

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК
ИЦиГ СО РАН

УДК 577.21

№ госрегистрации 01201058864

УТВЕРЖДАЮ
и.о. Директора
С. В. Лаврюшев

(подпись)

“01” октября 2012 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»)
(заключительный, этап №6)

Наименование этапа: «Реконструкция генных сетей стрессового ответа и создание моделей»

Руководитель проекта

д.б.н., проф.

_____ Г. М. Дымшиц
подпись, дата

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель, д.б.н., проф.	_____	<i>Дымишиц Г. М.</i> (раздел 5, введение, заключение)
Исполнители		
зав. отд. молекулярной генетики, д.б.н., проф.	_____	<i>Меркулова Т.И.</i> (раздел 1)
зав. лаб. генетики стресса, д.б.н., проф.	_____	<i>Раушенбах И. Ю.</i> (раздел 6)
зав. лаб. генной инженерии, к.б.н., доц.	_____	<i>Кочетов А. В.</i> (раздел 3)
д.б.н., с.н.с.	_____	<i>Груntenко Н.Е.</i> (раздел 4)
к.б.н., с.н.с.	_____	<i>Васильев Г.В.</i> (раздел 1)
к.б.н., с.н.с.	_____	<i>Левицкий В.Г.</i> (раздел 1)
к.б.н., н.с.	_____	<i>Антонцева Е. А.</i> (раздел 1)
к.б.н., н.с.	_____	<i>Ощепков Д. Ю.</i> (раздел 1)
к.б.н., н.с.	_____	<i>Богомолова Е. В.</i> (раздел 4)
к.б.н., с.н.с.	_____	<i>Адоньева Н.В.</i> (раздел 4)
к.б.н., н.с.	_____	<i>Лаухина О.В.</i> (раздел 4)
к.б.н., н.с.	_____	<i>Карпова Е.К.</i> (раздел 4)
к.б.н., н.с.	_____	<i>Иванов М. К.</i> (раздел 3)
м.н.с.	_____	<i>Глушков С.А.</i> (раздел 3)
к.б.н., м.н.с.	_____	<i>Волкова О.А.</i> (раздел 3)
н.с. к.б.н.	_____	<i>Брызгалов Л.О.</i> (раздел 1)
н.с. к.б.н.	_____	<i>Пахарукова М. Ю.</i> (раздел 1)
н.с. к.б.н.	_____	<i>Климова Н. В.</i> (раздел 1)
н.с. к.б.н.	_____	<i>Брагин А. Г.</i> (раздел 3)

<i>н.с.</i>	_____	<i>Федосеева Л.А.</i> (раздел 3)
<i>м.н.с. к.б.н.</i>	подпись, дата	<i>Сметанина М.А.</i> (раздел 1)
<i>м.н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Герасимова С.В.</i> (раздел 3)
<i>м.н.с.</i>	подпись, дата	<i>Шарипов Р.Н.</i> (раздел 2)
<i>н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Ершов Н.И.</i> (раздел 1)
<i>аспирант</i>	подпись, дата	<i>Иванисенко Т.В.</i> (раздел 3)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Горелова В.В.</i> (раздел 3)
<i>аспирант</i>	подпись, дата	<i>Ермаков А.А.</i> (раздел 3)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Брагин А.О.</i> (раздел 3)
<i>студент</i>	подпись, дата	<i>Никулин П.С.</i> (раздел 3)
<i>студент</i>	_____	<i>Аркова О.В.</i> (раздел 3)
<i>студент</i>	подпись, дата	<i>Сайк О.В.</i> (раздел 3)
<i>студент</i>	_____	<i>Медведев К.Е.</i> (раздел 3)
<i>студент</i>	подпись, дата	<i>Емцева М.В.</i> (раздел 3)
<i>Нормоконтролер</i>	_____	<i>Амайзер Н.Н.</i> (раздел 3)
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 72 с., 18 рис., 6 табл., 58 источников.

СИГНАЛЫ ЭКСПРЕССИИ, СТРЕСС, ТРАНСЛЯЦИЯ, мРНК, ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ ХРОМАТИНА, SOLID, МЕТОД CHIP-SEQ, FOXA, ЮВЕНИЛЬНЫЙ ГОРМОН, Д2-РЕЦЕПТОРЫ, 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОН, ДОФАМИН

Целью проекта является выявление механизмов, контролирующих экспрессию генов животных в норме и в условиях стресса, а также исследование генетических моделей патологических состояний. За отчетный период были получены следующие результаты:

С помощью ПЦР в режиме реального времени проведёна выборочная проверка данных по влиянию гепатоканцерогенных аминокрасителей на транскриптом печени крысы, полученных ранее методом микрочипового анализа. Показано, что высококанцерогенный для крыс 3'-MeДАБ, в отличие от слабоканцерогенного для них ОАТ, приводит к количественным изменениям мРНК целого ряда генов, задействованных в процессах апоптоза и клеточного цикла. Реконструкция схемы регуляторных событий в онкогенезе выявила определяющую роль снижения активности транскрипционного фактора FoxO3.

Разработана комплексная математическая модель регуляции почечных процессов и ее роли в развитии артериальной гипертонии, способная описывать как локальные явления, так и усредненные глобальные параметры. Работоспособность модели была протестирована путем имитации такой патологии системы кровообращения, как стеноз артерии.

Создана база данных мРНК генов человека и мыши, эффективность экспрессии которых при стрессе контролируется на уровне трансляции. Предложена гипотеза о роли лидерных рамок считывания и реинициации в стресс-специфической контроле экспрессии генов млекопитающих на уровне трансляции мРНК.

Впервые продемонстрировано, что онтогенетическое переключение в механизме дофаминовой регуляции деградации ювенильного гормона у дрозофилы происходит на уровне транскрипции гена рецептора дофамина *DD2R*, а не на уровне его трансляции. Реконструирован механизм молекулярно-генетического контроля экспрессии генов, регулирующих взаимодействие стресс-связанных гормонов дрозофилы. Предложена схема взаиморегуляции генов, контролирующей взаимодействие стресс-связанных гормонов у самок дрозофилы. Разработана программа внедрения результатов НИР в образовательный процесс. За отчетный период опубликовано 9 статей в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	14
1. Реконструкция схемы регуляторных событий, ведущих к развитию опухолей печени под действием гептоканцерогенных аминоазосоединений.....	25
2. Создание комплексной математической модели регуляции почечных процессов и ее роли в развитии артериальной гипертонии	37
3. Создание базы данных мРНК генов эукариот, содержащих сигналы стресс-специфической трансляции.	51
4. Изучение онтогенетического паттерна экспрессии гена DD2R в яичниках дрозофилы - ткани, синтезирующей 20-гидроксиэкдизон.....	55
5. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.....	58
6. Реконструкция механизмов молекулярно-генетического контроля экспрессии генов, регулирующих взаимодействие стресс-связанных гормонов crucialное для сохранения гормонального статуса организма в условиях стресса.....	61
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	65
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	68

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 предыдущих этапах 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. На втором этапе проекта нами была проведена иммунопреципитация хроматина семенников самцов крыс с антителами против транскрипционного фактора SF1. Создан задел для исследования этих образцов методом ChIP-Seq. С использованием биочипов RatRef-12 BeadChip (Illumina), содержащих 22523 уникальные олигонуклеотидные пробы, проведен анализ изменений транскриптома печени крысы при введении животным двух азосоединений: гепатоканцерогенного для крыс 3'-MeДАБ и неканцерогенного для них ОАТ. Выявлено 1052 и 442 гена, уровень экспрессии которых в печени достоверно изменялся более чем в 2 раза 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. 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. На третьем этапе проекта нами была проведена иммунопреципитация хроматина ткани печени самцов крыс двухмесячного возраста с обработкой канцерогенами и без, а так же новорождённых с использованием антител против транскрипционных факторов FoxO3A, FoxA2, HNF4. Получены и секвенированы (SOLiD) специфические библиотеки. На четвертом этапе проекта для исследования транскрипционного контроля генов, вовлеченных в онкогенез, проведена иммунопреципитация хроматина тканей печени, почки и надпочечников самцов крыс шестимесячного возраста с использованием антител против транскрипционных факторов SF1 и LRH. Из данного материала получены специфические библиотеки для системы SOLiD. Качество полученного материала проверено тестовым лигированием – «WFA» на системе SOLiD, проводится секвенирование библиотек на системе SOLiD. Изучалась связь между гепатоканцерогенностью азосоединений ОАТ и 3'-MeДАБ для мышей линии GR и одним из ранних событий воздействия этих факторов – их влиянием на ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора FoxA. При введении мышам однократно в возрасте 12 дней 3'-MeДАБ вызывал опухоли печени у самцов и самок в 100% случаев, наравне с известным мышиным гепатоканцерогеном ОАТ. При этом ОАТ снижал ДНК-связывающую активность FOXA в печени в 2,5-3 раза и, как следствие, снижал на 40% уровень глюкокортикоидной индукции печень-специфического гена TAT. В отличие от этого, 3'-MeДАБ не изменял ни активность FOXA белков, ни степень глюкокортикоидной индукции TAT. На пятом этапе проекта был проведён компьютерный анализ ранее полученных данных по иммунопреципитации хроматина *in vivo* (ChIP-Seq) с

антителами против транскрипционных факторов FoxO3A, FoxA2, связанных с ответом на ксенобиотики и онкогенезом. Обработаны данные контрольных экспериментов с использованием антител против суммарного IgG мыши и гистона H3. С помощью экспериментальной верификации проведена оптимизация параметров четырёх программ распознавания сайтов связывания FoxA2 - PWM, SiteGA, MonoChipmunk и DiChipmunk. Такая оптимизация позволила провести высокодостоверный анализ локализации сайтов связывания FoxA2 внутри пиков ChIP-Seq, а также подробно изучить профиль полногеномного распределения сайтов связывания транскрипционного фактора FoxO3A для взрослых и новорождённых особей мышей.

(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 предыдущих этапах проекта нами были отработаны некоторые методы и процедуры для проведения высокочувствительного анализа уровня транскрипции индивидуальных генов: для этого были разработаны процедуры измерения 5'-эндо/эксонуклеазной активности препаратов ДНК-полимеразы Taq. Проведен анализ эффективности использования различных вариантов олигонуклеотидов со структурными модификациями. На втором этапе проекта был 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». На третьем этапе проекта нами была изучена

экспрессия генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), кодирующих ангиотензиноген, ренин, ангиотензин-превращающий фермент, рецепторы ангиотензина II первого и второго типа и рецептор ренина/проренина, которую определяли в тканях почки, надпочечников, гипоталамуса и продолговатого мозга у молодых (1,5 мес) и взрослых (4-7 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG. Сделано заключение о том, что на формирование гипертензивного статуса крыс линии НИСАГ может влиять состояние РАС в первые недели их жизни, у взрослых животных за поддержание гипертензии отвечают другие системы. На четвертом этапе проекта была исследована экспрессия ключевого гена биосинтеза катехоламинов тирозин-гидроксилазы (ТН) в тканях надпочечников, гипоталамуса и продолговатого мозга у молодых (1.5 мес) и взрослых (4-7 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ в сравнении с нормотензивной линией WAG. Мы не выявили различий в базальном уровне мРНК *Th* в надпочечниках крыс WAG и НИСАГ в возрасте 1.5 и 4 месяца, но у крыс в возрасте 7 месяцев наблюдалось небольшое (23%), но статистически достоверное снижение уровня мРНК *Th* в надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG. Повышение экспрессии гена *Th* в этом органе у обеих линий крыс при стрессе водной депривации не достигало статистически достоверного уровня. В гипоталамусе, но не в продолговатом мозге, у молодых крыс НИСАГ уровень мРНК *Th* оказался втрое повышен по сравнению с таковым у нормотензивных крыс WAG. К возрасту 4 месяцев повышенный вдвое уровень мРНК *Th* наблюдался в продолговатом мозге крыс НИСАГ, однако таких различий в гипоталамусе не было. Необычно, что стресс водной депривации вызвал повышение содержания мРНК *Th* в гипоталамусе крыс НИСАГ втрое, в то время как у крыс WAG этот показатель вообще не изменилось. Это наблюдение подтверждает повышенную реактивность симпатической нервной системы крыс НИСАГ. К возрасту 7 мес содержание мРНК *Th* в мозговых структурах крыс НИСАГ, как и в надпочечниках, оказывается даже ниже, чем у крыс WAG. Сделано заключение о том, что на формирование гипертензивного статуса крыс НИСАГ может влиять состояние ренин-ангиотензиновой системы в первые недели их жизни, у взрослых животных за поддержание высокого уровня артериального давления отвечают другие системы.

(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 предыдущих этапах проекта нами были созданы репрезентативные выборки негомологичных нуклеотидных последовательностей функциональных районов мРНК эукариотических генов. На втором этапе 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 другими макромолекулами. Обнаружено, что в молекуле РНК параметр ASA контекстно-зависим. Впервые показано, что альтернативные стартовые кодоны характеризуются эволюционной консервативностью, что свидетельствует об их функциональной значимости. Проведен компьютерный анализ мРНК *Mus musculus*, характеризующихся различной эффективностью трансляции в норме и при стрессе. Выдвинуто предположение о том, что реинициация трансляции, характеристики которой зависят от статуса фосфорилирования фактора eIF2 α , является одним из ключевых механизмов стресс-специфического контроля экспрессии генов млекопитающих. На пятом этапе проекта было проведено исследование роли механизма реинициации трансляции в синтезе альтернативных изоформ белков человека. Обнаружено, что при определенной конфигурации 5'-НТП, содержащей лидерные рамки считывания, с мРНК человека с высокой степенью вероятности могут дополнительно считываться дополнительные N-концевые изоформы белков. По сравнению с аннотированными полноразмерными вариантами, эти изоформы часто характеризуются иной субклеточной локализацией, а также отсутствием сайтов посттрансляционных модификаций, что свидетельствует об их функциональных различиях. Известно, что эффективность реинициации трансляции зависит от статуса фосфорилирования фактора инициации трансляции eIF2 α , который – в свою очередь – изменяется в ответ на стресс. В рамках этой части работы было предсказано около 300 генов человека, с мРНК которых могут дополнительно считываться укороченные с N-конца изоформы аннотированных белков, причем эффективность их синтеза может изменяться в условиях стресса.

(4) *Исследование роли контроля экспрессии генов дофаминовых (ДА) рецепторов в поддержании гормонального статуса в нормальных и стрессирующих условиях.* Установлено, что D₂-подобный рецептор (D₂R) у млекопитающих является ключевым модулятором двигательной функции. У человека D₂R оказался важнейшей терапевтической мишенью для лечения брадикинезии, возникающей в результате болезни Паркинсона. Однако пока практически ничего не известно о том какую роль контроль

экспрессии генов рецепторов дофамина играет в регуляции гормонального статуса организма в стрессирующих условиях. Проведение подобных исследований на человеке невозможно, так как требует фармакологического изменения уровней стресс-связанных гормонов и проведения генетических экспериментов. Поскольку показано, что ДА-подобные рецепторы 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 предыдущих этапах 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. На втором этапе проекта изучено влияние ксенобиотической активации Д2-подобных рецепторов на метаболизм ювенильного гормона в нормальных и стрессирующих условиях. 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 Д2-подобными рецепторами. Обнаружено, что ксенобиотическая активация

Д2-подобных рецепторов вызывает снижение деградации ЮГ и этот эффект имеет онтогенетический характер. На третьем этапе проекта нами было обнаружено наличие Д2-подобных рецепторов в жировом теле и *corpus allatum* и подтвержден сделанный нами на первом этапе реализации проекта вывод о том, что негативная регуляция синтеза ЮГ дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами. На четвертом этапе проекта был осуществлен иммуногистохимический анализ яичников половозрелых самок *D. melanogaster* с использованием кроличьих антител против рецептора дофамина 2R (DD2R) и измерен титр 20-гидроксиэкдизона (20Э) у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R в железе, синтезирующей ювенильный гормон. Впервые продемонстрировано, что в фолликулярных клетках яичников (месте синтеза 20Э) половозрелых самок дрозофилы отсутствуют Д2-подобные рецепторы. Впервые показано, что у самок дрозофилы с повышенным в результате снижения числа DD2R в *corpus allatum* титром ЮГ, уровень 20Э резко повышен. Таким образом подтверждено, что дофамин регулирует уровень 20Э опосредованно, через систему метаболизма ЮГ. На пятом этапе проекта был (1) осуществлен иммуногистохимический анализ *corpus allatum* молодых и половозрелых самок дикого типа *D. melanogaster* с использованием кроличьих антител против DD2R; (2) осуществлен иммуногистохимический анализ жирового тела молодых и половозрелых самок *D. melanogaster* дикого типа и с генетической абляцией части клеток *corpus allatum*; (3) исследовано влияние 20Э на экспрессию гена DD2R. Впервые показано, что онтогенетический характер ингибирующего влияния ДА на синтез и деградацию ЮГ у *Drosophila* обусловлен переключением на геномном уровне, вызывающем изменение числа дофаминовых Д2-подобных рецепторов в железе, синтезирующей ЮГ, и ткани, синтезирующей ферменты его деградации; Обнаружено, что это переключение обусловлено изменением титра 20-гидроксиэкдизона после оплодотворения самок.

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 шестого (заключительного) этапа проекта — реконструкция генных сетей стрессового ответа и создание моделей. Задачи этапа включают следующие виды работ:

1. Реконструкция схемы регуляторных событий, ведущих к развитию опухолей печени под действием гептоканцерогенных аминокислотсоединений.
2. Создание комплексной математической модели регуляции почечных процессов и ее роли в развитии артериальной гипертонии.
3. Создание базы данных мРНК генов эукариот, содержащих сигналы стресс-специфической трансляции.
4. Изучение онтогенетического паттерна экспрессии гена DD2R в яичниках дрозофилы - ткани, синтезирующей 20-гидроксиэксдиолон.
5. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.
6. Реконструкция механизмов молекулярно-генетического контроля экспрессии генов, регулирующих взаимодействие стресс-связанных гормонов crucialное для сохранения гормонального статуса организма в условиях стресса

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Развитие и жизнедеятельность многоклеточных животных обеспечивается строго контролируемым и специфическим уровнем экспрессии генов в различных органах и тканях. Целью проекта является выявление молекулярных механизмов, регулирующих 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 отчетного (шестого этапа главным образом была проведена работа по реконструкции генных сетей стрессового ответа и созданию моделей, однако также была получена новая интересная информация по другим направлениям работы.

Исследование молекулярных основ канцерогенеза требует применения современных высокопроизводительных методов анализа геномов. В рамках проекта такие методы были применены для изучения форм рака, формирующихся при обработке лабораторных животных ксенобиотиками. При этом основное внимание было уделено влиянию канцерогенов на паттерн экспрессии регуляторных генов, связанных с развитием опухолей – и, в частности, на выявление сайтов связывания специфических транскрипционных факторов. Известно, что канцерогенез характеризуется нарушением баланса процессов пролиферации, апоптоза и дифференцировки. За поддержание такого баланса в высокодифференцированной клетке отвечают регуляторные белки - транскрипционные факторы, которые обеспечивают специфику протеома определенного типа клеток. Примером таких белков является семейство транскрипционных факторов FOXA. Белки этого семейства (FoxA1, FoxA2, FoxA3) экспрессируются в печени, поджелудочной железе и легких, способствуют компактизации хроматина и контролируют экспрессию множества генов-мишеней. В печени обнаружено более 100 генов-мишеней FoxA, продукты которых регулируют процессы дифференцировки, клеточного метаболизма, поддержания фенотипа клеток. Вовлеченность факторов FoxA в индукцию опухолей исследована нами на модели воздействия на организм различных гепатоканцерогенных веществ, прежде всего азосоединений, которые обладают выраженной тканевой, видовой и линейной специфичностью.

На предыдущих этапах выполнения данного проекта нами было проведено сравнительное исследование влияния высококанцерогенного для крыс, но слабоканцерогенного для мышей 3'-MeДАБ и высококанцерогенного для мышей, но слабоканцерогенного для крыс ОАТ на полногеномный паттерн экспрессии генов в печени крыс. Исследование влияния этих соединений на транскриптом печени проводилось с использованием биочипов

(RatRef-12 BeadChip (Illumina), содержащих олигонуклеотидных пробы, соответствующие 22523 генам крысы. Предварительные результаты обработки полученных данных обнаружили очень интересную закономерность – оказалось, что в группа генов, избирательно реагирующих на высоко канцерогенный для крыс 3'МеДАБ, но не слабоканцерогенный ОАТ существенно обогащена генами, связанных с регуляцией клеточного цикла, апоптоза и ангиогенеза. Анализ этих групп генов показал, что, введение крысам 3'МеДАБ приводило, в частности, к активации 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*. В то же время 3'МеДАБ также вызывал избирательную индукцию антипролиферативных генов *Gadd45a*, *Cdkn1a* и *Btg3*, а также генов *Rhob*, *Tp53inp*, *Ddit3* и *Pcd2*, индуцирующих апоптоз, что весьма усложняет наблюдаемую картину. Однако, известно, что для того чтобы сделать надежные выводы из данных микрочипового анализа транскриптома, необходимо провести их верификацию путем изучения влияния исследуемых веществ на экспрессию ряда произвольно выбранных генов методом ПЦР в реальном времени. В этой связи на завершающем этапе проекта была поставлена задача осуществления такой верификации. Для изучения методом ПЦР в режиме реального времени изменения экспрессии генов под действием 3'-МеДАБ и ОАТ из генов, показавших в микроэрей-анализе различия в изменении уровня экспрессии в ответ на эти аминоазокрасители, было выбрано 11 (*Cyp1A1*, *Cyp3A1*, *Cdkn1a*, *Ccng1*, *Pcna*, *Btg2*, *Btg3*, *Mdm4*, *Tnfrsf12a*, *Klf6*, *Irf7*), продукты которых играют ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков, регуляции пролиферации и ответе на клеточный стресс. По завершению этой работы анализ уже верифицированных данных позволил провести реконструкцию регуляторных событий, которые могут приводить к развитию опухолей печени под действием гептоканцерогенных аминоазосоединений

Другое направление работы в рамках НОЦ и настоящего проекта связано с исследованием молекулярно-генетических основ артериальной гипертонии (АГ).

Гипертония – одна из ведущих причин нетрудоспособности, заболеваемости и смертности среди населения; это наиболее обычное хроническое заболевание в мире и один из наиболее важных факторов риска для сердечно-сосудистых заболеваний, сердечных приступов и инсультов. Всемирная Организация Здравоохранения связывает с высоким кровяным давлением более 7 млн. смертей в год. Считается, что артериальное давление (АД) – это тонко регулируемый количественный показатель, на который влияет множество физиологических систем, которые в конечном счете интегрируются и поддерживают уровень АД для безопасного и адекватного кровотока во всех тканях, несмотря на широко различающиеся метаболические потребности (Roszkopf et al., 2007). Распространенность

гипертонии может охватить значительную часть взрослого населения в индустриализованных и стареющих обществах в ближайшем будущем, например, в Западной Европе. Поэтому необходимо понимать патогенез гипертонии как динамический процесс, вероятно, берущий свое начало еще в раннем детстве.

Доступные свидетельства показывают, что генетические механизмы дают вклад в регуляцию АД (см. обзор Roszkopf et al., 2007). Наблюдается существенная корреляция между значениями АД родителей и детей. Считается, что 30-60% наблюдаемых вариаций в АД определяется генетическими факторами, определяемыми пятью, десятью или более генами, каждый из которых имеет только весьма ограниченный вклад. Окружение (питание) определяет оставшуюся половину вариации АД. Таким образом, мы стоим перед сложным взаимодействием повышающих и снижающих АД генов, многие из которых обладают плеiotропными эффектами, в сочетании с множеством экзогенных факторов. Кроме того, первичная гипертония тесно связана с множеством других заболеваний, включая метаболический синдром, диабет второго типа, преэклампсию или почечные заболевания. Моногенные, или менделевские, формы гипертонии – это крайне редкие нарушения. Наиболее подробно описанные формы – это аутосомные заболевания, которые сопровождаются определенным фенотипом в дополнение к повышенному АД. Среди моногенных гипертонических форм наиболее известные – это излечимый глюкокортикоидами альдостеронизм (GRA), видимый избыток минералокортикоидов (AME), синдром Лиддла, синдром Гордона (псевдоальдостеронизм 2 типа) и некоторые другие. В отличие от редких случаев моногенной гипертонии, первичная, или эссенциальная гипертония определяется полигенными механизмами, мозаикой нейтральных, гормональных и клеточных отклонений с сильным влиянием стиля жизни и факторов окружающей среды. Эссенциальная гипертония составляет около 90-95% всех случаев гипертонии у людей. Генетический вклад в вариации кровяного давления (ВР) у человека оценивается в 30–50% (Rassler, 2010). У большинства пациентов гипертония имеет мультигенную основу и проявляет различные свойства. За последнюю декаду, многие гены были включены в изучение генетики гипертонии, причем во многих случаях лишь на узкой базе доказательств (Roszkopf et al., 2007).

В последние десятилетия ведутся интенсивные исследования генетико-физиологических механизмов гипертонической болезни. Важным условием, обеспечивающим успех этих исследований, стало создание экспериментальных генетических моделей гипертонической болезни, каждая из которых воспроизводит один из вариантов этого, по сути дела, гетерогенного заболевания и позволяет изучать каждую из этих форм по отдельности, в чистом виде. Поскольку эссенциальная гипертония человека является сложным и комплексным заболеванием, исследователи вывели различные линии лабораторных

животных, и прежде всего крыс с высоким давлением, для изучения этой болезни на экспериментальных моделях. В некоторых случаях были также селектированы животные с низким давлением, либо поддерживаются неселектированные стоковые животные, из которых выведена гипертензивная линия.

Наиболее известные гипертензивные линии крыс – это линия GH (генетически гипертензивные) из Новой Зеландии; сольчувствительные (S) и сольрезистентные (R) крысы Dahl, отобранные по реакции АД на высокосолевою диету; крысы со спонтанной гипертензией SHR, выведенные по признаку высокого АД без провокативных стимулов в Киото, Япония, и контрольные к ним крысы Wistar-Kyoto; крысы Sabra, подверженные гипертензии (SBH) и Sabra, устойчивые к гипертензии (SBN), выведенные на основе ответа АД на одностороннюю нефрэктомия, воздействие дезоксикортикостерон-ацетата и 1% NaCl в питье; линии крыс Lyon, селектированные по высокому (LH) или низкому (LL) АД (третья линия, LN, была отобрана по нормальному давлению) без специальных провоцирующих воздействий; Миланские линии (Milan) также селектированы на высокое (MHS) и низкое (MNS) давление без провоцирующих факторов (Rapp, 2000).

В результате многолетней селекции в Институте цитологии и генетики СО РАН получена линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (линия НИСАГ). Крысы линии НИСАГ представляют одну из наиболее удобных моделей для изучения развития гипертензивной болезни под влиянием психоэмоционального стресса, который является важнейшим фактором формирования артериальной гипертензии человека. Известно, что уровень стресса определяется как интенсивностью стимуляции (стрессора), так и чувствительностью или восприимчивостью организма к этой стимуляции, то есть фактически взаимодействием средовых и организменных, в том числе и генетических, факторов. Поэтому для создания экспериментальной модели стресс-чувствительной артериальной гипертензии проводилась работа по генетической селекции линии крыс, отличающихся повышенной чувствительностью к действию эмоциогенных стимулов, которая выражалась бы в увеличении АД (Маркель, 2002). Селекция проводилась фактически в два этапа. На первом этапе на протяжении 17 поколений для скрещиваний отбирали крыс из разных семей, отличающихся повышенным уровнем АД в условиях эмоционального стресса. После того как был достигнут значительный селекционный успех, был начат второй этап, призванный получить гомозиготную линию со стабильным проявлением признака (повышенного АД), пригодную для последующего генетического анализа. С этой целью на протяжении более 20 поколений проведены близкородственные (братско-сестринские) скрещивания. В такой инбредной линии все особи имеют практически одинаковый геном. Важно отметить, что несмотря на то, что селекция велась на повышение АД при стрессе, отмечено также

увеличение базального АД, которое достигло 160-170 мм рт. ст. Действие эмоционального стресса приводит у крыс селекционированной линии к повышению АД еще на 35-40 мм рт. ст., в результате чего оно достигает 200 мм рт.ст.

За прошедшие годы были исследованы многие физиологические и биохимические характеристики данной линии (Маркель, 2002). Показано, что крысы НИСАГ характеризуются повышенной поведенческой активностью в незнакомой обстановке (тест открытого поля), что свидетельствует об их повышенной психологической возбудимости. Отмечены изменения в скорости обмена и концентрации норадреналина, дофамина и серотонина в отделах мозга, участвующих в регуляции артериального давления и стресс-реактивности. Изменены также концентрации и соотношения $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -адренорецепторов в данных отделах мозга. Внутримозговое введение фармакологических агентов, избирательно стимулирующих $\alpha 1$ -адренорецепторы, крысам НИСАГ приводит к повышению артериального давления, в то время как у контрольных крыс такая стимуляция сопровождается его снижением. У гипертензивных крыс также изменена реакция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГАС, основного гормонального звена стресса) на стимуляцию $\alpha 1$ -адренорецепторов головного мозга. Отсюда было сделано заключение, что изменение норадренергической регуляторной системы головного мозга у крыс НИСАГ может быть ответственно как за повышение АД, так и за изменение стрессовой реактивности. Наши данные указывают на более высокую стресс-реактивность ГГАС крыс линии НИСАГ (Хворостова и др., 2002; Markel et al., 2007). С коррекцией функции норадренергических механизмов мозга в раннем онтогенезе связана также возможность смягчения развития гипертензивного статуса у крыс линии НИСАГ (Маркель, 2002).

С особенностями функции норадренергической системы мозга связано, вероятно, повышение симпатической нервной активности у крыс НИСАГ как в состоянии покоя, так и при стрессе (Маркель и др., 2006; Markel et al., 2007). Это находит выражение в увеличении концентрации адреналина в мозговом слое надпочечников и повышении активности основных ферментов его биосинтеза – тирозингидроксилазы, дофамин- β -гидроксилазы и фенилэтанолламин-N-метилтрансферазы. Это свидетельствует о том, что, вероятно, у крыс этой линии присутствуют какие-то изменения в цепи биосинтеза катехоламинов. В рамках проекта было проведено исследование экспрессии ключевого гена биосинтеза катехоламинов тирозин-гидроксилазы (TH) в тканях надпочечников, гипоталамуса и продолговатого мозга у молодых (1.5 мес) и взрослых (4-7 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ в сравнении с нормотензивной линией WAG. Мы не выявили различий в базальном уровне мРНК *Th* в надпочечниках крыс WAG и НИСАГ в возрасте 1.5 и 4 месяца, но у крыс в возрасте 7 месяцев наблюдалось небольшое (23%), но

статистически достоверное снижение уровня мРНК *Th* в надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG. Повышение экспрессии гена *Th* в этом органе у обеих линий крыс при стрессе водной депривации не достигало статистически достоверного уровня. В гипоталамусе, но не в продолговатом мозге, у молодых крыс НИСАГ уровень мРНК *Th* оказался втрое повышен по сравнению с таковым у нормотензивных крыс WAG. К возрасту 4 месяцев повышенный вдвое уровень мРНК *Th* наблюдался в продолговатом мозге крыс НИСАГ, однако таких различий в гипоталамусе не было. Необычно, что стресс водной депривации вызвал повышение содержания мРНК *Th* в гипоталамусе крыс НИСАГ втрое, в то время как у крыс WAG этот показатель вообще не изменилось. Это наблюдение подтверждает повышенную реактивность симпатической нервной системы крыс НИСАГ. К возрасту 7 мес содержание мРНК *Th* в мозговых структурах крыс НИСАГ, как и в надпочечниках, оказывается даже ниже, чем у крыс WAG. Сделано заключение о том, что на формирование гипертензивного статуса крыс НИСАГ может влиять состояние ренин-ангиотензиновой системы в первые недели их жизни, у взрослых животных за поддержание высокого уровня артериального давления отвечают другие системы. На заключительном этапе проекта была разработана комплексная математическая модель, позволяющая описывать регуляцию почечных процессов и ее роль в развитии артериальной гипертензии на основе совокупности данных – как полученных нами, так и литературных.

Исследованием контроля экспрессии генов стрессового ответа на уровне трансляции мРНК.

Считается, что инициация трансляции большинства эукариотических мРНК происходит по механизму “линейного сканирования”, хотя в ряде случаев возможна инициация на внутреннем участке мРНК или шунтирование потока рибосом (Jackson et al., 2010). Согласно модели линейного сканирования, 40S субъединица рибосомы связывается с кепом на 5'-конце мРНК и движется вдоль матрицы до инициаторного кодона AUG. Считается, что нуклеотиды в районе стартового кодона (контекст) важны для его взаимодействия с рибосомой: наибольший вклад вносят пурины в положении –3 и гуанин в положении +4 вокруг AUG. Если контекст триплета AUG не оптимален, то часть рибосом не распознает его как стартовый кодон и может начать трансляцию на следующем AUG (механизм leaky scanning или “сканирование с подтеканием”) (Kozak, 2005). Реинициация трансляции в эукариотических клетках, в отличие от прокариотических, малоэффективна. Показано, что после трансляции очень небольших ORF некоторые 40S субъединицы рибосом могут продолжить сканирование и повторно инициировать трансляцию на расположенной ниже dORF. Эффективность реинициации повышается также при увеличении размера участка, лежащего между стоп-кодоном uORF и следующим

стартовым кодоном AUG. Предполагают, что это дает 40S субъединице рибосомы больше времени для связывания с недостающими факторами инициации трансляции (Jackson et al., 2010). Таким образом, трансляция с помощью механизма реинициации может осуществляться только при соблюдении определенных условий, ограничивающих размер uORF и ее расположение.

В 5'-концевом участке мРНК могут содержаться триплеты AUG, не принадлежащие к основной ORF. Каким образом можно интерпретировать присутствие uAUG в эукариотических мРНК? Если трансляция мРНК осуществляется по механизму линейного сканирования, то uAUG могут взаимодействовать с 40S субъединицами рибосом, на них может начинаться трансляция и с них могут считываться соответствующие белковые продукты. Если трансляция мРНК осуществляется по другому механизму (IRES или шунтирование потока рибосом), то рибосомы могут пропускать uAUG-содержащие участки. В настоящее время нет четких критериев, позволяющих предсказать механизм инициации трансляции по нуклеотидной последовательности мРНК, что не позволяет оценить масштаб использования этих альтернативных механизмов.

В подавляющем большинстве эукариотических мРНК, представленных в банках нуклеотидных последовательностей, аннотирован только один стартовый кодон трансляции. Следует, однако, учесть, что границы БКП предсказаны, а не определены экспериментально. Точность предсказания зависит от адекватности использованных критериев и может варьировать. Анализ нуклеотидных последовательностей эукариотических мРНК показал, что они часто содержат стартовый кодон трансляции в субоптимальном контексте и триплеты AUG в составе 5'-НТП (Rogozin et al., 2001; Kochetov, 2005; Vazykin and Kochetov, 2011) (в этой связи сам термин “нетранслируемый” представляется не вполне адекватным, по-видимому, 5'-НТП следует понимать как район мРНК, расположенный выше стартового кодона трансляции основной ORF).

Функциональный смысл субоптимальных стартовых кодонов БКП не очевиден, поскольку их присутствие снижает эффективность трансляции эукариотических мРНК. Считается, что они могут использоваться в механизмах контроля уровня экспрессии генов для предотвращения избыточной продукции регуляторных факторов (Kochetov et al., 1998; Rogozin et al., 2001), поскольку изменение контекста стартового кодона во многих случаях приводит к негативным последствиям. Особенно значимы мутации в ключевых позициях контекста: например, замена G – T в позиции -3 перед стартовым кодоном гена BRCA1 приводит к 70% снижению уровня синтеза белка и сопровождается высоким риском рака груди; замена G на A в позиции +4 мРНК рецептора андрогенов приводит к снижению уровня синтеза на 20 - 50% и сопровождается синдромом частичной нечувствительности к андрогенам. Замена в позиции -3 перед AUG (G заменен на A) в мРНК гена 11

beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 увеличивает синтез белка, что может отражаться в ассоциации этой мутации с синдромами ожирения и диабета (Malavasi et al., 2010). В некоторых случаях мутации в минорных позициях контекста также приводят к заболеваниям: например, замена С на Т в позиции -1 мРНК CD40 снижает трансляцию на 13% и сопровождается развитием болезни Грейвса (Jacobson et al., 2005). Вообще, значимость мутаций, изменяющих трансляционную активность мРНК, привлекает все больше внимания. Для описания таких ситуаций был даже предложен специальный термин «translational pathophysiology» (трансляционная патофизиология) (Cazzola and Skoda, 2000); можно также привести недавние обзоры (Chatterjee and Pal, 2009; Le Quesne et al., 2010).

Считается, что реинициация трансляции в эукариотических системах малоэффективна и может использоваться в регуляторных целях. Действительно, реинициация заметна, если 5'-проксимальная рамка считывания мала (причем чем она тем меньше, тем реинициация эффективнее) (Jackson et al., 2010). Поэтому, в большинстве известных случаев реинициации трансляции, пептид, который кодируют uORF, не выполняет каких-то функций сам по себе. Реинициация трансляции может использоваться для тонкого контроля экспрессии гена, поскольку имеет определенные преимущества перед «сканированием с подтеканием». Поскольку 40S субъединицы рибосомы после терминации трансляции на стоп-кодоне uORF продолжают сканирование, но восстанавливают трансляционную компетентность не сразу (как минимум должен связаться комплекс eIF2-met-tRNA_i-GTP), то такие рибосомы могут пропустить ближайшие к терминатору uORF триплеты AUG и инициировать трансляцию на удаленных сайтах. Более того, поскольку процесс восстановления трансляционной компетентности вероятностный, трансляция может реиницироваться на нескольких таких кодонах. Если 40S субъединицы рибосом пропускают uAUG в результате «сканирования с подтеканием», то при линейном сканировании в 3'-направлении каждый встречный AUG в оптимальном контексте будет восприниматься в качестве сайта инициации трансляции и их пропуск невозможен, поэтому для тонкой настройки трансляционного контроля экспрессии регуляторных генов часто используется комбинация реинициации и «сканирования с подтеканием». Например, в мРНК транскрипционного фактора SCL содержатся четыре стартовых кодона, перед которыми расположена uORF со стартовым кодоном в субоптимальном контексте. Было показано, что часть 40S субъединиц рибосомы пропускает uAUG с помощью «сканирования с подтеканием» и иницирует трансляцию на первом стартовом кодоне SCL. Однако, инициация трансляции на трех других AUG, расположенных во внутренних районах БКП, осуществляется в результате реинициации трансляции и в ней задействованы те рибосомы, которые транслировали uORF (uORF расположена вблизи от AUG1 SCL и этот стартовый кодон не распознается рибосомами,

терминированными трансляцию на стоп-кодоне uORF, так как они не успевают восстановить трансляционную компетентность) (Calkhoven et al., 2003). Сходная схема синтеза N-концевых изоформ была обнаружена для важных транскрипционных факторов C/EBP β и C/EBP α (Calkhoven et al., 2000; Wethmar et al., 2010).

Роль реинициации трансляции в стресс-специфическом контроле экспрессии генов эукариот связана с тем, что ее эффективность может зависеть от функциональной активности трансляционных факторов. Например, было показано, что скорость восстановления трансляционной компетентности 40S субъединиц рибосом зависит от статуса фосфорилирования eIF2 α . В 5'-НТП мРНК транскрипционного фактора GCN4 дрожжей расположено несколько uORFs. Рибосомы после трансляции uORF1 способны реиницировать на стартовом кодоне следующей uORF и в нормальных условиях инициация трансляции на белок-кодирующей последовательности низка, поскольку размеры спейсера между стоп-кодоном uORF1 и стартовыми кодонами нижерасположенных uORF достаточны для восстановления трансляционной компетентности. Однако, в условиях стресса происходит фосфорилирование eIF2 α и концентрация его активной формы снижается. Это приводит к увеличению времени, необходимой для восстановления комплекса 40S-eIF2-met-tRNA_i-GTP и – в результате – к инициации трансляции на стартовом кодоне GCN4. Этот механизм используется клетками для быстрого ответа на стрессовые условия, поскольку скорость синтеза белка с уже синтезированных и присутствующих в цитоплазме мРНК значительно выше, чем при индукции транскрипции. У млекопитающих аналогичный механизм был найден у ключевых транскрипционных факторов стрессового ответа ATF4 (Vattem and Wek, 2004), ATF5 (Zhou et al., 2008). В мРНК ATF5 в составе 5'-НТП расположены две uORF: короткая 5'-проксимальная uORF1 и более длинная uORF2, которая перекрывается с БКП. При нормальном статусе фосфорилирования eIF2 α рибосомы реиницируют трансляцию на uORF2 и не достигают старта трансляции ATF5, но при стрессе в условиях фосфорилирования eIF2 α ситуация меняется. Эти примеры показывают, что uORF могут использоваться не только для конститутивного контроля трансляционной активности мРНК, но и способны изменять спектр и количество продуктов трансляции в зависимости от состояния клетки.

Исследование молекулярно-генетических механизмов ответа на стрессовые воздействия также проводилось на эволюционно-консервативной 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).

Резко изменяя гормональный статус и энергетический метаболизм организмов при столкновении с неблагоприятными факторами среды, стресс вызывает столь же резкие изменения в их воспроизводительной функции. Причем эти изменения имеют много общих черт даже у таких эволюционно далеких таксонов, как млекопитающие и насекомые. Так, у представителей обоих таксонов при стрессе изменяется уровень гонадотропинов и биогенных аминов, играющих важную роль в контроле репродуктивной функции (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2009). Изучение закономерностей взаимодействия этих гормонов (и его генетической компоненты) требует возможности фармакологического изменения их уровня и проведения генетических экспериментов, что исключено для исследований, касающихся человека. Удобной моделью для выяснения этих закономерностей в контроле размножения в норме и при стрессе является дрозофила, тем более, что феноменологически ответ репродуктивной системы насекомых и млекопитающих (человека, в частности) имеет общие черты, одной из которых является остановка воспроизводительной функции самок в условиях сильного стресса (обзор: Груntenко, 2008). Выяснение механизмов взаимодействия гонадотропинов и биогенных аминов насекомых может быть полезным для интерпретации результатов, получаемых при изучении аналогичных механизмов у млекопитающих.

Стресс-реакция насекомых была впервые описана в 1987 году (Rauschenbach et al., 1987), однако изучение отдельных элементов этой реакции и их взаиморегуляции проводится до сих пор. На настоящий момент показано, что компонентами стресс-реакции насекомых являются биогенные амины (октопамин (ОА), дофамин (ДА), серотонин), ювенильный гормон (ЮГ) и 20-гидроксиэкдизон (20Э) (Rauschenbach et al., 1995; Hirashima et al., 2000). Эти гормоны также контролируют приспособленность, важнейшими компонентами которой являются способность оставить потомство и способность адаптироваться к неблагоприятным условиям (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2009).

Известно, что у имаго дрозофилы ЮГ и 20Э выполняют функции гонадотропинов (обз.: Simonet et al., 2004). Модель гормонального контроля синтеза желточных белков (ЖБ), в которой ЮГ стимулирует синтез (а затем – секрецию и поглощение) ЖБ фолликулярными клетками яичников и одновременно индуцирует экдизонсекретирующие клетки яичника к синтезу или секреции 20Э, который, в свою очередь, инициирует синтез ЖБ в жировом теле была разработана Постлесвейтом и Паркером (Postlethwait and Parker, 1987). Эта модель была дополнена в исследованиях Баунс (обз.: Bownes, 1989), показавшей, что у *D. melanogaster* (1) ЮГ модулирует транскрипцию *yr* генов, (2) 20Э поддерживает ее на высоком уровне, (3) ЮГ необходим в высоких дозах для инициации созревания яичников после вылета и затем в более низких - для поддержания продукции ЖБ жировым телом.

Заклучение Постлесвейта и Паркера (Postlethwait and Parker, 1987) о том, что ЮГ инициирует ранние стадии вителлогенеза и синтез экдистеродов в яичниках, а 20Э стимулирует синтез ЖБ в жировом теле было подтверждено Ричардом с соавторами (Richard et al., 2001) при изучении вителлогенеза у ЮГ-дефицитных мутантов и диапаузирующих самок дикого типа *D. melanogaster*.

Соллером и соавторами (Soller et al., 1999) в результате анализа данных экспериментов по обработке самок *D. melanogaster* экзогенными ЮГ и 20Э была выдвинута гипотеза близкая к модели Постлетвейта и Паркера (Postlethwait and Parker, 1987). Они полагают, что развитие вителлогенических ооцитов, включая как синтез ЖБ в фолликулярных клетках, так и их поглощение ооцитами, стимулируются ЮГ, тогда как 20Э контролирует превителлогенические стадии развития ооцитов. Согласно их представлениям, у *Drosophila* для нормального течения оогенеза принципиальным является поддержание баланса ЮГ и 20Э (Soller et al., 1999). В наших исследованиях это представление было подтверждено и показано, что нарушение баланса вызывает драматические изменения в ходе оогенеза: при стрессе происходит повышение титра ЮГ, приводящее к прекращению откладки яиц, и повышение уровня 20Э вызывающее гибель вителлогенических ооцитов (Gruntenko et al., 2003). Таким образом, четкое регулирование титра ЮГ и 20Э и сохранение их баланса в гемолимфе необходимо не только для координации процессов, связанных с контролем вителлогенеза и репродуктивной функции, но и для регуляции изменений, происходящих в ответ на стрессорное воздействие. Для поддержания баланса гонадотропинов должен существовать механизм, обеспечивающий регуляцию титра одного из гонадотропинов под воздействием изменения в титре другого. Мы показали, что такой механизм существует у самок дрозофилы и посредником во взаиморегуляции ЮГ и 20Э является ДА (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2008).

Известно, что влияние ДА на метаболизм клетки опосредуется через трансмембранные рецепторы. Семейство ДА рецепторов подразделяется на два больших подсемейства: Д1-подобные рецепторы (Д1 и Д5) и Д2-подобные рецепторы (Д2, Д3 и Д4) (обзоры: Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000). Обнаружена высокая консервативность ДА рецепторов у млекопитающих и дрозофилы; кДНК Д1- и Д2-подобных рецепторов выделены у многих видов, в том числе у дрозофилы (Hearn et al. 2002). Показано, что Д1-подобные рецепторы связываются со стимулирующими G белками (Gas), вызывая активацию аденилатциклазы и запуск каскада, приводящего к изменениям матричной активности хроматина. Д2-подобные рецепторы передают сигнал через ингибирующие G белки (Gai/o), вызывая ингибирование аденилатциклазы (обзоры: Missale et al. 1998; Vallone et al. 2000). Стадияспецифичность действия ДА на метаболизм ЮГ у самок дрозофилы позволила нам предположить наличие переключения на геномном уровне в

тканях мишенях (ЖТ и СА), приводящего к изменению состава и/или числа Д1- и Д2-подобных рецепторов (Gruntenko and Rauschenbach, 2008). Такое предположение поддерживается данными, демонстрирующими, что у позвоночных и беспозвоночных экспрессия генов Д1- и Д2-подобных рецепторов подвергается ткане- и стадияспецифичной регуляции, причем пространственные и временные паттерны экспрессии этих генов часто не совпадают (Humphries et al. 2003; Li et al. 2007).

В рамках предыдущих этапов проекта мы показали, что у неполовозрелых (1-суточных) самок дрозофилы число Д2-подобных рецепторов в жировом теле (ткани, синтезирующей ферменты деградации ювенильного гормона) на порядок превышает таковое у половозрелых (6-суточных) самок, и не обнаружили Д2-подобных рецепторов в яичниках (ткани, синтезирующей экдизон). Таким образом, мы установили, что онтогенетический характер ингибирующего влияния ДА на деградацию ЮГ у *Drosophila* обусловлен изменением числа Д2-подобных рецепторов в ткани, синтезирующей ферменты его деградации. Возник вопрос, происходит ли это переключение на уровне трансляции (синтеза рецепторов) или же раньше, на уровне экспрессии гена, их кодирующего? Для получения ответа на этот вопрос, мы изучили экспрессию гена Д2-подобных рецепторов (*DD2R*) в жировом теле и яичниках молодых и половозрелых самок линии дикого типа Canton S *D. melanogaster*.

1. Реконструкция схемы регуляторных событий, ведущих к развитию опухолей печени под действием гептоканцерогенных аминокзосоединений.

Для оценки изменения экспрессии методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) из генов, показавших в микроэррей-анализе различия в изменении уровня экспрессии в ответ на 3'-МеДАБ и ОАТ, было выбрано 11: *Cyp1A1*, *Cyp3A1*, *Cdkn1a*, *Ccng1*, *Pcna*, *Btg2*, *Btg3*, *Mdm4*, *Tnfrsf12a*, *Klf6*, *Irf7*. Известно, что продукты этих генов играют ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков, регуляции пролиферации и ответе на клеточный стресс. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar весом 200-250 г разведения вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Крыс содержали группами по 3-4 особи в пластиковых ванночках площадью 40 на 36 см при свободном доступе к воде и пище. ОАТ и 3'-МеДАБ растворяли в оливковом масле и вводили животным внутривентриально за 18 ч до забоя. Доза составляла 25,0 мг на 100г массы тела для 3'-МеДАБ и 22,5 мг на 100г для ОАТ. Контрольным животным вводили растворитель. Для выделения РНК 50мг свежесывленной ткани печени гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 1мл TRI Reagent (Ambion). Затем гомогенат переносили в пробирки и центрифугировали 5 мин 14000g при +4°C. Супернатант отбирали и к нему добавляли 200 мкл хлороформа, после чего содержимое пробирки тщательно перемешивали и

центрифугировали 5 мин 14000g при +4°C. Верхнюю бесцветную фракцию переносили в новую пробирку и добавляли к ней равный объем изопропанола, выдерживали 10 мин при комнатной температуре, после чего РНК осаждали центрифугированием 10 мин 14000g. Затем РНК промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в воде и хранили -70°C. Определение количества и качества препаратов РНК проводили спектрофотометрически на приборе NanoDrop ND1000 (NanoDrop, США) и с помощью электрофореза в агарозном геле.

кДНК получали из 1-3 мкг суммарной РНК реакцией обратной транскрипции с использованием 100 единиц активности MoMLV РНК-зависимой ДНК-полимеразы в буфере, содержащем 50 mM Трис-НСl (pH=8.3), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 2 мкМ d(T)₁₈, 100 мкг/мл БСА, 1 mM dNTP и 20 единиц RNase Inhibitor («Applied Biosystems», США). Реакцию вели в течение одного часа при 42°C и останавливали нагреванием до 90°C в течение 10 минут. Праймеры для ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) были подобраны с помощью программы PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, США). Для отслеживания контаминации образцов кДНК геномной ДНК прямой и обратный праймеры подбирали комплементарными двум смежным экзонам так, чтобы результирующий ампликон охватывал границы сплайсинга соответствующего интрона (Таблица 1). Специфичность праймеров к целевому транскрипту оценивали с помощью инструмента Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Праймеры были синтезированы в фирме Биоссет на автоматическом синтезаторе АСМ-102И (Биоссет, Новосибирск).

Для проведения ПЦР-РВ в 96-луночных плашках (Bio-Rad, США) при 4°C готовили реакционную смесь, содержащую 75 mM Трис-НСl, pH 8.9; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 % Tween; 4 mM MgCl₂; 1,5 единицы активности *Taq* ДНК-полимеразы; 0,2 пМ прямого и обратного праймеров; 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, SYBR Green I до конечного разведения в 40000 раз и количество кДНК, эквивалентное 5 нг исходной РНК (приведены экспериментально подобранные в серии разведений максимальные концентрации SYBR Green I и кДНК, не оказывающие ингибирующего эффекта на реакцию амплификации). В случае отрицательных контролей из состава реакционной смеси исключали кДНК.

ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США) при следующем температурном режиме: начальная денатурация, 97°C 1 мин; 40 циклов {денатурация, 97°C 10 с; отжиг праймеров, 60°C 20 с (для пары «GAPDH-TNFRSF12A» – 58°C 20 с); элонгация, 72°C 20 с; детекция, 82°C 5 с}. Для анализа продуктов реакции амплификации и выбора температуры избирательной детекции целевого ампликона получали кривые плавления конечных продуктов ПЦР от 69°C до 95°C с инкрементом 0,5°C. Для определения оптимальной температуры отжига

каждой пары праймеров проводили ПЦР-РВ в градиенте температур: 57°C / 58°C / 59,3°C / 61°C / 62,5°C / 63°C. В качестве эндогенного контроля использовали ген домашнего хозяйства GAPDH.

Таблица 1. Последовательности праймеров для использования в ПЦР в режиме реального времени

Название	Последовательность	мРНК (RefSeq)	L _{кДНК}	L _{гДНК}
BTG2_F BTG2_R	5'-TCAAGGTTTTTCAGTAGGGCG-3' 5'-TGTGGTTGATGCGGATACAG-3'	NM_017259	114	1355
BTG3_F BTG3_R	5'-AAGGAAGTAGAAGTGAAACCGAG-3' 5'-TGGATAAGCAAATGGAACAGGAG-3'	NM_019290	180	3989
CCNG1_F CCNG1_R	5'-TCCCTTGCTGTGAATTTACTGG-3' 5'-CTGTGAACCTATACTGACTTATCCG-3'	NM_012923	172	1655
CDKN1A_F CDKN1A_R	5'-TGTCGCTGTCTTGCCTC-3' 5'-ACTTCAGGGCTTTCTCTTGC-3'	NM_080782	161	743
CYP1A1_F CYP1A1_R	5'-ACCTCCCTAACTCTTCCCTG-3' 5'-ACATTGGCATTCTCGTCCAG-3'	NM_012540	175	639
CYP3A1_F CYP3A1_R	5'-AAGGGTCAGTGGTCATGATTC-3' 5'-TCCAAAGGGCAGATATACATAAGG-3'	NM_013105	140	1547
IRF7_F IRF7_R	5'-AAGGTGTATGAACTTAGCCCG-3' 5'-AGCATCACCAGAAAGCAGAG-3'	NM_00103369 1	174	583
KLF6_F KLF6_R	5'-TTCACCTCCCTGTTTTCCC-3' 5'-AAGATAGCGTTCCAACCTCCAG-3'	NM_031642	178	3198
MDM4_F MDM4_R	5'-ACATCACATTCCACCTCTGC-3' 5'-CTGGCCTAGATAGTGCATTACC-3'	NM_00101202 6	174	7703
PCNA_F PCNA_R	5'-AACCTACAGAGCATGGATTTCG-3' 5'-TGTCTTCATTACCAGCACATTTTAG-3'	NM_022381	154	960
TNFRSF12A_F TNFRSF12A_R	5'-GGACCTCGACAAGTGCATG-3' 5'-ACCAGGAAACCAGAAACCAG-3'	NM_181086	168	398
GAPDH_F GAPDH_R	5'-TCTTCCACCTTTGATGCTGG-3' 5'-CTCTTGCTCTCAGTATCCTTGC-3'	NM_017008	180	290

L_{мРНК} – размер ожидаемого продукта амплификации целевой кДНК, п.н.; L_{гДНК} – размер возможного продукта амплификации примеси геномной ДНК, п.н.

Для каждой мРНК-мишени в каждой экспериментальной группе выполняли три биологических и три технических повтора.

Обработку данных ПЦР в реальном времени проводили с использованием программы CFX

Manager V1.6.541.1028 (Bio-Rad, США). Значение C_t вычисляли с помощью встроенного алгоритма программы CFX Manager. Относительный уровень экспрессии целевых транскриптов рассчитывали методом $\Delta\Delta C_t$. Полученные с помощью ПЦР-РВ результаты показали их хорошее соответствие данным микрочипового анализа. Из результатов, приведенных на рисунке 1, видно, что тенденции в изменении экспрессии анализируемых генов в трех экспериментальных группах, выявленные методом микроэррей-анализа, в значительной мере воспроизводятся при использовании метода ПЦР-РВ. Так, по результатам обоих экспериментов, экспрессия *Cdkn1a*, *Ccng1*, *Pcna*, *Btg2*, *Btg3*, *Tnfrsf12a* и *Klf6* в печени животных, обработанных 3'-МеДАБ, более чем в два раза превышает таковую в контрольной группе и в группе животных, обработанных ОАТ.

Также в обоих экспериментах в результате введения ОАТ экспрессия генов *Btg2*, *Klf6*, *Tnfrsf12a*, а также *Irf7* и *Mdm4*, существенно не менялась, тогда как экспрессия *Cdkn1a* и *Ccng1* возрастала в 2 и более раз. Оба метода также выявили значительную индукцию гена *Сур1А1* в ответ на введение ОАТ и гораздо менее выраженную индукцию экспрессии этого гена под действием 3'-МеДАБ.

В то же время, некоторые изменения транскрипционного профиля, выявленные методом полногеномного профилирования, не подтвердились при их анализе методом ПЦР-РВ. Так, по данным микроэррей-анализа экспрессия *Irf7* и *Mdm4* в печени животных, обработанных 3'-МеДАБ, возрастала в 2,8 и 3,6 раз, соответственно, тогда как по результатам ПЦР-РВ не обнаружено достоверного изменения экспрессии этих генов. Кроме того, по данным ПЦР-РВ оба изучаемых азосоединения приводили к значительной активации гена *Сур3А1*, хотя в микроэррей-анализе некоторое увеличение экспрессии *Сур3А1* было выявлено только в случае введения ОАТ. Стоит также отметить, что методом ПЦР-РВ в случае ОАТ была показана активация генов *Btg3* и *Pcna*, не наблюдавшаяся при использовании метода профилирования экспрессии на микроматрицах. Интересно, что различия между 3'-МеДАБ и ОАТ в активации генов цитохромов 1А1 и 3А1, равно как и генов клеточного цикла *Cdkn1a* и *Pcna*, оказались значительно более выраженными в эксперименте ПЦР-РВ.

Подтверждение большей части тестированных с помощью ПЦР-РВ данных микрочипового анализа позволяет с доверием относиться к его результатам и дает возможность дальнейшего функционального анализа генов, по данным микро-эррей по-разному реагирующих на высоконцерогенный 3'-МеДАБ и слабоканцерогенный ОАТ. Для функциональной интерпретации таких групп генов был проведен статистический анализ обогащения групп терминами Gene Ontology (GO): Biological Process (уровень иерархии 5; порог P-value $\leq 0,01$) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): Pathways (порог P-value $\leq 0,05$) с помощью Web-инструмента DAVID (Dennis et al., 2003).

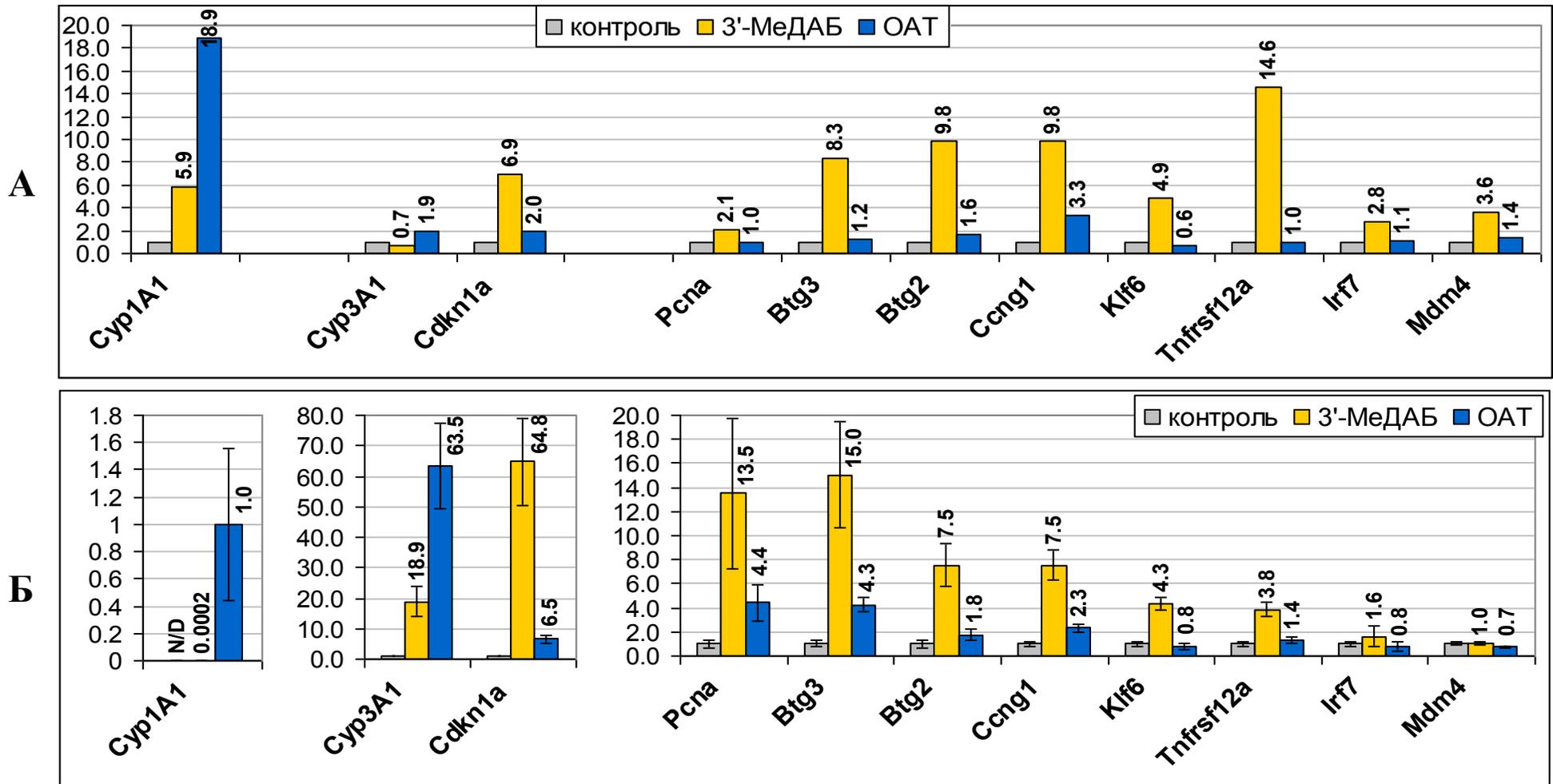


Рисунок 1. Сопоставление данных по изменению уровня экспрессии 11 генов в клетках печени крысы под действием 3'-МеДАБ и OAT, полученных методами микроэрей-анализа (А) и ПЦР в реальном времени (Б). На диаграмме указаны средние значения коэффициента изменения экспрессии ± стандартная ошибка среднего (n=3). N/D – продукт не детектирован.

Наибольший интерес с точки зрения различий в гепатоканцерогенных свойствах 3'-МеДАБ и ОАТ представляет тот факт, что группа генов, реагирующих избирательно на высококанцерогенный для крыс 3'-МеДАБ (группа III), показала наибольшее обогащение по генам, ассоциированным с термином GO «регуляция апоптоза» и его синонимами. В то же время, среди генов, избирательно реагирующих на слабоканцерогенный ОАТ (группа IV), обогащения по этим терминам не обнаружено. Более того, анализ в категориях KEGG показал, что группа III, наиболее обогащена генами, связанными с терминами «P53 сигнальный путь» и «клеточный цикл», причем экспрессия практически всех таких генов повышалась в ответ на высококанцерогенный 3'-МеДАБ.

Более подробный анализ генов, участвующих в регуляции апоптоза и пролиферации клеток и реагирующих на введение 3'-МеДАБ и/или ОАТ, показал, что уровень экспрессии большинства из них при введении животным 3'-МеДАБ заметно выше, чем в случае ОАТ (таблица 2).

В частности, введение крысам 3'-МеДАБ, в отличие от ОАТ, приводит к увеличению экспрессии генов *Ccnd1*, *Ccng1*, *Mcm7*, *Pcna*, *Mybl2*, *Brd2*, *Jun*, *Nupr1*, *Pdgfa*, *Tnfrsf12a*, *Gdf15*, *Mapk8ip3*, *Mapk7* и *Map3k6*, являющихся известными маркерами и индукторами пролиферативных процессов, а также к репрессии генов антипролиферативных белков *Rbl2*, *Rarb* и *Igfbp1*. Наблюдаемые изменения экспрессии этих генов могут указывать на активацию пролиферативных процессов в клетках печени под действием 3'-МеДАБ, но не ОАТ.

С другой стороны, наблюдаемая в случае 3'-МеДАБ активация экспрессии генов *Gadd45a*, *Cdkn1a*, *Btg2*, *Btg3* и *Tob2*, опосредующих p53-зависимый арест клеточного цикла, а также генов *Rhob*, *Trp53inp*, *Ddit3* и *Pdcd2*, способных индуцировать апоптоз в ответ на повреждение ДНК, свидетельствует о блокировке клеточного цикла и индукции процессов репарации и апоптоза. В пользу этого также говорит индукция ряда генов системы репарации в ответ на 3'-МеДАБ (таблица 2).

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптоза и репарации, под действием 3'-МеДАБ и ОАТ

транскрипт	М	О	М/О	транскрипт	М	О	М/О
регуляторы пролиферации				регуляторы клеточной смерти			
<i>Tnfrsf12a</i>	14.6	1.0	14.5	<i>Klf6</i>	4.9	0.6	7.6
<i>Nupr1</i>	2.9	0.4	7.9	<i>Ddit3</i>	3.6	0.9	4.1
<i>Btg3</i>	8.3	1.2	6.7	<i>Mdm2</i>	9.4	2.8	3.4
<i>Btg2</i>	9.8	1.6	6.1	<i>Rhob</i>	4.2	1.3	3.2
<i>Pdgfa</i>	6.1	1.1	5.7	<i>Traf4</i>	3.6	1.2	3.1
<i>Gdf15</i>	8.6	1.6	5.4	<i>Mcl1</i>	2.3	0.8	2.9
<i>Map3k6</i>	4.3	1.0	4.3	<i>Mdm4</i>	3.6	1.4	2.6

Ccnd1	2.2	0.6	3.6	Tp53inp1	4.0	1.9	2.1
Cdkn1a	6.9	2.0	3.5	Pdcd2	2.1	1.2	1.7
Gadd45a	2.9	0.9	3.2	Bcl2l1	1.9	1.2	1.6
Brd2	2.8	0.9	3.1	Stk3	0.4	0.7	0.6
Mapk8ip3	2.9	0.9	3.1	Prkra	0.4	0.6	0.6
Ccng1	9.8	3.3	3.0	Lcn2	0.02	0.04	0.5
Jun	2.6	1.0	2.7	Ctnnb1	0.5	0.9	0.5
Mybl2	3.0	1.3	2.3	Faf1	0.4	1.3	0.3
Tob2	2.0	0.9	2.3	G0s2	0.1	1.0	0.1
Mcm7	2.4	1.1	2.3	система репарации			
Pcna	2.1	1.0	2.1	Pdrg1	6.3	1.2	5.3
Mapk7	2.1	1.0	2.1	Nhej1	3.2	1.3	2.4
E2f5	1.8	1.1	1.7	Polh	2.2	1.0	2.2
Rarb	0.5	0.6	0.8	Rad52	2.2	1.0	2.1
Pcsk9	0.4	0.9	0.5	Ung	0.5	0.9	0.5
Rbl2	0.3	0.8	0.4	Polg2	0.3	0.6	0.5
Igfbp1	0.2	1.3	0.1	Mgmt	1.3	3.5	0.4

Примечание: приведены коэффициенты изменения экспрессии мРНК при воздействии 3'-МеДАБ (М), ОАТ (О) и их отношение (М/О).

В то же время, 3'-МеДАБ вызывает репрессию генов индукторов апоптоза *G0s2*, *Faf1*, *Ctnnb1*, *Pcsk9*, *Stk3*, *Lcn2* и *Prkra*, а также активацию экспрессии генов *Mdm2* и *Mdm4*, напрямую репрессирующих p53; *Mcl1* и *Bcl2l1*, блокирующих митохондриальный путь активации апоптоза; *Traf4*, *Klf6* и регуляторов клеточного цикла *Ccng1*, *Cdkn1a*, *Btg2* и *Nupr1*, продукты которых также обладают выраженными антиапоптогенными свойствами.

Таким образом, наиболее вероятным событием, описывающим наблюдаемые изменения экспрессии генов регуляторов пролиферации и апоптоза в ответ на введение высококанцерогенного 3'-МеДАБ, является арест клеточного цикла в G1 фазе, опосредованный активацией сигнального пути p53, наряду с нарушением регуляции путей активации апоптоза.

Группа IV, объединяющая гены, избирательно реагирующие на ОАТ, проявила значимое обогащение терминами GO и KEGG, связанными, в первую очередь, с метаболизмом ксенобиотиков («метаболизм бензена и производных», «метаболизм ксенобиотиков CYP450», «метаболизм глутатиона» и т.д.). При этом экспрессия большинства соответствующих генов возрастала в ответ на ОАТ. Сходное обогащение терминами KEGG «метаболизм ксенобиотиков CYP450», «метаболизм лекарств» также было выявлено в группе генов V, реагирующих идентично на оба азокрасителя, однако в данном случае экспрессия большей части генов снижалась в ответ на 3'-МеДАБ и ОАТ. Наконец, в группе III обогащения аналогичными терминами выявлено не было.

Из результатов более детального анализа этой функциональной категории генов, приведенных в таблице 3, видно, что представленность мРНК ферментов как фазы I, так и фазы II метаболизма ксенобиотиков значительно выше в клетках печени животных, обработанных ОАТ, по сравнению с животными, обработанными 3'-МеДАБ.

Таблица 3. Изменение уровня экспрессии генов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, под действием 3'-МеДАБ и ОАТ

транскрипт	М	О	О/М	транскрипт	М	О	О/М
цитохромы P450				УДФ-глюкуронозил-трансферазы			
Cyp1b1	1.2	62.9	50.7	Ugt1a6	2.6	9.0	3.5
Cyp2b15	0.5	8.7	15.9	Ugt1a7	1.8	3.2	1.8
Cyp3a23/3a1	0.4	2.9	6.5	Ugt2b34	0.5	0.8	1.7
Cyp2a1	0.6	2.0	3.6	Ugt2b1	2.4	4.0	1.7
Cyp2f4	0.4	1.4	3.6	Ugt2a3	0.4	0.7	1.6
Cyp2c12	1.1	3.7	3.3	сульфотрансферазы			
Cyp1a1	5.9	18.9	3.2	Sult1c1	0.1	0.2	1.4
Cyp2c6	0.4	1.0	2.5	Sult1a1	0.4	0.4	1.1
Cyp1a2	1.4	3.1	2.2	Sult1c2	0.3	0.2	0.8
Cyp2a2	0.6	1.1	1.9	НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы			
Cyp2t1	0.4	0.5	1.5	Nqo2	0.3	0.8	2.8
Cyp2d5	0.4	0.6	1.5	Nqo1	4.1	8.5	2.1
Cyp2d1	0.5	0.7	1.5	глутатион-S-трансферазы			
Cyp4f4	0.3	0.4	1.4	Gsta2	0.8	3.9	4.9
Cyp3a2	0.4	0.6	1.4	Gsta4	0.6	2.4	4.2
Cyp2b3	0.3	0.4	1.3	Gstp1	2.3	6.7	2.8
Cyp2c37	0.4	0.5	1.2	Gsta5	2.2	4.6	2.1
Cyp2c13	0.4	0.5	1.1	Gstm3	0.4	0.4	1.1
Cyp2c23	0.5	0.5	1.0	Gstm1	2.0	1.9	1.0
Cyp2c7	0.5	0.5	0.9	транспортеры ОАТР и MDR/TAP			
Cyp3a18	0.3	0.3	0.9	Slco1b2	0.2	0.7	4.3
Cyp2c55	5.9	3.2	0.5	Abcc2	2.3	2.2	1.0
Cyp4a3	1.1	0.4	0.4	Abcc3	6.2	5.4	0.9
эпоксидгидролаза				Tap1	3.0	1.0	0.3
Ephx1	3.8	4.5	1.2	Abcb1b	48.3	6.9	0.1

Примечание: приведены коэффициенты изменения экспрессии мРНК при воздействии 3'-МеДАБ (М), ОАТ (О) и их отношение (О/М).

В частности, ОАТ приводит к гораздо более выраженной индукции генов цитохромов P450, и в первую очередь, ключевых ферментов метаболизма проканцерогенов Cyp1b1 и Cyp1a1, а также ряда генов УДФ-гликозил-трансфераз, глутатион-S-трансфераз, оксидоредуктазы Nqo1 и эпоксидгидролазы 1. В то же время, в ответ на 3'-МеДАБ происходит более значительное в сравнении с ОАТ увеличение экспрессии генов, кодирующих транспортные белки семейства

MDR/TAP, и в особенности, гена *Abcb1b* (multidrug resistance protein 1), участвующего в транспорте широкого спектра гидрофобных ксенобиотиков из клетки.

На основании наблюдаемых изменений экспрессии генов метаболизма ксенобиотиков можно предположить, эти два азосоединения могут индуцировать стратегически различные механизмы их утилизации в клетках печени крыс – быструю метаболическую деактивацию в случае ОАТ и более медленный метаболизм в сочетании с активной экскрецией в случае 3'-МеДАБ.

Стоит отметить, что регуляция экспрессии генов II фазы метаболизма ксенобиотиков (УДФ-гликозил-трансфераз, глутатион-S-трансфераз, *Nqo1* и *Ephx1*) осуществляется через активацию AhR-Nrf2-сигнального пути, ответственного также за ответ клетки на окислительный стресс. Любопытно, что экспрессия гена *Nrf2* увеличивается сопоставимо в ответ на 3'-МеДАБ и ОАТ (в 2.8 и 2.3 раза, соответственно), тогда как активация гена арилгидрокарбонового рецептора *AhR* наблюдается только в ответ на ОАТ (в 1.9 раза). В этой связи можно предполагать, что наблюдаемые различия между 3'-МеДАБ и ОАТ по влиянию на экспрессию генов ферментов II фазы обусловлены, главным образом, способностью ОАТ индуцировать экспрессию арилгидрокарбонового рецептора. В частности, эти различия в экспрессии так называемой «батареи генов AhR» – *Cyp1a1*, *Nqo1* и *Ugt1a6* – достигают 2-3 раз (таблица 3).

В то же время, более чем двукратная активация генов-мишеней белка Nrf2, ответственных за метаболизм глутатиона (глутатион синтетазы, глутамат-цистеин лигазы, глутатион пероксидазы, глутатион редуктазы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы), а также других его генов-мишеней, участвующих в ответе на окислительный стресс (тиоредоксин 1, тиоредоксин редуктазы 1, ферритина легкой цепи 1), наблюдается примерно в равной степени под действием обоих азосоединений.

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. Для ряда этих генов уже известна связь между соответствующим изменением их экспрессии и гепатоканцерогенезом. Так, экспрессия генов *Mcl1* и *Bcl2l1*, кодирующих антиапоптозные белки семейства Bcl-2, повышена в подавляющем числе биопсийных проб и клеточных линий гепатокарциномы человека, и выражается в повышенной устойчивости клеток к апоптогенным сигналам. Высокий уровень экспрессии гена *Tnfrsf12a*, кодирующего рецептор цитокина TWEAK, наблюдается в клетках гепатокарцином человека и мыши и в клетках регенерирующей печени, но не в нативной ткани (Feng et al., 2000). Экспрессия

гена *Klf6* в клеточных линиях гепатокарциномы важна для их пролиферации и резистентности к апоптозу. Активация экспрессии *Jun* играет важную роль в подавлении апоптоза на ранних этапах химически индуцированного гепатоканцерогенеза у мышей. Также известно, что у мышей, нокаутных по *Ccng1*, значительно снижены частота возникновения, число и размер индуцированных диэтилнитрозамином опухолей (Jensen et al., 2003). Кроме того, 3'-МеДАБ, по сравнению с ОАТ, в значительно меньшей степени индуцирует экспрессию генов метаболизма ксенобиотиков, потенциально способных участвовать в его собственной метаболической деактивации.

Большой интерес представляет реконструкция возможных регуляторных путей, приводящих к наблюдаемому изменению экспрессии генов под действием гепатоканцерогенных аминокрастиелей. Одним из подходов к такого рода реконструкции может быть поиск сайтов связывания регуляторных белков – факторов транскрипции в промоторных районах интересующих генов. В серии наших работ была выявлена связь между гепатоканцерогенностью соединения и снижением ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов FoxA (Каледин и др., 2009). Кроме того, нами был открыт новый тип сайтов связывания FoxA - микросателлитный повтор тетра nukлеотида TTTG (Брызгалов и др., 2008). Было также показано, что с такими микросателлитными сайтами специфически связывается другой транскрипционный фактор из семейства Fox - FoxO3, который является важным антипролиферативным агентом (Ершов, 2011).

Ввиду того, что гены *Tnfrsf12a*, *Klf6* и *Irf7* содержат в регуляторной области микросателлитный сайт (TTTG)₃, а гены *Ccng1* и *Pcna* – (TTTG)₆, можно предполагать, что белки FoxA и/или FoxO3, способные связываться с данным типом сайтов, участвуют в регуляции экспрессии этих генов. Так как введение крысам 3'-МеДАБ приводит к снижению ДНК-связывающей активности FoxA и FoxO3 (Ершов, 2011), можно было ожидать, что уровень экспрессии вышеуказанных генов будет в той или иной мере изменяться в ответ на этот канцероген. Проведенные эксперименты по изучению изменения экспрессии генов под действием азосоединений методами микроэрей-анализа и ПЦР-РВ действительно показали значительно более выраженное увеличение экспрессии *Ccng1*, *Tnfrsf12a*, *Klf6* и *Pcna* в клетках печени крыс под действием гепатоканцерогенного для них 3'-МеДАБ в сравнении со слабоканцерогенным ОАТ.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что обработка животных гепатоканцерогенными для них аминоксоединениями не только приводит к снижению ДНК-связывающей активности белков подсемейства FoxA и FoxO3 (Ершов, 2011), но также видоспецифической активации конститутивного рецептора андростанов (CAR) и арилгидрокарбонового рецептора (AhR). При

этом, в отличие от белков FoxA, CAR и AhR, роль которых в процессах канцерогенеза не до конца ясна, FoxO3 обладает выраженным опухолесупрессорным действием, в том числе посредством регуляции ряда генов, продукты которых играют ключевую роль в процессах апоптоза и клеточного цикла. С помощью веб-инструмента STRING нами была реконструирована сеть взаимодействий между генами, экспрессия которых изменяется только в ответ на гепатоканцерогенный 3'-МеДАБ, но не на слабоканцерогенный OAT (рис. 2).

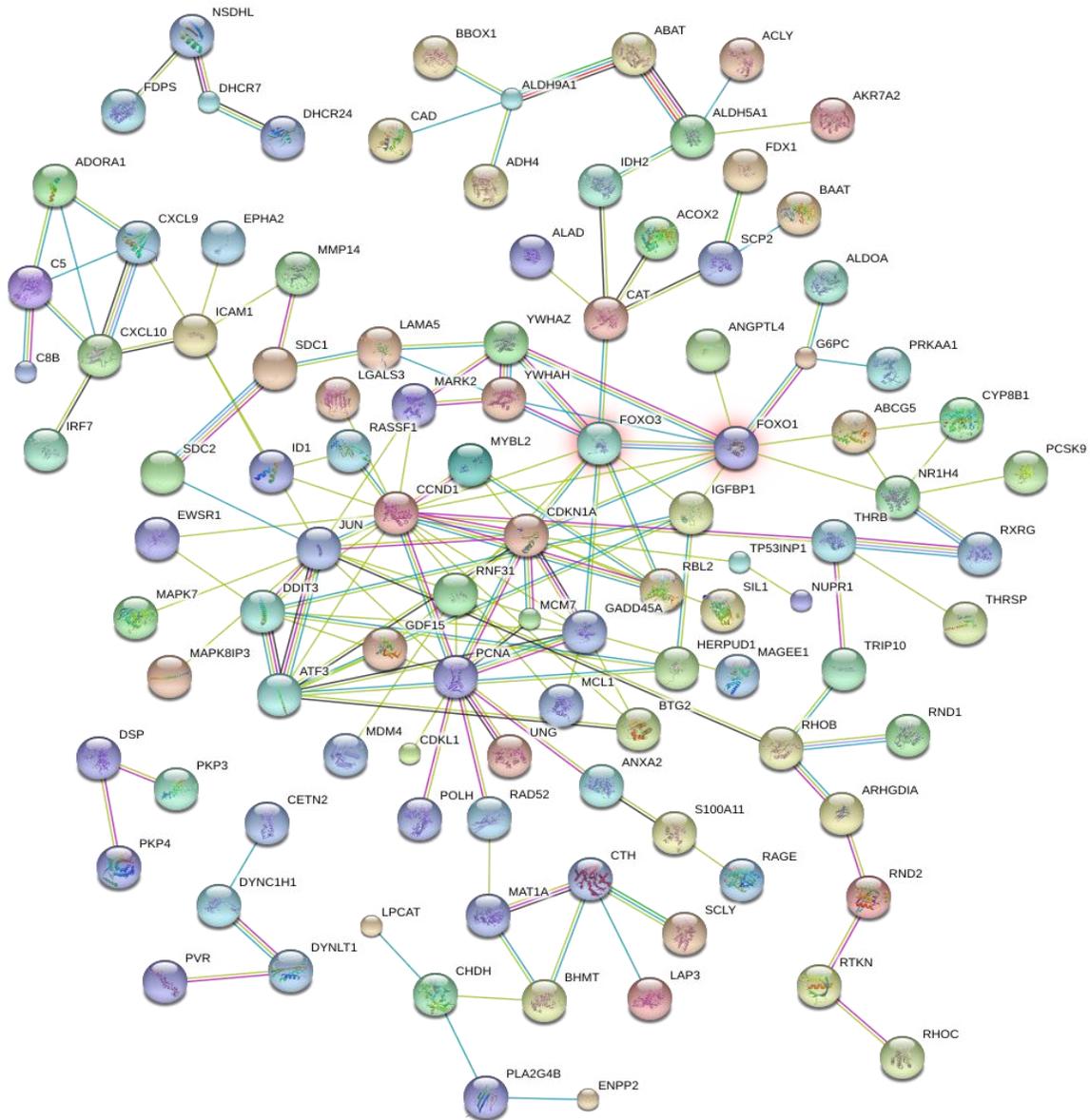


Рисунок 2. Сеть взаимодействий STRING 9.0 на основе перечня генов, экспрессия которых изменяется только в ответ на гепатоканцерогенный 3'-МеДАБ, но не на слабоканцерогенный OAT, с участием факторов транскрипции FoxO1 и FoxO3.

В соответствии с результатами функционального анализа, центральная часть данной сети представлена преимущественно генами, ответственными за регуляцию клеточного цикла и апоптоза. Для белков FoxO воспроизведены функциональные взаимодействия с высоким уровнем значимости как с представителями вышеуказанной группы генов (*Rbl2*, *Cdkn1a*, *Ccnd1*, *Gadd45a*, *Igfbp1*), так и с группой генов, ответственных за клеточный метаболизм (*Cat*, *Angptl4*, *G6pc*, *Abcg5*, *Nr1h4*). Таким образом, данный анализ также подтверждает возможное участие белков FoxO в реализации наблюдаемых эффектов 3'-МеДАБ на транскриптом печени.

Соответствующее литературным данным участие белков FoxO в регуляции экспрессии одновременно как генов клеточного метаболизма, так и генов клеточного цикла и апоптоза, может объяснять наблюдаемые ранние изменения экспрессии этих функциональных групп генов в печени под действием 3'-МеДАБ, равно как и показанную ранее связь между чувствительностью животных к гепатоканцерогенному действию аминокислотосоединений и их рационом.

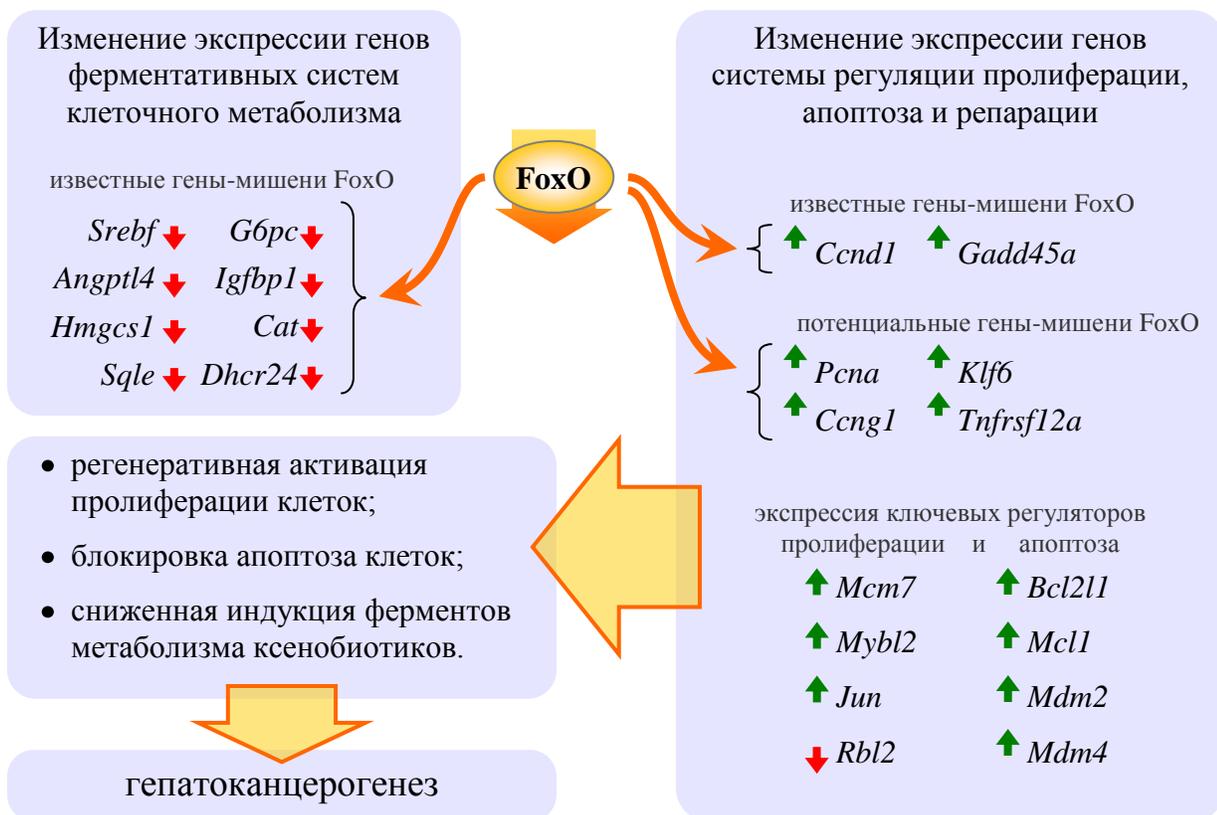


Рисунок 3. Схема возможного участия белков подсемейства FoxO в реализации ранних изменений экспрессии генов в печени, вызванных гепатоканцерогенным аминокислотосоединением 3'-МеДАБ.

Таким образом, можно предполагать, что снижение ДНК-связывающей активности данного белка является важным звеном в некоторых из событий злокачественного перерождения клеток печени под действием 3'-MeДАБ и восстановленная по результатам наших исследований схема регуляторных событий может выглядеть следующим образом (Рис. 3).

2. Создание комплексной математической модели регуляции почечных процессов и ее роли в развитии артериальной гипертонии (Шарипов Р.Н. при участии Киселева И.Н. и Семисалова Б.В., КТИ ВТ СО РАН)

Компьютерное моделирование сердечно-сосудистой системы (ССС) человека является одной из наиболее актуальных задач современной науки. Создание ее полной модели позволит перенести эксперименты в область *in silico* и увеличить производительность научных исследований в области создания лекарств нового поколения. На данный момент существует большое количество моделей, делающих упор на различные аспекты регуляции кровообращения, например (Солодянников, 1994).

В данной работе были использованы три описывающие различные аспекты ССС человека модели, а именно: модель кратковременных эффектов, связанных с сердечными сокращениями (Солодянников, 1994), модель долговременной почечной регуляции артериального давления (АД) (Karaaslan et al., 2005) и модель системы крупных артерий тела человека (Lamroni, 2004), использующие различный математический аппарат: обыкновенные дифференциальные уравнения (ОДУ), алгебро-дифференциальные уравнения (АДУ) и дифференциальные уравнения в частных производных (ДУЧП). Эти модели были реализованы в BioUML (<http://www.biouml.org>) – открытом пакете программ для формального описания и моделирования биологических систем. Для создания комплексной модели ССС человека с блоком почечной регуляции был применен агентный подход, а также модуль графического представления математических моделей в виде блочных диаграмм и модуль для автоматической генерации и численной симуляции агентных моделей с использованием библиотеки Ascape (Inchiosa and Parker, 2002). Как результат примененного подхода, комплексная модель ССС была создана путем интеграции вышеупомянутых различных по формализму и внутреннему содержанию моделей. Данная модель может демонстрировать как локальные (например, ток крови по отдельным сосудам, биение сердца), так и глобальные (регуляция содержания гормонов и других веществ в организме в течение нескольких часов) процессы в системе.

Агентное моделирование. Агентный подход используется для моделирования сложных систем, состоящих из большого количества взаимодействующих подсистем. В частности, в случае, когда слишком трудно или невозможно формализовать поведение системы на глобальном уровне. В

рамках этого подхода, система рассматривается как совокупность взаимодействующих частей – агентов, каждый из которых действует самостоятельно по заранее определенным правилам и может взаимодействовать с другими агентами и, таким образом, поведение всей системы складывается из взаимодействия ее частей. Изначально агентный подход был разработан для моделирования социальных процессов в человеческих сообществах. В рамках данного проекта агентный подход был выбран как наиболее гибкий и удобный для моделирования сложных биологических систем, таких как, например, ССС человека.

Для применения данного подхода был использован специальный программный модуль BioUML, который обеспечивает пользовательский интерфейс для графического создания агентных моделей в виде блочных диаграмм и автоматическую генерацию и симуляцию агентных моделей на основе библиотеки Ascape (Inchiosa and Parker, 2002).

Графическим представлением агентной модели в системе BioUML является блочная диаграмма, на которой каждому агенту соответствует отдельный блок (модуль), входные и выходные параметры обозначены портами, а связи между агентами представлены стрелками, соединяющими порты. При этом используются два вида связи – направленная связь, при которой значение параметра из одного агента просто передается соответствующему параметру другого агента (один агент влияет на другого, но не наоборот) и ненаправленная связь, при которой связанные параметры могут изменяться обоими агентами (агенты влияют друг на друга). На данный момент реализованы следующие типы агентов:

- блок (подмодель) – агент, содержащий математическую модель (чаще всего систему алгебро-дифференциальных уравнений) и метод ее численного решения;
- адаптер – агент, преобразующий входной сигнал соответствующим образом и подающий его на выход, в частности нам понадобится адаптер, вычисляющий скользящее среднее;
- график – агент, шаг которого во времени заключается в графическом выводе поступивших значений параметров.

Список элементов блочной диаграммы с графической нотацией приведен на рис. 4.

Модель сердечных сокращений

Одной из моделей, использованных в разработанной комплексной модели ССС человека, является модель (Солодяников, 1994), которая акцентирована на кратковременной регуляции кровообращения. Единица времени в модели – секунда.

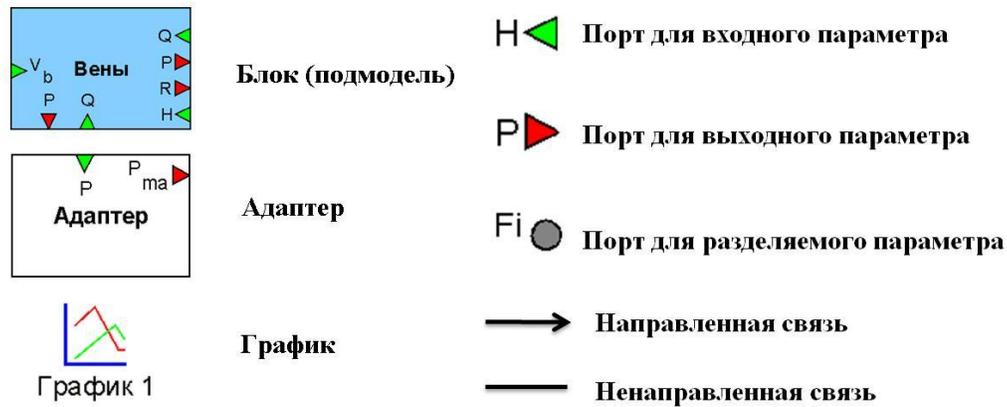


Рисунок 4. Графическая нотация элементов блочной диаграммы.

ССС представлена в модели в виде замкнутой системы резервуаров, включающих в себя сердце, венозный резервуар и артериальную систему. Капилляры не являются самостоятельными резервуарами, однако служат границей между артериальным и венозным резервуарами. Капиллярное сопротивление, зависящее от кислородного долга и гуморального фактора, влияет на ток крови из артерий в вены. Кровообращение между резервуарами регулируется следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dV_i}{dt} = Q_{ki} - Q_{ij}, \\ P_i = G_i(V_i - W_i), \\ Q_{ij} = \frac{P_i - P_j}{R_{ij}}, \end{cases} \quad (1)$$

где:

$i \in \{A, V, H\}$ - индекс резервуара (A – артериальная система, V – венозная, H – сердце),

V_i – объем крови в i -том резервуаре,

P_i – давление крови в i -том резервуаре,

G_i – объемная эластичность i -того резервуара,

W_i – ненапряженный объем i -того резервуара.

Q_{ij} – поток крови из i -того в j -тый резервуар,

R_{ij} – сопротивление току крови из i -того в j -тый резервуар.

Модель учитывает влияние кислородного обмена в организме, используя концепцию кислородного долга, который является одним из управляющих сигналов в модели. Сердце моделируется как насос, переключающийся между двумя состояниями – систолой и диастолой. Во время систолы активируется кровоток из желудочка в артериальный резервуар, во время

диастолы – из венозного резервуара в желудочек. Переход от систолы к диастоле основывается на законе Франка-Старлинга. Длина всего сердечного цикла $\frac{1}{H}$, где H - нейро-гуморальный фактор.

Модель ССС [1] была реализована в системе BioUML в виде блочной диаграммы (рис. 5) и включает в себя 59 параметров, 4 дифференциальных, 16 скалярных уравнений и 2 исполняемых события для мгновенного перехода между состояниями. Алгоритм для численного решения, встроенный в BioUML, на каждом шаге симуляции проверяет условие перехода и рассчитывает точное время происхождения события переходы модели из одного состояния в другое.

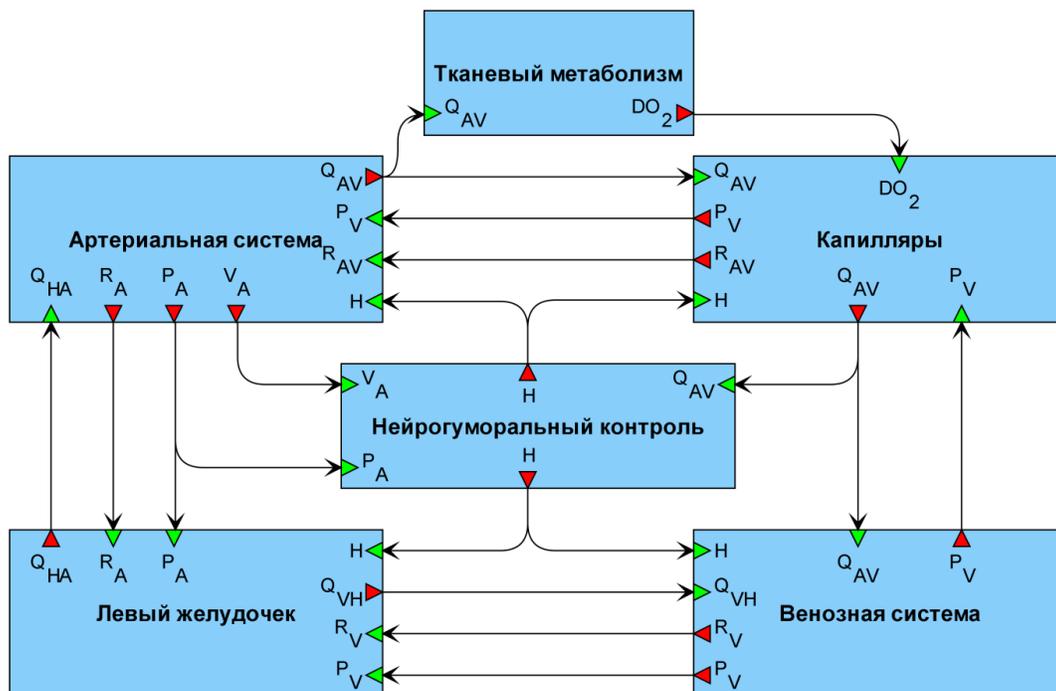


Рисунок 5. Модель ССС человека [1], реализованная как блочная диаграмма BioUML. Здесь: P_i – давление в i -том резервуаре, Q_{ij} – поток из i -того резервуара в j -тый, R_{ij} – сопротивляемость потоку Q_{ij} , V_i – объем i -того резервуара, H – нейро-гуморальный фактор, DO_2 – кислородный долг.

Модель долговременной почечной регуляции

Почка является важным компонентом ССС, регулирующим объем и состав жидкости в организме и, соответственно, артериальное давление, поэтому без нее комплексная модель была бы неполной. Одной из наиболее проработанных моделей ССС человека, подробно описывающих работу почки, является модель долговременной регуляции артериального давления, разработанная Ф. Караасланом с соавторами (Karaaslan et al., 2005). Данная модель была создана на основе предыдущих работ: Гайтона с соавторами (Guyton et al., 1972), Уттамсингха с соавторами (Uttamsingh et al., 1985) и Коулмана и Холла (Coleman and Hall, 1972). Модель

представлена в виде набора из 36 блоков, описываемых 61 алгебраическим и 8 дифференциальными уравнениями. Наиболее важной частью модели является блок, описывающий регуляцию объема жидкости в организме почкой. Данный блок значительно более детализирован, чем в моделях-предшественниках. Важной частью модели является регуляция уровня различных гормонов и веществ в организме – вазопрессина, ангиотензина, альдостерона, натрийуретического пептида, пищевой соли и др. в организме человека. Регуляция концентрации этих веществ описывается согласно подходу Гайтона с соавторами (Guyton et al., 1972):

$$\frac{dx}{dt} = \frac{x_s - x}{T}$$

где:

x – концентрация вещества,

x_s – уровень секреции вещества,

T – постоянная, отражающая тот факт, что новое состояние покоя после изменения уровня секреции достигается с некоторой определенной задержкой.

Реализованная в системе BioUML версия модели состоит из 6 функциональных блоков: сердце, артерии, почка, нервная система, гормональная система, блок контроля объема жидкости (рис.6).

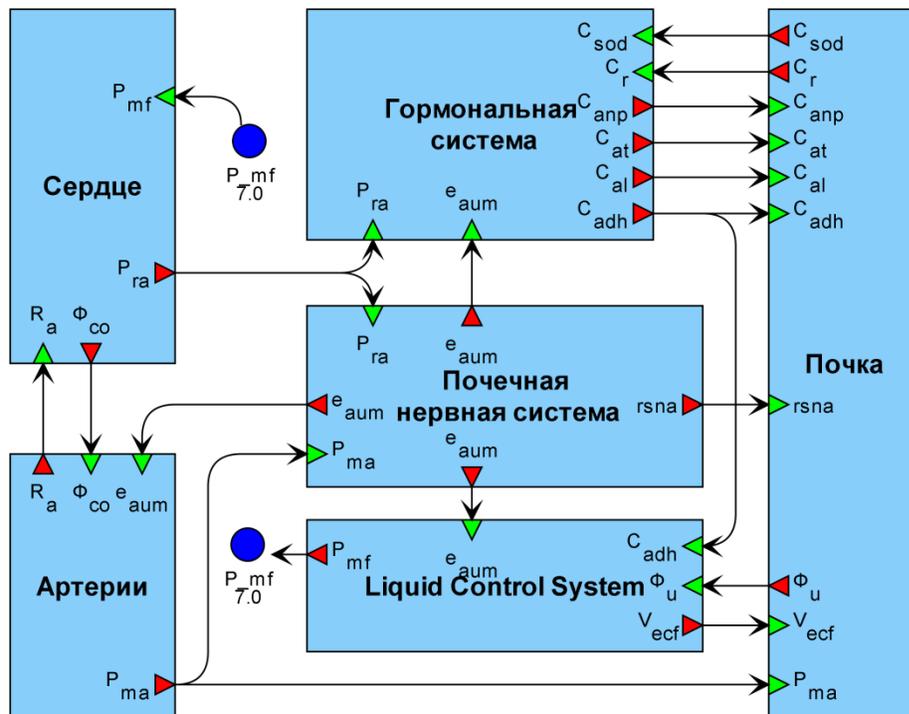


Рисунок 6. Модель CCC человека (Karaaslan et al., 2005), реализованная в виде блочной модели в BioUML (расшифровка параметров в таблице 4).

Модель артериального дерева

Одномерная модель артериального дерева человека, созданная ранее сотрудниками ИМ СО РАН и КТИ ВТ СО РАН в рамках интеграционных проектов СО РАН 2006-2011 гг на основе модели (Lamponi, 2004), описывает течение крови в артериальном сосудистом русле человека. Модель включает в себя 55 основных артерий, составляющих бинарное дерево. Каждая артерия описана набором параметров: длина, площадь поперечного сечения, объемная эластичность и два «дочерних» сосуда, на которые она разветвляется (кроме терминальных сосудов).

Таблица 4. Условные обозначения параметров модульной модели, используемых на рис. 3 и 4.

	Описание
e_{au}	Эффект автономной нервной системы
C_{ad}	Концентрация антидиуретического гормона
C_{an}	Концентрация натриуретического пептида
C_{al}	Концентрация альдостерона
C_{at}	Концентрация ангиотензина
C	Сердечный выброс, рассчитываемый в модели сердечных сокращений
C_r	Концентрация ренина
C_{so}	Концентрация натрия
Φ_c	Сердечный выброс, рассчитываемый в модели почечной регуляции
Φ_r	Почечный кровоток
Φ_u	Скорость тока мочи
P_m	Среднее артериальное давление
P_{mf}	Среднее наполняющее давление
P_{ra}	Давление в правом предсердии
Q_A	Поток крови из артериальной системы в почку
R_{aa}	Базовое сопротивление почечных афферентных артериол
R_r	Почечное сосудистое сопротивление
R_A	Сопротивление току крови из артериальной системы в почку
rsn	Почечная симпатическая нервная активность
vas	Васкуляризация
V_{ec}	Объем внеклеточной жидкости

Математическая модель была получена из уравнений Навье-Стокса посредством интегрирования их по произвольному осевому сечению сосуда, т.е. в некотором смысле посредством усреднения этих уравнений по “поперечному” направлению. Алгоритм решения уравнений модели был реализован на языке Java в виде модуля для пакета программ BioUML. Кроме того, в BioUML был реализован пользовательский интерфейс для графического редактирования структуры артериального дерева и задания всех необходимых параметров (Рис. 7).

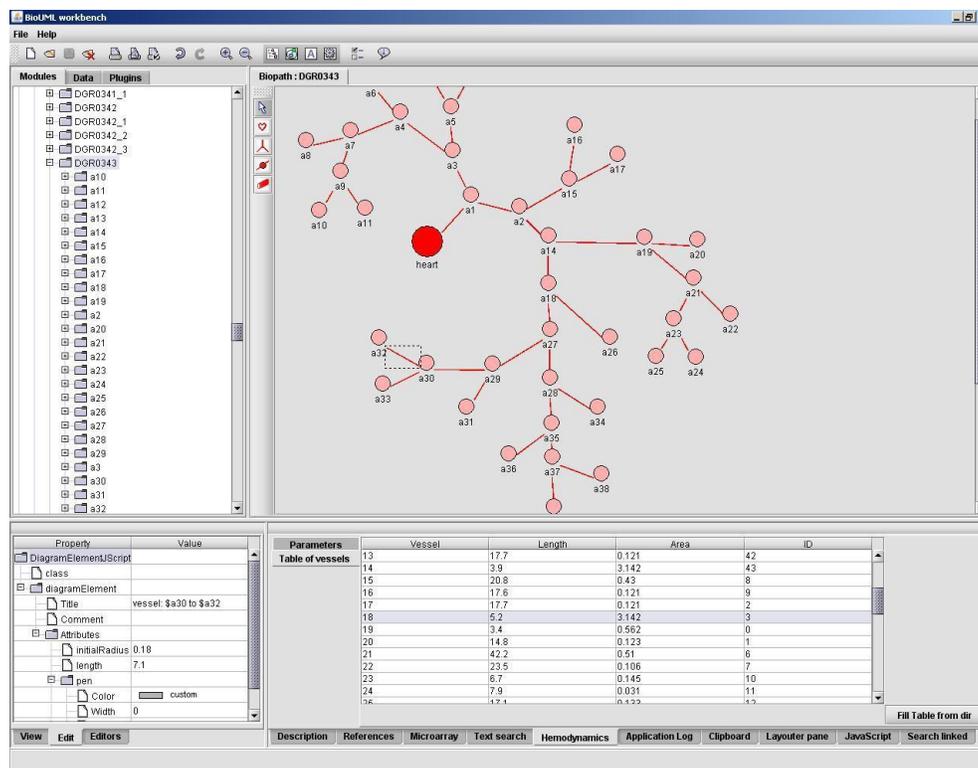


Рисунок 7. Гидродинамическая модель артериального дерева из 55 сосудов в системе BioUML.

Комплексная модель сердечно-сосудистой системы человека

В результате применения агентного подхода путем интеграции описанных выше математических моделей, которые были реализованы в пакете программ BioUML в виде блочных диаграмм, была создана и исследована комплексная модель ССС человека. Кроме того, были определены и согласованы между собой входные и выходные параметры каждой подмодели. Объединение моделей было осуществлено в два этапа.

Этап 1. Объединение моделей сердечных сокращений и артериального дерева.

Блочная диаграмма модели (Солодяников, 1994) (рис. 5) содержит модуль артериальной системы. Входными параметрами этого блока являются: поток крови из желудочка в артериальную систему Q_{HA} , сопротивляемость току крови из артериальной системы в капилляры R_{AV} , давление в венозном резервуаре P_V и нейро-гуморальный фактор H . Эти параметры используются внутри модуля для расчета выходных параметров, которыми являются: среднее артериальное давление P_A , объем крови в артериальном резервуаре V_A , сопротивляемость току крови из желудочка R_{HA} и поток крови из артериальной системы Q_{AV} .

Для того, чтоб заменить блок артериальной системы моделью артериального дерева необходимо добавить в последнюю расчет аналогичных выходных параметров (индекс HDM будет обозначать артериальное дерево):

$$V_{HDM}(t) = c_1 \sum_{i=1}^{55} \int_0^{l_i} A(t, z) dz,$$

Здесь коэффициент c_1 учитывает несоответствие между объемом артериального дерева и резервуара артериальной системы модели.

$$P_{HDM}(t) = \frac{\sum_{i=1}^{55} \int_0^{l_i} p(t, z) A(t, z) dz}{V_{HDM}(t)},$$

$$Q_{HDM, V}(t) = \sum_{i \in \mathbb{N}} Q_i(t, l_i).$$

Сопrotивляемость отдельных сосудов рассчитывалась по формуле Пуазейля, сопrotивляемость артериального дерева в целом – аналогично сопrotивляемости в электрических цепях: сосуды рассматривались как участки цепи, соединенные последовательно либо параллельно между собой. Поток крови играет роль тока, давление – электрического потенциала. Рассчитанное таким образом общее артериальное сопrotивление будем обозначать R_{HDM} .

С другой стороны, для численного решения уравнения гидродинамической модели необходимо задать краевые условия на свободных концах сосудов, что может быть сделано несколькими способами. В соответствии с входными параметрами модуля артериальной системы модели (Солодяников, 1994), мы будем использовать поток крови на входе в восходящую аорту Q_{HA} на одном конце дерева, и заданное давление P_V и сопrotивление на конечных сосудах R_{AV} :

$$Q_1(t, 0) = Q_{HA}(t)$$

$$Q_i(t, l_i) = \frac{A_i(t, l_i)}{\sum_{j \in \mathbb{N}} A_j(t, l_j) R_{AV}(t)} (p_i(t, l_i) - P_V(t)), i \in \mathbb{N}$$

Здесь \mathbb{N} - множество индексов последних сосудов дерева (не разветвляющихся на два других).

В комплексной модели не учтено влияние нейро-гуморального фактора на артериальное дерево, но с другой стороны, объединенная модель позволяет рассчитывать поток крови в каждом из 55 сосудов по отдельности.

Этап 2. Объединение моделей сердечных сокращений и модели почечной регуляции.

Модели (Солодяников, 1994) и (Karaaslan et al., 2005) используют одинаковый формализм – АДУ, однако имеют различные шкалы времени – секунды и минуты, соответственно, что

существенно затрудняет их объединение обычным образом, однако в агентной модели присутствует планировщик, обеспечивающий синхронизацию агентов и учитывающий различные шкалы времени. Как видно из рис. 5 и 6, эти модели имеют блоки, описывающие одни и те же биологические объекты: сердце и артериальную систему. При этом, модель сердечных сокращений, интегрированная с моделью артериального дерева, содержит детализированное представление работы сердца и артерий, в то время как модель долговременной почечной регуляции содержит усредненные по времени параметры. Исходя из этих соображений, мы убираем эти блоки из модели почечной регуляции и заменяем их блоками модели сердца и артериального дерева. Для корректного объединения необходимо передать в модель почки выходные параметры этих модулей.

В модели почечной регуляции (Karaaslan et al., 2005) артериальное давление представлено средним давлением P_{ma} , рассчитываемым на основе величины сердечного выброса и периферической сосудистой. В рамках модульной модели, это давление будет рассчитываться путем расчета скользящего среднего значения среднего по сосудам артериального давления P_{HDM} . Также важным параметром, влияющим на почечную симпатическую нервную активность, а также секрецию антидиуретического гормона и натрийуретического пептида, является уровень давления в правом предсердии P_{ra} , который в модели (Karaaslan et al., 2005) определяется величиной сердечного выброса Φ_{co} . В модели [1] отсутствует малый круг кровообращения, как и правое предсердие, соответственно в рамках модульной модели, мы выделили уравнения для расчета P_{ra} в отдельный модуль “Правое предсердие” из модуля “Сердце” модели (Karaaslan et al., 2005). Этот модуль принимает значение сердечного выброса (минутного объема), рассчитываемого в модуле “Левый желудочек” из модели сердечных сокращений и дополненным соответствующим уравнением:

$$CO(t) = \frac{c_2}{1000} \int_{t-60}^t Q_{HA}(x) dx, \quad CO(0) = \Phi_{co}(0) = 5 \text{ л / мин},$$

здесь c_2 – поправочный коэффициент, учитывающий отсутствие правого желудочка в модели (Солодяников, 1994)

Учет влияния автономной почечной нервной системы, а также эффекта васкуляризации, присутствующих в модели почки, на артериальное дерево достигается передачей соответствующих параметров в модель артериального дерева и коррекцией общего артериального сопротивления:

$$R_{HDM}^{Corrected} = R_{HDM} \frac{\varepsilon_{aum}}{vas}$$

Таким образом, модули “Сердце” и “Артерии” могут быть исключены из модульной модели с сохранением только уравнений для расчета давления в правом предсердии P_{ra} и эффекта васкуляризации vas (блоки 19 и 20 из (Karaaslan et al., 2005)).

Важным объектом регуляции в модели Карааслана и соавторов является общий объем крови в системе, в то время как в остальных рассматриваемых моделях он считается постоянным. Для учета этой регуляции в модульной модели, мы меняем объем артериального дерева с учетом изменений объема крови V_b в модели (Karaaslan et al., 2005):

$$V_{HDM}^{Corrected}(t) = V_{HDM}(t) + c_3(V_b(t) - V_b(0)).$$

Коэффициент $c_3 = 0.12$ отражает долю объема крови в артериальной системе (Proshin and Solodyannikov, 2006).

Для более детальной связи моделей, на концах почечных артерий артериального дерева зададим новое граничное условие:

$$Q_r(t, l_r) = Q_{r_1}(t, l_{r_1}) + Q_{r_2}(t, l_{r_2}) = \frac{P_r^{Average}(t)}{R_r} = \frac{A_{r_1}(t, l_{r_1})P_{r_1}(t, l_{r_1}) + A_{r_2}(t, l_{r_2})P_{r_2}(t, l_{r_2})}{R_r(A_{r_1}(t, l_{r_1}) + A_{r_2}(t, l_{r_2}))}$$

где r_1 и r_2 – индексы почечных артерий, R_r – почечная сосудистая сопротивляемость, рассчитываемая в модели почки с учетом влияния автономной нервной системы и потока натрия через *macula densa*.

Средняя афферентная сопротивляемость R_{aass} является константной, поэтому мы будем ее рассчитывать в модели артериального дерева, основываясь на сопротивляемости почечных артерий:

$$R_{aass}^{Mean}(t) = \frac{c_4}{k} \sum_{i=1}^k (r_{r_1}(t_i) + r_{r_2}(t_i)), \quad t_{i+1} - t_i = \Delta > 0, \quad \forall i = 1, \dots, k-1, \quad t_k = t,$$

где c_4 – поправочный коэффициент, введенный для учета блока артериол в модели артериального дерева из 55 основных сосудов.

Созданная таким образом комплексная модульная модель ССС человека представлена на рис. 8.

Эксперимент с комплексной моделью

Для тестирования модели было проведено два эксперимента. Первым был долгосрочный эксперимент с солевой нагрузкой, описанный в (Karaaslan et al., 2005). Эксперимент был проведен на комплексной модели, с выключенным из-за большой вычислительной сложности модулем артериального дерева. Потребление пищевой соли в состоянии покоя составляет 0.126 мЭкв/мин.

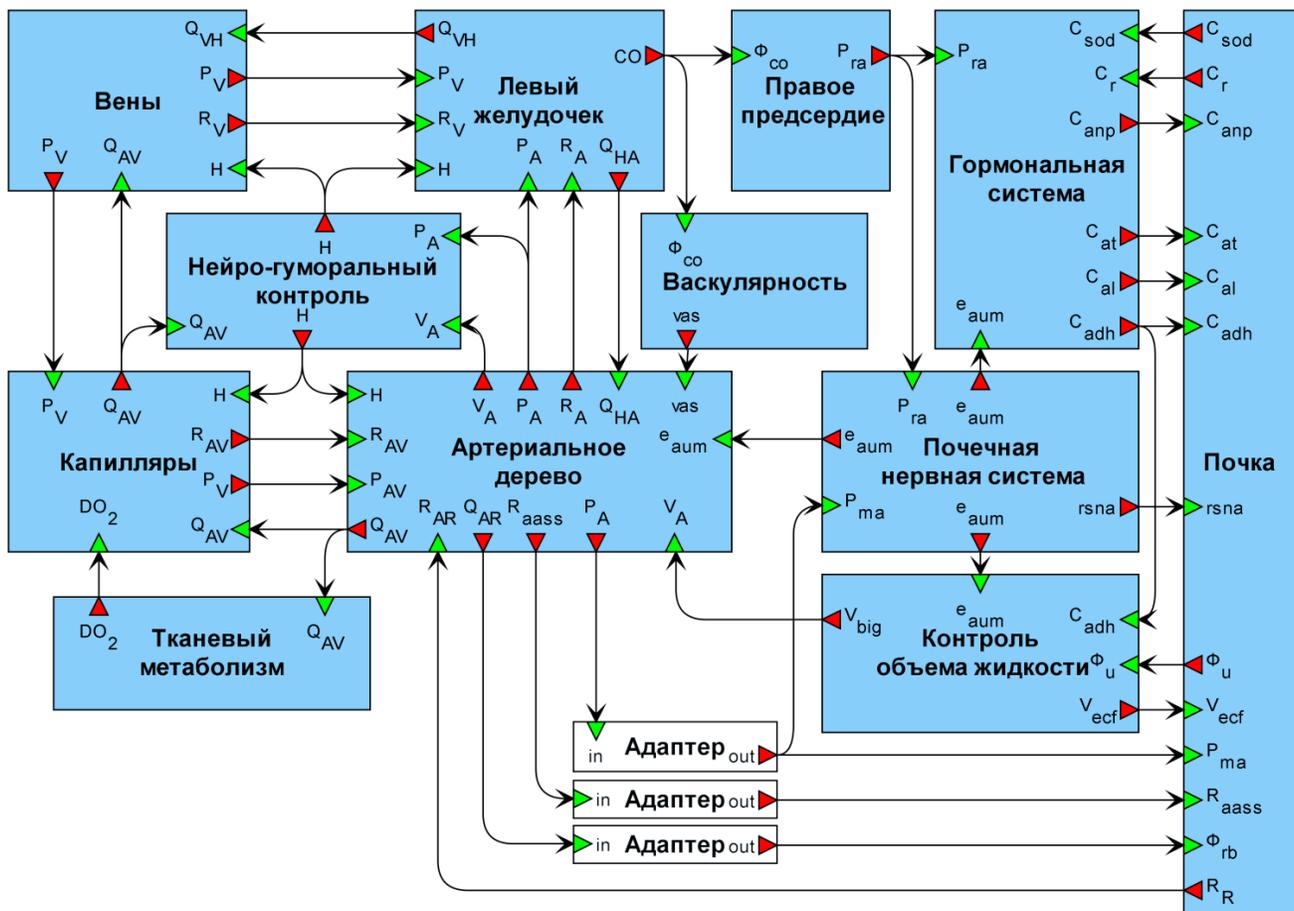


Рисунок 8. Комплексная модель ССС человека, собранная в системе BioUML из блоков моделей сердечных сокращений (Солодяников, 1994) модели почечной регуляции (Karaaslan et al., 2005) и модели артериального дерева (Lamponi, 2004). Для расшифровки обозначения параметров см. рис.5 и Таблицу 4.

Симуляция начинается с момента времени $t_0 = 0$ (рис. 9). Общее время симуляции – 13 дней. Через 24 часа после начала симуляции потребление соли увеличивается скачком до 0.26 мЭкв/мин и уменьшается до 0.02 через 6 дней после начала симуляции. Результаты эксперименты приведены на рис. 6. Сплошной линией обозначены результаты симуляции комплексной агентной модели, пунктиром – отдельно реализованной в BioUML модели. Из результатов симуляции видно некоторое расхождение между моделью почечной регуляции, реализованной отдельно, и комплексной моделью. Это связано с небольшими отличиями в величинах их параметров. Так, сердечный выброс, рассчитываемый в модели сердечных сокращений равен примерно 6.5 л/мин, в то время как в модели почки в норме он меньше. Кроме того, в случае комплексной модели играют роль краткосрочные параметры, так, например, среднее артериальное давление считается подсчетом скользящего среднего по времени артериального давления, из-за чего все связанные с ним параметры также становятся подвержены слабым колебаниям.

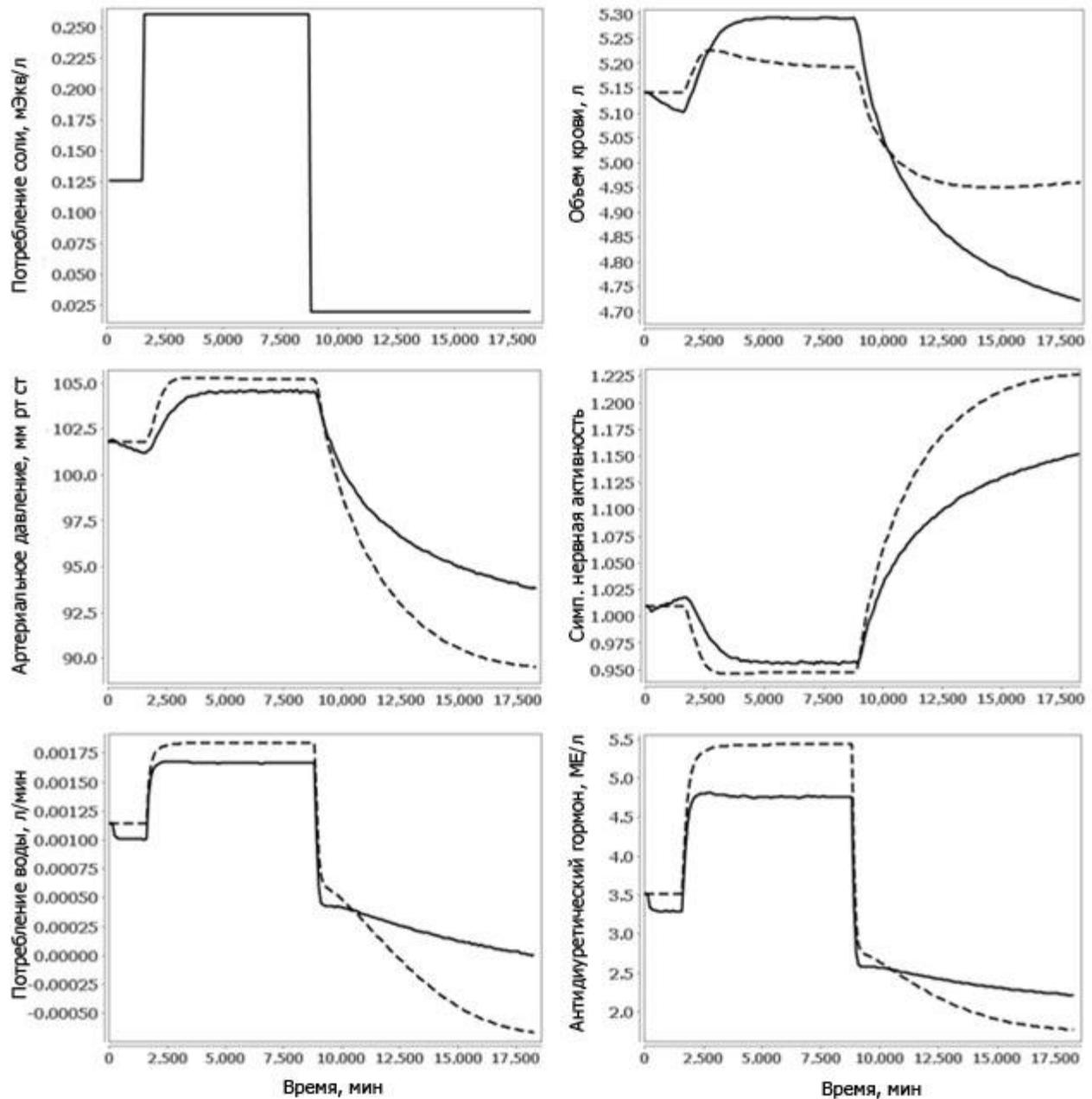


Рисунок 9. Эксперимент с солевой нагрузкой в комплексной модели. Пояснения см. в тексте.

Второй эксперимент призван продемонстрировать взаимодействие между блоком артерий и блоками усредненных параметров модели долговременной регуляции ССС. Эксперимент заключается в постепенном сужении почечных артерий, площадь сечения каждой из артерий линейно сужается со 100% до 50% с 5 по 125 минуту эксперимента. Общее время эксперимента – 240 минут. На рис. 10 представлены результаты для долгосрочных параметров в сравнении с

работой модели почечной регуляции. На рис. 11 представлены графики изменения потока крови и артериального давления для отдельных сосудов в различных контрольных точках.

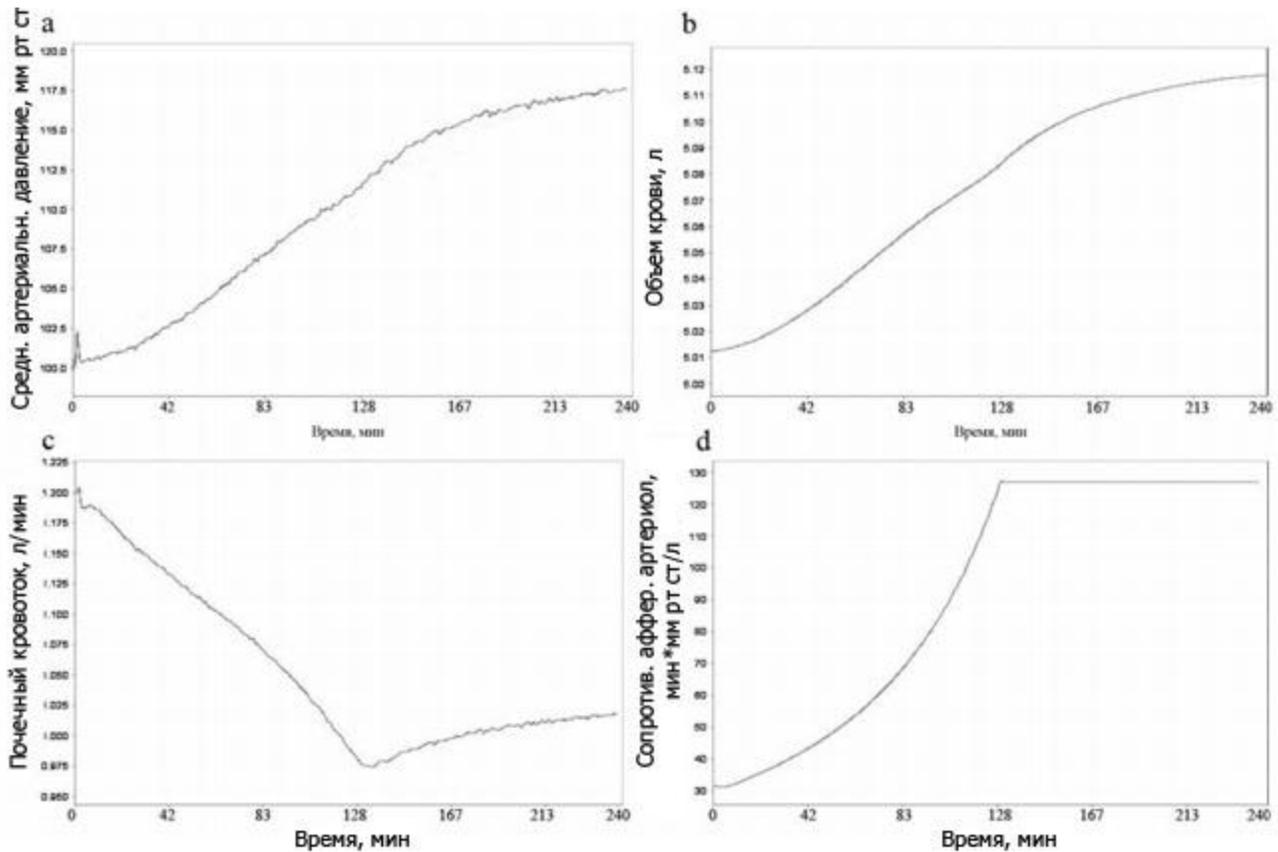


Рисунок 10. Изменение параметров комплексной модели в результате сужения почечной артерии (эксперимент).

Нормальный объем крови взрослого человека составляет около 5 литров, норма почечного кровотока – около 1.2 и нормальное давление в почечной артерии – около 100 мм рт ст. Отсюда видно, что значения параметров, указанных на рисунке 7, находятся в допустимых рамках с точки зрения физиологии человека. Стеноз почечной артерии, моделируемый нами, приводит к повышению давления в ней в модели выше 110 мм рт ст, что соответствует нормальному давлению крови для сонной артерии. В ходе эксперимента давление крови в ССС возрастает, а в указанных артериях достигает значения 130-135 мм рт ст и в дальнейшем поддерживается, что уже соответствует начальному уровню артериальной гипертонии.

Таким образом, на основании изложенных выше результатов симуляции комплексной модульной модели ССС человека, мы можем заключить, что данная модель корректно описывает моделируемые процессы, связанные с кровообращением. В дальнейшем будет предпринято расширенное тестирование и валидирование построенной модели.

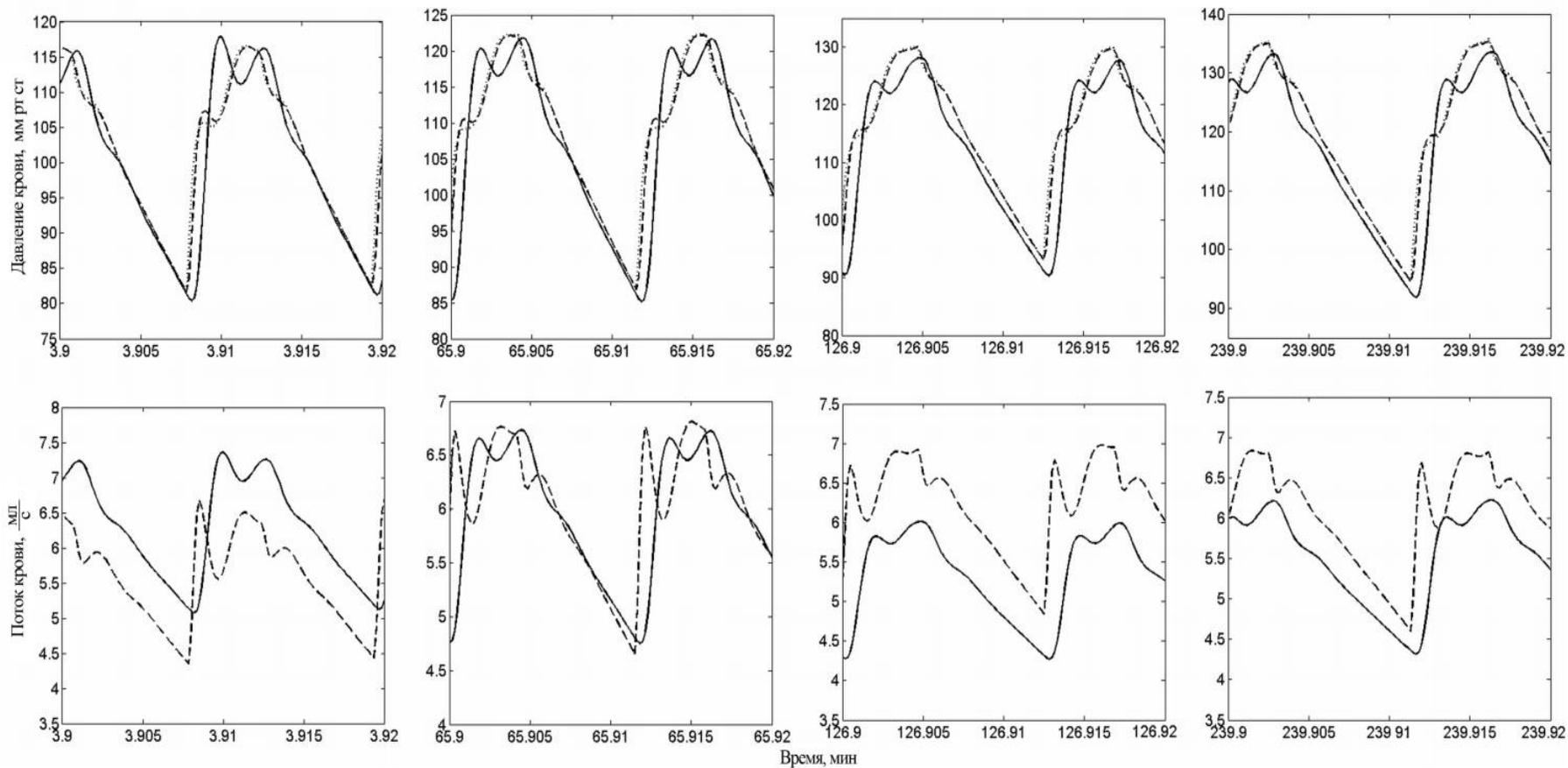


Рисунок 11. Результаты эксперимента с сужением почечной артерии. Краткосрочные параметры: давление и поток крови на конце правой почечной артерии (сплошная линия) и в начале правой сонной артерии (пунктир).

3. Создание базы данных мРНК генов эукариот, содержащих сигналы стресс-специфической трансляции.

На предыдущих этапах выполнения проекта нами были определены характеристики мРНК, потенциально связанные со стресс-специфической трансляцией. В частности, была предложена гипотеза, согласно которой определенное значение может иметь процесс реинициации трансляции, поскольку эффективность этого процесса зависит от статуса фосфорилирования фактора инициации трансляции eIF2a. При стрессе активируются протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование этого фактора, что приводит к выводу eIF2 из оборота и снижению трансляционной активности большинства клеточных мРНК. Это необходимо для того, чтобы перевести ресурсы клетки на синтез защитных белков, а также для того, чтобы предотвратить появление в клетке частично денатурированных молекул белка, способных негативно влиять на многие молекулярные процессы (Jackson et al., 2010). Эта гипотеза была подтверждена нами при проверке контекстных характеристик мРНК млекопитающих, связанных с реинициацией трансляции: было найдено, что присутствие небольших лидерных рамок считывания (uORF) у некоторых мРНК коррелирует с конформацией, способствующей реинициации на нижерасположенном стратовом кодоне и синтезу укороченной с N-конца молекулы соответствующего белка (детальное описание приведено в отчете за предыдущий этап выполнения проекта). Однако, связь между uORF и стресс-специфической трансляцией оставалась гипотетической. На данном этапе мы провели экспериментальную проверку такой взаимосвязи. Эта часть работы выполнена совместно с коллегами из университета Мадрида (Ventoso et al., 2012), на базе которых были выполнены экспериментальные исследования трансляционной активности мРНК генов мыши. Была использована клеточная линия фибробластов (NIH3T3). Культуры клеток обрабатывали ингибитором (thapsigargin), вызывающим активацию протеинкиназы PERK, фосфорилирование eIF2a и имитирующим стрессовые условия (unfolded protein response). Из культур, растущих в нормальных и стрессовых условиях, с помощью ультрацентрифугирования выделяли фракцию полисом, содержащих транслируемые мРНК, и идентифицировали эти молекулы с помощью микрочипов (детальное описание приведено в статье Ventoso et al., 2012). Было найдено следующее: после стресса около 90% мРНК диссоциировали с полисом и их трансляция прекращалась в течении первого часа после обработки. Через 3-4 часа синтез белка начинал восстанавливаться, при этом выделялись две группы: мРНК, трансляция которых усиливалась после стресса (Inducible, I – обогащенная матрицами генов стрессового ответа), а также группу матриц, трансляция которых была устойчивой и не менялась ни до стресса, ни под воздействие стресса (Resistent, R). Это

позволило найти две разные моды, которым следовали разные компоненты клеточного транскриптома. Характеристики этих выборок мРНК приведены в таблице 5.

Таблица 5. Характеристики мРНК клеток мыши, различающихся по трансляционной активности во время стресса (размер и G+C состав 5'-НТП, контекст стартового кодона трансляции (доля мРНК в оптимальном контексте RnnAUG), а также доля мРНК, содержащих разное число uAUG).

НИЗТЗ	все (8159)	Resistant (276)	Induced (599)
5'-НТП размер нт	144	191	206
5'-НТП G+C (%)	65.3	61.5	61.5
RnnAUG частота	0.87	0.89	0.84
uAUG=>1 (%)	43.3	38.1	58.9
uAUG=>2 (%)	22.4	19.6	36.4
uAUG=>3 (%)	13.3	12.4	24.1
uAUG=>4 (%)	7.9	6.9	15.3
uAUG=>5 (%)	4.8	4.8	10.1

Помимо перечисленных контекстных особенностей нами был проведен детальный компьютерный анализ прочих контекстных и структурных характеристик (в частности, потенциала формирования вторичной структуры в разных районах мРНК), который не дал интересных результатов. Единственное, что отличало выборку мРНК, трансляция которых усиливается во время и после стресса (I), от общего пула (в основном, стресс-репресслируемых) и стресс-устойчивых матриц (R) по нашим данным – это частота присутствия uORF: так, в выборке мРНК I около 60% матриц содержат uORF, тогда как в основной выборке их 43% и в выборке R менее 40% (табл. 5).

Этот результат позволил нам подтвердить наше исходное предположение о том, что стресс-специфическая трансляция скорее всего связана с реинициацией и uORF, что также позволило определиться с содержанием базы данных мРНК, трансляция которых стресс-специфично усиливается. Было сделано две БД:

- (1) выборка мРНК мыши (по данным экспериментов, приведена в Ventoso et al., 2012) и содержит идентификаторы транскриптов выборок R (276 генов) и I (599 генов);
- (2) выборка мРНК человека, предсказанная нами на основе критериев, описанных в отчете за предыдущий этап.

В базе данных мРНК человека содержится информация о 297 транскриптах, структура 5'-НТП которых способствует реинициации трансляции с нижерасположенных стартовых кодонов и синтезу укороченной с N-конца изоформы аннотированного белка. В БД (табл. 6) содержатся данные об идентификаторе соответствующей карточке банка данных нуклеотидных последовательностей GenBank, названию гена (поле DE (description) из карточки GenBank),

размер 5'-НТП, uORF и аннотированной белок-кодирующей последовательности (CDS), предсказанная с помощью программы TargetP локализация аннотированного белка и укороченной с N-конца изоформы, а также (при наличии) – функциональный мотив из БД ProSite, присутствующий в участке N-концевой последовательности белка, которого нет у укороченной изоформы (последнее можно рассматривать в качестве показателя функциональных различий между аннотированной и предсказанной нами укороченной с N-конца трансляционных изоформ белка).

Таблица 6. Образец электронной таблицы в формате Microsoft Excel, содержащей структурированную информацию о стресс-специфических мРНК человека, предсказанных на основе анализа характеристик их нуклеотидных последовательностей.

GenBank ID	Information from GenBank ID field	5'UTR size, n	uORF size, n	CDS size, n	Predicted localization of N-end truncated protein form (M=mitochondria, S=secretory, X=other)	Predicted localization of annotated protein form (M=mitochondria, S=secretory, X=other)	ProSite Motif 1
AB004885	mRNA for PKU-beta	212	78	2364	X	X	ASN_GLYCOSYLATION
AB005297	BAI 1 mRNA,	183	69	4755	M	S	PKC_PHOSPHOSITE

В качестве примера применения разработанного нами подхода для предсказания стресс-зависимой трансляции белков человека можно привести анализ организации мРНК одного из важнейших регуляторных белков – рецептора глюкокортикоидов альфа (GR α). Глюкокортикоиды выполняют большое количество регуляторных функций во время стрессов различной природы и широко используются в качестве противовоспалительных и иммуносупрессорных препаратов. Рецептор глюкокортикоидов кодируется одним геном и изоформа GR α является наиболее широко представленной и функционально значимой (Turner et al., 2010; Bockmuhl et al., 2011; Oakley and Cidlowski, 2011). Ранее было показано, что мРНК гена GR α человека кодирует несколько белковых изоформ (A, B, C, D) (Lu and Cidlowski, 2005; Oakley and Cidlowski, 2011) (рис. 12). Стартовый кодон трансляции изоформы A расположен в субоптимальном контексте (ctgATGg) и значительная часть 40S субъединиц рибосом, поступающих на мРНК, может пропускать его и продолжать линейное сканирование в 3'-направлении. Следующий стартовый кодон принадлежит микрорамке считывания ORF S (gaaATGtgATGg) и эта одно-кодонная микрорамка перекрывается со стартовым кодонм изоформы B. Стартовый кодон микрорамки S расположен в контексте, также допускающем ослабленное сканирование (хотя и не эффективное, поскольку в -3 положении расположен

пурин, а в +4 – не гуанин). По-видимому, большая часть 40S субъединиц рибосом распознает стартовый кодон S, а оставшиеся инициируют трансляцию на стартовом кодоне изоформы GRa B (он расположен в оптимальном контексте gtgATGg). Далее по мРНК расположены небольшая рамка считывания X (начинается с 4-го AUG), тогда как с близкорасположенных AUG-кодонов 5,6,7 инициируется трансляция наиболее представленной по количеству изоформы GRa C. Ранее считалось, что трансляция изоформы C осуществляется с помощью механизмов шунтирования потока рибосом и ослабленного сканирования (Lu and Cidlowski, 2005; Oakley and Cidlowski, 2011). Однако, полученные нами в рамках проекта данные позволяют предположить, что в данном случае работает механизм реинициации трансляции. Компьютерный анализ структуры мРНК GRa показал, что межцистронное расстояние между стоп-кодоном ORF S и стартовым кодоном X равно 135 нуклеотидов, а стартовыми кодонами изоформ C1-C3 это расстояние равно 176, 188 и 2012 нуклеотидов, соответственно. Таким образом, структура мРНК GRa сходна с хорошо известной мРНК транскрипционного фактора ATF5 (рис. 12). Ранее было показано, что в 5'-НТП мРНК ATF5 расположены две uORF, 40S субъединицы рибосомы распознают стартовый кодон uORF1 и трансляция uORF2 и основной рамки считывания ATF5 возможна с помощью реинициации (Zhou et al., 2008). В нормальных условиях реинициация трансляции происходит главным образом на стартовом кодоне uORF2 (межцистронное расстояние равно 110 нуклеотидов), то есть синтез белка ATF5 осуществляется на очень низком уровне. Однако, при стрессе происходит фосфорилирование фактора инициации трансляции eIF2a и восстановление трансляционной компетентности 40S субъединиц рибосом после терминации трансляции на стоп-кодоне uORF1 замедляется, поэтому они пропускают стартовый кодон uORF2 и инициируют трансляцию ATF5. Таким образом, синтез этого транскрипционного фактора происходит в условиях стресса вопреки общему снижению трансляции основного клеточного пула мРНК (Zhou et al., 2008). Аналогичным образом, структурно функциональная организация мРНК GRa способствует реинициации трансляции на стартовом кодоне ORF X в нормальных условиях и на стартовых кодонах C1 – C3 – в условиях стресса (рис. 12). Это предсказание было проверено с помощью анализа эволюционной консервативности мРНК генов GRa: было найдено, что мРНК человека сходна с мРНК приматов, быка, свиньи, овцы и ряда других организмов, но отличается от известных модельных организмов (мыши, крысы).

На основе этой работы была предложена новая гипотеза (Kochetov et al., 2012), согласно которой синтез трансляционных изоформ рецептора глюкокортикоидов альфа изменяется при стрессе: появляется значительно больше молекул изоформы GRa C. Ранее было показано, что трансляционные изоформы GRa регулируют транскрипцию разных наборов генов (Lu and Cidlowski, 2005; Oakley and Cidlowski, 2011). Изменение в общем количестве молекул GRa и

изменение соотношения трансляционных может быть существенным элементом интегрального ответа на стрессовые условия, связанного – в том числе – с действием глюкокортикоидов.

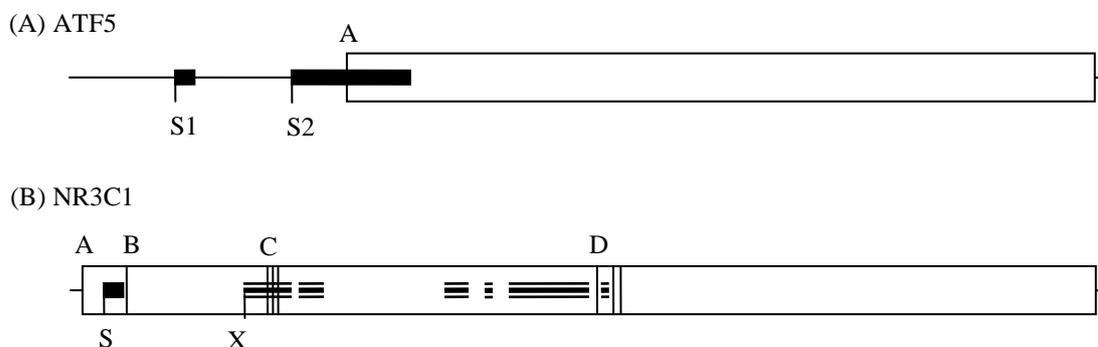


Рисунок 12. Структурно-функциональная организация мРНК ATF5 и GR α .

(A) ATF5 содержит две uORF (AUG S1 (gccATGg), AUG S2 (gccATGg)). Рибосомы могут инициировать трансляцию на стартовых кодона uORF2 или ATF5 за счет реинициации трансляции.

(B) NR3C1 (GR α человека) содержит стартовый кодон изоформы A (ctgATGg), AUG S начинает трансляцию однокодонной микрорамки (gagATGtgATGg), стоп-кодон которой перекрывается со стартовым кодоном изоформы B. AUG X инициирует трансляцию 78-нуклеотидной рамки считывания, внутри которой расположены три стартовых кодона изоформы C (C1,C2,C3).

4. Изучение онтогенетического паттерна экспрессии гена DD2R в яичниках дрозофилы - ткани, синтезирующей 20-гидроксиэкдизон

Экспрессия гена D2-подобных рецепторов в клетках жирового тела и яичников молодых и половозрелых самок определялась методом *in situ* гибридизации с использованием в качестве зонда амплифицированного фрагмента геномной ДНК *D. melanogaster*, меченного диоксигенином. Мечение осуществлялось при помощи ПЦР с использованием специфических праймеров к гену DD2R, определенных на основании его нуклеотидной последовательности. Препараты анализировали при помощи микроскопа Zeiss Axioskop 2 Plus и программы Axio Vision.

На рисунке 13 приведены результаты изучения экспрессии гена DD2R в жировом теле и яйцевых камерах молодых (1-суточных) и половозрелых (6-суточных) самок линии Canton S *D. melanogaster*. Хорошо видно включение диоксегениновой метки, свидетельствующее об экспрессии гена DD2R, в тканях жирового тела как молодых, так и зрелых особей (рис.13а и 13в, соответственно), и отсутствие сигнала в яйцевых камерах самок обоих возрастов

(рис.13б,г). Следует отметить, что в жировом теле молодых самок (рис.13а) наблюдается значительно более яркий сигнал, чем в жировом теле половозрелых (рис.13в).

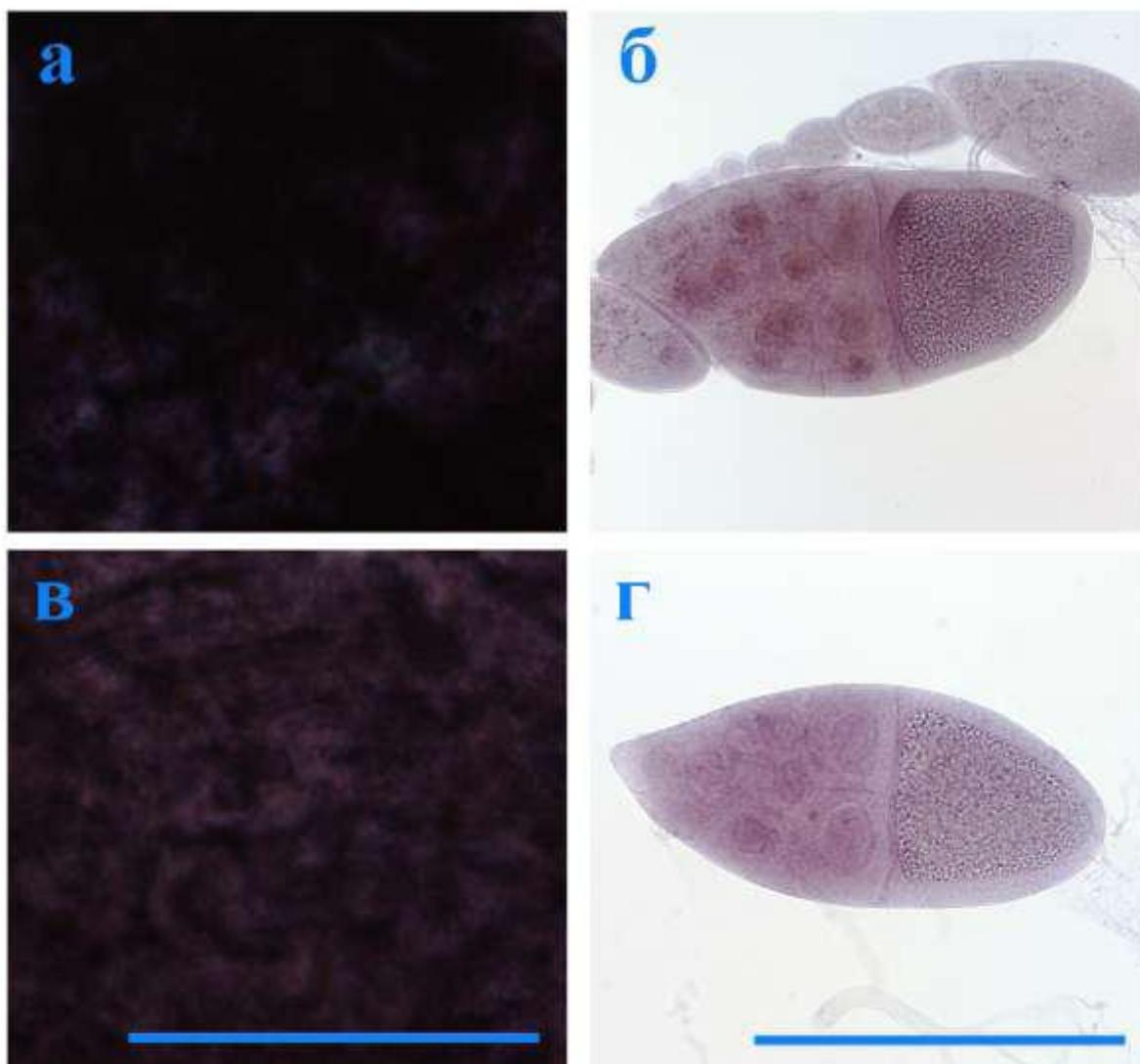


Рисунок 13. Онтогенетический паттерн экспрессии гена DD2R у самок линии дикого типа Canton S *D. melanogaster*. а-г – типичная *in situ* гибридизация жирового тела (а,в) и яичников (б,г) 1-суточных (а,б) и 6-суточных (в,г) самок. Шкала а,в = 50 μm , шкала б,г = 300 μm .

Таким образом, мы подтвердили сделанные нами на предыдущих этапах настоящего проекта выводы:

- (1) онтогенетический характер влияния ДА на уровень активности ЮГ-эстеразы (фермента деградации ЮГ, синтезирующегося в жировом теле) у самок дрозофилы обусловлен изменением числа Д2-подобных рецепторов в жировом теле;
- (2) ДА контролирует уровень 20Э не непосредственно, через рецепторы в фолликулярных клетках, а опосредованно – через воздействие на систему метаболизма ЮГ.

Полученные на данном этапе результаты также демонстрируют, что наблюдаемое онтогенетическое переключение в механизме дофаминовой регуляции деградации ЮГ у

дрозофилы происходит на уровне транскрипции гена дофаминовых D2-подобных рецепторов, а не на уровне трансляции

Экспрессия гена DD2R в жировом теле и яичниках молодых и половозрелых самок D. melanogaster под воздействием теплового стрессирования.

На рисунке 14 представлены результаты изучения экспрессии гена *DD2R* в жировом теле и яйцевых камерах молодых (1-суточных) самок линии Canton S *D. melanogaster* в нормальных условиях и при тепловом стрессе.

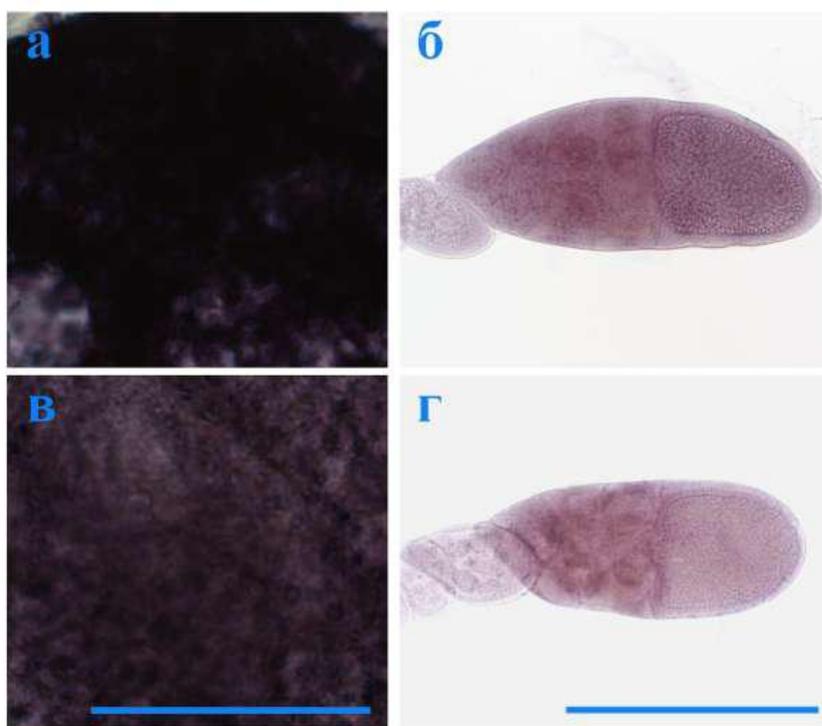


Рисунок 14. Влияние теплового стресса на экспрессию гена *DD2R* у 1-суточных самок линии дикого типа Canton S *D. melanogaster*. а-г – типичная *in situ* гибридизация жирового тела (а,в) и яичников (б,г) контрольных (а,б) и подвергнутых тепловому стрессированию (38°C, 2ч) (в,г) самок. Шкала а,в = 50 μм, шкала б,г = 300 μм.

Ясно видно уменьшение включения диоксегениновой метки в жировом теле стрессированных самок (рис. 14в) по сравнению с контрольными (рис. 14а), свидетельствующее о подавлении экспрессии гена D2-подобных рецепторов при тепловом стрессе. Экспрессия гена *DD2R* в яйцевых камерах молодых мух отсутствует как в нормальных условиях (рис. 14б), так и при тепловом стрессе (рис. 14г).

Данные исследования экспрессии гена *DD2R* при тепловом стрессе у половозрелых (6-суточных) самок линии Canton S *D. melanogaster* приведены на рисунке 15. Очевидно, что снижение яркости сигнала, свидетельствующего об экспрессии гена *DD2R*, в жировом теле подвергнутых стрессу зрелых самок (рис. 15в) по сравнению с контрольными (рис. 15а) даже

более выражено, чем у молодых. Экспрессия гена *DD2R* в яйцевых камерах зрелых мух также отсутствует и в нормальных условиях (рис. 15б), и при тепловом стрессе (рис. 15г).

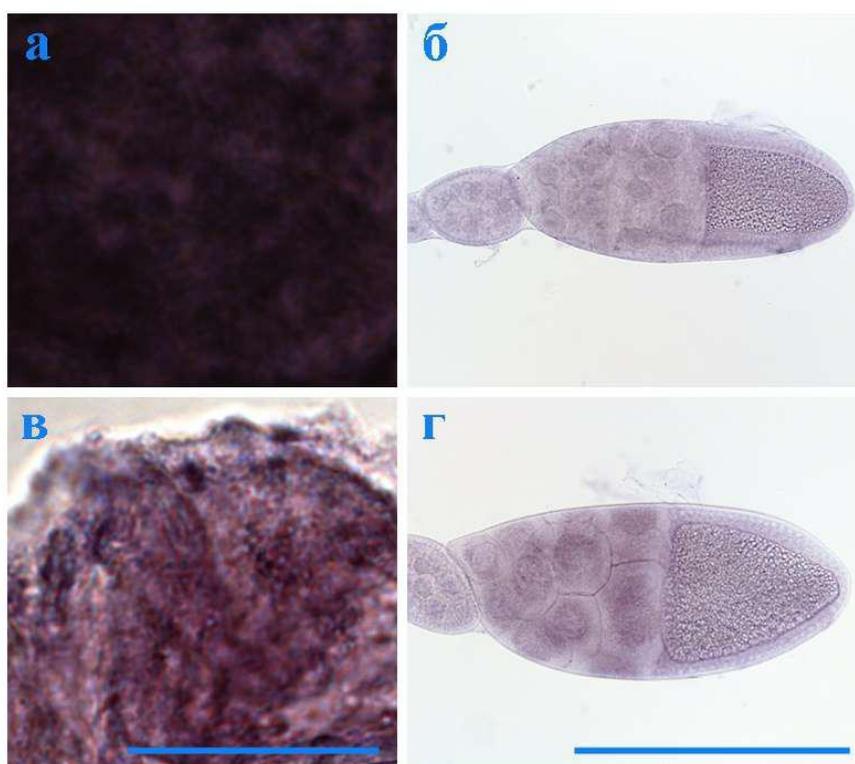


Рисунок 15. Эффект теплового стресса на экспрессию гена *DD2R* у 6-суточных самок линии дикого типа *Canton S D. melanogaster*. а-г – типичная *in situ* гибридизация жирового тела (а,в) и яичников (б,г) контрольных (а,б) и подвергнутых тепловому стрессированию (38°C, 2ч) (в,г) самок. Шкала а,в = 50 μм, шкала б,г = 300 μм.

Итак, мы показали, что тепловой стресс оказывает ингибирующее влияние на экспрессию гена Д2-подобных рецепторов в ткани, синтезирующей ЮГ, и у молодых, и у половозрелых самок дрозофилы.

5. Разработка программы внедрения результатов НИР в образовательный процесс.

Приведена программа курса лекций для студентов 5 курса ФЕН НГУ (специализация «молекулярная биология, биохимия») «Механизмы репликации, транскрипции и трансляции» (преподаватель – проф. д.б.н. Г.М. Дымшиц, составлена 05.09.2011-12.12.2011, продолжительность 30 часов). Жирным шрифтом выделены разделы, в которых представлены результаты НИР.

Репликация

- Принципы репликации. Доказательства полуконсервативного механизма репликации ДНК и хромосом (Мезельсон и Сталь, Ральф, Тейлор).
- Ферментативная система синтеза ДНК *in vitro*. Активирование ДНК.

- Строение и каталитические активности ДНК-полимеразы I *E.coli*
- Метод “ближайших соседей” в доказательстве комплементарности и антипараллельности репликации. Сравнительные характеристики ДНК- полимеразы I, ДНК- полимеразы II и ДНК- полимеразы III *E.coli* Различные формы ДНК- полимеразы III *E.coli*.
- Схемы репликации Корнберга, Кэрнса и Оказаки. Доказательства схемы прерывистой репликации Оказаки. ДНК-лигазы.
- Жизненный цикл фага M13. Репликация фаговой ДНК. Модель “катыщегося колеса”. Праймирование репликации ДНК фагов G4 и ϕ X174. Праймаза и праймосома.
- Репликация ДНК аденовируса. Репликация ДНК фага T7. «Концевая избыточность»
- Репликация митохондриальной ДНК млекопитающих. Денатурация ДНК-матрицы при репликации. Анализ методом избирательной модификации одноцепочечных ДНК карбодиимидом.
- Белок 32 гена фага T4. Его свойства и функции. Другие SSB , их функции.
- Геликазы. Их роль в репликации. Топоизомеразы. Механизм действия релаксаз и гираз. Модель инверсии знака.
- Структура *ori* репликации ДНК *E. coli*. Роль белка *dnaA*. События в репликативной вилке ДНК *E.coli*. Метилирование *ori* ДНК *E.coli* и репликативный цикл.
- Инициация репликации ДНК эукариот. Синтез рибоолигонуклеотидных праймеров с помощью ДНК-полимеразы альфа/праймазы. Строение ДНК-полимеразы альфа/праймазы, длина РНК-затравок, точность синтеза, катализируемого праймазой.
- Репликация отстающей цепи ДНК: ДНК-полимераза дельта, ее строение. Переключение синтеза от ДНК-полимеразы альфа к ДНК-полимеразе дельта. Факторы репликации: репликативный белок С, фактор клеточной пролиферации PCNA; их строение и функции в репликации. Обеспечение точности репликации, 3'-5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы дельта.
- **Репликация отстающей цепи ДНК: удаление РНК затравок, синтез с переносом цепи, катализируемый ДНК-полимеразой дельта, удаление флэпов с помощью флэп-эндонуклеазы I.**
- Репликация лидирующей цепи ДНК: ДНК-полимераза епсилон, строение, функции; обеспечение точности репликативного синтеза. Репликативный белок А: строение, характер взаимодействия с ДНК, роль в репликации ДНК. Другие ДНК-полимеразы высших эукариот: ДНК-полимераза гамма, ДНК-полимераза бета, строение и функции.

- Понятие синтеза ДНК через повреждение. Биохимические свойства TLS-полимераз. TLS в клетках прокариот: ДНК-полимеразы, модель. TLS в клетках эукариот: ДНК-полимеразы, модель. Методы изучения TLS.
- Проблема недорепликации 3' концов линейных молекул ДНК эукариот. Лимит Хейфлика, теория Оловникова, теломераза, теломеры.

Транскрипция

- Принципы транскрипции. Строение и свойства РНК-полимеразы *E.coli*. Роль отдельных субъединиц. Закрытые и открытые комплексы фермента с матрицей при транскрипции.
- Особенности структуры промотора прокариот. Различные варианты прокариотических промоторов. Этапы транскрипции. Стадия узнавания и прочного связывания. Инициация. Элонгация. ρ -зависимая и ρ -независимая терминация.
- Негативная индукция. Регуляция экспрессии *lac*-оперона *E.coli* с участием цАМФ. Позитивная индукция *ara*-оперона *E.coli*. Регуляция экспрессии глутаминсинтетазы *E.coli*.
- Негативная репрессия. Регуляция экспрессии *trp*-оперона *E.coli*. Аттенуация.
- Регуляция образования рибосом у прокариот. Процессинг рРНК и тРНК про- и эукариот.
- Особенности транскрипции у эукариот. Многообразие и специфичность эукариотических РНК-полимераз. Проксимальные и дистальные *cis*-элементы транскрипции эукариот. Энхансеры. Композиционные элементы. Синергичные и антагонистичные. Базальные факторы транскрипции эукариот. Системы с *polI*, *polII* и *polIII*.
- *Trans*-факторы транскрипции. ДНК-связывающие домены в них. Принципы классификации. Этапы процессинга мРНК эукариот. Кэпирование и его роль. Полиаденилирование и его роль.
- Понятие о “разорванных генах”. Размеры экзонов и интронов. Альтернативный сплайсинг. Кальцитониновый ген крысы. Разнообразие механизмов сплайсинга: Дрожжевые тРНК. Ген *box* митохондрий дрожжей. Автосплайсинг рРНК *Tetrachymena*. Автосплайсинг с образованием “лассо”. Сплайсинг мРНК ядерных генов с участием snRNP. *Trans*-сплайсинг с участием SL РНК. Редактирование.
- **Экспрессия ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крыс в норме и при стрессе.**

Трансляция

- Особенности структуры tРНК. Изоакцепторные tРНК. Рекогниция. АРС-азы.
- Структура рибосомы и основные отличия между рибосомами прокариот и эукариот.
- Участники процесса трансляции – мРНК, tРНК и факторы трансляции, их общие черты и отличия у прокариот и эукариот.
- **Инициация трансляции у прокариот и эукариот.** Элонгация трансляции у прокариот и эукариот. Терминация трансляции у прокариот и эукариот .
- Функциональные центры рибосомы и основные черты их строения у прокариот и эукариот. Методы изучения строения функциональных центров.
- Внутренняя инициация трансляции. Прочтение стоп-кодона в качестве смыслового. Антибиотики и рибосома.
- Регуляция трансляции на примере фага MS2. Генетический код. Его свойства. Вырожденность и румеровская симметрия таблицы генетического кода. Механизм эволюционного возникновения ДНК
- Возможный механизм возникновения стоп-кодонов. Возможная структура первого гена и первого белка.

6. Реконструкция механизмов молекулярно-генетического контроля экспрессии генов, регулирующих взаимодействие стресс-связанных гормонов crucialное для сохранения гормонального статуса организма в условиях стресса

Как уже упоминалось выше, ранее нами было установлено, что гонадотропные гормоны, ЮГ и 20Э, и биогенные амины, ДА и октопамин (ОА), являются компонентами стресс-реакции дрозофилы. Показано, что система ЮГ отвечает на стрессирующее воздействие снижением активности ЮГ-деградирующих ферментов и, как следствие, повышением титра гормона. Система 20Э отвечает возрастанием уровня гормона вследствие повышения активности фермента его синтеза, экдизон-20-монооксигеназы (Э20МО). Системы ДА и ОА отвечают возрастанием содержания аминов (за счет их выброса из депо) и сначала падением, а затем повышением активности ферментов их синтеза (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2008).

Мы также продемонстрировали, что в нормальных условиях гонадотропины и ДА взаимодействуют между собой и это взаимодействие генетически детерминировано (рис.16).

1) ДА повышает титр ЮГ (стимулирует синтез (активность ЮГ-ацилметилтрансферазы, ЮГАМТ) и ингибирует деградацию (активность ЮГ-эстеразы, ЮГЭ, и ЮГ-эпоксидгидролазы, ЮГЭГ)) у молодых самок и снижает его (ингибирует активность ЮГАМТ и стимулирует активность ЮГЭ и ЮГЭГ) - у половозрелых.

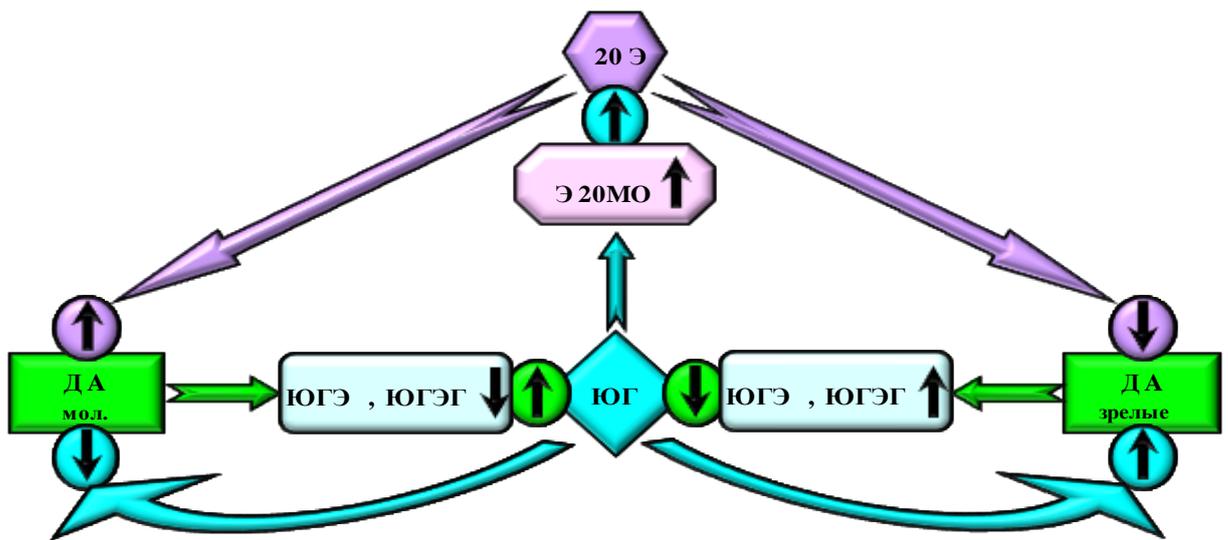


Рисунок 16. Схема взаиморегуляции ювенильного гормона (ЮГ), 20-гидроксиэкдизона (20Э) и дофамина (ДА) у молодых и половозрелых самок дрозофилы.

2) В этой регуляции существует обратная связь - повышение титра ЮГ вызывает снижение уровня ДА у молодых самок и повышение у зрелых. 3) 20Э регулирует титр ЮГ опосредованно через систему метаболизма ДА - увеличение титра 20Э повышает уровень ДА у молодых самок и снижает его у половозрелых, вызывая тем самым повышение титра ЮГ у тех и других. 4) ДА влияет на уровень 20Э, изменяя активность фермента его синтеза – экдизон-20-монооксигеназы, Э20МО, по-видимому, опосредованно через систему метаболизма ЮГ (обзор: Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Таким образом, у самок дрозофилы существует механизм восстановления баланса ЮГ и 20Э если в результате мутации или стрессирующего воздействия уровень одного из этих гормонов изменяется, и ДА является посредником, сохраняющим этот баланс (рис.17).

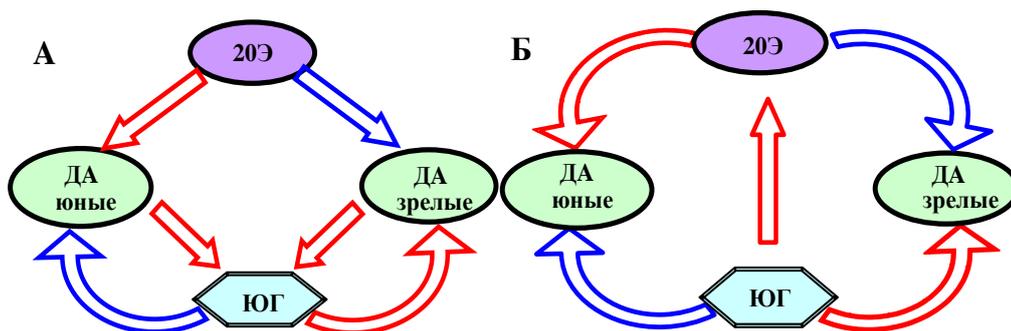


Рисунок 17. Механизм восстановления баланса гонадотропинов у молодых и половозрелых самок дрозофилы при повышении титра 20Э (А) или ЮГ (Б). Синие стрелки обозначают ингибирующее воздействие, красные – стимулирующее

Если баланс гонадотропинов сдвигается в сторону повышения титра 20Э (рис 18А):

- у молодых самок повышение титра 20Э вызывает возрастание уровня ДА; повышение уровня ДА приводит к увеличению титра ЮГ, повышение титра ЮГ вызывает снижение

содержания ДА, в результате уровень амина стабилизируется и устанавливается баланс гонадотропинов с новыми значениями титров ЮГ и 20Э;

- у половозрелых самок повышение титра 20Э приводит к снижению уровня ДА, снижение уровня ДА вызывает подъем титра ЮГ, повышение титра ЮГ, в свою очередь, приводит к повышению уровня ДА, в результате уровень амина стабилизируется и устанавливается баланс 20Э и ЮГ.

Если баланс гонадотропинов сдвигается в сторону повышения титра ЮГ (рис. 18Б):

- у молодых самок повышение титра ЮГ влечет за собой повышение титра 20Э и снижение уровня ДА; повышение титра 20Э, в свою очередь, вызывает увеличение содержания ДА, в результате уровень амина стабилизируется и устанавливается баланс гонадотропинов с новыми значениями титров ЮГ и 20Э;

- у половозрелых самок повышение титра ЮГ приводит к увеличению титра 20Э и повышению уровня ДА, повышение титра 20Э вызывает снижение содержания ДА, уровень амина стабилизируется и опять-таки устанавливается баланс гонадотропинов.

Поскольку сохранение баланса гонадотропинов является обязательным условием нормального течения оогенеза (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2009) роль ДА в контроле репродуктивной функции дрозофилы в условиях стресса crucialна.

В рамках настоящего проекта мы верифицировали гипотезу о том, что (1) ингибирующее влияние ДА на синтез и деградацию ЮГ опосредуется Д2-подобными рецепторами (DD2R), (2) стадийспецифичность влияния ДА на метаболизм ЮГ (экспрессию генов *JHAMT*, *JHE* и *JHEN*, контролирующих активность ЮГАМТ, ЮГЭ и ЮГЭГ, соответственно) обусловлена изменением экспрессии гена *DD2R*, (3) онтогенетическое изменение экспрессии гена *DD2R* контролируется 20Э, (4) стадийспецифичность влияния ДА на синтез 20Э (экспрессию гена *E20MO*, контролирующего синтез Э20МО) опосредуется ювенильным гормоном.

Оценив интенсивность синтеза ЮГ у самок дрозофилы со сниженной экспрессией DD2R в железе, синтезирующей ЮГ, *corpus allatum* (CA), мы показали, что ингибирующее влияние ДА на синтез гормона опосредуется Д2-подобными рецепторами.

Осуществив иммуногистохимический анализ экспрессии DD2R в CA, жировом теле (ЖТ) - ткани, синтезирующей ферменты ЮГ деградации, и фолликулярных клетках яичников (месте синтеза 20Э) мы установили следующее:

- 1) Уровень экспрессии DD2R в CA молодых самок значительно ниже, чем у половозрелых и напротив, экспрессия DD2R в ЖТ значительно выше у молодых, чем у половозрелых мух.
- 2) Паттерн экспрессии DD2R в ЖТ молодых самок с фармакологически повышенным уровнем 20Э соответствует паттерну половозрелых мух.
- 3) В фолликулярных клетках яичников Д2-подобные рецепторы отсутствуют.

Исследовав гибридизацией *in situ* экспрессию гена *DD2R* в ЖТ молодых и половозрелых самок дрозофилы мы показали, что онтогенетическое изменение интенсивности экспрессии Д2-подобных рецепторов происходит на уровне транскрипции.

В рамках бюджетного проекта нашей лаборатории мы показали, что активирующее влияние ДА на экспрессию генов *JHAMT*, *JHE* и *JHEN* опосредуется геном Д1-подобного рецептора, *DopR* и что экспрессия *DopR* в СА молодых самок и ЖТ половозрелых существенно выше, чем в СА половозрелых самок и ЖТ молодых мух (Gruntenko et al., 2012).

Суммируя изложенное, мы предлагаем следующий механизм молекулярно-генетического контроля экспрессии генов, регулирующих взаимодействие ЮГ, 20Э и ДА (рис. 18).

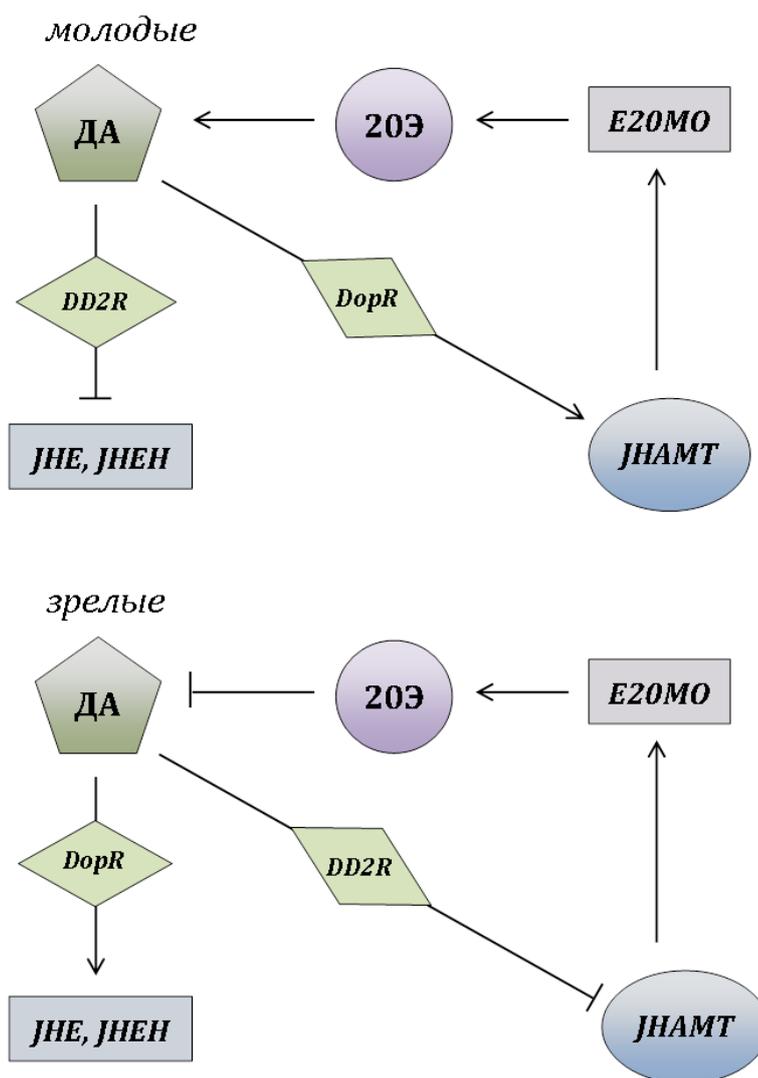


Рисунок 18. Схема взаимодействия генов регулирующих уровни ЮГ и 20Э у молодых (А) и половозрелых (Б) самок дрозофилы. ДА – дофамин, 20Э – 20-гидроксиэкдизон, DD2R – структурный локус Д2-подобного рецептора ДА, DopR - структурный локус Д1-подобного рецептора ДА, JHAMT - структурный локус ацилметилтрансферазы ювенильного гормона (ЮГ), JHE - структурный локус ЮГ-эстеразы, JHEN - структурный локус ЮГ-эпоксидгидролазы, E20MO - структурный локус экдизон-20-монооксигеназы Стрелка – активация, перекладина – ингибирование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ, проведенных на 6-ом этапе реализации проекта:

1. Для верификации данных по изменению транскриптома печени крыс при введении животным двух аминокислот: гепатоканцерогенного для крыс 3'-МеДАБ и неканцерогенного для них ОАТ, полученных на 2-м этапе с использованием биочипов RatRef-12 BeadChip (Illumina), содержащих 22523 уникальные олигонуклеотидные пробы использован метод ПЦР в режиме реального времени. С помощью этого метода изучены изменения экспрессии под действием 3'-МеДАБ и ОАТ 11 генов (*Cyp1A1*, *Cyp3A1*, *Cdkn1a*, *Ccng1*, *Pcna*, *Btg2*, *Btg3*, *Mdm4*, *Tnfrsf12a*, *Klf6*, *Irf7*), продукты которых играют ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков, регуляции пролиферации и ответе на клеточный стресс. Результаты исследования показали хорошее соответствие данных ПЦР-РВ и микрочипового анализа – полное соответствие наблюдалось в 65% случаев.

Анализ уже верифицированных данных позволил воссоздать схему регуляторных событий, которые могут приводить к развитию опухолей печени под действием гепатоканцерогенных аминокислот. Центральная часть сети реконструированных регуляторных событий представлена преимущественно генами, ответственными за регуляцию клеточного цикла и апоптоза. Важную роль в этих процессах играют транскрипционные факторы FoxO, вступающие в функциональные взаимодействия как с представителями группы генов клеточного цикла и апоптоза (*Rbl2*, *Cdkn1a*, *Ccnd1*, *Gadd45a*, *Igfbp1*), так и с группой генов, ответственных за клеточный метаболизм (*Cat*, *Angptl4*, *G6pc*, *Abcg5*, *Nr1h4*).

2. Разработана комплексная математическая модель регуляции почечных процессов и ее роли в развитии артериальной гипертонии, способная описывать как локальные явления, так и усредненные глобальные параметры. Применен подход, использующий графическое представление математических моделей в виде блочных диаграмм, а также автоматическую генерацию на их основе агентных моделей, который позволил интегрировать в составе одной комплексной модели ССС человека три различные модели, делающие акцент на различные ее части: артериальное дерево, сердце и почку. Данные модели используют различные формализмы (уравнения в частных производных, алгебро-дифференциальные уравнения, обыкновенные ДУ) и разные шкалы времени (секунды и минуты). Созданная комплексная модель способна демонстрировать как локальные явления, такие как посекундный поток крови, давление крови в каждом из 55 главных сосудов, сокращения сердца, так и усредненные глобальные параметры, такие как содержание ионов натрия или различных гормонов в организме. Модель была протестирована путем имитации такой патологии системы кровообращения как стеноз артерии. В процессе объединения часть регулирующих параметров была удалена, так как в некоторых блоках (например, артериальное дерево) не

предусмотрено их использование. Однако используемые нами принципы, а именно блочное графическое построение моделей и гибкость агентного моделирования делают созданную модель легко расширяемой. Блоки могут быть доработаны по отдельности или даже заменены на более совершенные математические модели соответствующих органов.

3. Создана база данных мРНК генов человека и мыши, эффективность экспрессии которых при стрессе контролируется на уровне трансляции. Предложена гипотеза о роли лидерных рамок считывания и реинициации в стресс-специфической контроле экспрессии генов млекопитающих на уровне трансляции мРНК.

4. В отчетный период был изучен онтогенетический паттерн экспрессии гена *DD2R* в яичниках и жировом теле дрозофилы, исследовано влияние теплового стресса на экспрессию гена *DD2R* и реконструирован механизм молекулярно-генетического контроля экспрессии генов, регулирующих взаимодействие стресс-связанных гормонов дрозофилы (ЮГ, 20Э и ДА). Впервые продемонстрировано, что онтогенетическое переключение в механизме дофаминовой регуляции деградации ЮГ у дрозофилы происходит на уровне транскрипции гена *DD2R*, а не на уровне его трансляции. Подтверждено, что в фолликулярных клетках яичников, месте синтеза 20Э у самок дрозофилы, ген *DD2R* не экспрессируется. Предложена схема взаиморегуляции генов, контролирующих взаимодействие стресс-связанных гормонов у самок дрозофилы.

5. Разработана программа внедрения результатов НИР в образовательный процесс.

Таким образом, все задачи, поставленные на данном этапе решены. По результатам работы за период шестого этапа были опубликованы и приняты в печать следующие статьи:

1. Шевелев О.Б., Рыкова В.И., Федосеева Л.А., Леберфарб Е.Ю., Дымшиц Г.М., Колосова Н.Г. Экспрессия *Ext1*, *Ext2* и гепараназы в мозге преждевременно стареющих крыс OXYS в период раннего онтогенеза и развития нейродегенеративных изменений. // Биохимия, 2012, том 77, вып. 1, с. 71 – 78.
2. Раушенбах И.Ю., Лаухина О.В., Алексеев А.А., Адоньева Н.В., Богомолова Е.В., Грунтенко Н.Е. Влияние дофамина на уровень 20-гидроксиэкдизона у самок *Drosophila* опосредуется ювенильным гормоном. Доклады РАН, 2012, т.446, №6, с. 1-3
3. Климов Л.О., Федосеева Л.А., Рязанова М.А., Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Экспрессия генов ренин-ангиотензиновой системы в структурах мозга крыс линии НИСАГ со стрессчувствительной артериальной гипертензией. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012, Т. 154, № 9, стр. 342-345.

4. Рязанова М.А. Экспрессия генов альфа1А- и альфа2А-адренорецепторов в миокарде и ткани почки у гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH). // Бюллетень СО РАМН, Т. 32, № 1, 2012. С.43-47.
5. Kutumova E.O., Kiselev I.N., Sharipov R.N., Lavrik I.N., Kolpakov F.A. A modular model of the apoptosis machinery. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V.736. P. 235-245.
6. Ventoso I., Kochetov A., Montaner D., Dopazo J., Santoyo J. Extensive translational remodeling during ER stress response in mammalian cells. *PLoS One.* 2012. 7: e35915
7. Kochetov A.V., Prayaga P.D., Volkova O.A., Sankararamakrishnan R. Hidden coding potential of eukaryotic genomes: non-AUG started ORFs. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2012. (<http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2012.691367>)
8. Kochetov A.V., Merkulova T.I., Merkulov V.M. Possible link between the synthesis of GR alpha isoforms and eIF2 alpha phosphorylated state. *Medical Hypotheses.* 2012. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2012.07.025>)
9. Gruntenko N.E., Laukhina O.V., Rauschenbach I.Yu. Molecular mechanisms of age-specific regulation of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone levels by dopamine in *Drosophila* females: role of D1- and D2-like receptors. // *J Insect Physiol.* 2012 (принята в печать)

В исследованиях активное участие принимали молодые ученые, в том числе аспиранты и студенты старших курсов. Полученные результаты уже используются в учебном процессе (курсах молекулярной биологии, компьютерной геномики; спецкурсах «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»). За время выполнения проекта защищены восемь кандидатских и одна докторская диссертации).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Брызгалов Л.О., Ершов Н.И., Ощепков Д.Ю., Каледин В.И., Меркулова Т.И., Выявление генов-мишеней транскрипционных факторов FOXA, связанных с регуляцией пролиферации. Биохимия. 2008. 73. 70 - 75.
2. Грунтенко Н.Е. Стресс и размножение насекомых: гормональный контроль. Новосибирск - Москва: ТО научных изданий КМК, 2008. 43 с
3. Ершов Н.И. Ранние изменения транскрипта печени крысы под действием гепатоканцерогенных аминоазокрасителей. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2011.
4. Каледин В.И., Пахарукова М.Ю., Пивоварова Е.Н., Кропачев К.Ю., Багинская Н.В., Васильева Е.Д., Ильницкая С.И., Никитенко Е.В., Кобзев В.Ф., Меркулова Т.И. Биохимия. 2009. 74. 466-475
5. Маркель А.Л., Дымшиц Г.М., Шмерлинг М.Д., Якобсон Г.С. Гены, стресс, гипертония. Бюллетень СО РАМН. 2002. 2. 35-40.
6. Маркель А.Л., Калашникова Е.В., Горякин С.В., Сахаров Д.Г., Т.А.Морева Т.А., Дымшиц Г.М., Гишинский М.А., Якобсон Г.С. Характеристика функциональной активности симпато-адреналовой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Бюлл. exper. биол. и мед. 2006. 141. 3. 244-247.
7. Солодяников Ю. В. Элементы математического моделирования и идентификация системы кровообращения. Самара: Изд-во Самар. ун-та, 1994. 315 стр.
8. Хворостова Ю.В., Горякин С.В., Петрова Г.В., Филипенко М.Л., Шихевич С.Г., Редина О.Е., Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Характеристика гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Росс. физиол. жур. 2002. 88. 1423-1432.
9. Bazykin G.A., Kochetov A.V. Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 2011. 39. 567-577.
10. Bockmuhl Y., Murgatroyd C.A., Kuczynska A., Adcock I.M., Almeida O.F., Spengler D. Differential regulation and function of 5'-untranslated GR-exon 1 transcripts. Mol Endocrinol. 2011. 25(7):1100-1110.
11. Bownes M. The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. J. Insect Physiol. 1989. 35. 409-413.
12. Calkhoven C.F., Muller C., Leutz A. Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression. Genes Dev. 2000. 14. 1920-1932.

13. Calkhoven C.F., Muller C., Martin R., Krosi G., Pietsch H. Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev.* 2003. 17. 959-964.
14. Cazzola M., Skoda R.C. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood.* 2000. 95. 3280-3288.
15. Chatterjee S., Pal J.K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol. Cell.* 2009. 101. 251-262.
16. Coleman T. G., Hall J. E. A mathematical model of renal hemodynamics and excretory function *Structuring Biological Systems: A Computer Modelling Approach* ed. by S. S. Iyengar. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992. pp. 89—124.
17. Gruntenko N., Rauschenbach I. 20-hydroxyecdysone, Juvenile Hormone and Biogenic Amines: Mechanisms of Interaction in Control of *Drosophila* Reproduction under Normal and Stressful Conditions // In: Ecdysone, structure and function (ed. G. Smagghe). Springer Science + Business Media B.V. 2009. P. 317-334
18. 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 (6). 902-908.
19. Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Bownes M., Segal D., Adonyeva N.V. and Rauschenbach I.Yu. Stress response in a juvenile hormone deficient *Drosophila melanogaster* mutant *apterous*^{56f}. *Insect Mol. Biol.* 2003. 12. 353-363.
20. Guyton A. C., Coleman T. G., Granger H. J. Circulation: Overall regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 1972. V. 34. P. 13—46.
21. Gruntenko N.E., Laukhina O.V., Rauschenbach I.Yu. Molecular mechanisms of age-specific regulation of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone levels by dopamine in *Drosophila* females: role of D1- and D2-like receptors. *J. Insect. Physiol.* 2012. in press.
22. Hearn M., Ren Y., McBride E., Reveillaud I., Beinborn M., Kopin A.A. *Drosophila* dopamine 2-like receptor: molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. 99. 14554—14559.
23. Hirashima A., Rauschenbach I.Yu., Sukhanova M. Jh. Ecdysteroids in stress responsive and nonresponsive *Drosophila virilis* lines under stress conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2000. 64. 2657-2662.
24. Humphries M.A., Mustard J.A., Hunter S.J., Mercer A., Ward V., Ebert P.R. Invertebrate D₂ type dopamine receptor exhibits age-based plasticity of expression in the mushroom bodies of the honeybee brain. *J. Neurobiol.* 2003. 55. 315-330.
25. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. 11. 113-127.

26. Jacobson E.M., Concepcion E., Oashi T., Tomer Y. Efficiency of CD40 gene translation: a case of translational pathophysiology. *Endocrinology*. 2005. 146. 2684-2691.
27. Inchiosa M.E., Parker M.T. Overcoming Design and Development Challenges in Agent-based Modeling Using Ascape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. 99. Suppl. 3. 7304-7308.
28. Karaaslan F. et al. Long-term mathematical model involving renal sympathetic nerve activity, arterial pressure, and sodium excretion. *Ann Biomed Eng*. 2005. 33. 1607-1630.
29. 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.
30. Kochetov A.V., Ischenko I.V., Vorobiev D.G., Kel A.E., Babenko V.N., Kisselev L.L., Kolchanov N.A. Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features. *FEBS Lett*. 1998. 440. 351-355.
31. Kochetov A.V., Merkulova T.I., Merkulov V.M. Possible link between the synthesis of GR alpha isoforms and eIF2 alpha phosphorylated state. *Medical Hypotheses*. 2012. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2012.07.025>)
32. Kozak M. Regulation of translation *via* mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 2005. 361. 13-37.
33. Lamponi D. One dimensional and multiscale model for blood flow circulation. Pour l'obtention du grade de docteur es sciences. Ecole Polytechnique Federale De Lausanne. 2004.
34. Le Quesne J.P., Spriggs K.A., Bushell M., Willis A.E. Dysregulation of protein synthesis and disease. *J. Pathol*. 2010. 220. 140-151.
35. Li P., Shah S., Huang L., Carr A.L., Gao Y., Thisse C., Thisse B., Li L. Cloning and spatial and temporal expression of the zebrafish dopamine D₁ receptor. *Dev. Dynam*. 2007. 236. 1339-1346.
36. Lu N.Z., Cidlowski J.A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell*. 2005. 18.331-342.
37. Malavasi E.L., Kelly V., Nath N., Gambineri A., Dakin R.S., Pagotto U., Pasquali R., Walker B.R., Chapman K.E. Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology*. 2010. 151. 195-202.
38. Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Yu.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. Neuroendocrine profiling in ISIAH rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol*. 2007. 195. 439-450.

39. Missale C., Nash S. R., Robinson S.W., Jaber M., Caron M.G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 1998. 78. 189-225.
40. Oakley R.H., Cidlowski J.A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 2011. 286, 3177-3184.
41. Postlethwait J.H., Parker J. Regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Molecular biology of invertebrate development / Eds O'Connor J. D., Alan R.* New York: Liss Inc., 1987. P.29-42.
42. Proshin A. P., Solodyannikov Y. V. Mathematical modeling of blood circulation system and its practical application. *Automation and Remote Control.* 2006. 67. 329-341.
43. Rapp J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the Rat. *Physiol. Rev.* 2000. 80. 135-172.
44. Ressler B. The renin-angiotensin system in the development of salt-sensitive hypertension in animal models and humans. *Pharmaceuticals.* 2010. 3. 940-960.
45. Rauschenbach, I.Y., Lukashina, N.S., Maksimovsky, L.F., Korochkin, L.I. 1987. Stress-like reaction of *Drosophila* to adverse environmental factors. *Journal of Comparative Physiology,* 157, 519-531.
46. Rauschenbach I.Y., Khlebodarova T.M., Chentsova N.A., Gruntenko N.E., Grenback L.G., Yantsen E.I., Filipenko M.L. Metabolism of the juvenile hormone in *Drosophila* adults under normal conditions and heat stress. *J. Insect Physiol.* 1995. V.41. P.179-189.
47. Richard D.S., Jones J.M., Barbarito M.R., Cerula S., Detweiler J.P., Fisher S.J., Brannigan D.M., Scheswohl D.M. Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: further evidence for the relative roles of ecdisteroids and juvenile hormones. *J. Insect Physiol.* 2001. V.47. P.905-913.
48. 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.
49. Roszkopf D., Schürks M., Rimbach C., Schäfers R. Genetics of arterial hypertension and hypotension. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2007. 374. 429-469.
50. Simonet G., Poels J., Claeys I., Van Loy T., Franssens V., De Loof A., Vanden Broeck J. Neuroendocrinological and molecular aspects of Insect reproduction. *J. Neuroendocrinol.* 2004. V.16. P.649-659.
51. Soller M., Bownes M., Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.* 1999. 208. 337-351.

52. Turner J.D., Alt S.R., Cao L., Vernocchi S., Trifonova S., Battello N., Muller C.P. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem. Pharmacol.* 2010. 80. 1860-1868.
53. Uttamsingh R. J., Leaning M. S., Bushman J. A. et al. Mathematical model of the human renal system *Med. Biol. Eng. Comput.* 1985. 23. 525-535.
54. Wethmar K., Smink J.J., Leutz A. Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays.* 2010. 32. 885-893.
55. Vallone D., Picetti R., Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000. 24. 125-132.
56. Vatter A.M., Wek R.C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. 101. 11269-11274
57. Ventoso I., Kochetov A., Montaner D., Dopazo J., Santoyo J. Extensive translational remodeling during ER stress response in mammalian cells. *PLoS One.* 2012. 7: e35915
58. Zhou D., Palam L.R., Jiang L., Narasimhan J., Staschke K.A., Wek R.C. Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J. Biol. Chem.* 2008. 283. 7064-7073.