

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
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” ноября 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 от 5 апреля 2010 г., шифр заявки
«2010-1.1-142-043-002»)
(промежуточный, этап № 2)

Наименование этапа: «Анализ транскриптома лабораторных животных при воздействии ксенобиотиков»

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 1, 2)
зав. лаб. генетики стресса, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Раушенбах И. Ю. (разделы 5, 6)
зав. лаб. генной инженерии, к.б.н., доц. д.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Кочетов А. В. (раздел 4)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Грунтенко Н.Е. (раздел 5, 6)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Васильев Г.В. (разделы 1, 2)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Левицкий В.Г. (раздел 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 5)
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 3)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Глушков С.А. (раздел 3)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Сангаев С.С. (раздел 4)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Волкова О.А. (раздел 4)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Брызгалов Л.О. (раздел 2)

<i>м.н.с.</i>	_____	<i>Брагин А. Г.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Герасимова С.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<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 4)
<i>студент</i>	_____	<i>Горелова В.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Савельева А.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>студент</i>	_____	<i>Аркова О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>студент</i>	_____	<i>Сайк О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>Студент</i>	_____	<i>Медведев К.Е.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>Студент</i>	_____	<i>Емцева М.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 6)
<i>Нормоконтролер</i>	_____	<i>Амайзер Н.Н.</i>
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 69 с., 32 рис., 9 формул, 3 табл., 48 источников.

СИГНАЛЫ ЭКСПРЕССИИ, СТРЕСС, ТРАНСЛЯЦИЯ, КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР, МИКРОЧИПОВЫЙ АНАЛИЗ, ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ ХРОМАТИНА, SOLiD, МЕТОД CHIP-SEQ, FOXA, ЮВЕНИЛЬНЫЙ ГОРМОН, 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. За отчетный период для проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных ДНК на системе SOLiD (ChIP-Seq) была проведена иммунопреципитация хроматина семенников самцов крыс 10 дневного возраста с антителами против транскрипционного фактора SF1. С использованием биочипов RatRef-12 BeadChip (Illumina), содержащих 22523 уникальные олигонуклеотидные пробы, проведен анализ изменений транскриптома печени крысы при введении животным двух аминоазосоединений: гепатоканцерогенного для крыс 3'-Me-ДАБ и неканцерогенного для них ОАТ. Выявлено 1052 и 442 гена, уровень экспрессии которых в печени изменялся более чем в 2 раза ($P\text{-value} \leq 0,01$) в ответ на введение 3'-Me-ДАБ и ОАТ, соответственно. При этом экспрессия 408 генов изменялась преимущественно в ответ на канцерогенный 3'-Me-ДАБ, но не на ОАТ, 74 гена демонстрировали избирательную реакцию на ОАТ, 232 гена реагировали сходным образом на оба аминоазокрасителя. С использованием базы Gene Ontology показано, что около 20% генов, избирательно реагирующих на гепатоканцерогенный 3'-Me-ДАБ, представлено генами, связанными с клеточным циклом и апоптозом, в то время как в группе генов с одинаковой реакцией на оба аминоазокрасителя такие гены отсутствуют. С помощью компьютерного метода SITECON показано обогащение промоторных районов генов, активируемых под действием обоих соединений, потенциальными сайтами связывания печень-специфичных транскрипционных факторов FoxA.

Для проведения работ на генетической модели – линии крыс с синдромом наследственной артериальной гипертензии (НИСАГ) была проведена отработка методов высокочувствительного анализа содержания индивидуальных транскриптов. С целью оптимизации количественной ПЦР в реальном времени разработан метод характеристики флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов, использование которого позволяет

проводить оценку степени мечения олигонуклеотидов флуорофорами и гасителями флуоресценции. Это позволило увеличить чувствительность и воспроизводимость количественной ПЦР в реальном времени, за счёт использования охарактеризованных препаратов флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов и ДНК- и РНК-зависимых ДНК-полимераз, оптимизации состава реакционной смеси и «горячего старта».

В рамках направления работы, связанного с выявлением сигналов, контролирующих экспрессию генов на уровне трансляции мРНК, был проведен компьютерный анализ структурно-функциональной организации эукариотических матриц. Впервые исследована структурная характеристика мРНК –размер поверхности молекулы, доступной для взаимодействия (accessible surface area, ASA), отражающая способность участков молекулы к взаимодействию с растворителем (молекулами воды), а также другими макромолекулами. Обнаружено, что в молекуле РНК параметр ASA контекстно-зависим, то есть разные тринуклеотиды характеризуются различными значениями ASA. Оказалось, что стартовые кодоны трансляции AUG (типичный для эукариот) и GUG (распространенный у прокариот), а также терминатор трансляции UGA характеризуются наиболее высокими значениями этого параметра, что могло быть одним из факторов выбора именно этих триплетов в качестве трансляционных сигналов на ранних этапах эволюции. Впервые показано, что потенциальные альтернативные стартовые кодоны характеризуются эволюционной консервативностью, что свидетельствует об их функциональной значимости.

В рамках проекта проводится исследование молекулярно-генетических механизмов стрессоустойчивости на модели *Drosophila* (у насекомых ответ на стрессовые факторы сопровождается изменением в балансе ряда гормонов и биогенных аминов, что может рассматриваться в качестве интересной модели эволюционной консервативности механизмов стрессового ответа). За отчетный период исследована возможность оценки уровня синтеза ювенильного гормона с использованием в качестве индикаторов уровня его деградации, а также уровня плодовитости мух. Подтверждена гипотеза, выдвинутая нами ранее, согласно которой синтез и деградация ювенильного гормона у насекомых находятся под общим контролем и уровень деградации гормона может служить индикатором уровня его синтеза. Впервые установлено, что негативная регуляция синтеза ювенильного гормона дофамином опосредуется D2-подобными рецепторами: снижение числа D2-подобных рецепторов в *corpus allata* повышает уровень синтеза ювенильного гормона. Впервые показано, что повсеместная ксенобиотическая активация D2-подобных рецепторов вызывает снижение деградации ЮГ и этот эффект имеет онтогенетический характер.

Полученные результаты используются в учебном процессе (курсы лекций «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»).

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
1. Получение иммунопреципитированного материала органов крысы для создания библиотек системы SOLiD.....	16
2. Изучение изменений транскриптома печени крысы под действием гепатоканцерогенных аминоазосоединений с помощью микрочипового анализа. Анализ полученных данных и отбор потенциальных генов-мишеней опухолевых супрессоров семейства FOX и генов, продукты которых связаны с контролем пролиферации и апоптоза.....	19
3. Оптимизация алгоритмов количественного ОТ ПЦР-анализа для проведения высокоточных измерений.....	25
4. Исследование контекстных характеристик нетранслируемых районов мРНК генов животных, связанных с эффективностью трансляции в норме и при стрессе.....	52
5. Изучение влияния ксенобиотической активации Д2-подобных рецепторов на метаболизм ювенильного гормона в нормальных и стрессирующих условиях.....	55
6. Исследование метаболизма ювенильного гормона самок дрозофилы, у которых экспрессия гена DDR2 специфически снижена в железе, производящей ювенильный гормон (с помощью тканеспецифичной РНК-интерференции на линиях трансгенных мух).....	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	64
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	66

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.

На первом этапе проекта нами были отработаны методики проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием пула выделенных ДНК на системе SOLiD, а также разработан метод предсказания сайтов связывания

транскрипционных факторов группы FOX. Кроме этого, были отработаны процедуры выделения препаратов РНК для микрочипового анализа транскриптома и препаратов ядерных белковых экстрактов.

(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 гипертонивной 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.

На первом этапе проекта нами были отработаны некоторые методы и процедуры для проведения высокочувствительного анализа уровня транскрипции индивидуальных генов: для этого были разработаны процедуры измерения 5'-эндо/экзонуклеазной активности препаратов ДНК-полимеразы Taq. Проведен анализ эффективности использования различных вариантов олигонуклеотидов со структурными модификациями.

(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.

На первом этапе проекта нами были созданы репрезентативные выборки нуклеотидных последовательностей функциональных районов мРНК эукариотических генов.

(4) Исследование роли контроля экспрессии генов дофаминовых (ДА) рецепторов в поддержании гормонального статуса в нормальных и стрессирующих условиях. Установлено, что Д2-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 высоко-консервативны 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.

На первом этапе проекта нами было показано, что ксенобиотическая активация или инактивация Д2-подобных рецепторов изменяют интенсивность ответа щелочной фосфатазы на стресс: стресс-реактивность фермента снижена у самок, кормленных бромокриптином (агонистом Д2-подобных рецепторов дофамина), и повышена у самок, кормленных метаклопрамидом (антагонистом Д2-подобных рецепторов дофамина). Щелочная фосфатаза регулирует содержание предшественника дофамина – тирозина. Таким образом, показано, что изменение функциональной активности Д2-подобных рецепторов влияет на метаболизм дофамина. Также было показано, что негативная регуляция активности щелочной фосфатазы дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами: снижение числа Д2-подобных рецепторов повышает активность фермента. На основе данных, представленных в выводе 5 и 6 можно заключить, что нами впервые показано, что Д2-подобные рецепторы дофамина играют существенную роль в развитии стресс-реакции насекомых.

Решение проблем, которым посвящен настоящий проект, 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.

Основная цель 2-го этапа проекта — анализ транскриптома лабораторных животных при воздействии ксенобиотиков. Задачи этапа включают следующие виды работ:

1. Получение иммунопреципитированного материала органов крысы для создания библиотек системы SOLiD
2. Изучение изменений транскриптома печени крысы под действием гепатоканцерогенных аминоазосоединений с помощью микрочипового анализа. Анализ полученных данных и отбор потенциальных генов-мишеней опухолевых супрессоров семейства FOX и генов, продукты которых связаны с контролем пролиферации и апоптоза
3. Оптимизация алгоритмов количественного ОТ ПЦР-анализа для проведения высокоточных измерений.
4. Исследование контекстных характеристик нетранслируемых районов мРНК генов животных, связанных с эффективностью трансляции в норме и при стрессе.
5. Изучение влияния ксенобиотической активации D2-подобных рецепторов на метаболизм ювенильного гормона в нормальных и стрессирующих условиях.
6. Исследование метаболизма ювенильного гормона самок дрозофилы, у которых экспрессия гена DDR2 специфически снижена в железе, производящей ювенильный гормон (с помощью тканеспецифичной РНК-интерференции на линиях трансгенных мух).

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 второго этапа главным образом была проведена работа по анализу транскриптома лабораторных животных при воздействии ксенобиотиков..

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: на первом этапе проводится обработка образца ткани или суспензии клеток формалином, приводящая к образованию ковалентных ДНК-белковых сшивок. Далее фиксированный ядерный хроматин выделяется и подвергается ультразвуковому дроблению на фрагменты с максимумом распределения по длинам в районе 250-500 п.н. 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 генома 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 предварительной селекции исходных данных, могущих 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 конкретные районы последовательностей ДНК, что даёт

несравненно больше возможностей для теоретического анализа результатов эксперимента. 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 биоинформатический анализ полученных пиков, их достоверности, распределения и изменений в результате тех или иных регуляторных событий.

Воздействие различных чужеродных веществ – ксенобиотиков, к которым относятся и химические канцерогены, на клетки организма животных обычно приводит к активации самых разнообразных сигнальных путей, и как следствие, к изменению уровня экспрессии многих генов. Среди этих генов могут находиться гены, контролирующие процессы пролиферации и апоптоза, и изменения уровня экспрессии таких генов может играть существенную роль в образовании злокачественных опухолей. Задачей данного этапа проекта было исследование транскриптома крысы при воздействии двух близких по структуре ксенобиотиков – аминоазокрасителей 3'-метил-4-диметиламиноазобензола (3'-MeДАБ) и орто-аминоазотолуола (ОАТ), первый из которых является сильным гепатоканцерогеном для крыс, в то время как второй проявляет лишь следовую гепатоканцерогенную активность (Каледин и Захарова, 1984). Использование такой пары соединений позволит вычленить события, специфичные для опухолеиндуцирующего соединения и отобрать кандидатные гены, изменение уровня экспрессии которых может быть связано с последующим опухолеобразованием.

ПЦР в реальном времени к настоящему моменту является одним из наиболее точных и чувствительных методов количественной детекции последовательностей ДНК с известной структурой, однако для получения однозначных результатов она требует тщательной оптимизации (Freeman et al., 1999; Bustin, 2002; Bustin and Nolan, 2004), включающей в себя подбор состава реакционной смеси, в частности концентраций солей, нуклеозидтрифосфатов и дополнительных компонентов, которые могут влиять на параметры гибридизации нуклеиновых кислот (Henke et al., 1997; Bachmann et al., 1990) или стабильность используемых в реакции ферментов (Lu and Nègre, 1993; Spiessa et al., 2004), подбор последовательностей и оценку качества препаратов олигонуклеотидных праймеров и зондов, определение температурного профиля реакции и модуляцию активностей участвующих в ПЦР ферментов. Традиционно оптимизация ПЦР осуществляется постановкой серии реакций, условия которых варьируют, и оценкой влияния тех или иных факторов на отдельные параметры реакции. Сложность, связанная с использованием подобного подхода, заключается в том, что в этом случае оказывается практически невозможным устранить взаимное влияние изменяемых факторов и выделить те из них, которые напрямую действуют на эффективность

ПЦР (например, крайне затруднительной является корректная независимая оценка влияния условий реакции на процессы амплификации и детекции продуктов амплификации, так как в ПЦР в реальном времени получение аналитического сигнала возможно только при одновременном их протекании). В силу этого, в ряде случаев представляется целесообразным использование методов, позволяющих напрямую установить физические закономерности поведения отдельных компонентов системы, таких как ДНК-полимераза и флуоресцентный зонд, и учёт установленных закономерностей при оптимизации ПЦР. Активности используемых в ПЦР ферментов-полимераз и их соотношения сильно влияют на эффективность амплификации целевой последовательности (Chandler, 1998; Bustin, 2000; Bustin and Nolan, 2002; Suslov and Steindler, 2005) и детекции продукта амплификации, которая, зачастую, зависит от нуклеазной активности полимеразы. Таким образом, точная характеристика активности входящего в состав реакционной смеси фермента является необходимым условием получения достоверных результатов.

Существенным моментом оптимизации системы ПЦР в реальном времени, основанной на применении флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов, является выбор зондов, применяющихся для детекции конкретной последовательности-мишени. При сравнении флуоресцентных зондов между собой и осуществлении крупномасштабных экспериментов, требующих использования нескольких партий одного и того же олигонуклеотидного зонда, как правило, не учитываются факторы эффективности флуоресцентного мечения и эффективности очистки конечного продукта от невключившихся молекул красителя и продуктов неполного синтеза олигонуклеотидного фрагмента, оказывающие существенное влияние на ключевые параметры ПЦР в реальном времени (Yeung et al., 2004; Espy et al., 2006). Качество зонда является одним из факторов, определяющих чувствительность ПЦР в реальном времени и достоверность количественной детекции с использованием этого метода. Применение методов характеристики качества флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов и оценки ДНК-полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-полимераз значительно сокращает процесс оптимизации ПЦР в реальном времени и делает его более эффективным.

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 пурины 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 («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). В целом, в существующих представлениях об организации 5'-НТП и сигнала инициации трансляции имеются пробелы, не позволяющие оценить трансляционные свойства эукариотических мРНК и их кодирующий потенциал (Kochetov, 2008).

Одна из целей настоящего проекта заключается в исследовании кодирующего потенциала эукариотических мРНК, направленном на выявление альтернативных открытых рамок считывания, кодирующих новые белки (то есть белки, отличные от тех, которые занесены в базы данных GenBank, SwissProt и т. п.). Эта информация позволит уточнить существующие представления как о структуре сигнала инициации трансляции, так и о составе протеома эукариотических клеток и трансляционном полиморфизме белков.

Установлено, что для нормального протекания оогенеза насекомых необходим баланс гонадотропинов, ЮГ и 20-гидроксиэкдизона (20Э). Нарушение этого баланса вызывает драматические изменения в ходе оогенеза (Soller et al., 1999; Gruntenko et al., 2003). Показано, что у самок дрозофилы существует механизм стабилизации баланса гонадотропинов: при изменении уровня одного из них в результате мутации или при стрессе баланс восстанавливается за счет соответствующего изменения титра второго. Посредником во взаиморегуляции ЮГ и 20Э является дофамин (ДА) - один из основных медиаторов, участвующих в контроле приспособленности насекомых (Gruntenko and Rauschenbach, 2008).

Известно, что влияние дофамина (ДА) на метаболизм клетки опосредуется двумя семействами G-протеин-связанных 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). Д2-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*.

В отчетный период мы: (I) изучили влияние ксенобиотической активации Д2-подобных рецепторов на уровень деградации ЮГ в нормальных и стрессирующих условиях у молодых и половозрелых самок *D. melanogaster* линии *w1118*; (II) верифицировали гипотезу о том, что синтез и деградация ЮГ у насекомых находятся под общим контролем и уровень деградации гормона может служить индикатором уровня его синтеза. В качестве модели использовали гомозиготную трансгенную линию *D. melanogaster UAS-reaper::UAS-hid* с рекомбинацией *UAS-reaper* и *UAS-hid* – двух активаторов клеточной смерти и линию *Aug21-Gal4/Cyo::arm-GFP*, несущую конструкцию *Aug21-Gal4*, экспрессирующуюся только в *CA*, и балансер *Cyo::arm-GFP*. Скрещивание *Aug21-Gal4/Cyo::arm-GFP* с гомозиготами *UAS-reaper::UAS-hid* дает 2 типа потомков: *Aug21-Gal4>UAS-reaper::UAS-hid*, с абляцией части клеток *CA*, и *Cyo::arm-GFP;UAS-reaper::UAS-hid* (*reaper* и *hid* без драйвера *Aug21-Gal4>* не экспрессируются); (III) исследовали влияние снижения числа Д2-подобных рецепторов в *CA* (посредством РНК-интерференции) на уровень синтеза ЮГ, оцениваемый по уровню его деградации ЮГ и плодовитости мух. В качестве модели использовали трансгенную линию *D. melanogaster, UAS-ds-DD2R*, несущую генетическую конструкцию – антисмысловой супрессор гена Д2-подобного рецептора *D. melanogaster (DD2R)* (Draper et al., 2007) и линию *Aug21-Gal4/Cyo::arm-GFP*. При скрещивании этих линий в поколении F1 будут получаться особи, у которых супрессор гена *DDR2* активен только в клетках *CA*;

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. Получение иммунопреципитированного материала органов крысы для создания библиотек системы 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 будет использоваться фрагменты хроматина, иммунопреципитированные со специфическими антителами.

В задачу данного этапа входила наработка материала иммунопреципитированного хроматина для последующего создания библиотек, а также контроль качества данного материала, осуществлённый с помощью ПЦР с праймерами на район [-1074] гена *Oht* крысы, содержащий сайт связывания фактора SF-1. Семенники самцов крыс 10 дневного возраста были выбраны для иммунопреципитации, поскольку на данной стадии наблюдается активная экспрессия SF-1 в клетках Лейдига семенников (Val *et al.*, 2003). Животное декапитировали. Содержимое семенников гомогенизировали на льду максимально быстро в 2 мл буфера AN (60 mM NaCl; 15 mM KCl; 15 mM Трис-HCl (pH=7,5); 0,5 mM спермидин; 0,15 mM спермин; 0,5 % NP-40; 2 mM ЭДТА; 0,5 mM ЭГТА), а затем ресуспендировали в 25 мл 1% раствора формальдегида в PBS и инкубировали при постоянном перемешивании (ротатор RS-24 Biosan) в течение 15 мин при комнатной температуре. В результате такой обработки образуются ковалентные «сшивки» ДНК с белками, отстоящими от неё на расстоянии в пределах 2 Å. Реакцию останавливали добавлением глицина до конечной концентрации 0,125 M и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 мин (ротатор RS-24 Biosan). Далее пробу центрифугировали 5 мин при 700g при 2°C (центрифуга Eppendorf 5804R). Супернатант сливали, а осадок ядер ресуспендировали в 1,5 мл лизирующего буфера (1 % SDS; 10 mM ЭДТА; 50 mM Трис-HCl (pH=8,1); ингибиторы протеаз) и инкубировали в течение 20 мин на льду. Затем лизат подвергали ультразвуковой обработке на приборе Covaris в пробирках из боросиликатного стекла с использованием программы D20_I8_C300_N10, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 15000 g при 2°C (центрифуга Eppendorf 5415R). К супернатанту добавляли буфер разведения (0,01 % SDS; 1,1% TritonX-100; 1,2 mM ЭДТА; 17 mM Трис-HCl (pH=8,1); 167 mM NaCl; ингибиторы протеаз) в соотношении 1:5, соответственно. Для очистки пробы от иммуноглобулинов добавляли иммобилизованный на гранулы азлактона белок-A/G (Pierce, # 53132), из расчета 10 мкл на 1 мл образца, инкубировали в течение 1-2 часов при 4°C при постоянном перемешивании (ротатор RS-24 Biosan) и центрифугировали при 2500 g в течение 1 мин при 4°C (центрифуга Eppendorf MiniSpin). Супернатант делили на две части, одну инкубировали со специфическими

антителами против SF-1 (Upstate # 07-618) в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании (ротатор RS-24 Biosan), вторую часть (контроль) – без добавления антител. Для сбора иммунокомплексов к пробе добавляли иммобилизованный на гранулы азлактона белок-A/G, из расчета 5 мкл на 2-2,5 мкг антител и продолжали инкубировать в течение 1 часа. Гранулы с иммунокомплексами осаждали при 2500 g (центрифуга Eppendorf MiniSpin) и промывали буферами в следующем порядке:

- 1) Буфер А (0,01 % SDS; 1% TritonX-100; 2 mM ЭДТА; 20 mM Трис-НСl (pH =8,1); 150 mM NaCl) два раза;
- 2) Буфер В (0,01 % SDS; 1% TritonX-100; 2 mM ЭДТА; 20 mM Трис-НСl (pH=8,1); 500 mM NaCl) два раза;
- 3) Буфер С (250 mM LiCl; 1 % NP-40; 1% deoxycholate Na; 1 mM ЭДТА; 10 mM Трис-НСl (pH=8,0) два раза;
- 4) TE (10 mM Tris-НСl (pH=8,0); 1 mM ЭДТА) три раза.

Затем иммунокомплексы дважды элюировали свежеприготовленным буфером Е (1% SDS; 10 mM NaHCO₃) в течение 15 мин при интенсивном встряхивании (Eppendorf Thermomixer), элюаты объединяли. Для удаления формальдегидных "сшивок" к пробе добавляли NaCl до 0,3 М и 10 мкг RNaseA и инкубировали в течение 4-5 часов при 65°C. Затем на каждые 500 мкл образца добавляли 10 мкл 0,5 М ЭДТА, 20 мкл 1 М Трис-НСl (pH=6,5) и 2 мкл протеиназы К 20 мг/мл и выдерживали 2 часа при 45°C. После фенол-хлороформной экстракции белков ДНК осаждали равным объемом изопропанола, осадок дважды промывали 70% этиловым спиртом и растворяли в 50 мкл буфера TE. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Nanodrop-1000.

Для проверки специфичности антител в использованных условиях и качества материала иммунопреципитированного хроматина был проведен ПЦР – анализ иммунопреципитированной ДНК и контрольного препарата (преципитация без добавления антител). ПЦР проводили в реакционном объеме 20 мкл. Каждая реакция ПЦР содержала в качестве матрицы 1 мкл преципитата (~0,07 мкг ДНК), либо 1 мкл контроля без антител, буфер для ПЦР (75 mM Трис-НСl (pH=7,5); 2,5 mM MgCl₂; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.01% Tween 20), 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 0,2 пМ каждого праймера и 0,5 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы. Для проведения ПЦР использовали следующие условия: 94°C, 2 мин - 1 цикл; 94°C, 15 сек; 63°C, 30 сек; 72°C, 15 сек – 35 циклов; 72°C, 2 мин – 1 цикл. Для визуализации продуктов амплификации проводили электрофорез в 4,5% ПААГ.

С фрагментов ДНК, преципитированных при использовании антител к SF-1, амплифицировался фрагмент ожидаемой длины (Рис. 1, дорожка 3). В контрольных образцах, полученных без добавления антител, данный фрагмент не амплифицировался (дорожка 2).

Для проверки того, что видимая на электрофореграмме полоса на уровне ~89 п.н. действительно соответствует району, содержащему сайт связывания SF-1 в позиции -1074, было проведено определение нуклеотидной последовательности продукта ПЦР. Поскольку данный фрагмент имеет небольшую длину, то с целью получения качественной секвенограммы перед постановкой реакции Сэнгера 20 мкл. ПЦР-реакции было обработано реактивом ExoSap (GE Healthcare) согласно рекомендации производителя. После этого ПЦР-фрагмент был секвенирован с прямого и обратного праймеров. Сравнение полученной последовательности (контиг 89 п.н.) с последовательностью гена *Oxt* крысы из базы данных EMBL с помощью программы Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) показало их полное совпадение.

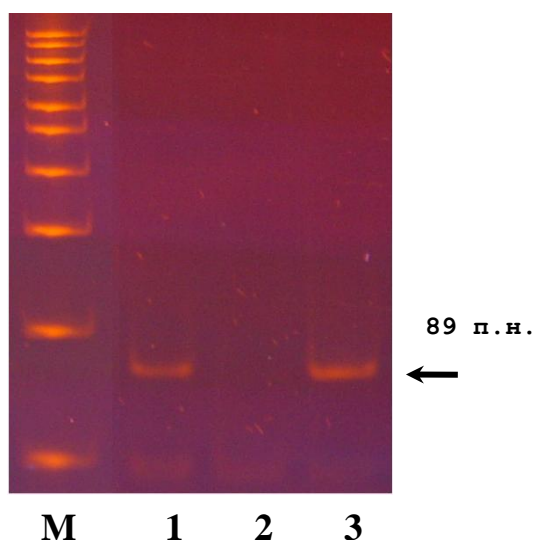


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами на район [-1074] гена *Oxt* крысы, полученных в экспериментах по иммунопреципитации хроматина с использованием антител к SF-1.

Для контроля протекания ПЦР использовали геномную ДНК после ультразвуковой обработки (дорожка 1). Для оценки неспецифической сорбции фрагментов хроматина на смолу с частью материала проводили процедуры в отсутствии антител (дорожка 2). Продукты ПЦР, полученные в результате иммунопреципитации - дорожка 3

M – маркер молекулярных весов ДНК, → – ПЦР-продукт.

2. Изучение изменений транскриптома печени крысы под действием гепатоканцерогенных аминоазосоединений с помощью микрочипового анализа. Анализ полученных данных и отбор потенциальных генов-мишеней опухолевых супрессоров семейства FOX и генов, продукты которых связаны с контролем пролиферации и апоптоза

Хотя аминоазокрасители 3'-метил-4-диметиламиноазобензол (3'-МеДАБ) и орто-аминоазотолуол (ОАТ) очень близки по химической структуре, их способность индуцировать опухоли печени у крыс сильно различается. Так, 3'-МеДАБ достаточно вводить в течение 90 дней в дозе около 6 мг в день чтобы получить опухоли практически у всех животных, тогда как при введении ОАТ в ежедневной дозе 10 мг в течение даже 300 дней опухоли удается индуцировать менее чем у четверти крыс (Marhold et al., 1969). В этой связи представляло большой интерес сравнить влияние этих двух соединений на профиль экспрессии генов печени крыс и выявить возможные сигнальные и метаболические пути, участвующие в реализации гепатоканцерогенных свойств 3'-МеДАБ.

В работе использовали 6 крыс-самцов линии «Вистар» массой 150-200 г разведения вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Каждой паре животных за 18 ч до забоя вводили внутривенно либо раствор 3'-Ме-ДАБ в дозе 25,0 мг на 100 г массы тела, либо раствор ОАТ в дозе 22,5 мг на 100 г массы тела, либо растворитель (кукурузное масло). Печени каждого животного гомогенизировали в тризоле (15 мг печени/0,5 мл тризола). Полученные препараты были переданы в ОАО «Хеликон-аналитика» для выделения суммарной РНК и выполнения 12 одноканальных гибридизаций (6 проб в 2-х технических повторях) на микроматрицах RatRef-12 BeadChip (Illumina), которые предназначены для полногеномного профилирования экспрессии генов крысы и содержат 22523 уникальных олигонуклеотидных пробы, дублированных в среднем 30-кратно. Сканирование микроматриц после гибридизации проводили на приборе Illumina BeadArray Reader. Преобразование первичных данных в средние значения интенсивности сигнала по каждой пробе (Sample Probe Profile) проводили с помощью программного пакета BeadStudio v3 (Illumina).

Обработку данных, включая \log_2 -трансформацию и нормализацию методом квантилей, проводили с помощью программного пакета R/Bioconductor:beadarray (Dunning et al., 2007). Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью программного пакета R/Bioconductor:limma (Smyth et al., 2004) с применением эмпирического Байесовского подхода и поправки Бенжамини-Хохберга. Значимым считали изменение уровня экспрессии гена в 2 и более раза при скорректированном уровне значимости $p\text{-value} \leq 0,05$. В результате нами было выявлено 1052 и 442 гена, уровень экспрессии которых в печени изменяется более

чем в 2 раза ($P\text{-value} \leq 0,01$) в ответ на введение 3'МеДАБ и ОАТ, соответственно (таблица 1, группы I и II). Сравнение этих групп показало, что экспрессия 40% генов (группа III) из группы I изменялась преимущественно в ответ на 3'МеДАБ, но не на ОАТ, и лишь 17% генов из группы II демонстрировали избирательную реакцию на ОАТ (группа IV); 232 гена реагировали сходным образом на оба азоокрасителя (группа V).

Таблица 1. Группы дифференциально экспрессирующихся генов.

группа	критерий отбора по уровню экспрессии	число генов
I	изменение более чем в 2 раза в ответ на введение 3'МеДАБ	1052(↑464, ↓588)
II	изменение более чем в 2 раза в ответ на введение ОАТ	442 (↑184, ↓258)
III	изменение в ответ на введение 3'МеДАБ в 2 и более раз сильнее, чем на ОАТ	408 (↑227, ↓181)
IV	изменение в ответ на введение ОАТ в 2 и более раз сильнее, чем на 3'МеДАБ	74 (↑57, ↓17)
V	изменение более чем в 2 раза в ответ на оба азоокрасителя при различии между ответом на 3'МеДАБ и ОАТ менее чем в 2 раза	232 (↑60, ↓172)

Примечание. Стрелки обозначают индукцию (↑) или репрессию (↓)

В выделенных группах было проведено исследование представленности генов, объединенных различными функциями, с использованием базы Gene Ontology Biological Process (GO) и Web-инструмента DAVID (Dennis et al., 2003). Наибольший интерес с точки зрения канцерогенных эффектов азоокрасителей представляет тот факт, что в группах генов, реагирующих на высоко канцерогенный для крыс 3'МеДАБ (I и III) термины «клеточная смерть» и «апоптоз» находятся на первой позиции по числу реагирующих генов, тогда как среди генов, реагирующих на слабый канцероген ОАТ (II и V) обогащения по этим терминам не обнаружено. Более того, только 3'МеДАБ, но не ОАТ, вызывает изменение (преимущественно активацию) экспрессии генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, ангиогенезом и подавлением клеточного роста. Подробный анализ этих групп генов показал, что, введение крысам 3'МеДАБ приводит, в частности, к активации экспрессии генов *Ccnd1*, *Ccng1*, *Mcm7*, *Pcna*, *Mybl2*, *Brd2*, *Jun*, *Nupr1*, *Pdgfa* и *Tnfrsf12a*, позитивно регулирующих клеточный рост и пролиферацию, а также ряда генов, блокирующих апоптоз, таких как *Mdm2*, *Mdm4* и *Klf6*. Кроме того, 3'МеДАБ вызывает репрессию генов *G0s2*, *Faf1*, *Pcsk9*, *Stk3* и *Prkra*, индуцирующих апоптоз, и *Rbl2*, обладающего антипролиферативным действием. Однако картина усложняется тем, что этот азоокраситель также вызывает избирательную индукцию

антипролиферативных генов *Gadd45a*, *Cdkn1a* и *Btg3*, а также генов *Rhob*, *Trp53inp*, *Ddit3* и *Pdcd2*, индуцирующих апоптоз.

На рис. 2 представлены результаты сравнения группы III - гены, уровень экспрессии которых достоверно изменен при обработке 3'Ме-ДАБ по сравнению с обработкой ОАТ, и группы V - гены, уровень экспрессии которых достоверно отличается от контроля при обработке любым из азокрасителей (3'Ме-ДАБ или ОАТ). Видно, что около 20% генов группы III представлено генами, связанными с клеточным циклом и апоптозом, в то время как в группе V такие гены отсутствуют (Рис. 2).

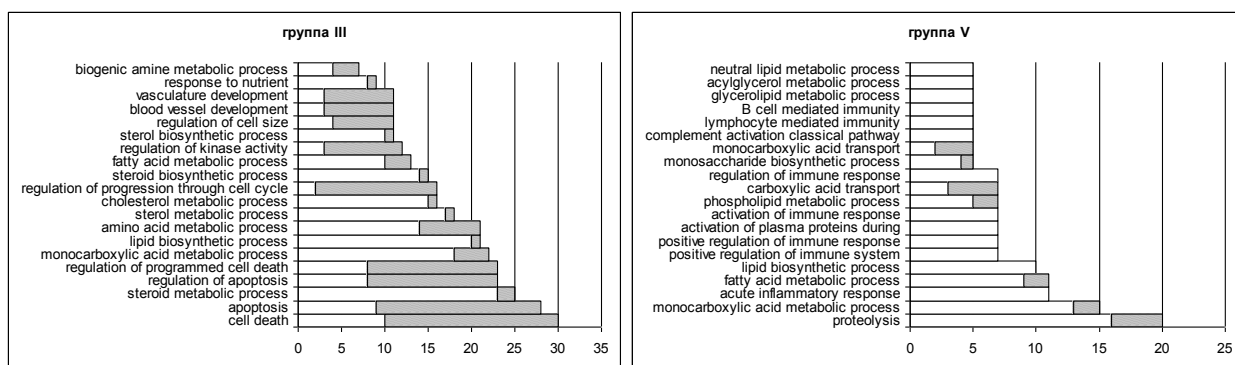


Рис. 2. Обогащение групп генов, различающихся по реакции на ОАТ и/или 3'МеДАБ, терминами Gene Ontology Biological Process (EASE \leq 0,01). На диаграммах приведено число реагирующих генов с указанием долей активируемых (косая штриховка) и репрессированных (без штриховки) генов для каждого из 20 наиболее представленных терминов в соответствующей группе.

В совокупности, результаты функционального анализа указывают на то, что высококанцерогенный для крыс 3'МеДАБ, в отличие от слабоканцерогенного для них ОАТ, приводит к количественным изменениям мРНК целого ряда генов, задействованных в процессах апоптоза и клеточного цикла, то есть наиболее вероятных ключевых игроков в злокачественном перерождении клеток печени.

Следующим этапом анализа полученных данных была попытка обнаружить связь между наличием потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов семейства FoxA в промоторных районах генов и изменением уровня их экспрессии в печени крысы под действием 3'МеДАБ и ОАТ. В предыдущих исследованиях нами была обнаружена четкая связь между гепатоканцерогенностью аминоазокрасителей и их способностью подавлять ДНК-связывающую активность этих транскрипционных факторов в печени мышей и крыс (Kropachev et al., 2001; Merkulova et al., 2005). Поэтому представляло большой интерес выяснить, как представлены потенциальные гены-мишени этих факторов, содержащие предсказанные FoxA сайты, в группах генов, изменивших уровень экспрессии в ответ на

гепатоканцерогенный для крыс 3'-МеДАБ и неканцерогенный для этих животных ОАТ. В качестве контроля были выбраны сайты связывания SF-1 (Steroidogenic factor 1), являющегося ключевым регулятором генов системы стероидогенеза. Так как этот фактор отсутствует в печени (Val et al., 2003), представляется крайне маловероятным массовое изменение уровня экспрессии генов, содержащих сайты его связывания, в печени в ответ на любое внешнее воздействие. Другой фактор – SREBP участвует в регуляции экспрессии большого числа генов липидного метаболизма и биосинтеза холестерина, и активен в клетках печени, однако пока нет данных, указывающих на возможность его участия в ответе на введение аминоазокрасителей.

Потенциальные сайты связывания FoxA, SF-1 и SREBP распознавали с помощью компьютерного метода SITECON (Oscherkov et al., 2004). На рис. 3 и 4 представлены результаты анализа связи между активацией генов под действием 3'МеДАБ и ОАТ и наличием потенциальных сайтов каждого из трех исследованных факторов транскрипции в их промоторных районах. На рисунках 3А и 4А сплошными линиями показаны значения долей генов, содержащих искомые сайты в промоторных областях, в зависимости от значения интервала изменения экспрессии гена. Пунктирными линиями показаны значения таких долей в группе генов с отсутствием изменения экспрессии при воздействии 3'МеДАБ и ОАТ. Так, из рисунка 3А видно, что доля генов, содержащих потенциальные FoxA сайты, среди генов, активирующихся под действием 3'МеДАБ, достигает значения 33.3% в интервале увеличения экспрессии от 1.123 до 1.718. В то же время доля генов с наличием потенциальных FoxA сайтов среди генов, не реагирующих на введение 3'МеДАБ, составляет 26.7%. Аналогично, из рисунка 4А видно, что доля генов с наличием потенциальных FoxA сайтов среди генов, активирующихся под действием ОАТ, достигает значения 33.8% в интервале увеличения уровня экспрессии от 1.092 до 1.562. В то же время доля генов с наличием потенциальных сайтов FoxA среди генов, не реагирующих на введение ОАТ, составляет 25.5%.

На рис. 3Б и 4Б приведены уровни значимости теста χ^2 для проверки гипотезы о том, что наличие потенциальных сайтов каждого из трех исследованных факторов транскрипции в регуляторном районе гена связано с изменением его экспрессии при введении 3'МеДАБ (рис. 2Б) или ОАТ (рис. 4Б). Видно, что имеется достоверная связь между наличием потенциальных сайтов FoxA в регуляторной области [-2000...+1] генов с активацией их экспрессии при воздействии как 3'МеДАБ (рис. 3Б), так и ОАТ (рис. 4Б). Эта связь становится значимой для групп генов с изменением экспрессии более чем на 20% при воздействии 3'МеДАБ и более на 7% при воздействии ОАТ.

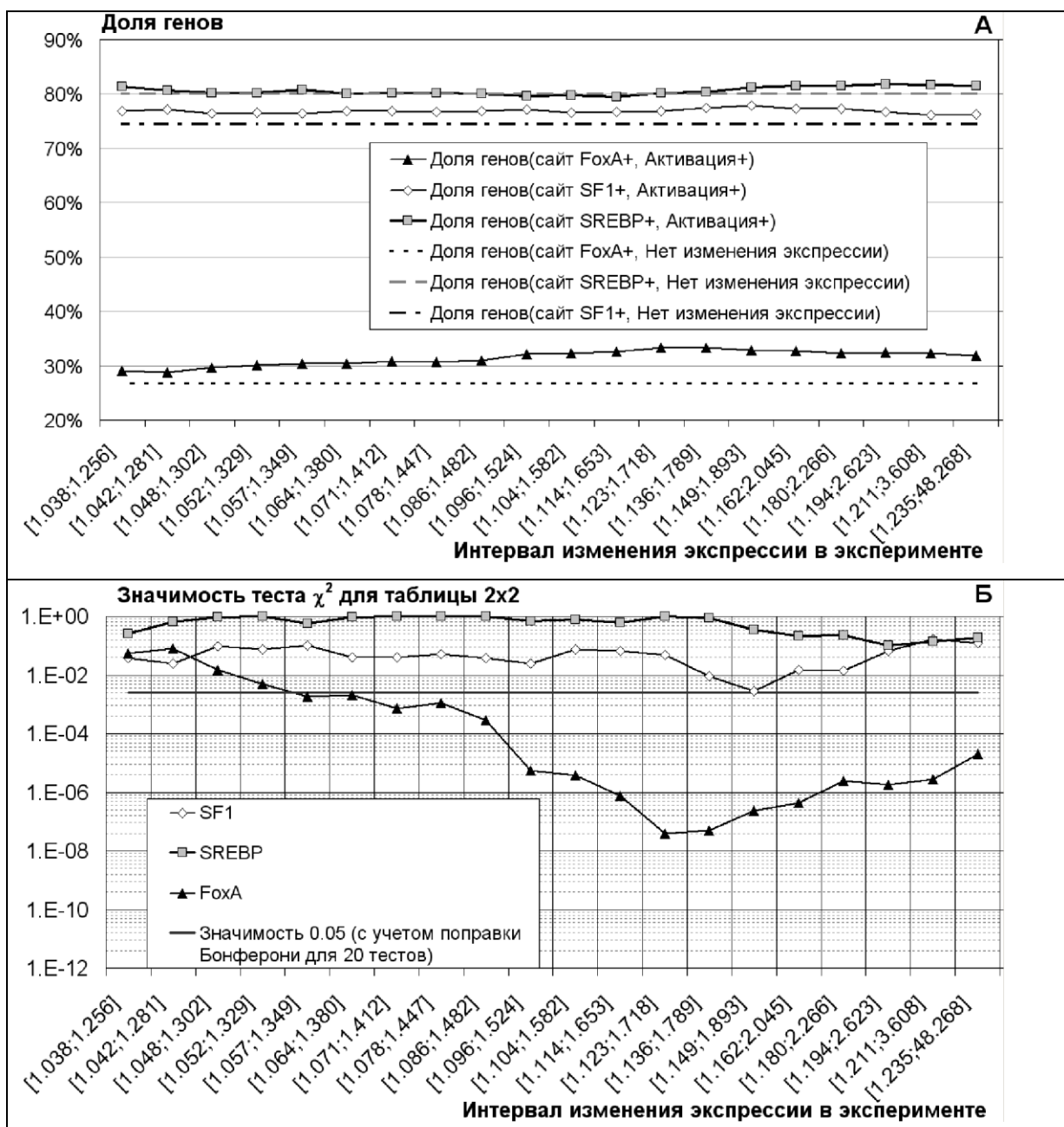
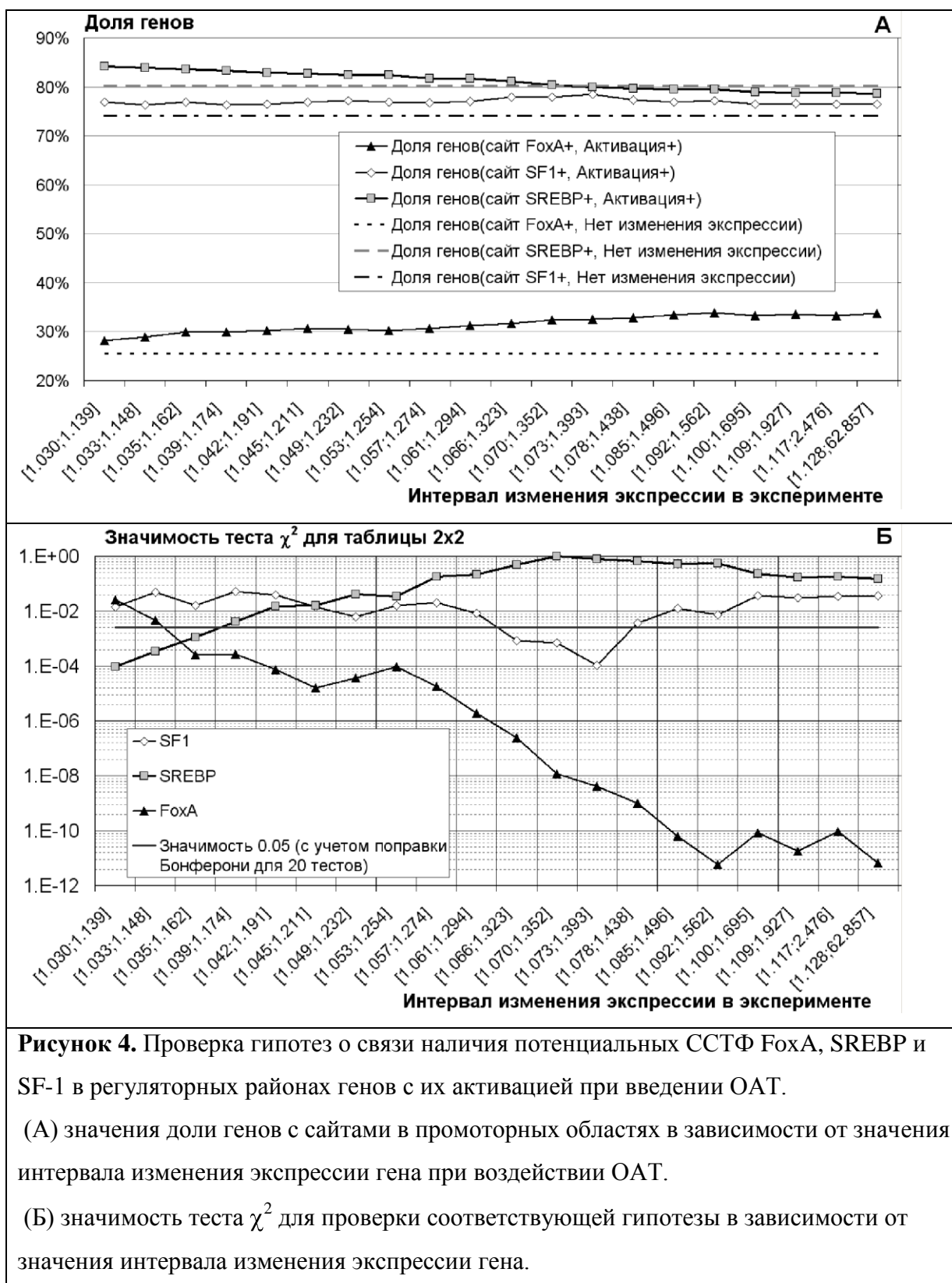


Рисунок 3. Проверка гипотез о связи наличия потенциальных ССТФ FoxA, SREBP и SF-1 в регуляторных районах генов с их активацией при введении 3'МеДАБ.

(А) значения доли генов с сайтами в промоторных областях в зависимости от значения интервала изменения экспрессии гена при воздействии 3'МеДАБ.

(Б) значимость теста χ^2 для проверки соответствующей гипотезы в зависимости от значения интервала изменения экспрессии гена.



В то же время, доли генов с наличием потенциальных SF-1 и SREBP сайтов (рис. 3А и 4А) между группами генов, реагирующих и не реагирующих на введение аминоазокрасителей, практически не отличаются. В соответствии с этим, на рисунках 3Б и 4Б в подавляющем большинстве интервалов изменения уровня экспрессии не наблюдается данных, значимых по критерию χ^2 ($P > 0.05$ с учетом поправки Бонферони для 20 измерений). Это позволяет говорить об отсутствии связи между наличием сайтов SF-1 или SREBP в регуляторной области генов и изменением их экспрессии под воздействием аминоазокрасителей.

Аналогичным образом было проведено исследование связи между репрессией генов и наличием потенциальных сайтов каждого из трех факторов транскрипции в промоторных районах генов. В подавляющем большинстве интервалов изменения уровня репрессии не наблюдается значений критерия χ^2 , соответствующих достоверной связи между наличием сайтов связывания исследованных факторов и репрессией генов ($P > 0.05$ с учетом поправки Бонферони для 20 измерений). Таким образом, репрессия генов под воздействием как 3'МеДАБ так и ОАТ, скорее всего, связана не с наличием сайтов связывания FoxA, SREBP или SF1 в их регуляторных областях, а с действием других факторов.

3. Оптимизация алгоритмов количественного ОТ ПЦР-анализа для проведения высокоточных измерений

Определение удельной активности ДНК-полимераз находит широкое применение в оптимизации условий ПЦР, позволяя выявлять влияние на неё различных факторов, проводить стандартизацию партий полимераз, исследовать параметры образования и диссоциации комплексов полимераз с антителами или другими белками, блокирующими процесс синтеза, оценивать полимеразные и нуклеазные активности ферментов и условия, при которых эти активности находят наибольшее проявление. Количества используемых в ПЦР ферментов и их соотношения оказывают существенное влияние на эффективности амплификации и детекции целевой последовательности (Chandler et al., 1998; Bustin, 2000; Bustin and Nolan, 2002; Suslov and Steindler, 2005).

Для определения полимеразной и нуклеазной активностей Taq-полимеразы мы использовали метод, описанный ранее (Брагин и др., 2008). Для оптимизации ПЦР использовались модельные системы (см. таблицу 2).

Табл. 2 Модельные системы, использовавшиеся для оптимизации ПЦР в реальном времени

Маркёр	Последовательности праймеров и зонда	Длина ампликона, п.н.	Температура гибридизации, °С
<i>coxII</i>	<i>cox2F</i> 5'-TGGACATCAATGGTATCGG-3' <i>cox2R</i> 5'-TACCAGTAAGCCAGATGCT-3' <i>coxII PR</i> 5'-R6G-AGTGC GCCT(BHQ1)CTTCACGAAGGTGATTT-3'	104	60.5
<i>orf246</i>	<i>orf246F</i> 5'-CTCGGGGCTCCATGTAGTATTTAGG-3' <i>orf246R</i> 5'-GGTGGATTATTCAAGTCGAAAGGCG-3' <i>246in</i> 5'-FAM-TGGGCTTTCCCT(BHQ1)GCCTTGCTTACATCGTGCT-3'	175	62
<i>orf324</i>	<i>orf324F2</i> 5'-CATTTTGTTAATGATGGCTGCTTTGA-3' <i>orf324R2</i> 5'-CCCTTTCCCTTCAGAG-3' <i>324FZ</i> 5'-FAM -CCTCT(BHQ1)GTCGCATCGAAGCCCAAGATCTC-3'	88	62

Чувствительность и эффективность реакции определялись ПЦР серии разведений стандартной матрицы, в качестве которой использовался клонированный ПЦР-продукт, значение среднеквадратичного отклонения аналитического сигнала реплик образцов использовалось в качестве меры воспроизводимости (каждый образец присутствовал в оптимизационных постановках в трёх повторах). В ходе оптимизации состава реакционной смеси оценивали зависимость перечисленных параметров от концентрации катионов магния (менялась от 2 до 8 мМ), концентрации олигонуклеотидных праймеров (менялась от 0.25 до 1 мкМ) и флуоресцентно-меченного зонда (менялась от 0.15 мкМ до 0.5 мкМ). Также оценивалась зависимость от температуры этапа гибридизации праймеров в протоколе ПЦР (варьировала от 54 до 72°C). В результате оптимизации были выбраны следующие условия: концентрация Mg^{2+} – 4.5 мМ, концентрация праймеров – 0.5 мкМ, концентрация зонда – 0.25 мкМ. Несмотря на проведение указанной оптимизации, использование реакционной смеси следующего состава: 10 мМ Трис-НСl, 50 мМ КCl, 4.5 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ dNTP, 0.2 е.а. Taq-полимеразы, специфические праймеры 0.5 μ М, олигонуклеотидный зонд 0.25 мкМ не позволяло достичь высокой чувствительности в ПЦР: в том случае, когда матрица присутствовала в реакционной смеси в низкой концентрации, флуоресцентный сигнал не детектировался. Было сделано предположение о том, что невозможность детекции флуоресцентного сигнала на поздних циклах ПЦР была связана с инактивацией полимеразы в ходе термоциклирования. Для проверки этой гипотезы была использована система оценки

активности ДНК-полимераза: Таq-полимераза помещалась в реакционные смеси различного состава, не содержащие олиго- и полинуклеотидных компонентов, и подвергалась циклическому нагреванию и охлаждению, температурные профили которых соответствовали таковым в ПЦР, в течение 30 циклов, после чего её активность измерялась и сравнивалась с активностью фермента, не проходившего процедуры термоциклирования. Варьирование ионного состава показало, что полимераза полностью инактивируется в буфере, содержащем хлорид, в то время как в буфере, содержащем сульфат, её активность не меняется после тридцати раундов циклирования (рис. 5), в связи с чем было принято решение об использовании в дальнейших экспериментах реакционной смеси, в состав которого вместо 50 мМ КСl входит 5 мМ (NH₄)₂SO₄.

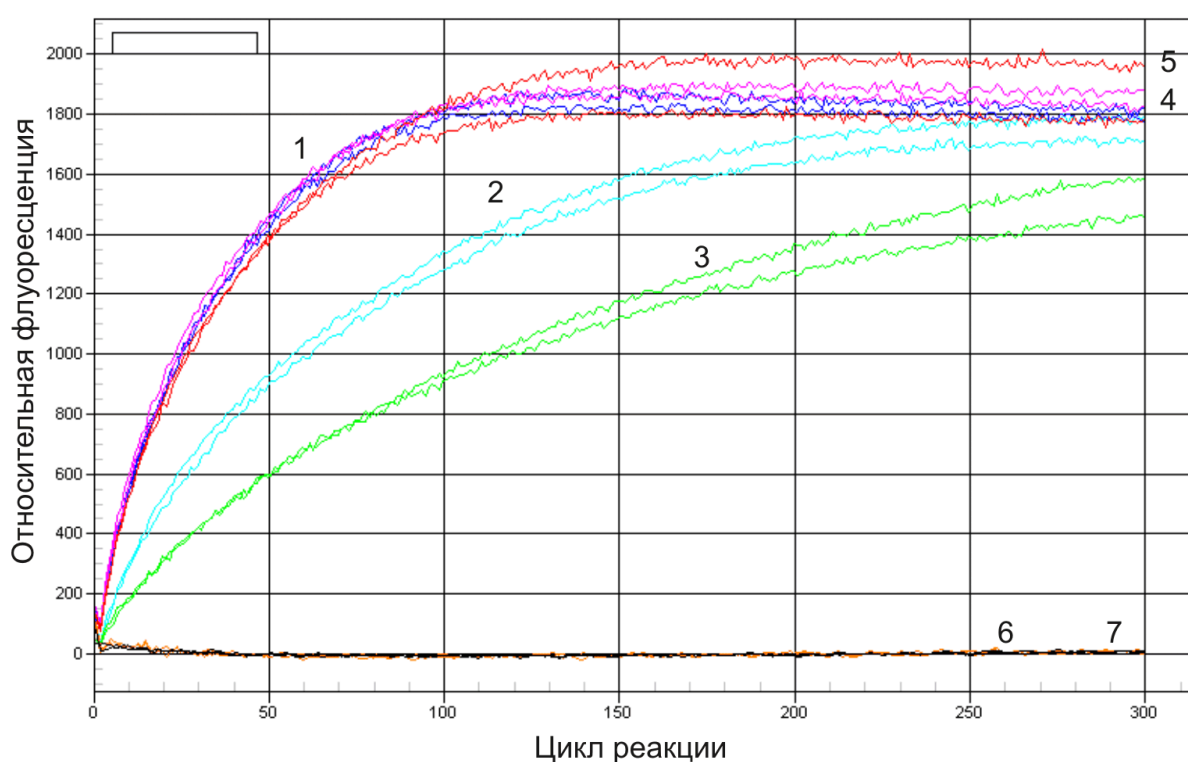


Рис. 5. Влияние ионного состава реакционной смеси на температурную стабильность Таq-полимеразы. Препарат полимеразы помещался в раствор, содержащий хлорид-анион (кривые 5 и 6, состав буфера полностью приведён в тексте) и сульфат-анион (кривые 1, 2, 3, 4, 7). После чего растворы 4 и 6 подвергали циклическому нагреву и охлаждению (30 циклов: 94°C – 10 секунд, 60°C – 20 секунд). Затем ДНК-полимеразная активность препаратов определялась с использованием разработанной системы оценки активности. Циклирование в растворе, содержащем хлорид, приводит к полной инактивации препарата полимеразы, в то время как в растворе, содержащем сульфат, активность сохраняется. Исходная активность препаратов Таq-полимеразы составляла 0.32 (образцы 1, 4, 5, 6), 0.16 (образец 2), 0.08 (образец 3) и 0 (образец 7) U на реакцию.

Использование реакционной смеси описанного выше состава позволило детектировать маркерные последовательности модельных систем в широком диапазоне концентраций, однако эффективность ПЦР на поздних циклах существенно падала, что приводило к уменьшению флуоресцентного сигнала и ошибкам количественной детекции.

Мы связали этот эффект с тем, что существенная активность Taq-полимеразы при комнатной температуре делает вероятной элонгацию праймеров, гибридованных на частично комплементарные участки матрицы, а также структур, сформированных благодаря внутри- и межпраймерной гибридизации при низких температурах во время смешивания компонентов реакционной смеси и помещении пробирок с ней в амплификатор. Использование «горячего старта» (группа методик, целью которых является блокировка реакции полимеризации при низких температурах, свойственных для стадий, предшествующих ПЦР) позволяет повысить выход целевого продукта ПЦР, так как уменьшает вероятность нежелательного полимеразного синтеза. Широко используется вариация «горячего старта», основанная на блокировании реакционного центра полимеразы специфическими антителами, которые необратимо диссоциируют при повышении температуры (Rybalkin et al., 1996). Однако для эффективного использования антител необходимо определить их концентрацию в реакционной смеси, при которой происходит гарантированная блокировка активности полимеразы; использование многократного избытка антител нецелесообразно в связи с дороговизной препарата. Для оценки ингибирующего действия антител и её зависимости от температуры нами применялся описанный метод одновременного определения полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-полимераз.

Для оценки эффективности ингибирования антителами полимеразной активности нами были оценены полимеразная активность нативной полимеразы и полимеразы в комплексе со специфическими антителами при различных температурах. Активность Taq-полимеразы в отсутствие антител проявлялась, начиная с температуры 28°C, при 50°C уровень активности фермента составлял уже 50% от активности при 70°C. В то же время комплекс полимеразы-специфические антитела обладал лишь фоновой активностью (скорость прироста флуоресценции не превышала 3% от таковой для нативного фермента). Инкубация реакционной смеси при 55, 60 и 65°C обеспечивала достижение максимальной эффективности реакции через 4000, 1300 и 100 с соответственно (рис. 6).

Для определения зависимости эффективности ингибирования полимеразной активности и температуры, при которой в смеси появляется свободная полимеразы, от соотношения Taq-полимеразы-специфические антитела использовали протокол с постепенным повышением температуры (0.5°C на шаг 10 с). В тех случаях, когда антитела находились в смеси в концентрации менее 1 мкг/мл, их ингибиторный эффект был несущественен (образцы 2, 3 на

рис. 7, А и Б) за счёт присутствия в смеси свободных молекул полимеразы; при концентрациях более 15 мкг/мл эффективность ингибирования оставалась на постоянном уровне (образцы 7, 8 на Рис. 7, А и Б). В целом, температурная инактивация антител и связанное с ней появление в реакционной смеси свободных молекул полимеразы зависело как от температуры, так и от времени инкубации, однако при температурах ниже 50°C комплекс оставался стабильным практически неограниченно долго.

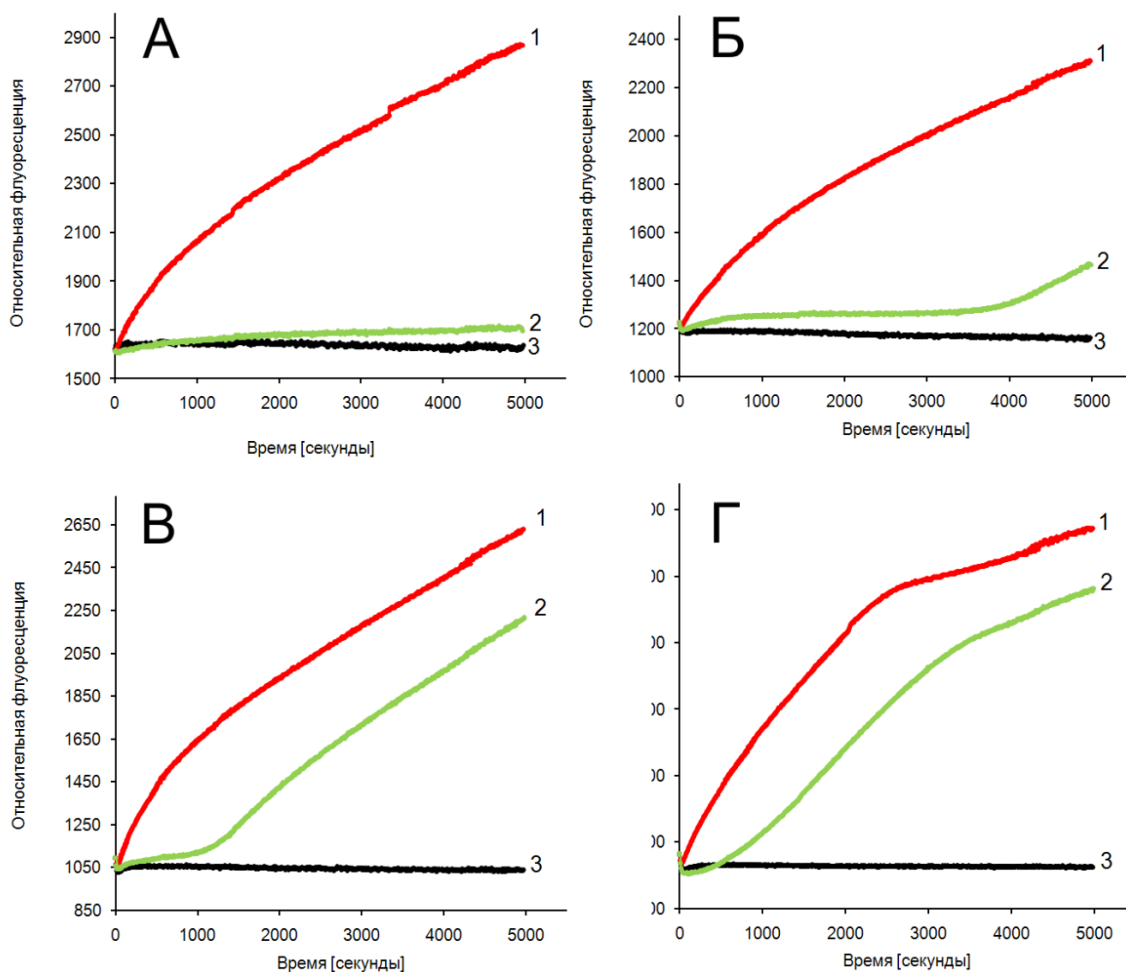


Рис. 6. Синтез продукта элонгации шпилечного олигонуклеотида при различных температурах в реакционных смесях, содержащих Taq-полимеразу в свободной форме (1), Taq-полимеразу в комплексе с антителами (2), и не содержащих полимеразы (3) при температурах 50 (А), 55 (Б), 60 (В), 65 (Г) градусов.

При прогреве реакционной смеси при 70°C в течение 15 секунд комплекс полимеразы с антителами распадался полностью через 750 секунд (на 25-30% быстрее, чем при инкубации на 60°C без предварительного прогрева), о чём свидетельствовало достижение скоростью прироста флуоресценции максимального значения. При предварительном прогреве в течение

70 секунд при 70°C 100% активность достигалась уже через 250 секунд. 15 секунд прогрева при больших температурах (80 и 90°C) оказалось достаточно для полной активации полимеразы. Таким образом, комплекс Таq-полимеразы с моноклональными антителами обладает следующими характеристиками:

- Не распадается при 55°C как минимум в течении 1 часа 20 минут. При этом уровень прироста фоновой флуоресценции не превышает 3% от максимальной скорости прироста.
- Скорость инактивации антител и появления в смеси активных молекул полимеразы зависит как от температуры, так и от времени инкубации.
- При температурах выше 80°C происходит быстрая (менее чем за 15 секунд) инактивация антител, при этом активность полимеразы достигает 100% от активности нативной полимеразы.

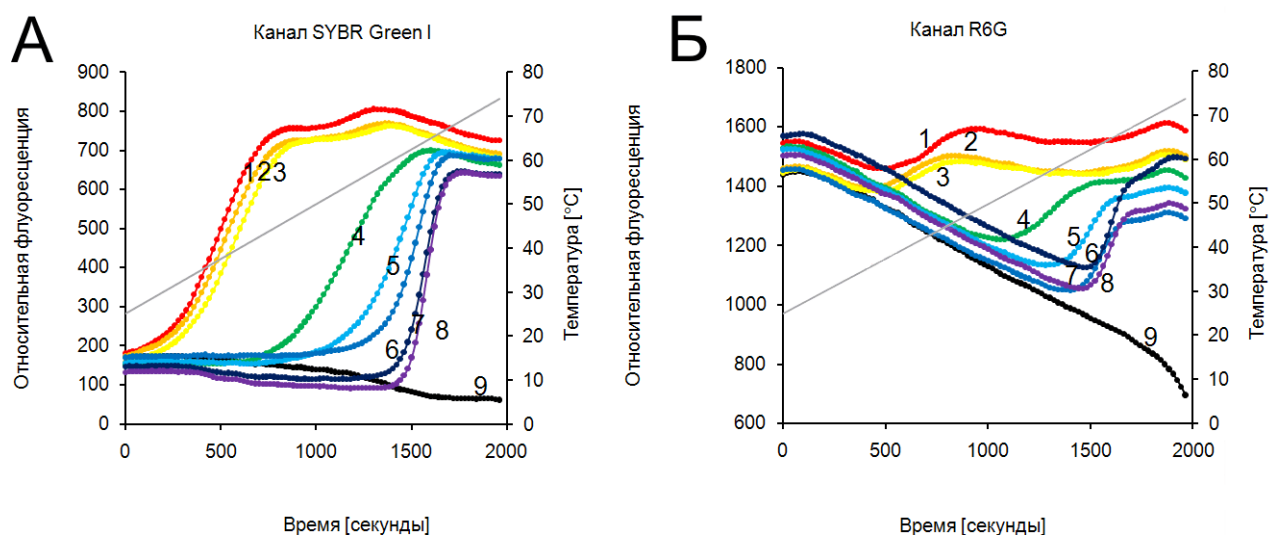


Рис. 8. Диссоциация полимеразы из комплекса с антителами при использовании протокола с постепенным повышением температуры: регистрация полимеразной (А) и 5'-3'-экзонуклеазной (Б) активностей. Концентрация Таq-полимеразы составляла 62.5 мU/мкл, концентрации антител 0 мкг/мл (1), 0.49 мкг/мл (2), 0.97 мкг/мл (3), 1.95 мкг/мл (4), 3.9 мкг/мл (5), 7.8 мкг/мл (6), 15.6 мкг/мл (7), 31.3 мкг/мл (8), образец 9 не содержал полимеразы. Серой линией показано изменение температуры в ходе реакции.

Таким образом, для блокирования активности полимеразы на ранних стадиях реакции в реакционную смесь были добавлены антитела к активному центру Таq-полимеразы в концентрации 15 мкг/мл, что привело к увеличению эффективности амплификации на поздних циклах ПЦР всех модельных систем (рис. 9).

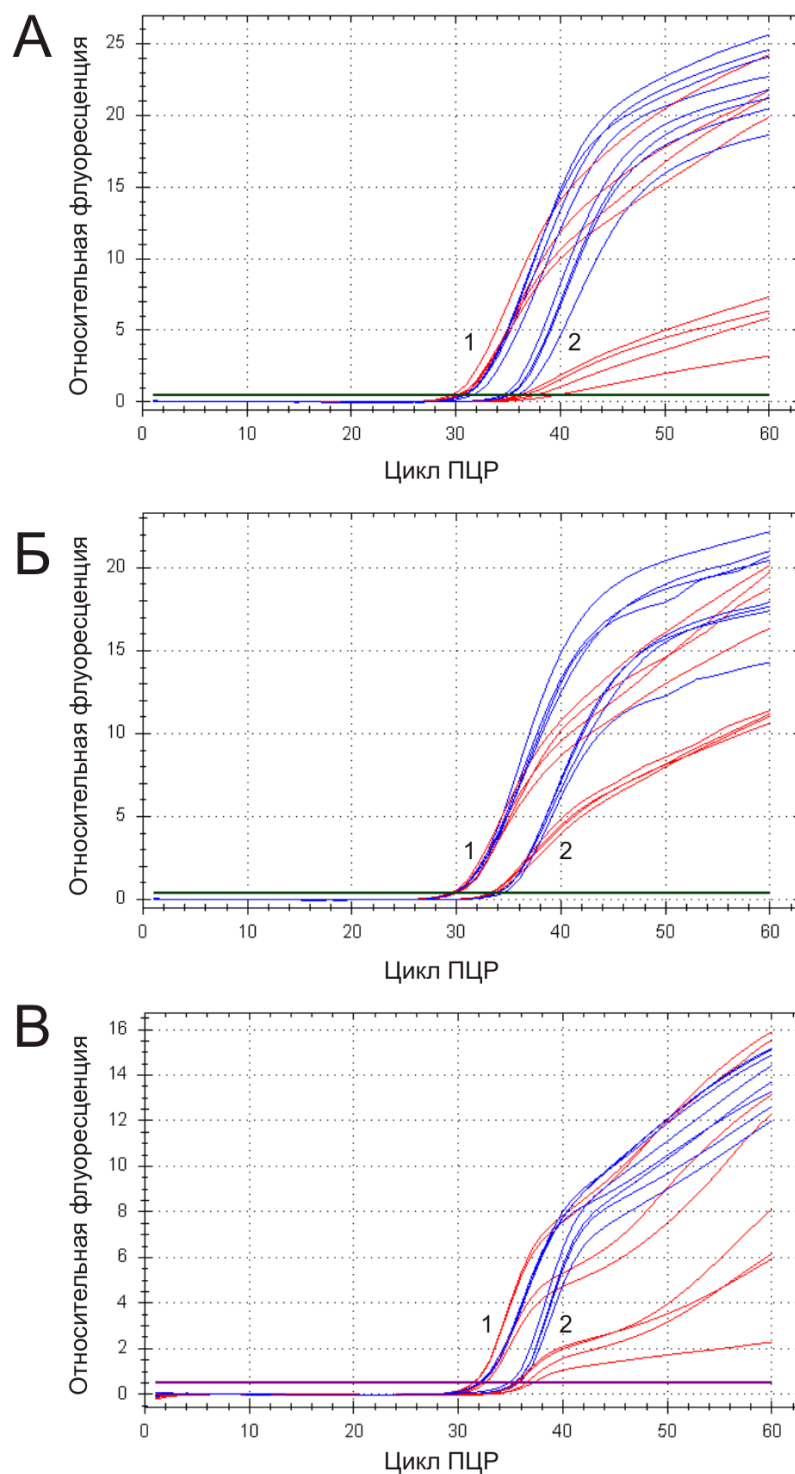


Рис. 9. Оптимизация ПЦР в реальном времени посредством введения горячего старта для полимеразы. Маркёрные последовательности *orf246* (А), *coxII* (Б) и *orf324* (В) мтДНК в количестве 1000 (1) и 100 (2) копий в реакционной смеси анализировались с использованием ПЦР в реальном времени в варианте с горячим стартом (синие кривые) и без горячего старта (красные кривые). При отсутствии горячего старта с уменьшением концентрации матрицы происходит падение уровня аналитического сигнала, приводящее к снижению чувствительности и ошибке количественного определения, введение в реакционную смесь моноклональных антител к Таq-полимеразе устраняет этот эффект.

После описанной оптимизации эффективность реакции для всех маркёров составляла от 95 до 100%, порог количественного определения составил 10 копий на реакцию (см. рис. 10).

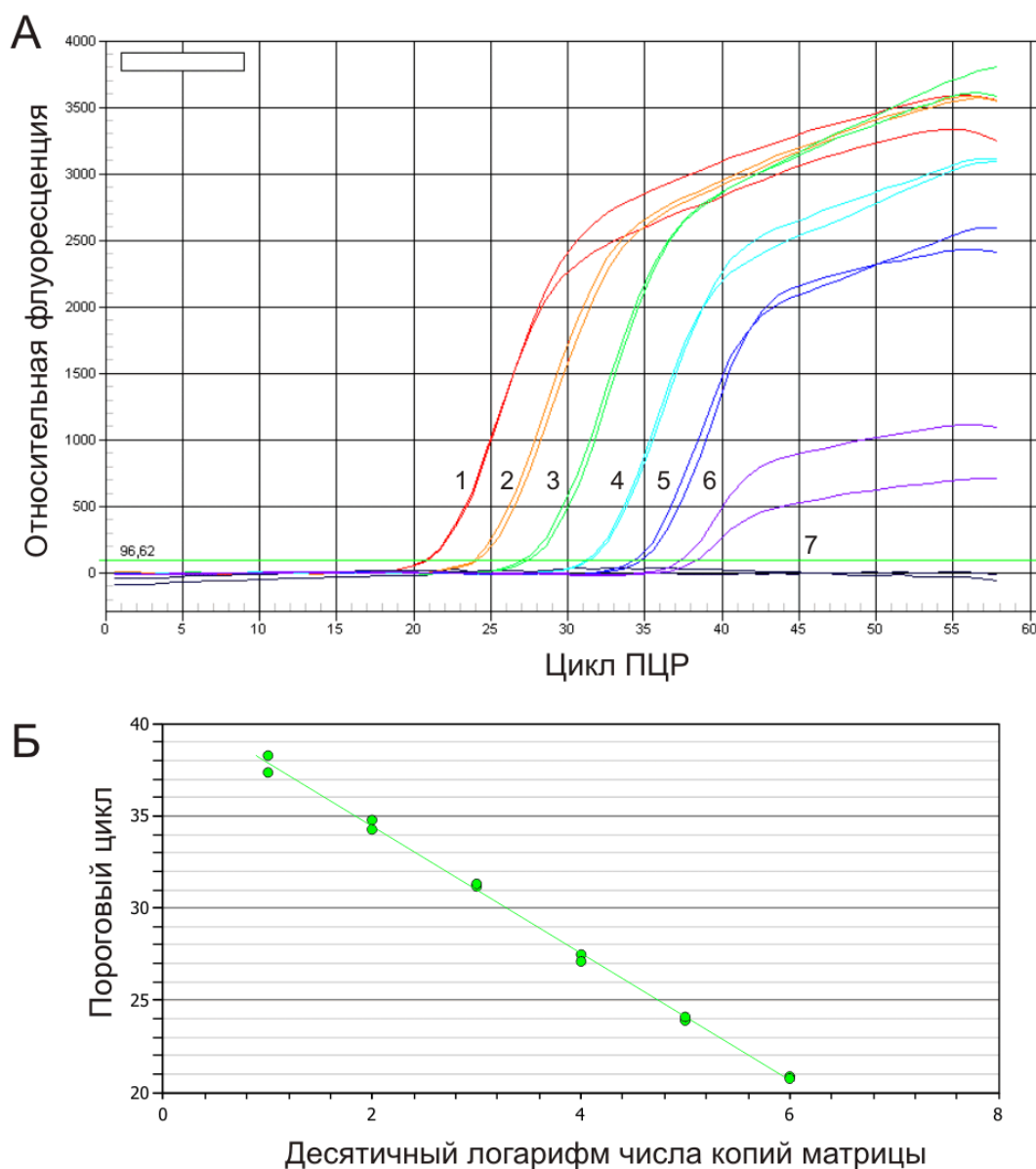


Рис. 10. ПЦР амплификация серии разведений клонированного маркёра мтДНК *coxII* в количестве 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 и 0 копий в реакционной смеси (кривые 1-7, А) и калибровочная прямая, построенная для приведённой серии разведений (Б). Эффективность амплификации составила 95.1%, коэффициент линейности R^2 составил 0.998.

Достижение условий, обеспечивающих максимальную температурную стабильность фермента, и блокировка неспецифического синтеза на стадиях, предшествующих ПЦР, позволили добиться максимальной чувствительности вплоть до единичных копий и расширить границы линейного диапазона детекции до границ 10 - 10^8 копий последовательности на реакцию.

В процессе оптимизации структуры флуоресцентно-меченного олигонуклеотида и в ходе крупномасштабных экспериментов, связанных с использованием нескольких партий одного и того же олигонуклеотидного зонда, как правило, не учитываются факторы эффективности флуоресцентного мечения и эффективности очистки конечного продукта от невключившихся молекул красителя и продуктов неполного синтеза олигонуклеотидного фрагмента, оказывающие существенное влияние на ключевые параметры ПЦР в реальном времени (Yeung et al., 2004; Espy et al., 2006). Несмотря на то, что ряд зарубежных производителей включает очистку с использованием HPLC и контроль при помощи MALDI-TOF спектроскопии в рутинные процедуры подготовки зондов, меченных флуорофором и гасителем (каталог «Sigma» [электронный ресурс], каталог «Midland Certified» [электронный ресурс], каталог «Eurogentec» [электронный ресурс]), это не является обязательным требованием, и с целью удешевления синтеза многие производители не используют указанные процедуры. В этом случае пользователю требуется самостоятельно характеризовать приобретаемые флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды с тем, чтобы убедиться, что их качество соответствует заявленному и не меняется от партии к партии вне зависимости от масштабов синтеза. Кроме того, процедура характеризации флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов, отличающаяся простотой, дешевизной и возможностью широкомасштабной реализации, нашла бы применение в лабораториях, самостоятельно синтезирующих флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды. Определение качества синтезированного зонда, не связанное с очисткой посредством HPLC, позволило бы избавиться от последней в случаях, когда качество неочищенного препарата находится на высоком уровне, так как эффективность работы в ПЦР таких зондов практически не уступает таковой в случае использования очищенных препаратов (Yeung et al., 2004).

Анализ качества синтезированного зонда заключается в определении доли целевого продукта в общем пуле продуктов синтеза и модификации. Под целевым продуктом в настоящей работе подразумевается полноразмерный олигонуклеотидный зонд, связанный с флуорофором и гасителем. Раствор, содержащий целевой продукт, может также содержать укороченные продукты, которые могут нести, или не нести флуоресцентную метку (в первом случае это может происходить из-за 3'-концевой деградации, во втором это результат неполного синтеза (Yeung et al., 2004)), полноразмерные зонды, лишённые красителя или гасителя, и примеси красителя или гасителя в свободной форме. Анализ качества синтеза сводится, таким образом, к оценке молярного соотношения олигонуклеотидного зонда, красителя и гасителя, подтверждению того, что краситель и гаситель связаны с зондом и того, что продукт синтеза представляет собой полноразмерный олигонуклеотид.

Спектр поглощения флуоресцентно-меченного олигонуклеотидного зонда позволяет проанализировать соотношение олигонуклеотида, красителя и гасителя в растворе, однако эта задача осложняется тем, что:

1. Спектры красителя, гасителя и олигонуклеотида значительно перекрываются и прямое определение количества вещества из анализа уровня поглощения на определённой длине волны невозможно.
2. Параметры спектров красителя и гасителя могут изменяться под влиянием химического окружения.
3. Параметры спектра олигонуклеотида зависят от последовательности олигонуклеотида.

Исходя из этих особенностей, анализ спектра поглощения флуоресцентно-меченного олигонуклеотидного зонда заключается в оценке вклада поглощения отдельных компонентов в суммарное поглощение с учётом того, что спектры отдельных компонентов могут в определённых границах изменяться в зависимости от химического окружения. Поглощение зонда описывается как:

$$D_P^\lambda = \left(c_{oligo} \cdot \varepsilon_{oligo}^\lambda(P) + c_{dye} \cdot \varepsilon_{dye}^\lambda(P) + c_{quencher} \cdot \varepsilon_{quencher}^\lambda(P) \right) \cdot l \quad (1)$$

где D_P^λ – поглощение зонда P на длине волны λ

c_{oligo} – концентрация олигонуклеотида в растворе

c_{dye} – концентрация красителя в растворе

$c_{quencher}$ – концентрация гасителя в растворе

$\varepsilon_{oligo}^\lambda(P)$ – коэффициент экстинкции олигонуклеотидной составляющей зонда P на длине волны λ

$\varepsilon_{dye}^\lambda(P)$ – коэффициент экстинкции красителя в составе зонда P на длине волны λ

$\varepsilon_{quencher}^\lambda(P)$ – коэффициент экстинкции гасителя в составе зонда P на длине волны λ

l – длина оптического пути

и задача сводится к вычислению концентраций олигонуклеотида, гасителя и красителя, на практике означающая разложение суммарного спектра поглощения на спектры поглощения отдельных компонентов с учётом возможного изменения формы этих спектров в некоторых пределах.

Для того чтобы разложить суммарный спектр поглощения на отдельные компоненты, необходимо каким-то образом описать их. В том случае, если мы предполагаем, что суммарный спектр поглощения может быть представлен в виде линейной комбинации спектров поглощения стандартов олигонуклеотида, красителя и гасителя, мы теряем возможность учёта изменения формы спектра от последовательности зонда и химического окружения красителя и гасителя в его составе (рис. 11).

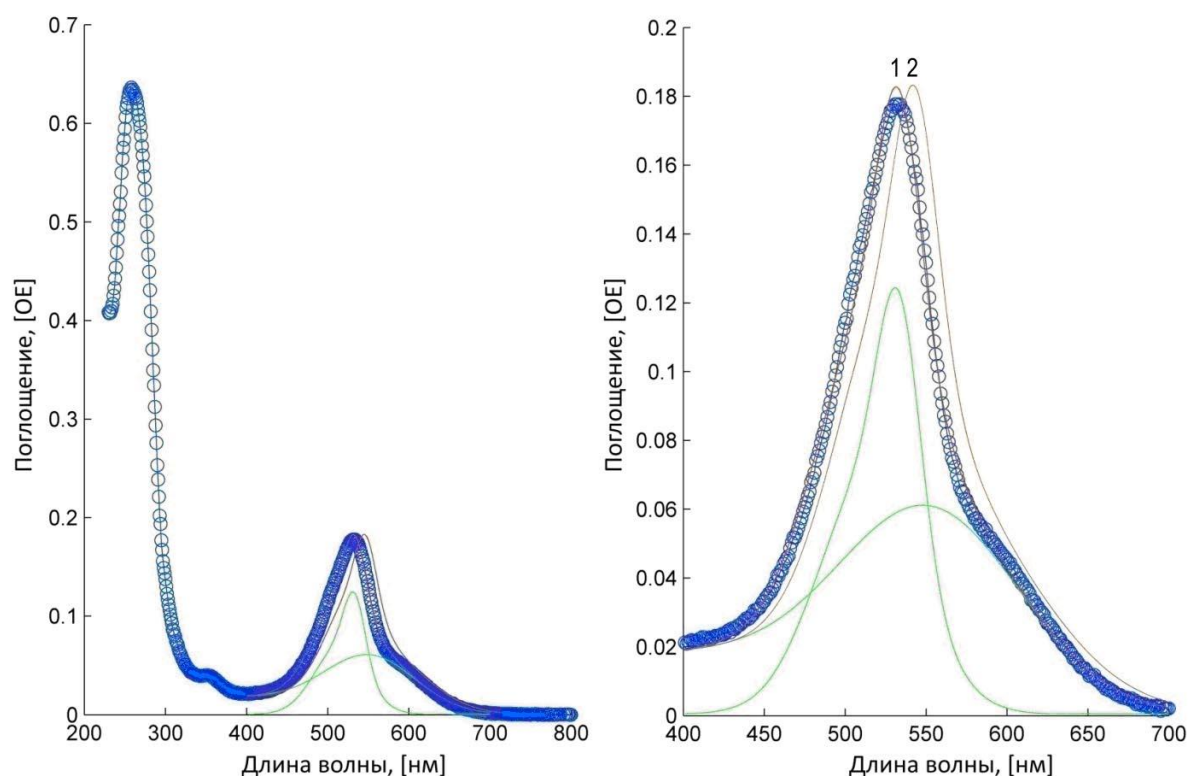


Рис. 11. Анализ типичного спектра поглощения олигонуклеотидного зонда, меченого флуорофором и гасителем. Пик в районе 260 нм обуславливается поглощением олигонуклеотидного фрагмента, в то время как в области 350-700 поглощение связано с флуорофором и гасителем, спектры которых изображены зелёными линиями. Суммирование спектров поглощения флуорофора и гасителя показано красной линией 1; при сдвиге спектра поглощения в длинноволновую область на 10 нм, показанном красной линией 2, анализ вкладов красителя и гасителя путём линейного разложения суммарного спектра даст неудовлетворительные результаты.

Для того чтобы учесть возможное изменение формы спектра поглощения зонда в зависимости от окружения флуорофора и обеспечить более тонкую аппроксимацию каждого конкретного спектра, продуктивнее описывать спектры отдельных компонентов в виде параметрических функций. В этом случае максимум функции будет описывать поглощение данного компонента, а прочие параметры – описывать форму спектра компонента в данном зонде, с учётом возможных изменений параметров. Так как пик поглощения олигонуклеотидного фрагмента не перекрывается с пиками поглощения флуорофора и гасителя, количество олигонуклеотида можно анализировать напрямую, не прибегая к аппроксимации пика поглощения какой-либо функцией. Концентрация олигонуклеотидного фрагмента в растворе, содержащем зонд, вычисляется по формуле:

$$C_{oligo} = \frac{D_P^{260} - D_{dye}^{260} - D_{quencher}^{260}}{l \cdot \varepsilon_{oligo}^{260}} \quad (2)$$

где $\varepsilon_{oligo}^{260}$ – коэффициент экстинкции олигонуклеотида на длине волны 260 нм, который может быть с высокой точностью вычислен с использованием метода ближайших соседей.

Поглощение флуорофора и гасителя на длине волны 260 нм вычисляется исходя из литературных данных о коэффициентах экстинкции на этой длине волны и определённых молярных концентрациях флуорофора и гасителя.

Таким образом, задача сводится к разложению перекрывающихся сигналов поглощения флуорофора и гасителя в области от 320 (в которой олигонуклеотидная составляющая практически не вносит вклад в поглощение) до 700 нм. Спектры флуорофоров и гасителей имеют достаточно сложный вид (см. зелёные линии на рис. 11). Для их аппроксимации возможно использование функций различных типов, исходя из того, что аппроксимационная функция должна иметь минимальное число параметров, максимальное число которых должно обладать физическим смыслом и легко определяться, для приближения спектров поглощения использовалась функция (3), представляющая собой сумму двух функций Гаусса:

$$y = y_0 + \frac{A_1}{w_1 \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{-2 \frac{(x-x_{c1})^2}{w_1^2}} + \frac{A_2}{w_2 \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{-2 \frac{(x-x_{c2})^2}{w_2^2}} \quad (3)$$

где A , w и x_c представляют собой линейный коэффициент, ширину и положение максимума для первого и второго Гауссианов, соответственно, а y_0 – смещение зависимой переменной относительно нуля (соответствует фоновому уровню поглощения).

Анализ спектров поглощения, наиболее широко используемых при синтезе олигонуклеотидных зондов красителей и гасителей, показал, что модель (3) является хорошим приближением, позволяя с достаточной точностью описывать получаемые на практике данные. Результаты аппроксимации используемых в работе красителей и гасителей приведены на рис. 7 и в таблице 2.

Во всех случаях параметр x_{c1} описывает положение максимума поглощения, которое совпадает с теоретическими данными для всех исследованных красителей и гасителей флуоресценции, параметр x_{c2} описывает положение минорного пика, вклад которого определяется соотношением величин A_1 и A_2 ; параметры w_1 и w_2 описывают ширину основного и минорного пиков, соответственно.

В области перекрывания спектров суммарное поглощение будет описываться как сумма двух функций (3), с параметрами флуорофора и гасителя соответственно (4).

$$w_{q2} \quad (4)$$

где C – область перекрывания спектров флуорофора и гасителя

d – переменные, относящиеся к красителю (dye).

q – переменные, относящиеся к флуорофору (quencher).

Табл. 3. Значения параметров функции (3) при аппроксимации спектров поглощения*

	FAM	R6G	ROX	Cy5	BHQ-1	BHQ-2
x_{c1}	496.48±0.11**	526.81±0.08	579.47±0.08	649.63±0.43	536.03±1.19	578.31±0.62
w_1	20.69±0.50	23.08±0.20	24.65±0.36	28.47±0.58	109.44±2.12	108.42±1.16
A_1	3.17±0.21	4.10±0.07	3.09±0.14	1.36±0.057	47.49±4.83	12.39±0.67
x_{c2}	473.76±1.68	508.56±0.23	546.21±1.50	609.02±1.47	430.01±17.59	456.12±9.68
w_2	41.54±1.92	55.10±0.40	56.80±3.66	42.85±4.58	162.76±24.61	168.45±29.44
A_2	3.13±0.28	9.95±0.14	3.47±0.39	0.65±0.14	22.21±5.42	4.52±0.98

*параметр y_0 во всех случаях принимался равным 0, что достигалось учётом фонового поглощения.

**Указана величина среднеквадратичной погрешности аппроксимации параметра.

Однако для аппроксимации реальных спектров поглощения флуоресцентно-меченных зондов использование функции (4) в неизменном виде нецелесообразно, так как в области перекрывания спектров поглощения флуорофора и гасителя суммарное поглощение, описываемое как сумма четырёх функций Гаусса, будет определяться 12 аппроксимируемыми параметрами, что приведёт к возникновению множества вариантов решений, в частности, возможно неверное определение вкладов основных и минорных пиков красителя и гасителя за счёт независимого определения амплитуд последних.

Для того чтобы функция (4) могла использоваться в качестве приближения функции (1), необходимо уменьшить число аппроксимируемых параметров, сохранив в то же время возможность гибкого определения последних для того, чтобы иметь возможность приближать спектры поглощения в широком диапазоне концентраций флуорофора и гасителя и учитывать возможную зависимость $D(P)$.

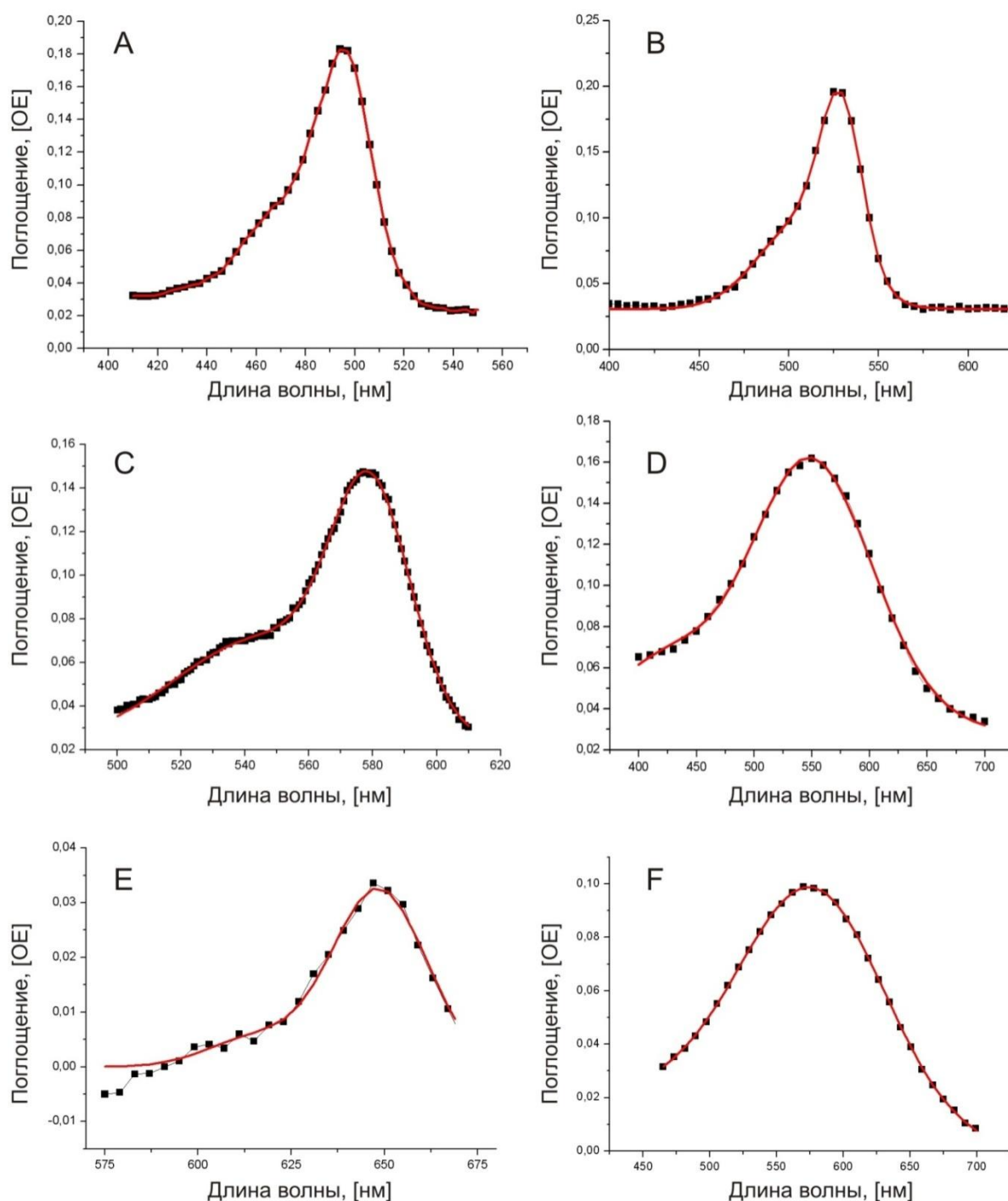


Рис. 12. Приближение спектров поглощения наиболее часто используемых при синтезе зондов флуорофоров и гасителей функцией (3). Экспериментальные данные показаны чёрными квадратами, аппроксимация функцией (3) красной линией, количество экспериментально полученных точек при построении графиков уменьшено для улучшения восприятия. А. FAM, В. R6G, С. ROX, D. BHQ-1, Е. Cy5, F. BHQ-2.

Чтобы уменьшить число аппроксимируемых параметров, параметры минорного пика выражаются через параметры основного пика, как для флуорофора, так и для гасителя флуоресценции, с использованием коэффициентов (5)-(7):

$$c_{xc} = x_{c2} - x_{c1} \quad (5)$$

$$cw = \frac{w_2}{w_1} \quad (6)$$

$$cA = \frac{A_2}{A_1} \quad (7)$$

С использованием (5)-(7), функция (4) преобразуется в (8):

$$D_1 P^1(\lambda \in C) = A_1 d / (w_1 d \sqrt{(\pi/2)}) \cdot e^{(-2 \int (x - x_1 dc) \int^2 / (w_1 d^2))} + c A_1 d \cdot A \int d / (c w_1 d \cdot w \int d \sqrt{(\pi/2)}) \cdot e^{(-2 \int (x - x_1 dc - c x c d) \int^2 / (c w_1 d \cdot w_1 d) \int^2)} + A_1 q / (w_1 q \sqrt{(\pi/2)}) \cdot e^{(-2 \int (x - x_1 qc) \int^2)} \quad (8)$$

Где аппроксимируемыми являются только параметры Ad , wd , xdc , Aq , wq , xqc , коэффициенты (5)-(7), определённые из данных таблицы 3 заданы в качестве констант. При аппроксимации спектра поглощения функцией (8) помимо вида функции и значений констант требуются также стартовые значения аппроксимируемых параметров и границы, в пределах которых может происходить изменение этих параметров. В качестве стартовых значений параметров используются данные таблицы 3, значения, определяющие границы аппроксимации подбираются таким образом, чтобы обеспечить аппроксимацию спектров флуорофора и гасителя в широком диапазоне концентраций последних, а также избежать интерпретации неспецифического поглощения в качестве вклада поглощения красителя и гасителя. На практике это означает, что параметр A может принимать значения от 0 до бесконечности (т.к. он определяет вклад пика поглощения в суммарное поглощение, зависящее от количества определяемого компонента), на практике максимальное значение A должно быть таким, чтобы обеспечивать выполнение условия (9), означающего, что максимум функции, описывающей поглощение (которого она достигает в точке $x=x_c$), не может превышать значения максимального поглощения, которое способен определить спектрофотометр. Для используемого спектрофотометра максимальное значение поглощения составляет около 4 О.Е., кроме того, при больших значениях поглощения перестаёт работать закон Ламберта-Бугера-Бера, за счёт изменения показателя преломления раствора (Степанова, 2003), поэтому на практике сфера действия метода ограничена растворами, оптическая плотность которых не превышает нескольких оптических единиц. С учётом выполнения (9) верхний порог аппроксимации A составляет 100 для флуорофоров и 1000 для гасителей флуоресценции.

$$\frac{A}{w \sqrt{\frac{\pi}{2}}} + \frac{cA \cdot A}{cw \cdot w \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{-2 \frac{cxc^2}{(cw \cdot w)^2}} < 4 \quad (9)$$

Границы остальных параметров аппроксимации подбираются так, чтобы их строгость была достаточной для верного определения пиков в чистом растворе флуорофора или гасителя. При анализе зонда подразумевается, что он содержит в своём составе и флуорофор,

и гаситель одновременно; анализ растворов чистых красителей и гасителей помогает выявить уровень переопределения флуорофора, в случае анализа содержания гасителя и наоборот (рис. 13, 14). Данный анализ был проведён для всех используемых комбинаций флуорофор/гаситель. Из рис. 14 А-D видно, что количество целевого компонента во всём диапазоне значений оптической плотности определяется верно (ошибка менее 2% во всех случаях), количество нецелевого компонента зависит от конкретной комбинации флуорофор/гаситель и не превышает 5% от количества целевого компонента. Таким образом, показатель 5% выбирается в качестве порога определения, зонды с содержанием флуорофора или гасителя менее 5% приравниваются к таковым, не имеющим в составе указанных компонентов.

Оценка эффективности анализа спектра поглощения однокомпонентных смесей и вклада паразитного пика *in vitro* показала близкие результаты: молярный вклад паразитного пика не превышал 5% от количества целевого компонента, линейность сигнала поглощения серии разведений красителя и гасителя составляла 0.999 (рис. 15).

Эффективность использования алгоритма для разложения суммарного спектра поглощения на спектры флуорофора и гасителя проверялась разложением сумм спектров для широкого диапазона значений поглощения и соотношений пиков как *in silico*, так и *in vitro*. Анализ показал, что алгоритм успешно определяет вклад спектральных компонент гасителя и флуорофора в широком диапазоне концентраций, при этом точность анализа снижается при приближении к границам определяемых областей и при достижении соотношения флуорофор/гаситель крайних значений. На рисунке 16 приведены зависимости ошибок определения оптических плотностей флуорофора и гасителя при их одновременном определении в растворе *in vitro*. Диапазон соотношения флуорофор/гаситель при котором ошибка определения этого соотношения не превышает 5% составляет около 30 (от 5 до 0.15 в случае FAM); с учётом того, что при анализе реальных олигонуклеотидных зондов этот параметр редко выходит за пределы значений от 0.3 до 2, предложенный алгоритм может успешно применяться для анализа соотношения краситель/гаситель (рис. 17).

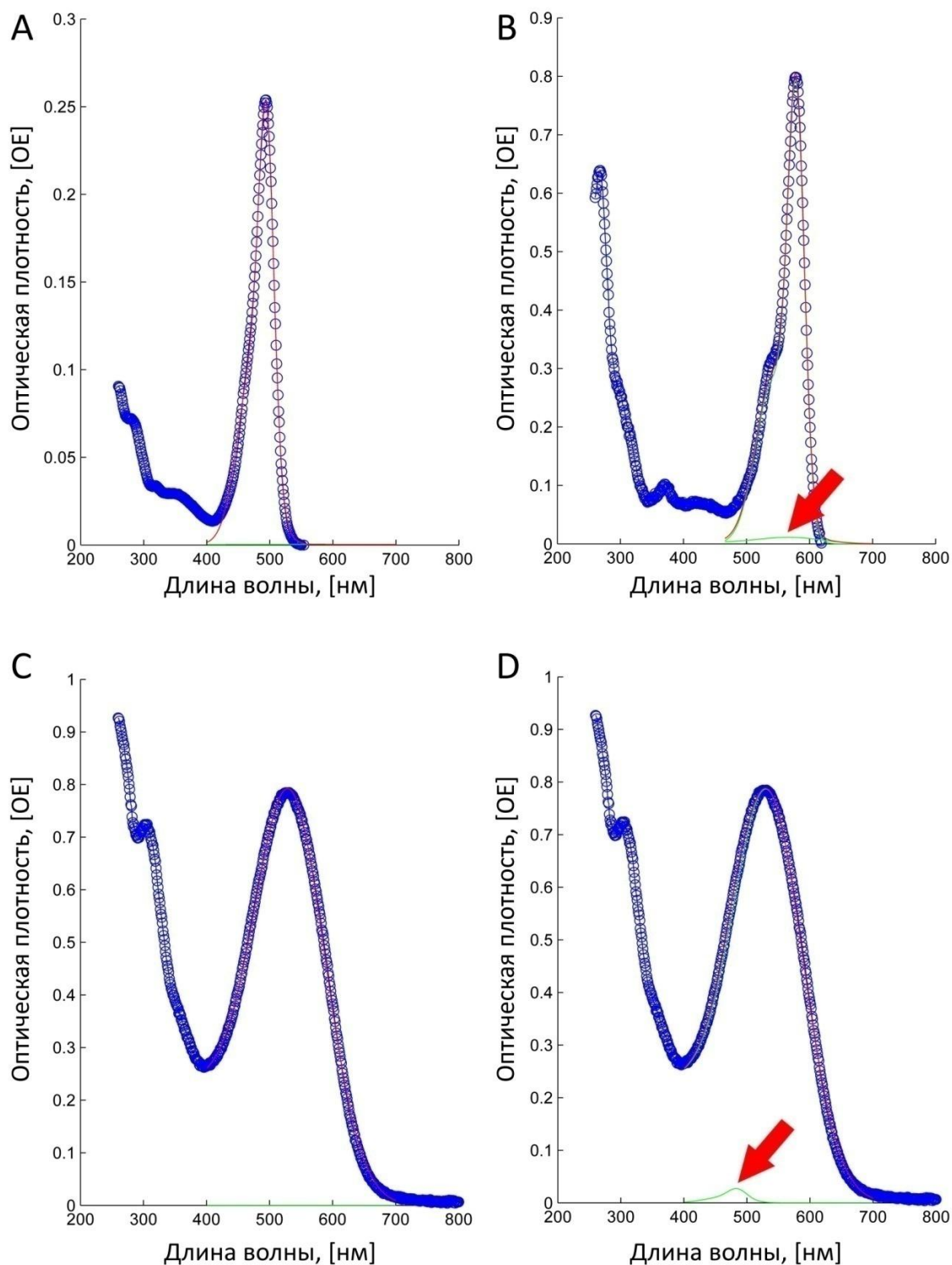


Рис. 13. Аппроксимация поглощения флуорофора и гасителя; в качестве исходных данных используются спектры поглощения чистых флуорофоров (А и В) и гасителей (С и D). На В и D видны артефакты анализа в виде появления минорных пиков гасителя в спектре флуорофора и флуорофора в спектре гасителя, связанные с существенным перекрытием спектров, при этом ошибка определения целевого компонента не превышает 2%, а ошибка определения пика паразитного компонента не превышает 5% (количество вещества паразитного компонента/количество вещества мажорного компонента). А. Разложение спектра FAM на спектры BNQ-1 и FAM, В. Разложение спектра ROX на спектры BNQ-2 и ROX, С. Разложение спектра BNQ-1 на спектры R6G и BNQ-1, D. Разложение спектра BNQ-1 на спектры FAM и BNQ-1.

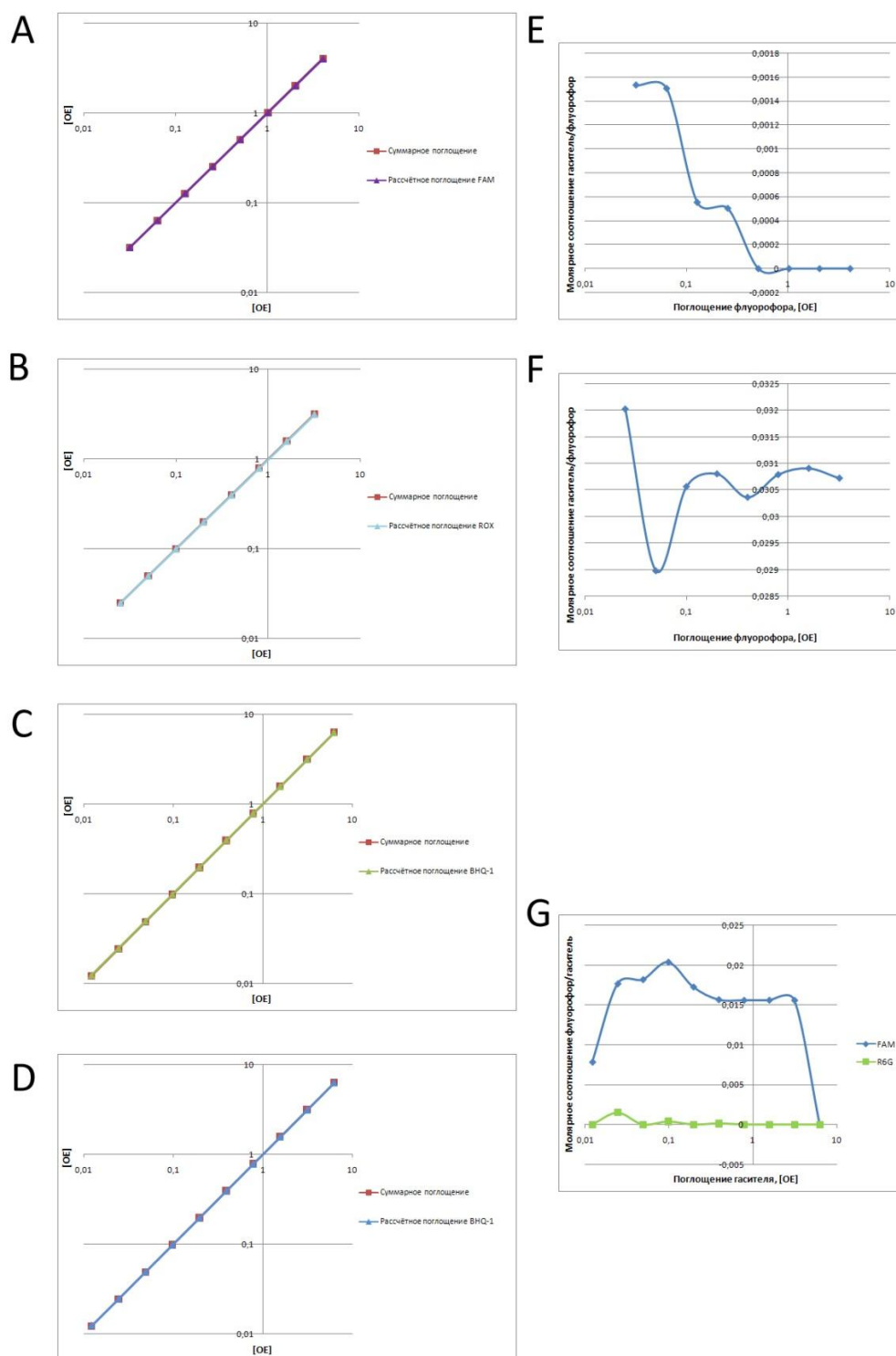


Рис. 14. Оценка качества аппроксимации в случае *in silico* анализа спектров, приведённых на рис. 3. На А-Д приведены значения суммарной оптической плотности в области пика и оптической плотности флуорофора или гасителя, вычисленной путём аппроксимации поглощения с использованием функции (8); на Е-Г приведены значения соотношения гаситель/флуорофор (при анализе спектра флуорофоров) и флуорофор/гаситель (при анализе гасителей). А. и Е. Разложение спектра FAM на спектры ВНQ-1 и FAM, В. и F. Разложение спектра ROX на спектры ВНQ-2 и ROX, С. Разложение спектра ВНQ-1 на спектры R6G и ВНQ-1, D. Разложение спектра ВНQ-1 на спектры FAM и ВНQ-1. G. Разложение спектра ВНQ-1 на спектры R6G и ВНQ-1 и FAM и ВНQ-1.

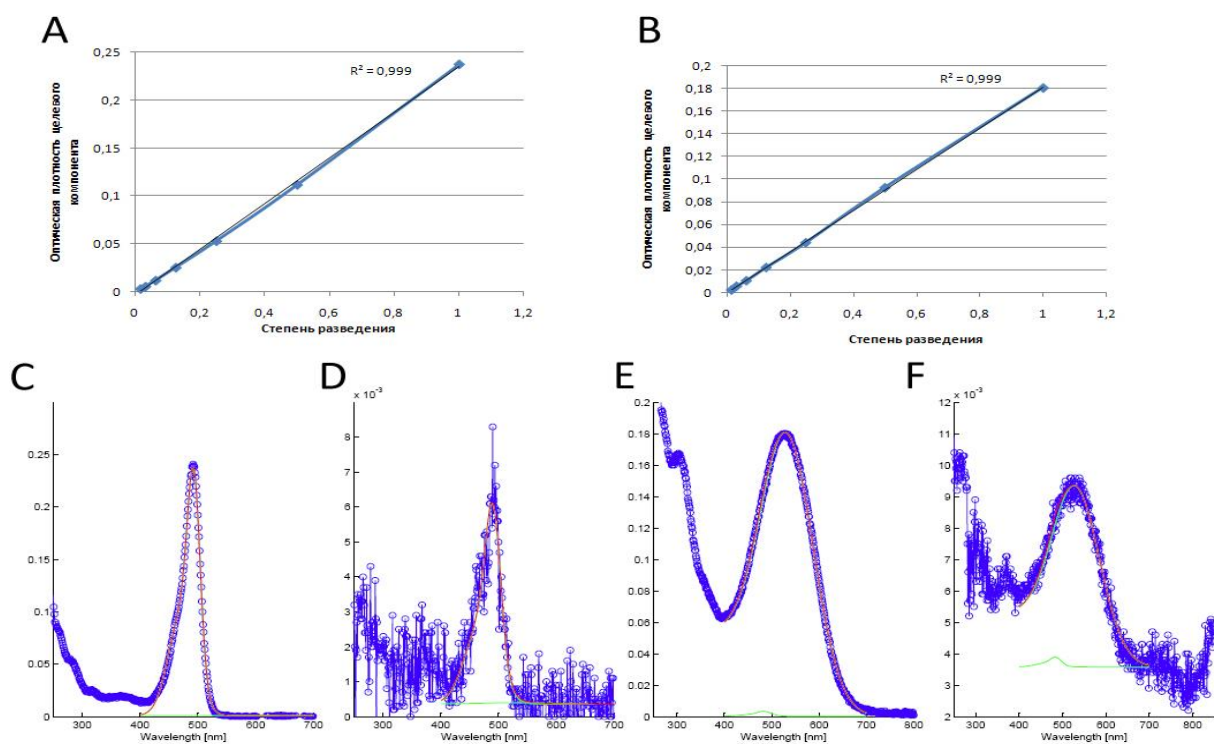


Рис. 15. Оценка эффективности использования алгоритма для определения пиков индивидуальных компонентов *in vitro*. Анализ спектров поглощения серии разведений FAM (A) и BHQ-1 (B) показывает, что спектр целевого компонента успешно определяется как в случае высоких (C и E), так и в случае низких (D, F) концентраций последнего (ошибка определения концентрации во всех представленных случаях не превышает 5%), динамический диапазон концентраций в случае анализа спектров индивидуальных красителей определяется диапазоном спектрофотометра и составляет около 200. C, D – FAM, E, F – BHQ-1.

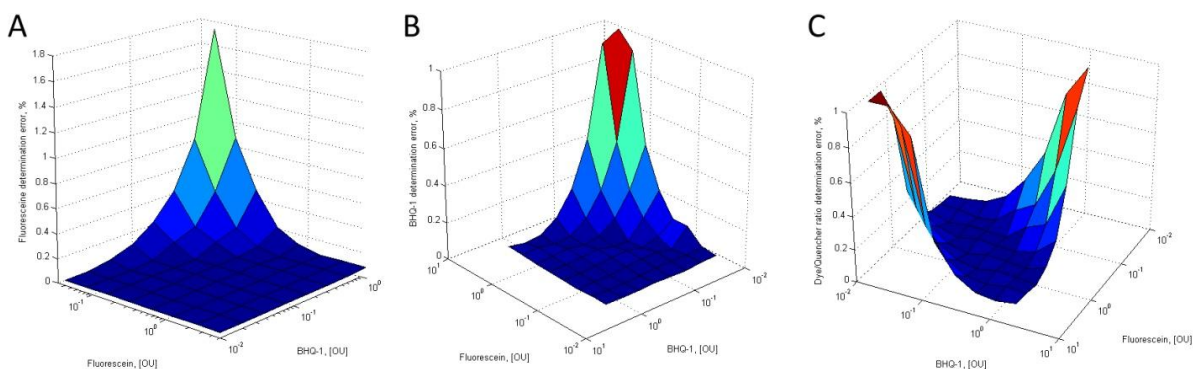


Рис. 16. Зависимость относительной ошибки определения оптической плотности FAM (A) и BHQ-1 (B) от оптической плотности FAM и BHQ-1 в растворе. Видно, что максимальное значение ошибки достигается при наибольшем соотношении BHQ-1/FAM в случае FAM, и FAM/BHQ-1 в случае BHQ-1, т.е. тогда, когда вклад определяемого компонента в суммарное поглощение минимален. Таким образом, наиболее точное определение соотношения краситель/гаситель в смеси достигается в тех случаях, когда это соотношение находится в ограниченных пределах (C). Для пары FAM/BHQ-1 эти пределы составляют от 5 до 0.15, при этом ошибка определения молярного соотношения краситель/гаситель не превышает 5%.

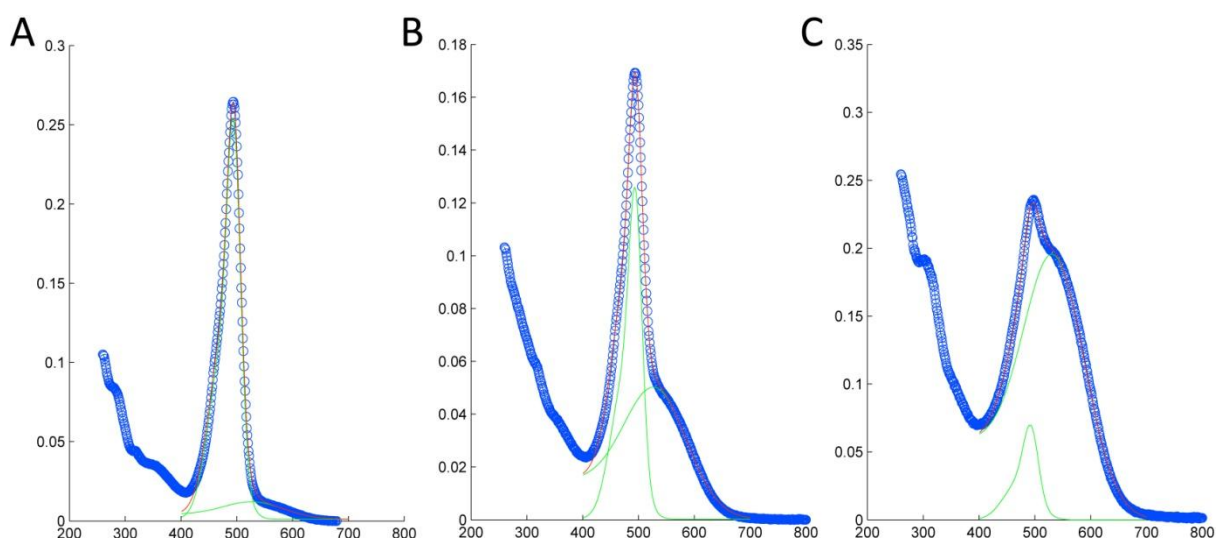


Рис. 17. Разложение суммарного спектра поглощения на спектры отдельных компонентов (FAM и BHQ-1) в случае высокого, среднего и низкого соотношения краситель/гаситель (А, В С, соответственно). Красным показана сумма спектров красителя и гасителя, зелёным – спектры по отдельности. Ошибка определения каждого из компонентов не превышает 5%.

Для анализа экспериментально полученных спектров поглощения требуется учитывать поглощение кюветы и растворителя. Так как поглощение измеряется в планшете, следует учитывать также оптическую неоднородность ячеек планшета. В рамках разработанного алгоритма учёт фонового поглощения осуществляется путём вычитания спектра растворителя из всех измеряемых спектров.

Таким образом, использование приведённого алгоритма позволяет разложить спектр поглощения олигонуклеотидного зонда и определить концентрации флуорофора, гасителя и олигонуклеотида, а также молярные соотношения указанных компонентов. Для определения степени гашения зонда помимо спектров поглощения для всех исследованных образцов снимались спектры флуоресценции и определялось соотношение флуоресценция/концентрация красителя. Величина этого соотношения служит показателем того, какая часть флуорофора ко-локализована с гасителем в составе олигонуклеотидного зонда и в конечном итоге определяет фоновую флуоресценцию зонда и уровень максимального разгорания.

Для того чтобы алгоритм анализа флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов мог широко использоваться в повседневной лабораторной практике, с использованием языка Matlab 7 был создан графический пользовательский интерфейс (рис. 18).

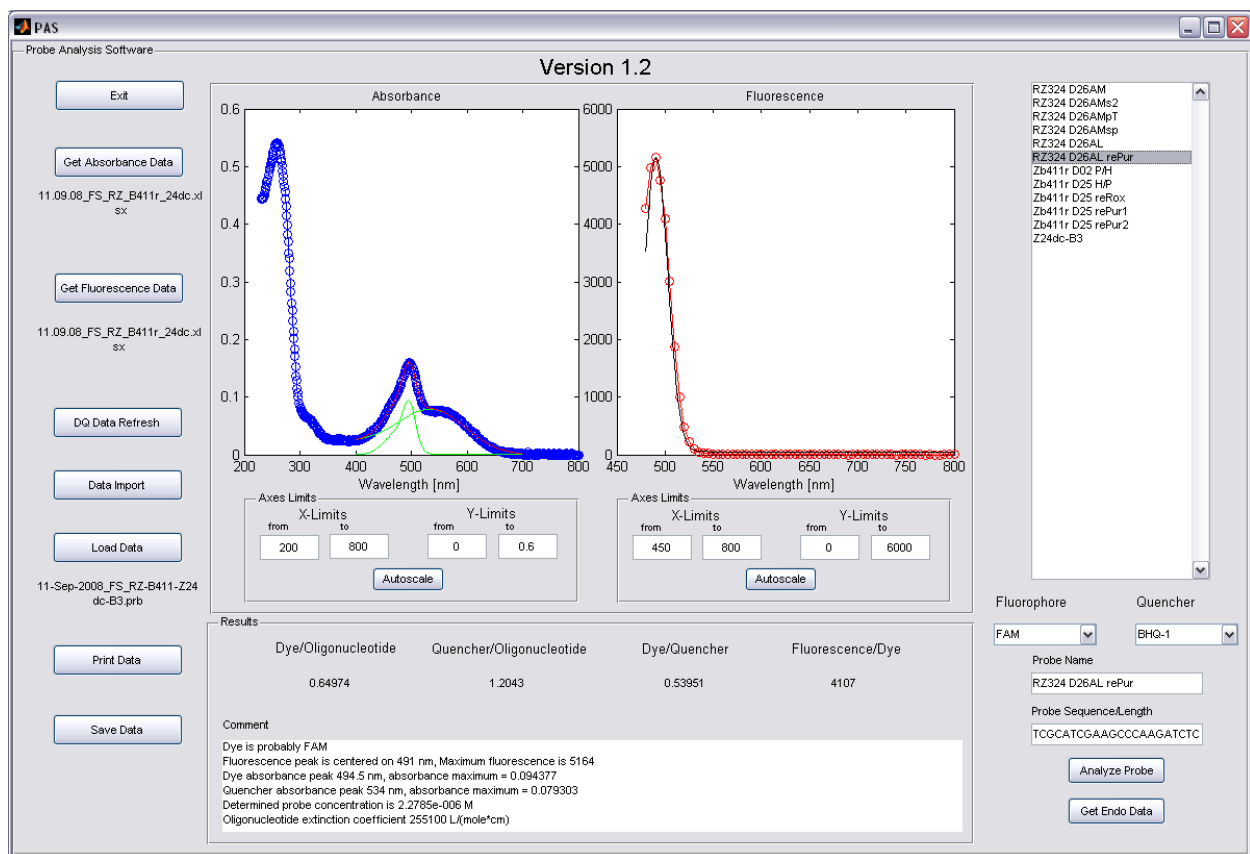


Рис. 18. Графический интерфейс пользователя. Вид главного окна программы PAS (Probe Analysis Software).

Созданный интерфейс обладает следующими характеристиками:

1. Позволяет импортировать данные из файлов Microsoft Excel.
2. Проводит анализ с учётом последовательности олигонуклеотидной составляющей зонда благодаря расчёту коэффициента экстинкции с использованием метода «ближайших соседей».
3. Автоматически определяет концентрацию зонда с учётом поглощения флуорофора и гасителя на длине волны 260 нм.
4. Рассчитывает молярные соотношения флуорофор/олигонуклеотид, гаситель/олигонуклеотид, флуорофор/гаситель и показатель флуоресценция/флуорофор.
5. Позволяет сохранять полученные данные в формате Microsoft Excel и собственном формате *.prb.
6. Позволяет обновлять существующую базу данных флуорофоров и гасителей без обновления версии программы, а также проводить повторный анализ *.prb файлов с использованием новых параметров аппроксимации без необходимости повторного импорта данных.
7. Позволяет распечатывать полученные численные характеристики и графики.

Оценка качества препаратов флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов показала, что оно оказывает сильное влияние на ПЦР в реальном времени. Наиболее значимое воздействие на ПЦР оказывают такие параметры, как концентрация олигонуклеотидного зонда, соотношение флуорофор/олигонуклеотид и флуоресценция/ флуорофор. На рисунке 19 приведён пример анализа олигонуклеотидного зонда, меченного флуорофором R6G. Три партии это зонда анализировались с использованием программы PAS а затем в равных количествах добавлялись в ПЦР.

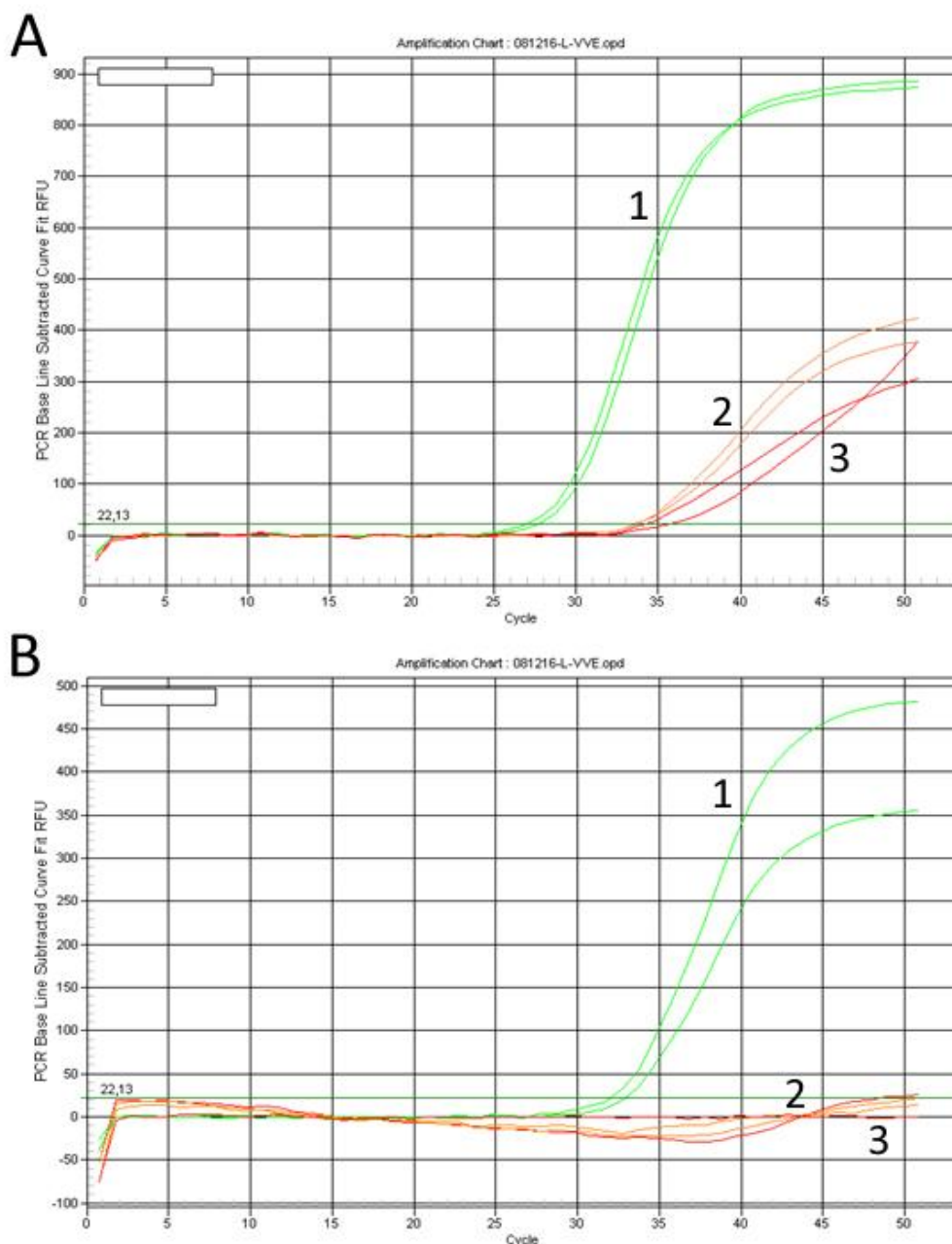


Рис. 19. Использование в ПЦР флуоресцентных зондов со значением параметра флуорофор/олигонуклеотид 0.678 (1), 0.348 (2) и 0.324 (3) в случае высокой (А) и низкой (В) концентрации матрицы. Зонды с большим соотношением демонстрируют лучшее разгорание и меньшие значения порогового цикла, что драматическим образом сказывается на чувствительности реакции.

Из данных, приведённых на рисунке видно, что величина порогового цикла находится в прямой зависимости от значения соотношения флуорофор/олигонуклеотид, в том случае, когда это соотношение выше (для зонда 1 оно составляет 0.678), значение порогового цикла для образца А меньше на 6 циклов, что означает ошибку количественной детекции более чем в 50 раз при сравнении результатов, полученных с использованием зонда партии 1 и зондов партий 2 и 3 (величина флуорофор/олигонуклеотид равна 0.348 и 0.324, соответственно). Более того, использование зондов 2 и 3 не позволяет выявить низкокопийную последовательность в образце 2, в то время как с использованием зонда 1 эта последовательность уверенно детектируется, что говорит о том, что качество зонда напрямую влияет на чувствительность реакции.

Аналогичные результаты были получены и при анализе зондов, меченных другими флуорофорами. Параметры ПЦР-кривой, такие как уровень увеличения флуоресценции при выходе реакции на плато и величина порогового цикла, зависят от степени мечения олигонуклеотида флуорофором, которое при анализе определяется величиной флуорофор/олигонуклеотид («Dye/Oligonucleotide»), и от способности флуорофора поглощать и излучать волны характерной длины, что зависит от его химического состояния и определяется соотношением флуоресценция/флуорофор («Fluorescence/Dye»). При этом решающее влияние на кинетику накопления флуоресцентного сигнала и достоверность количественной детекции оказывает именно величина соотношения флуорофор/олигонуклеотид, так после математической обработки ПЦР-кривые, приведённые на рис. 20А, приобретают вид, показанный на рисунке 21. Разница между пороговыми циклами для образцов с близкими значениями критерия флуорофор/олигонуклеотид (1.01 и 0.97 для образцов 1 и 2, соответственно) составляет менее 0.3 цикла, в то время как пороговый цикл для ПЦР-смеси, содержащей зонд партии 3, для которого этот критерий составлял 0.60, отличается от пороговых циклов образцов 1 и 2 более чем на 4 цикла. Это значит, что поочерёдное использование зондов партий 1(2) и 3 приведёт к ошибке количественной детекции с величиной около одного порядка. Стоит отметить и то, что зонд 1, характеризующийся большим значением параметра флуорофор/олигонуклеотид характеризуется лучшей кинетикой роста флуоресцентного сигнала.

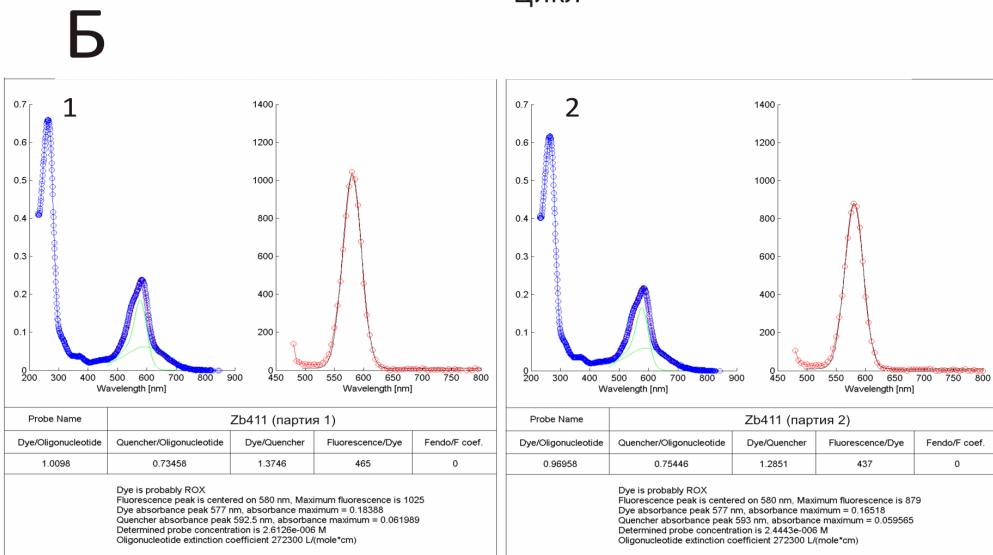
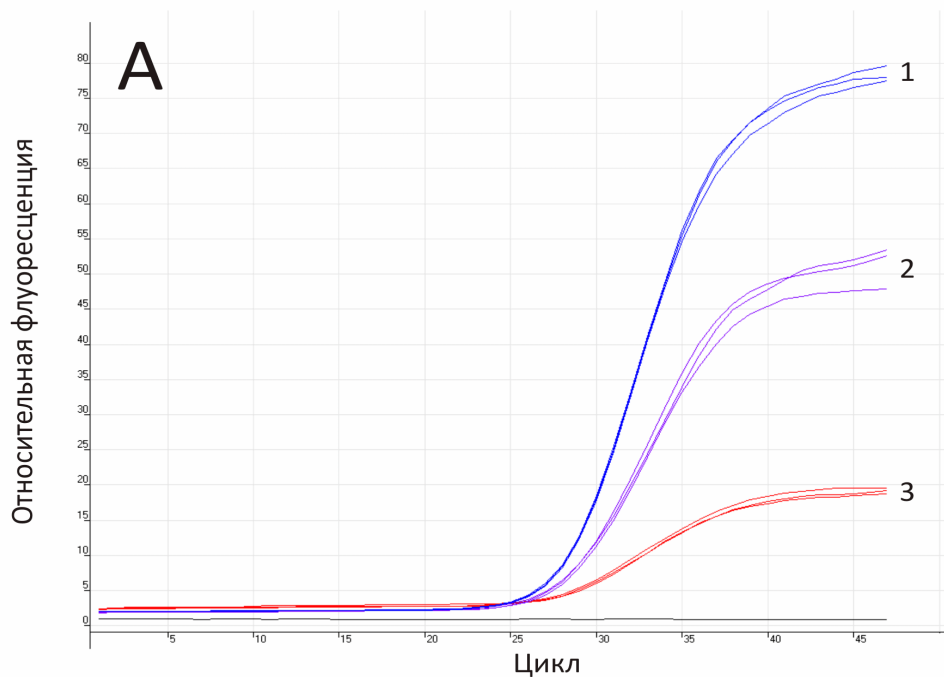


Рис. 20. ПЦР-амплификация с использованием разных партий зонда, меченого флуорофором ROX (А) и анализ спектров поглощения и флуоресценции соответствующих партий (Б). Нумерация зондов одинакова для обеих частей рисунка.

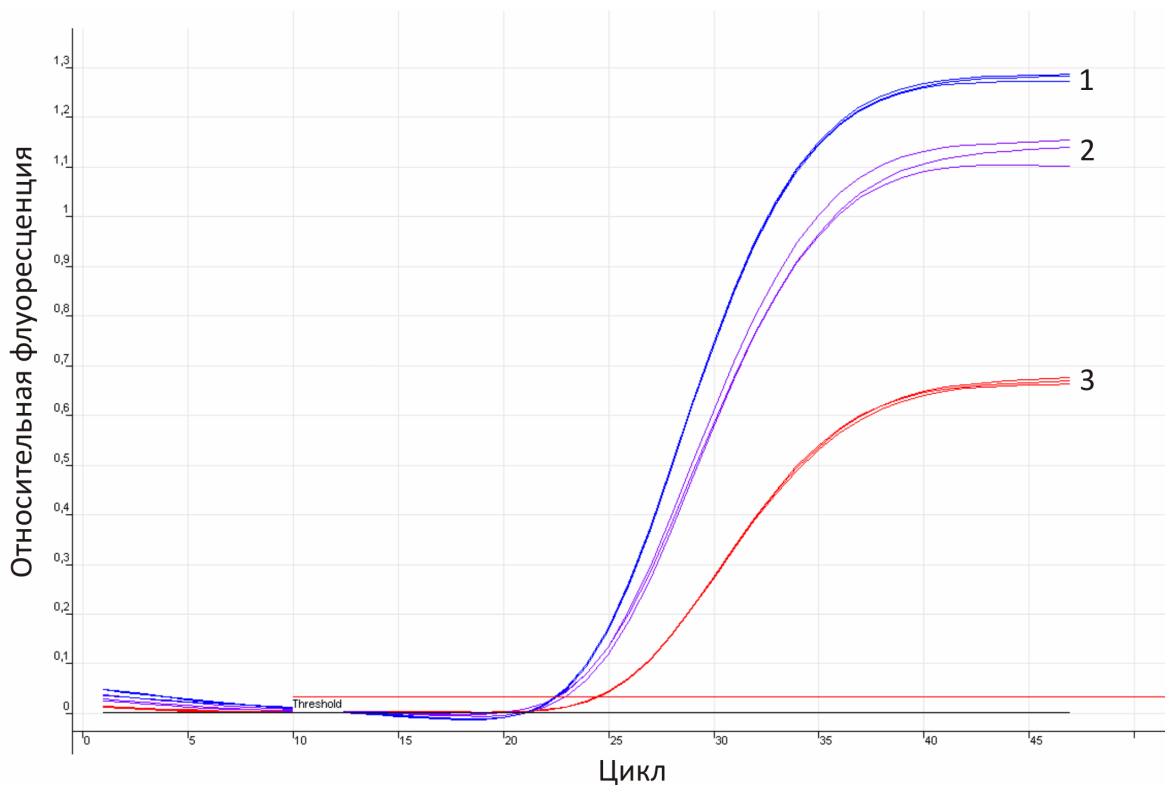


Рис. 21. Кривые роста флуоресцентных сигналов, полученных при использовании разных партий зонда, меченого ROX, после учёта фоновой флуоресценции и сглаживания, осуществляемого программой управления амплификатором RotorGene3000. Нумерация партий зонда соответствует таковой на рисунке 20.

Анализ данных, приведённых на рис. 22 дополняет полученную картину. При сравнении зондов, характеризующихся близкими значениями флуоресценция/флуорофор (зонды партий 2, 3 и 4), лучшую кинетику в ПЦР демонстрируют зонды, характеризующиеся лучшим соотношением флуорофор/олигонуклеотид (зонды партий 3 и 4, для которых это соотношение составляет 0.40 и 0.42, не отличаются по значению пороговых циклов (отличие средних составляет 0.01), в то время как флуоресценция ПЦР-смесей, в состав которых входит зонд партии 2, для которого это соотношение равно 0.55, достигает порогового уровня на 2 цикла раньше (рис. 23)). В то же время зонд партии 1, для которого характерно ещё большее значение параметра флуорофор/олигонуклеотид (0.63), не превосходит зонд партии 2, что объясняется тем, что флуорофор в его составе частично неактивен (соотношение флуоресценция/флуорофор составляет 1270, в то время как для зондов партий 2, 3, 4 этот показатель в среднем равен 6300), к сходным выводам приводит и анализ необработанной кривой роста флуоресценции ПЦР-смесей, содержащих этот зонд, для которых характерны низкие значения фоновой флуоресценции и флуоресценции после выхода реакции на плато. Тем не менее, с точки зрения кинетики расщепления, зонд партии 1 близок к зонду партии 2, что подтверждает тот факт, что доминирующее влияние на кинетику ПЦР оказывает

соотношение флуорофор/олигонуклеотид. Аналогичные данные были получены также для зондов, меченых FAM (данные не приводятся).

Установление аналитической зависимости между параметрами флуоресцентно-меченого олигонуклеотида и кинетикой ПЦР выходит за рамки текущего этапа данной работы. Тем не менее, очевидное влияние качества препарата флуоресцентного зонда на количественные оценки, производимые с использованием метода ПЦР в реальном времени, делает необходимым характеризацию качества зондов как на этапе поиска оптимальной последовательности олигонуклеотидной части (исключение из анализа заведомо некачественных препаратов зондов), так и во время проведения серии экспериментов, в рамках которой целесообразным является исключительно использование партий зондов, характеризующихся сходными значениями ключевых параметров.

Таким образом, в рамках данного этапа работы оптимизирован ионный состав реакционной смеси для ПЦР в реальном времени и метод «горячего старта»; показана важность оценки качества всех используемых флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов и разработан метод, позволяющий проводить подобную оценку.

Использование описанных методологических приёмов позволило добиться чувствительности ПЦР в 10 копий на реакцию для трёх описанных модельных систем и достоверной детекции копийности последовательности в диапазоне от 10 до 10^8 копий на реакционную смесь.

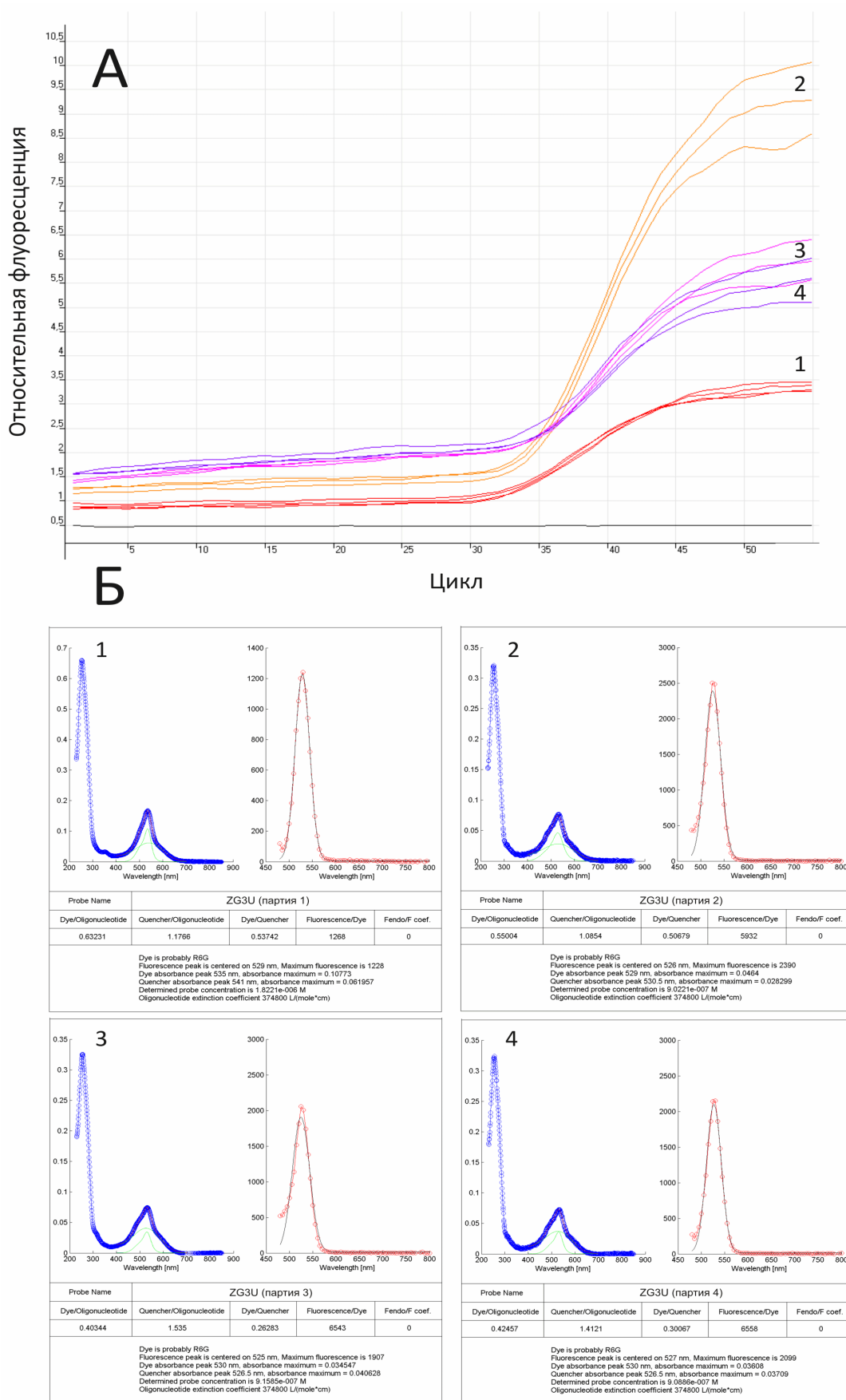


Рис. 22. ПЦР-кривые, полученные при использовании различных партий зонда, меченого ROX (А), и анализ спектров зондов этих партий (Б). Нумерация зондов одинакова для обеих частей рисунка.

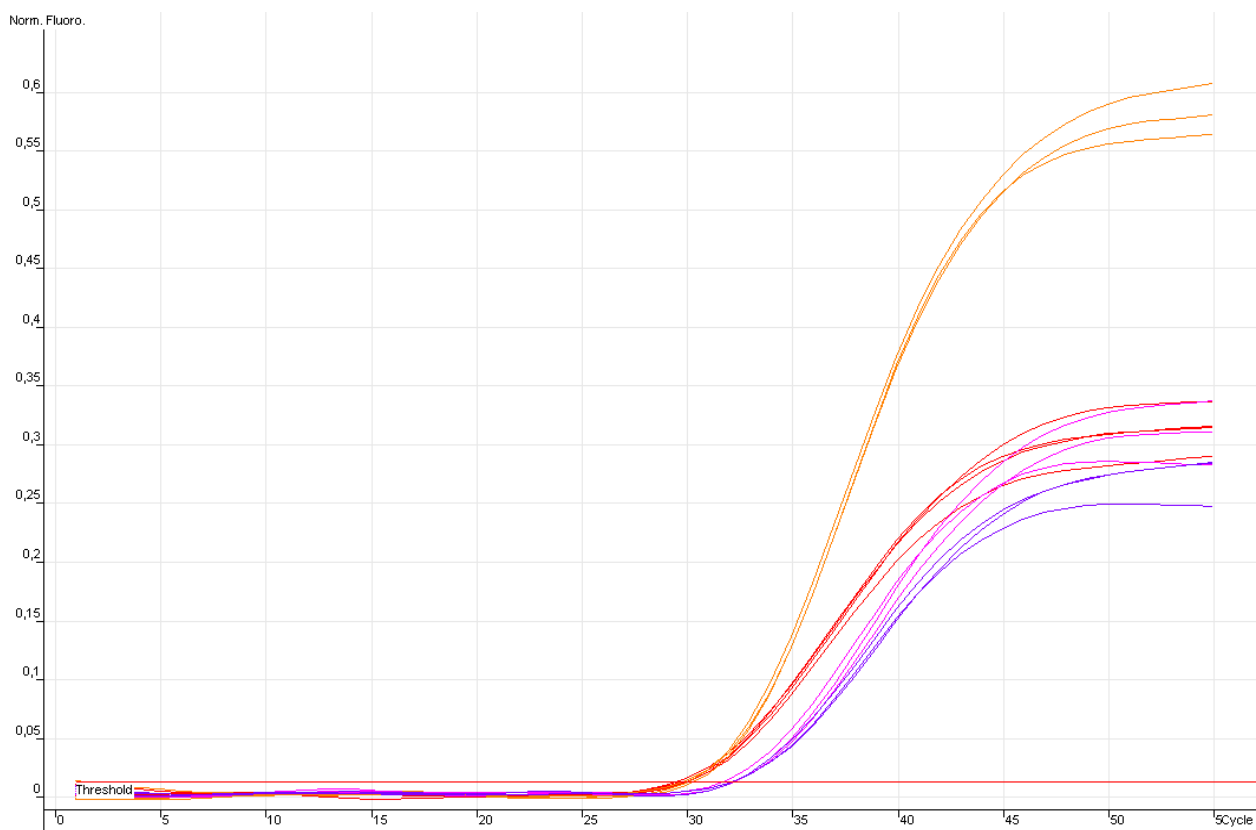


Рис. 23. Кривые роста флуоресцентных сигналов, полученных при использовании разных партий зонда, меченного ROX, после учёта фоновой флуоресценции и сглаживания. Цветовые обозначения партий зонда соответствует таковым на рисунке 17

4. Исследование контекстных характеристик нетранслируемых районов мРНК генов животных, связанных с эффективностью трансляции в норме и при стрессе.

Исследование трансляционно-значимых структурных характеристик мРНК: оценка контекстной зависимости параметра «размер доступной для взаимодействия поверхности» (accessible surface area, ASA).

Для исследования взаимосвязи между контекстными и структурными характеристиками мРНК эукариот, которые могут влиять на эффективность функционирования трансляционных сигналов, нами был проведен компьютерный анализ реконструированных трехмерных структур РНК и РНК-белковых комплексов, аннотированных в банке данных PDB. Для этих структур был рассчитан параметр accessible surface area (ASA), отражающий доступность поверхности молекулы РНК для молекул воды. Этот параметр является одной из важных характеристик молекул полимеров, поскольку почти полностью определяет энергию их гидрофобных взаимодействий. Кроме того, взаимодействие молекул РНК и других биологических макромолекул (лигандов, белков) осуществляется через экспонированные

(доступные для взаимодействия) поверхности. Параметр ASA отражает реакционную способность соответствующего участка молекулы и используется для вычислений активных центров в молекулах белков (например, Gong et al., 2009). Недавно были определены характеристики ASA для молекул ДНК (Ahmad, 2009), однако РНК оставалась не изученной. Следует отметить, что существует много примеров, когда в мРНК расположены сайты связывания различных регуляторных белков. При этом, структура таких сайтов в подавляющем большинстве случаев не известна: молекула РНК в растворе весьма лабильна и может существовать в виде набора переходящих друг в друга конформаций. Связывание белковых факторов с РНК осуществляется в результате распознавания как контекста (комбинаций нуклеотидов), так и специфических комбинаций контекста и вторичной структуры (например, Iron Responsive Element (Volz, 2008)) (Abaza and Gebauer, 2008; Sonenberg and Hinnebach, 2009; Van Der Kelen et al., 2009). При этом, нуклеотиды в пределах сайта связывания различаются по своей значимости – мутации в некоторых позициях могут приводить к изменению аффинности, в то время как другие позиции нейтральны. Это приводит к хорошо известному феномену полиморфизма сайтов связывания регуляторных белков. Это также значительно затрудняет их распознавание – в большинстве случаев участок нуклеотидной последовательности, взаимодействующий с белком, может быть описан как консенсус или частотная (весовая) матрица. Учет физико-химических параметров (таких, как ASA), как раз может значительно улучшить качество предсказания функционально-активных сайтов, что особенно справедливо для лабильных по структуре молекул РНК (Montange and Batey, 2008; Chatterjee and Pal, 2009; Liu et al., 2009).

В рамках проекта нами совместно с коллективом исследователей из Индии и Японии было проведено такое исследование зависимости параметра accessible surface area от нуклеотидной последовательности (контекста). Для этого из банка данных PDB была выделена выборка из 882 3D-структур, содержащих молекулы РНК. В результате обработки этой выборки (удаление гомологов с помощью программы BLASTCLUST; отбор участков, размер которых превышает 19 нуклеотидов; отбраковка участков с неканоническими нуклеотидами) были отобраны 87 структур, которые далее были использованы для компьютерного анализа. Вычисление значений ASA было выполнено с помощью программы NACCESS (Hubbard and Thornton, 1993).

В результате нами были получены следующие данные: оказалось, что значение параметра ASA для нуклеотида в молекуле РНК контекстно-зависимо – то есть, в значительной степени определяется типом соседних нуклеотидов. На рисунке 24 приведены средние значения ASA на нуклеотид для различных триплетных комбинаций.

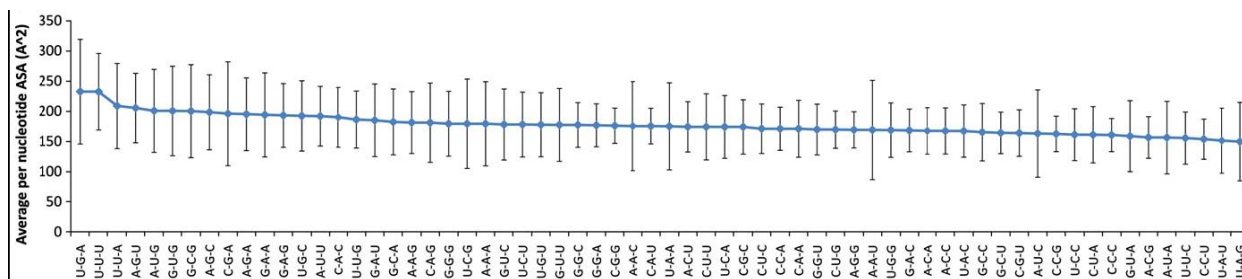


Рис. 24. Среднее значение ASA для триплетов в составе молекул РНК (также приведено стандартное отклонение) (Singh et al., 2010).

Можно видеть, что некоторые трансляционно-значимые комбинации нуклеотидов характеризуются высоким значением ASA:

- нонсенс-кодон UGA (наивысшее значение ASA). Этот нонсенс-кодон является наиболее распространенным сайтом терминации трансляции у большинства эукариот (в частности, у млекопитающих). Кроме того, этот стоп-кодон наиболее часто регулируется (случаи рекодинга, readthrough и т.п. обычно связаны именно с UGA).

- стартовый кодон AUG (а также второй по частоте встречаемости у бактерий стартовый кодон GUG) находятся на пятом и шестом месте по величине параметра ASA.

- центральный участок сайта Шайна-Дальгарно (GAG в составе GGAGG) также характеризуется высоким значением этого параметра.

С нашей точки зрения, величина ASA отражает доступность участка РНК для взаимодействия с другими молекулами. По-видимому, вполне закономерно, что практически универсальный сигнал инициации трансляции – кодон AUG – отличается одним из наиболее высоких значений этого индекса. Скорее всего, именно высокая степень «открытости для взаимодействия» послужила одной из причин выбора именно AUG в качестве инициаторного кодона на ранних этапах эволюции. Таким образом, полученные нами результаты позволили разработать новый способ оценки «реакционоспособности» участков в составе молекул РНК, который может быть использован для разработки новых высокоэффективных методов распознавания функционально-активных сайтов

Обнаружено, что в эукариотических мРНК могут содержаться эволюционно-консервативные альтернативные сайты инициации трансляции и такие мРНК могут дополнительно кодировать новые изоформы белка, различающиеся по размеру N-концевого домена.

В настоящее время считается, что мРНК генов эукариот содержат одну рамку считывания и один стартовый кодон трансляции и возможность кодирования нескольких белков одной мРНК не принимается во внимание. Однако, это противоречит некоторым экспериментальным данным: показано, что рибосомы могут иницировать трансляцию на

нескольких стартовых кодонах с помощью механизмов «сканирования с подтеканием» (leaky scanning) и реинициации трансляции. В частности, если контекст кодона AUG субоптимален, часть 40S субъединиц рибосом не распознает его в качестве инициаторного кодона, продолжает сканирование матрицы в 3'-направлении и может инициировать трансляцию на нижерасположенном AUG. Согласно некоторым оценкам, существующие представления о кодирующем потенциале эукариотических генов существенно занижены и «альтернативная трансляция» вносит весомый вклад в формирование протеома эукариот. В рамках проекта был проведен компьютерный анализ структурно-функциональной организации эукариотических мРНК, который показал положительную взаимосвязь между эффективностью сигнала инициации трансляции (оптимальностью или субоптимальностью нуклеотидного контекста) и присутствием эволюционно-консервативных альтернативных стартовых кодонов в начале CDS (Bazykin and Kochetov, 2010). Эти данные являются доказывающей функциональную значимость альтернативных сайтов инициации трансляции.

5. Изучение влияния ксенобиотической активации D2-подобных рецепторов на метаболизм ювенильного гормона в нормальных и стрессирующих условиях.

Для того, чтобы выяснить, как влияет на деградацию ЮГ активация D2-подобных рецепторов, был использован бромокриптин (БК; синтетический высокоаффинный агонист D2-подобных рецепторов дрозофилы) (Hearn et al., 2002). В экспериментах с 2-суточными самками, подопытных мух сразу после вылета помещали в стаканы, дно и 1 см стенок которых покрывали фильтровальной бумагой, пропитанной 0,5 мл питательного раствора, содержащего 0,5% сахарозы, 0,2% дрожжей и 1мМ БК. В контрольной серии БК в раствор не добавляли. В опытах с 6-суточными самками, мух в течение четырех суток содержали на питательной среде, не содержащей БК, затем мух подопытной серии помещали на двое суток на среду с добавлением БК. Стрессировали мух, помещая стаканы, в которых они содержались, на 1 час в термостат с температурой 38°C. Деградацию ЮГ измеряли радиометрическим методом.

На рис. 25 А показаны результаты измерения уровня деградации ЮГ в нормальных условиях и после теплового стресса у молодых (2-суточных) самок линии *w¹¹¹⁸ D. melanogaster*, обработанных БК и контрольных (без обработки). Рис. 25 Б демонстрирует результаты аналогичного эксперимента, проведенного на половозрелых (6-сут.) самках той же линии. Хорошо видно, что обработка мух БК вызывает в нормальных условиях у самок обоих возрастов существенное снижение уровня деградации ЮГ (различия с контролем достоверны

при $p < 0,001$ для молодых самок и при $p < 0,01$ для половозрелых). Поскольку показано, что системное введение БК активирует Д2-подобные (DD2R) рецепторы дрозофилы (Hearn et al., 2002), можно заключить, что полученные нами данные свидетельствуют о том, что ингибирующее влияние ДА на активность ферментов, деградирующих ЮГ у дрозофилы, осуществляется через посредство этих рецепторов. Более того, эти данные дают свидетельство в пользу предложенной нами гипотезы о том, что стадие-специфичность влияния дофамина на уровень деградации ювенильного гормона у самок дрозофилы связана с изменением в ткани-мишени (жировом теле – месте синтеза ферментов деградации ЮГ) состава и/или числа Д1- и Д2-подобных рецепторов: молодые и половозрелые самки, по-видимому, различаются по числу Д2-подобных рецепторов в жировом теле, поскольку их активация у молодых самок вызывает более резкое снижение уровня деградации ЮГ (на 38%), чем у половозрелых самок (на 21%).

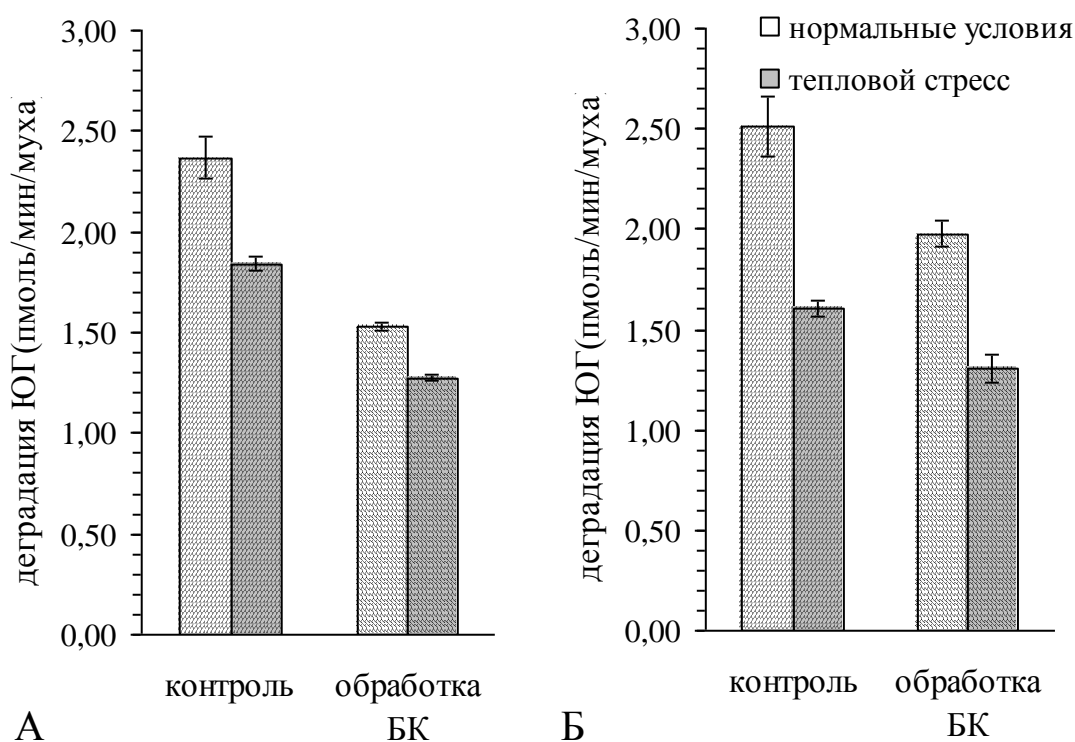


Рис. 25. Влияние активации Д2-подобных рецепторов (кормление мух БК) на уровень деградации ЮГ у (А) 2-суточных и (Б) 6-суточных самок *D. melanogaster* линии w1118 в нормальных условиях и после теплового стресса (38°C, 1ч).

Для того, чтобы выяснить, влияет ли активация Д2-подобных рецепторов дрозофилы на ответ системы деградации ЮГ на стрессирующее воздействие, мы подвергли молодых и половозрелых самок из групп, обработанных БК и контрольных, воздействию высокой температуры (38°C, в течении 1 часа) и измерили у них уровень деградации ювенильного гормона. Полученные результаты также показаны на рисунке 25. Хорошо видно, что в обеих

группах (обработанных БК и контрольных) уровень деградации ЮГ значительно снижается и у молодых (рис. 25 А), и у половозрелых (рис. 25 Б) самок (различия с группами при 25°C достоверны при $p < 0,001$ для контрольных и подопытных самок обоих возрастов). Таким образом, активация Д2-подобных рецепторов, вызываемая БК, не влияет на инициацию ответа системы деградации ЮГ на действие стрессора.

6. Исследование метаболизма ЮГ у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена *DDR2* в *CA* - железе, производящей гормон.

Уровень деградации ЮГ и плодовитость мух, как критерии оценки уровня синтеза гормона. Для выяснения такой возможности мы исследовали уровень синтеза ЮГ (активность ключевого фермента синтеза гормона – ацилметилтрансферазы ювенильного гормона (ЮГАМТ)), уровень деградации ЮГ и плодовитость *D. melanogaster* с генетической абляцией части клеток *CA* (рис. 26).

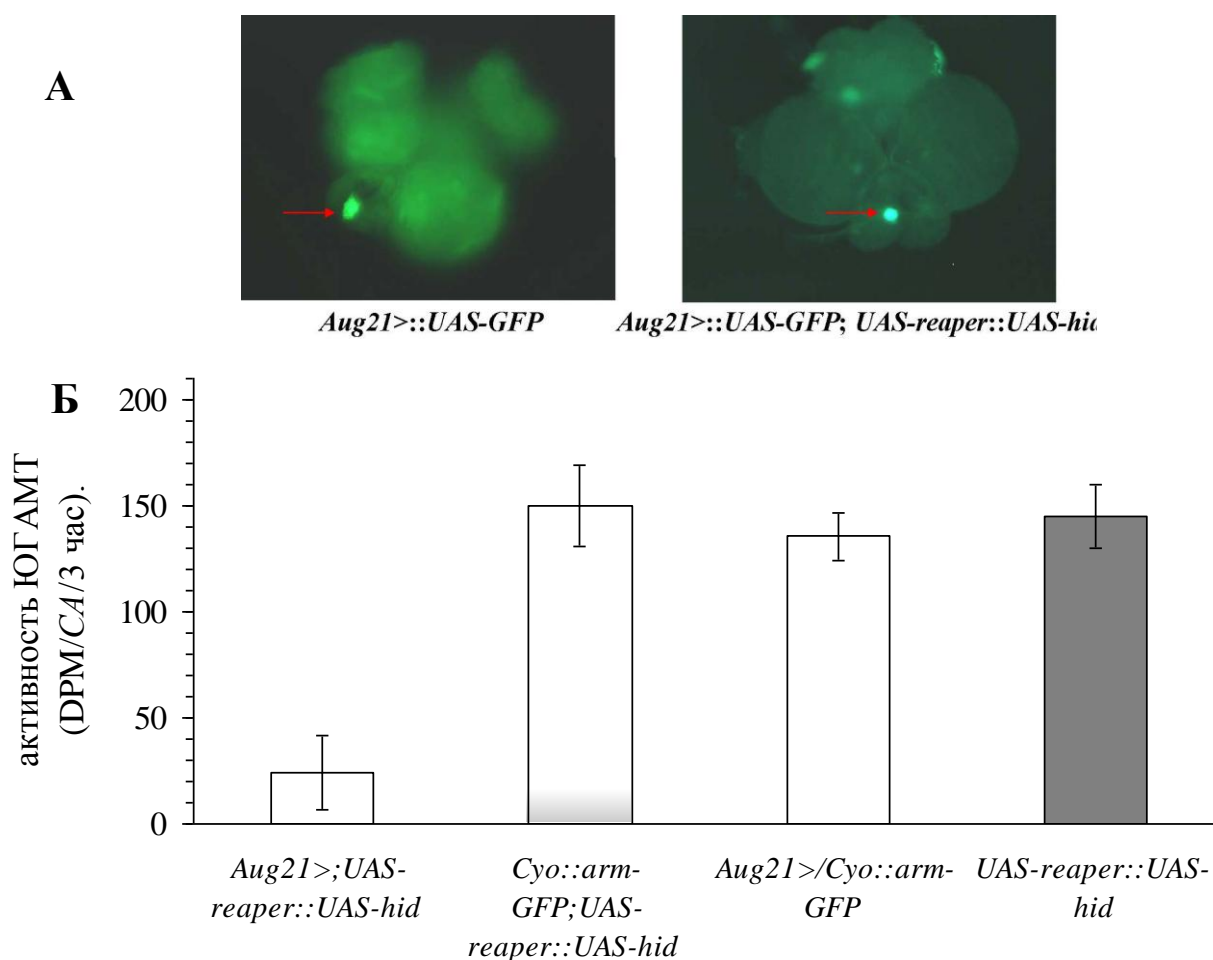


Рис. 26. Влияние активаторов клеточной смерти *UAS-reaper* и *UAS-hid* под драйвером *Aug21>* на (А) размер *CA*, и (Б) активность ЮГАМТ у личинок блуждающей стадии *D. melanogaster*.

На рис. 26 А показано сравнение размеров *corpus allata* (железа показана стрелкой) у личинок блуждающей стадии линии *Aug21>::UAS-GFP;UAS-reaper::UAS-hid*, несущей два активатора клеточной смерти (UAS-reaper и UAS-hid) и контрольной линии *Aug21>::UAS-GFP*. Хорошо видно уменьшение размеров *corpus allata* у первых.

На рис. 26 Б представлены результаты измерения активности ЮГАМТ у личинок гибридов *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* с абляцией *corpus allata*, контрольных гибридов *Cyo::arm-GFP;UAS-reaper::UAS-hid* (UAS-reaper и UAS-hid не экспрессируются в отсутствие драйвера *Aug21>*) и личинок родительских линий *Aug21>/Cyo::arm-GFP* и *UAS-reaper::UAS-hid*. Видно, что абляция части клеток *corpus allata* ведет к драматическому (в 5 раз) снижению активности ЮГАМТ (различия с контрольными группами достоверны при $p<0,001$) и, соответственно, к снижению синтеза ЮГ.

На рис. 27 приведены результаты измерения уровня деградации ЮГ у самок со сниженным уровнем синтеза ЮГ (*Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid*) и самок контрольных групп (*Cyo::arm-GFP;UAS-reaper::UAS-hid*, *Aug21>/Cyo::arm-GFP* и *UAS-reaper::UAS-hid*).

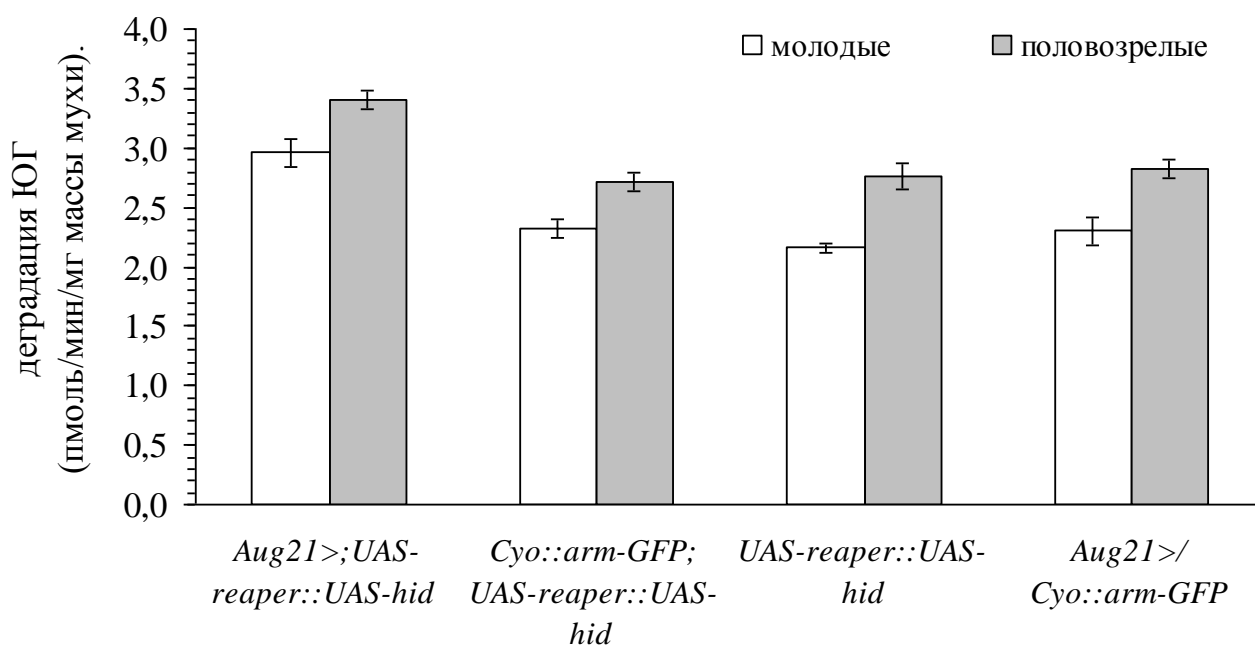


Рис. 27. Влияние снижения уровня синтеза ЮГ (*Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* мухи) на уровень его деградации у самок *D. melanogaster*.

Хорошо видно, что снижение уровня синтеза ювенильного гормона вызывает и у молодых (1-суточных) и у половозрелых (6-суточных) *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* самок существенное возрастание уровня деградации ЮГ (различия с контрольными группами достоверны при $p<0,001$). Для того, чтобы убедиться, что именно снижение синтеза ЮГ вызывает повышение его деградации у *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* самок, мы апплицировали им ювенильный гормон, растворенный в ацетоне и через 10 час после

апликации измерили у них уровень деградации ЮГ. Контрольным *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* и *Cyo::arm-GFP;UAS-reaper::UAS-hid* самкам апплицировали соответствующее количество ацетона. Результаты эксперимента показаны на рис. 28. Ясно, что фармакологическое повышение титра ЮГ восстанавливает деградацию гормона до уровня, характерного для контрольных самок (*Cyo::arm-GFP;UAS-reaper::UAS-hid*).

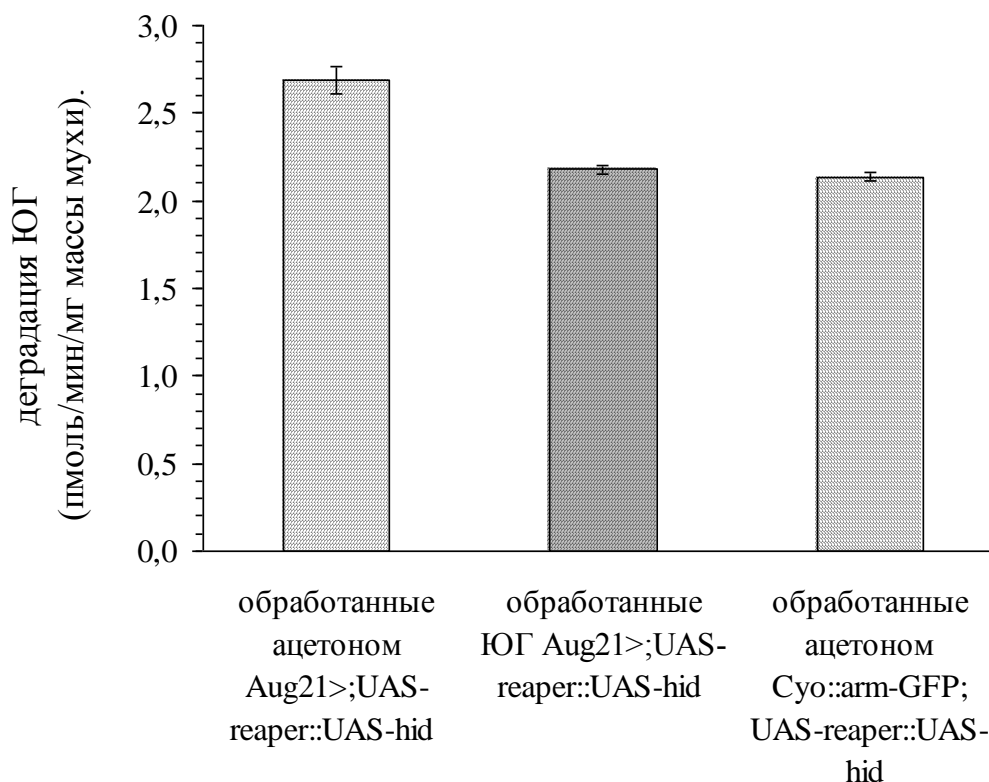
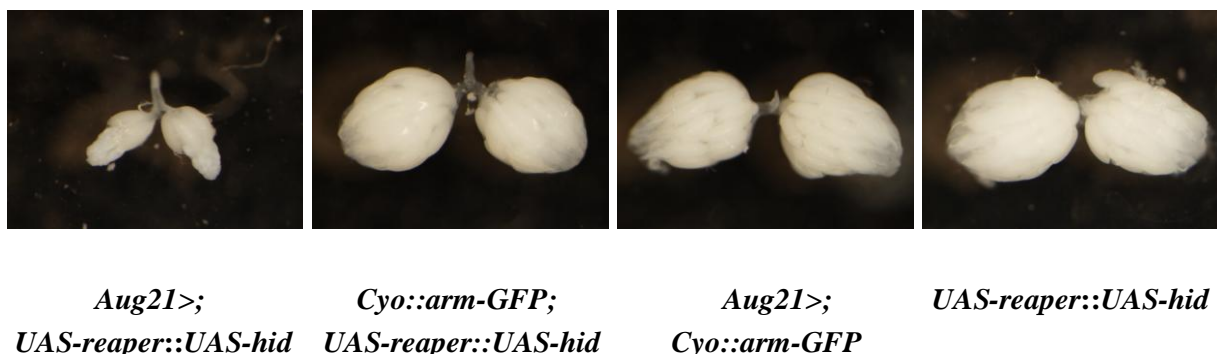


Рис. 28. Влияние фармакологического повышения титра ЮГ на уровень его деградации у самок *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* с генетически сниженным уровнем синтеза ЮГ.

Таким образом, мы подтвердили, что уровень деградации ювенильного гормона может служить индикатором уровня его синтеза: снижение синтеза ЮГ сопровождается повышением его деградации и, соответственно снижением его титра, а повышение синтеза - снижением деградации гормона и, соответственно повышением титра ЮГ.

Поскольку ювенильный гормон является гонадотропным гормоном еще одним индикатором его уровня у мух может служить их репродуктивная функция. Для того, чтобы это проверить мы оценили размер яичников и плодовитость гибридов *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* со сниженным титром (в результате снижения синтеза и повышения деградации) ЮГ и контрольных групп. Результаты показаны на рис. 5. Хорошо видно, что *Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* самки: (1) отличаются резко сниженным размером яичников по сравнению с

A



B

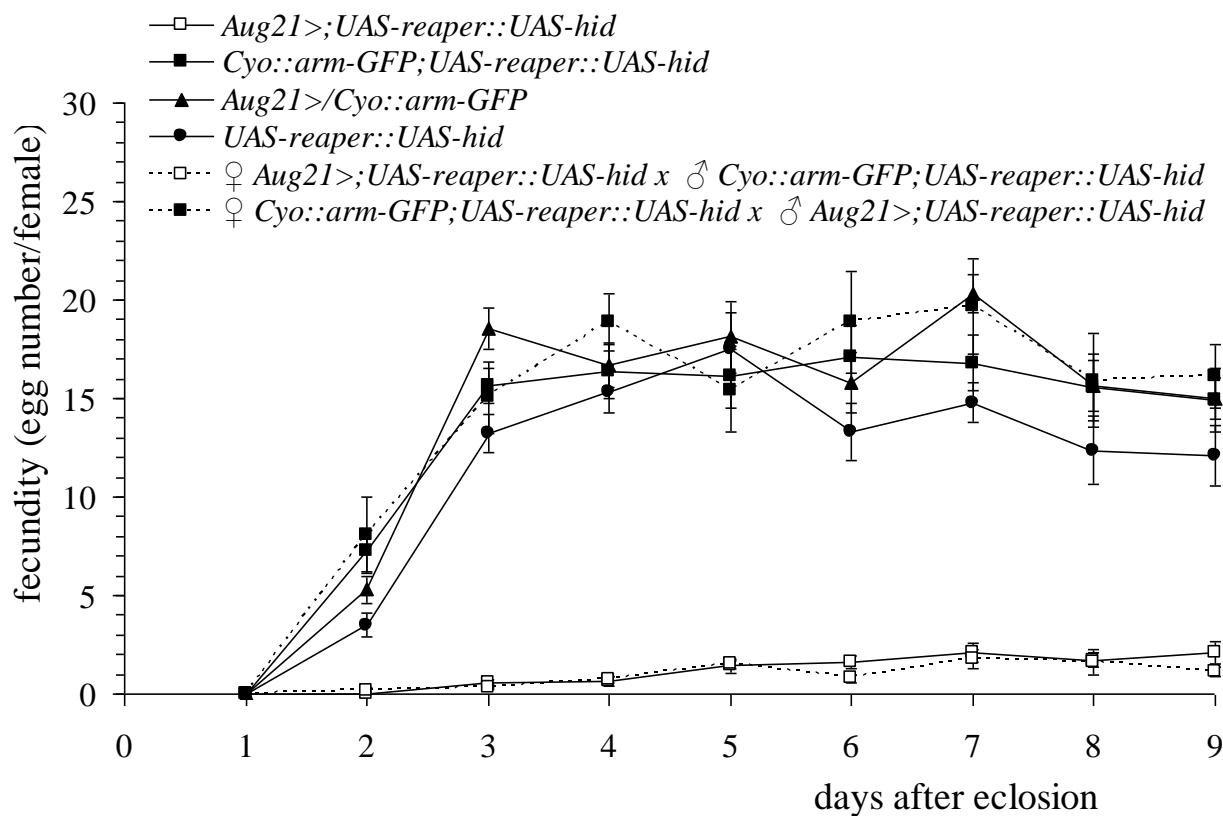


Рис. 29. Влияние снижения уровня синтеза ЮГ (*Aug21>;UAS-reaper::UAS-hid* мухи) на (А) размер яичников, (В) плодовитость самок и репродуктивную способность самцов (по оси Y – плодовитость (число яиц/самка), по оси X – дни после вылупления).

особями контрольных групп (рис. 29 А); (2) начинают откладывать яйца на сутки позже самок контрольных групп (рис. 29 В); (3) характеризуются драматически сниженной плодовитостью вне зависимости от того, оплодотворены ли они самцами своего генотипа или самцами контрольной группы (рис. 29 В). Важно отметить, что снижение уровня ЮГ не влияет на репродуктивную функцию самцов дрозофилы.

Таким образом, мы установили, что плодовитость самок может служить еще одним индикатором уровня синтеза ЮГ.

Влияние сниженной экспрессии гена DDR2 в СА на уровень синтеза ЮГ, оцениваемого по уровню его деградации в нормальных и стрессирующих условиях и плодовитости.

Для того, чтобы проверить предположение о том, что ингибирующее влияние ДА на синтез ювенильного гормона в *corpus allata* опосредуется Д2-подобными рецепторами, мы оценили уровень синтеза ювенильного гормона (используя деградацию ЮГ и плодовитость в качестве его индикаторов) у гибридных самок *Aug21>UAS-ds-DD2R* со сниженной экспрессией гена *DDR2* в *corpus allata*, гибридных самок *Aug21>w1118* с генотипом аналогичным *Aug21>UAS-ds-DD2R* (линия *w1118* является предшественницей линии *UAS-ds-DD2R* (Drapet et al., 2007)), но с нормальным уровнем экспрессии гена *DDR2*, и самок родительских линий - *Aug21-Gal4/Cyo::arm-GFP*, *UAS-ds-DD2R* и *w1118*. Результаты показаны на рисунках 30-32.

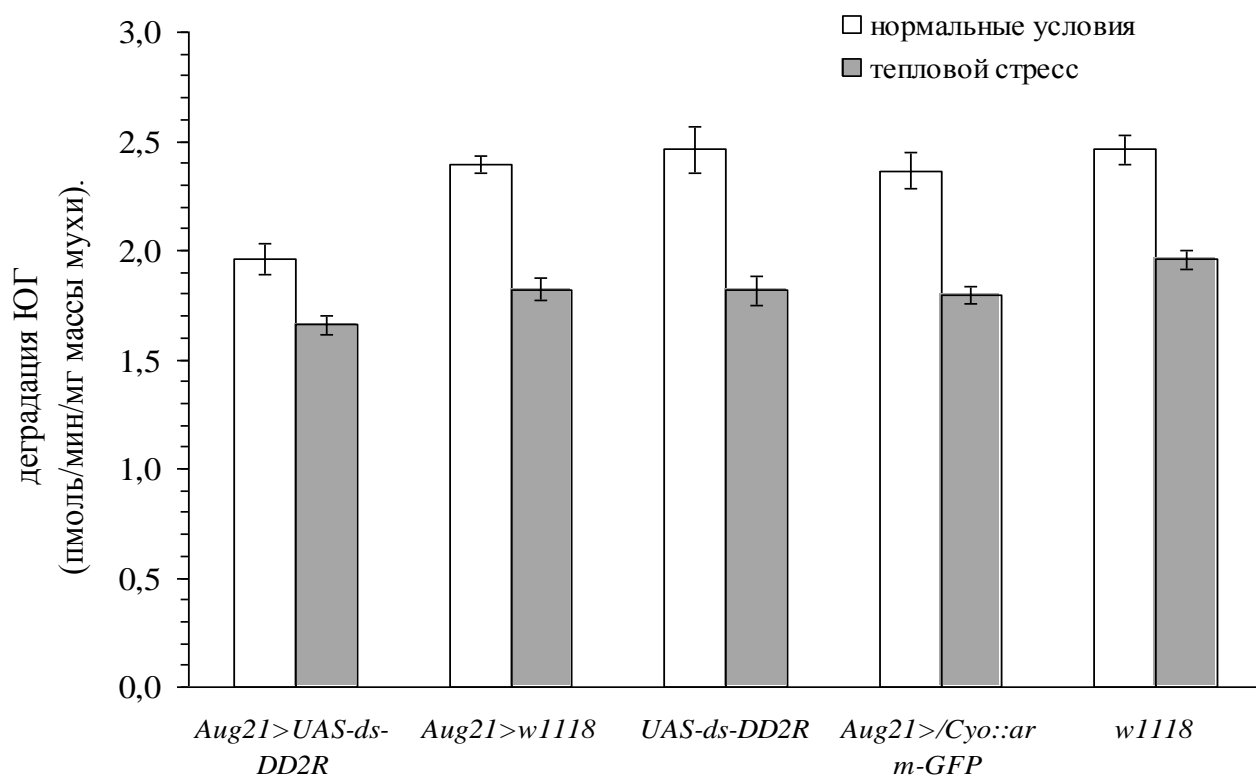


Рис. 30. Влияние снижения экспрессии гена *DD2R* (*Aug21>UAS-ds-DD2R* мухи) на уровень деградации ЮГ в норме и при тепловом (38°C, 1 час) стрессе.

На рис. 30 видно, что снижение числа *DD2R* в *corpus allata* у самок *Aug21>UAS-ds-DD2R* приводит к снижению уровня деградации ювенильного гормона (различия со всеми контрольными группами достоверны при $p < 0,001$). Видно также, что снижение числа Д2-подобных рецепторов не препятствует инициации ответа системы деградации

ювенильного гормона на действие стрессора: уровень деградации снижается при стрессе у *Aug21>UAS-ds-DD2R* самок так же, как у самок контрольных групп (различия между особями при 25°C и 38°C достоверны при $p<0,001$ для всех исследуемых групп). Однако интенсивность этого ответа различна у самок со сниженным числом DD2R и у контрольных групп (рис. 31).

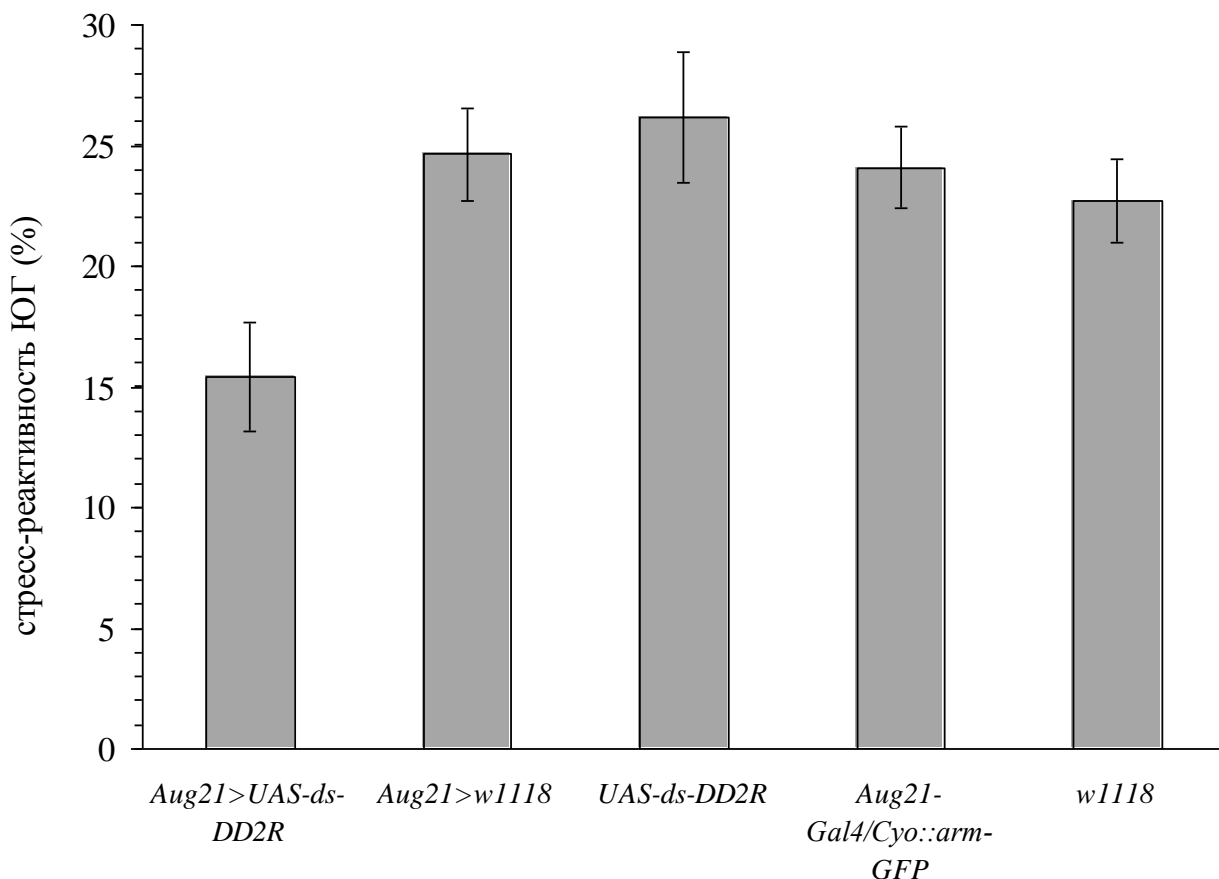


Рис. 31. Влияние снижения экспрессии гена DD2R (*Aug21>UAS-ds-DD2R* мухи) на уровень стресс-реактивности системы деградации ЮГ.

Действительно, на рис. 31 видно, что стресс-реактивность (процент снижения признака при стрессе) системы деградации ювенильного гормона у самок *Aug21>UAS-ds-DD2R* существенно ниже, чем у самок всех контрольных групп (различия достоверны при $p<0,001$). Таким образом, снижение уровня деградации ЮГ у самок со сниженным числом DD2R в железе, продуцирующей этот гормон, свидетельствует о повышении синтеза ЮГ. Как следует из результатов предыдущего раздела, еще одним индикатором уровня синтеза ювенильного гормона является плодовитость самок дрозофилы. На рис. 32 показаны результаты оценки плодовитости особей со сниженным числом DD2R в *corpus allata* (*Aug21>UAS-ds-DD2R*) и у мух контрольных групп. Ясно видно, что плодовитость первых существенно повышена, причем это характерно только для самок, поскольку плодовитость самок *Aug21>w1118*, оплодотворенных самцами с генотипом *Aug21>UAS-ds-DD2R* не отличается от их плодовитости при спаривании с самцами своего генотипа (*Aug21>w1118*).

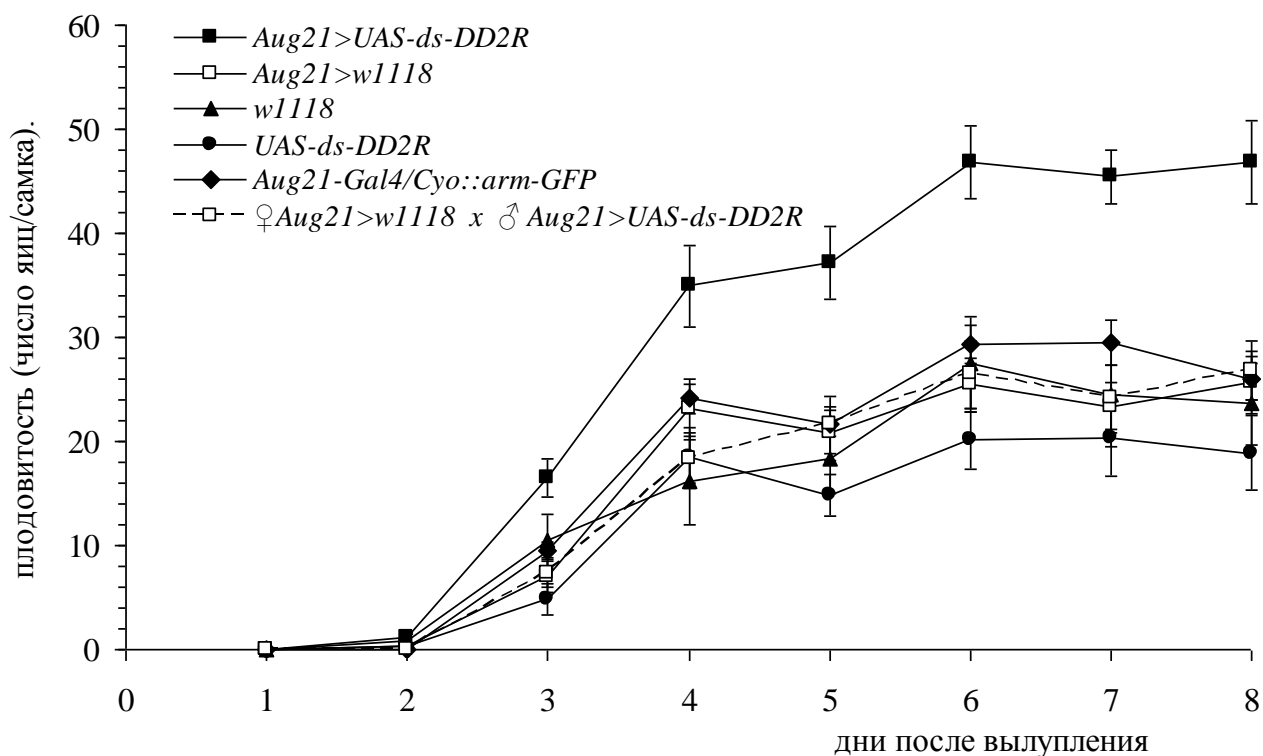


Рис. 32. Влияние снижения экспрессии гена DD2R (*Aug21>UAS-ds-DD2R* мухи) на плодовитость мух.

Таким образом, результаты оценки уровня плодовитости также свидетельствуют о повышении синтеза ювенильного гормона у самок со сниженным числом DD2R в *corpus allata*. Итак, мы подтвердили нашу гипотезу о том, что ингибирующее влияние дофамина на синтез ювенильного гормона у насекомых опосредуется D2-подобными рецепторами и показали, что эти рецепторы играют существенную роль в контроле развития реакции стрессового ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ, проведенных на 2-ом этапе реализации проекта:

1. Для проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных ДНК на системе SOLiD (ChIP-Seq) была проведена иммунопреципитация хроматина семенников самцов крыс 10 дневного возраста с антителами против транскрипционного фактора SF1. Это позволило создать задел для последующего исследования полученных образцов методом ChIP-Seq.

2. С использованием биочипов RatRef-12 BeadChip (Illumina), содержащих 22523 уникальные олигонуклеотидные пробы, проведен анализ изменений транскриптома печени крысы при введении животным двух аминоазосоединений: гепатоканцерогенного для крыс 3'-MeДАБ и неканцерогенного для них ОАТ. Выявлено 1052 и 442 гена, уровень экспрессии которых в печени изменялся более чем в 2 раза ($P\text{-value} \leq 0,01$) в ответ на введение 3'-MeДАБ и ОАТ, соответственно. При этом экспрессия 408 генов изменялась преимущественно в ответ на канцерогенный 3'-MeДАБ, но не на ОАТ, 74 гена демонстрировали избирательную реакцию на ОАТ, 232 гена реагировали сходным образом на оба аминоазокрасителя. С использованием базы Gene Ontology показано, что около 20% генов, избирательно реагирующих на гепатоканцерогенный 3'-Me-ДАБ, представлено генами, связанными с клеточным циклом и апоптозом, в то время как в группе генов с одинаковой реакцией на оба аминоазокрасителя такие гены отсутствуют. С помощью компьютерного метода SITECON показано обогащение промоторных районов генов, активируемых под действием обоих соединений, потенциальными сайтами связывания печень-специфичных транскрипционных факторов FoxA.

2. Для проведения работ на генетической модели – линии крыс с синдромом наследственной артериальной гипертензии (НИСАГ) была проведена отработка методов высокочувствительного анализа содержания индивидуальных транскриптов. С целью оптимизации количественной ПЦР в реальном времени разработан метод характеристики флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов, использование которого позволяет проводить оценку степени мечения олигонуклеотидов флуорофорами и гасителями флуоресценции. Это позволило увеличить чувствительность и воспроизводимость количественной ПЦР в реальном времени, за счёт использования охарактеризованных препаратов флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов и ДНК- и РНК-зависимых ДНК-полимераз, оптимизации состава реакционной смеси и «горячего старта».

3. В рамках направления работы, связанного с выявлением сигналов, контролирующих экспрессию генов на уровне трансляции мРНК, был проведен компьютерный анализ структурно-функциональной организации эукариотических матриц. Впервые исследована структурная характеристика мРНК – размер поверхности молекулы, доступной для взаимодействия (accessible surface area, ASA), отражающая способность участков молекулы к взаимодействию с растворителем (молекулами воды), а также другими макромолекулами. Обнаружено, что в молекуле РНК параметр ASA контекстно-зависим, то есть разные тринуклеотиды характеризуются различными значениями ASA. Оказалось, что стартовые кодоны трансляции AUG (типичный для эукариот) и GUG (распространенный у прокариот), а также терминатор трансляции UGA характеризуются наиболее высокими значениями этого параметра, что могло быть одним из факторов выбора именно этих триплетов в качестве трансляционных сигналов на ранних этапах эволюции. Впервые показано, что потенциальные альтернативные стартовые кодоны характеризуются эволюционной консервативностью, что свидетельствует об их функциональной значимости.

4. Изучено влияния ксенобиотической активации D2-подобных рецепторов на метаболизм ювенильного гормона в нормальных и стрессирующих условиях.

5. Исследован метаболизм ювенильного гормона самок дрозофилы, у которых экспрессия гена DDR2 специфически снижена в железе, производящей ювенильный гормон (с помощью тканеспецифичной РНК-интерференции на линиях трансгенных мух). Подтверждена гипотеза, выдвинутая нами ранее, согласно которой синтез и деградация ювенильного гормона у насекомых находятся под общим контролем и уровень деградации гормона может служить индикатором уровня его синтеза. Впервые установлено, что негативная регуляция синтеза ювенильного гормона дофамином опосредуется D2-подобными рецепторами: снижение числа D2-подобных рецепторов в *corpus allata* повышает уровень синтеза ювенильного гормона. Впервые показано, что повсеместная ксенобиотическая активация D2-подобных рецепторов вызывает снижение деградации ЮГ и этот эффект имеет онтогенетический характер. 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 опубликовано две статьи в ведущих российских и зарубежных журналах (ДАН, Gene) и четыре статьи были приняты в печать (Insect Biochemistry and Molecular Biology, J Comp Physiol B, ДАН, Nucleic Acids Research). 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. Степанова Р.Ф. Использование компьютерных технологий в практике количественного анализа. Потенциометрический и фотометрический методы: Учебное пособие. Самара: Изд-во "Самарский университет", 2003. с. 31.
2. Каледин В.И., Захарова Н.П. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных (Груntenко Е.В., ред.), ИЦИГ, Новосибирск, 1984. 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. Abaza I., Gebauer F. Trading translation with RNA-binding proteins. RNA 2008 14. 404-409.
5. Ahmad S. Sequence-dependence and prediction of nucleotide solvent accessibility in double stranded DNA. Gene 2009. 428. 25-30.
6. Bachmann B., Luke W., Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. Nucleic Acids Research. 1990. 15. 1309.
7. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J. Mol. Endocrinol. 2002. 29. 23–39.
8. Bustin S.A., Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. J. Biomol. Tech. 2004. 15. 155-166.
9. Chandler D.P., Wagnon C.A., Bolton H.J.R. Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. Applied and environmental microbiology. 1998. 64. 669-677.
10. Chatterjee S., Pal J.K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. Biol. Cell. 2009. 101. 251-262.
11. Dennis G. Jr., Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C., Lempicki R.A. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol. 2003. 4. 3.
12. 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.
13. Dunning M.J., Smith M.L., Ritchie M.E., Tavare S. Beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. Bioinformatics. 2007. 23. 2183-2184
14. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. III, Smith T.F. Real-Time PCR in Clinical

- Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin. Microbiol. Rev. 2006. 19. 165-256.
15. Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999. 26. 112-122.
 16. Gong S., Worth C.L., Bickerton G.R., Lee S., Tanramluk D., Blundell T.L. Structural and functional restraints in the evolution of protein families and superfamilies. Biochem. Soc. Trans. 37. 2009. 722-733.
 17. Gruntenko N.E., Bownes M., Terashima J., Sukhanova M., Rauschenbach I.Yu. Environmental stress affects oogenesis differently in wild type and a *Drosophila virilis* mutant with altered juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone levels. Insect Mol. Biol. 2003. 12. 393-404.
 18. Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Karpova E.K., Glazko G.V., Monastiriotti 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.
 19. 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.
 20. 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. USA. 2002. 99. 14554–14559.
 21. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Res. 1997. 25. 3957-3958.
 22. Hubbard S.J., Thornton J.M. NACCESS. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, 1993
 23. Kochetov A.V. Alternative translation and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. BioEssays. 2008. 30. 683-691.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. Gene 2005. 361. 13-37.

27. Kropachev K.Y., Kaledin V.I., Kobsev V.F., Plisov S.Y., Levashova Z.B., Merkulova T.I. Involvement of transcription factor HNF3 γ in the effect of *o*-aminoazotoluene on glucocorticoid induction of tyrosine aminotransferase tyrosine aminotransferase in mice sensitive to its hepatocarcinogen action. *Mol. Carcinol.* 2001. 31. 10-15.
28. Liu Y., Wimmer E., Paul A.V. *Cis*-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. 1789. 495-517.
29. Lu Y.H., Negre S. Use of glycerol for enhanced efficiency and specificity of PCR amplification. *Trends Genet.* 1993. 9. 297.
30. Marhold J., Matrka M., Rambousek V., Ruffer F. Oxidation of carcinogenic azo-dyes. VI. Influence of substitution on the carcinogenic activity of aminoazobenzene. *Neoplasma* 1969. 16. 181-189
31. Merkulova T.I., Kropachev K.Y., Timofeeva O.A., Vasiliev G.V., Levashova Z.B., Ilitskaya 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 Carcinog.* 2005.44. 223-232.
32. Montange R.K., Batey R.T. Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2008. 37. 117-133.
33. Oshchepkov D.Y., Vityaev E.E., Grigorovich D.A. SITECON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32. 208-212.
34. 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.
35. Rybalkin I.N., Mukhamedova N.M., Vlasik T.N. Chenchik A.A. The new technology of hot start polymerase chain reaction. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1996. 121. (Online).
36. Smyth G.K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Applic. Genet. Mol. Biol.* 2004. 3. 3.
37. Soller M., Bownes M., Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.* 1999. 208. 337-351.
38. Sonenberg N., Hinnebasch A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 2009. 136. 731-745.
39. Spiessa A.-N., Mueller N., Ivell R. Trehalose is a potent pcr enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of TAQ polymerase by the disaccharide trehalose. *Clinic. Chem.* 2004. 50. 1256-1259.

40. Suslov O., Steindler D.A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33. 181.
41. Van Der Kelen K., Beyaert R., Inze D., De Veylder L. Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2009. 44. 143-168.
42. Val P., Lefrancois-Martinez A.M., Veyssiere G., Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor.* 2003. 1. 8-45.
43. Vallone D., Picetti R., Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000. 24. 125-132.
44. Volz, K. The functional duality of iron regulatory protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. 18. 106-111.
45. Yeung A.T., Holloway B.P., Adams P.S., Shipley G.L. Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR. *Biotechniques.* 2004. 36. 266-270.
46. Каталог компании Sigma, раздел Dual-Labeled DNA Probes [электронный ресурс]. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/fluorescent-probes.html>
47. Каталог компании Midland Certified, раздел Quality Control: <http://www.oligos.com/qualityControl.htm>
48. Каталог компании Eurogentec, раздел Oligonucleotide synthesis and quality control [электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.eurogentec.com/products/double-dye-probes.html>