

СЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»**ПОДСЕКЦИЯ «БИОИНЖЕНЕРИЯ»****Культивирование мышечных фибробластов ЗТЗ на трехмерной матрице из рекомбинантного спидроина 1****Архипова А.Ю., Ерёмин П.С., Казюлина А.А.***студент, студент, молодой учёный**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический**факультет, Москва, Россия**E-mail: balbesyatina@gmail.com*

Использование искусственных матриц для создания имплантатов на основе собственных клеток организма является перспективным направлением современной медицины. Матрица обеспечивает необходимые механические свойства, задает форму имплантата и является субстратом, обеспечивающим прикрепление, пролиферацию и пространственную ориентацию имплантируемых клеток. Каркасная нить паутины позволяет создать пористые матрицы с привлекательными характеристиками, в том числе высокопрочные. Созданные матрицы характеризуются отличными адгезивными свойствами и не токсичны для человека.

Пористая матрица из рекомбинантного белка спидроина 1 была получена методом выщелачивания. Для создания пористой структуры использовались кристаллы NaCl. Диаметр крупных пор составил 200-400 мкм. Поры соединены между собой, создавая тем самым условия для миграции клеток внутрь матрицы. Такая структура матрикса в перспективе необходима для интеграции в окружающие ткани и васкуляризации имплантата *in vivo*.

Исследование адгезии на матрице из спидроина 1 *in vitro* показало, что через 24 часа все прикрепившиеся клетки распластаны на поверхности матрикса. Такая морфология характерна для данной линии клеток.

Была изучена динамика роста клеток на матрице. Общее количество клеток увеличивалось с течением времени. Через сутки оно составило 355 ± 64 клеток на мм^3 матрицы. Через 4 дня количество клеток увеличилось до 861 ± 118 на мм^3 . Максимальное количество клеток наблюдали через 14 дней, и оно составило 1924 ± 212 на мм^3 .

В первые дни культивирования клетки распределялись неравномерно. Через 1 день после прикрепления 58% клеток находилось в поверхностных слоях матрицы, 31% располагался на глубине 150-300 мкм от поверхности образца и только 11% – во внутренних слоях матрицы. Через 14 дней культивирования клеток на матрице из спидроина 1 увеличилось общее количество клеток, и распределение по толщине стало более равномерным. Количество клеток относительно общего числа составило 27%, 40% и 33%, соответственно, в верхнем, среднем и внутреннем слое, толщиной по 150 мкм каждый. В течение всего периода культивирования клеток на матрице были обнаружены делящиеся клетки.

Показано, что матрицы на основе рекомбинантного белка спидроина 1 обладают хорошей биосовместимостью, обеспечивая эффективную адгезию и пролиферацию клеток в течение длительного периода времени, что позволяет рассматривать такие матрицы в качестве перспективного биоматериала для создания искусственных тканей и органов.

**Механизм действия росиглитазона на экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2)
глиальными клетками**

Алешин С.Е.

Аспирант

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики и Институт физико-химической биологии им.*

А.Н. Белозерского, Москва, Россия

E-mail: aleshins@gmail.com

Воспалительные процессы при развитии нейродегенеративных заболеваний мозга, при травмах и инсультах являются объектами терапевтических стратегий. В настоящее время росиглитазон считается перспективным для лечения указанных патологий, поскольку в доклинических и первичных клинических испытаниях показывает противовоспалительную, нейропротективную активность. Механизм его действия в клетках мозга не ясен и интенсивно исследуется. Нами проводятся исследования регуляции синтеза простагландинов глиальными клетками мозга, астроцитами. Было показано, что стимуляция астроцитов липополисахаридом (LPS) приводит к значительному (в 4 раза) увеличению экспрессии COX-2, добавление росиглитазона приводит к дальнейшему потенцированию экспрессии COX-2. Нами выдвинута гипотеза опосредованной регуляции экспрессии COX-2 росиглитазоном по следующему механизму: 1) активация ядерных рецепторов PPAR γ , агонистом которых является росиглитазон; 2) PPAR γ зависимое увеличение уровня экспрессии другой изоформы PPAR β/δ и его активация; 3) PPAR β/δ зависимая индукция COX-2 экспрессии. Доказательству этой гипотезы посвящена данная работа. Объект исследования – первичные астроциты (1й пассаж), выделяемые из мозга новорожденных крыс, и культивируемые до эксперимента 8 дней. В эксперименте клетки стимулировали LPS в концентрации 100 нг/мл. Для установления механизма регуляции экспрессии COX-2 использовали также астроциты, трансфицированные плазмидой сверхэкспрессирующей PPAR β/δ . Специфичность действия агонистов оценивали с помощью малых интерферирующих РНК, комплементарных PPAR β/δ и PPAR γ . Работы по сайленсингу ядерных рецепторов PPAR на астроцитах проведены впервые. Для оценки действия PPAR γ агонистов использовали также фармакологический подход – специфический антагонист рецепторов GW9662. Использовали селективные агонисты PPAR γ – росиглитазон и циглитазон в различных концентрациях; селективный агонист PPAR β/δ – L-1654051. Экспрессию генов оценивали методами ПЦР в реальном времени и Вестерн блотом. Для подтверждения активности COX-2 использовали иммуоферментный анализ PGE₂, для оценки активности PPAR использовали коммерчески доступный набор, основанный на иммуоферментном анализе.

Получено, что при снижении уровня экспрессии PPAR γ с помощью сайленсинга росиглитазон или циглитазон переставали оказывать эффект на экспрессию COX-2. Эти данные указывают, что потенцирование экспрессии COX-2 — PPAR γ зависимый процесс. Следует заметить, что сайленсинг PPAR γ не влиял на уровень экспрессии COX-2 в LPS-стимулированных астроцитах, что говорит о наличии двух механизмов увеличения экспрессии COX-2: PPAR γ - зависимом и независимом. Мы показали, что сайленсинг другого изоформа PPAR- PPAR β/δ также снимает эффекты росиглитазона и циглитазона. Таким образом, для PPAR-опосредованного увеличения экспрессии COX-2 необходим как PPAR γ , так и PPAR β/δ . Для того, чтобы выяснить, почему агонист PPAR β/δ не оказывает влияния на экспрессию COX-2 без добавления росиглитазона, мы использовали астроциты со сверхэкспрессией PPAR β/δ . В этой клеточной модели агонист PPAR β/δ увеличивает экспрессию COX-2. Данные показывают, что отсутствие влияния PPAR β/δ агониста на экспрессию COX-2 в нативных клетках, связаны с недостатком рецептора. Роль росиглитазона как PPAR γ агониста заключается в увеличении экспрессии PPAR β/δ , который в свою очередь индуцирует экспрессию COX-2. Исследования проводились совместно с проф. Г. Райзером (медицинский факультет университета Отто-фон Герике г. Магдебурга, Германия). Работа выполнена при поддержке РФФИ (07-04-01160).

Действие рекомбинантного ИЛ-6 человека на нейральные опухолевые линии клеток

Антонова Г.А.

Аспирантка

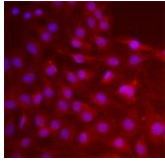
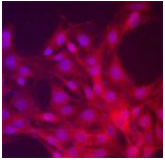
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: galati@yandex.ru

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) относится к многофункциональным цитокинам и продуцируется активированными моноцитами или макрофагами, эндотелиальными клетками, фибробластами, активированными Т-клетками, стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и реакции гемопоэза, а также участвует в дифференцировке нейроэпителиальных клеток в астроциты. Последовательность взаимодействий в передаче сигнала ИЛ-6 внутрь клетки такова: связывание ИЛ-6 с α -цепью рецептора (ИЛ-6Р); присоединение комплекса ИЛ-6/ИЛ-6Р к gp130; ковалентная гомодимеризация gp130; каскад событий внутрицитоплазматического фосфорилирования с участием JAK1, JAK2, TYK2, STAT1, STAT3. При связывании ИЛ-6 с рецептором транскрипционный фактор, сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 3 (STAT3) фосфорилируется по своему Tyr705 остатком JAK-киназы, что ведёт к димеризации STAT3, последующей ядерной транслокации и индукции экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), который является маркерным белком глиобластов и зрелых астроцитов. Низкомолекулярные индукторы, такие как cAMP (циклический аденозин-монофосфат), также запускают каскад с участием JAK-STAT-киназ.

Человеческий ИЛ-6 использовали как индуктор нейральной дифференцировки опухолевых клеток в астроцитарный ряд. Концентрацию функционально активного ИЛ-6 измеряли спектрофотокolorиметрическим методом твердофазного энзимосвязанного иммуносорбентного анализа (ELISA) с использованием наборов реактивов для ИФА, с использованием пероксидазы хрена, который является индикаторным ферментом. Измененные значения оптической плотности для стандартов использовались для построения калибровочной кривой, относительно которой были исчислены имеющиеся у нас пробы ИЛ-6. Использовалась длина волны 450 нм. Измерение производилось с дублированием стандартов. Для изучения индукторных возможностей ИЛ-6 брали клеточные линии клеток мыши, крысы, и человека и исследовали возможность индукции экспрессии GFAP, который является маркерным белком астроцитов. Использовали пять линий клеток – глиома крысы С6, гибрид С6 и нейробластомы мыши NG108, нейробластома человека IMR32, нейробластома человека BE(2)-C, нейробластома мыши N18. Выработку GFAP индуцировали добавлением циклического cAMP (аденозин-монофосфата) в концентрации 1mM/ml среды в течение 2 дней, и добавлением ИЛ-6 в концентрации 100ng/ml среды в течение 4 дней соответственно. Экспрессию GFAP детектировали иммуноцитохимически и с помощью Вестерн-блот-анализа. Исследование показало, что человеческий функционально активный ИЛ-6, и cAMP индуцируют экспрессию GFAP в клеточной линии С6 – глиома крысы. Возможность управления нейральной дифференцировкой опухолевых клеток (глиального и нейрального происхождения) дает перспективу применения в практике.

Имуноцитохимическое окрашивание на GFAP клеток линии С6 в отсутствие индуцирующих агентов	Индукция экспрессии GFAP под действием ИЛ-6 в клетках линии С6
	

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №08-04-12147-офи.

Биохимическая характеристика селеносодержащего белка V млекопитающих (SelV)**Варламова Е.Г.^{1,2}, Новоселов С.В.¹***Студент (магистр)*¹*Институт биофизики клетки РАН, Московская обл., Пущино, Россия*²*Пушинский государственный университет, Московская обл., Пущино, Россия**E-mail: 1928lv@mail.ru*

Селен — важный микроэлемент живых организмов, играющий значительную роль в регуляции многих физиологических процессов, дефицит которого в организме влечет за собой развитие ряда заболеваний сердечно-сосудистой, иммунной и репродуктивной систем. Целью данной работы является биохимическая характеристика одного из новых селен-содержащих белков млекопитающих — SelV (Selenoprotein V).

Биоинформатическими методами, используя программы PSI-BLAST, BLAST, HHPred, мы нашли, что SelV (36,7 kDa) состоит из 2 доменов: богатого пролином N-концевого домена и С-концевого, который гомологичен белкам семейства Rdx. Анализ последовательности SelV с помощью программ PSORT II Prediction, SignalP предположил наличие N-концевого сигнального пептида и высокую вероятность его митохондриальной локализации (65,2%).

Для дальнейшей биохимической характеристики этого белка нами был клонирован мышинный SelV и экспрессированы 3 его мутантных формы, полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза, (СХХС, СХХS и SХХС, где С – цистеин, S – серин) с полигистидиновым кластером на С-конце в клетках *E. coli* штамма *Rosetta*. Подготовленный аффинный матрикс инкубировали с белковым лизатом тестикул и связавшиеся потенциальные белки-партнеры были идентифицированы с помощью ПААГ-электрофореза. Вырезанные из геля полосы были проанализированы путем MALDY TOF/TOF анализа.

Для определения внутриклеточной локализации белка мы субклонировали последовательность, кодирующую OPC SelV, в вектор pEGFP-N2, несущий ген белка GFP (Clontech), и трансфецировали NIH 3T3 клетки полученной конструкцией и визуализировали флуоресценцию методом конфокальной микроскопии.

Получение и экспрессия конструктора, кодирующего слитный белок, состоящий из одноцепочечного рекомбинантного антитела ламы, связывающего ФНО, и цветного белка, флуоресцирующего в красной части спектра

Вахрушева О.А

Студентка

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: vakh57@rambler.ru

Фактор некроза опухоли (ФНО) является провоспалительным цитокином. В норме, ФНО играет важную роль в защите организма от патогенов, а также участвует в формировании иммунной системы. Однако, при многих аутоиммунных заболеваниях (в частности, при ревматоидном артрите и болезни Крона) отмечена гиперэкспрессия ФНО. В связи с этим, важным для понимания роли ФНО как в патологических, так и в нормальных процессах является изучение сайтов экспрессии этого цитокина.

У представителей семейства *Camelidae* помимо обычных антител присутствуют особые антитела, состоящие только из тяжёлых цепей. Несмотря на отсутствие лёгких цепей, такие антитела с высокой аффинностью связывают антиген. Описаны одноцепочечные рекомбинантные антитела, представляющие собой варибельный участок тяжёлой цепи антитела ламы. Эти антитела представляют собой наименьший известный антиген-распознающий элемент. Такие одноцепочечные антитела были получены и против ФНО человека [1]. Благодаря достаточно высокой аффинности и крайне малым размерам этих антител их можно использовать для создания слитных белков (fusion proteins), в частности с флуоресцентными белками. Одним из наиболее подходящих для визуализации структур на уровне целого организма флуоресцентных белков является белок Katushka [2]. Нами были получены конструкторы, кодирующие слитные белки одноцепочечных рекомбинантных антител, связывающих ФНО человека, и Katushka. Полученные конструкторы были проэкспрессированы в бактериальной системе (*E. coli*). Рекомбинантный белок сохранил способность к флуоресценции в красной области спектра. В настоящее время изучаются биологические свойства слитного белка, в том числе способность слитного белка связывать ФНО и визуализировать в организме места его продукции и накопления.

Использование связывающего ФНО цветного слитного белка в качестве маркера в экспериментах на мышинных моделях (в первую очередь, на мышах, “гуманизированных” по ФНО локусу [3]), позволит изучить, в каких тканях происходит экспрессия этого цитокина, в том числе и при заболеваниях, являющихся моделями заболеваний человека. Благодарность выражается Недоспасову С.А., Чудакову Д.М., Ефимову Г.А. и Сазыкину А.Ю. за научное руководство, помощь в работе и предоставленные материалы.

Ссылки:

1. K. Coppieters et al. Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 54, No. 6, 1856–1866 (2006).
2. D. Shcherbo et. al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature Methods*, Vol.4, No.9, 741-746 (2007).
3. Галимов А.Р и др. Определение места и характера интеграции геномного фрагмента, содержащего локус фактора некроза опухолей человека, у трансгенных мышей. *Молекулярная биология*, 42(4), 629-638 (2008).

**Использование лектинов бобовых для повышения урожайности рапса
(*Brassica napus* L.)
Вершинина З.Р.**

аспирант

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Уфа, Башкортостан, Россия
E-mail: zilyaver@mail.ru

На сегодняшний день только в России каждый год в сельском хозяйстве используется более миллиона тонн азотных удобрений. Нахождение альтернативного источника азота позволило бы существенно удешевить производство сельскохозяйственной продукции и, наконец, решить экологические проблемы, связанные с применением азотных удобрений. Интересным решением этой задачи является создание небобовых трансгенных растений, вступающих в азотфиксирующий симбиоз с ризобиями.

Одним из критических факторов на пути формирования бобово-ризобиального симбиоза являются лектины, которые обеспечивают узнавание растением-хозяином специфической для него бактерии. Эксперименты с трансгенными растениями, несущими различные гены лектинов бобовых, позволяют расширять круг микросимбионтов растения и являются важным этапом для достижения цели, которая заключается в переносе способности к азотфиксирующему симбиозу с ризобиями на небобовые растения.

В последние годы за рубежом рапсовое масло все шире используется для производства биотоплива. В перспективе и в России этот ресурсозобновляемый и экологически чистый источник энергии должен занять соответствующее место в общем объеме потребляемого моторного топлива. В ряде статей описывается образование клубеньков ризобиями при обработке целлюлазой и пектолиазой корневых волосков проростков рапса. Эти клубеньки обладали незначительной нитрогеназной активностью и были морфологически и структурно подобны клубенькам бобовых растений. Следовательно, если обеспечить специфическое взаимодействие ризобий с трансгенными по гену лектина корневыми волосками рапса, то можно добиться получения настоящих клубеньков без разрушения корневых волосков.

Полноразмерный ген лектина гороха посевного (*Pisum sativum* L.) был клонирован под управлением 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты в составе Т-ДНК вектора pCAMBIA 1305.1. Полученная конструкция была перенесена из *E. coli* методом электропорации в клетки *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGLO, которые в дальнейшем были использованы для трансформации рапса сорта Нанпа. В качестве селективного антибиотика применяли гигромицин. В качестве эксплантов использовали семядоли 5-дневных проростков, растущих *in vitro*. Трансгенность полученных растений была подтверждена активностью гена β -D-глюкоуронидазы, а также ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина гороха.

После обработки корней трансгенных растений рапса несколькими видами ризобий гороха были выявлены искривления корневых волосков, что является одной из первых симбиотических реакций. Подобные реакции отсутствовали у контрольных нетрансгенных растений рапса.

Возможность симбиотических взаимодействий между ризобиями и рапсом открывает новые горизонты на пути рационализации азотного питания этой сельскохозяйственной культуры. Дальнейшие исследования будут непосредственно связаны с получением на корнях рапса клубеньков и измерением их азотфиксирующей активности.

Ремедиация нефтезагрязненных почв и грунтов ассоциацией плазмидосодержащих штаммов¹**Ветрова А.А., Овчинникова А.А.²**

аспирант, магистр биологии

Пуцинский государственный университет, Пуцино, МО, Россия

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пуцино, МО, Россия

E-mail: vetrova123@rambler.ru

Интенсивная добыча невозобновляемых ресурсов и продукты их переработки являются реальной угрозой существования природных экосистем. Загрязнение нефтью влияет на весь комплекс морфологических, физических, физико-химических, биологических свойств почв, определяющих их плодородие. Микробная деградация нефтезагрязнений является существенным и наиболее важным компонентом биотехнологий очистки окружающей среды.

Большинство бактерий-нефтедеструкторов содержат плазмиды биodeградации. Плазмиды играют важную роль в генетической адаптации микроорганизмов, так как присутствие мобильных форм ДНК, которые могут передаваться путем конъюгации или трансформации, способствует появлению новых фенотипов, включая углеводородокислительную способность. В загрязненных почвах сильное селективное давление способствует конъюгационному переносу плазмид биodeградации. Возникновение в результате конъюгационного переноса новых комбинаций плазмид – бактерия может приводить к появлению более эффективных и конкурентоспособных штаммов-деструкторов. Интродукция микроорганизмов–потенциальных доноров плазмид биodeградации, может интенсифицировать процессы очистки и, кроме того, повышать биodeградативный потенциал микробных популяций загрязненных сайтов путем передачи плазмид и генов биodeградации в эндогенные микроорганизмы.

Целью данной работы было определение эффективности деградации нефти ассоциацией плазмидосодержащих штаммов, сравнение исследуемой комбинации микроорганизмов с биопрепаратами ЗАО Биоойл.

Ранее нами было установлено, что использование плазмидосодержащих бактерий способствует увеличению степени деградации нефти при культивировании в жидкой минеральной среде и в модельных системах, по сравнению с бесплазмидными штаммами. В ходе работы был проведен скрининг микроорганизмов-деструкторов нефти, выделенных с территорий загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Основные критерии отбора: способность к росту в средах с высоким содержанием нефти (нефтепродуктов)(40%) и соли, рН, температура, способность продуцировать биоэмульгаторы, наличие плазмид. В состав ассоциации входили следующие штаммы микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 16, *Acinetobacter baumannii* 7, *Pseudomonas putida* BS3701. Были проведены лабораторные и полевые испытания по сравнению отселектированной ассоциацией «ВиО» и биопрепарата «Биоойл». Таким образом, испытанная ассоциация ВиО является высокоэффективной и может быть использована для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами в регионах с холодным и умеренным климатом.

¹ Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов – гос. контракты РНП 2.1.1.7789 и РНП 2.1.1.9290, РФФИ 08-04-99019-р_офи и РФФИ 08-04-90028-Бел_а.

² Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. Филонову А.Е. за помощь в подготовке тезисов.

Фактор роста фибробластов стимулирует пролиферацию клеток в пигментном эпителии сетчатки крысы**Ганчарова О.С.**

Студентка

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: olgancharova@gmail.com

Некоторые хвостатые амфибии способны восстанавливать функционирующую сетчатку после ее повреждения либо удаления, в то время как ткани глаза млекопитающих не обладают столь выраженным регенеративным потенциалом. Регенерация сетчатки у тритонов происходит за счет трансдифференцировки клеток пигментного эпителия сетчатки, процесса, в ходе которого клетки эпителиального типа превращаются в нервные клетки. Даже в интактной сетчатке тритона могут присутствовать факторы, способствующие активации трансдифференцировки пигментного эпителия. Нами было показано [1], что тотальный экстракт сетчатки тритона вызывает пролиферацию клеток в пигментном эпителии сетчатки крысы, что, возможно, свидетельствует о запуске механизмов трансдифференцировки клеток пигментного эпителия млекопитающего.

В настоящей работе мы показали, что экстракт сетчатки крысы не обладает стимулирующим действием на пигментный эпителий крысы, в отличие от экстракта сетчатки тритона. Этот факт подтверждает наше предположение о присутствии в сетчатке тритона особых факторов, способствующих трансдифференцировке пигментного эпителия. Исследование природы этих факторов и составляет нашу дальнейшую работу.

Анализ данных литературы показал, что кандидатом на роль фактора, содержащегося в экстракте сетчатки тритона и стимулирующего пролиферацию пигментного эпителия крысы, может служить белок, известный как фактор роста фибробластов 2 (Fibroblast Growth Factor 2, FGF2) [2–4]. Мы исследовали влияние FGF2 на пигментный эпителий в составе заднего сектора глаз крыс-альбиносов в тех же условиях *ex vivo*, в которых прежде изучали действие экстракта сетчатки тритона на пигментный эпителий крыс, и получили следующие результаты:

- (i) пигментный эпителий в образцах, культивированных в присутствии FGF2, приобретает многорядный фенотип.
- (ii) в опытных образцах удалось обнаружить митозы в клетках ПЭС.

Выводы: Полученные нами результаты говорят об активации пролиферации клеток пигментного эпителия крысы в присутствии фактора роста фибробластов 2. Культивирование задних секторов глаз крыс в среде с добавлением FGF2 привело к тем же изменениям в пигментном эпителии, что и культивирование их в присутствии экстракта сетчатки тритона. Таким образом, действие экстракта сетчатки тритона на пигментный эпителий крысы может быть опосредовано фактором роста фибробластов 2.

Используемая литература

1. Ганчарова О.С., Килина О.В. Экстракт пигментного эпителия сетчатки тритона стимулирует пролиферацию клеток в пигментном эпителии сетчатки крысы. *Материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»*. 2008.
2. Sakaguchi D.S., Janick L.M., Reh T.A. *Developmental Dynamics*. 1997;209:387–398.
3. Park C.M., Hollenberg M.J. *Developmental Biology*. 1989;134:201–205.
4. Spence J.R. et al. *Molecular Vision*. 2007;13:57–65

Роль бактериального шаперонина GroEL в сворачивании белка LuxR, регулятора транскрипции *lux*-оперона *Vibrio fischeri*.**Горянин И.И.**

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия.

E-mail: dragon98@mail.ru

Интенсивность биолюминесценции клеток морской бактерии *Vibrio fischeri* определяется экспрессией *lux* генов, которая регулируется «LuxI-LuxR» системой.

Lux-регулон *V. fischeri* (*luxRICDABE*) состоит из двух оперонов: *luxR* и *luxICDABE*. Оперон *luxICDABE* кодируют гены люциферазной системы. Продуктом гена *luxR* является белок LuxR - активатор транскрипции оперона *luxICDABE*. Связываясь с автоиндуктором (АИ), белок LuxR способен формировать комплекс с промотерным участком *luxICDABE* оперона. Белок LuxR состоит из двух доменов: С-концевой домен отвечает за связывание с молекулой ДНК, а N-концевой участвует в связывании АИ. Уровень биолюминесценции клеток *Escherichia coli* штамма *gro⁻*, содержащих полную *lux* систему *Vibrio fischeri*, значительно ниже по сравнению со штаммом *gro⁺*.

Чтобы определить, участвует ли GroEL/ES в сворачивании LuxR, сконструировали слитный ген *luxR-gst* и вставлен в вектор pGEX-KG (pBR322 репликон: 30-50 копий на клетку). Совместно с химерным белком GST-LuxR, выделенным методом аффинной хроматографии на глутатионе, элюировался белок GroEL.

Предположили, что GroEL участвует в сворачивании только одного из доменов LuxR, а именно, связывающего АИ. Для проверки гипотезы были получены 2 аналогичные конструкции: с участками, кодирующими N-концевой (1-162 а.о.) и С-концевой (162-250) домены LuxR. Белок LuxR с С-концевым доменом активирует транскрипцию оперона на одинаковом уровне в штаммах *E. coli gro⁺* и *E. coli groEL673*. При выделении химерного белка, содержащего только С-концевой домен LuxR, GroEL элюирован не был, тогда как выделение слитного белка, содержащего N-концевой домен LuxR и GST показало наличие в элюате GroEL.

Таким образом, GroEL/GroES система участвует в сворачивании белка LuxR. GroEL/ES шаперонин необходим для сворачивания только N-концевого домена LuxR и, по-видимому, играет немаловажную роль в регуляции *lux* оперона

Экспрессия репортерного гена усиливается введением дополнительной 5'-НТО генов *CUP1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* вне зависимости от его промотора
Игнатова В.В., Антонец К.С.

Студенты

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ignatova_vv@mail.ru

Регуляция биосинтеза белков на уровне трансляции в живых клетках во многом определяется эффективностью инициации трансляции соответствующих мРНК. Изменение скорости инициации трансляции мРНК может быть обусловлено разным сродством факторов инициации трансляции к разным 5'-НТО. У ряда вирусных генов, а также у некоторых генов высших эукариот в области 5'-НТО выявлены последовательности, которые позитивно регулируют эффективность трансляции соответствующих мРНК. В частности, 5'-НТО мРНК вируса табачной мозаики содержит вырожденный тандемный повтор (CAA)_n, с которым связывается шаперон Hsp101, который является растительным ортологом дрожжевого шаперона Hsp104. Таким образом, осуществляется Hsp101-опосредованная позитивная регуляция трансляции этой вирусной мРНК. Подобные последовательности в области 5'-НТО были недавно обнаружены у нескольких дрожжевых генов. Также, в недавних исследованиях была показана позитивная регуляция экспрессии репортерных генов, находящихся под контролем промотора *CUP1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, шапероном Hsp104.

В нашей работе проводилось исследование роли 5'-НТО генов *CUP1-1* и *CUP1-2* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в регуляции экспрессии на посттранскрипционном уровне. Для этого были сконструированы плазмиды, несущие репортерный ген GFP – зеленый флуоресцирующий белок, под разными промотерами с неизменными лидирующими участками и с дополнительными последовательностями 5'-НТО *CUP1* перед стартовым кодоном. Для анализа продукции репортерного белка мы использовали методы флуоресцентной микроскопии и Вестерт-блот гибридизации. Установлено, что введение дополнительной последовательности 5'-НТО *CUP1* приводит к увеличению уровня продукции белка независимо от промотора. Мы провели анализ, в результате которого выяснили, что обе альтернативные последовательности 5'-НТО *CUP1* относятся к числу крайне АТ-обогащенных с содержанием ГЦ 25% и 25,9%, тогда как среднее значение для 5'-НТО длиной от 63 до 90 п.о. у дрожжей *S. cerevisiae* составляет 33%. Также следует отметить, что перед стартовым кодоном в 5'-НТО *CUP1* расположены четыре тандемных повтора (CAAT), которые могут служить регуляторными последовательностями, ответственными за взаимодействие с шапероном Hsp104, позитивно регулирующим уровень продукции белка через каскад факторов инициации трансляции. Мы исследовали уровень продукции репортерных белков в штаммах с нормальным уровнем продукции Hsp104, сверхпродукции Hsp104 и в изогенном штамме с делецией гена *Hsp104*. Нами установлено, что введение дополнительной последовательности 5'-НТО *CUP1* приводит к позитивной регуляции экспрессии репортерного гена вне зависимости от промотора. Полученные результаты в перспективе могут найти применение в биотехнологии для увеличения продуктивности биореакторов для продукции рекомбинантных белков.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта АФГИР и Министерства Образования Российской Федерации BRHE Y4-B-12-04.

Влияние транзитной глюкозной депривации на культивированные зернистые нейроны мозжечка¹**Кананыхина Е.Ю.***Студент**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**E-mail: jenuya2000@hotmail.ru*

Действие многих клеточных ядов и повреждающих воздействий сказывается в первую очередь на митохондриях. Патологические изменения этих органелл могут выражаться в фрагментации митохондриома, быстром нарушении движения митохондрий внутри тела нейрональной клетки и ее отростков. Наиболее важно, что при патологических воздействиях может нарушаться основная функция митохондрий, связанная с окислением органических соединений, субстратов митохондриального дыхания. Энергия, освобождающаяся при утилизации этих соединений, используется для создания мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий, который в дальнейшем обеспечивает синтез АТФ.

Поддержание определенного значения мембранного потенциала митохондрий является одним из требований, необходимых для нормального существования клетки, которое может нарушаться вследствие истощения энергетических субстратов, в частности при таком патологическом состоянии как гипогликемия. Исходя из вышесказанного, вопрос о влиянии транзитной субстратной депривации на морфофункциональное состояние митохондрий нейронов является актуальным, и он был исследован в настоящей работе путем моделирования этого явления с помощью глюкозной депривации культивированных зернистых нейронов мозжечка (КЗН). В ходе работы нами было сопоставлено изменение мембранного потенциала митохондрий КЗН с процессом изменения концентрации ионов внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) на стадии глюкозной депривации (ГД) и в период восстановления доступа клеток к этому энергетическому субстрату. Измерение $[Ca^{2+}]_i$ производили с помощью специфического флуоресцентного зонда на эти ионы Fluo-4 AM, а изменение мембранного потенциала митохондрий оценивали, используя флуоресцентный катион TMRE, который накапливается в митохондриях пропорционально их мембранному потенциалу.

Показано, что 60-минутная ГД вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий КЗН и повышение $[Ca^{2+}]_i$. Кальциевая перегрузка нейронов была обратимой, и через 60 минут после восстановления в среде инкубации нормального уровня глюкозы $[Ca^{2+}]_i$ полностью возвращался к норме, тогда как мембранный потенциал митохондрий оставался на $10,0 \pm 1,8\%$ ниже исходного. Гибель нейронов через 24 часа после 60 мин ГД составляла $14,0 \pm 4,4\%$. Таким образом, несмотря на значительное снижение мембранного потенциала митохондрий и кальциевую перегрузку, большая часть нейронов переживает эти физиологические нарушения. Возможно, что на первых этапах ГД снижение мембранного потенциала митохондрий КЗН может выполнять защитную функцию, предотвращая критическую аккумуляцию кальция в митохондриях и уменьшая продукцию активных форм кислорода, повышение которых может вести к набуханию и деструкции этих органелл и, в дальнейшем, гибели нейронов. Совершенно очевидно, что структурная пластичность митохондрий обладает не слишком большой обратимостью, что в свое время получило название переход в точку невозврата [Kroemer G, et al., 1995]. В это же время биохимические ответы, такие как модуляция содержания внутриклеточного кальция или величина митохондриального мембранного потенциала, обладают заметной степенью пластичности, видимо в результате организации систем, активно коррелирующих эти изменения, и можно говорить о системе поддержки гомеостаза этих параметров, что в очередной раз свидетельствует о жизненной необходимости поддержания постоянным этих значений.

¹ Поддержано РФФИ (гранты *08-04-00762-а, 08-04-01667-а, 09-04-01096-а*)

Подавление экспорта мРНК из ядра в цитоплазму может усиливать репродукцию вирусов растений

Ковров Д.В.

Студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия
E-mail: KovrovDV@rambler.ru

В нашей лаборатории было показано, что гиперэкспрессия коротких некодирующих РНК (КНР) под контролем промотора РНК-полимеразы II подавляет экспрессию “хозяйских” генов в растительной клетке. Возникает вопрос, могут ли такие КНР оказывать влияние на репродукцию вирусов, репликация которых происходит в цитоплазме. Вирусы в отличие от мРНК имеют способность к самокопированию в цитоплазме, что наряду с другими факторами определяет высокий уровень экспрессии с них целевых белков и как следствие, привлекательность системы с точки зрения биотехнологии. Мы предполагаем, что используемые нами КНР снизят экспрессию белков противовирусной защиты, что увеличит продуктивность вирусного вектора.

Взяв за объект исследования *Nicotiana benthamiana*, мы поставили серию экспериментов по одновременному введению (при помощи *Agrobacterium tumefaciens*) плазмид в ядра клеток молодых листовых пластинок. Данные плазмиды направляют синтез (а) коротких некодирующих РНК (КНР) под контролем промотора РНК-полимеразы II (35S промотор вируса мозаики цветной капусты) и (б) вирусного вектора созданного на основе ВТМ крестоцветных, несущий репортёрный ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP, green fluorescent protein). Уровень экспрессии вирусного вектора, измеряемого по флуоресценции GFP, в случае присутствия таких КНР увеличивается в 8-10 раз. Полученный уровень стимуляции вектора превосходит эффект получаемый при использовании белков ингибиторов посттранскрипционного у молчания генов.

Для исследования возможных механизмов стимулирующего действия коротких РНК были использованы конструкции, несущие КНР экспрессирующиеся под контролем промотора I и III. В нашей лаборатории были получены данные, что такие короткие РНК не угнетают, а напротив, несколько усиливает экспрессию “хозяйских” генов в клетках растения. Если действие КНР обусловлено только ингибированием синтеза противовирусных белков, эти конструкции не должны стимулировать экспрессию вирусного вектора.

Было обнаружено, что эти КНР усиливают экспрессию вирусного вектора в 2-4 раза. Это означает, что стимулирующий эффект коротких РНК может основываться не только на подавлении экспрессии белков противовирусной защиты, но и на неспецифическом ингибировании белков, участвующих в деградации РНК в цитоплазме. Это предположение было подтверждено тем, что в присутствии таких КНР повышается эффективность накопления вирусных РНК.

Полученные данные могут иметь важное биологическое значение. В последнее время стало известно что, что вирусная инфекция активизирует синтез коротких РНК, синтезируемых под контролем промотора II типа. В свете полученных ранее данных, представляет интерес исследование влияния таких РНК на экспрессию генов устойчивости к патогенам, в условиях вирусного заражения. В настоящее время проводятся исследования влияния экспрессии таких КНР на экспрессию мРНК в клетке.

Фидиппидова клетка как модель для изучения аутофагии в растениях**Колесникова В.С¹, Комарова Т.В²**¹Студент, ²Научный сотрудник, к.б.н.*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: selen.ozarenie@gmail.com*

Аутофагия представляет собой один из способов избавления как клеток от ненужных органелл, так и целого организма от ненужных клеток. Это явление играет важную роль для растения при старении клетки, стрессе, гиперчувствительном ответе на инфекции. В норме растительная клетка хорошо приспособлена к продукции больших количеств белка, накапливающегося в специальных компартментах для хранения и дальнейшего использования. Но всё же интенсивный, неконтролируемый синтез белка, скапливающегося в цитоплазме, по-видимому, через аутофагию, приводит к программируемой смерти клетки (PCD). Для изучения процесса аутофагии растительной клетки, приводящей к PCD, была разработана система с использованием вирусного вектора, позволяющего получать высокий уровень образования GFP в растении. Для этого инфекционная копия ВТМ доставлялась при помощи *Agrobacterium tumefaciens* в клетки листьев *Nicotiana benthamiana*. В течение трех дней после агроинъекции количество GFP достигало 5 г/кг, и это приводило к гибели клеток, получившим название "Фидиппидовы клетки". При помощи микроскопии (световой, конфокальной, электронной) и биохимического подхода были определены следующие свойства Фидиппидовой клетки: ко-локализация "вирусных фабрик" и скоплений GFP, а также поведение GFP в агрегатах и его правильная пространственная укладка. На основе морфологии были выделены стадии смерти ткани и клетки. Кроме того, методом вычитающей гибридизации был проанализирован профиль экспрессии мРНК в растительной клетке непосредственно перед возникновением видимых признаков деградации ткани. Было обнаружено повышение уровня экспрессии несколько генов, в том числе CDM1 (biotic cell death-associated protein) и убиквитина. Динамика накопления соответствующих мРНК подтверждает роль соответствующих белков в процессе аутофагии растительной клетки.

Исследование взаимодействия аналогов антибактериального пептида Ltc1K с мембранами эритроцитов и модельными липидными системами**Кудряшова К.С.,^{1,3} Самсонова О.В.^{1,2}**

Студент; аспирант;

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия²Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва, Россия

E-mail: rekamoskva@mail.ru

В последние годы наблюдается рост устойчивости патогенных микроорганизмов к действию известных антибиотиков. Проблема поиска новых антибактериальных агентов становится все более актуальной.

Антимикробные пептиды обнаружены у различных по происхождению организмов и, по-видимому, являются частью защитной системы. Многие из них обладают высокой антибактериальной и низкой цитотоксической активностью, поэтому могут рассматриваться как перспективные антибактериальные агенты при создании новых лекарств.

Изучение влияния структуры пептидов на характер их взаимодействия с про- и эукариотическими клетками, в том числе с использованием мутантных форм, необходимо для создания синтетических аналогов, обладающих заданным набором свойств.

В данной работе был проведен сравнительный анализ вторичной структуры, гемолитической активности и характера связывания с мембраной линейного катионного пептида латарцина Ltc1K из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaei* (SMWSGMWRRKLLKLRNALKKKLLKGEK) и его аналогов Ltc1.2, Ltc1.21 и Ltc1.22, укороченных на 3, 2 и 1 аминокислоту с N-конца, соответственно.

Гемолитическую активность пептидов оценивали по вытеканию гемоглобина при инкубации с эритроцитами человека *in vitro*. Пептиды Ltc1K, Ltc1.21 и Ltc1.22 обладали высокой гемолитической активностью (ГК₅₀ ~1 мкМ). Ltc1.2, наиболее укороченный аналог, обнаруживал наименьшую активность в отношении эритроцитов (ГК₅₀ 8 мкМ). Это согласуется с опубликованными данными о том, что N-концевой участок Ltc1K погружен в гидрофобную область мембраны. Следовательно, его удаление может снижать сродство пептида к мембране эукариотической клетки.

Методом кругового дихроизма было показано, что в водно-солевом растворе Ltc1K и его аналоги имеют преимущественно неупорядоченную структуру. При связывании с мицеллами из 1-миристоил-2-гидрокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолина все пептиды приобретают конформацию с высокой долей альфа-спирали. Такое свойство характеризует большинство известных линейных антибактериальных пептидов и считается одной из молекулярных детерминант их взаимодействия с мембраной.

С помощью метода флуоресцентной спектроскопии изучено взаимодействие Ltc1K и его аналогов с липосомами из 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина: измерены изотермы связывания и определены константы связывания.

Ведется работа по изучению пермебиализующей способности пептидов. Сравнительное исследование синтетических аналогов Ltc1K выявит различия в свойствах пептидов и позволит глубже понять влияние структуры антибактериального пептида на его свойства.

³ Автор выражает признательность д.б.н. Феофанову А.В. за помощь в подготовке тезисов.

Разработка генных конструкций на основе двухкассетной экспрессионной плазмиды pBudCE4.1, экспрессирующей ангиогенный и нейропротекторные факторы VEGF и GDNF¹

Кудряшова Н.В.², Салафутдинов И.И.², Шафигуллина А.К.³

² Аспирант(ка) биолого-почвенного факультета,

Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, Казань, Россия

nkudryashova@gmail.com, sal.ilnur@gmail.com

³ Врач – интерн

ГОУ ВПО МЗ РФ Казанский государственный медицинский университет, Казань,

Россия

E-mail: sh.aygul@gmail.com

В настоящее время разработка генных и генно-клеточных конструкций для лечения нейротравм, ишемических инсультов головного и спинного мозга и нейродегенеративных заболеваний является актуальной задачей современной медицины. В тоже время остается открытым вопрос выбора наиболее эффективного терапевтического гена или их комбинаций. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) обоснованно считается одним из наиболее перспективных нейротрофических факторов. Он поддерживает выживание нейронов, что, согласно нашим данным, осуществляется через рецептор Flk-1. Применение на модели экспериментальной травмы спинного мозга VEGF в гелевом носителе на основе экстракта белков базальной мембраны (Matrigel) существенно поддерживает васкуляризацию и рост аксонов (Faschiano et al., 2002). Выбор именно этого нейротрофического фактора обусловлен также его выраженным стимулирующим влиянием на процесс неоваскуляризации, что представляется важным для скорейшего устранения эффекта посттравматической ишемии и нормализации кровоснабжения мозга. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) принадлежит к семейству трансформирующего фактора роста бета (TGF β), секретируют клетки глии (астроциты, шванновские клетки), имеет выраженное нейропротекторное действие на дофаминэргические нейроны и мотонейроны спинного мозга (Cheng et al., 2002), стимулирует рост аксона (Iannotti et al., 2003). Уровень мРНК GDNF быстро возрастает при повреждении нервной системы (Höke et al., 2000). Трансплантация генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток, экспрессирующих GDNF, крысам с фенотипом бокового амиотрофического склероза увеличивает выживаемость мотонейронов (Suzuki et al., 2008). Целью работы является разработка генных конструкций на основе двухкассетной экспрессионной плазмиды pBudCE4.1, одновременно и независимо экспрессирующей два терапевтических гена VEGF (изоформы 121, 165 или 189) и GDNF.

Клонирование генов VEGF и GDNF в экспрессионные плазмидные векторы. Амплификация генов VEGF и GDNF с использованием специфичных праймеров методом ОТ-ПЦР, созданных на основе нуклеотидных последовательностей данного гена из системы GeneBank. Продукты амплификации были клонированы в плазмиду pGEM TEasy и просеквенированы. После этого нами было проведено субклонирование генов в экспрессионные плазмидные вектора pcDNA 3.1+ и pBudCE4.1.

Результат: созданы генетические конструкция на основе двухкассетной экспрессионной плазмиды pBud CE4.1, одновременно и независимо экспрессирующей два терапевтических гена VEGF (изоформы 121, 165 или 189) и GDNF для повышения эффективности доставки комбинаций терапевтических генов в клетки-мишени.

¹ Работа частично поддержана государственным контрактом ФЦП Федерального Агентства по Науке и Инновациям 02.552.12.7008

² Автор выражает благодарность научному руководителю доценту, к.б.н. Ризванову А.А., а также Киясову С.Л. и Исламову Р.Р. за помощь в планировании экспериментов.

Статистический анализ генома вируса гриппа для выявления варибельности структуры генов и кодируемых ими белков на примере гена белка М1.**Кузнецова М.А., Литвинчук А.В.**

Студенты

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: mak1989@yandex.ru, lit-lex@bk.ru

Вирус гриппа является серьезным патогеном человека, который на протяжении 20-го столетия вызвал несколько пандемий с высоким уровнем смертности. Именно пандемический потенциал и большая вероятность появления новых высокопатогенных штаммов делает крайне актуальными работы, направленные на структурные исследования вириона вируса гриппа.

Вирусы гриппа подразделяют на три типа: А, В и С. Тип А поражает как человека, так и животных, типы В и С только человека. Антигенные характеристики каждого типа существенно различаются. Тип А имеет подтипы, различающиеся структурой белков внешней поверхности - гемагглютинина и нейраминидазы. Для вирусов, особенно типа А, характерно наличие множественных различий в структуре антигенных детерминант. Из-за частых перестроек антигенных детерминант до сих пор не удается создать эффективную вакцину для всех подтипов вируса.

В настоящей работе предпринята попытка исследовать на примере белка М1 эволюционную стабильность белков вируса гриппа. Белок М1 — структурный; он выстилает изнутри липидный бислой вириона, образуя остов. В белке М1 выделяют N (аминокислотные остатки 1–86), М (аминокислотные остатки 87–164) и С (аминокислотные остатки 165–252) домены. Было проанализировано около 350 опубликованных нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок М1 вируса типа А, 23 типа В и 14 типа С. Частота нуклеотидных замен в кодирующей части гена белка М1 составляет примерно 0,0097 (258 замен на 265650 нуклеотидов). Чаще всего замены встречаются в домене М — 0,00132 (108 замен на 81900 нуклеотидов), который играет основную роль в связывании с РНК. Кроме того, М-домен является ключевым в образовании димеров М1-М1. Самым консервативным является N-домен — 0,00076 (69 замен на 90300 нуклеотидов). В С-домене — 0,00087 (81 замены на 93450 нуклеотидов). Таким образом, оказалось, что популяционная варибельность в доменах различна.

Особый интерес вызывает область, соединяющая N+М-домены с С-доменом белка. Она обладает особыми свойствами. Например, в ней происходит разрыв белковой молекулы между 164Gln-165Met при глубоком охлаждении. Оказалось, что эта область является высококонсервативной.

Для исследования этой междоменной области предполагается, используя методы белковой инженерии, создать штамм *E.coli* – продуцент белка М1 и методом олигонуклеотиднаправленного сайт-специфического мутагенеза проводить замены кодонов, тем самым изменяя аминокислотную последовательность данного участка.

Литература

1. Sarah L. Noton, Elizabeth Medcalf "Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions"
2. <http://influenza.big.ac.cn/> (IVDB(Influenza virus Database Resource))
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html> (Influenza Virus Resource)

Получение и культивирование нервных клеток головного мозга эмбрионов мыши**Лапаев С.С.***Студент**Евразийский Национальный университет им. Л. Н. Гумилева, Естественно-технический факультет, Астана, Казахстан**E-mail: bt12ls@mail.ru*

Клеточные культуры являются наиболее удобной и безопасной моделью для различного рода исследований, в том числе и исследований инфекционной активности прионов. Создание этих линии послужило моделью для более глубокого изучения нейропатологий человека и животных.

Целью проведенной работы было изучение возможности создания модельной клеточной линии нервных клеток из головного мозга эмбрионов мыши для последующего исследования культивирования на ней прионных агентов скрепи.

Головной мозг получали из эмбрионов мыши на 18-ом дне гестации. Предварительно отмытые клетки ресуспендировали в культуральной среде ДМЕМ с 10% фетальной сыворотки телят.

Для дифференцировки полученных клеток первичной культуры использовали кондиционную среду, полученную в результате культивирования первичной культуры эмбриональных фибробластов мыши, а также среду ДМЕМ с 5% фетальной сыворотки телят.

В результате проведенных работ была получена культура нервных клеток из головного мозга эмбрионов мыши перспективная для дальнейших исследований культивирования на них инфекционных прионных агентов.

Для использования полученных нервных клеток головного мозга эмбрионов мыши в дальнейшем, они были заложены на хранение методом криоконсервации в условиях жидкого азота с использованием, в качестве криопротектора, глицерина.

Полученные клеточные культуры нервных клеток представляют интерес для дальнейших исследований молекулярных основ амилоидогенеза и функций клеточных предшественников прионов, синтезируемых клетками нервной ткани. Созданные модельные культуры клеток могут быть использованы при разработке средств диагностики и лечения нейродегенеративных болезней человека и животных, вызываемых нарушением конформационных матриц молекул клеточных белков, а так же для проведения ряда лабораторных работ по изучению биохимических, физиологических и других свойств нервной ткани человека и животных.

Литература

4. Покровский В.И., Киселёв О.И., Черкасский Б.Л. (2004) Прионы и прионные болезни. СПб.
5. В.А. Яворская, Н.П. Волошина, В.В. Хвисяк, и др. (2004) Получение нейробластов из стромальных клеток костного мозга и их клиническое применение при некоторых заболеваниях нервной системы. // Трансплантология. Интернет-ресурс.
6. Л.Д. Любич, М.И. Лисяный. (2004) Получение, культивирование и индукция дифференцировки эмбриональных нейроклеток // Трансплантология. Интернет-ресурс.
7. Полтавцева Р.А., Марей М.В., Дубровина И.В. и др. (2001) Анализ развития стволовых нейральных клеток человека *in vitro* // Цитология. Cytology. Т. 43.
8. Л. П. Дьяконов, В. И. Ситьков. (2000) Животная клетка в культуре. М.: СПУТНИК.

**Влияние автоиндуктора 2-го типа на экспрессию *lsr*-оперона в клетках
Escherichia coli.
Лёушкин Е.В.**

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: leushkin@rambler.ru

Автоиндуктор 2-го типа (АИ-2) является медиатором «кворум сенсинга» у бактерий *Escherichia coli*. «Кворум сенсингом» называют способность бактерий чувствовать плотность популяции и использовать эту информацию в регуляции активности генов. АИ-2 конститутивно синтезируется белком LuxS из S-рибозилгомоцистеина и свободно выходит в окружающую среду. При достижении критической концентрации фосфорилируется киназой lsrK и вызывает дерепрессию lsr-оперона, связываясь с LsrR (репрессор lsr оперона). Оперон lsrACDBFG, кодирует белки транспорта и деградации АИ-2. За счёт такого механизма концентрация АИ-2 резко возрастает, что, как предполагается, ведёт к переключению регуляции многих генов, опосредуемой репрессором LsrR. К концу экспоненциальной фазы роста устанавливается равновесие между синтезом и распадом АИ-2: медиатор практически исчезает из среды.

Нашей первоочередной задачей было создание сенсора на АИ-2. Для создания сенсора в *E. coli* мы использовали промотор lsr-оперона и ген-репрессор *lsrR*. Фрагменты ДНК, несущие только промотор, а также промотор вместе с геном *lsrR* были вставлены в беспромоторные векторы pDEW201 (pBR322 репликон: 20-50 копий) и pMWFlux (pSC репликон: 8-12 копий), несущий lux гены *Photorhabdus luminescens* в качестве репортёрных. Полученные конструкции были трансформированы в штаммы *E. coli* MG1655 и *E. coli* DH5 α (не экспрессирует luxS). Все 4 штамма были проверены на чувствительность к АИ-2. Для этого клеткам при OD=0,05–0,1 добавляли надосадочные от клеток *E. coli* MG1655 при OD=1,5 (концентрация АИ-2 при такой плотности максимально) и *E. coli* DH5 α (не образуют АИ-2). Практически никакого значимого эффекта при этом не наблюдалось: добавка АИ-2 не увеличивала активность промотора. Но следует отметить, что штаммы с дополнительным LsrR имели более низкую люциферазную активность в начале экспоненциальной фазы роста и более высокую в стационарной фазе, чем штаммы без дополнительного репрессора.

В надежде увеличить количество АИ-2 клонировали белок LuxS (осуществляет синтез АИ-2) в вектор pZE21 под промотор PLtetO-1. Добавление такой надосадочной в начале экспоненциального роста приводит к подавлению экспрессии промотора (в 2-3 раза), а если суперэкспрессировать LuxS в сенсорных штаммах, то наблюдается сильное снижение люциферазной активности (до 100 раз). Полученные данные дают основания считать, что нефосфорилированная форма АИ-2, связываясь с LsrR, способствует репрессии lsr оперона. В ближайшее время планируется проверить предположение на штаммах с делециями по *luxS* и *lsrK*.

**Короткие некодирующие последовательности как инструмент изучения
ядерного экспорта**

Макаров Александр Алексеевич

Студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: ogion@list.ru

Ядро любой эукариотической клетки – место синтеза РНК, обладающих различными функциями. Кодированные РНК синтезируются из-под промотора полимеразы II, в то время как синтез некодирующих РНК направляется промоторами полимераз I и III и в ряде случаев промотором полимеразы II. Несмотря на то, что индивидуальные механизмы экспорта некоторых РНК изучены достаточно хорошо, взаимосвязь между различными механизмами экспорта РНК неясна. В данной работе мы исследовали некоторые процессы, происходящие в ходе экспорта РНК из ядра в клетках *N. benthamiana* – близкого родственника табака, широко применяющегося в растительной биотехнологии. Была выдвинута гипотеза, что тип промотора, его сродство к полимеразе определённого типа, определяет механизм сортировки и последующего экспорта РНК из ядра.

Был разработан оригинальный метод исследования экспорта РНК с помощью гиперэкспрессии коротких некодирующих РНК (КНР), синтезируемых под контролем промоторов полимераз I – III типов, соответственно, промотора рРНК (конструкция Pol I^{rRNA}-КНР), 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (Pol II^{35S}-КНР) тРНК^{tyr} (Pol III^{tRNA}-КНР). Суть метода заключается в оценке способности синтезируемых КНР влиять на экспрессию репортёрных генов.

На первом этапе работы мы доказали с помощью конфокальной микроскопии, что КНР, синтезирующиеся под контролем промоторов всех трёх типов экспортируются в цитоплазму.

Было показано, что Pol II^{35S}-КНР существенно подавляет экспрессию репортёрного гена (GFP), синтезирующегося из-под 35S промотора полимеразы II. При этом, различие в последовательностях КНР одинаковой длины не оказывало существенного влияния на описанный эффект: искусственная КНР (GAAA)₁₆ и природная U6 оказывали сходный эффект на экспрессию 35S-GFP. Более существенным фактором оказалась именно длина КНР. Её уменьшение приводило к снижению негативного эффекта на экспрессию маркерного гена. Наиболее вероятным объяснением этого, является то, что с ростом длины снижается экспрессия КНР, что было подтверждено анализом количества данной короткой РНК. С другой стороны, КНР, синтез которых направляется промоторами полимераз I и III – соответственно Pol I^{rRNA}-КНР и Pol III^{tRNA}-КНР – оказывают стимулирующий эффект на экспрессию репортёрного гена.

Полученные результаты чётко показывают, что только КНР, синтезируемые под контролем промотора полимеразы II конкурируют с мРНК. Конкуренция в данной системе может происходить на двух стадиях – транскрипции и экспорта. С помощью ПЦР с детекцией в реальном времени было показано, что количество РНК репортёрного гена не меняется в присутствии КНР, что ставит под сомнение идею о конкуренции за транскрипционные факторы. С другой стороны, с помощью конфокальной микроскопии было показано, что КНР, синтезированный из-под промотора полимеразы II (Pol II^{35S}- (GAAA)₁₆), действительно ограничивает выход репортёрной матрицы из ядра. Таким образом, было показано, что РНК, синтезирующиеся под контролем промотора полимеразы II конкурируют за транспорт между собой, но не конкурируют с РНК, синтез которых направляется промоторами другого типа.

Таким образом, была разработана экспериментальная система для исследования экспорта РНК из ядра, и с её помощью охарактеризована конкуренция РНК, синтезирующихся под контролем промоторов различных типов.

Высококчувствительная детекция однонуклеотидных замен при помощи изменённой эндонуклеазы I бактериофага T7**Машков О.И.**

Аспирант

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского
научного центра РАН, Уфа, РоссияE-mail: mr_mashkov@mail.ru

Одним из проявлений полиморфизма геномной ДНК являются однонуклеотидные замены (SNP). В геноме человека SNP представлены в среднем через каждые 500 п.н. Это делает возможным использование SNP в качестве эффективного инструмента при выполнении ряда задач в ходе популяционных исследований, оценки степени предрасположенности к различным заболеваниям, предсказания индивидуальной чувствительности к лекарственным средствам, оценки молекулярной эволюции групп родственных генов. В связи с этим, наблюдается повышенный интерес к разработке метода, способного осуществить в короткий срок информативный, недорогой и качественный анализ полноразмерной геномной ДНК на предмет выявления специфических SNP.

Существует несколько направлений в разработке метода, способного удовлетворить определённым требованиям проведения скрининга образцов. Наиболее информативным в плане выявления и характеристики мутаций *de novo* является метод автоматического секвенирования. Однако секвенирование протяжённых фрагментов ДНК является достаточно дорогой и трудоёмкой процедурой. Широко используются быстрые методы скрининга, которые полагаются на один из двух принципов. Первая группа методов использует конформационные различия в гетерогенных фрагментах ДНК, которые приводят к изменению электрофоретической подвижности образца (SSCP, DGGE). Однако данные методики не дают информации относительно природы или местоположения мутации. Вторая группа методов основывается на способности белков узнавать участок ДНК с ошибочно спаренными нуклеотидами, что обеспечивает исследователя информацией о местоположении мутации. В последние годы в разработке ферментативных методов детекции мутаций используются бактериофаговые резолвазы. Несмотря на то, что основной биологической функцией резолваз является разрешение структур Холлидея в процессе рекомбинации, они способны специфически узнавать и связываться с участками дуплексной ДНК, где не произошло спаривание нуклеотидов в силу отсутствия комплементарности между последними.

Нами клонирован и секвенирован ген эндонуклеазы I бактериофага T7 в векторе pKRX, который впоследствии был переклонирован в экспрессирующие векторные конструкции pET-3a, PinPoint Xa-2 и pET-44b в нужной ориентации и с сохранением рамки считывания, что было подтверждено секвенированием. В ходе дальнейшей работы необходимо получить при помощи изменения состава реакционной смеси или сайт-направленного мутагенеза дефектный по каталитической функции белок T7E1. Такой дефектный T7E1 способен узнавать и связываться с неспаренными нуклеотидами гетеродуплексной ДНК с прежней специфичностью, но последующего расщепления мисмэтча происходить не будет. К каталитически неактивному белку путём иммунизации будут получены кроличьи антитела, с которыми будут взаимодействовать вторичные антикроличьи антитела, меченные стрептавидином и магнитными частицами, несущими биотинную метку. В результате, полученный белковый комплекс будет способен присоединяться к гетеродуплексам ДНК, содержащим мисмэтчи, и не разрушать их, а благодаря магнитным частицам данный ДНК-белковый комплекс возможно без труда отделить от остальной массы дуплексных молекул с целью дальнейшего секвенирования конкретных фрагментов ДНК. Такой подход будет особенно ценен при изучении однонуклеотидного полиморфизма ДНК близнецов.

Окислительный стресс в клеточной модели пиелонефрита *in vitro***Моросанова М.А.**

Студент

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: mawula@gmail.com*

В основе патогенеза острого и хронического пиелонефрита лежит бактериальная инфекции почки и мочевыводящих путей. Однако, само повреждение почечной ткани в значительной мере происходит в результате избыточной активации воспалительного ответа иммунных клеток, а не только токсического действия самих бактерий. При этом под воздействием активных форм кислорода (АФК), продуцируемых нейтрофилами и моноцитами, в почечных клетках развивается окислительный стресс, что приводит к их гибели и разрушению ткани.

Для изучения механизмов развития окислительного стресса в клетках почки нами была разработана клеточная модель пиелонефрита *in vitro*. При этом клетки канальцевого эпителия почки крысы культивируют совместно с периферическими лейкоцитами крови, активированными бактериальной суспензией *E.coli* (бактерии инактивированы автоклавированием).

Генерация АФК в клетках почки измерялась через 1,5 и 24 часа с помощью окрашивания специфическим флуоресцентным зондом DCF, с последующим наблюдением за АФК-опосредованной флуоресценцией зонда с помощью конфокального микроскопа. Было показано, что при добавлении инактивированных бактерий генерация АФК в клетках почки после 24 часов совместного культивирования с лейкоцитами увеличивается в 3 раза по сравнению с контролем.

Кроме того, на данной модели было исследовано влияние различных веществ, в частности антиоксидантов, на развитие окислительного стресса. Для защиты почечных клеток от окислительного стресса использовались антиоксиданты Trolox, SkQ1, и ингибитор открытия митохондриальной неспецифической поры LiCl (совместное культивирование проходило в среде, содержащей эти вещества). Для антиоксиданта SkQ1 показано снижение уровня флуоресценции DCF практически для уровня контроля (после 24 часов сокультивирования). Для LiCl и антиоксиданта Trolox уровень флуоресценции снизился до значений, несколько меньших контрольного.

Таким образом, предложена клеточная модель пиелонефрита *in vitro*, которая может использоваться для тестирования потенциальных лекарственных препаратов. В данной работе мы показали развитие окислительного стресса в клетках почки при взаимодействии с активированными лейкоцитами и защитное действие ионов лития и антиоксидантов Trolox и SkQ1.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-01667, 09-04-00135 и Центром Митоинженерии МГУ.

Метанол как стрессовый медиатор растений**Поздышев Д.В.**

студент

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: denispoz@gmail.com*

В настоящее время биологическая роль метилового спирта в растении остаётся неясной. Основным источником метанола в растительной клетке является деэстерификация пектина ферментом пектинметилэстеразой (ПМЭ). Как было показано в нашей лаборатории, уровень экспрессии этого фермента, а также количество выделяемого метанола повышается при различных стрессах, в частности при механическом повреждении, вирусной инфекции или введении трансгена. Эти факты позволили предположить, что метанол участвует в механизмах защиты растения от вирусного и, возможно, бактериального или грибного заражения. Роль метанола в реакции на подобные стрессы показана нами экспериментально – обработка листьев растения нетоксичными концентрациями метилового спирта повышает его устойчивость к вирусной инфекции, а также снижает эффективность экспрессии трансгенов. Дальнейшие исследования выявили некоторые причины этого явления. Во-первых, это повышение активности посттранскрипционного умолкания генов, во-вторых, подавление импорта белков в ядро, и, в-третьих, изменение паттерна экспрессии белков. Последний факт был получен с помощью метода вычитающей гибридизации.

Этот метод, основанный на подавлении ПЦР за счет инвертированных концевых повторов, позволяет сравнить РНК двух образцов: листа, обработанного метанолом, и контрольного листа *N. bentamiana*. Белки, экспрессия генов которых при воздействии метанола возрастает наиболее значимо: ингибитор протеиназ II, бета-1,3-глюконаза (разные изоформы), белок EIG-J7, индуцируемый элиситорами, белок защиты от патогенных грибов СВР 20, адометионин-декарбоксилаза, индуцируемая бактериями или грибами пероксидаза. Примечательно, что некоторые из этих белков участвуют в противобактериальной защите растения. Также повышена активность генов регуляторных (гомолог кальценурина, калеозин, предположительная металлофосфатаза, гомолог фосфатазы С2), транспортных (плазмодесмальный транспортёр PDR40-2) и других белков. Значительно снижается экспрессия генов некоторых белков, в частности динеина и неспецифических липидных транспортеров. В настоящее время выделены гены ингибитора протеиназ II и плазмодесмального транспортера. Их промоторные последовательности изучаются на предмет индукции метанолом.

Экспрессия промотора фитохелатинсинтазы риса и псевдофитохелатинового гена в трансгенных растениях табака**Постригань Б.Н.***Младший научный сотрудник**Государственное учреждение Российской академии наук институт биохимии и генетики УНЦ РАН**E-mail: postrigan@bk.ru*

Многие тяжелые металлы являются опасными экотоксикантами, тормозящими, с одной стороны, рост самих растений, а с другой - при попадании в пищевые цепи оказывающими вредное воздействие на человеческий организм. Это вызывает повышенный практический интерес к созданию, в том числе методами генетической инженерии, растений-гипераккумуляторов тяжелых металлов, способных накапливать в своей биомассе значительные количества таких металлов, выводя их из почвы.

Растения связывают тяжелые металлы различными путями, наиболее специфичным из которых является связывание (хелатирование) при помощи специальных пептидов, называемых фитохелатинами. Согласно литературным данным, фермент, при помощи которого происходит синтез фитохелатинов (фитохелатинсинтаза) кодируется геном, экспрессия которого индуцируется действием тяжелых металлов и главным образом кадмия. Однако промоторная область данного гена изучена пока недостаточно и не выявлены регуляторные элементы, поэтому было интересно изучить экспрессионную активность промотора фитохелатинсинтазы, оцениваемой по такому удобному репортерному белку как глюкоуридаза в трансгенных по нему растениях в гетерологичной системе транскрипции.

Одной из целей данной работы являлось изучение экспрессионной активности клонированной нами промоторной области гена фитохелатинсинтазы риса размером 900 п.н., которую несли ранее созданные генно-инженерные конструкции на основе бинарного вектора pCAMBIA 1291Z с репортерным геном GUS, помещенным под контроль промотора гена фитохелатинсинтазы риса, в получен ряд трансгенных растений табака. Проводилась визуальная гистохимическая оценка экспрессии промотора и количественные спектрофотометрические и флюорометрические измерения, которые показали индуцибельный характер работы промотора фитохелатинсинтазы риса в трансгенных растениях табака и уверенную промоторную активность на различных концентрациях индуктора в случае принципиального наличия таковой для данной генетической системы.

Другой частью работы явилось конструирование и исследование экспрессии синтетического псевдофитохелатинового гена. Первоначально выбор был нами остановлен на варианте псевдофитохелатина со следующей последовательностью аминокислот-*Met(GluCys)₆Gly* и была воссоздана его нуклеотидная последовательность. Затем данную синтетическую конструкцию клонировали в бинарный вектор pCAMBIA1305.1. В этом векторе экспрессия псевдофитохелатинового гена проходила под управлением 35S промотора. Затем был проведен эксперимент по оценке экспрессии псевдофитохелатинового гена в растениях табака, выращивая их листовые пластинки на среде, содержащей различные концентрации кадмия. Была произведена оценка реакции растений на сам псевдофитохелатин в виде пептида, выживаемость растений в условиях жесткого и экстремального металлического стресса, особенности их роста и развития при этом, и возможность в перспективе использования таких растений для фиторемедиации загрязненных территорий.

Литература

1. Cobbett C.S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification // *Current Opinion Plant Biology*. 2000. V. 3. P. 211-216.
2. Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases // *J. Plant Physiol*. 2006. V.163. P. 319-332

Изучение иммунохимических и цитотоксических свойств вискумина, инкапсулированного в полилактидную матрицу с помощью сверхкритического диоксида углерода

Рамонова А. А., Ханчаев Ш. Ю.

Аспирант, молодой учёный

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

E-mail: lalula@yandex.ru

Вискумин (Mistletoe lectin или MLI) и его изоформы MLII и MLIII, содержащиеся в экстрактах из листьев растения *Viscum album L.* (Омела Белая), уже более двадцати лет используют при терапии онкологических заболеваний, а также в качестве иммуномодулирующих препаратов. Вискумин относится к группе рибосом-инактивирующих белков II типа (РИБ II). Он состоит из А- и В-субъединиц, связанных дисульфидной связью. Молекулярная масса вискумина - 60 кДа. Помимо экстрактов в качестве биологически-активного агента могут использоваться и очищенные белки. Использование инкапсулированного вискумина может быть более эффективным вследствие пролонгированного выхода из матрицы и длительного действия токсина на опухолевые клетки. В качестве матрицы был использован полилактид – полимер гомологического ряда алифатических полиэфиров. Биодegradация полимерной микрочастицы (или матрицы) приводит к постепенному высвобождению лекарственного препарата. Однако получения инкапсулированных в полимерные матрицы биоактивных веществ традиционными методами (использование органических растворителей, либо высоких температур) может приводить к снижению активности лекарственных препаратов или даже к изменению их свойств. Метод «сухой» сверхкритической флюидной инкапсуляции может быть успешно применен для включения белков в полимерную матрицу без потери ими физико-химических и биологических свойств.

Нами были изучены физико-химических и биологических свойств вискумина, включенного в биорезорбируемую полилактидную матрицу методом «сухой» сверхкритической флюидной инкапсуляции. После высвобождения вискумина из матрицы изучены иммунохимические и цитотоксические свойства данного токсина. Было проведено исследование кинетики выхода вискумина из полилактидной матрицы. В качестве контролей были взяты растворы 1) чистого полилактида, 2) лиофилизованного вискумина и 3) вискумина, не подвергавшегося лиофилизации. Количество вискумина, высвободившегося при деградации полилактида, определяли с помощью тест-системы на основе моноклональных антител MNA4 и MNA9-bi. По результатам твердофазного иммуноферментного анализа через 120 часов высвободилось 6,75 % от первоначально инкапсулированного токсина. Оценка цитотоксических свойств вискумина после его выхода из полилактидной матрицы, показала, что цитотоксическая активность вискумина, выявленного в анализируемых образцах, остается практически такой же по сравнению с токсином, не подвергавшимся дополнительной обработке.

Таким образом, инкапсуляция вискумина в полилактидную матрицу практически не повлияла на его свойства. Использование вискумина в качестве цитотоксического агента, икапсулированного в полилактидную матрицу, является достаточно перспективным. В чистом виде вискумин уже используется в качестве лекарственного средства при терапии опухолей. Использование инкапсулированного токсина может быть более эффективно, вследствие постепенного высвобождения малых количеств цитотоксического агента, воздействующих на опухолевые клетки.

Исследования механизма активации опухолевого супрессора p53 при ингибировании III комплекса дыхательной цепи митохондрий**Рудько В.В.**

Студент

Хуторненко А.А.

Аспирант

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: vovka-chem@bk.ru*

Опухолевый супрессор p53 — это ключевой регуляторный белок клетки, который активируется в ответ на различные стрессовые воздействия. Митохондрии играют двоякую роль — как «энергетические станции» клетки и как медиаторы ряда регуляторных путей, включая индукцию апоптоза. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что ингибирование III комплекса дыхательной цепи митохондрий (ДЦМ) приводит к значительному возрастанию внутриклеточного уровня и активности белка p53. В то же время, ингибирование комплексов I или IV влияния на опухолевый супрессор p53 не оказывало. На выяснение механизма этого явления и направлена данная работа.

Один из ферментов биосинтеза пиримидинов в клетке — это дигидрооротат дегидрогеназа (ДГОДГ), белок, встроенный во внутреннюю митохондриальную мембрану. Его функционирование сопряжено с III комплексом ДЦМ через убихинон, акцептирующий электроны при окислении дигидрооротата. Мы предположили, что активация опухолевого супрессора p53 при ингибировании III комплекса ДЦМ связана с нарушениями пути биосинтеза пиримидинов. Для проверки этой гипотезы исследовали влияние уридина, а также оротата и дигидрооротата (продукта и субстрата реакции, катализируемой ДГОДГ) на внутриклеточный уровень и активность белка p53 при действии ингибиторов III комплекса ДЦМ миксотиазола, стигмателлина и антимицина А в клетках рака шейки матки человека линии HeLa. Оказалось, что уридин и оротат препятствуют активации p53 под действием этих ингибиторов, а дигидрооротат существенного влияния не оказывает. Следовательно, наиболее вероятная причина активации p53 — это нарушение работы ДГОДГ. Этот вывод был подтвержден тем, что другой известный ингибитор биосинтеза пиримидинов, N-(фосфонацетил)-L-аспартат стимулировал повышение внутриклеточного уровня белка p53 в той же степени, что и ингибитор III комплекса ДЦМ миксотиазол.

Ингибирование биосинтеза пиримидинов *de novo* может приводить к нарушениям репликации ДНК, то есть, к генотоксическому стрессу. Активация p53 при генотоксическом стрессе обычно сопровождается пост-трансляционными модификациями этого белка, причем ключевой модификацией является фосфорилирование белка p53 по остатку Ser15. Мы показали, что при обработке клеток рака толстой кишки человека RKO миксотиазолом возрастание внутриклеточного уровня p53 не коррелирует с его фосфорилированием по остатку Ser15. Следовательно, маловероятно, что генотоксический стресс является причиной активации p53. Более вероятной причиной активации p53 представляется «транскрипционный стресс», возникающий при нарушении синтеза РНК. Исследование механизма этого явления продолжается.

Характеристика мутантов пенициллинацилазы из *E. coli* для получения энантиомеров эфиров α - и β -аминокислот

Седяров В.О.¹

Студент

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: sedlyarov@gmail.com

Одним из наиболее эффективным способом получения энантиомерно чистых первичных аминокислот является интегральный биокаталитический метод, основанный на двух стереоселективных реакциях, катализируемых пенициллинацилазой в водной среде: исчерпывающего ацилирования активного энантиомера из рацемата аминокислоты и, после отделения, его последующего деацилирования².

В настоящей работе исследована возможность применения мутантов β F71L и α R145L ПА из *E. coli* для расщепления энантиомеров аминокислот на примере α - и β -фенилаланина вышеуказанным методом.

С этой целью были очищены и охарактеризованы каталитические свойства мутантных препаратов фермента. В частности, была определена специфичность в реакции гидролиза синтетического цветного субстрата для мутантов и дикого типа фермента. Были охарактеризованы стереоселективность и нуклеофильная реакционная способность (соотношение скоростей синтеза/гидролиза) в реакции ацильного переноса амидов R- и S-миндальных кислот на рацемат этилового эфира α - и β -фенилаланина. При использовании мутантного фермента β F71L в ацильном переносе с R- и S-миндального амида на β -фенилаланин соотношение скоростей синтеза/гидролиза выше в 10 раз. На основании «минимальной» кинетической схемы реакции с учетом полученных кинетических параметров была построена математическая модель протекания стереоселективного превращения. Определены условия возможного препаративного расщепления энантиомеров.

Следует отметить, что различие в каталитических свойствах мутантных форм и дикого фермента удастся объяснить на качественном уровне методом молекулярного докинга.

1 Автор выражает признательность к.х.н. Гуранде Д.Т. за помощь в выполнении работы.

2 Guranda D.T., Khimiuk A.I., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2004**, *15*, 2901-2906.

Митохондриальная составляющая токсичности мутагена метилметансульфоната**Сорокин М.И.**

Студент

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: sorokin.maks@gmail.com*

Метилирующий агент метилметансульфонат (ММС) обладает по крайней мере двумя ярко выраженными эффектами на клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Инкубация с ММС вызывает повреждение геномной ДНК, а также приводит к увеличению концентрации активных форм кислорода (АФК), основным источником образования которых в клетке является митохондрия. Таким образом, возможны две причины токсичности ММС: повреждение, вызванное АФК, и непосредственное повреждение генетического материала ММС.

Наши данные, с одной стороны, указывают на ДНК как ключевую мишень ММС. В пользу этого свидетельствуют: (1) повышенная смертность под действием ММС клеток *Saccharomyces cerevisiae*, синхронизованных гидроксимочевинной в S стадии клеточного цикла, относительно асинхронной культуры клеток, (2) повышенная выживаемость под действием ММС клеток *Saccharomyces cerevisiae*, синхронизованных в G2/M стадии клеточного цикла нокодазолом, относительно асинхронной культуры клеток. С другой стороны, литературные данные о синтетической летальности делеций генов супероксиддисмутазы и репарирующих ферментов свидетельствуют в пользу митохондриальной составляющей токсичности ММС. Кроме того, мы показали, что митохондриальный агент додецилтрифенилфосфоний повышает выживаемость инкубированных с ММС клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Таким образом, можно предложить модель гибели клеток *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии ММС: АФК, образуемые митохондриями, в первую очередь повреждают одонитевую ДНК, которая в больших количествах появляется из-за непосредственно мутагенного действия ММС.

Литература

1. Rowe LA, Degtyareva N, Doetsch PW. (2008) DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med*.
2. Chlebowicz E., W.J. Jachymczyk (1979) Repair of MMS-Induced DNA double-strand breaks in haploid cells of *Saccharomyces Cerevisiae*, which requires the presence of a duplicate genome. *Molec. Gen. Genet*.
3. Doudican NA et al. (2005) Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*.

Упаковка спиралей в димере трансмембранного домена FGFR3. Влияние мутаций на структуру димера.**Фахрутдинова Г.Н.^{1,2}, Волынский П.Е.²***Студентка, к.ф.-м.н.*¹*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*²*Институт биоорганической химии им. Академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Россия**E-mail: gulya17m@yandex.ru*

Тирозинкиназные рецепторы (РТК) играют ведущую роль в процессах роста, развития и дифференцировки клеток. Все РТК обладают сходным пространственным строением: они состоят из лиганд-связывающего внеклеточного домена, α -спирального трансмембранного фрагмента (ТМС) и цитоплазматического киназного домена. Для передачи сигнала посредством РТК необходима димеризация рецептора, опосредованная связыванием лиганда. Нередко мутации приводят к изменению уровня димеризации и, таким образом, являются причиной различных заболеваний. Недавно показано, что в активации РТК большую роль играет также взаимодействие ТМС рецепторов. Их взаимодействие дополнительно стабилизирует структуру димера РТК, а также отвечает за правильное относительное расположение киназных доменов рецепторов. Более того, в ряде случаев показано, что мутации в ТМС приводят к неправильной работе рецепторов. Таким образом, исследование структурно-динамических характеристик димеров ТМС необходимо для понимания механизма функционирования РТК.

В настоящей работе такие параметры изучены для димера ТМС рецептора FGFR3 дикого типа, а также двух его мутантных форм (G380R и A391E), приводящих к костным дисплазиям. На первом этапе методом Монте-Карло было исследовано конформационное пространство димера в присутствии неявнозаданной мембраны. Было получено пять моделей конформации для дикого типа и ряд моделей для мутантных димеров. Для оценки динамических характеристик предложенных моделей, а также для релаксации структуры в явно заданном окружении проведен расчет молекулярной динамики (МД) моделей димера в бислое ДМФХ. Анализ результатов МД позволил отобрать две наиболее устойчивые структурные модели димера.

Для исследования влияния мутаций на димеризацию ТМС для них также были проведены расчеты согласно описанному протоколу. Обнаружено, что мутации слабо влияют на общую структуру димеров – модели, полученные по результатам МК поиска, сходны с моделями из ТМС дикого типа. Однако релаксация димеров в явно заданном бислое позволила выявить существенные отличия. В обеих моделях замены приводят к смещению положения димера относительно плоскости мембраны. Это может влиять на взаимное положение киназных доменов и таким образом, объяснить причину заболеваний, вызываемых данными мутациями.

Каспаза-1 ограничивает скорость распространения потивируса в растениях**Федосеева С.В.**

Аспирант

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: svetlana.fedoseeva@gmail.com*

У растений недавно были обнаружены каспазо-подобные протеазы – протеолитические ферменты, обладающие специфичностью и избирательностью каспаз животных и играющие существенную роль в реализации запрограммированной клеточной смерти у растений. Мы обнаружили, что одним из белков-мишеней каспазо-подобной протеазы растений (далее – каспазы-1) является капсидный белок вируса А картофеля – растительного патогена. Каспаза-1 вносит единичный разрыв в молекулу капсидного белка *in vitro*. Мы заинтересовались, имеет ли значение для развития вирусного заражения тот факт, что капсидный белок вируса может гидролизироваться каспазой-1 растений.

На первом этапе работы мы сконструировали мутантный капсидный белок, не способный расщепляться растительной каспазой-1 благодаря одной аминокислотной замене в сайте гидролиза. На основе этого белка был получен жизнеспособный мутантный вирус PVA. Мы сравнили эффективность распространения вирусного заражения в соседние клетки (ближнего транспорта) для вируса дикого типа и мутантного вируса. Эксперименты проводили на растениях *Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana tabacum*, и в обоих случаях было выявлено, что мутантный вирус PVA, капсидный белок которого устойчив к действию каспазы, распространяется по растению более эффективно, чем вирус дикого типа.

Чтобы удостовериться, что такие различия в поведении вируса дикого типа и мутанта обусловлены именно действием каспазы, следующим шагом мы суперпродуцировали каспазу-1 табака в *N.benthamiana*, одновременно осуществив вирусное заражение тех же самых растений. Оказалось, что в случае вируса дикого типа суперпродукция каспазы-1 привела к снижению скорости распространения вирусного заражения на ближние расстояния. При этом вирус PVA с мутантным (каспазоустойчивым) капсидным белком не показал значимых изменений в ходе развития вирусного заражения.

Следующим этапом стало исследование развития вирусного заражения в трансгенных растениях *N.benthamiana*, в которых активность каспазы-1 снижена путем РНК-интерференции. Выяснилось, что и в этом случае мутантный вирус оказался нечувствительным к изменению уровня активности каспазы. Для вируса PVA дикого типа, напротив, уменьшение каспазной активности в листьях растения-хозяина привело к более высокой скорости ближнего транспорта, сравнимой со скоростью распространения вируса PVA с мутацией в капсидном белке.

Таким образом, наблюдаются различия как в скорости распространения по растению-хозяину вируса PVA дикого типа и мутанта, так и в распространении вирусного заражения в зависимости от активности каспазы-1 в листьях растения. Мутантный вирус с устойчивым к действию каспазы капсидным белком к уровню активности каспазы нечувствителен. В то же время, для вируса PVA дикого типа прослеживается следующая зависимость: чем выше активность каспазы-1 в листьях растения-хозяина, тем медленнее происходит распространение вирусной инфекции в соседние клетки; чем ниже активность каспазы-1, тем эффективнее распространение вирусного заражения.

Полученные данные указывают на то, что расщепление капсидного белка вируса PVA каспазой-1 растений является частью механизма, ограничивающего распространение вирусной инфекции по растению.

Работа поддержана грантом РФФИ №08-04-00313.

Количественные параметры регуляции экспрессии стрептомицинового оперона**Хайруллина Г.А.**

Студентка

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия**E-mail: Guzel.Khairullina@gmail.com*

Общее количество рибосом составляет примерно 30–40% от массы клетки. И для образования этих структур клетка тратит соответствующее количество ресурсов. Рибосома представляет собой сложную структуру, состоящую из трех рРНК и более 50 белков. Гены рибосомных белков собраны в опероны, которые транскрибируются в виде полицистронной матрицы – оперона. Регулирование трансляции такого оперона является чрезвычайно сложным процессом, до сих пор не до конца изученным.

Данная работа посвящена регуляции синтеза рибосомных белков с полицистронной матрицы на примере стрептомицинового оперона. Стрептомициновый оперон состоит из четырех генов: *grsL* (кодирует белок S12), *grsG* (кодирует белок S7), *fusA* (кодирует фактор элонгации EF-G), *tufA* (кодирует фактор элонгации EF-Tu). Регуляция стрептомицинового оперона – достаточно сложный процесс. Известно, что четыре гена – *grsL*, *grsG*, *fusA* и *tufA* котранскрибируются и продукт второго гена – рибосомный белок S7 выступает в роли репрессора трансляции и регулирует свой собственный синтез и белка S12. Как предполагается, S7 взаимодействует с участком мРНК, находящимся между генами S12 и S7. Но механизм регуляции трансляции белка S12 рибосомным белком S7 до сих пор остается до конца не выявленным.

Целью работы является выявить эффект экспрессии белка S7 на уровень стабильности различных участков стрептомицинового оперона.

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени было показано, что при трансформации клеток *E. coli* плазмидой, содержащей гены вышеперечисленных рибосомных белков, количество ДНК матрицы для этих белков возрастает в несколько десятков раз. Для РНК копий генов рибосомного белка было выявлено следующее: на стадии экспоненциального роста клеток кишечной палочки количество РНК-матрицы белка S7 цистрона в несколько раз выше, чем на стадии стационарного роста. Этот факт объясняется активной пролиферацией клеток, и соответственно, необходимостью создания большого количества рибосом. Клетки *E. coli* были трансформированы плазмидой, содержащей гены белков S7, S12 и EF-G, под регулируемым промотором. На этих клетках было показано четырехкратное увеличение количества копий РНК гена белка S7 и стократное увеличение количества РНК-матрицы этого белка при индукции синтеза с плазмиды.

Работа поддержана грантом РФФИ-а №07-04-01034-4.

Анализ профилей генной экспрессии и возможные источники ошибок**Хлопова Н.С.¹**

Студентка

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Зооинженерный факультет, Москва, Россия**E-mail: hns86@mail.ru*

Использование технологии ДНК микроматриц (ДНК биочипов) позволяет одновременно осуществлять мониторинг нуклеотидных последовательностей большого количества генов, оценивать активность их транскрипции (профили генной экспрессии), с последующим выявлением генов и контролируемых ими метаболических путей, изменение работы которых может быть тесно связаны с формированием различных фенотипических характеристик. Несмотря на широкую распространенность, использования ДНК биочипов для анализа профилей генной экспрессии, метод имеет ряд недостатков, которые могут приводить к ошибочным результатам их анализа. Одной из причин ошибок может быть присутствие в мРНК разных генов гомологичных нуклеотидных последовательностей. В этом случае с одной и той же пробой ДНК на ДНК микроматрице может происходить гибридизация кДНК мРНК разных генов. Для того, чтобы оценить такую возможность, в настоящей работе выполнен сравнительный анализ различий в интенсивности сигналов гибридизации с пробами ДНК микроматриц, комплементарными к разным кодирующим последовательностям одних и тех же генов. Работа проводилась под руководством проф. С. Фаренкруг (Университет Миннесота, США). На ДНК микроматрицах в качестве проб присутствовали олигонуклеотиды длиной в 70 пар оснований, комплементарные к белок кодирующим последовательностям геномной ДНК свиней. Суммарную РНК выделяли из печени и почек 4-х животных, для каждого образца отдельно получали кДНК в РТ-ПЦР. Используя кДНК, меченную флюоресцентными красителями (Cy5 и Cy3), выполняли гибридизацию на ДНК микроматрицах. Суммарно среди 600 наиболее интенсивных сигналов гибридизации кДНК зрелых мРНК печени выделено 12 генов, для которых в ДНК микроматрицах присутствовало более чем одна проба. В результате сравнения интенсивности гибридизации разных участков кДНК одного и того же гена с пробами ДНК микроматриц выделились две группы генов. Первая - с наименьшими различиями между интенсивностью сигнала гибридизации различных участков кДНК одной и той же мРНК (до 4500 условных единиц свечения), в неё вошли: предшественник апополипротеина А-II, предшественник альфа-цепи С4b-связывающего белка (С4bp), бета-изоформа дермокина, глутатион-S-трансфераза А5-5, глутатион-S-трансфераза Му 2. Вторая группа, с наибольшими различиями (более 10000 условных единиц свечения) была представлена двумя генами – предшественник альфа-1-антихемотрипсина (АСТ) и предшественник альфа-цепи фибриногена. Наблюдаемые отличия воспроизводились в независимых экспериментах у всех исследованных животных.

Среди профилей генной экспрессии в почках выделено 7 генов, имеющих 2 и более проб на ДНК микроматрице. По разнице в условных единицах свечения в первую группу с наименьшими различиями вошли гены *fis* (FLJ12547) и *p23* (TCTP). Группа генов, внутренние участки гибридизации которых отличались более чем на 10000 условных единиц свечения, состояла из генов, кодирующих АТФ синтазу α цепи, предшественник хромогранина А (CgA), убиквитин.

Можно ожидать, что одна из причин отличий в интенсивности гибридизации разных участков кДНК одного и того же транскрипта обусловлена перекрестной гибридизацией. Очевидно, что это может быть источником существенных ошибок при выявлении «критических» генов органоспецифичного транскриптома.

1 Автор выражает признательность профессору, д.с.-х.н. Глазко Т.Т. за помощь в подготовке тезисов.

Получение безмаркерных трансгенных растений-продуцентов поверхностного антигена вируса гепатита В
Чеботарева Е.Н.¹

Аспирант

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пуцино, Россия
E-mail: elena-cheb@yandex.ru

Для отбора трансгенных растений традиционно используют селективные гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам или гены-репортеры. Используемые в настоящее время коммерческие трансгенные растения с устойчивостью к вредителям и гербицидам представляют существенную потенциальную биологическую и экологическую опасность, связанную с их негативным влиянием на полезные организмы агробиоценозов. В связи с этим остро стоит проблема разработки методов получения трансгенных растений нового поколения без “генетического мусора”, к которому относятся селективные гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам и другие маркерные гены.

Целью настоящей работы явилось получение трансгенных растений, экспрессирующих ген поверхностного антигена вируса гепатита В, без применения маркерных селективных генов.

Нами сконструирована плазида рВМ, не содержащая маркерных генов для отбора трансгенных растений. В эту плазмиду встроили ген поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) под контролем двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты. Полученную плазмиду рВМ-Ag перенесли в штамм *A. tumefaciens* LBA4404 (рAL4404), который использовали для трансформации листовых эксплантов табака и семян табака и томата.

Получено несколько линий растений табака и томата, синтезирующих HBsAg на уровне до 0.05% от общего растворимого белка. Метод трансформации семян оказался экономичным по времени отбора трансформантов и позволил нам повысить частоту агробактериальной трансформации до 15-20%.

Достигнутый уровень синтеза HBs-антигена в клетках томата достаточен для проведения доклинических испытаний полученных растений в качестве безопасной “съедобной” вакцины нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека», а также грантов РФФИ № 08-08-00328, 08-08-90014.

¹ Автор выражает признательность д.б.н. Рукавцовой Е.Б. за помощь в работе и подготовке тезисов.