

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН
ИЦиГ СО РАН

УДК 577.21

№ госрегистрации 01201058864

УТВЕРЖДАЮ
Директор
академик РАН Н. А. Колчанов

(подпись)
“15” сентября 2010 г.
М.П.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры
инновационной России» на 2009-2013 годы

Проведение научных исследований коллективами научно-образовательных центров в области
физико-химической молекулярной и клеточной биологии

по теме:
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-СПЕЦИФИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЖИВОТНЫХ
(Государственный контракт № 02.740.11.0705)
(промежуточный, этап № 1)

Наименование этапа: «Сбор материала для проведения молекулярно-генетического анализа и
оптимизация экспериментальных методик»

Руководитель проекта
д.б.н., проф.

_____ Г. М. Дымшиц
подпись, дата

Новосибирск 2010

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Дымишиц Г. М. (раздел 3, введение, заключение)
Исполнители		
зав. отд. молекулярной генетики, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Меркулова Т.И. (разделы 2, 3)
зав. лаб. генетики стресса, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Раушенбах И. Ю. (разделы 6, 7)
зав. лаб. генной инженерии, к.б.н., доц. д.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Кочетов А. В. (раздел 5)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Грунтенко Н.Е. (раздел 6, 6)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Васильев Г.В. (разделы 2, 3)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Левицкий В.Г. (разделы 2, 3)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Антонцева Е. А. (раздел 2)
к.б.н., м.н.с.	_____ подпись, дата	Ощепков Д. Ю. (раздел 3)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Богомолова Е. В. (раздел 7)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Адоньева Н.В. (раздел 6)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Карпова Е.К. (раздел 6)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Иванов М. К. (раздел 4)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Глушков С.А. (раздел 4)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Сангаев С.С. (раздел 5)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Волкова О.А. (раздел 5)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Брызгалов Л.О. (раздел 3)

<i>аспирант</i>	_____	<i>Брагин А. Г.</i>
	подпись, дата	(разделы 1, 2)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Герасимова С.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Ершов Н.И.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Сметанина М.А.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Иванисенко Т.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Горелова В.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Савельева А.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Аркова О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>студент</i>	_____	<i>Сайк О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Медведев К.Е.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>студент</i>	_____	<i>Емцева М.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 7)
<i>Нормоконтролер</i>	_____	<i>Амайзер Н.Н.</i>
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 45 с., 16 рис., 2 табл., 32 источника.

СИГНАЛЫ ЭКСПРЕССИИ, ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР, ФЛЭП-СТРУКТУРА, ДНК-ПОЛИМЕРАЗА, ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ ХРОМАТИНА, SOLiD, МЕТОД CHIP-SEQ, FOXA, ЮВЕНИЛЬНЫЙ ГОРМОН, ТЕПЛОВЫЙ СТРЕСС, D2-РЕЦЕПТОРЫ, ДОФАМИН

Целью проекта является выявление молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов животных на транскрипционном и посттранскрипционном уровне в норме и в условиях стресса, а также исследование генетических моделей патологических состояний. В рамках проекта планируется использовать современные методы количественного анализа паттернов экспрессии генов эукариот, а также ряд уникальных генетических моделей. В рамках первого этапа проведена работа по подготовке биологического материала и отработке методов исследования. Для проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием пула выделенных ДНК на системе SOLiD проведена отработка методики ультразвуковой фрагментации хроматина, обработанного формалином. С использованием разработанного ранее метода определения полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-полимераз и его модифицированного варианта, позволяющего измерять активность 5'-эндо/экзонуклеаз, был детально исследован механизм действия нуклеазной активности ДНК-полимеразы Taq. Для исследования паттернов экспрессии генов печени крысы в норме и при воздействии онкогенных ксенобиотиков из образцов печени крыс параллельно выделены препараты РНК и белковые экстракты ядер для проведения последующего анализа на биочипах. Проведена оценка уровня ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора FoxA в этих экстрактах. Исследовано влияние ксенобиотической активации и инактивации D2-подобных рецепторов на метаболизм дофамина. Впервые показано, что D2-подобные рецепторы дофамина играют существенную роль в развитии стресс-реакции насекомых. Созданы репрезентативные выборки нуклеотидных последовательностей мРНК генов эукариот. Выделены выборки различных функциональных районов мРНК (лидерный район, сигнал инициации трансляции, белок-кодирующая часть). Проведен первичный компьютерный анализ их контекстных характеристик. В рамках подготовки к проведению анализа экспериментальных выполнена работа по созданию новых эффективных компьютерных методов распознавания сайтов связывания FOX-белков. Полученные результаты используются в учебном процессе (курсы лекций «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»).

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	10
1.Проведение патентных исследований.....	16
2 Оработка оптимальных условий подготовки иммунопреципитированного материала (средняя длина фрагментов ДНК, количество, степень очистки) для создания библиотек, пригодных для системы массового параллельного секвенирования (SOLiD).....	17
3 Получение образцов суммарной мРНК из тканей печени крыс, подвергнутых воздействию гепатоканцерогенных аминоазосоединений	21
4 Оптимизация технологии ПЦР в реальном времени: разработка метода определения активности флэп-эндонуклеазы с использованием флуоресцентных меток.....	23
5 Создание выборок нуклеотидных последовательностей мРНК генов эукариот. Проведение первичного компьютерного анализа контекстных характеристик, связанных с эффективностью инициации трансляции.....	33
6 Изучение влияния ксенобиотической активации и инактивации D2-подобных рецепторов на метаболизм дофамина в нормальных и стрессирующих условиях.....	35
7 Исследование метаболизма дофамина у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R (полученной с помощью РНК-интерференции на трансгенных линиях).....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	43

ВВЕДЕНИЕ

Цель проекта заключается в выявлении молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов животных на транскрипционном и посттранскрипционном уровне в норме и в условиях стресса. Для выполнения этой работы планируется использовать современные методические подходы и перспективные генетические модели, что позволит исследовать регуляцию экспрессии генов, связанных с развитием социально-значимых патологий (канцерогенез, гипертоническая болезнь).

В настоящее время методы и подходы молекулярной биологии активно используются для исследования фундаментальных аспектов организации сложных биологических систем. Одна из ключевых задач заключается в реконструкции генных сетей и регуляторных контуров, определяющих адаптацию организма животных к стрессовым условиям различной природы: эта информация необходима не только для развития существующих представлений о молекулярно-генетических механизмах адаптации к неблагоприятным факторам, но и для получения новых данных о причинах канцерогенеза и некоторых заболеваний, связанных с дисфункцией регуляторных систем вследствие мутаций или воздействия ксенобиотиков. Эти исследования относятся к актуальным направлениям развития молекулярной биологии и необходимы для разработки новых методов диагностики и лечения патологических состояний человека. В то же время, стресс-специфическая экспрессия генов представляет собой модель, изучение которой может дать новую ценную информацию фундаментального характера. В рамках проекта планируется исследовать следующие модели: (1) Транскрипционный контроль экспрессии генов печени экспериментальных животных в норме и при воздействии онкогенных ксенобиотиков. Печень представляет собой ключевой орган детоксификации ксенобиотиков. Система генов, контролирующая детоксификацию, сложна и изучена недостаточно полно. Кроме того, многие ее компоненты одновременно являются ключевыми регуляторами базовых клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и апоптоз. Вследствие этого, происходящие при взаимодействии с определенными веществами сбои в регуляторных системах клеток печени могут приводить к развитию онкологических заболеваний. Планируется провести комплексное исследование влияния ряда гепатоканцерогенных соединений на транскриптом печени и полногеномное распределение важных для ее функции факторов транскрипции, что позволит очертить круг генов, ответственных за развитие опухолей печени под действием этих соединений и построить схему регуляторных событий, ведущих к данной патологии.

(2) Изучение механизмов транскрипционного контроля экспрессии генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крысы в норме и при стрессе. Эта часть работы связана с исследованием генетического контроля функционирования одной из важнейших

физиологических систем, нарушения в которой приводят к развитию гипертонической болезни. Для проведения исследований планируется использовать уникальную генетическую модель, разработанную в ИЦиГ СО РАН – лабораторную линию крыс НИСАГ, характеризующихся увеличенным кровяным давлением и наследственной склонностью к развитию гипертонии в ответ на стресс. Исследования на молекулярно-биологическом уровне позволят выявить регуляторные механизмы, нарушения в которых отвечают за развитие этой патологии. Планируется провести изучение реакции на стресс ключевых генов симпато-адреналовой и ренин-ангиотензиновой систем у крыс гипертензивной линии НИСАГ разных возрастов в почках, сердце и различных отделах мозга. Полученные данные будут использованы для развития представлений о механизмах возникновения артериальной гипертонии, связанной со стрессом.

(3) Изучение сигналов, локализованных в мРНК и контролирующих общую и стресс-специфическую трансляционную активность матриц. В рамках проекта планируется провести исследования молекулярных механизмов стрессового ответа, действующих не только на уровне контроля транскрипции, но и на уровне трансляции мРНК. Известно, что в условиях различных видов стресса происходит приостановка трансляции основного пула клеточных мРНК и экспрессируются преимущественно стресс-специфические гены. Сигналы, определяющие такую селективную трансляцию, в настоящее время малоизучены. Планируется провести исследование, направленное на выявление характеристик эукариотических мРНК, связанных с селективной трансляцией в стрессовых условиях. Знание таких характеристик позволит предсказывать мРНК, трансляция которых связана с адаптацией к неблагоприятным условиям, что – в свою очередь – будет способствовать выявлению соответствующих генов.

(4) Исследование роли контроля экспрессии генов дофаминовых (ДА) рецепторов в поддержании гормонального статуса в нормальных и стрессирующих условиях. Установлено, что D2-подобный рецептор (D2R) у млекопитающих является ключевым модулятором двигательной функции. У человека D2R оказался важнейшей терапевтической мишенью для лечения брадикинезии, возникающей в результате болезни Паркинсона. Однако пока практически ничего не известно о том какую роль контроль экспрессии генов рецепторов дофамина играет в регуляции гормонального статуса организма в стрессирующих условиях. Проведение подобных исследований на человеке невозможно, так как требует фармакологического изменения уровней стресс-связанных гормонов и проведения генетических экспериментов. Поскольку показано, что ДА-подобные рецепторы высококонсервативны у млекопитающих и дрозофилы, в рамках настоящего проекта использована созданная в ИЦиГ СО РАН уникальная модель (серия линий дрозофилы с

мутациями, вызывающими изменения в уровне различных стресс-связанных гормонов, в том числе дофамина), на которой установлен механизм взаиморегуляции гормонов стресса в контроле репродуктивной функции и устойчивости к действию стрессоров. Эта модель высокоперспективна еще и потому, что соответствующие регуляторные контуры у насекомых устроены значительно проще, чем у млекопитающих, и это позволяет реконструировать их организацию и эволюцию. Выявленные закономерности можно будет использовать как модель для коррекции гормонального дисбаланса, возникающего при стрессе у млекопитающих.

Решение этих проблем необходимо для развития признанного правительством Российской Федерации приоритетного направления «Живые системы», а также для ряда критических технологий в рамках этого направления. Вовлечение студентов Новосибирского государственного университета и аспирантов Института цитологии и генетики СО РАН в исследования в рамках данного проекта и использование его результатов в преподавании биологических дисциплин, таких как молекулярная биология, новейшие методы молекулярно-генетических исследований и др. сыграет важную роль в формировании у студентов целостного представления о молекулярных механизмах контроля экспрессии генов. Таким образом, в рамках НИР планируется проведение комплексного исследования молекулярных механизмов контроля экспрессии генов в стрессовых условиях, действующих на транскрипционном и трансляционном уровнях. Выполнение НИР должно обеспечивать достижение научных результатов мирового уровня, подготовку и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективных и жизнеспособных научных коллективов.

Основные цели 1-го этапа проекта — Сбор материала для проведения молекулярно-генетического анализа и оптимизация экспериментальных методик. Задачи этапа включают следующие виды работ:

1. Проведение патентных исследований
2. Отработка оптимальных условий подготовки иммунопреципитированного материала (средняя длина фрагментов ДНК, количество, степень очистки) для создания библиотек, пригодных для системы массового параллельного секвенирования (SOLiD).
3. Получение образцов суммарной мРНК из тканей печени крыс, подвергнутых воздействию гепатоканцерогенных аминоазосоединений.
4. Оптимизация технологии ПЦР в реальном времени: разработка метода определения активности флэп-эндонуклеазы с использованием флуоресцентных меток.

5. Создание выборок нуклеотидных последовательностей мРНК генов эукариот. Проведение первичного компьютерного анализа контекстных характеристик, связанных с эффективностью инициации трансляции.

6. Изучение влияния ксенобиотической активации и инактивации D₂-подобных рецепторов на метаболизм дофамина в нормальных и стрессирующих условиях.

7. Исследование метаболизма дофамина у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R (полученной с помощью РНК-интерференции на трансгенных линиях).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Развитие и жизнедеятельность многоклеточных животных обеспечивается строго контролируемым уровнем экспрессии генов в различных органах и тканях. Целью проекта является выявление молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов животных на транскрипционном и посттранскрипционном уровне в норме и в условиях стресса, а также исследование генетических моделей патологических состояний. В рамках проекта планируется использовать современные методы количественного анализа паттернов экспрессии генов эукариот, а также ряд уникальных генетических моделей. В рамках первого этапа главным образом была проведена работа по подготовке биологического материала и отработке методов исследования.

Количественные ПЦР и ОТ-ПЦР (обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция) находят широкое применение как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. В частности, количественная ОТ-ПЦР является эффективным инструментом для анализа экспрессии генов, особенно тех, транскрипция которых слаба. На разрешающую способность количественного ПЦР-анализа, а, следовательно, на достоверность получаемых с его помощью результатов оказывают влияние разнообразные факторы: 1) воспроизводимость процесса выделения матрицы; 2) эффективность удаления ингибиторов ПЦР; 3) концентрация целевой матрицы, добавляемой в реакционную смесь; 4) эффективность процесса амплификации; 5) воспроизводимость получаемого аналитического сигнала, и др. Первые два фактора и частично третий определяются используемым методом выделения нуклеиновой кислоты, и доведение их до максимальных показателей является тривиальной задачей, которая легко решается применением соответствующих коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот из того или иного биологического материала. Третий фактор определяется природой исследуемого биологического материала и контролируется (с точностью до второстепенных оговорок) только за счет изменения дозы материала. Четвертый и пятый факторы определяются дизайном систем амплификации матрицы и детекции целевого продукта, и доведение их до максимальных значений представляет собой в ряде случаев весьма сложную задачу. В рамках проекта запланировано проведение исследований в этом направлении, результаты которых будут использованы для оптимизации количественного высокоточного анализа уровня экспрессии генов.

Метод иммунопреципитации хроматина *in vivo* является уникальным по своим возможностям инструментом для изучения взаимодействия между ДНК-связывающими белками (транскрипционными факторами, гистонами и др.) и ядерной ДНК. Суть метода заключается в следующем: на первом этапе проводится обработка образца ткани или суспензии клеток формалином, приводящая к образованию ковалентных ДНК-белковых связей, что фиксирует

ДНК-связывающий белок на молекуле ДНК в районе специфического сайта связывания. Далее фиксированный ядерный хроматин выделяется и подвергается ультразвуковому дроблению на фрагменты с максимумом распределения в районе 250-500 п.о. (пар оснований) На следующем этапе с помощью специфических антител к интересующему нас белку проводится селективная иммунопреципитация ДНК-белковых комплексов. Ковалентные связи ДНК-белок гидролизуются, ДНК из преципитированных комплексов выделяется и исследуется различными методами. Взаимодействие интересующего нас белка с отдельными короткими участками геномной ДНК может быть исследовано с помощью полимеразной цепной реакции, большое количество данных о распределении сайтов связывания в геноме может быть получено гибридизацией на микрочипах (метод ChIP-Chip). Данные о полногеномном профиле распределения сайтов связывания получают путём секвенирования всего пула выделенной ДНК с помощью приборов массового параллельного секвенирования второго поколения – SOLiD фирмы ABI либо GA analyzer фирмы Illumina (метод ChIP-Seq). Метод ChIP-Seq обладает принципиальными преимуществами перед методом гибридизации на микрочипах. Во-первых, ChIP-Seq даёт многократно больший объём информации, во-вторых, результатом является картина полногеномного, а не только промоторного распределения сайтов связывания, в третьих, полученный результат свободен от предварительного (искусственного) отбора исходных данных, что может существенно исказить конечный результат, что неизбежно в случае с микрочипами, несущими фиксированное число заранее выбранных последовательностей. Наконец, результатом ChIP-Seq являются не относительные уровни сигнала, как в случае микрочипов, а информация о районах ДНК, задействованных в определенных биологических процессах, что даёт несравненно больше возможностей для компьютерного анализа результатов эксперимента. В частности, в результате секвенирования всего пула иммунопреципитированной ДНК и наложения этой информации на референсную геномную последовательность получают совокупность пиков покрытия, соответствующих районам взаимодействия ДНК-белок. Завершающей стадией эксперимента является компьютерный анализ полученных распределений и нуклеотидных последовательностей, их достоверности, а также изменений в результате тех или иных регуляторных событий. Применение этой технологии для изучения генетических моделей патологических состояний и стрессового ответа позволит получить новую информацию, необходимую для реконструкции регуляторных событий и генных сетей. Изменения уровня экспрессии некоторых генов могут приводить к развитию патологий, включая образование злокачественных опухолей. Наиболее перспективным подходом к выявлению таких генов является применение высокопродуктивных технологий анализа транскриптомов. Одна из задач настоящего проекта заключается в исследовании паттернов

экспрессии генов печени крысы в норме и при воздействии онкогенных ксенобиотиков. В качестве таких соединений были выбраны аминокрасители орто-аминоазотолуол (ОАТ) и 3'-метил-4-диметиламиноазобензол (3'-МеДАБ). Известно, что, несмотря на сходную структуру, 3'-МеДАБ является сильным гепатоканцерогеном для крыс, в то время как ОАТ проявляет лишь следовую гепатоканцерогенную активность (Каледин и Захарова, 1984). Влияние этих соединений на транскриптом печени запланировано проводить с использованием биочипов (RatRef-12 BeadChip (Illumina)), содержащих олигонуклеотидных пробы, соответствующие 22523 генам крысы.

Одной из важных генетических моделей контроля стрессоустойчивости являются животные с измененным уровнем нейрогормонов и медиаторов. Важным медиатором, участвующим в контроле приспособленности у разных видов животных (способности оставить потомство и выжить при стрессе), является дофамин. Показано, что у насекомых полиморфизм по уровню дофамина способствует адаптации популяций к стрессирующим условиям различной природы (Gruntenko et al., 2004). Установлено, что у самок дрозофилы существует механизм стабилизации баланса стресс-связанных гонадотропинов (ювенильного гормона и 20-гидроксиэкдизона), являющегося жизненно-важным для нормального протекания оогенеза: при изменении уровня одного из гонадотропинов в результате мутации или при стрессе, баланс восстанавливается за счет соответствующего изменения титра второго. Посредником во взаиморегуляции ювенильного гормона и 20-гидроксиэкдизона является дофамин (обз.: Gruntenko, Rauschenbach, 2008). Продемонстрировано, что резкое увеличение уровня дофамина в результате мутации или при стрессе сопровождается столь же резким падением активности щелочной фосфатазы - фермента, регулирующего пул предшественника дофамина – тирозина (Sukhanova et al., 1996), что способствует восстановлению нормального уровня амина и исполнению им роли посредника в восстановлении баланса ювенильного гормона и 20-гидроксиэкдизона.

Известно, что влияние дофамина на метаболизм клетки опосредуется двумя семействами G-протеин-сопряженных рецепторов, D1-подобных и D2-подобных (обз.: Vallone et al., 2000). Показано, что D1-подобные рецепторы связываются со стимулирующими G белками (Gas), вызывая активацию аденилатциклазы и запуск каскада, приводящего к изменениям матричной активности хроматина. D2-подобные рецепторы передают сигнал через ингибирующие G белки (Gai/o), вызывая ингибирование аденилатциклазы (обз.: Vallone et al., 2000). D2-подобный рецептор *Drosophila* (DD2R) был клонирован и охарактеризован (Hearn et al., 2002). Дрэпер с соавторами (Draper et al., 2007) определили паттерн пространственной экспрессии гена *DD2R* и функционально охарактеризовали мух со сниженным уровнем экспрессии *DD2R*.

Следует отметить, что регуляторные контуры, контролирующие эффекты дофамина, являются консервативными у разных видов животных. Изучение организации этой системы у

насекомых способно пролить свет на ее эволюцию, а также позволит выявить базовые ключевые компоненты. Важным преимуществом работы с насекомыми является наличие генетических моделей, позволяющих осуществлять глубокий молекулярно-генетический анализ.

В отчетный период в рамках проекта была проверена выдвинутая нами гипотеза о том, что ингибирующее влияние дофамина на активность щелочной фосфатазы в тканях дрозофилы опосредуется D₂-подобными рецепторами. В качестве модели была использована трансгенная линия *D. melanogaster*, UAS-*ds-DD2R*, несущая генетическую конструкцию - антисмысловой супрессор гена *DD2R* (Draper et al., 2007). Для того, чтобы снизить число D₂-подобных рецепторов в тканях дрозофилы была использована линия *D. melanogaster*, несущая генетическую конструкцию с драйвером Actin5C-Gal4, обеспечивающим повсеместную экспрессию Gal4 (Draper et al., 2007). При скрещивании этих линий в поколении F1 должны получаться особи, у которых супрессирован ген *DDR2*. Для ксенобиотической активации или инактивации D₂-подобных рецепторов нами были использованы бромокриптин (синтетический высокоаффинный агонист D₂-подобного рецептора дрозофилы (Hearn et al., 2002)) и метоклопрамид (селективный антагонист D₂-подобного рецептора (Evans, 1990)).

Исследование структуры эукариотических генов и матричных РНК необходимо для понимания фундаментальных механизмов реализации генетической информации. В настоящее время считается, что инициация трансляции большей части эукариотических мРНК происходит по механизму линейного сканирования, согласно которому 40S субъединица рибосомы связывается с кепом на 5'-конце мРНК и движется вдоль матрицы в поиске инициаторного AUG кодона в подходящем контексте (Kozak, 2005). Показано, что нуклеотиды в районе стартового кодона растений и млекопитающих важны для его взаимодействия с рибосомой: оптимальному контексту соответствуют пурин в -3 и гуанин в +4 положениях вокруг AUG. В экспериментах *in vitro* показано, что в случае субоптимального контекста AUG кодона, часть рибосом не распознает его как старт трансляции и может инициировать трансляцию на следующем AUG (leaky scanning или «сканирование с подтеканием») (Kozak, 2005)). Однако, в ряде случаев рибосомы преимущественно распознают или пропускают AUG кодоны независимо от их расположения и контекста, причем эти феномены нельзя объяснить известными причинами, например, наличием сайтов внутренней инициации трансляции (Кочетов, 2006). Характерно, что структура существенной части эукариотических мРНК, разметка которых проводилась на основе критериев модели «линейного сканирования», плохо совместима с эффективной инициацией трансляции (Rogozin et al., 2001). Недавно было показано, что эукариотический сигнал инициации трансляции может содержать несколько альтернативных стартовых кодонов AUG (Kochetov,

2005) и такие мРНК могут кодировать изоформы белка, различающиеся по N-концевому домену и функциональным свойствам (Kochetov et al., 2005).

Другой значимой характеристикой является вторичная структура мРНК, параметры которой оказывают выраженное влияние на эффективность трансляции и цитоплазматическую стабильность. Известно, что стабильные шпильки в 5'-нетранслируемой последовательности мРНК ингибируют эффективность инициации трансляции, поскольку 40S субъединицы рибосомы во время линейного сканирования должны затратить определенное время на их преодоление (Kozak, 2005; Kochetov et al., 2007). Негативный эффект зависит от локализации вторичной структуры по отношению к 5'-концу (расположение в непосредственной близости от кэпа способствует более сильному негативному воздействию, так как такое расположение стерически затрудняет взаимодействие между кэпом и фактором инициации трансляции 4E). Ингибирующий эффект вторичных структур мРНК в составе белок-кодирующих частей снижен, поскольку 80S рибосома обладает более мощным геликазным потенциалом по сравнению с 40S субъединицей. Вообще говоря, в последнее время принято считать, что в живых системах молекулы мРНК существуют не в виде одной определенной конформации, а могут существовать в виде набора (популяции) переходящих друг в друга конформаций, энергия которых близка к глобальному минимуму (набор субоптимальных конформаций, локальных термодинамически-приемлемых минимумов). Ситуация еще более усложняется тем, что в цитоплазме клетки находится большое количество других биологических макромолекул, которые взаимодействуют с мРНК. К таким молекулам относятся универсальные факторы аппарата трансляции (eukaryotic initiation factors, eIFs), факторы элонгации трансляции, поли(А)-связывающий белок, а также разнообразные белки, взаимодействующие со специфическими сигналами в составе мРНК отдельных генов (по некоторым оценкам, экспрессия около 20% генов эукариот контролируется на уровне трансляции и цитоплазматической стабильности мРНК). Таким образом, сигналы экспрессии, локализованные в мРНК, могут быть полиморфны и этот полиморфизм может быть одним из источников генетической изменчивости и эволюции на уровне регуляторных событий и генных сетей.

Одно из направлений, в которых планируется проводить исследования в рамках настоящего проекта, это механизмы трансляционного контроля паттернов экспрессии генов, задействованных в контроле стрессового ответа. В условиях стресса трансляция большинства клеточных мРНК супрессирована, поскольку клетка функционирует в стрессовом режиме и все ресурсы переключаются на поддержку основных жизненных функций и выживание. При этом мРНК генов стрессоустойчивости продолжают транслироваться. Различные виды стресса (гипоксия, вирусная инфекция, воздействие ксенобиотиков, индукция деления клеток

при воздействии факторов роста или вследствие онкогенеза) запускают интегральный стрессовый ответ, направленный на приостановку трансляции пула мРНК, характерного для данных клеток в нормальных условиях (Cully and Downward, 2009). Один из механизмов, выключающих «нормальную» экспрессию генов, заключается в фосфорилировании фактора инициации трансляции eIF-2alpha, что ингибирует общий синтез белка. Однако, несмотря на универсальность этого механизма, трансляция некоторых мРНК продолжает осуществляться. В частности, это касается мРНК важных регуляторных генов ATF4, ATF5 (activating transcription factors), GADD34 (growth arrest DNA inducible gene 34) и др. Недавние эксперименты показали, что в структуре лидерного района мРНК генов ATF4, ATF5 и GADD34 содержатся небольшие рамки считывания, выполняющие роль сенсора функциональной активности фактора eIF2alpha: в отсутствие фосфорилирования этого фактора трансляционная активность таких мРНК снижена, однако, при наступлении стресса и фосфорилировании eIF2alpha, увеличивается эффективность механизма реинициации трансляции, что приводит к дополнительному синтезу транскрипционных активаторов ATF4, ATF5 и GADD34 (Watatani et al., 2008; Lee et al., 2009). Также было показано, что конформационные характеристики мРНК (специфически локализованные элементы вторичной структуры) тоже способны увеличивать трансляционную активность мРНК в том случае, если eIF2alpha фосфорилирован: в частности, этот механизм позволяет некоторым вирусам преодолевать клеточные механизмы противовирусной защиты, действующие на уровне трансляции (Ventoso et al., 2006). Следует отметить, что сигналы, локализованные в мРНК и позволяющие им транслироваться в условиях стресса, исследованы недостаточно: например, имеющиеся на сегодняшний день данные не позволяют предсказывать эффективность стресс-специфической трансляции по структуре нуклеотидной последовательности. Выявление таких сигналов относится к актуальным задачам молекулярной биологии, поскольку это позволит разобраться в деталях жизненно-важных регуляторных механизмов, отвечающих за адаптацию молекулярно-генетических систем клетки к стрессовым условиям. Кроме того, такая информация позволит разобраться в специфических молекулярных основах некоторых патологических состояний (опухоли, наследственные заболевания).

В целом, в рамках проекта запланировано проведение комплексного исследования, включающего как работы методического характера (оптимизация ПЦР в реальном времени), так и анализ механизмов транскрипционного и посттранскрипционного контроля экспрессии эукариотических генов, задействованных в ответе на стресс и в развитии ряда патологических состояний.

1. Проведение патентных исследований

Для выполнения этой части работы нами был проведен поиск и анализ патентной информации. Детальное описание результатов патентного поиска представлено в виде отдельного приложения к настоящему отчету, поэтому в данном разделе приводятся только краткое изложение выводов и рекомендаций:

1. Исследования молекулярных механизмов стресс-специфического контроля экспрессии генов животных относятся к актуальным направлениям развития молекулярной биологии и необходимы для разработки новых методов диагностики и лечения патологических состояний человека, которые пригодны для массового коммерческого распространения в медицинской практике, а также в академическом секторе при проведении исследований, направленных на разработку оптимальных методик контроля экспрессии генов, ответственных за развитие социально-значимых заболеваний.

Основными тенденциями развития в рамках проекта являются:

- оптимизация алгоритмов ПЦР-анализа для высокоточного анализа содержания мРНК генов, задействованных под влиянием повреждающих факторов внешней среды;
- создание новых генетических моделей патологических состояний для исследования механизмов, контролирующих паттерны экспрессии ключевых регуляторных генов человека;
- создание специфических ингибиторов экспрессии выбранных генов, ответственных за развитие социально-значимых заболеваний человека;
- разработка усовершенствованных способов диагностики и лечения патологических состояний человека, связанных с дисфункцией регуляторных систем.

Разрабатываемая тема «Молекулярные механизмы стресс-специфического контроля экспрессии генов животных» соответствует актуальным направлениям развития биотехнологий, поскольку нацелена на изучение уровней экспрессии генов, ответственных за развитие социально-значимых заболеваний. Исследования на молекулярно-биологическом уровне позволят выявить регуляторные механизмы, нарушения в которых отвечают за развитие патологических состояний человека.

2. В России исследования, направленные на выявление генов, нарушения в структуре и экспрессии которых приводят к развитию заболеваний, проводятся слабо, поскольку зачастую отсутствуют надежные данные о генах, либо группах генов, подавление экспрессии которых необходимо для восстановления нормального фенотипа клеток и приведет ли такое ингибирование к устойчивому терапевтическому эффекту.

3. Ведущими странами, занимающимися исследованиями в вышеназванной области являются США, Великобритания, Германия, Япония, Франция, и др. страны, где

исследованиям в области молекулярной биологии и биотехнологии придается ранг национальных программ.

4. Выявлено около 40 организаций (компаний), разрабатывающих или приобретающих средства подавления экспрессии генов, ответственных за развитие социально-значимых заболеваний. Данные компании должны быть объектом постоянного внимания разработчиков с целью своевременного выявления созданных ими новых эффективных средств подавления экспрессии генов, ответственных за развитие различных заболеваний или тенденций их развития.

5. Наиболее перспективными агентами для направленного подавления экспрессии генов, ответственных за развитие социально-значимых заболеваний, являются интерферирующие РНК.

6. Наиболее востребованными и обладающими максимально высоким коммерческим потенциалом на рынке биотехнологий являются компании Entelos (США), BioSeek (США), CompuGen (США), Pharsight (США), Optimata (Израиль), GeneGo (США, Германия), Genstruct (США), Gene Network Sciences (США) и Genomatica (США).

2. Отработка оптимальных условий подготовки иммунопреципитированного материала (средняя длина фрагментов ДНК, количество, степень очистки) для создания библиотек, пригодных для системы массового параллельного секвенирования (SOLiD).

Одной из начальных стадий подготовки работы систем массового параллельного секвенирования является подготовка специальных фрагментных библиотек, несущих специфические олигонуклеотидные адаптеры по краям, и целевые встройки размером 60-90 п.о. в центре. В качестве исходного материала для их создания будут использоваться фрагменты хроматина, иммунопреципитированные со специфическими антителами.

Результатом работы системы SOLiD является массив коротких (25 или 35 п.о.) прочтений. Каждый отдельный фрагмент соответствует случайному участку исходного района иммунопреципитированной ДНК размером 200-500 п.о. (Jothi et al., 2008). Поэтому точность локализации сайтов связывания напрямую зависит от размера исходного фрагмента иммунопреципитированной ДНК – чем он больше, тем более пологими получаются пики покрытия геномной ДНК, тем больше требуется уровень покрытия (число отсеквенированных фрагментов) и, соответственно, выше стоимость эксперимента. Кроме того, при этом падает точность локализации истинного сайта связывания интересующего нас белка (Valouev et al., 2008). Поэтому для минимизации этих эффектов необходимо уменьшение среднего размера

иммунопреципитированного фрагмента хроматина. Однако, уменьшение среднего размера фрагментов обычно достигается за счет использования более жестких режимов ультразвуковой обработки хроматина, что может приводить к разрыву не только цепи ДНК, но и образованных обработкой формалином ДНК-белковых сшивок. За счёт этого может существенно падать выход ДНК в процедуре собственно иммунопреципитации. Кроме того, наличие в обработанном хроматине белков и поперечных сшивок изменяет спектр его фрагментации по сравнению с очищенной ДНК. Поэтому выбор оптимальных условий озвучивания хроматина является важной составной частью эксперимента.

Для ультразвуковой фрагментации хроматина нами был использован прибор Covaris v.2. Данный прибор обладает широкими возможностями по регулировке параметров обработки ДНК. Для всех вариантов программ был выбран режим Frequency sweeping как обеспечивающий большую равномерность распределения звуковых волн по всему объёму образца. Остальные параметры (первые буквы параметров включены в названия программ): Среднее время генерации волн (D) в процентах; Амплитуда волн (I); Число циклов излучения за рабочий цикл (C); Суммарное число рабочих циклов (N). Всего было проверено 28 различных комбинаций рабочих параметров (от D5_I3_C100_N10 до D20_I10_C1000_N10), часть результатов проверки приведена на Рис.1 А и В. Гомогенат 200 мг ткани печени обрабатывался формалином в 20 мл буфера, далее хроматин выделялся, для проверки каждой из программ необходимое количество хроматина (5 мкг) озвучивалось отдельно в объёме 500 мкл, далее проводилась процедура разрушения ДНК-белковых сшивок инкубацией в буфере 0.1М NaHCO₃, 0.3М NaCl, 0.5 мкг/мкл РНКазы А, в течение 1 часа. После этого белковая фракция удалялась фенол-хлороформной экстракцией, образец пересаждался добавлением 2.2 объёмов этанола, растворялся в 30 мкл ТЕ, 6 мкл. каждого образца наносились на 2% агарозный гель, электрофорез проводился в буфере TAE 1 час при напряжении 6 В/см. Визуализация осуществлялась окрашиванием геля бромистым этидием.

Максимально жесткие из использованных условий озвучивания (программа D20_I10_C1000_N10) дали средний размер фрагментов 100-200 п.о. (Рис. 1А, линия 1), что не соответствует оптимальному размеру фрагментов. Озвучивание в полипропиленовых пробирках Eppendorf дало существенно худший результат, чем в пробирках из боросиликатного стекла (Рис.1А, линии 2 и 2а соответственно, программа D10_I5_C200_N10). Наилучшие результаты показала программа D20_I8_C300_N10 - средний размер фрагментов от 100 до 300 п.н., незначительная часть материала представлена фрагментами более 500 п.н. (Рис.1В, линия 8).

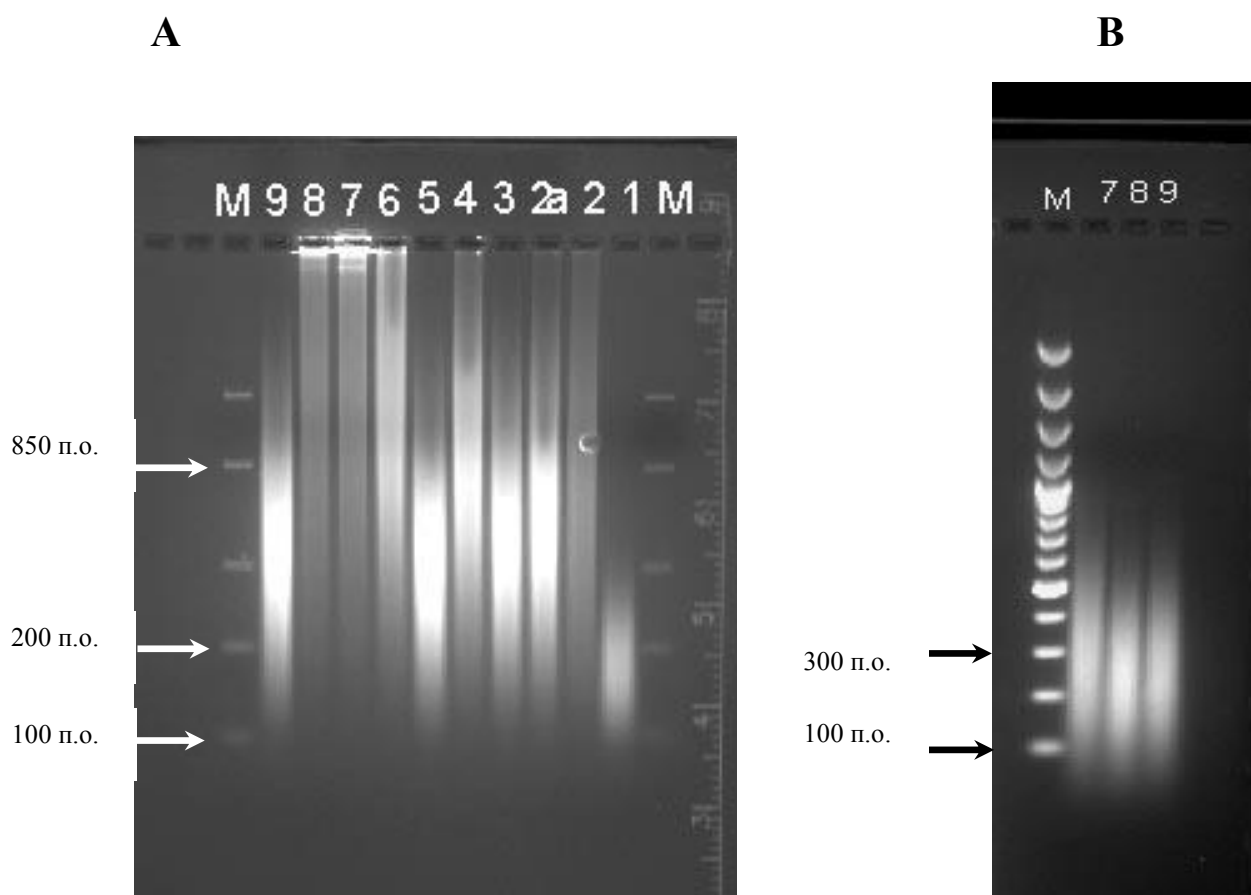


Рис.1. Результаты ультразвуковой фрагментации обработанного формалином хроматина для различных вариантов программ установки Covaris. Электрофорез в 2% агарозных гелях, буфер TAE, окраска бромистым этидием. **А:** М – маркёр длин Fermentas FastRuler™ Low Range DNA Ladder. 1-9 – различные варианты программ (описаны в тексте). **В:** М – маркёр длин Fermentas 100 bp DNA Ladder, 7, 8, 9 – различные варианты программ (описаны в тексте).

Дополнительно в рамках подготовки к проведению анализа экспериментальных данных полногеномного скрининга сайтов связывания FOX-белков методом ChIP-Seq, намеченного на следующий год выполнения проекта, нами была выполнена работа по созданию новых эффективных компьютерных методов распознавания сайтов связывания этих белков. На настоящий момент обычно используемые пакеты программ показали свою недостаточную эффективность и недостаточную разрешающую способность по отношению к распознаванию реальных сайтов связывания FOX-белков. Так, в работе (Motallebipour *et al.*, 2009) только 12,5% (1022 из 8175) ChIP-Seq пиков для фактора FOXA1 охарактеризованы как содержащие варианты пятибуквенного мотива TnTTnAc, при том, что сам по себе данный мотив совершенно недостаточен для эффективного распознавания сайта связывания FOXA. В качестве потенциальных мотивов связывания для основной массы пиков предложены

экзотические варианты CGnnnC, AnnCG, CGC *etc.* Поскольку транскрипционные факторы данного семейства имеют значительную вариативность реальных сайтов связывания, плохо описываемую в терминах стандартного консенсуса и стандартных весовых матриц, то для их предсказания необходимо разработать иные подходы.

Разработанный нами ранее метод на основе подхода оптимизированных весовых матриц (далее - PWM) показал высокую эффективность распознавания сайтов связывания FOXA. Мы использовали его для модельного анализа результатов эксперимента ChIP-Seq по выявлению сайтов связывания транскрипционного фактора FoxA, взятых из работы (Wederell *et al.*, 2008, данные в свободном доступе [<http://www.bcgsc.ca/data/ChIP-Seq>]). Авторы работы полагали, что максимальное значение профиля ChIP-Seq позволяет надежно выявить районы связывания транскрипционного фактора FoxA вблизи этого района. Ширина пиков ChIP-Seq варьировала от 183 до 9812 п.о., причем 50% последовательностей было протяженнее 654 п.о. Нами было произведено наложение профилей ChIP-Seq и потенциальных сайтов связывания, предсказанных методом PWM для всех последовательностей исходной выборки. Целью данного сравнения было определение того, на каком расстоянии от центра ChIP-Seq пика располагается большинство сайтов связывания FOX-белков.

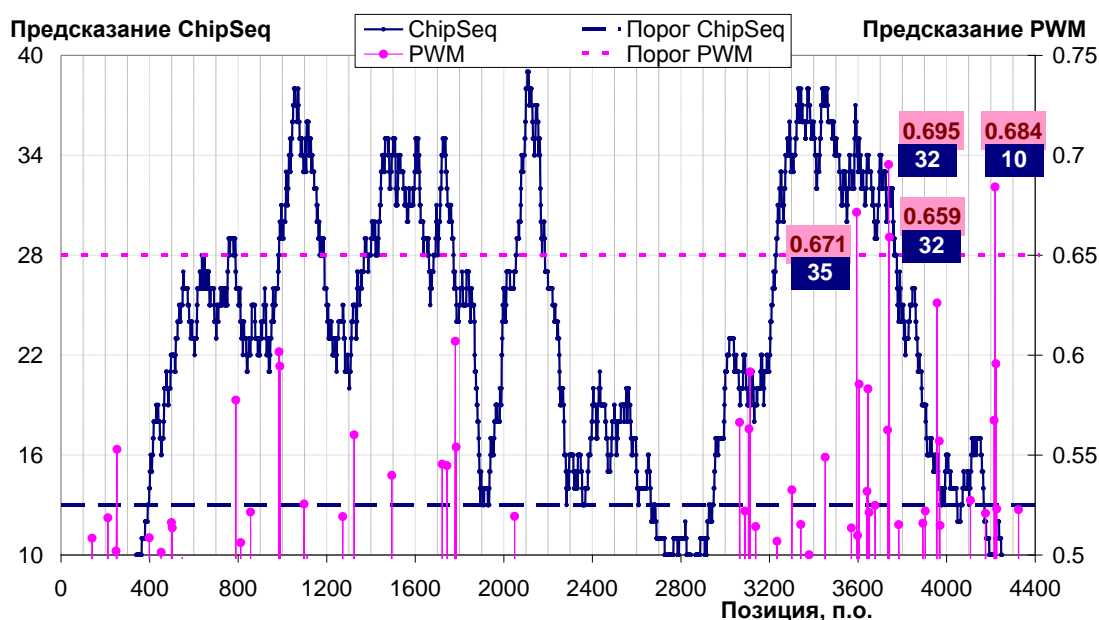


Рис. 2. Пример наложения профилей предсказаний сайтов FoxA экспериментальным (ChIP-Seq) и теоретическим (PWM) методами. Ось X – позиция относительно начала района ДНК. Ось Y, слева – предсказания ChIP-Seq, справа – предсказания методом PWM. Показанный район ДНК расположен в районе [1923;6913] относительно аннотированного 3’

конца транскрипта гена PHD finger protein 6 (Хромосома X, позиции 49156893-49201569). Штриховыми линиями указаны принятые в анализе пороги методов ChIP-Seq (13) и PWM.(0.65).

Основная часть (42%) всех предсказанных сайтов связывания FOXA обнаруживается на расстояниях менее 10 нуклеотидов от центра ChIP-Seq-пика, обычно рассматриваемого как вероятная позиция сайта связывания (рис. 2). Вероятность нахождения сайта на расстоянии более чем 10 нуклеотидов резко падает и остаётся почти постоянной (но при этом достаточно значимой) для расположения сайта на расстояниях от 10 до 190 нуклеотидов от центра ChIP-Seq-пика. На расстояниях не более 30 нуклеотидов находится немногим более 50% всех предсказаний, и только 76% всех предсказанных сайтов располагаются в диапазоне расстояний от 0 до 100 нуклеотидов от центра ChIP-Seq-пика, что довольно существенно расходится с утверждениями о возможности локализации сайтов связывания с точностью до нескольких нуклеотидов (Valouev et al., 2008) исключительно путём анализа конфигурации пиков ChIP-Seq-эксперимента. Таким образом, совместное применение экспериментальных и теоретических подходов позволит существенно улучшить качество распознавания сайтов связывания транскрипционных факторов семейства FOXA на уровне анализа полногеномных данных.

3. Получение образцов суммарной мРНК из тканей печени крыс, подвергнутых воздействию гепатоканцерогенных аминоазосоединений.

Ввиду достаточно высокой стоимости биочипового анализа требовалось заранее исключить из эксперимента животных, не демонстрировавших по каким-либо причинам стандартного ответа на введение аминоазосоединений ОАТ и 3'-МеДАБ. В качестве критерия такого ответа на аминоазосоединения был принят ранее установленный факт избирательного снижения ДНК-связывающей активности факторов транскрипции FoxA в клетках печени крыс под действием 3'-МеДАБ, но не ОАТ (Merkulova et al., 2005). Для этого из образцов печени крыс, использовавшихся для получения целевых препаратов РНК, параллельно были выделены белковые экстракты ядер. Оценку уровня ДНК-связывающей активности FoxA в полученных экстрактах проводили методом задержки в геле олигонуклеотидного зонда TTR, содержащего известный сайт связывания белков FoxA (Рис. 3). Образцы, для которых не наблюдалось подавления FoxA ДНК-связывающей активности в ответ на введение 3'-МеДАБ, были исключены из анализа.

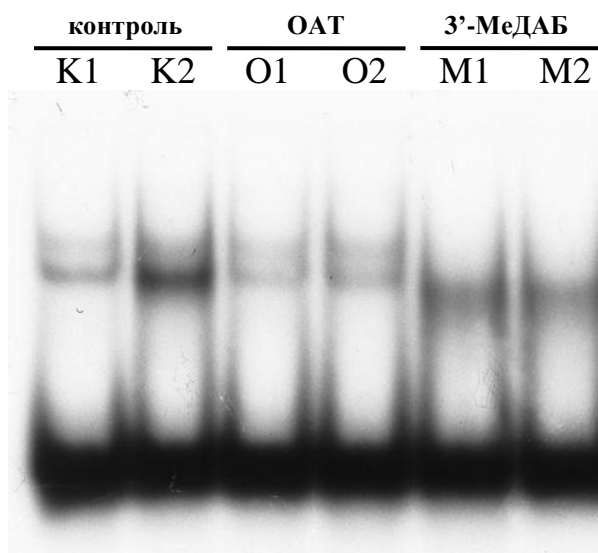


Рис. 3. Оценка влияния 3'-МеДАБ на FoxA ДНК-связывающую активность методом задержки меченого ДНК-зонда в геле с использованием экстрактов ядер клеток печени крыс. Приведены данные для 6 образцов печени, препараты РНК из которых взяты для выполнения гибридизации на микроматрицах.

Для выполнения гибридизации на микроматрицах требовалось получить препараты РНК высокого качества. В этой связи, для выделения РНК были опробованы два различных метода. В первом варианте был использован метод сорбции нуклеиновых кислот на силикагеле с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagene», США).

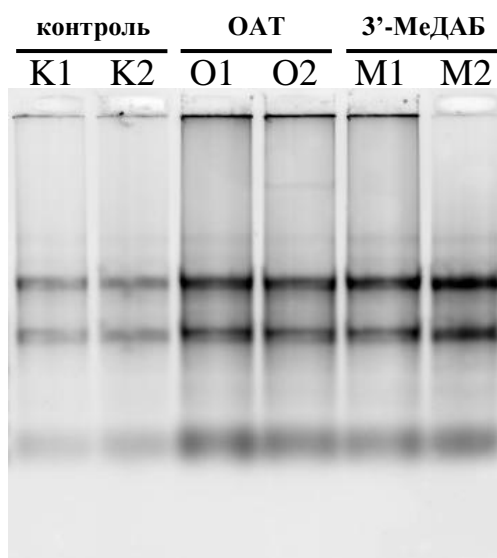


Рис. 4. Результаты оценки качества препаратов РНК, полученных методом фенол-хлороформной экстракции и взятых для дальнейшего выполнения гибридизации на микроматрицах.

Во втором случае выделение РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции с помощью реактива TRI Reagent («Ambion», США). Оказалось, что использование последнего метода позволяет добиться большего выхода при меньшей склонности к деградации целевого препарата РНК (Рис. 4). Полученные таким образом препараты РНК переданы в ОАО «Хеликон-аналитика» для выполнения гибридизаций на микроматрицах RatRef-12 BeadChip (Illumina).

4. Оптимизация технологии ПЦР в реальном времени: разработка метода определения активности флэп-эндонуклеазы с использованием флуоресцентных меток.

В рамках этой части работы была проведена оптимизация метода, используемого в рамках проекта для высокоточного количественного анализа содержания специфических ДНК и кДНК в пробах. Распространенным вариантом количественной ПЦР является технология ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентно-меченых гидролизуемых зондов, комплементарных одной из цепей образующегося продукта амплификации. В данном варианте количественной ПЦР системы амплификации матрицы и детекции целевого продукта тесно взаимосвязаны, поэтому эффективность генерации флуоресцентного сигнала (на основе которого проводятся все дальнейшие расчеты) является функцией трех переменных: эффективности процесса амплификации, эффективности гибридизации зонда с матрицей и эффективности расщепления гибридного зонда. Отсюда следует, что даже при эффективности амплификации, близкой к единице, эффективность генерации флуоресцентного сигнала может быть низкой, что приведет к ошибкам при определении начальной концентрации добавленной в реакционную смесь матрицы, особенно при работе с низкокопийными последовательностями. В связи с этим, для дизайна системы амплификации необходимо иметь методы контроля эффективности всех трех процессов.

В рассматриваемом варианте количественной ПЦР расщепление зонда происходит за счет 5'-3'-эксонуклеазной активности используемой термостабильной ДНК-полимеразы. Указанная активность некоторых ДНК-полимераз, в частности, ДНК-полимеразы I *E. coli*, выполняет важную функцию в метаболизме ДНК, принимая участие в удалении РНК-затравок в ходе репликации и поврежденных нуклеотидов в ходе репарации (Kornberg, 1992). Подобно ДНК-полимеразе I *E. coli*, ДНК-полимераза *Taq* также отщепляет 5'-концевые нуклеотиды двухцепочечной ДНК с образованием моно- и олигонуклеотидов (Longley et al., 1990; Holland et al., 1991; Lawyer et al., 1993; Lyamichev et al., 1993). Предпочтительным субстратом для расщепления является 5'-флэп-структура (комплекс трех цепей ДНК, одна из которых непрерывна, а две другие формируют разрыв, причем цепь ДНК, фланкирующая разрыв с 3'-края, имеет неспаренный свисающий 5'-участок (флэп)), так как гидролиз идет по

фосфодиэфирной связи, соединяющей 5'-флэп со спаренным участком цепи (т.е. ДНК-полимераза *Taq* обладает структуроспецифической флэп-эндонуклеазной активностью (structure-dependent single-stranded endonuclease (SDSSE) activity)) (Holland et al., 1991; Lyamichev et al., 1993). Целью настоящей работы являются уточнение и детализация приведенных выше положений, что имеет непосредственное отношение к дизайну системы амплификации матрицы и детекции целевого продукта и, в частности, к оценке эффективности расщепления зонда.

В ходе исследования зависимости скорости нуклеазного расщепления зонда от концентрации dNTP (нуклеотидтрифосфатов) в реакционной смеси с помощью описанного нами ранее метода определения полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-полимераз (Брагин и др., 2008; принцип метода раскрыт на рис. 5) было обнаружено, что при определенной концентрации dNTP (которой на изображенном на рис. 6 графике соответствует точка с абсциссой 3.4) наблюдается резкое увеличение скорости реакции. Детальный анализ результатов эксперимента привел к предположению, согласно которому в основе наблюдаемого ускорения лежит изменение структуры субстрата, возникающее в результате полимеразного синтеза. Суть эксперимента заключалась в следующем: проводилось измерение скорости расщепления зонда при различных концентрациях dNTP.

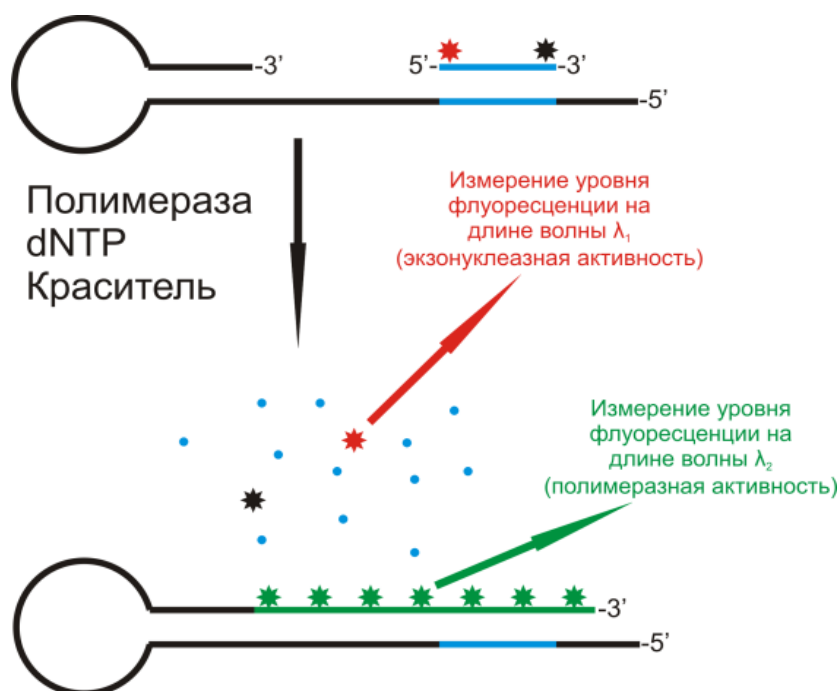


Рис. 5. Схема метода определения полимеразной и 5'-3'-эксонуклеазной активностей ДНК-полимераз. Красной и черной звездочками обозначены флуоресцентная метка и гаситель соответственно, синим цветом выделены зонд и сайт посадки зонда шпилечного олигонуклеотида.

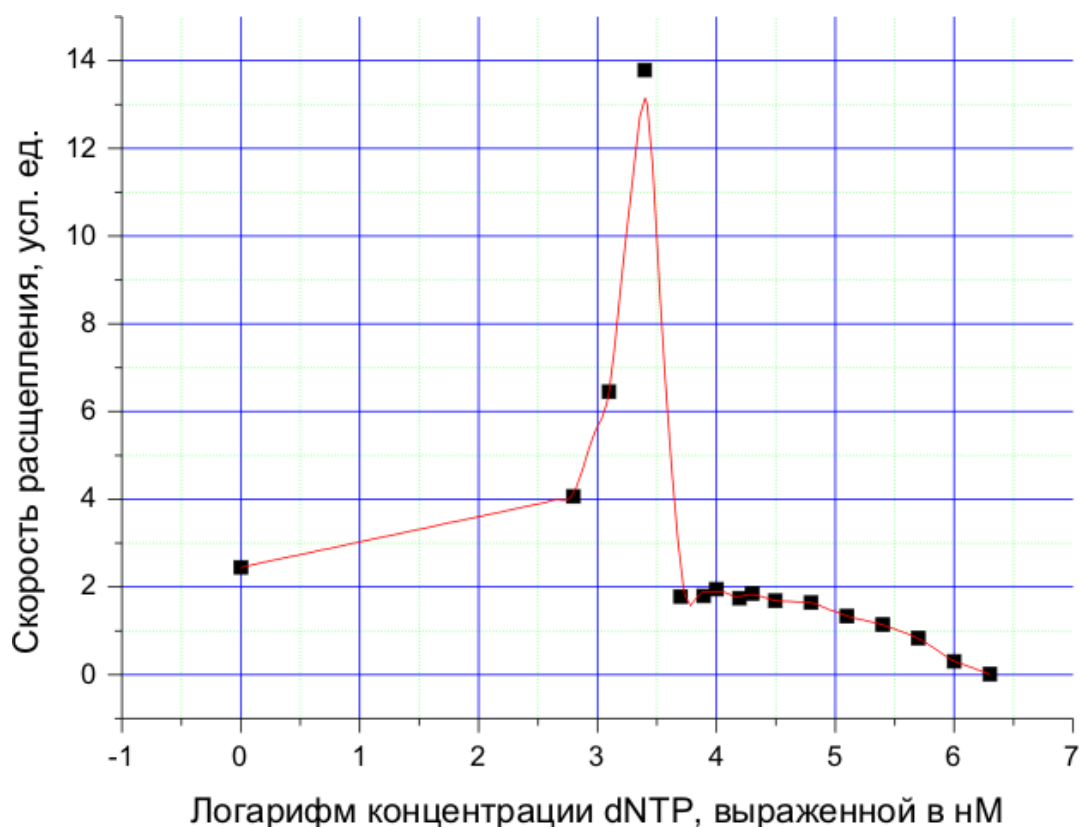


Рис. 6. Зависимость скорости расщепления зонда от концентрации dNTP. Черные квадраты соответствуют экспериментальным точкам, красным цветом выделена интерполяционная кривая.

Реакционная смесь объемом 50 мкл, содержащая 67 мМ Tris-HCl (pH 8.9), 1.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 5 мМ MgCl₂, 0.01% Tween-20, от 0.625 мкМ до 2000 мкМ каждого из dNTP, 1000 нМ меченого флуорофором олигонуклеотидного зонда, 2 мкМ SYTO13 и 185 нМ соответствующего шпилечного олигонуклеотида, прогревалась до 95°C и медленно охлаждалась до комнатной температуры, после чего помещалась в амплификатор и инкубировалась в течение 10 мин при температуре проведения реакции для стабилизации уровня фона.



Рис. 7. Структура субстрата, использованного в эксперименте по исследованию зависимости скорости расщепления зонда от концентрации dNTP. Зонд выделен зеленым цветом; флуорофор ROX (выделен красным) и гаситель BHQ-2 расположены в 1-й и 24-й (считая с 5'-конца) позициях зонда, соответственно. В пределах шпилечного олигонуклеотида красным цветом выделена шпилечная часть, синим – часть, комплементарная зонду.

Реакция запускалась добавлением в реакционную смесь 5 мкл Taq ДНК-полимеразы до конечной концентрации 500 нМ. Температура проведения реакции составляла 60°C. Детекцию флуоресценции в реальном времени в каналах FAM и ROX проводили с 10-секундным интервалом с использованием амплификатора с оптическим модулем CFX 96 («BioRad», США). При гибридизации шпилечного олигонуклеотида с матрицей образуется субстрат, структура которого приведена на рис. 7.

Из рисунка 7 видно, что расстояние между 3'-концом шпилечного олигонуклеотида и 5'-концом зонда составляет 41 нуклеотид (11A, 1G, 18T и 11C). Исходя из приведенных данных, можно рассчитать среднюю длину олигонуклеотида, который может быть синтезирован при полном расходовании присутствующих в реакционной смеси dNTP. Длина продукта лимитируется трифосфатом, который требуется в наибольшем количестве. Какой трифосфат является лимитирующим, зависит от рассматриваемого участка шпилечного олигонуклеотида: в данном случае в позициях с 1 по 7 одноцепочечного участка шпильки лимитирующим трифосфатом является либо dGTP либо dGTP и dATP одновременно, а в позициях 8 – 69 лимитирующим трифосфатом является dATP. Средняя длина продукта (L) рассчитывалась по формуле

$$L = \frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}} + N$$

где $\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}}$ – отношение концентрации dNTP к концентрации шпилечного олигонуклеотида – показывает среднее число молекул каждого из трифосфатов, которое приходится на одну молекулу шпилечного олигонуклеотида; N – общее количество молекул нелимитирующих трифосфатов, предшествующих и следующих за последней молекулой лимитирующего трифосфата до тех пор, пока не встречается $\left(\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}} + 1\right)$ -я молекула любого из трифосфатов.

Например, для минимальной концентрации dNTP (0,625 мкМ или 625 нМ) и концентрации шпильки в реакционной смеси 185 нМ отношение $\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}}$ составляет 3,37, т.е. в состав продукта может включиться максимум 3 молекулы каждого из трифосфатов; двигаясь в 5'-3'-направлении вдоль последовательности одноцепочечного участка шпильки начиная с 1 позиции, находим, какой из четырех трифосфатов впервые встречается $\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}} \approx 3$ раза (в данном случае это dCTP, см. рис. 7). Следовательно, лимитирующим дезоксинуклеотидтрифосфатом будет dGTP, расположенный в 6 позиции новосинтезированной цепи. После него в седьмую позицию растущей цепи включается dATP, поскольку в новосинтезированной цепи данный трифосфат встречался лишь 2 раза. С этого момента лимитирующими становятся как dGTP, так и dATP. Затем в растущую цепь снова

должен включиться dATP ($(\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}} + 1 \approx 4)$ -й по счету), но так как лимит трифосфатов исчерпан, рост цепи прекращается. Таким образом, средняя длина синтезируемых олигонуклеотидов при концентрации dNTP 625 нМ и концентрации шпилечного олигонуклеотида 185 нМ составит 7 нуклеотидов. Рассуждая аналогичным образом, была рассчитана средняя длина синтезируемых олигонуклеотидов для всех использованных в эксперименте концентраций dNTP. Так как для полной достройки шпильки требуется 25 молекул dATP и, начиная с 8-й позиции от участка шпилечного олигонуклеотида dATP является лимитирующим трифосфатом, то при $\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}} \geq 25$ происходит полная достройка шпилечного олигонуклеотида, следовательно, длина продукта в этом случае составит 69 нт. Результаты расчетов суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Расчетные значения длин синтезируемых продуктов для разных концентраций dNTP в реакционной смеси.

Концентрация dNTP, мкМ	$\frac{c_{dNTP}}{c_{hairpin}}$	Средняя длина синтезируемого продукта, нт
0	0	0
0.625	3	7
1.25	7	16
2.5	14	30
5; 7.8; 10; 15.6; 20; 31.2; 62.5; 125; 250; 500; 1000; 2000	>27	69

Стоит отметить, что проведенный расчет дает весьма приблизительные оценки длин синтезируемых продуктов. Реальные же значения могут отличаться от расчетных вследствие неточностей, связанных, например, с определением концентраций dNTP и шпилечного олигонуклеотида. Таким образом, согласно данным, приведенным в таблице 1, в условиях данного эксперимента в соответствующих реакционных смесях образуется пять типов гипотетических структур, которые являются производными структуры, изображенной на рис. 7, и соответствуют разным длинам синтезируемых продуктов (рис. 8 и таблица 1)

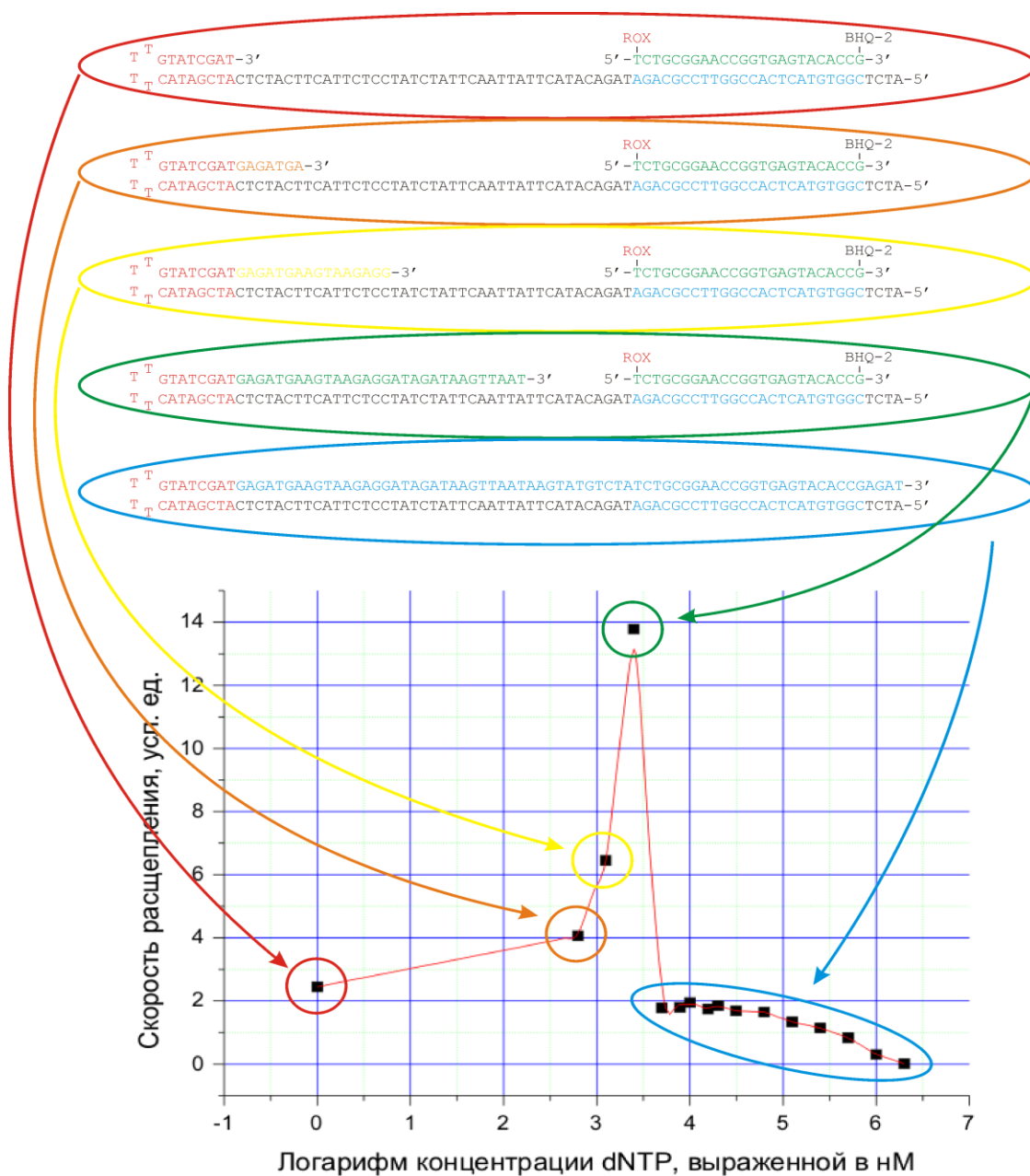
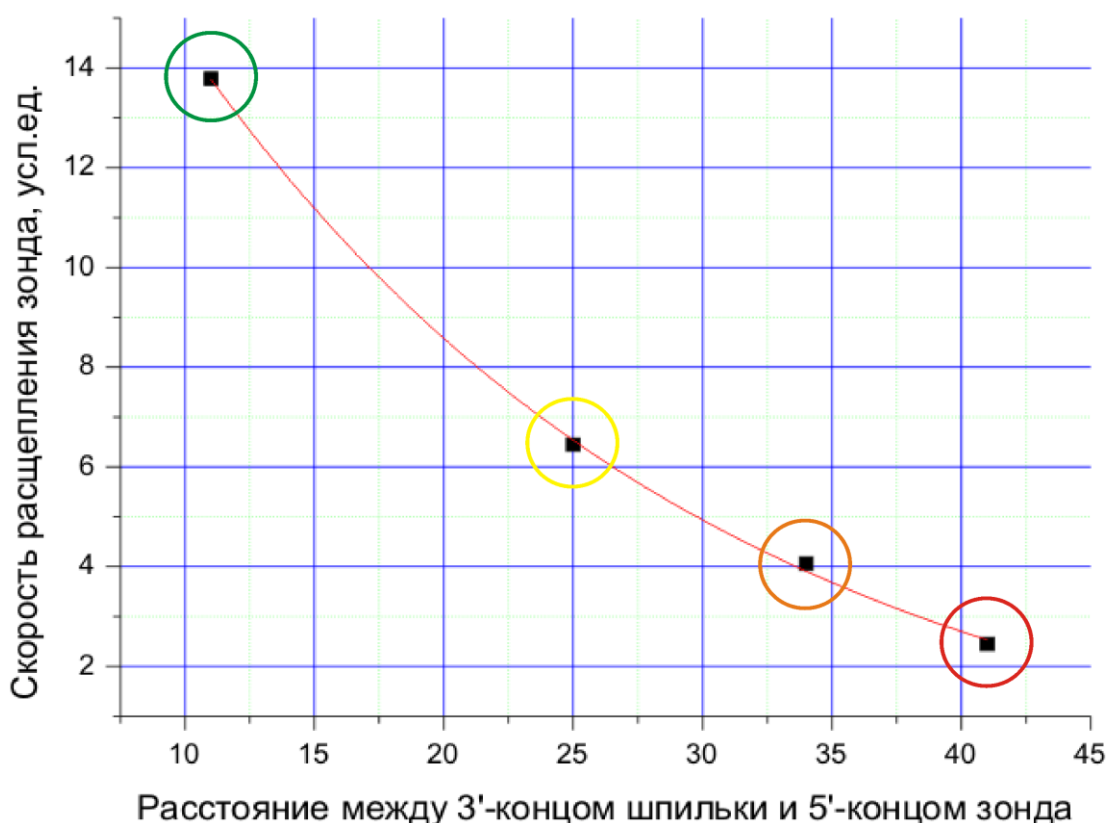


Рис. 8. Структуры субстратов, образующихся в эксперименте по исследованию зависимости скорости расщепления зонда от концентрации dNTP. Зонд выделен зеленым цветом; флуорофор ROX (выделен красным) и гаситель BHQ-2 расположены в 1-й и 24-й с 5'-конца позиций зонда соответственно. В пределах шпилечного олигонуклеотида: а) в 5'-концевой области синим цветом выделена часть, комплементарная зонду; б) в 3'-концевой области оранжевым, желтым, зеленым и синим цветами выделены олигонуклеотидные последовательности, синтезированные в экспериментальных точках, для которых значения $\frac{C_{dNTP}}{C_{hairpin}}$ составляют 3, 7, 14 и более 27 (см. таблицу 1) соответственно; в) красным цветом выделена шпилечная часть. График под структурами субстратов идентичен графику, изображенному на рис. 6. Каждой экспериментальной точке на графике с помощью цветового выделения и стрелок поставлена в соответствие одна из приведенных на рисунке структур.

Из рис. 8 видно, что: 1) расстояние между 3'-концом шпилечного олигонуклеотида и 5'-концом зонда для верхних четырех структур составляет 41, 34, 25 и 11 нуклеотидов соответственно; 2) с уменьшением расстояния между 3'-концом шпилечного олигонуклеотида и 5'-концом зонда скорость расщепления последнего растет и достигает максимума для структуры, заключенной в эллипс зеленого цвета (график этой зависимости изображен на рис.



9).

Рис. 9. График зависимости скорости расщепления зонда от расстояния между 3'-концом шпильки и 5'-концом зонда. Черными квадратами обозначены экспериментальные точки, красным цветом выделена интерполяционная кривая. Цветовое выделение экспериментальных точек соответствует таковому на рис. 8.

Вероятно, существует оптимальная структура субстрата, для которой эффективность расщепления зонда Taq ДНК-полимеразой достигает максимальных значений, т.е. на практике это означает, что один и тот же зонд в ходе ПЦР может расщепляться с разной интенсивностью в зависимости от того, на каком расстоянии от зонда находится праймер. Необходимо было проверить данное предположение прямым способом и установить,

насколько универсальный характер носит рассмотренное явление, иными словами, не является ли оно свойством данной конкретной системы шпилечный олигонуклеотид-зонд. Для проверки этого предположения была сконструирована модельная система, состоящая из набора шпилечных олигонуклеотидов и зонда, причем структуры как шпилечных олигонуклеотидов, так и зонда отличны от рассмотренных ранее. Структуры образуемых субстратов, представляющих собой комплексы шпилечный олигонуклеотид-зонд, приведены на рис. 10.

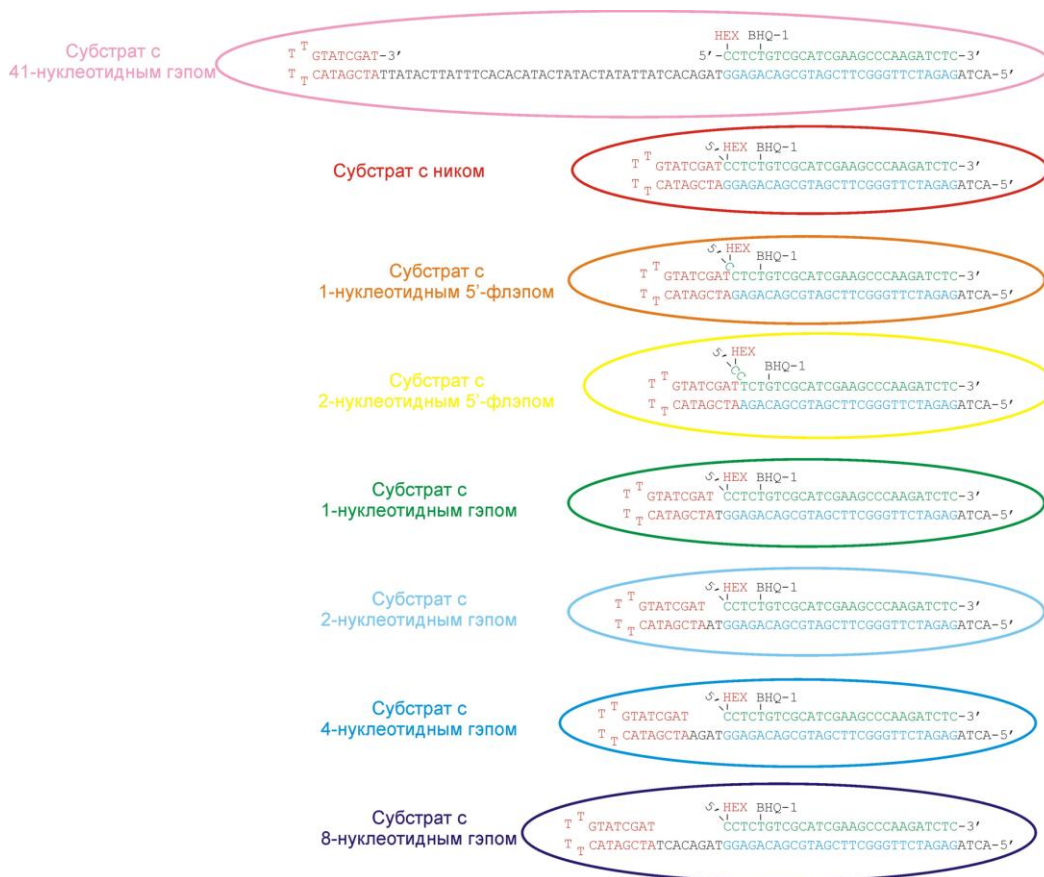


Рис. 10. Структуры субстратов для Taq ДНК-полимеразы. Внутри каждого эллипса приведена структура комплекса шпилечный олигонуклеотид-зонд. Во всех приведенных структурах зонд один и тот же и выделен зеленым цветом; флуорофор HEX (выделен красным) и гаситель BHQ-1 расположены в первой и пятой с 5'-конца позициях зонда соответственно. В пределах шпилечного олигонуклеотида красным цветом выделена шпилечная часть, синим – часть, комплементарная зонду.

На рис. 10 видно, что сконструированные комплексы шпилечный олигонуклеотид-зонд формируют три типа структур: 1) структура с ником; 2) 5 структур с гэпом (длина гэпов составляет 1, 2, 4, 8 и 41 нт); 3) 2 структуры с флэпом (длина флэпов составляет 1 и 2 нт). Именно структуры с флэпом, согласно (Holland P. M., 1991; Lyamichev V., 1993), являются предпочтительными для нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы. Наиболее длинным

шпилечным олигонуклеотидом среди рассматриваемых является олигонуклеотид в составе субстрата с 41-нуклеотидным гэпом, остальные 7 шпилечных олигонуклеотидов являются его делеционными вариантами.

Была исследована зависимость скорости расщепления зонда от расстояния между 3'-концом шпилечного олигонуклеотида и 5'-концом зонда. Схема используемого в данном эксперименте метода изображена на рис. 11.

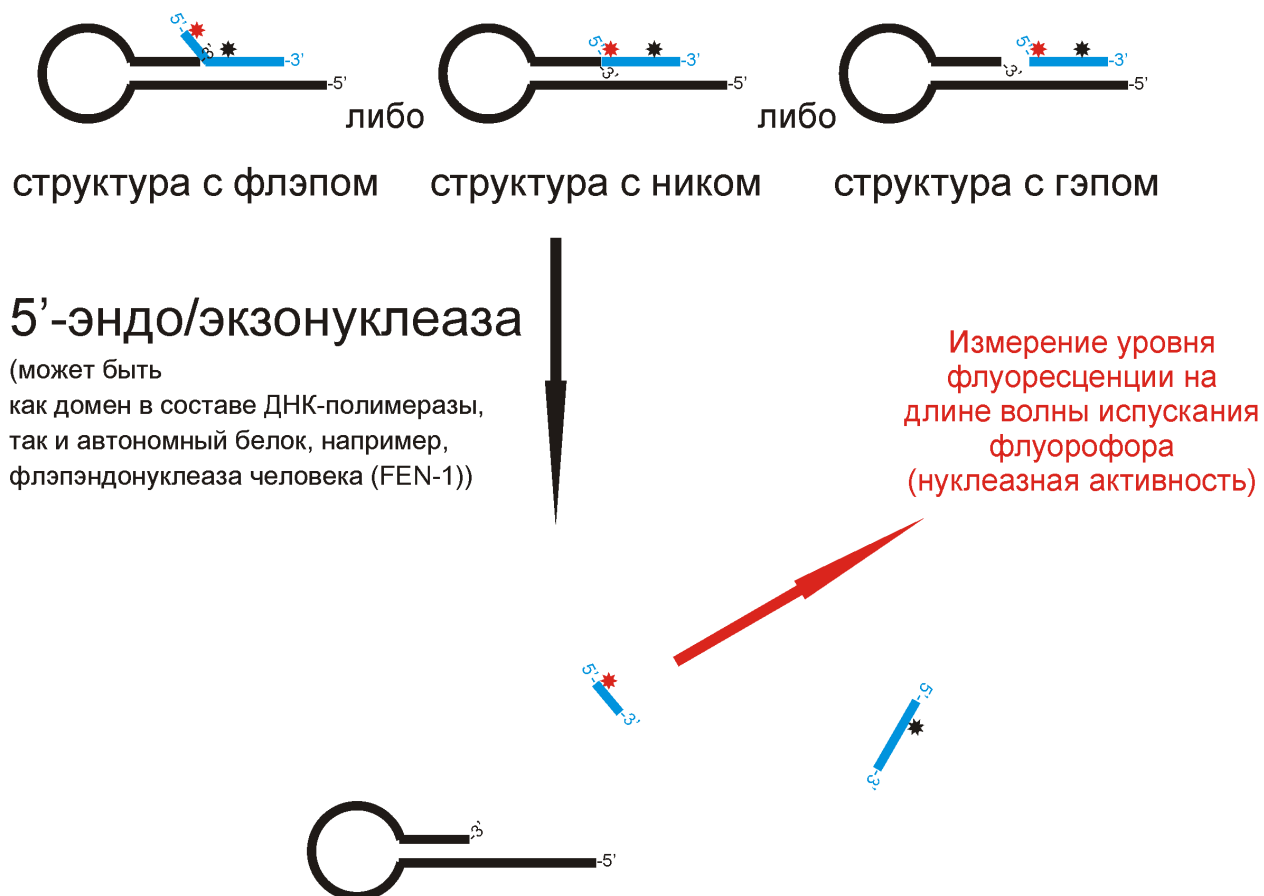


Рис. 11. Схема метода определения нуклеазной активности 5'-эндо/эксонуклеаз. Красной и черной звездочками обозначены флуоресцентная метка и гаситель соответственно, синим цветом выделен зонд.

Реакционная смесь объемом 50 мкл, содержащая 67 мМ Tris-HCl (pH 8.9), 1.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 мМ MgCl_2 , 0.01% Tween-20, 100 нМ меченого флуорофором олигонуклеотидного зонда и 100 нМ соответствующего шпилечного олигонуклеотида, прогревалась до 95°C и медленно охлаждалась до комнатной температуры, после чего помещалась в амплификатор и инкубировалась в течение 10 мин при температуре проведения реакции для стабилизации уровня фоновой флуоресценции. Реакция запускалась добавлением в реакционную смесь 1 мкл ДНК-полимеразы Taq до конечной концентрации 4 нМ. Температура проведения реакции составляла 60°C. Детекцию флуоресценции в реальном времени в канале HEX проводили с

10-секундным интервалом с использованием амплификатора с оптическим модулем CFX 96 («BioRad», США). График исследуемой зависимости скорости от расстояния, построенный в результате анализа экспериментальных данных, приведен на рис. 12.

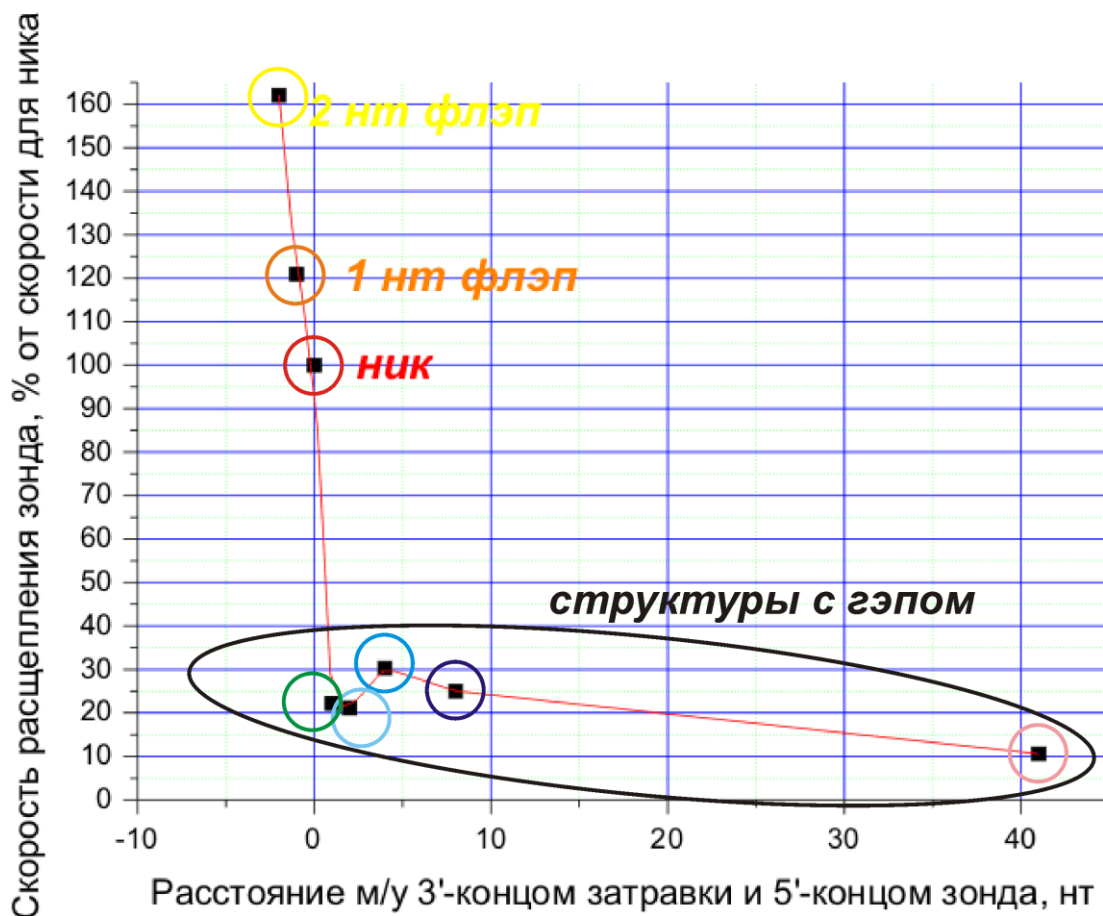


Рис. 12. График зависимости скорости расщепления зонда от расстояния между 3'-концом шпилечного олигонуклеотида и 5'-концом зонда. Черными квадратами обозначены экспериментальные точки, красным цветом выделена интерполяционная кривая. Цветовое выделение экспериментальных точек соответствует таковому на рис. 10.

Из графика, изображенного на рис. 12, можно заключить, что: 1) скорость расщепления зонда в составе структуры с одно- и двухнуклеотидным флэпами выше скорости расщепления зонда в составе структуры с ником в 1.2 и 1.6 раз соответственно; 2) скорость расщепления зонда в составе структур с гэпами ниже скорости расщепления зонда в составе структуры с ником в 3 – 10 раз в зависимости от длины гэпа; 3) скорость расщепления зонда в составе структуры с двухнуклеотидным флэпом выше скорости расщепления зонда в составе структуры с 41-нуклеотидным гэпом в 16 раз; 4) структуры с флэпом и с ником являются более

предпочтительными для расщепления 5'-эндо/эксонуклеазой ДНК-полимеразы Taq, чем структуры с гэпом.

Результат данного эксперимента хорошо согласуется с результатом рассмотренного ранее эксперимента по исследованию зависимости скорости нуклеазного расщепления зонда от концентрации dNTP в реакционной смеси. Оба эксперимента указывают на то, что существует оптимальная структура субстрата, для которой эффективность расщепления зонда Taq ДНК-полимеразой достигает максимальных значений: такими структурами являются флэп-структуры и структуры с никами.

5. Создание выборок нуклеотидных последовательностей мРНК генов эукариот. Проведение первичного компьютерного анализа контекстных характеристик, связанных с эффективностью инициации трансляции.

В рамках проекта планируется провести исследования молекулярных механизмов стрессового ответа, действующих не только на уровне контроля транскрипции, но и на уровне трансляции мРНК. Известно, что в условиях различных видов стресса происходит приостановка трансляции основного пула клеточных мРНК и экспрессируются преимущественно стресс-специфические гены. Сигналы, определяющие такую селективную трансляцию, в настоящее время малоизучены. Планируется провести исследование, направленное на выявление характеристик эукариотических мРНК, связанных с селективной трансляцией в стрессовых условиях. Знание таких характеристик позволит предсказывать мРНК, трансляция которых связана с адаптацией к неблагоприятным условиям, что – в свою очередь – будет способствовать выявлению соответствующих генов.

Исследование такого рода может быть проведено с помощью методов компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей мРНК и сопоставления выявленных закономерностей контекстной и структурной организации мРНК с существующими в настоящее время представлениями о молекулярных механизмах инициации трансляции. В связи с этим в качестве методики проведения этой части НИР нами был выбран компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК животных и других эукариот.

В рамках данного этапа было запланировано создание репрезентативных выборок нуклеотидных последовательностей мРНК животных и других эукариот (для их сравнительного анализа), а также первичный анализ их контекстных характеристик. Для этого из компьютерной базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) были выделены выборки кДНК генов ряда эукариотических организмов. С помощью программы ReadSeq (version 2.1.3; <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/readseq/java/>) были выделены выборки функциональных районов мРНК (лидерный район (5'-НТП), район аннотированного

сайта инициации). Далее выборки были очищены от мРНК генов пластид и митохондрий и неполных нуклеотидных последовательностей (содержащих символы, отличные от стандартных обозначений нуклеотидов a,g,t,c). Высокоомологичные (>95%) последовательности были исключены из выборок с помощью программы *CleanUp* (Grillo et al., 1996). Далее с помощью программы Molecular Genetic Language и набора специально написанных *ad hoc* программ был проведен первичный компьютерный анализ этих выборок и создана электронная таблица в формате Paradox for Windows, содержащая информацию о:

- (1) размере лидерного района;
- (2) числе триплетов AUG в составе 5'-НТП;
- (3) нуклеотидах в ключевых позициях контекста стартового кодона (-3 и +4);
- (4) размере белок-кодирующей части;
- (5) нуклеотидном составе в 5'-НТП;
- (6) нуклеотидном составе белок-кодирующей части;
- (7) функции соответствующего гена, взятое из поля DE соответствующей карточки GenBank.

Таким образом, полученная информация была собрана в виде электронных таблиц – баз данных, содержащих идентификатор гена из GenBank и сопутствующую информацию, в том числе о трансляционно-значимых характеристиках (наличие и число лидерных триплетов AUG, контекст аннотированного стартового кодона трансляции). Число входов в этих таблицах соответствует числу генов, мРНК которых были выделены из банка данных нуклеотидных последовательностей GenBank (таблица 2). Кроме того, сформированы выборки мРНК и функциональных районов, которые хранятся в формате Fasta, что позволяет использовать их для проведения дальнейшего компьютерного анализа.

Таблица 2. Выборки нуклеотидных последовательностей мРНК генов эукариот.

Организм	Число нуклеотидных последовательностей
<i>Homo sapiens</i>	21695
<i>Mus musculus</i>	13701
<i>Rattus norvegicus</i>	9462
<i>Drosophila melanogaster</i>	1966
<i>Xenopus laevis</i>	8807
<i>Arabidopsis thaliana</i>	16617
<i>Danio rerio</i>	11910

Формат электронных таблиц позволяет проводить статистический анализ корреляций между уже полученными контекстными характеристиками мРНК и их функциональных районов, а также теми характеристиками, которые будут вычислены на следующих этапах реализации проекта. Для этого электронные таблицы будут конвертированы в формат Statistica for Windows.

6. Изучение влияния ксенобиотической активации и инактивации D2-подобных рецепторов на метаболизм дофамина в нормальных и стрессирующих условиях.

Для того, чтобы выяснить как влияет на метаболизм дофамина в нормальных и стрессирующих условиях активация D2-подобных рецепторов или снижение их доступности для дофамина нами были использованы бромокриптин, синтетический высокоаффинный агонист D2-подобных рецепторов дрозофилы (Hearn et al., 2002) и их селективный антагонист, метаклопрамид (Evans, Green, 1990). Для оценки влияния рецепторов на метаболизм дофамина использовали уровень активности щелочной фосфатазы – фермента, определяющего содержание предшественника дофамина (тирозина).

На рисунке 13 представлены результаты оценки влияния бромокриптина (А) и метаклопрамида (Б) на активность щелочной фосфатазы у 2-суточных самок исходной линии w1118. Хорошо видно, что под действием бромокриптина активность щелочной фосфатазы существенно падает (различия с контролем достоверны при $p < 0,001$). Также очевидно, что тепловой стресс (38°C , 2 час) вызывает снижение активности щелочной фосфатазы (рис. 13А) и у контрольных особей, и у кормленных бромокриптином (различия с группами, содержащимися при 25°C достоверны при $p < 0,001$ для контрольных и кормленных бромокриптином особей). Таким образом, активация D2-подобных рецепторов не препятствует инициации ответа щелочной фосфатазы на действие стрессора.

Под действием метаклопрамида (рис. 13Б), снижающего доступность D2-подобных рецепторов, активность щелочной фосфатазы, напротив, у самок возрастает (различия с контролем достоверны при $p < 0,01$). Тепловой стресс вызывает снижение активности щелочной фосфатазы и у контрольных особей, и у кормленных метаклопрамидом ($p < 0,001$ для обеих групп). Следовательно, снижение доступности D2-подобных рецепторов также не препятствует инициации ответа щелочной фосфатазы на действие стрессора.

Для того, чтобы выяснить, изменяет ли активация или снижение доступности D2-подобных рецепторов интенсивность ответа щелочной фосфатазы на действие стрессора, нами была рассчитана ее стресс-реактивность (т.е. процент снижения активности фермента при стрессе у контрольных и кормленных бромокриптином и метаклопрамидом особей).

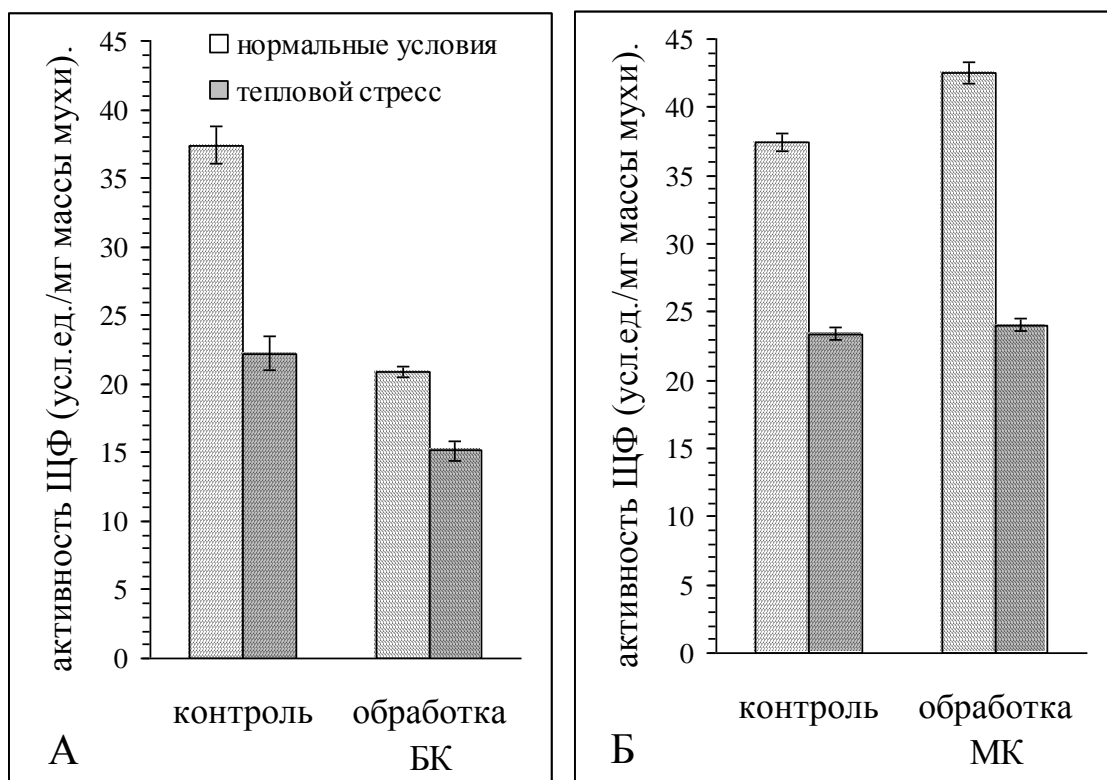


Рис. 13 Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в нормальных условиях и после теплового стресса (38°C, 2ч) у 2-суточных самок линии w1118, кормленных (А) бромокриптином (БК) и (Б) метоклопрамидом (МК).

На рис. 14 приведены результаты этой оценки. Видно, что ксенобиотическая активация или инактивация D2-подобных рецепторов изменяют интенсивность ответа щелочной фосфатазы на стресс: стресс-реактивность фермента снижена у самок, кормленных бромокриптином, и повышена у самок, кормленных метаклопрамидом (различия с контролем достоверны при $p < 0,001$ для обоих вариантов эксперимента).

7. Исследование метаболизма дофамина у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R (полученной с помощью РНК-интерференции на трансгенных линиях).

В исследовании были использованы три линии *D. melanogaster*: трансгенная линия Actin5C-Gal4/CyO, несущая повсеместно экспрессирующийся драйвер Actin5C-Gal4; гомозиготная линия UAS-ds-DD2R, несущая дцРНК-супрессор pUAS-ds-DD2R и её линия-предшественник w1118 (контроль).

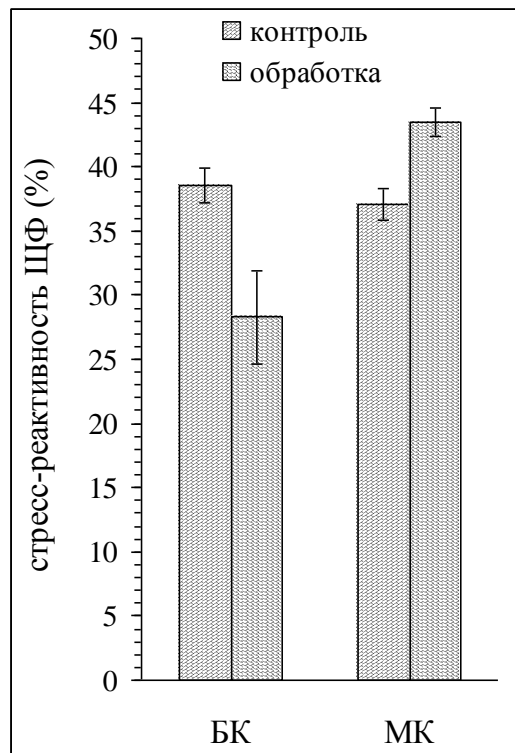


Рис. 14. Стресс-реактивность щелочной фосфатазы (ЩФ) у 2-суточных самок линии w1118, кормленных бромокриптином (БК) и метаклопрамидом (МК).

Скрещивания линий Act5C-Gal4/CyO и w1118 с линией UAS-ds-DD2R дают 2 типа потомства каждое: (1) Actin5C-GA14>UAS-ds-DD2R у особей которой под драйвером Actin5C-Gal4 снижается экспрессия гена Д2-подобного рецептора дрозофилы (*DD2R*) (Drapier et al., 2007) и CyO;UAS-ds-DD2R с неизменной экспрессией гена *DD2R*, легко различаемых по наличию или отсутствию крыльев curly; (2) Actin5C-GA14>w1118 (контроль для Actin5C-GA14>UAS-ds-DD2R) и CyO;w1118.

На рис. 15 представлены результаты измерения активности щелочной фосфатазы у гибридных самок Actin5C-GA14>UAS-ds-DD2R и Actin5C-GA14>w1118 и самок родительских линий UAS-ds-DD2R, Actin5C-Gal4/CyO и w1118. Активность фермента у самок Actin5C-GA14>UAS-ds-DD2R со сниженным уровнем DD2R рецепторов значительно выше, чем у самок Actin5C-GA14>w1118, имеющих тот же генетический фон, но неизменённый уровень DD2R рецептора, а также в сравнении с самками родительских линий (различия достоверны при $p < 0.001$ для всех групп). Родительские линии не отличаются по активности щелочной фосфатазы ни между собой, ни от гибридов Actin5C-GA14>w1118.

Обработка самок линии с генотипом Actin5C-GA14>UAS-ds-DD2R бромокриптином, активирующим рецепторы DD2R (Hearn et al., 2002), восстанавливает у них активность щелочной фосфатазы (рис. 15) до уровня, типичного для самок гибридов Actin5C-GA14>w1118 и мух родительских линий (различия между обработанными

бромокриптином и контрольными самками гибридов Actin5C-GAl4>UAS-ds-DD2R достоверны при $p < 0.001$). Этот результат свидетельствует о том, что различия в активности фермента между гибридными самками Actin5C-GAl4>w1118 и Actin5C-GAl4>UAS-ds-DD2R связаны именно со снижением у последних числа DD2R рецепторов.

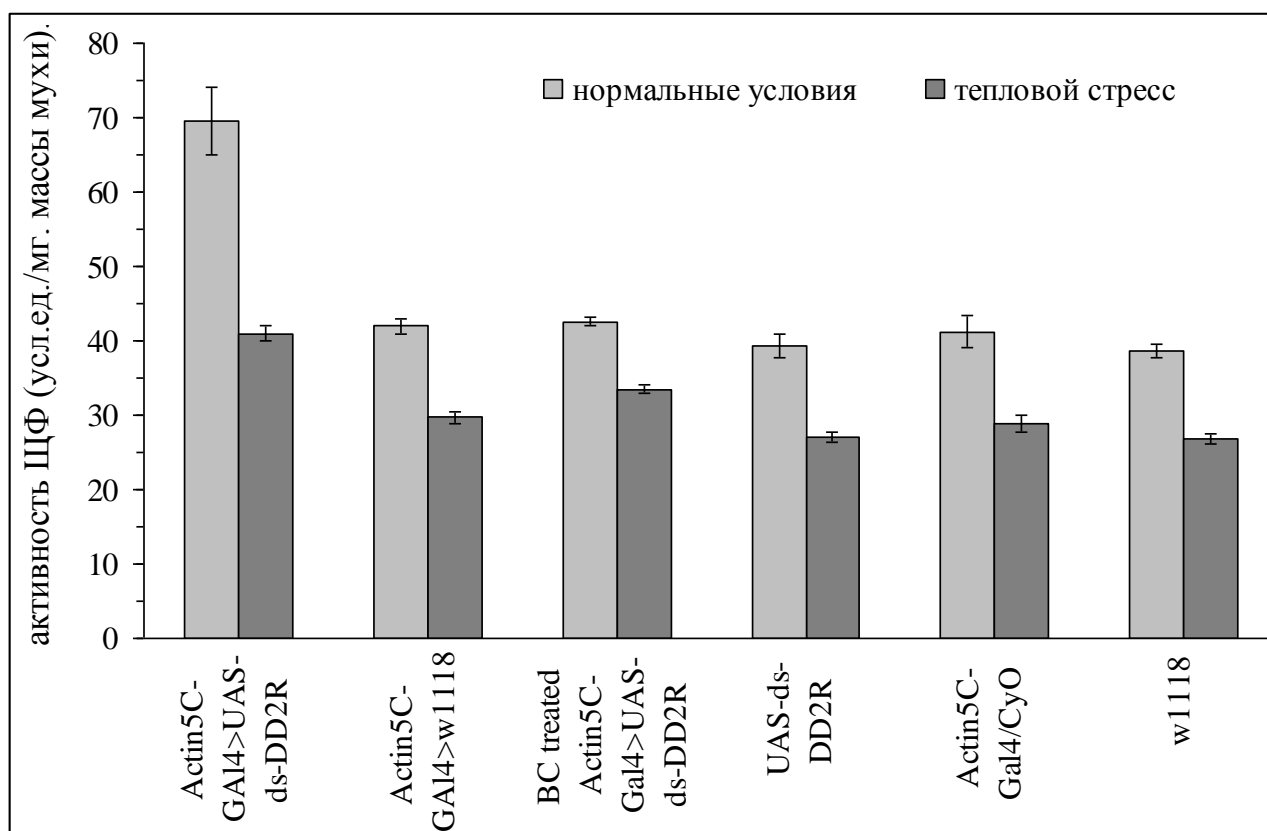


Рис. 15. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в нормальных условиях и после теплового стресса у 2-суточных самок гибридов Actin5C-GAl4>UAS-ds-DD2R и Actin5C-GAl4>w1118, самок родительских линий UAS-ds-DD2R, Actin5C-Gal4/CyO и w1118, и самок гибридов Actin5C-GAl4>UAS-ds-DD2R, кормленных бромокриптином (BC treated).

Тепловой стресс (38°C, 2 час) вызывает снижение активности щелочной фосфатазы (рис. 16) у самок всех исследованных групп (различия с особями каждой из групп, содержащимися при 25°C достоверны при $p < 0.001$). Таким образом снижение числа D2-подобных рецепторов не препятствует инициации ответа щелочной фосфатазы на действие стрессора.

Для того, чтобы оценить, влияют ли изменения в количестве этих рецепторов на интенсивность ответа щелочной фосфатазы на действие стрессора у самок дрозофилы, мы рассчитали стресс-реактивность этого фермента. Результаты приведены на рис. 16.

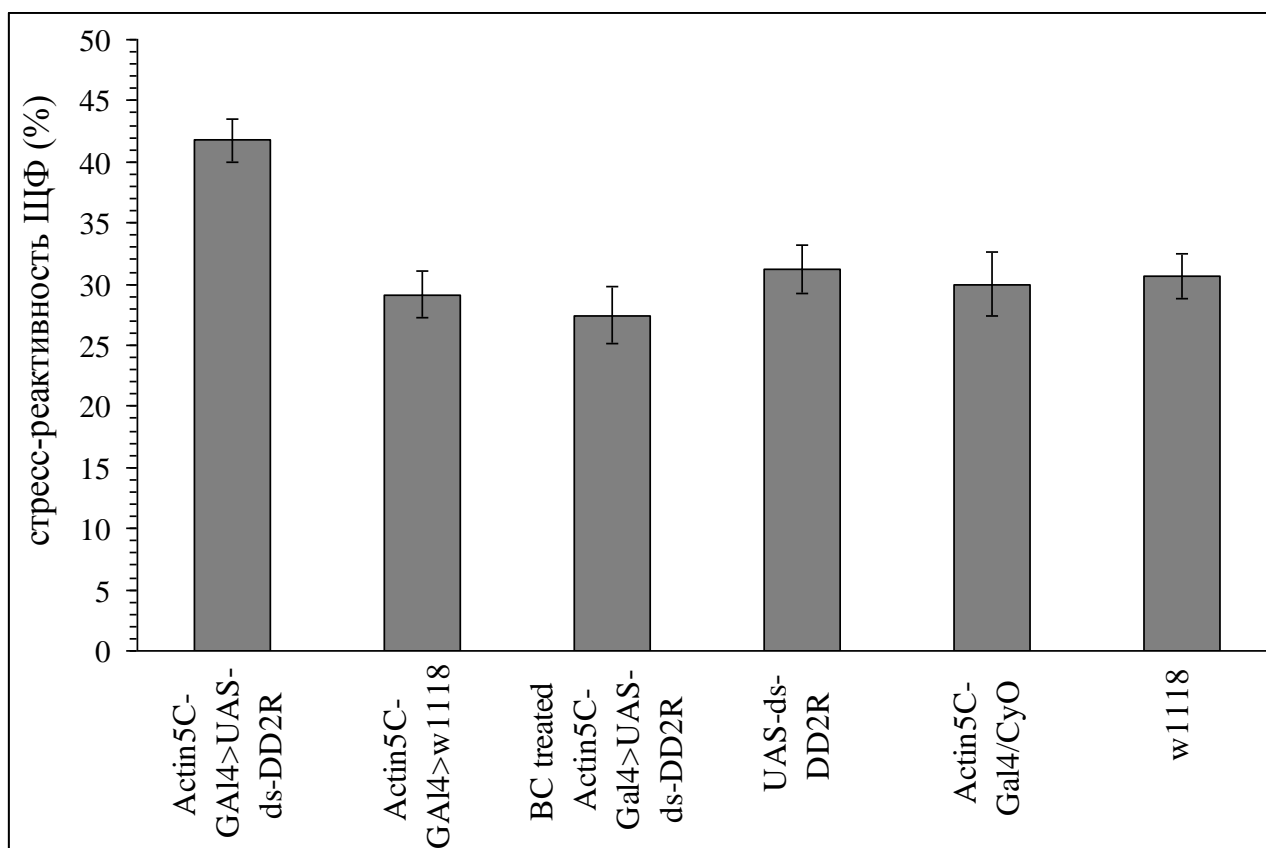


Рис. 16. Стресс-реактивность щелочной фосфатазы (ЩФ) у 2-суточных самок гибридов Actin5C-Gal4>UAS-ds-DD2R и Actin5C-Gal4>w1118, самок родительских линий UAS-ds-DD2R, Actin5C-Gal4/CyO и w1118, и самок гибридов Actin5C-Gal4>UAS-ds-DD2R, кормленных бромокриптином (BC treated).

Оказалось, что самки гибридов Actin5C-Gal4>w1118 и родительских линий не различаются по этому параметру. В то же время, у самок со сниженным уровнем рецепторов DD2R (Actin5C-Gal4>UAS-ds-DD2R) стресс-реактивность щелочной фосфатазы значительно выше, чем у самок родительских линий и самок гибридов Actin5C-Gal4>w1118 (различия достоверны при $p < 0,001$ для всех групп). Обработка самок гибридов Actin5C-Gal4>UAS-ds-DD2R бромокриптином приводит к восстановлению у них стресс-реактивности этого фермента до уровня контрольных особей (Actin5C-Gal4>w1118), что свидетельствует о существенной роли Д2-подобных рецепторов в контроле ответа щелочной фосфатазы на действие стрессора.

Таким образом, мы получили подтверждение нашей гипотезы о том, что негативная регуляция активности щелочной фосфатазы дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами: снижение числа или доступности Д2-подобных рецепторов повышает активность фермента; активация Д2-подобных рецепторов, напротив, снижает активность щелочной фосфатазы.

Кроме того, мы впервые показали, что D₂-подобные рецепторы играют существенную роль в развитии стресс-реакции насекомых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ, проведенных на 1-ом этапе реализации проекта:

1. Для проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных ДНК на системе SOLiD проведена отработка методики ультразвуковой фрагментации хроматина, обработанного формалином. Выбраны оптимальные параметры работы установки Covaris. Дополнительно в рамках подготовки к проведению анализа экспериментальных данных выполнена работа по созданию новых эффективных компьютерных методов распознавания сайтов связывания FOX-белков. Проведён модельный анализ данных Chip-Seq, находящихся в открытом доступе. Показано, что применение данного метода существенно улучшает качество распознавания сайтов связывания транскрипционных факторов FOXA при анализе полногеномных данных.

2. Для исследования паттернов экспрессии генов печени крысы в норме и при воздействии онкогенных ксенобиотиков из образцов печени крыс параллельно выделены препараты РНК и белковые экстракты ядер. Проведена оценка уровня ДНК-связывающей активности FoxA в этих экстрактах, по этому показателю отселектированы препараты РНК для последующего биочипового анализа, препараты РНК переданы в ОАО «Хеликон-аналитика» для выполнения гибридизаций чипах RatRef-12 BeadChip (Illumina).

3. С использованием разработанного ранее метода определения полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-полимераз и его модифицированного варианта, позволяющего измерять активность 5'-эндо/эксонуклеаз, был детально исследован механизм действия нуклеазной активности ДНК-полимеразы Taq. Установлено, что эффективность расщепления зонда за счет нуклеазной активности ДНК-полимеразы Taq достигает максимальных значений в том случае, когда зонд входит в состав структуры с флэпом либо структуры с ником, но не структуры с гэпом. Полученные результаты позволят осуществлять более эффективный дизайн систем амплификации матрицы и детекции целевого продукта в технологии ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентно меченых гидролизуемых зондов.

4. Созданы репрезентативные выборки нуклеотидных последовательностей мРНК генов эукариот. Выделены выборки различных функциональных районов мРНК (лидерный район, сигнал инициации трансляции, белок-кодирующая часть). Проведен первичный компьютерный анализ контекстных характеристик, связанных с эффективностью инициации трансляции.

5. Изучено влияния ксенобиотической активации и инактивации D2-подобных рецепторов на метаболизм дофамина в нормальных и стрессирующих условиях. Показано, что

ксенобиотическая активация или инактивация D₂-подобных рецепторов изменяют интенсивность ответа щелочной фосфатазы на стресс: стресс-реактивность фермента снижена у самок, кормленных бромокриптином (агонистом D₂-подобных рецепторов дофамина), и повышена у самок, кормленных метаклопрамидом (антагонистом D₂-подобных рецепторов дофамина). Щелочная фосфатаза регулирует содержание предшественника дофамина – тирозина. Таким образом, показано, что изменение функциональной активности D₂-подобных рецепторов влияет на метаболизм дофамина.

6. Исследован метаболизм дофамина у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R (полученной с помощью РНК-интерференции на трансгенных линиях). Показано, что негативная регуляция активности щелочной фосфатазы дофамином опосредуется D₂-подобными рецепторами: снижение числа D₂-подобных рецепторов повышает активность фермента. На основе данных, представленных в выводе 5 и 6 можно заключить, что нами впервые показано, что D₂-подобные рецепторы дофамина играют существенную роль в развитии стресс-реакции насекомых.

Таким образом, все задачи, поставленные на данном этапе решены полностью, кроме того, удалось дополнительно решить несколько проблем, актуальных для общего развития проекта. По результатам работы было подготовлено пять статей в ведущие российские и зарубежные журналы и три из них были приняты в печать (Доклады РАН, J. Comp. Physiol. B, Gene).

В исследованиях активное участие принимали молодые ученые, в том числе аспиранты и студенты старших курсов.

Полученные результаты уже используются в учебном процессе (молекулярной биологии, компьютерной геномике; спецкурсы «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Брагин А.Г., Глушков С.А., Иванов М.К., Краснов А.А., Дымшиц Г.М. Определение ДНК-полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-зависимых полимераз с использованием флуоресцентной детекции в режиме реального времени. Биохимия. 2008. 73. 1007-1017.
2. Каледин В.И., Захарова Н.П. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных. (Груntenко Е.В. ред.). Изд. ИЦиГ СО РАН, 1984, Новосибирск, с. 146–185.
3. Кочетов А.В. Альтернативные сайты инициации трансляции и их вклад в протеом эукариотических клеток. Молекулярная биология. 2006. 40. 788-795.
4. Cully M., Downward J. Translational responses to growth factors and stress. Biochem. Soc. Transact. 2009. 37. 284-288.
5. Draper I., Kurshan P.T., McBride E., Jackson F.R., Kopin A.S. Activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. Dev. Neurobiol. 2007. 67. 378-393.
6. Evans A.M., Green K.L. Characterization of the dopamine receptor mediating the hyperpolarization of cockroach salivary gland acinar cells in vitro. Brit. J. Pharmacol. 1990. 101. 103-108.
7. Grillo G., Attimonelli M., Liuni S., Pesole G. CLEANUP: a fast computer program for removing redundancies from nucleotide sequence databases. Comp. Appl. Biosci. 1996. 12. 1-8.
8. Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Karpova E.K., Glazko G.V., Monastirioti M., Rauschenbach I.Yu. The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to heat stress. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2004. 55. 55-67.
9. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Interplay of juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. J Insect Physiol. 2008. 54. 902-908.
10. Jothi R., Cuddapah S., Barski A., Cui K., Zhao K. Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. Nucleic Acids Res. 2008. 36. 5221-5231.
11. Hearn M., Ren Y., McBride E., Reveillaud I., Beinborn M., Kopin A.A. *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. 99. 14554–14559.

12. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991. 88. 7276-7280.
13. Kochetov A.V., Palyanov A., Titov I.I., Grigorovich D., Sarai A., Kolchanov N.A. AUG_hairpin: prediction of a downstream secondary structure influencing the recognition of a translation start site. *BMC Bioinformatics.* 2007. 8. 318.
14. Kochetov A.V. Alternative translation and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *BioEssays.* 2008. 30. 683-691.
15. Kochetov A.V., Sarai A., Rogozin I.B., Shumny V.K., Kolchanov N.A. The role of alternative translation start sites in generation of human protein diversity. *Mol. Genet. Genomics.* 2005. 273. 491-496.
16. Kochetov A.V. AUG codons at the beginning of protein coding sequences are frequent in eukaryotic mRNAs with a suboptimal start codon context. *Bioinformatics.* 2005. 21. 837-840.
17. Kornberg A. *DNA Replication* (Second ed.). New York 1992.
18. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 2005. 361. 13-37.
19. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Chang S.Y., Landre P.A., Abramson R.D., Gelfand D.H. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods App.* 1993. 2. 275-287.
20. Lee Y.Y., Cevallos R.C., Jan E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2009. 284. 6661-6673.
21. Longley M.J., Bennett S.E., Mosbaugh D.W. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18, 7317-7322.
22. Lyamichev V., Brow M.A., Dahlberg J.E. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science.* 1993. 260. 778-783.
23. Merkulova T.I., Kropachev K.Y., Timofeeva O.A., Vasiliev G.V., Levashova Z.B., Il'nitskaya S.I., Kobzev V.F., Pakharukova M.Y., Bryzgalov L.O., Kaledin V.I. Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver. *Mol. Carcinogen.* 2005. 44. 223-232.
24. McCaskill J.S. The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers.* 1990. 29. 1105-1119.

25. Motallebipour M., Ameer A., Reddy Bysani M.S., Patra K., Wallerman O., Mangion J., Barker M.A., McKernan K.J., Komorowski J., Wadelius C. Differential binding and co-binding pattern of FOXA1 and FOXA3 and their relation to H3K4me3 in HepG2 cells revealed by ChIP-Seq. *Genome Biol.* 2009. 10. 129.
26. Rogozin I.B., Kochetov A.V., Kondrashov F.A., Koonin E.V., Milanezi L. Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a "weak" context of the start codon/ *Bioinformatics.* 2001. 17. 890-900.
27. Sukhanova M.Jh., Grenback L.G., Gruntenko N.E., Khlebodarova T.M., Rauschenbach I.Yu. Alkaline phosphatase in *Drosophila* under heat stress. *J. Insect Physiol.* 1996. 42. 161-165.
28. Watatani Y., Ichikawa K., Nakanishi N., Fujimoto M., Takeda H., Kimura N., Hirose H., Takahashi S., Takahashi Y. Stress-induced translation of ATF5 mRNA is regulated by the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 2008. 283. 2543-2553.
29. Wederell E.D., Bilenky M., Cullum R., Thiessen N., Dagpinar M., Delaney A., Varhol R., Zhao Y., Zeng T., Bernier B., Ingham M., Hirst M., Robertson G., Marra M.A., Jones S., Hoodless P.A. Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2008. 36. 4549-4564.
30. Vallone D., Picetti R., Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000. 24. 125-132.
31. Valouev A., Johnson D.S., Sundquist A., Medina C., Anton E., Batzoglou S., Myers R.M., Sidow A. Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on ChIP-Seq data. *Nat. Methods.* 2008. 5. 829-834.
32. Ventoso I., Sanz M.A., Molina S., Berlanga J.J., Carrasco L., Esteban M. Translation resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* 2006. 20. 87-100.