



10 YEARS OF COLLABORATION
OF RUSSIAN SCIENTISTS WITH GEORGE MASON UNIVERSITY
FAIRFAX VA (2002-2012)

16 ЯНВАРЯ 2012
МОСКВА
ИОГЕН РАН

**СПИСОК РОССИЙСКИХ ОРГАНИЗАЦИЙ, УЧАВСТВОВАВШИХ В
СОВМЕСТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ С GEORGE MASON UNIVERSITY, USA
(2002-2012)**

Институт Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Медико-Генетический Научный Центр РАМН, Москва

Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН,
Новосибирск

Биомедицинский Центр, Санкт-Петербург

РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, , Москва

ГНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов, , Москва

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Москва

Институт Цитологии, Санкт-Петербург

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (ИМБ РАН), Москва

НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАМН, Москва

Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича, Москва

Пензенский Государственный Университет Архитектуры и Строительства,
Пенза

Организационный комитет:

Анча Баранова (George Mason University, Fairfax, USA, а также Медико-
Генетический Научный Центр РАМН, Москва)

Сергей Брускин (ИОГен РАН)

Виктория Скобеева (МГУ им. М.В. Ломоносова)

Sponsored by



PLENARY

Chair: Dr. Nick YANKOVSKY

- 10:00 Nick YANKOVSKY "An introduction to the history of the research collaboration"
Янковский Николай Казимирович ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО
- 10:10 Valery SOYFER
Сойфер Валерий Николаевич ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО
- 10:20 Valentin VLASOV "The current works and the future plans in tumor biomarker research"
Власов Валентин Викторович «Работы и планы ИХБФМ СО РАН по поиску маркеров раковых заболеваний»
- 10:50 Andrey KOZLOV "The novel biological phenomenon – expression of evolutionarily new genes in tumors"
Козлов Андрей Петрович «Обнаружение нового биологического феномена – экспрессии эволюционно новых генов в опухолях».
- 11:20 Ancha BARANOVA "Genome and transcriptome features of the malignant cell: Bird's view"
Баранова Анча «Общая картина генома и транскриптома в опухолях человека»
- 11:50 Valery GLAZKO "Biomarkers of the genetic adaptation to the ecological stress in mammalian populations"
Глазко Валерий Иванович «Биомаркеры популяционно-генетической адаптации к действию экологического стресса у млекопитающих»
- 12:20 COFFEE BREAK - THE BEST TIME TO SET NEW COLLABORATIONS

SESSION 1

Chair: Dr. Valentin VLASOV

- 12:50 Maria LAGARKOVA/Sergey KISELEV "Biomarkers for somatic cells reprogramming"
Лагарькова Мария/Киселев Сергей «Биомаркеры репрограммирования соматических клеток»
- 13:10 Alexander MEZENTSEV/Sergey BRUSKIN "Genetic markers and molecular mechanism of psoriasis"
Мезенцев Александр/Брускин Сергей «Генетические маркеры и молекулярный механизм псориаза»
- 13:30 Pavel LAKTIONOV "Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid: general overview, advantages and limitations as a source of oncomarkers"
Лактионов Павел Петрович «Циркулирующие нуклеиновые кислоты крови: общие сведения, преимущества и недостатки использования циркунк для онкодиагностики»
- 13:50 Natalya VEYKO "Extracellular DNA participates in the bystander effect in mesenchymal stem cells"
Вейко Наталья Николаевна «Особенности развития эффекта свидетеля с участием внеклеточной ДНК в мезенхимных стволовых клетках»

- 14:10 Svetlana TAMKOVICH "Aberrantly methylated DNA as circulating DNA-oncomarker"
Тамкович Светлана Николаевна «Циркулирующие в крови aberrантно метилированные ДНК – удобные ДНК-онкомеркеры»
- 14:30 Vladislav MILEYKO "Longitudinal studies of prospective DNA-oncomarkers"
Милейко Владислав Айкович «Информационно-техническое обеспечение долгосрочных исследований потенциальных ДНК-онкомаркеров»
- 14:50 Maria GRACHEVA "454 Next Generation Sequencing In Oncological Markers Research"
Грачева Мария «Секвенирование нового поколения 454 в исследованиях онкомаркеров»
- 15:10 COFFEE BREAK - THE BEST TIME TO SET NEW COLLABORATIONS



SESSION 2 Chair: Dr. Ancha BARANOVA

- 15:30 Fyodor KISELEV/Olga DONTSOVA «Telomerase activity and expression of its gene as biomarker for early stage cervical carcinoma»
Киселев Федор Львович/Донцова Ольга Анатольевна «Экспрессия теломеразной активности как маркер ранних стадий прогрессии рака шейки матки»
- 15:50 Mikhail SKOBLOV "Searching for and studying human antisense transcripts"
Скоблов Михаил Юрьевич «Поиск и исследование антисмысловых транскриптов человека»
- 16:10 Tatiana GLAZKO "Early markers of cytogenetic anomalies in the interphase nuclei"
Глазко Татьяна Теодоровна «Предшественники цитогенетических аномалий в структуре интерфазного ядра»
- 16:30 Yuri SKOBLOV "HSV-1 Thymidine kinase: marker, instrument, model"
Скоблов Юрий Самойлович «Тимидинкиназа вируса герпеса: маркер, инструмент, модель»
- 16:50 Andrey MARAKHONOV «Family of KCTD proteins: A comparative study of structure and function»
Марахонов Андрей «Взаимоотношения между структурой и функцией на примере белков семейства KCTD»
- 17:10 Ilya MANUKHOV "Lux-biosensors for the detection of the Type I quorum system signal molecules»
Манухов Илья Владимирович «Lux-биосенсоры для детекции сигнальных молекул систем "Quorum sensing" первого типа»
- 17:30 Valery DANILENKO
Даниленко Валерий Николаевич
- 17:30 Vikas CHANDHOKE

FINAL REMARKS
ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ СЛОВО

FINAL REMARKS
ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ СЛОВО

The current works and the future plans in tumor biomarker research

Valentin Viktorovich VLASOV

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences

Работы и планы ИХБФМ СО РАН по поиску маркеров раковых заболеваний

В. В. Власов

ИХБФМ СО РАН, Новосибирск

В настоящее время в институте ведутся исследования по следующим направлениям:

- исследование внеклеточных микровезикул и нуклеопротеидных комплексов с целью идентификации переносимых ими нуклеиновых кислот, потенциальных онкомаркеров
- поиск белков, принимающих участие в связывании циркулирующих ДНК с поверхностью клеток крови и являющихся потенциальными маркерами рака молочной железы.
- поиск белковых маркеров плоскоклеточного рака легких
- исследование возможности анализа профиля экспрессии набора специфических генов для оценки эффективности химиотерапии и прогноза течения немелкоклеточного рака легких

В 2012 г. будут начаты работы по метагеномному исследованию микроорганизмов, заселяющих желудочно-кишечный тракт онкологических больных.

The novel biological phenomenon – expression of evolutionarily new genes in tumors

Andrey Petrovich KOZLOV

The Biomedical Center, St. Petersburg

Обнаружение нового биологического феномена – экспрессии эволюционно новых генов в опухолях

А.П. Козлов

Биомедицинский центр, Санкт-Петербург

В течение ряда лет мы разрабатываем концепцию возможной эволюционной роли опухолей. Согласно этой концепции, опухоли являются источником избыточных клеточных масс, которые используются в эволюции многоклеточных организмов для экспрессии эволюционно новых генов. Это ведет к происхождению новых типов клеток, тканей и органов.

Нетривиальным предсказанием концепции положительной эволюционной роли опухолей является предсказание об экспрессии в опухолях эволюционно новых генов. Мы предприняли попытку экспериментальной проверки данного предсказания, используя два взаимно дополнительных подхода. В рамках первого подхода исследовалась эволюционная новизна опухолеспецифических последовательностей. В рамках второго подхода изучалась опухолеспецифичность эволюционно новых генов. Полученные результаты подтверждают предсказание об экспрессии в опухолях эволюционно новых генов.

Genome and transcriptome features of the malignant cell: Bird's view

Ancha BARANOVA

*School of Systems Biology, College of Science, George Mason University, Fairfax, VA USA
The Research Centre of Medical Genetics RAMS, Moscow, Russia*

Общая картина генома и транскриптома в опухолях человека

А.В. Баранова

МГНЦ РАМН, Москва

Школа Системной Биологии, Университет имени Джорджа Мейсона, США

Процесс трансформации нормальной клетки в опухолевой происходит отнюдь не мгновенно. Общеизвестно, что опухоль проходит в своем развитии ряд стадий, каждой из которых предшествует определенное генетическое событие, изменяющее либо последовательность какого-либо гена, либо структуру/число хромосом. В последнее десятилетие к генетическим событиям, способствующим развитию опухолей были добавлены эпигенетические, в том числе изменения паттернов метилирования ДНК и различные модификации гистонов. В результате микроэволюционных процессов, происходящих в клональных популяциях опухолевых клеток, эти клетки накапливают генетические и эпигенетические события, которые сочетанным образом способствуют постепенному усилению злокачественного потенциала клетки, которое соответствует постепенной трансформации участка ткани в доброкачественную, а затем и в злокачественную опухоль. Конкуренция клеток за кислород или другие ресурсы приводит к увеличению размера популяции наиболее быстро растущих клеток, таким образом, увеличивая число возможных мишеней для следующего по степени злокачественности мутационного события. Еще одним важным фактором, способствующим опухолевой прогрессии является нестабильность генома опухолевой клетки, также нарастающая пропорционально степени злокачественности. Главными компонентами нестабильности генома являются мутации генов, ответственных за репарацию ДНК и поддержание целостности хромосом, а также глобальное снижение степени метилирования генома,

приводящее к эктопической экспрессии тысяч гетерологичных РНК. Каждая из таких РНК обладает слабым регуляторным эффектом, но в сумме они серьезно нарушают функционирование стандартного набора транскриптов, поддерживающих дифференцировку конкретного типа клеток. В дополнение к эктопическим РНК, опухоли экспрессируют транскрипты, не представленные ни в одной из нормальных тканях поскольку они, в сущности, не являются генами, а представляют собой фрагменты геномных последовательностей, расположенных по соседству со слабыми промоторами, полностью ингибированными в нормально функционирующих клетках. Такие эволюционно-новые последовательности могут быть использованы в качестве биомаркеров опухолей; более того, большинство хорошо известных биомаркеров опухолей, применяющихся в клинической практике, являются именно такими эволюционно новыми генами, получившими свой шанс послужить матрицей для РНК-синтеза в результате дестабилизации генома.

Поддержание состояния дифференцировки нормальной клетки является результатом сочетанного действия многих клеточных генов, состояние активности которых определяет клеточный фенотип. Каждую клетку можно представить как динамическую систему, занимающую конкретную позицию в многомерном пространстве, где каждая из множества осей представляет собой относительную функциональность какой-либо разновидности биомолекул в составе клетки (например, уровень экспрессии гена). В физике, такая позиция носит название аттрактора, или устойчивой позиции. Каждый из аттракторов, описывающих какой-либо из типов клеточной дифференцировки, можно охарактеризовать путем описания специфического паттерна генной экспрессии, поддерживающего эту дифференцировку. Когда геном клетки дестабилизирован, такая клетка покидает устойчивое состояние дифференцировки и случайным образом «блуждает» в многомерном пространстве вокруг аттрактора; эти «блуждания» часто приводят клетку в новую «устойчивую» точку, соответствующую опухолевому фенотипу. Переход клетки в окрестность нового аттрактора может быть ускорен в результате селективного давления внутри участка ткани, подвергающегося озлокачествлению, например, конкуренцией в условиях гипоксии. Теория «аттракторов» освещает процесс канцерогенеза под новым углом, отличающимся от традиционных теорий о роли мастер-генов, активно способствующих процессу трансформации. Немаловажно, что концепция аттракторов может быть использована для создания диагностических и прогностических тестов нового типа, опирающихся на полнотранскриптомные профили экспрессии.

Biomarkers of the genetic adaptation to the ecological stress in mammalian populations

Valery Ivanovich GLAZKO

Russian State Agrarian University - MTAА, Moscow, 127550, Timirjazevsky street, 49

Биомаркеры популяционно-генетической адаптации к действию экологического стресса у млекопитающих

В.И.Глазко

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Выполнено сопоставление популяционно-генетических последствий действий биотических и абиотических факторов экологического стресса на генетическую структуру, оцениваемую по разным типам молекулярно-генетических маркеров и цитогенетических характеристик. Установлено, что влияние факторов экологического стресса может приводить к существенной генетической дифференциации по молекулярно-генетическим маркерам между группами животных, в некоторых случаях такая дифференциация оказывается больше, чем межпородные отличия. Выявлены два гена, продуктами которых являются рецептор витамина Д и пуридиннуклеозидфосфорилаза, полиморфизм которых во всех случаях участвовал в межгрупповой внутрипородной дифференциации в связи с действием факторов экологического стресса. Это позволяет предполагать наличие универсальных характеристик популяционно-генетического ответа исследованных пород крупного рогатого скота на влияние разных факторов экологического стресса. Анализ репродуктивных особенностей экспериментального стада крупного рогатого скота в трех последовательных поколениях, родившихся в экспериментальном хозяйстве «Новошепеличи», позволяет выяснить механизмы, благодаря которым у потомков родителей, подвергавшихся действию экотоксических факторов, происходит изменения генетической структуры и удаление ряда аллелей и генотипов, ассоциированных с повышенной чувствительностью, из воспроизводства. К ним относятся повышение бесплодия коров и смертности новорожденных (до трех месяцев).

Выполнены исследования мутационных спектров у представителей видов полевков (*Microtus arvalis* и *Clethrionomys glareolus*), отловленных в зоне отчуждения ЧАЭС в местообитаниях с низким уровнем радионуклидного загрязнения (<5 Ки/км²), которые рассматривались как спонтанные мутационные спектры (условно контрольные), в условиях промежуточного уровня радионуклидного загрязнения (~200 Ки/км² – Янов, расчетная поглощенная доза – около 0,6 - 0,8 Гр/год) и при высоких уровнях (500 - 1000 Ки/км², Озеро Глубокое, Чистогаловка, «Рыжий лес», расчетная поглощенная доза – около 0,9 – 1,1 Гр/год). Получены данные о том, что у представителей рыжей и обыкновенной полевков в местообитаниях с высоким уровнем радионуклидного загрязнения обнаруживается отчетливая селекция к 1999-2001 году животных с условно обозначенной повышенной радиорезистентностью. Так, в популяциях рыжей полевки, отловленных в 1999 –

2001 гг. в местообитании с максимально высоким уровнем радионуклидного загрязнения обнаруживаются, в основном, животные, у которых в клетках костного мозга частота встречаемости цитогенетических аномалий не только не больше, чем в условно контрольной популяции, но по некоторым характеристикам даже меньше. Повышение количества таких, условно радиоустойчивых, особей у рыжей полевки наиболее выражено в "Рыжем лесу" (1000 Ки/км²). В местообитаниях с существенно меньшим уровнем радионуклидного загрязнения (Янов, ~200 Ки/км²) такая селекция не наблюдалась. Похожие данные были получены и при исследовании цитогенетических аномалий в клетках костного мозга популяций обыкновенной полевки.

Далее для выяснения популяционно-генетических последствий хронического действия экологического стресса выполнен сравнительный анализ внутривидовой генетической дифференциации у монгольских местных пород яков, крупного рогатого скота, овец, коз в условиях относительно экологически благополучных хозяйств района Хубсугул (Монголия) и в зоне рискованного животноводства Южного Гоби (материал для исследований предоставлен д.б.н. Ю.А. Столповским, Институт общей генетики им.Н.И. Вавилова РАН). Полученные данные позволяют утверждать, что животные, разводимые в условиях действия хронического экологического стресса в зоне рискованного животноводства отличаются от представителей того же вида, воспроизводящихся в более благоприятных условиях, статистически достоверной относительно повышенной стабильностью хромосомного аппарата, а также повышенным уровнем гетерозиготности по отдельным молекулярно-генетическим маркерам. Интересно отметить, что у животных Южного Гоби частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами оказываются ниже типичного для многих других пород крупного рогатого скота и овец из относительно экологически благополучных регионов. Такое же снижение уровня частот встречаемости цитогенетических аномалий ниже типичного для вида описано нами у видов мелких мышевидных грызунов, отловленных в зоне отчуждения ЧАЭС через 28 – 30 поколений после аварии. Полученные данные позволяют предполагать, что в экстремальных условиях воспроизводится только часть генофонда, отличающаяся повышенной стабильностью генетического аппарата. Накопленные данные свидетельствуют о сходстве популяционно-генетических ответов исследованных видов млекопитающих в ответ на хроническое действие различных факторов экологического стресса по преимущественному воспроизводству только части исходного генофонда, отличающегося относительно повышенной гетерозиготностью по отдельным генетическим системам и повышенной стабильностью хромосомного аппарата в соматических клетках.

Biomarkers for somatic cells reprogramming

Maria LAGARKOVA, Sergey KISELEV

*Epigenetics Department, Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia***Биомаркеры репрограммирования соматических клеток**

Мария Лагарькова, Сергей Киселев

Отдел эпигенетики, Институт общей генетики им. Вавилова РАН, Москва, Россия

Процесс индивидуального развития начинается с единственной тотипотентной клетки. По мере выполнения онтогенетической программы развития растет число и разнообразие типов клеток. На ранних этапах развития клетки плюрипотентны, в дальнейшем их потенциал утрачивается, они становятся мультипотентными, олигопотентными, и в специализированной ткани организма представлены терминально дифференцированными клетками сомы. Соматические клетки теряют способность к дифференцировке и имеют ограниченную способность к самообновлению. Однако, если взять генетический материал соматической клетки и перенести его в тотипотентную или плюрипотентную клетку, то онтогенетическая программа будет выполняться опять. Этот процесс называется репрограммированием соматического генома. Благодаря последним достижениям молекулярной биологии были обнаружены ключевые транскрипционные факторы, определяющие плюрипотентное состояние. Оказалось, что достаточно ввести в соматические клетки всего 4 гена, кодирующие эти факторы, и небольшое количество клеток репрограммируется до плюрипотентного состояния. Эти клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSCs). По своим молекулярным и функциональным характеристикам они очень близки к эмбриональным стволовым клеткам. К настоящему времени iPSC получены из разнообразных типов клеток. Например, нами получены и охарактеризованы iPSC из клеток эндотелия человека, также получены iPSC из клеток кожи пациентов с хореей Гентингтона, болезнью Пакинсона, наследственной макулодистрофией Штатгардта и ряда других патологий. Потенциально iPSC с исправленным генотипом могут служить источником дифференцированных клеток для заместительной терапии. Однако, существует целый ряд вопросов, замедляющих терапевтическое использование iPSC. Например, по какому сценарию происходит репрограммирование соматических клеток: по стохастическому, когда любая клетка из популяции имеет мизерные шансы на репрограммирование (обычная эффективность репрограммирования 0,1-0,001%), или по элитному, когда в популяции существуют клетки, особенно чувствительные к репрограммированию? Как влияет на этот сценарий использование химических молекул, повышающих эффективность репрограммирования? Какие характерные особенности имеют соматические клетки, которые прошли процесс репрограммирования? Чтобы ответить на эти вопросы, мы решили создать систему, в которой за счет введенных генетических меток будет возможно проследить судьбу индивидуальной клетки и сравнить iPSC, полученные разными способами. Этот подход даст нам возможность идентифицировать специфические генетические или эпигенетические маркеры, которые способствуют репрограммированию клеток.

Genetic markers and molecular mechanism of psoriasis

Alexander MEZENTSEV, Sergey BRUSKIN

*Research Institute of Russian Academy of Sciences, NI Vavilov Institute of General Genetics,
Moscow, Russia***Генетические маркеры и молекулярный механизм псориаза**

Мезенцев А.В., Брускин С.А.

*Учреждение Российской Академии Наук Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова, Москва, Россия*

Псориаз - мультифакторное заболевание, имеющее генетическую составляющую. Причины, вызывающие болезнь, неизвестны. Значительно больше известно о молекулярном механизме заболевания. Так, движущей силой болезни является аутоиммунный процесс, спровоцированный на молекулярном уровне, а внешними проявлениями псориаза являются повреждения кожи, в большинстве случаев в виде шелушащихся пятен красного цвета. Псориаз является одним из наиболее распространенных кожных заболеваний. По данным медицинской статистики, в разных странах от псориаза страдают от 2 до 6 процентов населения. Особая социальная значимость псориаза делает актуальной задачей поиск биомаркеров этой болезни и изучение их роли в ее патогенезе.

Изучение этиологии и патогенеза, а также генетический анализ многофакторных заболеваний в целом и псориаза в частности, сопряжен с рядом трудностей: (1) прежде всего, это полиморфизм патологических состояний, т.е. непрерывный спектр переходов от субклинических форм к формам с ярко выраженными клиническими симптомами; (2) истинная тяжесть заболевания определяется индивидуальной клинической картиной пациента, которая обусловлена уникальностью процессов метаболизма каждого индивидуума, определяемой его генетическим статусом; (3) гетерогенность в реакции пациентов на лекарственные препараты, а также в отношении побочных эффектов лекарственных препаратов. Факторы индивидуального ответа пациента на применение лекарственных препаратов, как и факторы индивидуальной предрасположенности человека к различным заболеваниям, требуют разработки научных основ для определения критериев соответствующей лекарственной терапии для каждого отдельного пациента. Поиски генетических маркеров, наличие которых в организме обуславливает восприимчивость организма человека к определенному заболеванию, ведутся на протяжении не одного десятка лет и имеют большое значение. Это объясняется тем, что только генетический подход позволяет приблизиться к пониманию биологической сущности заболеваний, а получаемые при таком подходе данные дают возможность выделять группы риска развития исследуемой патологии.

Поскольку развитие псориаза обусловлено значительным количеством факторов как генетических (уже известно более 10 локусов предрасположенности к псориазу), так и внешней среды (курение, инфекции, психо-эмоциональные стрессы, травмы), то четко выявить роль генетических факторов в развитии заболевания у пациента оказалось невозможно. Предлагаемый подход основан на поиске, идентификации и верификации биомаркеров на молекулярном уровне с помощью технологии «глубокого секвенирования» и позволит оценить механизмы течения заболевания, что является, несомненно, актуальным, т.к. позволит

разработать арсенал молекулярно-диагностических тест-систем и фармакотерапий для персонализированной медицины.

Выявленные молекулярные маркеры могут быть использованы при разработке *in vitro* моделей заболевания, а также создания системы доклинического скрининга лекарственных препаратов и установление возможных мишеней для разработки новых лекарственных средств против псориаза.

Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid: general overview, advantages and limitations as a source of oncomarkers

Pavel LAKTIONOV

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Division of Russian Academy of Sciences

Циркулирующие нуклеиновые кислоты крови: общие сведения, преимущества и недостатки использования циркуНК для онкодиагностики

Павел Лактионов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Циркулирующие нуклеиновые кислоты (циркНК) были обнаружены в плазме крови (свободные циркНК) и в составе комплексов с поверхностью форменных элементов крови (скпНК). Свободные циркДНК более фрагментированы по сравнению с скпДНК и циркулируют преимущественно в составе нуклеосом, апоптических телец и комплексов с белками сыворотки. Показано, что РНК в крови так же могут циркулировать в составе нуклеопротеиновых комплексов, и преимущественно встречаются в составе экзосом и микровезикул. Не выяснено упакованы ли скпНК в какие либо специфические структуры, однако известно, что некоторые белки клеточной поверхности способны связывать нуклеиновые кислоты и опосредовать их транспорт в клетки. По-видимому, циркулирующие в плазме комплексы нуклеиновых кислот так же могут адсорбироваться на поверхности клеток. СкупДНК не являются интактными молекулами; в их составе были обнаружены ДНК последовательности, обладающие иммуномодулирующим действием. Отношение концентрации свободных циркДНК к скпДНК изменяется в зависимости от состояния донора: в норме основная часть циркНК связана с поверхностью клеток крови, а при некоторых патологиях наблюдается перераспределение циркулирующих нуклеиновых кислот. Считается, что основным процессом, обеспечивающим появление циркулирующих НК является апоптоз, однако циркулирующие НК могут возникать и в результате активной секреции клетками. Состав свободных циркулирующих ДНК не идентичен геномной ДНК; в результате сравнительного исследования свободной внеклеточной ДНК культивируемых клеток методом FISH было продемонстрировано, что некоторые участки ДНК перепредставлены в пуле внеклеточной ДНК. Сравнительное исследование свободно циркулирующей апоптической и геномной ДНК методом массового параллельного секвенирования на платформе SOLID так же позволило выявить перепредставленные в пуле внеклеточных ДНК последовательности.

культивирования поврежденных клеток. Адаптивный ответ в МСК сопровождается: (1) снижением уровня синтеза АФК, (2) уменьшением количества клеток, содержащих двунитевые разрывы, (3) снижением уровня апоптоза клеток, (4) увеличением в несколько раз количества мРНК генов антиокислительного ответа, генов репарации и антиапоптотических генов, (5) снижением количества мРНК генов, ответственных за синтез АФК и NO.

На фоне развития выраженного адаптивного ответа мы обнаружили небольшую популяцию клеток (менее 0,1 %) которые содержат слабо репарируемые двунитевые разрывы в конкретных областях интерфазного ядра (в участках хроматина, сближенных с ядрышкообразующими районами хромосом). Эти разрывы не приводят к апоптозу клеток, о чем свидетельствует активный процесс транскрипции ЯОР в тех же клетках, характерный для жизнеспособных клеток. Обнаруженная субпопуляция стволовых клеток с устойчивыми двунитевыми разрывами может быть источником клонов, содержащих хромосомные перестройки и встроенные фрагменты экзогенной ДНК. Мы обнаружили, что модельные GC-богатые и/или «окисленные» фрагменты ДНК, которые моделируют свойства вкДНК организма при патологии, индуцируют увеличение численности такой субпопуляции МСК, наравне с ионизирующим излучением. Работы ряда авторов указывают на то, что вкДНК может участвовать в «горизонтальном» переносе генетической информации, в том числе, и в процессе метастазирования. Анализируя такие свойства вкДНК, как содержание гуанозина и 8-оксогуанозина, можно оценить потенциальный уровень опасности циркулирующей ДНК для трансформации стволовых клеток в раковые.

Aberrantly methylated DNA as circulating DNA-oncomarker

Svetlana TAMKOVICH

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Division of Russian Academy of Sciences

Циркулирующие в крови аберрантно метилированные ДНК – удобные ДНК-онкомеркеры

Светлана Тамкович

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Эпигенетические изменения промоторных областей опухолевых супрессорных генов как правило ассоциированы с трансформацией нормальных клеток и, таким образом, могут рассматриваться в качестве ранних маркеров опухолевой трансформации. Наряду с другими опухолевоспецифическими нуклеиновыми кислотами, аберрантно метилированные ДНК (метДНК) были обнаружены в пуле ДНК, циркулирующих в крови онкологических больных (циркДНК). Благодаря процедуре бисульфитной конверсии аберрантно метилированную ДНК можно детектировать в присутствии большого избытка ДНК дикого типа, что наряду с присутствием таких ДНК практически во всех трансформированных клетках позволяет рассматривать аберрантно метилированные ДНК в качестве перспективных маркеров для онкодиагностики, основанной на анализе циркулирующих ДНК крови. Однако при разработке таких

диагностических систем необходимо учитывать особенности циркулирующих метДНК, определяющихся процессами их генерации и циркуляции, такие как фрагментация, стабильность, выведение и распределение в крови.

Исследование циркуляции метДНК показало, что свободная метДНК и метДНК в составе природных комплексов более стабильны, чем аналогичные неметилированные ДНК, и способны циркулировать в крови более длительное время. Нами было показано, что aberrantly метилированная опухолевая ДНК присутствует не только в плазме, но и на поверхности форменных элементов крови. Связанная с поверхностью клеток ДНК обычно представлена более длинными молекулами, чем в плазме в связи с тем, что молекулы ДНК менее фрагментированы, связанные с поверхностью клеток крови ДНК представляют собой удобный источник материала для онкодиагностики.

Действительно, одновременный анализ метилирования генов *RASSF1A*, *Cyclin D2* и *RAR β 2* при помощи метил-чувствительной ПЦР в суммарном пуле циркулирующих ДНК крови (из плазмы и связанных с поверхностью форменных элементов) позволяет повысить чувствительность детекции злокачественных новообразований молочной железы не менее чем в два раза по сравнению с использованием для анализа только циркулирующей ДНК из плазмы крови. Определение степени метилирования генов *RAR β 2* и *RASSF1A* позволяет дискриминировать пациентов с немелкоклеточным раком легкого от здоровых доноров с чувствительностью 90% и специфичностью 82%.

Вопреки этим многообещающим данным, выбор последовательности ДНК-мишени и дизайн праймеров требуют тщательного исследования метилирования CpG-регионов циркулирующей ДНК крови. Действительно, участие клеток всех тканей в формировании суммарного пула циркулирующей ДНК, а также высокая степень фрагментации циркулирующей ДНК сильно осложняют выбор последовательностей опухолевоспецифических ДНК-мишеней. При помощи пиросеквенирования промоторной области гена *RAR β 2* циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы было показано, что некоторые позиции CpG-динуклеотидов менее вариабельны, чем другие и, таким образом, более пригодны для дизайна праймеров. При помощи секвенирования по Сэнгеру клонированных ПЦР-продуктов конвертированных промоторных областей гена *RNF219* циркулирующих в крови здоровых мужчин и больных раком предстательной железы было показано, что в промоторной области данного гена отсутствуют вариабельные позиции CpG-динуклеотидов; в крови циркулирует два типа молекул с профилем метилирования характерным для «нормы» и «онкологии».

Полученные данные демонстрируют необходимость исследования профиля метилирования потенциальных ДНК-онкомаркеров, циркулирующих в крови здоровых доноров и онкологических больных, а также характера их фрагментации что позволит в дальнейшем создать диагностическую систему, основанную на анализе циркулирующей ДНК

Longitudinal studies of prospective DNA-oncomarkers

Vladislav MILEYKO

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Division of Russian

*Academy of Sciences***Информационно-техническое обеспечение долговременных исследований потенциальных ДНК-онкомаркеров.****Владислав Милейко***Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

Оценка диагностического потенциала новых ДНК-маркеров для раннего выявления, мониторинга и подбора оптимальной терапии рака, требует создания непрерывно пополняемой коллекции биологических образцов совмещенной с клинической информацией о состоянии доноров от которых были получены эти образцы. Образцы в составе такой коллекции должны быть соответствующим образом описаны, а их количество и условия хранения должны отвечать задачам запланированного исследования.

Чтобы обеспечить потребности долгосрочных исследований нами была разработана электронная база данных BREP-TEST – автоматизированная система, предназначенная для хранения и обработки данных о состоянии здоровья доноров и учета полученных образцов, как первичных – фракции крови, плазма, биоптаты, так и вторичных – выделенная ДНК и РНК. Зарегистрированный в системе медперсонал учреждений-партнеров исследования может пользоваться базой данных BREP-TEST в своем аккаунте on-line интерфейса. При этом каждый авторизованный пользователь (врач или медицинская сестра) имеет возможность создавать и редактировать карточки своих пациентов, а администратор базы имеет доступ к электронной картотеке всех пользователей. Такой подход наряду с автосохранением текущей версии базы данных при внесении изменений обеспечивает безопасность и сохранность информации в системе BREP-TEST.

Порядок сбора образцов и внесения информации в базу данных на всех этапах строго регламентируется специально разработанным протоколом. Этот протокол включает 7 разделов, определяющих порядок забора образцов, хранения и транспортировки, правила обработки крови, упаковки, маркировки и извлечения образцов для экспериментальных исследований, а также порядок создания коллекции образцов нуклеиновых кислот, выделенных из полученного биологического материала. Разработанные протоколы и база данных доступны для всех участников исследования для редактирования и оптимизации.

454 Next Generation Sequencing In Oncological Markers Research



Maria GRACHEVA
Roche Diagnostics Rus LLC

Секвенирование нового поколения 454 в исследованиях онкомаркеров

Грачева Мария
ООО «Рош Диагностика Рус»

Актуальность анализа присутствующих в геноме онкогенов на наличие полиморфизмов и мутаций для выявления их корреляции с тем или иным видом рака, динамики развития опухолей и подбора адекватной таргетной, направленной на конкретного человека и конкретное заболевание, терапии в настоящее время уже не вызывает сомнений. Высокопроизводительное секвенирование онкогенов является неоспоримым подспорьем скорейшего развития персонализированной медицины в этом ключе. Высокопроизводительная технология секвенирования нового поколения, разработанная компанией Roche/454 Life Sciences, представляет собой удобный инструмент, как для полногеномных масштабных исследований онкомаркеров, так и для более направленных, сверхглубоких исследований конкретных онкогенов на наличие, например, соматических мутаций.

В настоящий момент платформы секвенирования Roche/454 - GS FLX+ и GS Junior за каждый запуск способны высокоточно прочитывать сотни тысяч клональных нуклеотидных последовательностей ДНК длиной до 1000 п.о. (как в методе Сэнгера), давая общую производительность до 1 миллиарда п.о. Важно отметить, что, несмотря на возможность проводить полногеномное ресеквенирование на этих платформах, наибольшую диагностическую значимость все-таки имеет таргетное ресеквенирование онкогенов, а не полных геномов. Компания Рош/454 предлагает два основных подхода к таргетному ресеквенированию онкогенов – таргетный отбор онкогенов при помощи захватывающих (гибридизирующих) чипов NimbleGen Sequence Capture с последующим высокопроизводительным секвенированием 454 и сверхглубокое 454 секвенирование ампликонов, т.е. ПЦР-продуктов конкретных экзонов онкогенов.

Первый подход используется для анализа участков генома общим размером от 100 тысяч п.о. до 50 миллионов п.о. Этот подход позволяет выявлять любые виды мутаций и полиморфизмов, включая вставки и делеции практически любого размера на протяжении всех отображенных областей. При этом для достоверного выявления несоматических мутаций и полиморфизмов необходимо 10-кратное покрытие интересуемой области клональными прочтениями. Для таргетного анализа большинства известных генов онкомаркеров уже разработан чип NimbleGen Sequence Capture, который захватывает полный спектр экзонов (около 1350) из 75 генов, ассоциированных с раком. В этих генах уже было обнаружено более 9000 вариантов. Все эти гены могут быть проанализированы всего лишь в одном запуске секвенатора GS Junior.

Второй подход используется для выявления редких соматических мутаций, делеций и вставок в экзонах, с чувствительностью менее 0,02%, а также для анализа вариаций количества копий генов. В этом подходе осуществляется сверхглубокое секвенирование ПЦР-продуктов, причем для выявления редких мутаций с

чувствительностью менее 1%, требуется более чем 500-кратное покрытие этого участка индивидуальными клональными прочтениями. Такой подход абсолютно необходим для своевременного выявления мутаций, приводящих к резистентности опухолей к химиотерапии, и уже широко используется в анализе таких генов как: EGFR, BRCA, KRAS, TET2, RUNX1, CBL, BRAF в диагностике.

Важно отметить, что длина индивидуальных клональных прочтений, составляющая около 500 п.о. для GS Junior и порядка 800 п.о. для GS FLX+, абсолютно критична для определения гаплотипов, выявления делеций и вставок, а также для высокоточного картирования на референсную последовательность и удобства получения ПЦР-продуктов. В анализе раковых транскриптомов длина индивидуальных прочтений важна для определения возможных сплайс-вариантов и фьюжн-транскриптов.

Высокая производительность платформ 454 и удобство анализа длинных прочтений, генерируемых ими, однозначно позволяют производить всеобъемлющий анализ онкогеномов и наработке данных для статистики. Это уже привело к появлению готовых к использованию тест-систем для диагностики на основе технологии 454, а в перспективе приведет и к большему их количеству, что еще ближе подведет современную медицину к персонализированной.

Telomerase activity and expression of its gene as biomarker for early stage cervical carcinoma

Kisseljov FL¹, Petrenko AA¹, Korolenkova LI¹, Pavlova LS¹, Skoblov MU², Baranova AV², Skvortsov DA³, Dontsova OA³

¹ Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Russia

² Research Centre for medical genetics RAMS

³ Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow Russia

Экспрессия теломеразной активности как маркер ранних стадий прогрессии рака шейки матки

Ф.Л.Киселев¹, А.А.Петренко¹, Л.И.Короленкова¹, Л.С.Павлова¹,
М. Ю. Скоблов², А.В.Баранова², Д.А.Скворцов³, О.А.Донцова³

¹ Онкологический Центр им. Н.Н.Блохина РАМН

² Медико-генетический Центр РАМН

³ Химический факультет МГУ им. Ломоносова

Исследование проводили на образцах биопсий шейки матки, взятых после кольпоскопического исследования - морфологически нормального эпителия шейки матки, интраэпителиальных неоплазий (CIN) различных стадий и плоскоклеточных карцином шейки матки. В полученных образцах биопсий исследовали наличие генома HPV высокого риска (hrHPV), теломеразную активность и экспрессию 5 изоформ мРНК гена hTERT. Число hrHPV-положительных случаев составляет около половины образцов нормального эпителия шейки матки и CIN I и встречается в подавляющем большинстве образцов на более поздних стадиях заболевания. Ферментативная активность теломеразы превалирует в hrHPV-положительных образцах (пред)опухолевых поражений

шейки матки. Экспрессия мРНК гена hTERT начинается уже в клетках нормального эпителия шейки матки, наблюдается в подавляющем большинстве (~75%) образцов и является ранним событием в патогенезе рака шейки матки. В то же время, мРНК гена hTERT обнаружена во всех образцах дисплазий и карцином, что указывает на важное значение теломеразы для возникновения и прогрессии опухоли шейки матки. Каноническая (нормально сплайсированная) и β -изоформы мРНК наблюдается во всех исследованных образцах (пред)опухолевых поражений шейки матки. Число случаев, экспрессирующих α - и $\alpha\beta$ -изоформы мРНК, увеличивается по мере прогрессии заболевания. Экспрессия γ -изоформы мРНК наблюдается в единичных случаях на поздних стадиях развития заболевания (CIN III и карциномы). Не выявлено взаимосвязи между наличием теломеразной активности и экспрессией какой-либо из 4 исследованных альтернативно сплайсированных изоформ мРНК гена hTERT.

Searching for and studying human antisense transcripts

Mikhail Skoblov¹, Andrey Marakhonov¹, Alexandra Filatova¹, Victoria Serzhanova¹, Ancha Baranova^{1,2}

¹Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» under Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

²School of Systems Biology, College of Science, George Mason University, Fairfax, VA USA

Поиск и исследование антисмысловых транскриптов человека

М.Ю. Скоблов¹, А.В.Марахонов¹, А.Ю.Филатова¹, В.А.Сержанова¹,
А.В.Баранова^{1,2}

¹ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва

²Университет имени Джорджа Мейсона, США

Регуляция экспрессии генов осуществляется на разных уровнях молекулярно-биологических процессов. Посттранскрипционная регуляция за счет некодирующих транскриптов является одной из широко распространенных. Самым известным и мощным механизмом является РНК-интерференция, когда одна микроРНК способна влиять на экспрессию тысячи генов.

Антисмысловые транскрипты также являются широко распространенными тонкими регуляторами транскрипции. По результатам ранее проведенных нами биоинформатических исследований каждый третий ген человека имеет потенциально регулятор в виде антисмыслового транскрипта — молекулы РНК, последовательность которой частично или полностью комплементарна мРНК этого гена.

Несмотря на частую встречаемость антисмысловых транскриптов, об их функции и механизмах действия известно пока немного. Так, до недавних пор считалось, что антисмысловые транскрипты должны подавлять экспрессию смысловых, однако, в последнее время было показано, что в некоторых случаях антисмысловые транскрипты способны стабилизировать смысловую РНК, тем самым, увеличивая уровень экспрессии генов. В каких случаях реализуется первый, а в каких случаях второй вариант на сегодняшний день не известно.

Нами ранее был разработан алгоритм для проведения полногеномного

биоинформатического поиска АТ человека. Результаты поиска показали, что около одной трети генов человека регулируются с помощью АТ. Создание базы данных АТ позволило провести их дифференциальную классификацию в соответствии с набором заданных параметров. В настоящее время ведется работа над следующими проблемами: можно ли классифицировать смысловые и антисмысловые транскрипты как «регулируемый» и «регулятор» или же это такая пара всего лишь отражение факта совместного существования и ко-эволюции двух генов, экспрессия которых происходит строго отдельно по тканям; являются ли белок-некодирующие АТ простыми регуляторами смысловых кодирующих транскриптов или же им присущи какие-либо дополнительные функции; насколько консервативны АТ; какие именно гены подавляются с помощью механизма антисмысловой регуляции (потенциальные супрессоры опухолевого роста), и какие именно АТ сверхэкспрессируются в опухолевой клетке (потенциальные онкогены).

Early markers of cytogenetic anomalies in the interphase nuclei

Tatiana Teodorovna GLAZKO

Russian State Agrarian University - MTAА, Moscow

Предшественники цитогенетических аномалий в структуре интерфазного ядра

Глазко Т.Т.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, vglazko@yahoo.com

Цитогенетические аномалии являются одной из самых общих характеристик клеток, вовлекаемых в неопластическую трансформацию. Генетическая гетерогенность клеточного потомства, связанная с ними, лежит в основе селекции клеточных клонов при опухолевой прогрессии (увеличения злокачественности или автономности клеток). Само формирование цитогенетических аномалий, как правило, является сложным, полифакторным процессом, существенный вклад в который могут вносить нарушения надхромосомного уровня организации генетического материала в пространстве интерфазного ядра. К одному из таких уровней относится подразделенность диплоидного набора хромосом в соматических клетках на гаплоидные сети, сохраняющие отдельные черты своей структурно-функциональной автономности в зависимости от своей исходной принадлежности к мужским и женским гаметам. Такая автономность непосредственно обнаруживается в виде сегрегации мужского и женского гаплоидных наборов при ранних делениях бластомер, генетически обусловленной точности их конъюгации при формировании политеменных хромосом и в профазе первого мейотического деления, функционально проявляется в сохранении хромосомного импринтинга в соматических клетках взрослого организма. Имеются и структурные основания для исходной подразделенности гаплоидных сетей хромосом, поскольку в зиготу ряда млекопитающих центросома привносится сперматозоидом, а аппарат клеточного деления строится в основном за счет ооцита.

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о том, что одним из качественных отличий мутационных спектров в соматических клетках *in vivo* от *in*

in vitro является отсутствие центрических слияний между акроцентрическими гомологами. О значимости сохранения автономности гаплоидных сетей в соматических клетках свидетельствуют также данные о том, что наиболее частым генетическим дефектом опухолевых клеток различного происхождения является утрата гетерозиготности полиморфных ДНК маркеров (Loss Of Heterozygosity – LOH). Механизмы LOH могут быть связаны либо с рекомбинацией между гомологами, либо дефектами сегрегации хромосом после вторичной диплоидизации полиплоидов, формируемых в результате нарушений прохождений стадий митоза или за счет клеточных слияний. Сегрегация гаплоидных сетей хромосом в соматических клетках *in vivo* наблюдается при рутинной световой микроскопии метафаз разных видов, а также по присутствию гаплоидных метафазных пластинок среди клеток костного мозга некоторых лабораторных линий мышей. Накопленные данные позволяют предполагать, что изменения взаимоотношений между гаплоидными сетями хромосом в соматических клетках могут быть в определенной степени связаны с частотой появления разных типов цитогенетических аномалий, в частности, анеуплоидий.

Для того, чтобы проверить это предположение, выполнены исследования связей между взаимным расположением гомологичных хромосом (близкое – локализация в $\frac{1}{4}$ метафазной пластинки, максимально удаленное – на концах ее диаметра и промежуточные – все остальные варианты) и частотами встречаемости анеуплоидных метафаз. В результате получены следующие данные. У ряда пород крупного рогатого скота в метафазных пластинках клеток периферической крови после краткосрочного культивирования (72 часа с фитогемагглютинином) выявлены статистически достоверные корреляции ($P < 0,05$) между частотой встречаемости клеток с максимальной разобцённостью пар хромосом X (на концах диаметра метафазной пластинки) и долей анеуплоидных клеток. Интересно отметить, что частота встречаемости метафаз с максимально разобцёнными хромосомами X статистически негативно коррелировала с долей клеток, несущих центрические слияния между хромосомами по типу Робертсоновских транслокаций ($P < 0,05$). Сходные данные получены при сравнении межвидовых отличий по долям анеуплоидных клеток и частотам встречаемости близости между гомологами в метафазных пластинках костного мозга полевки экономки (легко идентифицируемые пары гомологов 1, 10, 14) и обыкновенной полевки (пары гомологов 1, 5, X). В наших исследованиях не использовались препараты, нарушающие веретено деления или элементы цитоскелета. Полученные данные свидетельствуют о том, что оценки разобцённости гомологов в соматических клетках могут быть эффективно использованы для прогноза в них частот формирования таких цитогенетических аномалий, как анеуплоидия или центрические слияния по типу Робертсоновских транслокаций. Из этого следует, что автономность гаплоидных сетей хромосом и их взаимоотношения выполняют определенную функцию в поддержании стабильности хромосомного аппарата в соматических клетках. Ранее нами были получены данные о том, что пространственная организация политенных хромосом в интерфазных ядрах слонных желез личинок *Chironomus thummi* может быть обусловлена балансом между прочностью контактов политенных хромосом с друг другом и периферией ядра. Отмечалось также, что уникально высокая частота латеральных контактов гомологичных хромосом отличает клеточные линии эмбриональных фибробластов мыши, сохраняющих в течение двух лет пассирования ряд фенотипических характеристик, от клеточных линий с быстро эволюционирующим фенотипом при

их спонтанной неопластической трансформации *in vitro*. То есть, близкие контакты гаплоидных сетей хромосом способствуют стабилизации генетического аппарата, разобщенность сетей – его повышенной изменчивости.

Одним из направлений поисков возможных механизмов, лежащих в основе организации гаплоидных сетей хромосом и взаимоотношений между ними, могут быть особенности динамики контактов теломер с ядерной ламиной, а также между центромерными участками в интерфазном ядре. Предлагается гипотеза, связывающая организацию гаплоидных сетей хромосом и ее нарушения с функцией и модификацией ряда белков, участвующих в организации теломер, в контроле их контактов с ядерной ламиной, в прикреплении центромерных участков к структурам веретена деления, гистонового кода (в частности, гистона H2A.Z), а также в формировании РНК-белковых структур в районах хромосомного импринтинга.

HSV-1 Thymidine kinase: marker, instrument, model

Yury Samoylovich SKOBLOV

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Тимидинкиназа вируса герпеса: маркер, инструмент, модель

Ю.С. Скоблов

ИБХ РАН, Москва

Тимидинкиназа вируса простого герпеса первого типа (ТК ВПГ-1) – специфический фермент – является наиболее популярной мишенью для действующих и вновь разрабатываемых антигерпетических средств. Весьма необычная субстратная специфичность ТК, сделала возможным использовать широкий спектр синтетических нуклеозидных аналогов, в том числе ациклических нуклеозидов – субстратов ТК, которые способны подавлять репродукцию ВПГ-1. Механизм действия таких соединений хорошо известен: 1) ТК ВПГ-1 фосфорилирует нуклеозид до монофосфатного производного, 2) клеточные киназы осуществляют фосфорилирование до соответствующего трифосфатного производного, 3) ДНК-полимераза ВПГ-1 встраивает синтетический аналог в растущую цепь ДНК, что приводит к терминации репликации вирусной ДНК. Некоторые соединения, такие как ацикловир, ганцикловир, валцикловир стали использоваться для терапии вирусных герпетических инфекций. К сожалению, их широкое применение весьма ограничено по двум причинам: во-первых, такие соединения достаточно токсичны, а во-вторых, из-за высокой мутабельности ВПГ-1, длительное использование ацикловира и его аналогов приводит к появлению мутантных форм ВПГ-1, резистентных к действию ациклических нуклеозидов. Подробные исследования штаммов ВПГ-1, резистентных к ацикловиру, показали, что в 95% случаев мутации затрагивают ген вирусной ТК и лишь в 5% мутации локализованы в гене вирусной ДНК-полимеразы.

Сравнительно недавно в качестве антигерпетического агента был предложен Н-фосфонат ацикловира (гидрофосфонат ацикловира), который оказался

достаточно эффективным как средством для подавления как эталонного штамма ВПГ-1, так и его глубоко резистентного к ацикловиру мутанта. Мы попытались выяснить механизм действия Н-фосфоната ацикловира и возможные причины различий в действии ацикловира и Н-фосфоната ацикловира на репродукцию ВПГ-1.

Было проведено клонирование и секвенирование генов ТК ВПГ-1 штаммов L2 и L2/R, т.е. эталонного штамма и производного штамма глубоко резистентного к ацикловиру. Оказалось, что штамм ВПГ-1 L2/R содержит мутации в гене ТК, приводящие к потере ферментативной активности. Аналогичные исследования проведенные на клинических изолятах ВПГ-1, выделенных у пациентов, прошедших терапии ацикловиrom. Эти штаммы оказались в разной степени резистентны к ацикловиру и Н-фосфонату ацикловира, при этом была выявлена четкая корреляция между мутациями в гене ТК и образовавшейся резистентностью.

Экспрессия клонированного гена ТК в *E.coli* позволила наработать достаточное количество чистого фермента для энзимологических исследований. Было показано, что Н-фосфонат ацикловира не является субстратом для ТК, однако *in vitro* достаточно эффективно ингибирует фосфорилирование ацикловира по смешанному типу действия.

На основе имеющихся в литературе данных по рентгеноструктурному анализу ТК с помощью компьютерного моделирования был проведен скрининг химической библиотеки для выявления соединений, которые могут эффективно взаимодействовать с ТК. Все природные нуклеозиды и их производные были сразу исключены из-за очевидности результата. Из нескольких тысяч соединений были выбраны 6 веществ, которые протестированы в качестве субстратов с ТК. Оказалось, что 2 соединения могут являться альтернативными субстратами, а еще 2 соединения ингибиторами фосфорилирования ацикловира.

Family of KCTD proteins: A comparative study of structure and function

[Andrey MARAKHONOV](#)¹, [Mikhail SKOBLOV](#)¹, [Ancha BARANOVA](#)^{1,2}

¹*Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» under Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

²*School of Systems Biology, College of Science, George Mason University, Fairfax, VA USA*

Взаимоотношения между структурой и функцией на примере белков семейства KCTD

А.В. Марахонов¹, М.Ю. Скоблов¹, А.В. Баранова^{1,2}

¹ ФГБУ «МГНЦ» РАМН, Москва, Россия

² Университет имени Джорджа Мейсона, США

Функциональные исследования белков невозможны без детального изучения их структуры. Именно поэтому «золотым стандартом» структурно-функциональных исследований уже давно является рентгеноструктурный анализ. Он позволяет устанавливать третичные структуры белков, что открывает безграничные возможности для изучения конформаций, фолдинга, поиска активаторов и ингибиторов конкретного белка и др., что, в конечном итоге, позволяет создавать лекарственные препараты, специфично взаимодействующие с белком и изменяющие его функциональную активность. Доступность структурных данных для большого количества пептидов позволяет экстраполировать их структуры на новые, еще неизученные в этом отношении белки. Ведущую роль в этом «переносе знаний на структуры» играют биоинформатические методы, позволяющие проводить поиск гомологичных уже охарактеризованным в структурном отношении последовательностей. Однако знание структуры белка еще не говорит о знании его функции в клетке, поэтому изучение структурно-функциональных взаимоотношений в семействах белков представляется актуальной задачей.

В процессе изучения причин В-клеточного хронического лимфолейкоза, нами обнаружено несколько кодирующих белок генов. Одним из интересных кандидатов на роль супрессора опухолевого роста оказался ген *KCNRG*. Биоинформатический анализ его последовательности позволил идентифицировать домен T1, ответственный за белок-белковые взаимодействия посредством тетрамеризации и встречающийся также в белках потенциал-зависимых калиевых каналов. Полногеномный поиск у человека выявил 27 генов, содержащих изолированный домен T1. Данное семейство было охарактеризовано как семейство KCTD белков (K⁺ channel tetramerization domain containing)

На основе способности домена T1 к тетрамеризации, мы предположили, что KCTD белки могут формировать комплексы с белками калиевых каналов, нарушая тем самым их сборку в функциональный канал. Несмотря на высокую гомологию внутри семейства KCTD белков, было показано, что белок KCTD5 в растворе формирует не тетрамеры, а пентамеры. Тем не менее, *KCNB5* активно взаимодействует с другими белками, не содержащими T1 домен, посредством C-конца, а также за счет других эпитопов. Однако для других членов семейства KCTD никакой информации не получено.

Нами было проанализировано участие KCTD белков в различных сигнальных путях. Было показано, что семейство очень гетерогенно по этому признаку. Кроме того, мы провели множественное выравнивание белковых последовательностей KCTD-белков. Это позволило выделить несколько подгрупп. Нами также был проведен сравнительный экспрессионный анализ семейства KCTD и белков потенциал-зависимых калиевых каналов в различных тканях человека с целью поиска потенциально взаимодействующих пар.

Lux-biosensors for the detection of the Type I quorum system signal

molecules.

Manukhov IV¹, Melkina OE¹, Khurulnova SV¹, Goryanin II¹, Marishev IV¹, Kotova VYu¹, Baranova AV², Zavilgelsky GB¹

¹ GNII Genetika, Moscow

² School of Systems Biology, College of Science, George Mason University, Fairfax, VA USA

Lux-биосенсоры для детекции сигнальных молекул систем "Quorum sensing" первого типа.

Манухов И.В.¹, Мелькина О.Е.¹, Хрульнова С.В.¹, Горянин И.И.¹, Марышев И.В.¹, Баранова А.В.², Котова В.Ю.¹, Завильгельский Г.Б.¹

¹ ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва

² School of Systems Biology, College of Science, George Mason University, Fairfax, VA USA

Различные виды бактерий используют «Quorum Sensing» (QS) системы регуляции экспрессии генов для скоординированного ответа, согласованного с локальной плотностью их популяции. *Lux*-оперон морских бактерий *Aliivibrio fischeri* в настоящее время принято считать модельным в исследованиях QS систем, а по обозначению белка LuxR, регулятора *lux*-оперона было определено семейство LuxR-гомологичных белков – регуляторов QS систем первого типа. В настоящей работе впервые определена структура QS системы *lux*-оперона у психрофильных светящихся морских бактерий *Aliivibrio logei*. В отличие от *lux*-оперонов мезофильных морских бактерий *A. fischeri*, содержащих в своём составе одну копию гена *luxR*, в *lux*-оперонах психрофильных бактерий содержится две копии гена *luxR*, причём белки LuxR1 и LuxR2 различаются как по аминокислотной последовательности, так и по активности по отношению к регулируемому ими промотору. Для проведения данных исследований сконструированы биосенсоры для детекции аутоиндуктора первого типа (N-3-оксогексаноил-лактон L-гомосерина) (АИ-1).

В работах (Fidopiastis P.M *et al* 1999; Nelson E.J. *et al* 2007) было показано, что *Aliivibrio salmonicida* является криптоически люминесцирующим видом бактерий и светится лишь при добавлении в среду субстрата люциферазной реакции *p*-деканала. В настоящей работе показано, что структура *lux*-оперонов *A. salmonicida* и *A. logei* сходна, а криптоическая люминесценция патогенных морских бактерий *A. salmonicida* связана с дефектом в гене *luxD*, кодирующем одну из субъединиц редуктазы. Данный результат получен с применением плазмид, с генами *luxCD* из *A. logei* и *A. salmonicida*, под контролем P_{lac} промотора. Данными плазмидами был трансформирован штамм *E. coli* MC1061, в котором находилась плазида, содержащая гены *luxABE* из *A. fischeri*. При инкубации клеток при пониженной температуре 15-18°C (гены *luxCD*, взятые из психрофильных бактерий, кодируют чувствительные к повышению температуры более 20°C белки) недостаток в *p*-деканале восполнялся наличием в клетке *luxCD* генов из *A. logei*, но не *luxCD* генов из *A. salmonicida*. Тест система комплементации *luxABE* генов генами *luxCD* психрофильных бактерий оказалась применима для анализа активности холододового РНК шаперона CspA.

С применением биосенсоров для детекции АИ-1 показано, что АТФ-зависимая протеаза Lon участвует в негативной регуляции систем QS у морских бактерий. Доказано, что шаперонин GroEL/ES участвует в сборке нативной формы белка LuxR. Основную регуляторную функцию в белке LuxR несет N – домен (162 аминокислотных остатка), являющийся мишенью для Lon-протеазы и определяющий контакт полипептида с шаперонином GroEL, необходимым для сборки нативной структуры LuxR. Дефицит шаперона GroEL/ES компенсируется высокими концентрациями АИ-1.

LIST OF THE MANUSCRIPTS
published in collaboration with George Mason University
(2003-2011)

2011

Manukhov IV, Khrul'nova SA, Baranova A, Zaviigelsky GB. Comparative analysis of the lux operons in *Aliivibrio logei* KCh1 (a Kamchatka Isolate) and *Aliivibrio salmonicida*. *J Bacteriol.* 2011 Aug;193(15):3998-4001.

Kostyuk SV, Ermakov AV, Alekseeva AY, Smirnova TD, Glebova KV, Efremova LV, Baranova A, Veiko NN. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes. *Mutat Res.* 2011 Oct 4.

Biderman B, Marakhonov A, Skoblov M, Birerdinc A, Nohelty E, Page S, Khomenkov V, Chandhoke V, Sudarikov A, Nikitin E, Baranova A. Inhibition of potassium currents as a pharmacologic target for investigation in chronic lymphocytic leukemia. *Drug News Perspect.* 2010 Dec;23(10):625-31.

2010

Manukhov IV, Melkina OE, Goryanin II, Baranova AV, Zaviigelsky GB. The N-terminal domain of *Aliivibrio fischeri* LuxR is a target of the GroEL chaperonin. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(20):5549-51.

Birerdinc A, Nohelty E, Marakhonov A, Manyam G, Panov I, Coon S, Nikitin E, Skoblov M, Chandhoke V, Baranova A. Pro-apoptotic and antiproliferative activity of human KCNKG, a putative tumor suppressor in 13q14 region. *Tumour Biol.* 2010 Jan;31(1):33-45

Sikaroodi M, Galachiantz Y, Baranova A. Tumor markers: the potential of "omics" approach. *Curr Mol Med.* 2010 Mar;10(2):249-57.

2009

Manyam G, Baranova A, Skoblov M, Mishra RK. SnS-Align: a graphic tool for alignment of distantly related proteins. *Int J Bioinform Res Appl.* 2009;5(6):663-73.

2008

Myakishev M, Polesskaya O, Kulichkova V, Baranova A, Gause L, Konstantinova I. PCR-based detection of Pol III-transcribed transposons and its application to the rodent model of ultraviolet response. *Cell Stress Chaperones.* 2008 Spring;13(1):111-6.

Alsheddi T, Vasin L, Meduri R, Randhawa M, Glazko G, Baranova A. siRNAs with high specificity to the target: a systematic design by CRM algorithm. *Mol Biol (Mosk).* 2008 Jan-Feb;42(1):163-71.

Krukovskaia LL, Polev DE, Nosova IuK, Baranova AV, Koliubaeva SN, Kozlov AP. Investigation of transcription factor Brachyury (T) expression in human normal and tumor tissues. *Vopr Onkol.* 2008;54(6):739-43.

Marakhonov AV, Baranova AV, Skoblov Mlu. Antisense regulation of human gene MAP3K13: true phenomenon or artifact. *Mol Biol (Mosk).* 2008 Jul-Aug;42(4):581-7.

2007

Palena C, Polev DE, Tsang KY, Fernando RI, Litzinger M, Krukovskaya LL, Baranova AV, Kozlov AP, Schlom J. The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2471-8.

Nikitin EA, Malakho SG, Biderman BV, Baranova AV, Lorie YY, Shevelev AY, Peklo MM, Vlasik TN, Moskalev EA, Zingerman BV, Vorob'ev IA, Poltarau AB, Sudarikov AB, Vorobjev AI. Expression level of lipoprotein lipase and dystrophin genes predict survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2007 May;48(5):912-22.

2006

Skoblov M, Shakhbazov K, Oshchepkov D, Ivanov D, Guskova A, Ivanov D, Rubtsov P, Prasolov V, Yankovsky N, Baranova A. Human RFP2 gene promoter: unique structure and unusual strength. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 14;342(3):859-66.

Stepanova M, Tiazheleva T, Skoblov M, Baranova A. Potential regulatory SNPs in promoters of human genes: a systematic approach. *Mol Cell Probes.* 2006 Dec;20(6):348-58.

Klimov D, Skoblov M, Ryazantzev A, Tyazheleva T, Baranova A. In silico search for natural antisense transcripts reveals their differential expression in human tumors. *J Bioinform Comput Biol.* 2006 Apr;4(2):515-21.

Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol.* 2006 Aug 14;174(4):535-46.

Litvin O, Tiunova A, Connell-Alberts Y, Panchin Y, Baranova A. What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. *J Cell Mol Med.* 2006 Jul-Sep;10(3):613-34. Review. PubMed PMID: 16989724.

Kozlov AP, Galachyants YP, Dukhovlinov IV, Samusik NA, Baranova AV, Polev DE, Krukovskaya LL. Evolutionarily new sequences expressed in tumors. *Infect Agent Cancer.* 2006 Dec 25;1:8.

2005

Stepanova M, Tiazheleva T, Skoblov M, Baranova A. A comparative analysis of relative occurrence of transcription factor binding sites in vertebrate genomes and gene promoter areas. *Bioinformatics.* 2005 May 1;21(9):1789-96.

Krukovskaja LL, Baranova A, Tyezelova T, Polev D, Kozlov AP. Experimental study of human expressed sequences newly identified in silico as tumor specific. *Tumour Biol.* 2005 Jan-Feb;26(1):17-24.

Gus'kova AA, Zagurnyĭ AV, Skoblov M Iu, Baranova AV, Andronova VL, Iankovskii NK, Galegov GA, Skoblov IuS. Molecular genetic analysis of thymidine kinase from herpes simplex virus type 1. *Mol Biol (Mosk)*. 2005 Jan-Feb;39(1):155-8.

2004

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. 2004 Apr;83(4):706-16.

2003

Ivanov DV, Tyazhelova TV, Lemonnier L, Kononenko N, Pestova AA, Nikitin EA, Prevarskaya N, Skryma R, Panchin YV, Yankovsky NK, Baranova AV. A new human gene KCNRG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3. *FEBS Lett.* 2003 Mar 27;539(1-3):156-60.

Semova N, Kapanadze B, Corcoran M, Kutsenko A, Baranova A, Semov A. Molecular cloning, structural analysis, and expression of a human IRLB, MYC promoter-binding protein: new DENN domain-containing protein family emerges. *Genomics*. 2003 Sep;82(3):343-54.

van Everdink WJ, Baranova A, Lummen C, Tyazhelova T, Looman MW, Ivanov D, Verlind E, Pestova A, Faber H, van der Veen AY, Yankovsky N, Vellenga E, Buys CH. RFP2, c13ORF1, and FAM10A4 are the most likely tumor suppressor gene candidates for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Oct 1;146(1):48-57.

Baranova A, Hammarsund M, Ivanov D, Skoblov M, Sangfelt O, Corcoran M, Borodina T, Makeeva N, Pestova A, Tyazhelova T, Nazarenko S, Gorreta F, Alsheddi T, Schlauch K, Nikitin E, Kapanadze B, Shagin D, Poltaraus A, Ivanovich Vorobiev A, Zabarovsky E, Lukianov S, Chandhoke V, Ibbotson R, Oscier D, Einhorn S, Grander D, Yankovsky N. Distinct organization of the candidate tumor suppressor gene RFP2 in human and mouse: multiple mRNA isoforms in both species- and human-specific antisense transcript RFP2OS. *Gene*. 2003 Dec 4;321:103-12.