3/9, 6 отобранных растений показали цифру в среднем $27 \pm 6,2$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹. Вариант D4/11: всего растений – 39, GUS-положительных – 30, сила промотора в среднем – $24 \pm 2,0$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹ (6 растений). Вариант D4/19: всего растений – 41, GUS-положительных – 20, сила промотора в среднем – $30 \pm 2,5$ нмоль 4MU мг⁻¹ мин⁻¹ (7 растений). Итак, можно сделать выводы о том, что нами получены химерные формы промоторов каулимовирусов, которые не уступают по силе 35S промотору. Подтвердилось предположение о том, что промотор вируса мозаики георгина немного активнее 35S промотора.

Получение рекомбинантного белка FliC в клетках *E. coli*

Матюнина Е.А., Аль-Шехадат Р.И., Духовлинов И.В.

(Санкт-Петербург, alshehadat@yahoo.com)

В последнее время исследователи все чаще направляют свое внимание на использование в составе иммуногенов адьювантов, активирующих врожденный иммунный ответ. Одним из таких иммуномодуляторов является белок флагеллин, основной структурный компонент бактериальной флагеллы. Так, флагеллин *Salmonella typhimurium* был успешно применен в качестве адьюванта в таких лабораторных моделях как F1/V антиген *Yersinia pestis* (возбудитель чумы), 4xM2e-антиген (4 слитых эпитопа из белка M2 вируса гриппа), белок Sp-1 мерозоида *Plasmodium vivax* (возбудитель малярии) и др. Представляется перспективным использовать рекомбинантный флагеллин, как адьювант при создании иммуногенов против *Mycobacterium tuberculosis* и ВИЧ-1 субтипа А. Для этого необходимо создать штамм *E. coli*, продуцент рекомбинантного белка FliC (флагеллина *S. typhimurium*) и получить очищенный препарат данного белка.

Ген, кодирующий белок FliC, был амплифицирован с использованием в качестве матрицы геномной ДНК аттенуированного штамма *S. typhimurium* T10. Амплифицированный ген был клонирован в экспрессионной плазмиде pET151. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21[DE3] Star.

Была проведена оптимизация экспрессии рекомбинантного белка FliC в клетках *E. coli*, при этом варьировали 3 параметра: тип индуктора (0.2% лактоза и 1мМ ИПТГ), время индукции (1-7 часов при индукции экспрессии ИПТГ и 16-20 часов при индукции лактозой), а также температура ферментации бактерий (25°C;30°C;37°C). В результате, было показано, что максимальный уровень экспрессии при использовании более дешевого индуктора – лактозы (37+/-1% от общего клеточного белка после 16 часов индукции 0.2% лактозой) не отличался от уровня экспрессии при использовании ИПТГ (39+/-1% от общего клеточного белка после 4 часов индукции 1мМ ИПТГ). При этом при использовании в качестве индуктора 0.2% лактозы кроме индукции происходит значительный прирост биомассы клеток, что практически не наблюдается при индукции 1мМ ИПТГ. Также прирост биомассы наблюдается при пониженной температуре ферментации бактерий- 25°C. Полученный рекомбинантный белок FliC на 88+/-1.5% находится в клетках штамма-производителя в растворимом виде и только 12+/-1.5% процент приходится на нерастворимую фракцию – тельца включения. С использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии был получен препарат флагеллина *S. typhimurium* с чистотой 95+/-2%, который можно использовать при проведении иммунологических экспериментов.

Авторы выражают признательность д.б.н., профессору А.П. Козлову и к.м.н. Н.А. Климову за научное руководство и ценные практические советы.

Регуляция экспрессии гена аполиipoproteина А-I человека в клетках моноцитарно-макрофагального ряда при действии фактора некроза опухоли альфа

Могиленко Д.А. (Санкт-Петербург, denis@iem.sp.ru)

Аполиipoprotein А-I (апоА-I) является главным белковым компонентом липопротеинов высокой плотности человека, которые принимают участие в обратном транспорте холестерина, включая его отток из моноцитов и макрофагов в стенке сосуда. Существуют экспериментальные данные, показывающие, что доставка кДНК апоА-I человека в составе ретровирусных векторов экспрессии в макрофаги защищает мышей, дефектных по гену аполиipoproteина E, от развития атеросклероза. В то же время, экспрессия эндогенного апоА-I в клетках моноцитарно-макрофагального ряда до настоящего времени не была показана.

В данной работе мы впервые показали, что ген апоА-I человека на умеренном уровне экспрессируется в клетках ТНР-1 (моноцитарно-макрофагальная линия клеток человека) как на уровне мРНК, так и на белковом уровне. Используя методы непрямой иммунофлуоресценции, конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, было показано, что синтезированный белок апоА-I в клетках ТНР-1 локализуется как в виде внутриклеточных включений, так и на поверхности клеточной мембраны. Интересно, что обработка клеток ТНР-1 бета-метил циклодекстрином приводит к уменьшению содержания белка апоА-I на клеточной мембране, что свидетельствует об ассоциации апоА-I с мембранными рафтами. Количественный RT-PCR анализ показал, что уровень мРНК апоА-I в клетках ТНР-1 возрастает в 5.4+/-1.1 раза по сравнению с контрольным уровнем через 24 ч после добавления фактора некроза опухоли альфа (ФНО). Добавление блокирующих антител к ФНО полностью отменяет эффект активации экспрессии гена апоА-I при действии ФНО. Действие ФНО также приводит к увеличению содержания внутриклеточного белка апоА-I в этих клетках. При дифференцировке моноцитарной линии клеток ТНР-1 в макрофаги под действием флорболового эфира базальный уровень мРНК апоА-I возрастает в 4.2+/-0.3 раза по

сравнению с уровнем мРНК апоА-I в моноцитах, но происходит уменьшение степени активации экспрессии этого гена при действии ФНО. Используя специфические ингибиторы, мы показали функциональную роль JNK и MEK1/2 в моноцитах и NF-карраВ, JNK и р38 в макрофагах в ходе ФНО-опосредованной активации экспрессии гена апоА-I. Было показано, что LXR является положительным, а PPAR-alpha – отрицательным регулятором экспрессии гена апоА-I в клетках ТНР-1, и что оба этих ядерных рецептора, по-видимому, вовлечены в ФНО-зависимую активацию экспрессии гена апоА-I. Интересно, что при дифференцировке клеток ТНР-1 в макрофаги уровень экспрессии генов LXR-alpha и LXR-beta увеличивается, а PPAR-alpha – уменьшается, что может быть причиной более высокого базального уровня мРНК апоА-I в макрофагах по сравнению с моноцитами. Полученные нами результаты позволяют предположить, что апоА-I, синтезированный клетками моноцитарно-макрофагального ряда, может участвовать в процессах развития атеросклероза в условиях воспаления.

Функциональный анализ двух пограничных областей форум доменов районов 70С и 84D генома *D. melanogaster*

Moussieva E.D. (Москва, edmois@eimb.ru)

Эукариотический геном состоит из структурно-функциональных доменов (форум-доменов) длиной 50-200 т.п.н., которые также называют Рс-доменами. Форум-домены были обнаружены как фрагменты эукариотического генома длиной 50-200 т.п.н., образующиеся в результате спонтанной фрагментации хромосом, которая происходит после заплывания клеток в легкоплавкую агарозу и последующем лизисе. Расположенные на их границах области PRE/TRE (Polycomb/Trithorax Response Elements) отвечают за поддержание ранее установившегося транскрипционного состояния связанных с ними генов.

Для изучения последовательностей ДНК, расположенных на границах форум доменов были выбраны пограничные районы форум-доменов дисков 70С и 84D в геноме *D. melanogaster*. Ранее методом торможения ДНК-белковых комплексов в геле было показано, что данные пограничные районы содержат функциональные сайты связывания белка SuUR, часто встречающегося в местах локализации белков группы Polycomb в хромосомах дрозофилы. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов 70С и 84D выявил наличие в них характерных для PRE/TRE сайтов связывания белков Pleiohomeotic, GAGA-фактора, Grainy head, Dorsal Switch Protein I, белков семейства SpI/KLF. Функциональную активность исследуемых фрагментов 70С (6..1755, AC U90540) и 84D (2283..3173, AC U89926) определяли с помощью разработанного ранее метода транзientной экспрессии мини-хромосомных конструкций в культуральных клетках дрозофилы Schneider-2. Данные фрагменты встраивали в репортёрные конструкции в обеих ориентациях на расстоянии около 3,2 т.п.н. от промотора гена Hsp70, под контролем которого находился репортёрный ген люциферазы светлячка. Элемент 84D проявляет свойства сайленсера в обеих ориентациях, в то время как элемент 70С в одной из ориентаций проявляет свойства сайленсера, а в другой – активатора. Анализ области bxd (PRE/TRE из локуса bithorax дрозофилы) в использованной системе транзientной экспрессии мини-хромосомных конструкций в клетках Schneider-2 показал, что этот фрагмент также проявляет свойства сайленсера в одной ориентации и активатора в другой. Для анализа состояния хроматина изучаемых районов пограничных областей форум-доменов *in vivo* использовали хроматин-иммунопреципитацию с антителами к триметилированному по лизину 27 гистону H3 – метке, характерной для областей PRE/TRE, за образование которой ответственны белки группы Polycomb: гистонметилтрансферазы Enhancer of zeste и Polycomblike. Как и контрольный район bxd, исследуемые фрагменты обогащены данной модификацией в культуральных клетках дрозофилы Schneider-2. Это указывает на возможность

связывания комплексов, содержащих белки группы Polysomb, с изучаемыми областями 70S и 84D *in vivo*. Полученные данные убедительно свидетельствуют о функциональной активности исследуемых фрагментов 70S и 84D. Различия, обнаруженные между этими двумя пограничными областями форум-доменов, позволяют предположить существование в них разных типов PRE/TRE.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Н.А. Чурикову за помощь в подготовке тезисов.

Эндорибонуклеазные активности α -субъединиц протеасом и их изменение при воздействии на клетки доксорубицином

Моисеева Т.Н. (Санкт-Петербург, t.n.moiseeva@gmail.com)

Протеасома – это мультисубъединичный комплекс, который играет ключевую роль в расщеплении большинства клеточных белков. В последнее время были обнаружены и некоторые неканонические роли протеасом – их участие в регуляции транскрипции и способность к расщеплению РНК. Исследование специфичности РНКазной активности показало преимущественное расщепление AU-богатых участков. Кроме того, стали известны две субъединицы цитоплазматических протеасом, предположительно отвечающие за РНКазную активность, – $\alpha 1$ и $\alpha 5$.

Целью данной работы было идентифицировать ранее неизвестные α -субъединицы протеасом, способные расщеплять РНК, а также исследовать изменения, происходящие в них после индукции апоптоза в клетках K562 ДНК-повреждающим агентом – доксорубицином. Субъединицы протеасом, выделенных из цитоплазмы и из ядер клеток K562, были разделены с помощью двумерного электрофореза. Из пятен, соответствующих по молекулярным массам α -субъединицам протеасом, были экстрагированы белки, которые в дальнейшем исследовались на наличие РНКазной активности в различных условиях: в отсутствие двухвалентных катионов и при наличии в реакционной среде 10мМ Mg^{2+} или 10мМ Ca^{2+} . В качестве субстрата использовалась мРНК р53, полученная с помощью транскрипции *in vitro* в присутствии радиоактивно меченного СТР. 5 субъединиц α -типа из цитоплазматических протеасом оказались способными расщеплять РНК, причём их активности усиливались в присутствии ионов кальция. Среди субъединиц протеасом из ядер клеток K562 только две – $\alpha 7$ и $\alpha 5$ – оказались способными расщеплять РНК. При этом субъединица $\alpha 7$ была наиболее активна в присутствии Mg^{2+} . Для исследования регуляции РНКазной активности протеасом при индукции апоптоза, протеасомы были выделены из цитоплазмы и из ядер клеток, обработанных доксорубицином. Субъединицы протеасом были разделены с помощью двумерного электрофореза, из пятен, соответствующих по молекулярным массам α -субъединицам, экстрагировались белки, которые затем исследовались на наличие РНКазной активности по отношению к радиоактивно меченой мРНК р53 в присутствии и отсутствии двухвалентных катионов (Mg^{2+} и Ca^{2+}). После обработки клеток доксорубицином всего 4 субъединицы сохранили способность к расщеплению РНК: $\alpha 6$ потеряла свою активность. Кроме того, наблюдались изменения в воздействиях двухвалентных катионов на активность практически всех субъединиц. Экстракты всех исследуемых пятен были также изучены с помощью масс-спектрометрии с целью идентификации содержащихся в них белков и посттрансляционных модификаций, способных влиять на РНКазную активность.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект №08-04-00834) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Релокализация генов-партнеров по незаконной рекомбинации в условиях ингибирования ДНК-топоизомеразы II

Согласно современным представлениям, как интерфазные хромосомы, так и гены занимают в ядре достаточно жестко определенные радиальные положения. Считается общепринятым тот факт, что близкое расстояние между локусами может являться причиной незаконной рекомбинации между ними, часто приводящей к развитию лейкозов. Возникающие в результате транслокаций лейкозы, могут носить как первичный, так и вторичный характер. Возникновение вторичных лейкозов связывают с терапией рака ингибиторами ДНК-топоизомеразы II. ДНК-топоизомераза II является жизненно необходимым ферментом, так как катализирует топологические изменения в ДНК в ходе сегрегации дочерних хромосом после завершения процесса репликации ДНК, транскрипции, рекомбинации и реорганизации хроматина. Именно поэтому при терапии раковых заболеваний применяются препараты, ингибирующие активность ДНК-топоизомеразы II и вызывающие гибель активно делящихся клеток.

В настоящей работе исследовалось взаимное пространственное расположение генов AML1 и ETO, являющихся частыми партнерами при транслокациях, ведущих к возникновению первичных и вторичных лейкозов.

Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием культуры первичных фибробластов человека (HEF 1698) было показано, что радиальное распределение флуоресцентных сигналов, соответствующих гену ETO и хромосомной территории 8-ой хромосомы во внутриядерном пространстве делящихся клеток имеет линейный профиль. Также было показано, что при обработке клеток этопозидом (VP16) – ингибитором ДНК-топоизомеразы II – характер распределения сигналов резко меняется и сигналы, в значительной степени, группируются на внутриядерной орбите, соответствующей 45% радиуса ядра.

Для частого партнера гена ETO по транслокациям, гена AML1, было показано, что основная масса сигналов, соответствующих гену AML1 и хромосомной территории 21-ой хромосомы в интактных клетках, сосредоточена на той же орбите (45% радиуса ядра), и что такое распределение сигналов не изменяется после обработки клеток этопозидом. Анализ размера геномной ДНК с применением метода электрофоретического разделения ДНК в пульсирующем поле показал возникновение большого числа разрывов в ДНК вследствие обработки клеток этопозидом. Также с использованием культуры клеток Jurkat была продемонстрирована тенденция к предпочтительной локализации сигналов, соответствующих гену ETO, в околядрешковом пространстве в условиях ингибирования ДНК-топоизомеразы II.

Таким образом, продемонстрировано, что в условиях, имитирующих противораковую терапию, происходит сближение генов AML1 и ETO. Это сближение, сопровождающееся расщеплением ДНК ингибитором топоизомеразы II, может вести к хромосомным транслокациям и развитию вторичных лейкозов.

Выделение и очистка металлопротеазы *B. intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036

Рудакова Н.Л., Данилова Ю.В. (Казань, puphen@rambler.ru)

Выяснение роли минорных протеиназ бацилл, доля которых в общем пуле протеолитической активности штамма не превышает 10%, представляет особый интерес для исследования. Одним из таких ферментов является исследуемая нами металлопротеаза штамма *B. intermedius* 3-19. Ген металлопротеазы был клонирован в протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG 2036. Нуклеотидная последовательность гена была конвертирована в аминокислотную последовательность белка, исходя из которой была рассчитана молекулярная масса фермента – 19 кДа. На основании гомологии с

другими ферментами исследуемая протеиназа была отнесена к семейству M12 клана MB.

Протеолитическая активность обнаруживается в культуральной жидкости и её уровень достигает своего максимума на 29-31 час роста, что соответствует стационарной фазе роста культуры. Активность рекомбинантного штамма ингибируется офенантролином – специфическим ингибитором металлопротеаз и не ингибируется специфическими ингибиторами сериновых протеиназ. В качестве первого этапа выделения белка было выбрано дробное фракционирование сульфатом аммония. В интервале насыщения 0,2 – 0,7 степень очистки белка составила 20, а выход белка почти 50%. Последующая очистка полученной фракции белка на бацитрацин-силохроме повысила степень очистки белка ещё в 50 раз, выход при этом составил 19%. SDS-электрофорез данной фракции показал наличие 4-х полос, поэтому в дальнейшем мы использовали 2 способа очистки. Первый – это применение ионообменной хроматографии на анионообменнике DEAE-целлюлозе и катионообменнике КМ-целлюлозе. Хроматография на DEAE-целлюлозе позволила повысить степень очистки белка в 6,4 раза. Хроматография на КМ-целлюлозе оказалась менее эффективной, поэтому в дальнейшем не использовалась. SDS-электрофорез фракции белка после очистки на DEAE-целлюлозе показал наличие 3-х полос. Вторым способом очистки белка явилась хроматография на гидрофобном носителе бутил-сефарозе. В результате был получен препарат белка, степень очистки которого возросла в 2,8 раза, и выход составил 33 %. SDS-электрофорез данной фракции показал наличие только одной полосы белка. На основании рисунка электрофореза было установлено, что молекулярная масса металлопротеазы соответствует приблизительно 17 кДа, что соответствует расчетам, полученным предварительно на основании нуклеотидной последовательности гена. На гомогенном препарате были исследованы некоторые энзиматические свойства белка: pH-оптимум как и pH-стабильность находится в пределах 7,2 – 7,4; фермент стабилен в интервале температур от 37 до 65⁰С, максимальную активность проявляет при 65⁰С. Таким образом, нами впервые разработан способ получения гомогенного препарата новой металлопротеазы *B. intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* с использованием хроматографии на гидрофобном носителе.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ № 09-04-99044-г_ofi. Н.Л. Рудакова выражает признательность к.б.н. Н.П. Балабан и профессору, д.б.н. М.Р. Шариповой за помощь в подготовке тезисов.

Поиск участков белка preMsk1p, необходимых для направления специфического импорта тРНК в митохондрии дрожжей

Смирнова Е.В., Каменский П.А. (Москва, e.renyxa@gmail.com)

В клетках дрожжей *S.cerevisiae* существует три изоакцепторных лизиновых тРНК, две из которых закодированы в ядерном геноме, а одна – в митохондриальном. Одна из тРНК, закодированных в ядерной ДНК (тРЛ1, антикодон CUU), частично импортируется в митохондрии (95% молекул находится в цитозоле, 5% – в митохондриальном матриксе). Вторая лизиновая тРНК (тРЛ2, антикодон UUU) находится исключительно в цитоплазме, а третья (тРЛ3, антикодон UUU) – в матриксе митохондрий. тРЛ1 импортируется в аминокцилированном виде. Помимо аминокцилирования, для импорта необходимо связывание тРЛ1 с предшественником митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (preMsk1p). Этот белок синтезируется в цитоплазме и затем импортируется в митохондриальный матрикс, где после отщепления сигнала митохондриальной локализации он аминокцилирует тРЛ3. Для эффективного импорта тРЛ1 необходимо также наличие одной из двух форм гликолитического фермента енолазы (Epo2p), который специфически связывает аминокцилированную тРЛ1. Epo2p доставляет тРЛ1 к

поверхности митохондрий, где тРЛ1 взаимодействует с preMsk1p. тРЛ1 необходима для трансляции митохондриальных мРНК при повышенных температурах (поскольку в этом случае тРЛ3 гипомодифицирована по первому положению антикодона и не способна эффективно распознавать лизинный кодон AAG).

Митохондриальная ЛизРС состоит из двух доменов: С-концевого, катализирующего реакцию аминокислотирования, и N-концевого, ответственного за первичное связывание тРНК и взаимодействие с антикодоновой петлей. Было показано (*in vitro* и *in vivo*), что для специфического импорта тРЛ1 в митохондрии достаточно только N-концевого домена preMsk1p. В представляемой работе показано, что укороченные с С-конца версии N-концевого домена белка способны направлять импорт не только тРЛ1, но также и других малых РНК: тРЛ2, некоторых мутантных транскриптов гена тРЛ1 и даже некоторых тРНК *E.coli* (*in vitro*); аланиновой тРНК (*in vivo*). Таким образом, участок белка, ответственный за специфичность импорта тРЛ1 в митохондрии, находится в пределах аминокислотной последовательности, отличающей полный N-концевой домен от его укороченных вариантов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и программы PICS (Франция). П.К. является держателем Гранта Президента РФ.

Изучение новой сайт-специфической эндонуклеазы VspACI, узнающей последовательность 5'-CCGC-3'

Тарасова М.В., Джанобилова З.К., Томилова Ю.Э. (Новосибирск, tarasovamv@gmail.com)

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) представляют собой сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы бактерий. ЭР, относящиеся к IIA или IIS типам узнают непалиндромные последовательности ДНК и производят гидролиз обеих цепей внутри или рядом с сайтом узнавания. Такие рестриктазы являются составной частью систем рестрикции-модификации (РМ-систем), в которые помимо них входят одна или две ДНК-метилтрансферазы (метилазы), защищающие ДНК бактерии от гидролиза собственной ЭР. ЭР могут быть чувствительны не только к модификациям оснований, производимым метилазами из той же РМ системы, но и к метилированию других оснований узнаваемой последовательности. Изучение чувствительности к метилированию различных рестриктаз имеет большое значение для анализа статуса метилирования ДНК, а также для планирования генно-инженерных работ, связанных с метилированной ДНК. Данная работа посвящена изучению РМ-системы VspACI, а также исследованию зависимости степени гидролиза ДНК ЭР VspACI от присутствия C5-метилцитозинов в сайте узнавания.

Новая ЭР VspACI из штамма *Bacillus species* AC, была выделена с помощью трех стадий хроматографии. Последовательность ДНК, узнаваемую найденной ЭР, определяли путем сравнения длин полученных фрагментов при гидролизе ДНК фагов лямбда и T7 и плазмиды pUC19 с теоретическими картинками гидролиза этих субстратов, построенных с помощью программы Vector NTI. Используя специально-синтезированные олигонуклеотиды и рестриктазы с известной субстратной специфичностью, определили позицию гидролиза узнаваемой последовательности. Сайт узнавания и позиции гидролиза (указаны стрелками) оказались следующими: 5'-C↓CGC-3'/3'-GGC↓G-5'. Таким образом, новая ЭР является истинным изошизомером рестриктазы AciI. Была исследована зависимость степени гидролиза ДНК от наличия C5-метилцитозинов в сайте узнавания рестриктазы VspACI. Для этого провели гидролиз двух плазмид pFsp4HI2 и pHspAI, несущих гены m5C-метилаз, M.Fsp4HI и M.HspAI соответственно. Первая из указанных метилаз модифицирует второй цитозин в последовательности 5'-GCNCGC-3', вторая – первый цитозин в последовательности 5'-GCCGC-3'. Таким образом, имеется несколько вариантов пересечения сайтов узнавания метилаз и рестриктазы VspACI, при которых один или два цитозина в сайте узнавания

изучаемой рестриктазы являются метилированными. В том числе, имеется два варианта пересечения сайтов, включающих в себя CG-метилирование. Длины полученных фрагментов ДНК после гидролиза плазмид pFsp4HI2 и pHspAI сравнили с длинами фрагментов из теоретических картин гидролиза этих плазмид при различных вариантах блокирования расщепления наличием метильных групп в узнаваемой последовательности. Кроме того, чувствительность ЭР BspACI к C5-метилированию сайта узнавания была исследована путем гидролиза олигонуклеотидов, несущих метильную группу на одном из цитозинов, входящих в сайт узнавания. Полученные данные по гидролизу плазмид и олигонуклеотидов полностью коррелируют друг с другом.

Регуляторные белки TnrA, GlnK, GS *Bacillus subtilis* в условиях азотного голодания Федорова К.П., Каюмов А.Р. (Казань, ksunchik-@mail.ru)

В ответ на воздействия внешней среды происходит активация многих регуляторных систем, контролирующей экспрессию различных генов и оперонов. В условиях недостатка азота, фактор транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* активирует гены, ответственные за ассимиляцию альтернативных источников азота. При избытке доступного азота повышается концентрация внутриклеточного глутамин, что приводит к подавлению активности глутаминсинтетазы GS по принципу обратной репрессии. Фермент GS способен формировать белковый комплекс с TnrA, снижая его способность взаимодействовать с ДНК. В условиях азотного голодания TnrA связан с мембраной посредством белков GlnK-AmtB. Трансмембранный белок AmtB является транспортным и направляет в клетку ионы аммония. GlnK представляет собой небольшой регуляторный белок, который регулирует активность AmtB. Ранее было показано, что при переносе клеток в среду без источника азота, локализация TnrA становится цитозольной, и он быстро элиминируется из клеток. Целью данного исследования явилось установить поведение белков TnrA, GS и GlnK, участвующих в регуляции азотного метаболизма бацилл, после удаления источника азота из среды.

Было исследовано поведение белков TnrA, GlnK и GS в условиях истощения источника азота в клетках *B. subtilis* 168 и в штаммах *B. subtilis*, дефектных по белкам GlnK и AmtB. В клетках *B. subtilis* 168, деградация TnrA наблюдалась в клетках уже через 15 минут после удаления источника азота из среды. В мутантных штаммах *B. subtilis* $\Delta amtB$ и *B. subtilis* $\Delta glnK$ протеолитического расщепления фактора TnrA не происходило. При этом уровень белков GS и GlnK не изменялся в диком штамме *B. subtilis* 168 и в штаммах дефектных по генам *glnK* и *amtB*. Мы изучали поведение белков TnrA, GlnK, GS после истощения источника азота и дальнейшего инкубирования в SMM без азота в течение 18 часов в клетках *B. subtilis* 168. Было обнаружено, что фактор TnrA, который разрушался после переноса на среду без азота, появлялся в клетках вновь на 4 час инкубирования. Уровень белков GlnK и GS не изменялся после 18 часов выращивания на среде без азота. Также было изучено изменение количества белков при переносе клеток с богатой питательной среды на бедную среду без источника азота. При росте на среде LB ген *tnrA* неактивен, и отсутствуют белки TnrA, GlnK и AmtB. В этом случае белок TnrA обнаруживался в клетках всех штаммов после 18 часов культивирования. GlnK появлялся на 2-ой час инкубации, а в *B. subtilis* $\Delta amtB$ через 0.5 часа культивирования на среде без азота. Уровень GS оставался на исходном уровне во всех трех штаммах. Таким образом, протеолиз фактора транскрипции TnrA является специфическим ответом клеток на условия истощения источника азота и не затрагивает другие белки системы регуляции азотного метаболизма клеток бацилл.

Тезисы основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант №09-04-99044-г_ofi).

Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. М.Р. Шариповой за помощь в подготовке тезисов.

Локализация РНКазного центра субъединицы зета 20S протеасомы

Федорова О.А. (Санкт-Петербург, fedorovaolgand@mail.ru)

Протеасомы – это мультикаталитические протеазные комплексы, которые встречаются как в ядре, так и в цитоплазме клеток большинства организмов. Под словом “протеасома” обычно подразумевается 26S протеасома, состоящая из 20S коровой частицы и двух ассоциированных с ней 19S регуляторных комплексов. 20S протеасома представляет собой полый цилиндр, составленный из субъединиц двух типов: α и β . Протеолитические центры протеасомы расположены на трех β -субъединицах. Субъединицы α -типа, в свою очередь, обеспечивают регулируемый доступ субстрата и присоединение регуляторных комплексов. Важнейшей функцией протеасом на протяжении долгого времени считалось участие в убиквитин-зависимом расщеплении белков, однако в 1990х годах было впервые показано наличие у 20S протеасом эндорибонуклеазной активности. Впоследствии были идентифицированы две α -субъединицы, обладающие РНКазной активностью, а также была обнаружена способность 26S протеасом к расщеплению РНК. Кроме того, была показана, что способность 20S протеасом и их отдельных субъединиц расщеплять мРНК находится в зависимости от посттрансляционных модификаций. В исследованиях последних лет продемонстрировано участие некоторых субъединиц регуляторного 19S комплекса в регуляции транскрипции. Таким образом, есть основания рассматривать протеасому как важный элемент системы регуляции экспрессии генов на различных этапах. В силу неопределимой важности убиквитин-зависимого протеолиза для жизнедеятельности любой клетки, внимание большинства исследователей сосредоточено на изучении механизмов протеолитических активностей протеасом, и, таким образом, исследование РНКазы протеасом остается в тени.

Целью данной работы является локализация РНКазного центра в составе субъединицы $\alpha 5$ (зета). Анализ третичной структуры данного белка позволил локализовать потенциальные активные центры; они представляли собой последовательности трех аминокислотных остатков: H186-S188-E193 и H227-T230-D233. Последовательность дикого типа кДНК субъединицы $\alpha 5$ человека была клонирована в экспрессионный вектор pGEX, и на ее основе был получен химерный белок $\alpha 5$, слитый с GST; $\alpha 5$ -GST был экспрессирован в *E. coli*, т.е. не нес посттрансляционных модификаций. Для этого белка были подобраны оптимальные условия проявления им РНКазной активности. В соответствии с целями работы нами были получены экспрессионные векторы pGEX-5X-3- $\alpha 5$, pGEX-5X-3- $\alpha 5$ -H186A и pGEX-5X-3- $\alpha 5$ -H227A, содержащие соответственно ген субъединицы $\alpha 5$ и последовательности $\alpha 5$, несущие точечные мутации в 186 или 227 положениях (для инактивации потенциальных РНКазных центров); была исследована способность $\alpha 5$ и мутантных белков к расщеплению РНК. В качестве субстрата РНКазной активности белков была использована меченная [32 P] мРНК гена человека p53. Продукты нуклеолиза анализировали с помощью денатурирующего электрофореза высокого разрешения. Эксперименты показали, что мутантный белок H186A, как и белок дикого типа, обладает РНКазной активностью, в то время как замена гистидина на аланин в 227 положении существенно подавляла эндорибонуклеазную активность соответствующего мутантного белка. Таким образом, есть основания полагать, что РНКазный центр субъединицы $\alpha 5$ образован аминокислотными остатками H227-T230-D233.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект №08-04-00834) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Пространственная организации локуса 14 хромосомы кур *Филоненко Е.С., Яровая О.В. (Москва, Dr.Elena.S@gmail.com)*

Эукариотическая ДНК организована в большие петли, фиксированные основаниями на ядерном матриксе. В задачи нашей работы входило проанализировать пространственную организацию 250 т.п.н. района куриной хромосомы 14, который включает кластер α -глобиновых генов, ряд генов домашнего хозяйства и генов неспецифичных эритроидной линии дифференцировки. Методом *in situ* гибридизации с флюоресцентными ВАС-пробами к исследуемому участку нами было продемонстрировано, что в лимфоидных клетках DT40 локус организован в несколько петель, фиксированных основанием на элементах ядерного скелета. В делящихся эритроидных клетках линии HD3 пространственная организация резко отличается от лимфоидных клеток: большая часть домена коллапсирована и на препаратах развёрнутого хроматина (гало) наблюдается в виде точечного сигнала. Картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу с шагом 5 т.п.н. показало, что в эритроидных клетках вся область α -глобиновых генов, и прилегающих к ним TMEM8 и гена домашнего хозяйства GGPRX закорена на матриксе, в то время как в лимфоидной линии клеток мы выявили ряд участков прикрепления и петель, распределённых по всему локусу, что согласуется с данными по *in situ* гибридизации. Анализ участков прикрепления методом ПЦР в реальном времени позволил более детально охарактеризовать участки прикрепления. По полученным нами данным для линии клеток HD3 ядерный матрикс обогащён фрагментами ДНК, содержащими эритроидспецифический энхансер, ген домашнего хозяйства GGPRX, ген TMEM8, эмбриональный глобиновый α -P ген и ряд других открытых рамок считывания, но не включает в себя гены α -D и α -A, экспрессирующихся на высоком уровне в данном типе клеток. Для линии лимфоидных клеток DT40 мы выявили участки прикрепления к ядерному матриксу, соответствующие эритроидспецифическому энхансеру, гену домашнего хозяйства GGPRX и гену TMEM8, а также участок, включающий ориджин репликации. Полученные нами данные, свидетельствуют о том, что структура исследуемого локуса резко отличается в разных типах клеток и её архитектура напрямую не связана с транскрипционным статусом клетки.

Новая реакция амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот в режиме реального времени. РЦР – Рекуррентная Цепная Реакция

Чемерис Д.А. (Уфа, chemeris@gmail.com)

Повышенный интерес к амплификации и высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот и к разработке все новых способов их проведения объясняется тем, что это многомиллиардный и быстро растущий бизнес. Несмотря на то, что в основе разработанной нами новой цепной реакции лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР), из-за весьма существенных отличий, заключающихся главным образом в характере накопления целевых продуктов, по которому РЦР превосходит ПЦР на несколько порядков, мы назвали данную реакцию иначе – Рекуррентная Цепная Реакция, чтобы исключить длинное название данной реакции типа «ПЦР с увеличивающимся с каждым циклом коэффициентом размножения молекул ДНК» или «ПЦР с увеличивающимся с каждым циклом числом мест для отжига праймеров в составе ампликона». Особенностью РЦР является то, что в качестве прямого и обратного (вариант РЦР 2/2 – более продуктивная реакция) или только одного из них (вариант РЦР 2/1, характеризующийся преимущественным накоплением одной из цепей) используются праймеры, представляющие собой тандемно повторяющиеся последовательности одинарного (основного) праймера с расположением повторов в них по типу "голова к хвосту" и состоящие из двух или большего числа таких элементов. Помимо того, что с

каждым циклом происходит удлинение ампликона на длину одинарного праймера и увеличение для них числа мест отжига в составе ампликона, применение термостабильной ДНК полимеразы, обладающей активностью, смещающей цепь ДНК (вторая особенность РЦР), приводит к возникновению в каждом цикле двуцепочечного ампликона, а также построенных с впереди отжигшихся праймеров одиночных цепей ДНК, смещенных такой полимеразой, причем число таких ампликонов в виде одиночных цепей ДНК растет с каждым циклом, благодаря чему РЦР приобретает огромные преимущества по сравнению с ПЦР. РЦР 2/2 уже к 20-му циклу опережает ПЦР по степени размножения молекул ДНК не в 2 – 3 – 5 раз, а сразу на 5 порядков. Детекция протекания РЦР в реальном времени может осуществляться путем регистрации роста флуоресценции красителя типа SYBR Green I или с использованием гибридизационных зондов типа молекулярных сигнальных огней. Другим способом детекции результатов РЦР может быть контроль переноса флуоресцентной резонансной энергии от красителя-донора к красителю-акцептору, входящих соответственно в состав прямого и обратного праймеров, при условии отжига последних в непосредственной близости друг от друга. При этом нами разработан улучшенный способ такой детекции накопления ампликонов в реальном времени на платформе "УФА" (Универсальная Флуоресцентная Амплификация, или "UFA" – Universal Fluorescent Amplification), по большинству параметров превосходящий аналогичные методы.

Помимо ПЦР разработано немало других методов амплификации нуклеиновых кислот, но ни один из них так до сих пор и не смог составить серьезной конкуренции ПЦР, несмотря на то, что некоторые по эффективности размножения молекул ДНК сравнимы или даже превосходят ПЦР, однако последняя заметно превосходит их благодаря простоте исполнения. Что касается РЦР, то при формировании реакционной смеси никаких принципиальных отличий в добавлении ингредиентов по сравнению с ПЦР нет, и после набора программы в термоциклере амплификация с помощью РЦР будет идти как обычная ПЦР. Учитывая это, на РЦР нами подана заявка на патент РФ, который в настоящее время переводится в международную фазу.

Проникновение антисмысловых олигонуклеотидов в клетки эмбрионов мыши линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J

Черняева Е.С. (Москва, lozadionisa@gmail.com)

Важной задачей современной биологии и медицины является поиск препаратов, способных с высокой эффективностью селективно подавлять экспрессию определенных генов. Одними из претендентов на роль ген-направленных терапевтических агентов являются антисмысловые олигонуклеотиды (АсОДН), которые способны образовывать прочные специфические комплексы с внутриклеточными нуклеиновыми кислотами. АсОДН и их производные направлены на матричные РНК с целью ингибирования процесса трансляции. В настоящее время АсОДН находят применение в клинике для лечения онкологических заболеваний, ряда вирусных и бактериальных инфекций. Однако до сих пор недостаточно изучена эффективность проникновения олигонуклеотидов в клетки-мишени, а также зависимость эффективности проникновения олигонуклеотидов от их вторичной структуры. В связи с этим актуальным является изучение эффективности проникновения олигонуклеотидов различной вторичной структуры в клетки-мишени.

Нами были подобраны два АсОДН к мРНК EGFP (enhanced green fluorescent protein) и методами молекулярного моделирования показано, что АсОДН 5'-GAGCTGCACGCTGCCGTC-3' формирует вторичную структуру, а АсОДН 5'-TCGCCCTTGCTCACCAT-3' не формирует вторичную структуру. В работе было проведено исследование проникновения данных АсОДН, имеющих флуоресцентную метку TAMRA, в клетки эмбрионов мыши линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J от

стадии 2-х бластомеров до стадии бластоцисты (1,5-4,5сут. развития) и в клетки, полученные от эмбрионов мыши этой же линии 18,5сут. развития, культивируемые *in vitro*. АсОДН добавляли в среду до конечной концентрации 1нмоль/мл, инкубировали в течение часа при 37⁰С и отмывали в среде без АсОДН. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии показано, что АсОДН, формирующий вторичную структуру, проникает в клетки ранних эмбрионов мыши линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osb/J на всех стадиях развития и локализуется в цитоплазме, но практически не проникает в клетки всех исследованных первичных культур (фибробласты кожи, жировые клетки, миобласты, МСК костного мозга), полученных из эмбрионов мыши 18,5 сут. развития. Возможно, это связано с тем, что в клетках ранних эмбрионов наблюдается более активный транспорт веществ внутрь клеток (эндоцитоз и свободная диффузия), чем в клетках эмбрионов на более поздних стадиях развития. Также было показано, что АсОДН, формирующий вторичную структуру, не проникает в клетки ранних эмбрионов мыши линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osb/J до стадии компактизации (1,5 -2,5сут. развития) и проникает в эмбрионы на стадиях компактизированной морулы и бластоцисты (2,5-4,5сут. развития) и локализуется в цитоплазме. Кроме того, было установлено, что этот АсОДН проникает в клетки всех исследованных первичных культур поздних эмбрионов мыши линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)1Osb/J и локализуется в цитоплазме, преимущественно в околоядерной области. Различия в проникновении АсОДН, формирующих и не формирующих вторичную структуру, в клетки эмбрионов разных стадий развития, дают возможность предполагать наличие разных доминирующих механизмов их поступления в клетки.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проводимых в рамках Программы поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых ВУЗов России компании Carl Zeiss, Германия (грант №2-13).