

· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · УОТСОН · КРИК · ЧАРГАФФ ·

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

ВЕСТНИК
биотехнологии
и физико-химической
биологии
имени Ю.А. Овчинникова



Т. 1, № 1
2005

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Научно-практический журнал

Главный редактор

Р.Г. Васильев

Редакционная коллегия

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, Ю.В. Махотин, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), А.А. Воробьев (Москва),
В.Г. Дебабов (Москва), В.В. Зверев (Москва), А.И. Иваненко (Москва),
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пуцзино), М.П. Кирпичников (Москва),
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва), Т.В. Овчинникова (Москва),
О.Н. Озолинь (Пуцзино), Е.Н. Орешкин (Москва), А.Н. Панин (Москва),
Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва), Л.С. Сандахчиев (Новосибирск),
К.Г. Скрябин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швеиц (Москва), В.К. Янковский (Москва)

*Печатается при поддержке
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова
и Информационно-аналитического центра
медико-социальных проблем*

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

Вступительное слово. *Р.Г. Василов*4

Оригинальные статьи

Проблемы и перспективы биотехнологического образования в России: создание научно-образовательной системы нового поколения и опыт подготовки специалистов-биотехнологов высшей квалификации в Учебно-научном центре ИБХ РАН. *Т.В. Овчинникова, В.Т. Иванов*5

Новая эндонуклеаза рестрикции PspXI узнает необычную последовательность ДНК 5'-VC[^]TTCGAGB-3'. *Д.А. Гончар, М.А. Абдурашитов, О.А. Беличенко, В.С. Дедков, Н.В. Мезенцева, Ю.Э. Томилова, С.Х. Дегтярев*..... 18

Молекулярно-генетический анализ несиндромальной аутосомно-рецессивной тугоухости и глухоты у больных и в популяциях Волго-Уральского региона *Э.К. Хуснутдинова, Л.У. Джемилева* 24

Действие рекомбинантного фактора некроза опухоли бета на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа у животных с модифицированной иммунореактивностью. *Г.М. Сысоева, В.А. Фадина, Е.Д. Даниленко, В.И. Масычева*..... 32

Модификация методов агробактериальной трансформации *in vitro* и *in vivo* для получения трансгенных растений моркови и гороха. *Н.В. Савельева, Е.Э. Дудник, Л.А. Лутова*..... 37

Использование ферментов гидробионтов для повышения качества рыбных деликатесов в Германии. *О.Я. Мезенова, К. Леше*..... 47

Краткие сообщения

Стволовые клетки и щелевые контакты. *С.М. Гайнуллина* 53

Обзоры

Регуляторы генной экспрессии у бактерий: белковые факторы транскрипции и нетранслируемые РНК. *О.Н. Озолин, К.С. Шавкунов, М.Н. Тутукина* 56

Молекулярная динамика и дизайн био- и наноструктур. *К.В. Шайтан, Е.В. Турлей, Д.Н. Голик, К.Б. Терешкина, О.В. Левцова, И.В. Федик, А.К. Шайтан, М.П. Кирпичников*..... 66

Сравнительные исследования транскрипционных профилей эмбриональных стволовых клеток для разработки клеточных тест-систем нового поколения. *О.Ф. Гордеева, Н.Ю. Красникова, А.В. Ларионова* 79

Страницы истории

К 100-летию со дня рождения Э. Чаргаффа – провозвестника матрицы ДНК. *Р.Г. Василов, В.С. Воробьев*.....85

Юбилейные и знаменательные даты.....88

Хроника

События первого полугодия 2005 г.....90

Информация

Предстоящие мероприятия 2005 г.....92

Правила для авторов.....93

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

Opening address. *R.G. Vasilov*.....4

Original articles

- Problems and prospects of biotechnological education in Russia: creation of scientifically-educational system of new generation and experience in training experts-biotechnologists the top skills in Science-Educational center of Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences. *T.V. Ovchinnikova, V.T. Ivanov*5
- Ψ spXI, a novel restriction endonuclease that recognizes the unusual DNA sequence 5'-VC[^]TCGAGB-3' *D.A. Gonchar, M.A. Abdurashitov, O.A. Belichenko, V.S. Dedkov, N.V. Mezentseva, J.E. Tomilova, S.Kh. Degtyarev* 18
- Molecular-genetic analysis nonsyndromic autosomal recessive deafness in patients and Volga-Ural populations. *E.K. Khusnutdinova, L.U. Dzhemileva* 24
- The action of the recombinant tumor necrosis factor-beta on development of the slow type hypersensitivity reaction in animals with modified immunoreactivity. *G.M. Sysoyev, V.A. Fadina, E.D. Danilenko, V.I. Masycheva* 32
- Modification of methods of in vitro and in vivo agrobacterial transformation for generation carrot and pea transgenic plants *N.V. Savelyeva, E.E. Dudnik, L.A. Lutova* 37
- Use of hydrobionts enzymes for improvement of the quality of fish delicacies in Germany. *O.J. Mezenova, K. Loesche* 47

Short communications

Stem cells and gap junctions. *S.M. Gajnullina*53

Reviews

- Regulators of gene expression in bacteria: the albuminous factors of transcription, and the non-translated RNA. *O.N. Ozolin, K.S. Shavkunov, M.N. Tutukina*..... 56
- Molecular dynamics and design of bio- and nanostructures. *K.V. Shaitan, E.V. Turlej, D.N. Golik, K.B. Tereshkina, O.V. Levtsova, I.V. Fedik, A.K. Shaitan, M.P. Kirpichnikov* 66
- Comparative studies of transcript profiles of the embryonic stem cells for the development of cellular test-systems of new generation. *O.F. Gordeyev, N.Yu. Krasnikova, A.V. Larionov* 79

Pages of history

- On the centenary of the birth of Erwin Chargaff, a predictor of DNA matrix. *R.G. Vasilov, V.S. Vorobyev*.....85
- Anniversary and significant dates.....88

The chronicle

Events of the first half-year 2005.....90

The information

Forthcoming actions 2005.....92

Rules for authors.....93

Вступительное слово

Вниманию читателя представляется первый номер нового отечественного журнала, посвященного биотехнологии и физико-химической биологии.

Я хотел бы сразу обратить внимание на то, что журнал носит имя Юрия Анатольевича Овчинникова. Это не случайно, поскольку он и де юре и де факто равновелик в обеих дисциплинах, с которыми имеет дело выходящее в свет издание. Наверное, излишне характеризовать Ю.А. Овчинникова, но для начинающих исследователей нужно напомнить, что это — наш знаменитый ученый, молекулярный биолог, академик и вице-президент АН СССР, один из основателей биотехнологии в нашей стране, крупный общественный деятель и вообще — легендарная личность. В журнале мы будем не раз обращаться к анализу его деятельности и вклада в науку.

Журнал планируется как периодическое издание, в котором будут представлены вопросы теории и практики биотехнологии с постоянным акцентом на все новое и прогрессивное, что делается в области физико-химической биологии.

Рубрики построены по традиционному принципу, свойственному академическим журналам: колонка главного редактора, оригинальные статьи, краткие сообщения, обзоры, страницы истории, хроника, информация.

Патронат настоящего издания осуществляет Общество биотехнологов России, которое также носит имя Ю.А. Овчинникова, и Информационно-аналитический центр медико-социальных проблем.

Однако не следует думать, что это — чисто корпоративное издание. Страницы журнала открыты не только для членов Общества биотехнологов, но и для всех специалистов, стремящихся поделиться своими знаниями и достижениями в столь бурно развивающейся области, как биотехнология и сопряженные научные направления. Причем, мы ждем авторов и из России, и из ближнего и дальнего зарубежья.

Редколлегия испытывала большое волнение и затруднения по поводу формирования первого номера журнала. Старт должен быть удачным и хотя бы в минимальной степени соответствовать имени Ю.А. Овчинникова и тех фамилий, которые окружают его портрет на обложке. Так уж случилось, что первую статью в редакцию сдала вдова Юрия Анатольевича — Татьяна Владимировна Овчинникова, которая трудится в Институте биоорганической химии РАН, возглавляя Учебно-научный центр. И поэтому мы без колебаний помещаем ее статью на первое место и искренне рады этому знаковому совпадению.

Далее следует подборка статей, главным образом, представителей фундаментальной науки, в которых демонстрируется очень высокий методический и аналитический уровень. В следующих номерах мы постараемся более подробно осветить практические проблемы биотехнологии и биологии. В целом же при формировании композиции и содержания журнала будет поддерживаться мультидисциплинарный подход, характерный для биотехнологии как комплексного научно-практического направления.

В добрый путь, журнал!

**Главный редактор,
вице-президент Общества биотехнологов России,
профессор В.Г. ВАСИЛОВ**

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В РОССИИ: СОЗДАНИЕ НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ОПЫТ ПОДГОТОВКИ СПЕЦИАЛИСТОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ ВЫСШЕЙ КВАЛИФИКАЦИИ В УЧЕБНО-НАУЧНОМ ЦЕНТРЕ ИБХ РАН

Т.В. ОВЧИННИКОВА*, В.Т. ИВАНОВ

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Целью настоящей научно-практической разработки является описание созданной в Учебно-научном центре (УНЦ) Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) новой системы подготовки кадров высшей квалификации в области биотехнологии, основанной на эффективной интеграции научного и образовательного потенциала ИБХ РАН и ряда ведущих профильных вузов РФ. Проанализирован многолетний опыт УНЦ ИБХ РАН — интегрированной научно-образовательной структуры, реализующей на практике принцип опережающей подготовки кадров в области биотехнологии. Дано научное обоснование функционирования УНЦ ИБХ РАН как научно-образовательной структуры, определены формы, принципы и методы взаимодействия академического института и высших учебных заведений в совместной подготовке кадров в области биотехнологии, обеспечивающие координацию научно-образовательной деятельности и организационное взаимодействие академического института и профильных вузов РФ на базе УНЦ ИБХ РАН. Разработаны условия для переподготовки и повышения квалификации специалистов-биотехнологов с учетом междисциплинарности и стремительной динамики развития этой области знания. Разработка иллюстрируется организационным подходом, обеспечивающим фундаментализацию и опережающий характер высшего биотехнологического образования.

Ключевые слова: биотехнология, учебно-научный центр, интеграция, научно-образовательный и производственный комплекс

Подготовка кадров высшей квалификации по приоритетному технологическому направлению «Биотехнология» является одним из необходимых условий для проведения исследований, позволяющих решать проблемы охраны здоровья, обеспечения продовольствием, утилизации отходов, сохранения биосферы, предотвращения экологических катастроф. Стремительный темп развития и междисциплинарный характер этой области знания делает очевидной необходимость объединения усилий научных учреждений, в частности, институтов Российской академии наук, и высших учебных заведений Российской Федерации при подготовке специалистов в области биотехнологии. Практика показала, что эффективной формой реализации этой задачи является создание научно-образовательных центров на базе академических институтов.

* Автор для переписки:

Овчинникова Татьяна Владимировна, доктор биологических наук, руководитель Учебно-научного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
Адрес: 117997 Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
E-mail: ovch@ibch.ru

В Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) с 1982 года активно функционирует интегрированная научно-образовательная структура — Учебно-научный центр (далее УНЦ) ИБХ РАН. УНЦ ИБХ РАН был создан основателем отечественной биотехнологии академиком Ю.А. Овчинниковым, имя которого в настоящее время носит Общество биотехнологов России [1–5]. Понимая, что развитие отечественной биотехнологии невозможно без воспитания научной смены, Юрий Анатольевич уделял вопросу подготовки кадров особое внимание. Будучи человеком, постоянно ищущим новые пути, академик Ю.А. Овчинников все чаще обращался к мысли о необходимости объединения усилий высших учебных заведений и академических институтов при обучении специалистов-биотехнологов, а также дополнения фундаментальности классического университетского образования практической направленностью инженерной подготовки. Решение о создании УНЦ на базе академического института в начале 80-х годов было поистине пионерским. УНЦ ИБХ РАН был первой в стране научно-образовательной структурой,

созданной с целью эффективной интеграции потенциала научного академического института и ряда высших учебных заведений Российской Федерации, нацеленной на подготовку высококвалифицированных кадров для биотехнологии, получение новейших научных знаний и инновационную деятельность в этой приоритетной научной и технологической области. Лишь спустя 15 лет эта инициатива была поддержана в рамках Федеральной целевой программы «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки на 1997–2000 годы», и по всей стране была создана сеть учебно-научных центров, в том числе и при академических институтах. Решением Координационного межведомственного совета по приоритетному направлению «Науки о жизни и биотехнология» от 15 ноября 1993 г. УНЦ ИБХ РАН был утвержден головной организацией по подготовке специалистов высшей квалификации в области наук о жизни и биотехнологии в Российской академии наук. УНЦ ИБХ РАН является головной организацией по подготовке кадров по технологическому направлению «Биотехнология» раздела «Технологии подготовки кадров для национальной технологической базы» ФЦП «Национальная технологическая база». По решению Ученого совета ИБХ РАН 2003 года приоритетным направлением деятельности ИБХ РАН является подготовка научных кадров по физико-химической биологии и биотехнологии.

В УНЦ ИБХ РАН ежегодно проходят обучение более 200 студентов старших курсов 13 профильных кафедр, ведущих подготовку специалистов-биотехнологов на 10 факультетах 7 ведущих вузов Российской Федерации (рис. 1.), среди которых:

- биологический факультет Московского государственного университета (МГУ) им. М.В. Ломоносова (кафедра биоорганической химии – базовая кафедра ИБХ РАН, кафедра физиологии микроорганизмов, кафедра цитологии и гистологии, кафедра биофизики);
- химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова (кафедра химии природных соединений);
- факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова (кафедра биологической и медицинской химии);
- факультет молекулярной и биологической физики Московского физико-технического института (МФТИ), кафедра физико-химической биологии и биотехнологии – базовая кафедра ИБХ РАН;
- факультет биотехнологии и органического синтеза Московской государственной академии тонкой

химической технологии им. М.В. Ломоносова (МИТХТ), кафедра биотехнологии, кафедра химии и технологии биологически активных соединений, кафедра химии и технологии высокомолекулярных соединений;

- фармацевтический факультет Московской медицинской академии (ММА) им. И.М. Сеченова (кафедра общей фармацевтической и биомедицинской технологии);
- факультет подготовки научно-педагогических кадров ММА им. И.М. Сеченова;
- факультет технологии органических веществ и химико-фармацевтических средств Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (РХТУ), кафедра химии и технологии медицинских препаратов;
- ветеринарно-биологический факультет Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина (МГАВМБ), кафедра органической и биологической химии;
- учебный центр физико-химической биологии и биотехнологии (на правах факультета) Пушчинского государственного университета (ПушГУ).

С 2005/2006 учебного года УНЦ ИБХ РАН начинает прием студентов факультета биоинженерии и биоинформатики (ФББ) МГУ им. М.В. Ломоносова и кафедры биохимии медико-биологического факультета Ставропольского государственного университета (СГУ).

В 1995 г. в Филиале ИБХ РАН в г. Пушкино-на-Оке также был создан Учебно-научный центр (УНЦ ФИБХ РАН), в котором проходят подготовку по магистерской образовательной программе студенты Пушчинского государственного университета, Владикавказского государственного университета, Волгоградского государственного университета, Воронежского государственного университета, Вятской государственной сельскохозяйственной академии, Красноярского государственного университета, Кубанского государственного университета, Мордовского государственного университета, Нижегородского государственного университета, Пятигорской государственной фармацевтической академии, Самарского государственного университета, Саратовского государственного университета, Ставропольского государственного университета, Удмуртского государственного университета, Уральского государственного университета.

Партнерство перечисленных выше специализированных кафедр высших учебных заведений и Учебно-

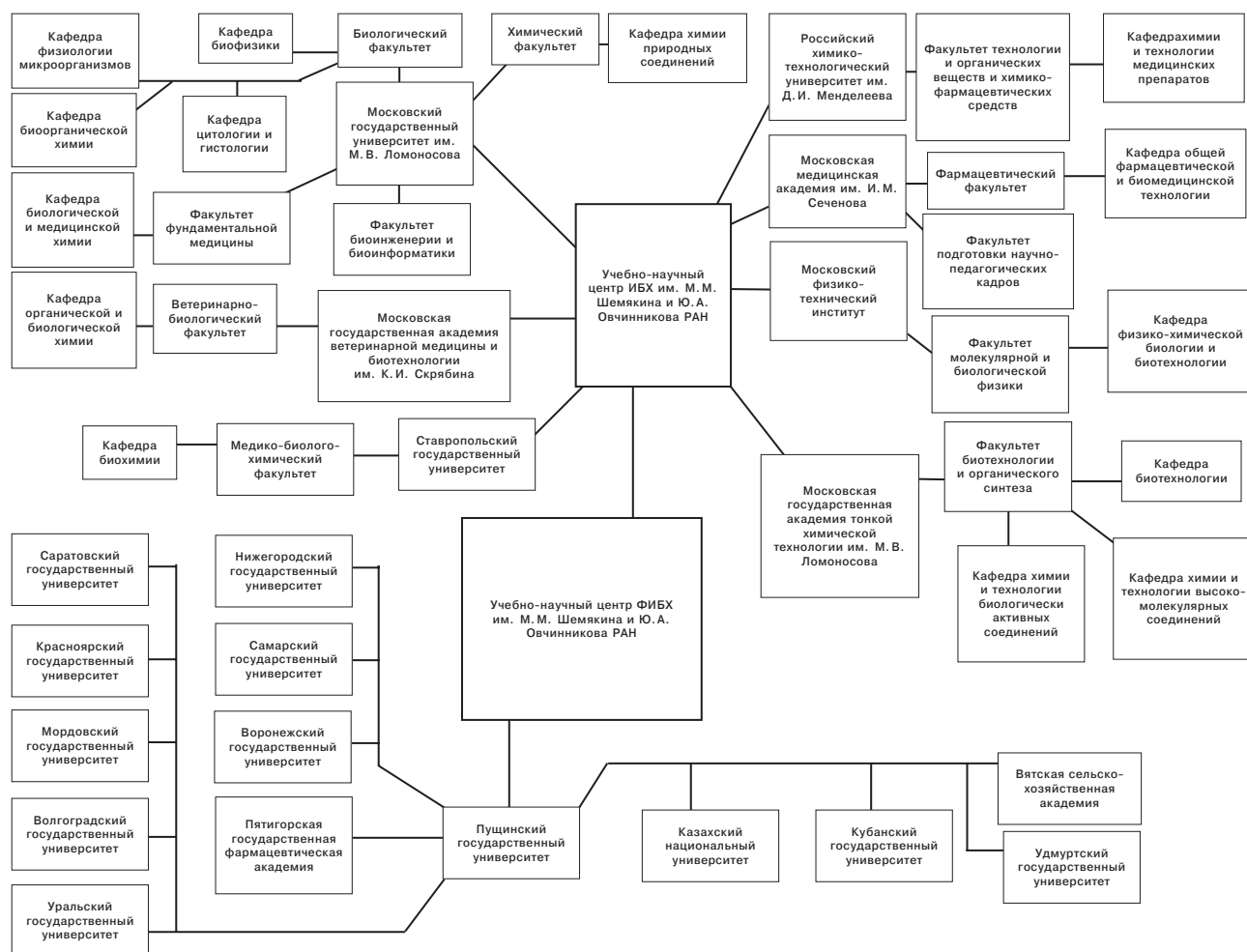


Рис. 1. Структура связей УНЦ ИБХ РАН с вузами

научного центра ИБХ РАН на протяжении многих лет является примером эффективной интеграции высшей школы и академической науки для совместной подготовки высококвалифицированных кадров в области биотехнологии [6–9].

Принципы сотрудничества УНЦ ИБХ РАН со специализированными кафедрами вузов зависят от специфики вуза и определяются учебными планами и программами обучения студентов в УНЦ ИБХ РАН, разработанными совместно с этими кафедрами. Так, например, студенты базовых кафедр ИБХ РАН (кафедры биоорганической химии МГУ и кафедры физико-химической биологии и биотехнологии МФТИ) приходят в УНЦ после трех лет обучения в вузе и в течение последующих лет (МГУ – 2 года, МФТИ – 3 года) осваивают весь курс специальной подготовки по программам обучения в УНЦ ИБХ РАН. Занятия проводятся на 4 курсе – 3 дня в неделю, на 5 курсе – 4 дня в неделю, на 6 курсе – 5 дней в неделю с полной учебной нагрузкой (по 8 часов в

день). Программа обучения студентов базовых кафедр в УНЦ ИБХ РАН включает чтение специальных лекционных курсов с итоговой аттестацией в виде зачетов и экзаменов, выполнение лабораторных работ в рамках больших практикумов по основным направлениям физико-химической биологии и биотехнологии и проведение научно-исследовательской работы по тематике, непосредственно связанной с исследованиями, которые проводятся в научных подразделениях ИБХ РАН [10–20].

Отличительной особенностью учебного процесса на базе УНЦ ИБХ РАН является проведение больших практикумов по новейшим экспериментальным методам физико-химической биологии и биотехнологии, поскольку большое значение для практической подготовки студентов к условиям реального научного исследования придается освоению ими основных навыков и приемов экспериментальной работы. Лабораторные практикумы в УНЦ ИБХ РАН по соотношению учебных часов сопоставимы с основными лекционными

курсами. С целью обеспечения наиболее эффективной передачи навыков практической работы в научной лаборатории занятия по большому практикуму проводятся с небольшими группами студентов (не более 3–4 студентов на одного преподавателя), что максимально приближено к индивидуальной форме освоения образовательной программы. Лабораторные практикумы проводятся с использованием уникального парка научного оборудования ИБХ РАН.

Научные сотрудники ИБХ РАН активно участвуют в учебной работе со студентами. Ведущие ученые ИБХ РАН читают студентам специальные лекционные курсы, принимают участие в проведении лабораторных спецпрактикумов, осуществляют научное руководство студенческими научно-исследовательскими работами. Общее число сотрудников ИБХ РАН и ФИБХ РАН, ведущих преподавательскую деятельность в Учебно-научном центре, в 2004/2005 учебном году составило 53 человека. Среди них — действительные члены и члены-корреспонденты РАН и РАМН, профессора, доктора и кандидаты наук, руководители подразделений и ведущие специалисты ИБХ РАН.

Основные спецкурсы и практикумы для студентов вузов в УНЦ ИБХ РАН [21–22].

Теоретические курсы.

1. Структура и функции пептидов и белков.
2. Основы структурно-функциональной организации ферментов.
3. Химия нуклеиновых кислот.
4. Основы генной инженерии.
5. Липиды и мембраны.
6. Биоэффекторные липиды.
7. Молекулярные механизмы мембранного транспорта.
8. Механизмы клеточной сигнализации.
9. Химия углеводов.
10. Гликобиология.
11. Молекулярные основы иммунологии.
12. Проблемы и достижения молекулярной медицины.
13. Низкомолекулярные биорегуляторы.
14. Физико-химические методы исследования биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов.
 - 14.1. Оптические методы.
 - 14.1.1. Оптическая спектроскопия.
 - 14.1.2. Конфокальная микроскопия.
 - 14.2. Масс-спектрометрия.
 - 14.3. Ядерный магнитный резонанс.
 - 14.4. Рентгеноструктурный анализ.

14.5. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров.

14.6. Молекулярная динамика биомолекул.

15. Биоинформатика.

15.1. Молекулярное моделирование биополимеров.

15.2. Фактографические базы данных в области физико-химической биологии и биотехнологии.

15.3. Научно-библиографические и патентные базы данных в области физико-химической биологии и биотехнологии.

16. Биотехнология.

16.1. Белковая инженерия.

16.2. Инженерная энзимология.

16.3. Мембранная биоинженерия.

16.4. Гликотехнология.

16.5. Генно-инженерная биотехнология животных.

16.6. Генно-инженерная биотехнология растений.

16.7. Промышленная биотехнология.

17. Техника безопасности лабораторных работ.

Практические курсы.

1. Структура и функции пептидов и белков.
2. Химия нуклеиновых кислот и основы генной инженерии.
3. Липиды и мембраны.
4. Молекулярные основы иммунологии.
5. Физико-химические методы исследования биополимеров и биорегуляторов.
6. Биохимия.
7. Биоинформатика.

После прохождения курса теоретической и практической подготовки в УНЦ студенты направляются в исследовательские лаборатории и группы ИБХ РАН и ФИБХ РАН для выполнения курсовых и дипломных работ. Для студентов МГУ и ММА курс обучения в УНЦ ИБХ РАН завершается защитой дипломной работы на 5-м курсе. Студенты МФТИ и МИТХТ на 4-м курсе защищают диплом бакалавра, а в конце 6 курса представляют к защите магистерскую диссертацию. Студенты других специализированных кафедр московских вузов проходят обучение в УНЦ ИБХ РАН в той форме и по тем учебным планам, которые определяются по согласованию с кафедрами.

Ежегодно в дни зимних каникул УНЦ ИБХ РАН проводит зимние студенческие школы для студентов перечисленных выше вузов. В работе школы в разные годы принимали участие от 200 до 600 слушателей. В частности, в феврале 2005 г. Учебно-научным центром ИБХ РАН была проведена XVII

зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» [23–27].

Основные статистические показатели образовательной деятельности УНЦ ИБХ РАН за последние 3 года (табл. 1).

Таблица 1

**Итоги работы УНЦ ИБХ РАН
за 2002–2004 гг.**

| | Наименование | Годы | УНЦ ИБХ | УНЦ ФИБХ | Всего |
|----|---|------|------------|-------------|-------|
| 1. | Общее число студентов | 2002 | 177 | 19 | 196 |
| | | 2000 | 212 | 13 | 225 |
| | | 2004 | 223 | 20 | 243 |
| 2. | Число курсовых и дипломных работ | 2002 | 80 | 19 | 99 |
| | | 2003 | 105 | 13 | 118 |
| | | 2004 | 86 | 20 | 106 |
| 3. | Число аспирантов | 2002 | 61 | 9 | 70 |
| | | 2003 | 70 | 9 | 79 |
| | | 2004 | 75 | 11 | 86 |
| 4. | Число сотрудников, выполняющих преподавательскую работу | 2002 | 43 | 9 | 52 |
| | | 2003 | 41 | 8 | 49 |
| | | 2004 | 44 | 9 | 53 |

Преимущество такой системы подготовки кадров состоит в значительном сокращении сроков адаптации молодых специалистов при переходе от учебы к научной работе, раннем привлечении студентов к участию в научных исследованиях и, как следствие, заметном росте числа научных публикаций по материалам студенческих научных работ. Результаты студенческих научно-исследовательских работ представляются в виде докладов и стендовых сообщений на научных конференциях и молодежных научных школах. Лучшие из выпускников имеют возможность продолжить обучение в аспирантуре ИБХ РАН.

Немаловажное значение для эффективной работы по подготовке специалистов-биотехнологов имеет постоянное тесное взаимодействие УНЦ ИБХ РАН со специализированными кафедрами вузов. Все вопросы, касающиеся образовательных программ, учебных планов, расписаний занятий, контроля посещаемости студентов, организации учебной работы, сдачи экзаменов и зачетов, защиты курсовых и дипломных работ, решаются УНЦ ИБХ РАН совместно с кафедрами, что отражается в двусторонних договорах о сотрудничестве в области подготовки кадров для биотехнологии.

УНЦ ИБХ РАН реализует свои функции, опираясь на материально-техническую базу ИБХ РАН.

ИБХ РАН располагает лабораторными помещениями для проведения научно-образовательной деятельности в области биотехнологии, включая термостатируемые и холодные комнаты, микробиологические боксы, ламинарные шкафы для работы в условиях стерильности, боксы и инкубаторы для работы и с культурами клеток и их хранения, другое современное научное оборудование для проведения биохимических, молекулярно-биологических и микробиологических исследований, а также для работ с применением генно-инженерной технологии. В ИБХ РАН имеются скоростные центрифуги, приборы для электрофореза и изоэлектрофокусирования, аминокислотные анализаторы, автоматические секвенаторы аминокислотной и нуклеотидной последовательности, автоматические синтезаторы пептидов и олигонуклеотидов, микроскопы, хроматографы, спектрофотометры, термостаты, низкотемпературные и обычные холодильники, оборудование для хранения биопрепаратов при низких температурах. Такой набор специального лабораторного оборудования обеспечивает не только возможность освоения студентами вузов новейших экспериментальных методов биотехнологии, но и обеспечивают полную безопасность при проведении этих работ как для учащихся вузов, так и для окружающей среды.

ИБХ РАН располагает уникальным научным оборудованием и вычислительной техникой для проведения фундаментальных исследований биологически активных соединений — четырьмя ЯМР-спектрометрами (Avance 700, Avance 600, Avance DRX-500 (Брукер, Германия) и UNITY 600 (Вариан, США) и тремя вычислительными кластерами — 48-процессорным кластером на базе AMD Opteron-230 с коммуникационной средой InfiniBand; 32-процессорным кластером на базе AMD Athlon MP 2800+ с коммуникационной средой Myrinet и 24-процессорным кластером на базе AMD Athlon MP 2200+ с коммуникационной средой Gigabit Ethernet. Все компьютеры объединены в локальную сеть и имеют защищенный выход в сеть Internet. В ИБХ РАН имеются пакеты программ молекулярного моделирования SYBYL (Tripos), GROMACS, FANTOM, MODELLER, WHAT IF, RasMol, MOLMOL, BOSS, THREADER и др., имеется доступ к вычислительным ресурсам Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН, РФФИ и Минобрнауки РФ. В ИБХ РАН с 2000 г. работает Центр коллективного пользования «Центр биомолекулярной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения», преобра-

зованный в 2004 году в ЦКП «Физические методы исследования биополимеров».

Наличие в УНЦ ИБХ РАН специальных лабораторных помещений, оснащенных современным оборудованием, позволяет осуществлять на высоком уровне научно-образовательный процесс для студентов профильных вузов, что практически недоступно для каждого отдельно взятого вуза. Интеграция нескольких специальных кафедр различных учебных заведений с одним УНЦ на базе академического института позволяет значительно сокращать общие затраты на научно-образовательный процесс. Наряду с этим перед ИБХ РАН неизбежно возникают финансовые проблемы, связанные с необходимостью дополнительного приборного оснащения и поддержки в рабочем состоянии парка приборов, активно используемого в учебном процессе. Эти проблемы могут быть решены путем целевого финансирования учебно-научных центров, выполняющих функции межвузовских научно-образовательных структур, по принципу финансирования центров коллективного пользования.

Одним из подразделений ИБХ РАН является уникальное опытное биотехнологическое производство, укомплектованное собственными кадрами и всем необходимым оборудованием для разработки технологии получения и выпуска новых лекарственных средств и препаратов для ветеринарии и сельского хозяйства. В составе Филиала ИБХ в городе Пущино Московской области имеется уникальная станция искусственного климата «Биотрон» для проведения исследований в области биоинженерии трансгенных растений, а также научно-производственный комплекс для предклинических испытаний лекарственных препаратов и фармацевтических средств.

Основные источники финансирования образовательной деятельности УНЦ ИБХ РАН за последние 3 года:

- 1) ФЦП «Национальная технологическая база», раздел «Технологии подготовки кадров для развития национальной технологической базы», головная организация по целевой подготовке кадров по технологическому направлению «Биотехнология».
- 2) ФЦП «Интеграция науки и высшего образования России на 2002–2006 годы».
- 3) ЦП Президиума РАН «Поддержка молодых ученых», направление «Поддержка деятельности базовых кафедр ведущих российских вузов и научно-образовательных центров, созданных при институтах РАН».

- 4) Международные научные проекты, в том числе Международные проекты Министерства науки и образования РФ, а также гранты Нидерландской организации научных исследований (NWO), Швейцарского фонда научных исследований (SNSF), Международной ассоциации по содействию сотрудничеству с учеными новых независимых государств бывшего Советского союза (INTAS), Международного научно-технического центра (ISIC), Программа международной комиссии по молекулярной и клеточной биологии (МСВН) Организации объединенных наций по вопросам образования, науки и культуры (UNESCO).

Основные направления научных исследований УНЦ соответствуют приоритетным направлениям научных исследований, утвержденных Ученым советом ИБХ РАН и Президиумом РАН, одним из которых является направление «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии». По решению Ученого совета ИБХ РАН, утвержденному Президиумом РАН, приоритетным направлением деятельности ИБХ РАН является подготовка научных кадров по физико-химической биологии и биотехнологии.

Сотрудниками ИБХ РАН в течение последних пяти (2000–2004 гг.) лет опубликовано около 2350 научных статей в отечественных и зарубежных журналах, материалах симпозиумов и конференций, 4 монографии. В 2000–2004 гг. сотрудниками ИБХ РАН было представлено более 600 докладов на российских конференциях и школах и более 400 — на международных. На базе ИБХ РАН было проведено 14 конференций, в том числе 7 международных, защищено 4 докторских и 62 кандидатских диссертаций.

В последние годы в ИБХ РАН были проведены следующие научные и технологические разработки:

- технология получения инсурана (инсулин человеческий генно-инженерный);
- биотехнология получения субстанции лекарственного препарата «Рибавирин» и его аналогов для терапии тяжелых вирусных заболеваний человека, включая гепатит С;
- биотехнология получения субстанций лекарственных препаратов на основе модифицированных нуклеозидов для лечения лейкозов и аутоиммунных заболеваний человека;
- технология получения субстанции и лекарственных форм препарата на основе генно-инженерного гормона роста человека (соматотропина);
- технология получения субстанции и лекарственных форм препарата на основе

генно-инженерного гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ);

- технология получения дисахарида глюкозаминилмурамовой кислоты — полупродуктов для получения препарата «Ликопид».

ИБХ РАН имеет 44 действующих патента в РФ, 5 лицензионных договоров, 4 договора об уступке товарных знаков и подана 21 заявка на изобретения.

Научно-исследовательская деятельность проводится в рамках следующих федеральных, региональных и международных научных программ:

- ФЦП «Национальная технологическая база»;
- ФЦП «Интеграция науки и высшего образования России»;
- МНТП «Вакцины нового поколения и диагностические системы будущего»;
- ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники», подпрограмма «Новейшие методы биоинженерии» (проекты «Белковая инженерия», «Генная инженерия и трансгеноз», «Разработка биотехнологии получения медицинских препаратов нового поколения для лечения распространенных заболеваний человека», «Геном человека»);
- ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002–2006 гг.»;
- приоритетные направления науки и техники: «Развитие новых направлений биотехнологии и обеспечение биологической безопасности», «Развитие приборной базы научных организаций и вузов»;
- гранты Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) и инновационные проекты (за последние 5 лет поддержано более 450 проектов);
- Федеральная комплексная программа «Физико-химическая биология» РАН;
- гранты Президента РФ для поддержки молодых ученых и ведущих научных школ РФ;
- комплексная программа Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»;
- международные проекты в рамках межправительственных соглашений;
- гранты Правительства г. Москвы;
- гранты фирмы ASGL (Россия);
- международные научные программы (было поддержано более 100 проектов, среди них проекты Germ. Fed. Min. Res. Tech. (Герма-

ния), INTAS, ISTC (Международный научно-технический центр, МНТЦ), INSERM (Франция), CRDF (США), Volkswagen Foundation (Германия.), INCO-Copernicus, FIRCA (США), HHMI (США), DOE (Министерство энергетики, США), NIH (США), FEBS, DFG (Германия.), Международный грант ФРГ (Германия), NATO (США), Bayer AG (Германия), ICGEB (Международный центр генетической инженерии), SNF (Швейцария), Wellcome Trust (Великобритания).

ИБХ РАН принимает участие в работе выставок, в том числе в постоянно действующей выставке научных достижений при Президиуме РАН, выставке «Жизнь без диабета» в Выставочном павильоне ВДНХ, выставке Третьего Международного форума «Высокие технологии XXI века» в Выставочном комплексе «Экспоцентр на Красной Пресне», в Торгово-экономической ярмарке в г. Харбине (КНР), Международной научно-технической выставке «Технологии из России-2002» в г. Шэньян (КНР); выставке Третьего Международного Форума «Высокие технологии оборонного комплекса». За последние 5 лет на выставках ИБХ РАН получено 4 награды за инновационную деятельность.

Сотрудниками ИБХ РАН было получено 4 Ленинских премии, 25 Государственных премий в области науки и техники, 14 премий Правительства РФ в области науки и техники, 4 премии Ленинского комсомола, 12 именных премий РАН, работы ИБХ РАН были неоднократными победителями конкурса Координационного совета по приоритетному направлению «Технологии живых систем». Сотрудники ИБХ РАН являются представителями РФ в Международном союзе по белковой инженерии (INPEC).

Фундаментальные исследования и технологические разработки в области биотехнологии осуществляются в ИБХ РАН с участием студентов и аспирантов профильных вузов, что позволяет получать новейшие научные знания, создавать новые технологии на основе эффективной интеграции научного, кадрового потенциала и материально-технических возможностей академического института и высшей школы. Создание условий для обучения студентов профильных вузов в области биотехнологии на базе научно-образовательного центра ИБХ РАН делает возможным раннее вовлечение талантливой молодежи в научно-исследовательскую работу еще на стадии обучения.

Совместная научно-образовательная и инновационная деятельность в области биотехнологии на

базе УНЦ ИБХ РАН позволяет обеспечить опережающий характер высшего биотехнологического образования путем оперативного внедрения в учебный процесс новейших разделов биотехнологии. УНЦ ИБХ РАН совместно с профильными вузами участвует в разработке новых систем, методов и форм образовательной деятельности, подготовке и оптимизации образовательных стандартов и учебных программ в области биотехнологии, определении перспективных направлений и специализаций биотехнологического образования, приводящих к его выходу на качественно новый уровень. Использование результатов совместных исследований и разработок в учебном процессе обеспечивает подготовку специалистов-биотехнологов высшей квалификации на самом современном уровне в соответствии с мировыми стандартами. Организация практического обучения студентов специализированных кафедр профильных высших учебных заведений на базе УНЦ ИБХ РАН позволяет сократить затраты на образовательный процесс за счет использования материально-технической базы и научного потенциала интегрированной научно-образовательной структуры для обучения на базе одного академического института студентов целого ряда ведущих вузов РФ. Совместное проведение научных студенческих школ, молодежных научных конференций, конкурсов молодых исследователей позволяет создать условия для закрепления талантливой молодежи в сфере науки и высшего образования России. На базе УНЦ ИБХ РАН проводится переподготовка и повышение квалификации специалистов с учетом междисциплинарности и динамики развития современной биотехнологической науки.

Параллельно с обучением студентов профильных вузов фундаментальным основам биотехнологии в ИБХ РАН создана научно-образовательная опытно-экспериментальная база на основе биотехнологического производства ИБХ РАН, укомплектованного всем необходимым оборудованием для разработки технологии получения и выпуска новых лекарственных средств и препаратов для ветеринарии и сельского хозяйства, а также на базе станции искусственного климата «Биотрон» для проведения исследований в области биоинженерии трансгенных растений и научно-производственного комплекса предклинических испытаний лекарственных препаратов и фармацевтических средств в Филиале ИБХ РАН в г. Пущино Московской области. На основании изложенного выше можно констатировать, что в ИБХ РАН создан и успешно функционирует уникальный научно-образовательный и производственный биотехнологический комплекс, соответствующий современным международным стандартам.

Международная деятельность Учебно-научного центра ИБХ РАН.

УНЦ ИБХ РАН активно сотрудничает в области подготовки и переподготовки специалистов-биотехнологов с зарубежными университетами и научно-исследовательскими институтами. Партнерами УНЦ ИБХ РАН в разные годы являлись:

- Будапештский университет (Венгрия);
- Вроцлавский университет (Польша);
- Институт биоорганической химии, г. Познань (Польша);
- Институт биохимии, г. Цюрих (Швейцария);
- Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Цюрих (Швейцария);
- Институт химии, г. Лейден (Нидерланды);
- Лейденский университет (Нидерланды);
- Парижский университет – Сорбонна (Франция);
- Политехнический институт, г. Лодзь (Польша);
- Свободный университет, г. Берлин (Германия);
- Сегедский университет (Венгрия);
- Софийский университет им. Климента Охридского (Болгария);
- Стокгольмский университет (Швеция);
- Университет им. Вильгельма Гумбольдта, г. Берлин (Германия);
- Университет им. Мартина Лютера, г. Галле (Германия);
- Университет им. Адама Мицкевича, г. Познань (Польша);
- Университет им. Марии Склодовской-Кюри, г. Люблин (Польша);
- Учебно-научный центр по изучению ДНК, г. Колд-Спринг-Харбор (США).

УНЦ ИБХ РАН ежегодно организует международные студенческие и молодежные научные школы по физико-химической биологии и биотехнологии. Так, в феврале 2005 г. была проведена XVII молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». УНЦ ИБХ РАН совместно с ММА им. И.М.Сеченова ежегодно проводит международную школу молодых исследователей «Достижения молекулярной биологии и новые эффективные способы лечения человека». Международные студенческие и молодежные научные школы проводятся УНЦ ИБХ РАН при поддержке ЮНЕСКО в рамках комиссии по молекулярной и клеточной биологии (МСВН). При поддержке фондов научных исследований Швейцарии (SNSF) и Германии

(DFG) были проведены международные школы и семинары по структуре и функции белков. В разные годы в работе студенческих и молодежных научных школ принимали участие слушатели из Индии, Кипра, Ливана, Марокко, Сирии, Туниса, Непала, Эфиопии, Ганы, Габона, а также ученые и преподаватели из Болгарии, Великобритании, Германии, Дании, Италии, Нидерландов, США, Швейцарии.

В течение ряда лет УНЦ ИБХ РАН проводил практические занятия по биотехнологии для иностранных студентов Российского университета дружбы народов, в том числе для студентов из Ганы, Габона, Индии, Кипра, Ливана, Марокко, Сирии, Туниса, Непала, Эфиопии. Учитывая заслуги УНЦ ИБХ РАН в области обучения иностранных студентов и подготовки специалистов-биотехнологов, его коллектив был награжден памятной медалью Российского университета дружбы народов.

Многолетний опыт международного сотрудничества позволяет УНЦ ИБХ РАН определять формы и методы интеграции отечественного биотехнологического образования в международную систему.

Организация и поддержка научно-образовательного центра в области биотехнологии на базе УНЦ ИБХ РАН.

Развитие принципов эффективной интеграции ИБХ РАН, являющегося лидером в области биотехнологии, и ряда ведущих профильных высших учебных заведений Российской Федерации для обеспечения подготовки кадров высшей квалификации по новейшим направлениям биотехнологии создает условия для формирования современной инфраструктуры биотехнологического образования в России и организации национального научно-образовательного центра в области биотехнологии на базе Учебно-научного центра ИБХ РАН. В настоящее время УНЦ ИБХ РАН разработаны предложения по механизму эффективной интеграции научного и кадрового потенциала и материально-технических возможностей ИБХ РАН и ряда профильных вузов для получения новых фундаментальных знаний и развития научно-образовательной и инновационной деятельности в области биотехнологии. Совместно с высшими учебными заведениями на базе УНЦ ИБХ РАН создаются новые системы, методы и формы интеграции научной и образовательной деятельности, проводится работа по подготовке и оптимизации образовательных стандартов и программ высшего профессионального образования в области биотехнологии и по определению перспективных направлений и специализаций

биотехнологического образования, приводящих к его выходу на мировой уровень. В настоящее время специалистами УНЦ ИБХ РАН и специализированных кафедр профильных вузов разрабатываются рекомендации по формированию современной инфраструктуры биотехнологического образования с целью достижения синергического эффекта при интеграции научной и образовательной деятельности в рамках создания и функционирования интегрированных научно-образовательных структур, а также определяются методы и формы интеграции отечественного высшего профессионального биотехнологического образования в международные системы.

Создание научно-образовательного центра в области биотехнологии на базе УНЦ ИБХ РАН позволит:

- расширить обучение в области биотехнологии студентов старших курсов специализированных кафедр ряда профильных вузов (МГУ, МИТХТ, РХТУ, МФТИ, МГАВМБ, РУДН, ПушГУ, СГУ и др.), используя УНЦ ИБХ РАН в качестве межвузовской базы при подготовке специалистов-биотехнологов;
- создать условия для переподготовки и повышения квалификации специалистов с учетом междисциплинарности и динамики развития современной биотехнологии;
- обеспечить эффективную интеграцию научного и кадрового потенциала и материально-технических возможностей ИБХ РАН и профильных вузов РФ для получения новых знаний и развития научно-образовательной и инновационной деятельности в области биотехнологии;
- разработать организационные формы, принципы и методы взаимодействия академического института и высших учебных заведений в совместной подготовке кадров в области биотехнологии;
- обеспечить дальнейшую координацию научно-образовательной деятельности и организационное взаимодействие ИБХ РАН и профильных вузов РФ на базе УНЦ ИБХ РАН;
- создать научно-образовательную опытно-экспериментальную биотехнологическую базу на основе биотехнологического производства ИБХ РАН;
- создать систему переподготовки и повышения квалификации специалистов-биотехнологов региональных профильных вузов и научно-исследовательских институтов РФ на базе УНЦ ИБХ РАН;

- разработать систему дистанционной переподготовки и повышения квалификации специалистов-биотехнологов региональных профильных вузов и научно-исследовательских институтов РФ;
- разработать проекты новых образовательных программ по современным разделам биотехнологии, обеспечивающих опережающий характер биотехнологического образования путем оперативного внедрения в учебный процесс новейших разделов биотехнологии;
- разработать новые, в том числе электронные, учебные пособия по новейшим разделам биотехнологии;
- совместно с профильными вузами разработать новые системы, методы и формы образовательной деятельности, подготовить рекомендации по оптимизации образовательных стандартов и учебных программ в области биотехнологии, определить перспективные направления развития и специализации биотехнологического образования, приводящие к его выходу на мировой уровень;
- совместно с вузами определить формы и методы интеграции отечественного биотехнологического образования в международную систему;
- разработать модели интегрированной системы обучения на базе научно-образовательного центра, реализующей принцип опережающей подготовки кадров в области биотехнологии, включающей в себя систему мер по закреплению и стимулированию молодых специалистов в России.

Созданная в Учебно-научном центре ИБХ РАН система подготовки кадров позволяет преодолеть возникающее противоречие между стремительным развитием естественнонаучных знаний в области биотехнологии и возможностями их усвоения студентами, а также противоречие между все возрастающим объемом накопленных знаний и сроками подготовки специалистов. Стратегия развития современного биотехнологического образования на базе УНЦ ИБХ РАН учитывает существующее противоречие между классическим биотехнологическим образованием, отличающимся фундаментальной базовой подготовкой и некоторой отстраненностью от практического приложения полученных знаний, и современными тенденциями в развитии биотехнологии, требующими выхода на инновационное развитие производственной сферы. Это противоречие может быть преодолено только путем сохранения лучших традиций классического университетского образования наряду с планомерным внедрением в учебный процесс

современных разделов биотехнологии и новейших информационных технологий, а также ознакомлением студентов с научно-производственной сферой при проведении практического обучения на опытно-экспериментальной базе.

Передовые информационные технологии являются важнейшим фактором развития системы современного биотехнологического образования. Использование компьютерных технологий создает принципиально новые возможности не только в получении новых знаний в области биотехнологии, но и в приобретении профессиональных навыков. Внедрение современных информационных технологий влияет как на содержание, так и на качество биотехнологического образования. В последние годы бурно развивается система информационного обеспечения биотехнологических исследований, включающая электронный доступ к научно-библиографическим массивам. Электронными хранилищами научных и практических биотехнологических знаний являются специализированные базы данных (БД). Наиболее интересными для студентов, аспирантов и исследователей, работающих в различных областях биотехнологии, являются Научная электронная библиотека e-Library (Россия) и БД: Medline (США), Derwent Biotechnology Abstract (Великобритания), Science Citation Index (США), EMBASE (Нидерланды). Библиотека e-Library создана в 1998 г. при финансовой поддержке РФФИ. Она имеет более 6000 полнотекстовых журналов и предоставляет выход к БД Science Citation Index (1991–1993 гг.). БД Medline создается Национальной медицинской библиотекой США с 1950 г. и содержит информацию на основе более 6000 журналов, издаваемых в 70 странах. БД Biotechnology Abstracts создается английской фирмой Derwent с 1982 г. Около 30% документов этой БД составляют патенты. БД EMBASE создается издательством Elsevier (Нидерланды) с 1974 г. В отличие от Medline она на две трети состоит из источников, опубликованных в неанглоязычных странах. БД формируется на базе 3500 журналов. БД USPATFULL, JAPIO, INPADOC содержат полнотекстовые документы патентных ведомств США, Японии и Европы, соответственно. БД, содержащие сведения о появлении, продвижении на рынке и фирмах-производителях новых биотехнологических продуктов: BioBusiness (создана в 1985 г. Информационной службой по биологии BIOSIS, США), CELL (создана в 1981 г. фирмой CELL Tech Ltd., Великобритания), PROMT (создана в 1978 г. компанией Information Access Co., Великобритания),

RHIN (создана в 1980 г. компанией Pharmaceutical and Healthcare Industries News, Великобритания). Приведенные примеры дают представление лишь о небольшой части электронных специализированных ресурсов, доступных исследователям в области биотехнологии. Использование современных информационных технологий и ресурсов является важным и неотъемлемым условием успешного развития биотехнологического образования в XXI веке [28–37].

В целях повышения эффективности контактов «институт-вуз» необходимо дальнейшее укрепление юридической базы для проведения образовательной деятельности в учебно-научных центрах при академических институтах. В пункте 2 статьи 11 Федерального закона 122-ФЗ «О науке и государственной научно-технической политике» в редакции закона от 22 августа 2004 года один из основных принципов государственной научно-технической политики сформулирован следующим образом: «Интеграция научной, научно-технической и образовательной деятельности на основе различных форм участия работников, аспирантов и студентов образовательных учреждений высшего профессионального образования в научных исследованиях и экспериментальных разработках посредством создания учебно-научных комплексов на базе образовательных учреждений высшего профессионального образования, научных организаций академий наук, имеющих государственный статус, а также научных организаций федеральных органов власти». Положение нового Федерального закона «О науке и государственной научно-технической политике», касающееся учебно-научных центров на базе научных академических организаций, должно найти свое отражение в новой редакции Федерального закона «О высшем и послевузовском профессиональном образовании». Опыт взаимодействия УНЦ ИБХ РАН и специализированных кафедр профильных вузов показывает, что при разной ведомственной подчиненности возможно на практике обеспечить полную интеграцию исследовательского и учебного процессов для обеспечения подготовки кадров высшей квалификации в области биотехнологии.

Таким образом, система подготовки и переподготовки научных и научно-педагогических кадров высшей квалификации в области биотехнологии на базе УНЦ ИБХ РАН является примером эффективной интеграции научного и образовательного потенциала ведущего академического института в области биотехнологии и ряда профильных высших учебных заведений и комплексного использования их материально-технических и кадровых возможностях

с целью осуществления совместных исследований и разработок, проведения учебного процесса и развития инновационной деятельности в научной и образовательной сферах. Созданная система подготовки специалистов-биотехнологов позволяет добиться фундаментализации высшего биотехнологического образования. Важнейшим достижением такой системы подготовки специалистов-биотехнологов для работы в сфере науки и производства является опережающее образование, состоящее в глубоком предварительном анализе современных тенденций и направлений в фундаментальной биотехнологии и своевременной корректировке образовательных программ и учебных планов в вузах с учетом требований времени [17].

Литература

1. Иванов В.Т. Очерк научной деятельности академика Ю.А. Овчинникова (1934–1988) / В сб.: «Ю.А. Овчинников. Химия жизни. Избранные труды». – М.: Наука, 1990. – 496 с.
2. Юрий Анатольевич Овчинников. Жизнь и научная деятельность / Под ред. В.Т. Иванова. – М.: Наука, 1991. – 255 с.
3. Юрий Анатольевич Овчинников. Библиография ученых СССР / Сост. Н.Б. Полякова, Е.Д. Дьяченко, Т.В. Овчинникова. – М.: Наука, 1991. – 153 с.
4. Воробьев В.С. Академик Овчинников – легенда российской биологии // Медицинская газета, 58, 30 июля 2004 г.
5. Овчинникова Т.В. Наукою призванный: творец и организатор. Юрий Анатольевич Овчинников (1934–1988) / В кн.: «Судьбы творцов российской науки». – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – С. 196–205.
6. Овчинникова Т.В. Учебно-научный центр Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН: 20-летний опыт подготовки кадров в области физико-химической биологии и биотехнологии и перспективы развития / Тезисы докладов рабочего совещания «Об опыте создания учебно-научных центров на базе высших учебных заведений и институтов Российской академии наук». Саратов, 27–29 мая 2003 г. – С. 19–21.
7. Овчинникова Т.В. Интеграция науки и высшего образования в области физико-химической биологии и биотехнологии на базе Учебно-научного центра ИБХ РАН / Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «Интеграция науки и высшего образования России». Самара–Казань, 14–17 сентября 2001 г. – Ч. 2. – С. 18–19.
8. [Овчинникова Т.В.] Ovchinnikova T.V. Science-Educational Center. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry. Scientific Report. – Moscow, 2000. – P. 197–204.
9. Овчинникова Т.В., Барсуков Л.И., Северцова И.В., Шамборант О.Г. Учебно-научный центр Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина АН

- СССР. Опыт подготовки молодых научных кадров на основе тесного сотрудничества с высшими учебными заведениями / Тезисы докладов на международном семинаре «Подготовка, повышение квалификации и аттестация научных и педагогических кадров». Москва, 11–16 июня 1990 г. — С. 51–53.
10. Овчинникова Т.В., Быков В.А., Завада Л.Л., Ефремова Н.Б. Совместная работа кафедры медицинской биотехнологии ММА им. И.М. Сеченова и Учебно-научного центра ИБХ им. М.М. Шемякина РАН по подготовке научных кадров / Материалы научно-методической конференции «Проблемы высшего медицинского образования». Москва, 26–27 октября 1993 г. — С. 43–44.
 11. Овчинникова Т.В., Завада Л.Л., Ефремова Н.Б. Совместная работа ММА им. И.М. Сеченова и ИБХ РАН по подготовке кадров. Проблемы интеграции педагогического процесса / Материалы научно-методической конференции «Интеграция учебного процесса при переходе на многоуровневую систему высшего медицинского и фармацевтического образования». Москва, октябрь 1994 г. — С. 63–64.
 12. Овчинникова Т.В., Потапенко Н.А., Завада Л.Л., Сазыкин Ю.О., Быков В.А. Интеграция учебного процесса при совместной работе по подготовке научных кадров в области медицинской биотехнологии / Тезисы научно-практической конференции ММА им. И.М. Сеченова. Москва, 1996 г. — С. 109–110.
 13. Овчинникова Т.В., Завада Л.Л., Сазыкин Ю.О., Быков В.А. Интеграция высшего биомедицинского образования и фундаментальной науки / Материалы международной конференции «Фармацевтическая биоэтика». Москва, 1997. — С. 62–63.
 14. Завада Л.Л., Овчинникова Т.В., Григоренко В.Г., Маркелов М.Л., Сазыкин Ю.О. Новое в интегративном учебном процессе по подготовке кадров в области медицинской биотехнологии / Материалы научно-методической конференции ММА им. И.М. Сеченова «Современные проблемы образования в высшей медицинской школе». Москва, 1998. — С. 52–54.
 15. Овчинникова Т.В., Завада Л.Л., Потапенко Н.А., Сазыкин Ю.О., Быков В.А. Проблемы интеграции высшего медицинского образования и фундаментальной науки при подготовке специалистов в области биомедицинских технологий / Актуальные проблемы междисциплинарной интеграции в медицинском образовании: методология, технология и практика. — М., 1999. — С. 18–20.
 16. Овчинникова Т.В., Завада Л.Л., Потапенко Н.А., Сазыкин Ю.О., Быков В.А. Приоритеты и проблемы в развитии биомедицинского образования / Материалы научно-методической конференции ММА им. И.М. Сеченова. «Проблемы качества подготовки специалистов в медвузе XXI века». Москва, октябрь 2000 г. — С. 16–18.
 17. Марченко В.И., Овчинникова Т.В. Приоритеты и проблемы естественнонаучного образования на рубеже III тысячелетия / Тезисы докладов на международном конгрессе «Наука и образование на пороге III тысячелетия». Минск, 3–6 октября 2000 г. — С. 66–67.
 18. Завада Л.Л., Овчинникова Т.В., Сазыкин Ю.О., Батурина М.В. Биоэтика в учебном процессе / Тезисы научно-практической конференции ММА им. И.М. Сеченова. — М., 1996. — С. 44–46.
 19. Быков В.А., Сазыкин Ю.О., Иванов В.П., Овчинникова Т.В., Павлова Л.А., Демина Н.Б. Проблемы биоэтики в работе кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии / Тезисы научно-практической конференции ММА им. И.М. Сеченова. — М., 1996. — С. 113–114.
 20. Швец В.И., Победимский Д.Г., Быков В.А., Овчинникова Т.В., Береговых В.В., Симонов-Емельянов И.Д., Фролова А.К., Соломонов В.А. Принципы построения и опыт организации образовательной системы нового поколения в области биотехнологии на основе интеграции многоуровневой фундаментальной подготовки и использования достижений российской науки // Биотехнология, 2005 (в печати).
 21. Сборник программ спецкурсов и лабораторных практикумов Учебно-научного центра ИБХ РАН для студентов кафедры биоорганической химии МГУ / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. — М., 2002. — 58 с.
 22. Сборник программ спецкурсов и лабораторных практикумов Учебно-научного центра ИБХ РАН для студентов кафедры физико-химической биологии и биотехнологии МФТИ / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. — М., 2003. — 80 с.
 23. Тезисы докладов и стендовых сообщений на XIII зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. Москва, 7–9 февраля 2001 г. — 131 с.
 24. Тезисы докладов и стендовых сообщений на XIV зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. Москва, 11–15 февраля 2002 г. — 139 с.
 25. Тезисы докладов и стендовых сообщений на XV зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. Москва, 10–14 февраля 2003 г. — 68 с.
 26. Тезисы докладов и стендовых сообщений на XVI зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. Москва, 9–12 февраля 2004 г. — 112 с.
 27. Тезисы докладов и стендовых сообщений на XVII зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» / Под ред. Т.В. Овчинниковой и Т.И. Соркиной. Москва, 7–10 февраля 2005 г. — 111 с.

28. Овчинникова Т.В. Новые информационные технологии в биомедицинском образовании / Материалы международной конференции «Фармацевтическая биоэтика». – М., 1997. – С. 60–61.
29. Шкаренкова Л.С., Орловская Т.Т., Овчинникова Т.В. «Современный подход к научно-библиографическому обеспечению ученых и преподавателей, работающих в области фармакологии» / Тезисы научно-практической конференции ММА им. И.М. Сеченова. – М., 1996. – С. 107–109.
30. Шкаренкова Л.С., Орловская Т.Т., Овчинникова Т.В. Информационное сопровождение исследований лекарственных средств: базы данных, необходимые при решении вопросов патентования и маркетинга // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – Т. 42. – 10. – С. 43–45.
31. Шкаренкова Л.С., Орловская Т.Т., Овчинникова Т.В. Современная биотехнология и ее информационная поддержка / Материалы научно-методической конференции ММА им. И.М. Сеченова. – М., 1997. – С. 238–240.
32. Шкаренкова Л.С., Орловская Т.Т., Овчинникова Т.В. Информационная поддержка исследований в области биотехнологии // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24. – 1. – С. 64–68.
33. Шкаренкова Л.С., Орловская Т.Т., Овчинникова Т.В. Информационное сопровождение исследований в области биомедицинских технологий // Биомедицинские технологии. – 1998. – Т. 8. – С. 78–80.
34. Орловская Т.Т., Шкаренкова Л.С., Овчинникова Т.В. Использование компьютерных технологий в процессе обучения студентов медицинских вузов / Актуальные проблемы междисциплинарной интеграции в медицинском образовании: методология, технология и практика. – М., 1999. – С. 22–23.
35. Тележинская И.Н., Овчинникова Т.В. Практическое руководство по использованию фактографических баз данных в области физико-химической биологии и биотехнологии: Учебно-методическое пособие для студентов и аспирантов МГУ, МФТИ, МИТХТ, ММА, РУДН. – М., 2000. – 70 с.
36. Овчинникова Т.В., Орловская Т.Т. Информационные технологии в системе биомедицинского образования XXI века / Материалы научно-методической конференции ММА им. И.М. Сеченова. «Проблемы качества подготовки специалистов в медвузе XXI века». Москва, октябрь 2000 г. – С. 112–113.
37. Орловская Т.Т., Тележинская И.Н., Овчинникова Т.В. Информационное обеспечение современного биотехнологического образования: электронные базы данных / Материалы Третьего Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 14–18 марта 2005 г. – Ч. 2. – С. 280–281.

PROBLEMS AND PROSPECTS OF BIOTECHNOLOGICAL EDUCATION IN RUSSIA: CREATION OF SCIENTIFICALLY-EDUCATIONAL SYSTEM OF NEW GENERATION AND EXPERIENCE IN TRAINING OF EXPERTS-BIOTECHNOLOGISTS THE TOP SKILLS IN THE SCIENCE-EDUCATIONAL CENTER OF THE INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

T.V. OVCHINNIKOVA, V.T. IVANOV

Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences

In the present article a new system of professional training in the field of biotechnology created in the science-educational Center (SEC) of Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (IBC), of the Russian Academy of Sciences is described. The main idea is based on effective integration between IBC and of some institutes of higher education of the Russian Federation. The long-term experience of SEC IBC in the realisation of educational programs for the purpose of improving of the professional training in the field of biotechnology is analyzed. The substantiation of the functioning of SEC IBC as a scientific and educational body is given. The forms, principles and methods of the interaction between academic institute and of some institutes of higher education using a professional training in the field of biotechnology in the SEC IBC are presented also. The educational programs are adapted for the purpose of retraining and improvement of professional skills of the experts-biotechnologists taking into account an interdisciplinary and impetuous dynamics of development of this area of knowledge. The special attention is devoted for description of an approach which provides the fundamental basis and principles of leading higher education in the field of biotechnology.

Keywords: biotechnology, centre of science-educational, educational programs, integration of science and education

УДК 577.152.314

НОВАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ PspXI УЗНАЕТ НЕОБЫЧНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-VCTCGAGB-3'

Д.А. ГОНЧАР*, М.А. АБДУРАШИТОВ, О.А. БЕЛИЧЕНКО, В.С. ДЕДКОВ, Н.В. МЕЗЕНЦЕВА, Ю.Э. ТОМИЛОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Нами обнаружен бактериальный штамм *Pseudomonas species X11*, который является продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции, названной PspXI. Этот фермент узнает восьминуклеотидную последовательность ДНК с необычным, V-B типом вырожденности: 5'-VCTCGAGB-3', где V означает А, С или G, а B означает Т, С или G. Препарат эндонуклеазы рестрикции PspXI с концентрацией 10000 ед/мл был получен путем очистки в четыре хроматографические стадии. Показано, что PspXI гидролизует сайт узнавания между С и Т, с образованием 5'-выступающих «липких» концов, совместимых с концами, образующимися при гидролизе ДНК эндонуклеазами рестрикции XhoI (5'-C[^]TTCGAG-3') и SalI (5'-G[^]TTCGAC-3').

Ключевые слова: рестриктазы, эндонуклеаза, ДНК.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) входят в состав бактериальных систем рестрикции-модификации. Наиболее изученными являются рестриктазы второго типа, так как эти ферменты повсеместно распространены и нашли широкое применение в исследованиях в области биотехнологии и молекулярной биологии, таких как клонирование генов, сайт-направленный мутагенез, рестрикционное картирование, ДНК-диагностика и так далее. Эндонуклеазы рестрикции второго типа узнают короткие, обычно от четырех до восьми пар нуклеотидов, последовательности в двуцепочечной ДНК и специфически гидролизуют ее либо внутри сайта узнавания, либо на фиксированном расстоянии недалеко от этого сайта. К настоящему времени показано существование более 250 различных сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции, но только 27 из них представляют собой нуклеотидную последовательность, состоящую из более чем шести пар нуклеотидов [1].

Данная работа посвящена изучению новой эндонуклеазы рестрикции PspXI, выделенной из бактериального штамма *Pseudomonas species X11*. Рестриктаза PspXI узнает восьминуклеотидную последовательность ДНК с необычным, V-B типом вырожденности сайта узнавания.

* Автор для переписки:

Гончар Д.А.,

сотрудник НПО «СибЭнзим»

Адрес: 630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

Материалы и методы

В работе использовались реактивы производства «Sigma» (США), «Serva» (Германия), «ICN» (США) и «Хеликон» (Россия). Для хроматографической очистки фермента применялись следующие носители: фосфоцеллюлоза P11 и ДЭАЭ-целлюлоза DE52 («Whatman», Великобритания), гепарин-сефароза («Sigma», США), гидроксипатит (BioRad, США). Для выращивания бактериальных клеток использовались компоненты питательной среды фирмы «Organotechnie» (Франция).

Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, полинуклеотидкиназу фага Т4 и препараты фаговых ДНК производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

Морфологические и физико-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [2]. Определение вида микроорганизма проводили по определителю Берджи [3].

Выделение плазмидных ДНК pBluescriptSK(+) [4], pMTL22 [5], pSse9/1 [6], pMT440 [7] и pCPV13 [8] осуществляли с использованием наборов «QIAGEN GmbH» (Германия) согласно протоколам производителя.

Для определения места гидролиза межнуклеотидных связей использовали [гамма-³²P]-меченные ДНК-дуплексы. Исходные олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия)

и метились с помощью T4-полинуклеотидкиназы. Для разделения продуктов ферментативного гидролиза меченых олигонуклеотидов применяли электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК осуществляли методом Сенгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) согласно протоколам производителя.

Выращивание клеток штамма *P. species X11*. Клетки штамма *Pseudomonas species X11* выращивались при 30 °С в 20-литровом ферментере («New Brunswick Scientific», США) в питательной среде LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, (рН 7,6)) с добавлением 0,1% MgSO₄ и 0,001% тиамин (В1). Культура росла в течение 5 часов с аэрацией воздухом 10 л/мин и перемешиванием при 200 об/мин до оптической плотности A550=4. Клетки собирались центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин на центрифуге «Beckman» (США). Биомасса хранилась при -20 °С.

Тестирование рестриктазной активности *PspXI*. Для тестирования активности рестриктазы *PspXI* в клетках 1 мл выросшей культуры переносили в 1,5 мл пробирки «Eppendorf» и центрифугировали при 5000 g в течение 2 мин на микроцентрифуге «Eppendorf 5804» (Германия). Осадок суспендировали в 180 мкл воды, и готовили грубый лизат клеток по методу, описанному ранее [9]. Затем аликвоту грубого лизата 5 мкл добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг субстрата в реакционном буфере, и ставили серию разведений в 4 и 16 раз. Смесь инкубировали в термостате на 37 °С в течение 1 ч. Продукты реакции наносили на 0,8% агарозный гель и проводили электрофорез в Трис-ацетатном буфере (50 mM Трис-ацетат (рН 8,0), 20 mM Na-ацетат, 2 mM ЭДТА) при напряжении 120 V. После окрашивания бромистым этидием гель фотографировали в УФ-свете. В качестве субстрата для анализа рестриктазной активности использовали ДНК фага лямбда, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции HindIII. При тестировании активности ЭР *PspXI* в хроматографическом профиле аликвоты по 1 мкл из фракций добавляли к 20 мкл реакционной смеси, инкубировали 10 мин при 37 °С и проводили электрофорез.

Очистка препарата фермента ЭР *PspXI*. Все стадии очистки фермента проводили при 4 °С или на льду. Замороженную биомассу суспендировали в 400 мл буфера «А» (10 mM Трис-HCl (рН 7,5), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол). Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE»,

Великобритания) двадцатью 1 минутными импульсами с 1 минутными интервалами. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин на центрифуге «Beckman». Препарат фермента ЭР *PspXI* получали из супернатанта с использованием четырех хроматографических стадий: 100 мл фосфоцеллюлозы (колонка 4,5 x 15 см); 30 мл ДЭАЭ-целлюлозы (колонка 2,5x9 см); 7 мл гепарин-сефарозы (колонка 1,6x8,5 см) и 5 мл гидроксипатита (колонка 1,6x8,5 см). На первых трех стадиях элюцию фермента проводили линейным градиентом концентрации KCl (0,2–1 M) в буфере «А». При очистке на гидроксипатите использовали К-фосфатный буфер «Б» (10 mM К-фосфат (рН 7,5), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол) с добавлением 0,2 M KCl. Фермент вымывали линейным градиентом концентрации К-фосфата (0,01–0,1 M) в буфере «Б» с 0,2 M KCl.

Затем эндонуклеазу рестрикции концентрировали диализом против буфера «А», содержащего 0,2 M KCl и 50% глицерин. Препарат ЭР *PspXI* хранили при -20 °С. За одну единицу активности принимали количество фермента, необходимое для исчерпывающего расщепления 1 мкг ДНК фага лямбда, обработанной ЭР HindIII в 50 мкл реакционной смеси за 1 ч при 37 °С.

Результаты и обсуждение

Штамм, определенный нами как *Pseudomonas species X11*, был выделен из пробы пресной воды в ходе поиска микроорганизмов – продуцентов эндонуклеаз рестрикции. Обнаруженный фермент был назван *PspXI* согласно общепринятой номенклатуре.

В результате наработки культуры клеток штамма *P. species X11* было получено 114 г биомассы с эндонуклеазной активностью 5000 ед/г. После хроматографической очистки из данного количества биомассы было получено 12 мл препарата эндонуклеазы рестрикции *PspXI* с концентрацией 10000 ед/мл.

Оптимальными условиями для работы фермента оказались SE-буфер 5 (Y) (33 mM Трис-ацетат (рН 7.9), 10 mM Mg-ацетат, 66 mM К-ацетат, 1 mM ДТТ) и температура 37 °С (данные не приведены). Полная инактивация ЭР *PspXI* в реакционной смеси происходила при нагревании до 80 °С за 20 мин.

Определение специфичности рестриктазы *PspXI* проводили, используя в качестве субстрата ДНК фага лямбда и плазмиды pBluescriptSK(+) (pBS). На рисунке 1а приведены картины гидролиза этих ДНК эндонуклеазами рестрикции Sfr274I [10] и *PspXI* по

отдельности и совместно. Так как фермент Sfr274I имеет на ДНК лямбда всего один сайт узнавания (в позиции 33498) и образует при гидролизе высокомолекулярные фрагменты, трудно разделяемые электрофорезом в агарозном геле, то мы использовали в качестве субстрата гидролизат ДНК фага лямбда рестриктазой HindIII (вторая дорожка после маркера). При этом после обработки этого субстрата рестриктазой Sfr274I образуется один дополнительный фрагмент 3397 п.н. (дорожка 3), который хорошо заметен на геле. ЭР PspXI при обработке этого же самого субстрата дает абсолютно такой же набор фрагментов ДНК, что и Sfr274I (дорожка 4). А при совместном гидролизе ДНК лямбда/HindIII этими двумя рестриктазами картина никак не меняется (дорожка 5). То же самое можно сказать о плазмиде pBS. Ее обработка эндонуклеазой рестрикции Sfr274I приводит к образованию линейной формы (дорожка 7), поскольку фермент имеет один сайт узнавания на этой плазмиде (в позиции 667). Рестриктаза PspXI дает точно такую же картину гидролиза (дорожка 8),

а совместный гидролиз рестриктазами Sfr274I и PspXI не приводит к появлению каких-либо дополнительных фрагментов (дорожка 9).

В то же время на рисунке 1б представлены результаты гидролиза этими эндонуклеазами рестрикции таких субстратов, как ДНК аденовируса типа 2 (Ad2, GenBank асс. по. AC_000007) и плазмиды pMTL22 [5]. ЭР Sfr274I имеет на ДНК Ad2 шесть сайтов узнавания (в позициях 5777, 8243, 9688, 19330, 23923, 29787) и дает в результате ее расщепления характерную специфическую картину (дорожка 2). В то время как рестриктаза PspXI имеет только три сайта узнавания на этой ДНК (в позициях 5777, 8243 и 29787) и дает соответственно набор более крупных фрагментов (дорожка 3). А при совместном гидролизе картина, характерная для Sfr274I, восстанавливается (дорожка 4). При гидролизе ЭР Sfr274I плазмиды pMTL22 (имеет один сайт узнавания XhoI в позиции 176) происходит образование линейной формы (дорожка 6), а эндонуклеаза рестрикции PspXI не расщепляет данный субстрат (дорожка 7).

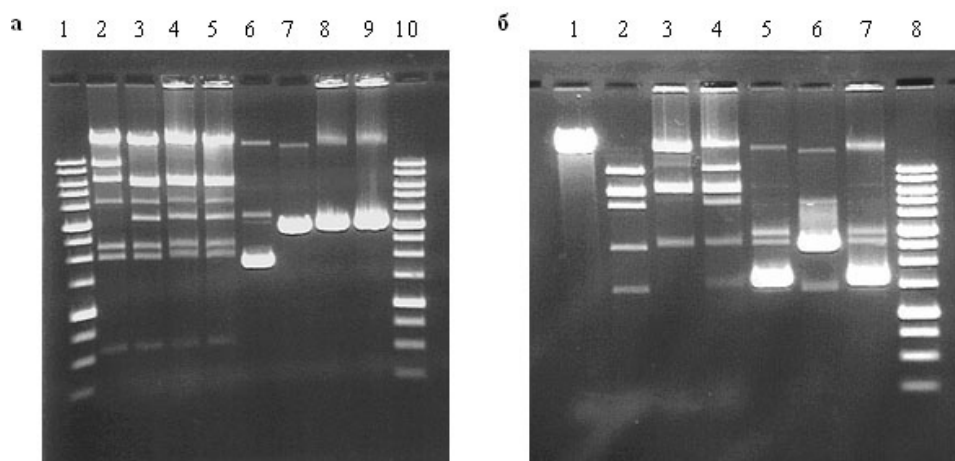


Рис. 1. Расщепление различных ДНК эндонуклеазами рестрикции PspXI и Sfr274I

- а.** Гидролиз ДНК фага лямбда и pBS. ДНК лямбда/HindIII (дор. 2); лямбда/HindIII, обработанная Sfr274I (дор. 3); лямбда/HindIII, обработанная PspXI (дор. 4); лямбда/HindIII, обработанная Sfr274I и PspXI (дор. 5). ДНК плазмиды pBS (дор. 6); pBS, обработанная Sfr274I (дор. 7); pBS, обработанная PspXI (дор. 8); pBS, обработанная Sfr274I и PspXI (дор. 9); 0,25-10 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (дор. 1 и 10). Продукты расщепления разделены в 0,8% агарозном геле.
- б.** Гидролиз ДНК Ad2 и pMTL22. ДНК Ad2 (дор. 1); Ad2, обработанная Sfr274I (дор. 2); Ad2, обработанная PspXI (дор. 3); Ad2, обработанная Sfr274I и PspXI (дор. 4). ДНК pMTL22 (дор. 5); pMTL22, обработанная Sfr274I (дор. 6); pMTL22, обработанная PspXI (дор. 7); 0,25-10 kb ДНК-маркеры молекулярной массы (дор. 8). Продукты расщепления разделены в 0,8% агарозном геле.

Таким образом, можно предположить, что сайт узнавания ЭР PspXI перекрывается с последовательностью узнавания рестриктазы Sfr274I - 5'-СТСGAG-3'. Однако при этом не все сайты узнавания ЭР Sfr274I расщепляются новым ферментом, то есть гидролиз, по-

видимому, зависит от того, какие нуклеотиды окружают последовательность 5'-СТСGAG-3'.

Анализ полученных картин расщепления позволяет заключить, что, по-видимому, сайт СТСGAG не узнается рестриктазой PspXI в том случае, если перед ним с 5'-

**Последовательности ДНК, которые расщепляются
или не расщепляются эндонуклеазой рестрикции PspXI**

| Расщепляются | Не расщепляются |
|--|---|
| 5'- GCTCGAGT -3' 3'-CGAGCTCA-5' (pSse9/1-1651) | 5'-GCTCGAGA-3' 3'-CGAGCTCT-5' (Ad2-19330) |
| 5'- CCTCGAGT -3' 3'-GGAGCTCA-5' (Ad2-29787; λ-33497) | 5'-CCTCGAGA-3' 3'-GGAGCTCT-5' (pCPV13-433) |
| 5'- CCTCGAGC -3' 3'-GGAGCTCG-5' (Ad2-5777 и 8243) | 5'-ACTCGAGA-3' 3'-TGAGCTCT-5' (Ad2-23923) |
| 5'- ACTCGAGT -3' 3'-TGAGCTCA-5' (pCPV13-5831) | 5'-TCTCGAGA-3' 3'-AGAGCTCT-5' (Ad2-9688) |
| 5'- CCTCGAGG -3' 3'-GGAGCTCC-5' (pBS-667) | |
| 5'- GCTCGAGC -3' 3'-CGAGCTCG-5' (pMT440-13) | |

Примечание. Нуклеотиды, окружающие внутренний сайт CTCCGAG, выделены жирным шрифтом. Названия ДНК-субстратов и позиции сайтов показаны в скобках

конца находится тимин, либо после него с 3'-конца стоит аденин. Для проверки этого предположения нами были использованы несколько дополнительных субстратов, содержащих недостающие варианты последовательности. В таблице 1 приведены все возможные варианты такого окружения (соответствующие нуклеотиды выделены жирным шрифтом), причем в правой части таблицы приведены те последовательности, которые не должны гидролизоваться эндонуклеазой рестрикции PspXI, а в левом столбце перечислены те последовательности, которые могут расщепляться данным ферментом. Так как не все последовательности являются палиндромными, то в таблице приведены обе цепи ДНК.

Мы проверили возможность гидролиза всех недостающих комбинаций нуклеотидов, окружающих сайт узнавания ЭР Sfr274I, путем расщепления ЭР PspXI плазмид: pSse9/1, несущей ген ДНК-метилтрансферазы M.Sse9I, pMT440 и плазмиды pCPV13, которая содержит фрагмент 1999161-209975 ДНК вируса оспы коров (GenBank acc. no. X94355, [8]). Оказалось, что все эти субстраты расщепляются ЭР PspXI, и, следовательно, PspXI действительно не расщепляет те последовательности ДНК, в которых перед сайтом CTCCGAG стоит Т или после него соответственно А. Таким образом, можно сделать вывод, что сайт узнавания новой эндонуклеазы рестрикции PspXI является восьминуклеотидным, с вырождением по краям, то есть 5'-VCTCGAGB-3', где

«V» означает А, С или G, а «B» означает С, G или Т согласно общепринятой номенклатуре.

Чтобы определить место гидролиза ДНК новым ферментом, мы использовали два радиоактивно-меченных с 5'-конца олигонуклеотидных дуплекса С1 и С2. Верхняя цепь дуплекса С1 содержала последовательность ACTCCGAGA, и он не должен был расщепляться рестриктазой PspXI. Верхняя цепь дуплекса С2 содержала последовательность CCTCGAGT, и поэтому данный дуплекс должен был гидролизоваться исследуемым ферментом. После инкубации ферментов PspXI и Sfr274I с олигонуклеотидами аликвоты реакционной смеси подвергались электрофорезу в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. На рисунке 2 приведены полученные радиоавтографы гелей. Видно, что PspXI расщепляет дуплекс С2, но не С1, причем продукты гидролиза дуплекса С2 рестриктазами Sfr274I и PspXI идут на одном и том же уровне; следовательно, их позиции расщепления ДНК совпадают.

Таким образом, новый фермент расщепляет ДНК между цитозином и тиминном, образуя 5'-выступающие четырехнуклеотидные концы, которые аналогичны концам, образующимся при гидролизе ДНК рестриктазой Sfr274I или XhoI (5'-C[^]TCCGAG-3').

Место расщепления ДНК новой эндонуклеазой рестрикции было подтверждено еще одним способом. Как уже отмечалось, ДНК pBluescriptSK(+) имеет

один сайт узнавания ЭР PspXI. С помощью автоматического секвенатора нами была определена нуклеотидная последовательность участка рBS, содержащего этот сайт в исходной ДНК, и в ДНК, которая предварительно была обработана рестриктазой PspXI (рис. 3). На рисунке видно, что происходит обрыв цепи, причем, поскольку полимеразы достраивала верхнюю цепь, то точка обрыва последовательности

расщепляет последовательность 5'-ТСТСГАГ-3', независимо от нуклеотида, находящегося перед этой последовательностью. Кроме того, согласно базе данных по ферментам рестрикции-модификации, REBASE [1], эндонуклеаза рестрикции PspXI является единственной к настоящему моменту известной рестриктазой, которая узнает последовательность с тройным, V-V типом вырождения. Мы также полагаем, что ЭР PspXI может рассматриваться с эволюционной точки зрения как возможное промежуточное звено между ферментами, узнающими шести- и восьминуклеотидные последовательности ДНК. Новый фермент, несомненно, является перспективным для биотехнологии, так как может использоваться при клонировании совместно с широко известными ЭР XhoI и Sall, а также может найти применение для крупноблочной фрагментации ДНК.

Благодарности. Авторы благодарят Владимира Баймака за техническую помощь в экспериментальной работе, а также к.б.н. Алексея Гордадзе за помощь в написании статьи.

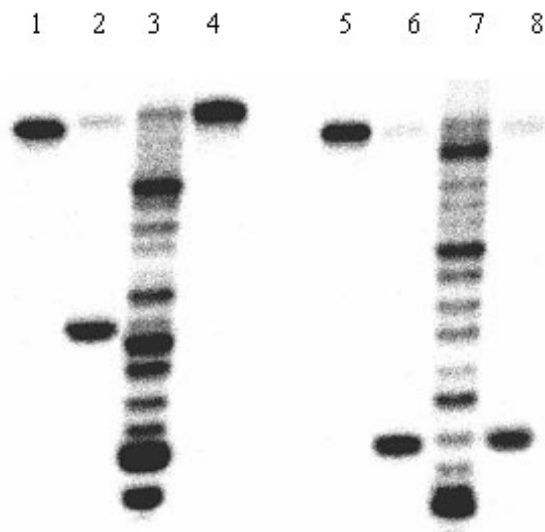


Рис. 2. Определение позиции расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции PspXI с использованием [гамма-³²P]-меченных олигонуклеотидных дуплексов.

Верхняя меченая цепь дуплекса С1 - 5'-CCAGGTGAAGACTCGAGACCACG -3' (дор. 1-4),

а верхняя цепь дуплекса С2 - 5'-

GCATGCCCTCGAGTGATCGCA -3' (дор. 5-8).

Дорожки 1 и 5: исходные дуплексы; дорожки 2 и 6: дуплексы, обработанные Sfr274I; дорожки 4 и 8: дуплексы, обработанные PspXI; дорожки 3 и 7: маркеры, полученные исчерпывающим гидролизом тех же олигонуклеотидных дуплексов экзонуклеазой III из *E. coli*

льности соответствует месту гидролиза ферментом нижней цепи. Этот результат подтвердил ранее полученные данные, и таким образом, можно сделать вывод, что новая эндонуклеаза рестрикции PspXI гидролизует ДНК с образованием 5'-выступающих концов, которые могут быть лигированы с концами, образующимися при гидролизе такими рестриктазами, как XhoI (5'-С^ТСТСГАГ-3') и Sall (5'-G^ТСТСГАС-3').

В заключение следует отметить, что ранее был открыт еще один необычный изошизомер рестриктазы XhoI - PaeR7I [11]. Как было показано, PaeR7I гидролизует сайт 5'-СТСГАГ-3', за исключением тех случаев, когда перед ним с 5'-конца стоит динуклеотидная последовательность СТ. В отличие от этого фермента, эндонуклеаза рестрикции PspXI не

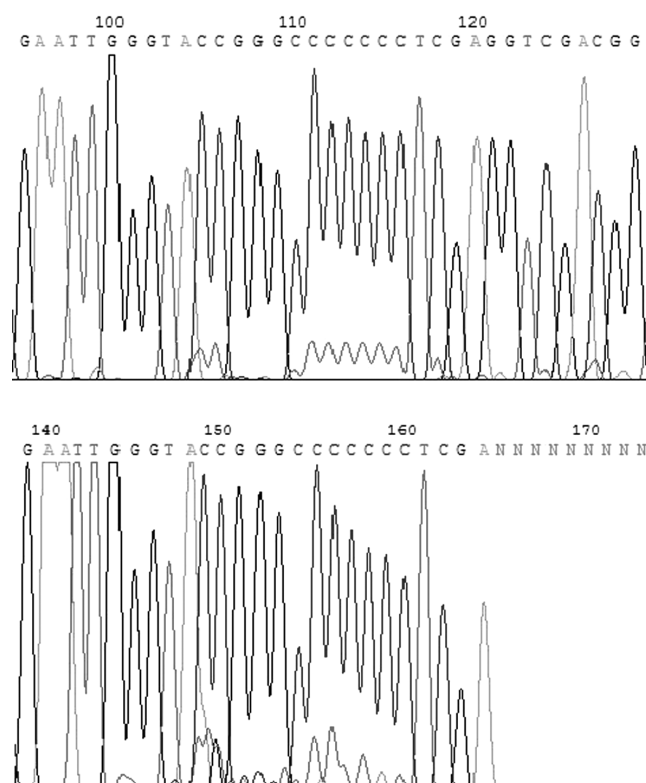


Рис. 3. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции PspXI путем секвенирования участка плазмиды рBluescriptSK(+).

Верхняя хроматограмма — секвенирование района полилинкера рBS, содержащего последовательность узнавания PspXI, в исходной плазмиде. Нижняя хроматограмма — секвенирование того же района плазмиды, обработанной PspXI. Точка разрыва соответствует позиции расщепления нижней цепи

Литература

1. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J. and Macelis D. REBASE: restriction enzymes and methyltransferases // Nucleic Acids Res. – 2003. – Vol. 31. – P. 418–420.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М., 1995.
3. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2-х томах. Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. – М., 1997.
4. Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A. and Huse W.D. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties // Nucleic Acids Res. 1988. – Vol. 16. – P. 7583–7600.
5. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A. and Minton N.P. The pMTL nic-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing // Gene. – 1988. – Vol. 68. – P. 139–149.
6. Gonchar D.A., Wolf Y.I. and Degtyarev S.Kh. Cloning and characterization of Sse9I DNA-methyltransferase recognizing 5'-AATT-3' // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24. – P. 2790–2792.
7. Deyev S.M., Yazygin S.A., Kuznetsov D.A., Jukovich M. and Hartley R.W. Ribonuclease-charged vector for facile direct cloning with positive selection // Mol. Gen. Genet. – 1998. – Vol. 259. – P. 379–382.
8. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V. and Kotwal G.J. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins // Virology. – 1998. – Vol. 243. – P. 432–460.
9. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // Прикл. биохим. микробиол. – 1988. – Т. 24. – С. 121–124.
10. Пучкова Л.И., Кривопалова Г.Н., Андреева И.С., Селина А.В., Серов Г.Д., Речкунова Н.И., Дегтярев С.Х. Streptomyces fradiae – продуцент эндонуклеазы рестрикции Sfr274I // Изв. Сиб. отд. АН СССР. – 1990. – 1. – С. 32–34.
11. Gingeras T.R. and Brooks J.E. Cloned restriction/modification system from Pseudomonas aeruginosa // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – Vol. 80. – P. 402–406.

Принятые сокращения: система РМ – система рестрикции-модификации; ЭР – эндонуклеаза рестрикции, Трис – трис-(оксиметил)-аминометан; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ДТТ – дитиотреитол; п.н. – пары нуклеотидов.

PSPXI, A NOVEL RESTRICTION ENDONUCLEASE THAT RECOGNIZES THE UNUSUAL DNA SEQUENCE 5'-VC[^]TCGAGB-3'

D.A. GONCHAR, M.A. ABDURASHITOV, O.A. BELICHENKO, V.S. DEDKOV, N.V. MEZENTSEVA, J.E. TOMILOVA, S.KH. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

We have discovered a bacterial strain *Pseudomonas species X11* that produces the novel restriction endonuclease PspXI. This enzyme recognizes an unusual degenerate octanucleotide sequence 5'-VCTCGAGB-3', where V stands for A, C or G and B stands for T, C or G. The PspXI restriction endonuclease preparation with concentration of 10000 units/ml was isolated using four chromatographic steps. PspXI cuts its recognition sequence between C and T producing cohesive ends compatible with those of produced by XhoI (5'-C[^]TCGAG-3') and SalI (5'-G[^]TCGAC-3') restriction endonucleases.

Keywords: restrictases, endonuclease, DNA

УДК: 575:599, 577:213.1

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНОЙ ТУГОУХОСТИ И ГЛУХОТЫ У БОЛЬНЫХ И В ПОПУЛЯЦИЯХ ВОЛГО-УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА

Э.К. ХУСНУТДИНОВА, Л.У. ДЖЕМИЛЕВА*

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Врожденная глухота — одно из частых заболеваний человека, регистрируемое с частотой 1:1000 новорожденных детей. Причиной наследственной тугоухости и глухоты являются мутации в генах GJB2 и GJB6, среди которых у жителей Европы наиболее часто встречается мутация 35delG. Изучен спектр и частота мутаций генов GJB2 и GJB6 у больных двухсторонней глухотой и нейросенсорной тугоухостью и здоровых членов (235 чел.) из 100 семей, а также выявлена частота гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC, 167delT гена GJB2 в популяциях, проживающих на территории Волго-Уральского региона. Мутация 35delG была выявлена у 53 пациентов, из них 13 (24,5%) были гетерозиготами и у 40 пациентов (75%) делеция находилась в гомозиготном состоянии. Наиболее часто мутация 35delG гена GJB2 встречается на хромосомах больных татарского и русского происхождения, ее частота составила 40,9 и 55,2%, соответственно. Среди исследованных популяций Волго-Уральского региона гетерозиготное носительство мутации 35delG наиболее часто встречается у мордвы (1/16), удмуртов (1/27), русских (1/46), реже у татар (1/96), а 167delT обнаруживается в популяциях чувашей (1/50) и коми (1/40). В выборках башкир (четыре этногеографические группы), чувашей и коми мутация 35delG не была обнаружена. В среднем, в популяциях Волго-Уральского региона частота мутации 35delG составляет 0,14, что соответствует частоте в популяциях Северной и Центральной Европы.

Ключевые слова: этногенетика, этногеография, наследственные заболевания, глухота.

На сегодняшний день, по статистике, каждый шестой человек на планете испытывает проблемы со слухом. К сожалению, существует множество причин ослабления слуха и глухоты. Потеря слуха является одновременно медицинской и социальной проблемой. Наибольшее значение имеет врожденная глухота как тяжелое и инвалидизирующее заболевание, поскольку развитие слуха и общее умственное развитие тесно связаны. Врожденная глухота — одно из частых заболеваний человека, регистрируемое с частотой 1:1000 новорожденных детей. В вопросах этиологии и патогенеза заболевания остается много неясных аспектов, но считается, что примерно в половине всех случаев врожденной глухоты имеют место генетические нарушения. Около 100 генов в организме человека отвечает за эмбриогенез и

функционирование органа слуха (ОММ). Выявлено, по крайней мере, 40 генов, мутации в которых в той или иной степени способствуют нарушению слуха у человека [1]. Таким образом, наследственные формы врожденной тугоухости и глухоты характеризуются клиническим полиморфизмом и генетической гетерогенностью [2]. Около 75% всех случаев несиндромальной наследственной глухоты приходится на аутосомно-рецессивные формы, 10–15% — на аутосомно-доминантные, а на сцепленную с X-хромосомой и митохондриальные формы глухоты — менее 1%. Наиболее частая форма наследственной потери слуха — несиндромальная аутосомно-рецессивная глухота, — характеризуется клиническим полиморфизмом и генетической гетерогенностью [3]. Данная форма заболевания встречается наиболее часто среди больных наследственной несиндромальной глухотой — от 30 до 65% всех случаев заболевания. Остальные формы встречаются несколько реже [4, 5]. Наиболее частой причиной несиндромальной аутосомно-рецессивной глухоты у человека являются мутации в генах GJB2

* Автор для переписки:

Джемилева Лиля Усеиновна,
сотрудница Института биохимии и генетики УНЦ РАН
Адрес: 450054 Уфа, пр-т Октября, 71
Тел./факс: (3472) 356088
E-mail: Dzhemilev@anrb.ru

(gap junction 2) и GJB6 (gap junction 6), локализованных в области 13q11-q13, кодирующих коннексины 26 (Cx26) и 30 (Cx30) — трансмембранные белки, участвующие в образовании коннексонов — структур, состоящих из шести белковых субъединиц и обеспечивающих полноценный ионный обмен между соседними клетками, что, в свою очередь, способствует поддержанию гомеостаза эндолимфы, а, точнее, строго регулирует концентрацию ионов калия (K^+) [2]. Почти во всех тканях внутреннего уха обмен ионами K^+ между клетками происходит с помощью диффузии через щелевые соединения или коннексоны. Каждая половинка щелевого соединения (коннексона) формируется 6 молекулами коннексина, причем, для некоторых коннексонов характерна гетеротипия (присутствие различных классов коннексинов в одном коннексоне). Мутации в генах GJB2 и GJB6 (13q11-q12), кодирующих коннексины 26 и 30, соответственно, обуславливают нейросенсорную тугоухость и глухоту [6]. Наиболее частой мутацией в гене GJB2 является делеция гуанина в 35-м положении (35delG), ответственная, приблизительно, за 20% всех наследственных нарушений слуха у человека [5,6]. Однако, существуют межпопуляционные различия в мутационном спектре гена GJB2: мутация 35delG обнаруживается преимущественно в европейских популяциях, тогда как наиболее частой мутацией у азиатов является 235delC [7,8]. Мутация 167delT наиболее часто является причиной несиндромальной наследственной глухоты у евреев Ашкенази [9]. Наиболее частой мутацией гена GJB6 является del 342-kb дельта (GJB6-D13S1830), которая встречается с частотой 5,3% среди больных несиндромальной наследственной глухотой [10, 11].

Принимая во внимание немаловажное значение поиска наиболее оптимальных методов диагностики нарушений слуха в раннем детском и младенческом возрасте, а также разработки подходов к дородовой диагностике данного заболевания, целесообразным представляется изучение спектра мутаций генов GJB2 и GJB6 у больных несиндромальной аутосомно-рецессивной глухотой, а также определение частоты гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC, 167delT гена GJB2 в популяциях, проживающих на территории Волго-Уральского региона.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК больных с клиническим диагнозом двусторонняя нейросенсорная тугоухость и глухота предположительно наследственной этиологии, состоящих на учете в Республиканском

сурдологическом центре Республиканской детской клинической больницы г. Уфы, членов их семей, а также здоровых доноров, проживающих в Волго-Уральском регионе. Материал для исследования предоставлен Сурдологическим центром РДКБ, медико-генетической консультацией РКБ и собран в ходе экспедиционных выездов в 2000–2005 гг. Данные по этнической принадлежности выясняли путем анкетирования, включая национальную принадлежность родителей до третьего поколения. Обследованы больные двухсторонней нейросенсорной тугоухостью и глухотой и здоровые члены (235 чел.) из 100 семей. По этнической принадлежности семьи распределились следующим образом: русских — 38, татарских — 32, башкирских — 5, других национальностей — 25. В 18 семьях пробанды происходили из межнациональных браков. Диагноз глухоты или тугоухости устанавливался на основе данных тональной пороговой аудиометрии (аудиометр «GSI-61», Grason Stadler Instruments, USA), акустической импедансометрии (импедансометр «Zodiac 901», Дания) и регистрации отоакустической эмиссии (система «ILO 92», Otodynamics Ltd., Великобритания). Наследственный характер глухоты в семьях устанавливали на основании генеалогических данных и ретроспективного анализа анамнеза больных с целью исключения возможного влияния факторов внешней среды во время пренатального и постнатального развития: учитывали отсутствие инфекций, травм слухового аппарата, применения ототоксических антибиотиков.

ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [12].

Для анализа спектра мутаций генов GJB2 и GJB6 амплификация фрагментов кодирующего региона проводилась праймерами, последовательности которых были предложены Kessel (1997)[13], Kelley (1998)[14] и del Castillo (2002)[11] (табл. 1). Результаты амплификации фрагментов, содержащих мутации 35delG, 235delC, 167delT гена GJB2 и дельта (GJB6-D13S1830) гена GJB6 оценивались путем проведения вертикального электрофореза в 9% полиакриламидном геле (исходное соотношение акриламида и метиленисакриламида 29:1,3) при напряжении 300 В в течение шести часов с последующим окрашиванием раствором этидия бромидом стандартной концентрации и детекции в ультрафиолетовом свете.

Исследование образцов ДНК на наличие мутаций и полиморфизмов проводили методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК

Последовательности праймеров, использованных для SSCP-анализа и секвенирования

| Наименование локуса | Последовательность праймеров | Источник |
|-------------------------|--|---|
| GJB2 | | |
| Участок 1 ^{3*} | 5'-AGG CCG ACT TTG TCT GCA ACA-3' 5'-GTG GGC CGG GAC ACA AAG-3' | [14] |
| Участок 2* | 5'-CGA AGC CGC CTT CAT GTA CG-3' 5'-GTG GGC CGG GAC ACA AAG-3' | |
| Участок 3* | 5'-TCG GCC CCA GTG GTA CAG-3' 5'-CTG GGC AAT GCG TTA AAC TGG-3' | |
| Del35G | 5'-TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC-3' 5'-GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG-3' | [13] |
| Del167T | 5'-ATG AGC AGG CCG ACT TTG TCT G-3' 5'-GTG GGA GAT GGG GAA GTA GTG A-3' | Праймеры подобраны с помощью программы Primer select (5.05 1999-2002) |
| Del235C | 5'-ACG ATC ACT ACT TCC CCA TCT C-3' 5'-ACT AGG AGC GCT GGC GTG GAC-3' | |
| GJB6 | | |
| D13S175 | 5'-GTT GGT CAA AGG GTA CAA ACT TG-3' 5'-ATT ACC GCA ATC AAA CTA AAT AAC TA-3' | [11] |
| Участок 1* | 5'-TCA GGG ATA AAC CAG CGC AAT-3' 5'-ACA CCG GGA AAA AGT GGT CAT-3' | |
| Участок 2* | 5'-GCA AGA GGA CTT CGT CTG CAA CA-3' 5'-CGG AAA AAG ATG CTG CTG GTG T-3' | |
| Участок 3* | 5'-AAG CAC AAG GTT CGG ATA GAG G-3' 5'-AGC AGC AGG TAG CAC AAC TCT G-3' | |
| Δ(GJB6-D13S1830) | 5'-TAT TGG ATA CTT GAA TCT GCT G-3' 5'-TGC ATC ACC TCA CAT AGG TTA -3' | |

Примечание: * — праймеры, использованные для SSCP-анализа. Экзоны генов GJB2 и GJB6 были разделены на участки, приблизительно по 330–390 п.н., фланкировались соответствующими праймерами.

(SSCP), основанным на различной электрофоретической подвижности одностранных фрагментов ДНК, различающихся вследствие нуклеотидных замен по конформации молекул, в неденатурирующем полиакриламидном геле [15]. Определение последовательности нуклеотидов образцов ДНК, у которых были обнаружены изменения электрофоретической подвижности при SSCP-анализе, проводили с помощью автоматического секвенирования (ABI PRISM 310 (Applied Bio-systems)).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ статистического анализа Biostatistics v.4.03, а также с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Исследование спектра мутаций генов GJB2 и GJB6 (DFNB1) представляет, пожалуй, наибольший интерес для клиницистов и генетиков, в связи с доста-

точно высокой частотой (до 75%) повреждения этих генов у больных с врожденной нейросенсорной тугоухостью и глухотой. В гене GJB2 идентифицировано более 80 мутаций и около 20 полиморфизмов у больных нейросенсорной тугоухостью и глухотой. Carrasquillo (1997) впервые обнаружил мутацию del35G в гене коннексина 26, в гомозиготном состоянии сопровождающуюся потерей слуха [16]. Lench с соавторами в 1998 изучал частоту 35delG у больных наследственной глухотой в Бельгии и Англии [17]. В Англии частота данной мутации среди больных составляет 9%, а в Бельгии 10%. Murgia в 1999 году обнаружил 35delG у 53% больных аутосомно-рецессивной формой наследственной глухоты [18]. Также 35delG была обнаружена у больных итальянского и испанского происхождения, в 88 и 55% случаев наследственных форм глухоты, соответственно [9, 17]. У пациентов-греков 35delG встречается с частотой 53,8% [4]. Мутация 35delG является широко распространенной среди больных наследственными формами глухоты и составляет, в среднем,

около 3% гетерозиготного носительства в европейских популяциях [9]. Данные по частоте гетерозиготного носительства наиболее частых мутаций гена GJB2 представлены в таблице 2.

Нами проведено исследование спектра и частоты мутаций генов GJB2 и GJB6 у больных наследственной несиндромальной нейросенсорной тугоухостью и глухотой из Башкортостана и определена частота гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC, del167T гена GJB2 в выборках неродственных индивидов коренных национальностей Волго-Уральского региона.

Анализ спектра и частоты встречаемости различных типов мутаций в генах GJB2 и GJB6 показал, что у больных в обследованной нами выборке подавляющее число (у 59% пациентов) составляют мутации в гене GJB2. Мутация 35delG была выявлена у 53 пациентов, из них 13 (24,5 %) были гетерозиготами и у 40 пациентов (75%) данная мутация идентифицирована в гомозиготном состоянии. Также мы обнаружили два типа компаунд гетерозиготного состояния мутаций 35delG, 235delC и 167delT (генотип 35delG167delT/35delG – у 4 пациентов) и (генотип 35delG235delC /35delG у 1 пациента). Наиболее часто мутация 35delG гена GJB2 встречается на хромосомах больных татарского и русского происхождения,

ее частота составила, 40,9% и 55,2%, соответственно (табл. 2). Мутации 235delC и 167delT гена GJB2 были выявлены на хромосомах больных татарского происхождения с низкой частотой (менее 0,01). Среди башкир, представляющих коренную национальность исследуемого региона, обнаружены пять больных с предположительно наследственной глухотой, однако у них не найдено ни одной мутации в генах GJB2 и GJB6. Вполне возможно, что глухота у этих пяти пациентов вызвана мутационным повреждением какого-либо другого гена, экспрессирующегося в тканях внутреннего уха. Малочисленность представителей других этнических групп в выборке больных не позволила провести для них статистический анализ и рассчитать частоту делеции 35delG в гене GJB2. Второй по частоте встречаемости мутацией гена GJB2 у больных несиндромальной нейросенсорной наследственной глухотой из Башкортостана является мутация 312del14. Частота данной мутации на хромосомах больных татарского происхождения составляет 0,035 (у 2 пациентов – мутация 312del14 находилась в гомозиготном состоянии и у 3 – в гетерозиготном) (таб. 3). Мутация дельта (GJB6-D13S1830) гена GJB6 не была выявлена ни у одного пациента.

Такую высокую частоту 35delG среди пациентов с наследственной несиндромальной глухотой можно

Таблица 2

Частота 35delG, 235delC, del167T гена GJB2 в различных популяциях мира

| Популяция | Частота гетерозиготного носительства 35delG (%) | Частота гетерозиготного носительства 235delC (%) | Частота гетерозиготного носительства 167delT (%) | Авторы |
|---------------------|---|--|--|--------|
| Евреи Ашкенази | 0,7 | 0 | 4,03 | [19] |
| Греки | 3,5 | 0 | 0 | [20] |
| Испанцы | 2,3 | 0 | 0 | [21] |
| Итальянцы | 4 | 0 | 0 | [14] |
| Американцы (белые) | 2,1 | 0 | 0 | [22] |
| Иранцы | 1,2 | 0 | 0 | [2] |
| Американцы (черные) | 0 | 0 | 0 | [22] |
| Либанзийцы | 2,3 | 0 | 0 | [23] |
| Австрийцы | 0,9 | 0 | 0 | [24] |
| Австралийцы | 1,0 | 0 | 0 | [22] |
| Венгры | 9,6 | 0 | 0 | [25] |
| Французы | 2,7 | 0 | 0 | [26] |
| Турки | 1,78 | 0 | 0 | [27] |
| Японцы | 0 | 1,04 | 0 | [7] |
| Китайцы | 0 | 1,3 | 0 | [28] |
| Корейцы | 0 | 1,0 | 0 | [28] |

Таблица 3

Распределение наиболее частых мутаций гена GJB2 у больных с несиндромальной наследственной нейросенсорной потерей слуха с учетом этнической принадлежности

| Этническая принадлежность | Количество больных (n=100) | 35delG/35delG | 35delG/+ | 35delG/35delG 167delT | 35delG/35delG 235delC | 167delT/+ | 235delC/+ | 312del14/312del14 | 312del14/+ | +/+ |
|---------------------------|----------------------------|---------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------|-----------|-------------------|------------|-----|
| Русские | 38 | 18 | 2 | 2 | - | - | - | - | 2 | 14 |
| Татары | 33 | 8 | 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | - | 12 |
| Башкиры | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | 5 |
| Метисы | | | | | | | | | | |
| Русский/Татарин | 13 | 3 | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | 7 |
| Белорус/Татарин | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Русский/Чуваши | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Мордвин/Татарин | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Башкир/Татарин | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Другие национальности | | | | | | | | | | |
| Украинцы | 4 | 3 | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Армяне | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Чуваши | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Всего | 100 | 35 | 13 | 4 | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 40 |

объяснить высокой ассортативностью браков между этими больными. В связи с большой распространенностью тугоухости и глухоты, обусловленных мутациями в гене GJB2, существует вероятность того, что в брак вступят супруги, имеющие рецессивную форму тугоухости из-за мутационного повреждения гена GJB2. При этом родословные таких больных будут приобретать нетипичный для аутосомно-рецессивного наследования тип передачи глухоты. Другими словами, эти родословные имеют вид аутосомно-доминантного типа наследования. Таким образом, при проведении медико-генетического консультирования поиск мутации 35delG гена GJB2 может быть рекомендован во всех случаях несиндромальной наследственной глухоты в раннем детском возрасте. Учитывая соотношение числа гетеро- и гомозиготных носителей мутации 35delG гена GJB2 среди больных из Башкортостана, доля этой мутации среди всех мутаций в локусе DFNB1 составляет 86%, что еще раз подчеркивает диагностическую значимость данной мутации и согласуется с данными литературы [29].

Полученные высокие значения частоты мутации 35delG и связь с этнической принадлежностью подтверждают важность изучения распространенности этой делеции в гене GJB2 в различных популяциях

Волго-Уральского региона. Результаты анализа частоты гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC и 167delT в семи популяциях Волго-Уральского региона представлены в таблице 4.

Из таблицы 3 видно, что наиболее часто гетерозиготное носительство 35delG встречается в популяциях мордвы, удмуртов, и русских, несколько реже данная мутация обнаруживается среди татар, а в популяциях чувашей, башкир и коми она не выявлена у обследованных индивидуумов.

При проведении сравнительного анализа гетерогенности популяций Волго-Уральского региона по частоте встречаемости мутации del35G гена GJB2, статистически достоверные отличия наблюдаются между популяциями финно-угорских народов и между популяциями башкир и русских. Также имеются достоверные различия между этническими группами коми, русских и мордвы. Исключения представляют популяции татар и чувашей, которые показали максимальное сходство со всеми народами Волго-Уральского региона.

Таким образом, частота гетерозиготного носительства мутации 35delG, выявленная в популяциях мордвы, удмуртов и русских, близка к частоте носительства этой мутации в популяциях Южной Европы – Испании (3%) [21], Греции (3,5%) [20], и Италии,

**Частота гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC, и 167delT гена GJB2
в популяциях Волго-Уральского региона**

| Популяции ВУР | N | Количество хромосом | del35G | | del167T | | del235C | |
|---------------|-----|---------------------|--|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | | | Частота гетерозиготного носительства | Частота аллелей | Частота гетерозиготного носительства | Частота аллелей | Частота гетерозиготного носительства | Частота аллелей |
| Башкиры | 240 | 480 | 0 0 (0-0.015) | 0 0 (0-0.007) | 0 0 (0-0.015) | 0 0 (0-0.007) | 0 0 (0-0.015) | 0 0 (0-0.007) |
| Татары | 96 | 192 | 1 .010 (0.000264 – 0.05667) | 1 0.0052 (0.000132 – 0.02867) | 0 0 (0-0.030) | 0 0 (0-0.019) | 0 0 (0-0.030) | 0 0 (0-0.019) |
| Русские | 92 | 184 | 2 0.021 (0.002615 - 0.075533) | 2 0.0104 (0.001264 – 0.03712) | 0 0 (0-0.039) | 0 0 (0-0.019) | 0 0 (0-0.039) | 0 0 (0-0.019) |
| Чуваши | 100 | 200 | 0 0 (0-0.036) | 0 0 (0-0.018) | 2 .020 (0.002431 - 0.07038) | 2 0.0100 (0.001213 – 0.03565) | 0 0 (0-0.036) | 0 0 (0-0.018) |
| Мордва | 80 | 160 | 5 0.062 (0.020603 - 0.139857) | 5 0.0313 (0.010223 – 0.07141) | 0 0 (0 – 0.04) | 0 0 (0 – 0.022) | 1 .012 (0.000316- 0.06768) | 1 0.0063 (0.00015 – 0.03432) |
| Коми | 80 | 160 | 0 0 (0 – 0.040) | 0 0 (0 – 0.022) | 2 .025 (0,003042 - 0,08740) | 2 0,0125 (0,001517 - 0,04442) | 0 0 (0 – 0.04) | 0 0 (0 – 0.022) |
| Удмурты | 80 | 160 | 3 .037 (0.007801 - 0.10570) | 3 0.0188 (0.003884 – 0.05381) | 0 0 (0 – 0.04) | 0 0 (0 – 0.022) | 0 0 (0 – 0.04) | 0 0 (0 – 0.022) |

а также в популяциях Эстонии [29], где на сегодняшний день наиболее высока частота гетерозиготного носительства 35delG. В среднем же распространенность гетерозиготного носительства мутации 35delG в популяциях Волго-Уральского региона (0,014) больше соответствует частоте гетерозиготного носительства 35delG в популяциях Ирана, Австралии, Турции и белых представителей Америки (см. табл. 2).

Полученные данные в значительной степени соответствуют гипотезе о существовании эффекта основателя в происхождении мутации 35delG в гене GJB2 и позволяют предположить, что ее распространение происходило с запада на восток, в пользу чего свидетельствует градиент частоты носительства мутации у народов Волго-Уральского региона с максимальным значением у мордвы (0,062) и минимальным у башкир, чувашей и коми (0,00).

Отсутствие мутации в популяциях башкир, объединяющих четыре этногеографические группы, вероятнее всего, объясняется преобладанием в структуре их генофонда монголоидного компонента, являющегося основой генофондов популяций Азии, где частота мутации 35delG крайне

низка (0/53), а среди больных с несиндромальной ауто-сомно-рецессивной глухотой преобладает мутация 235delC [20]. 235delC выявляется у больных глухотой — японцев, — с частотой примерно 70%, тогда как частота ее гетерозиготного носительства составляет 3,2% [8].

Анализ частоты гетерозиготного носительства мутации 235delC у народов Волго-Уральского региона показал наличие данной мутации в популяции мордвы только у одного индивида. Данный факт может свидетельствовать о случайном попадании хромосомы, несущей данную мутацию в популяцию мордвы, поскольку у народов, соседствующих с мордвой, 235delC не обнаружена. Для установления происхождения делеции мы планируем провести анализ гаплотипов на хромосомах, несущих данную мутацию.

Частота 167delT у больных наследственной глухотой около 4%, а частота гетерозиготного носительства данной мутации среди нормально слышащих индивидов в популяции евреев Ашкенази с нормальным слухом составляет 0,73% [22] (Табл. 2). Делеция обнаружена в популяциях чувашей (2%) и коми (2,5%). Зинченко (2002), исследуя

распространенность нейросенсорной тугоухости и глухоты на территории республики Чувашия (1:4400 частота АР форм), показала, что частота 35delG гена GJB2 на хромосомах больных составляет 0,04, то есть данная делеция у больных встречается достаточно редко [30].

Вполне возможно, что какая-либо другая мутация гена GJB2 играет существенную роль в возникновении наследственной нейросенсорной глухоты в Республике Чувашия [30]. К сожалению, на сегодняшний день слишком мало литературных данных по частоте гетерозиготного носительства мутации 167delT в различных популяциях, поэтому делать какое-либо заключение о происхождении данной делеции у чувашей и коми не представляется возможным.

Поскольку различные случаи врожденной нейросенсорной тугоухости могут иметь одинаковую клиническую картину, а этиологический диагноз может быть очень важен, необходимо проведение медико-генетического консультирования таких больных с применением молекулярно-генетического анализа гена GJB2 на предмет мажорной для нашего региона мутации 35delG. Также целесообразным является определение мутаций 167delT и 312del14.

Обнаружение мутаций в гене GJB2 может являться дифференциально-диагностическим критерием для разграничения приобретенных и наследственных форм тугоухости и глухоты, что может быть очень существенным для дальнейшего медико-генетического прогноза.

Литература

1. *Resendes B.L., Robertson N.G., Szustakowski J.D. et al.* Gene discovery in the auditory system: characterization of additional cochlear-expressed sequences // *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* — 2002. — Vol. 3(1). — P. 45–53.
2. *Najmabadi H., Cucci R., Sahebjam S.* GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss // *Hum. Mut.* — 2002. — Vol. 504. — P. 135–138.
3. *Van Camp G., Willems P.J., Smith R.J.* Non-syndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity // *Am. J. Hum. Genet.* — 1997. — Vol. 60. — P. 758–764.
4. *Antoniadi T., Gronskov K., Sand A. et al.* Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 16. — P. 7–12.
5. *Zelante L., Gasparini P., Estivill X. et al.* Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterranean // *Hum. Mol. Genet.* — 1997. — Vol. 6. — P. 1605–1609.
6. *Denoyelle F., Weil L., Maw M.A. et al.* Prelingual deafness: high prevalence of 30delG mutation in the connexin 26 gene // *Hum. Mol. Genet.* — 1997. — Vol. 6. — P. 2173–2177.
7. *Abe S., Usami S., Shinkawa H. et al.* Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese // *J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 37. — P. 41–43.
8. *Kudo T., Ikeda K., Kure S. et al.* Novel mutation in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population // *Am. J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 90. — P. 141–145.
9. *Rabionet R., Gasparini P., Estivill X.* Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins // *Hum. Mutat.* — 2000. — Vol. 16. — P. 190–202.
10. *Kikuchi T., Kimura R.S., Paul D.L. et al.* Gap junction systems in the mammalian cochlea // *Brain Research Reviews.* — 2000. — Vol. 32. — P. 163–166.
11. *del Castillo I., Villamar M., Moreno-Pelayo M.A. et al.* A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346. — P. 243–249.
12. *Mathew C.C.* The isolation of high molecular weight eucariotic DNA: *Methods in Molecular Biology* /Ed. Walker J.M.Y.L. — Human Press, 1984. — Vol. 2. — P. 31–34.
13. *Kelsell D.P., Dunlop J., Stevens H.P. et al.* Connexin 26 gene mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness // *Nature.* — 1997. — Vol. 387. — P. 80–83.
14. *Kelley P.M., Harris D.J., Comer B.C. et al.* Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62. — P. 792–799.
15. *Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Sekya T.* Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single cell conformation polymorphism // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1989. — Vol. 86. — P. 2766–2770.
16. *Carrasquillo M. M., Zlotogora J., Barges S., Chakravarti A.* Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations // *Hum. Molec. Genet.* — 1997. — Vol. 6. — P. 2163–2172.
17. *Lench N., Houseman M., Newton V. et al.* Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness // *Lancet.* — 1998. — Vol. 351. — P. 415.
18. *Murgia A., Orzan E., Polli R. et al.* Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability // *J. Med. Genet.* — 1999. — Vol. 36. — P. 829–832.
19. *Sobe T., Vreugde S., Shahin H. et al.* The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israel population // *Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 106. — P. 50–57.

20. Antoniadis T., Rabionet R., Kroupis C. E. et al. High prevalence in the Greek population of del35G mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. Letter to the editor // Clin. Genet. – 1999. – Vol. 55. – P. 381–382.
21. Estivill X., Fortina P., Surrey S. et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness // Lancet. – 1998. – Vol. 351. – P. 394–398.
22. Morell R. J., Kim H.J., Hood L.J. et al. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with non-syndromic recessive deafness // Nat. Engl. J. Med. – 1998. – Vol. 339. – P. 1500–1505.
23. Mustapha M., Salem N., Delague V. et al. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 35delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene // J. Mol. Genet. – 2001. – Vol. 1. – P. 38–42.
24. Loffler J., Nekahm D., Hirst-Stadlmann A. et al. Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria // Europ. J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 9. – P. 226–230.
25. Toth T., Kupka S., Esmer H. et al. Frequency of the recessive 35delG mutation in the GJB2 gene in Northeast-Hungarian individuals and patients with hearing impairment // Int. J. Mol. Med. – 2001. – Vol. 8. – P. 189–192.
26. Lucotte G., Bathelier C., Champeonis T. PRC test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France // Mol. Cell. Prob. – 2001. – Vol. 15. – P. 57–59.
27. Tekin M., Akar N., Cin S. et al. Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians // Hum. Genet. – 2001. – Vol. 108. – P. 385–389.
28. Yan D., Park H. J., Ouyang X.M. et al. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians // Hum. Genet. – 2003. – Vol. 114(1). – P. 44–50.
29. Gasparini P., Rabionet R., Barbuiani G. et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG // Eur. J. Hum. Genet. – 2000. – Vol. 8(1). – P. 19–23.
30. Зинченко Р.А., Зинченко С.П., Галкина В.А. и др. Распространенность и молекулярно-генетическое типирование несиндромальной нейросенсорной тугоухости в республике Чувашия // Генетика. – 2003. – 9. – С. 1275–1284.

Принятые сокращения:

DFNB1 – Различные генные локусы многочисленных несиндромальных форм глухоты обозначаются буквами DFN, взятыми из английского слова «deafness» – глухота, и нумеруются в хронологической последовательности по мере их открытия.

Аутосомно-доминантные локусы обозначают DFNA.

Аутосомно-рецессивные – DFNB,

X-сцепленные – DFN.

GJB2 – gap junction 2

GJB6 – gap junction 6

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF NON-SYNDROMIC AUTOSOMAL RECESSIVE DEAFNESS IN PATIENTS AND VOLGA-URAL POPULATIONS

E.K. KHUSNUTDINOVA, L.U. DZHEMILEVA

Institute of biochemistry and genetics of Ufa Scientific center of Russian Academy of Sciences, Ufa

Congenital deafness is one of the frequent human diseases, registered with frequency 1:1000 newborn children. The reason of hereditary deafness are mutations in genes GJB2 and GJB6 among which inhabitants of the Europe most often have a 35delG mutation. The spectrum and frequency of mutations of genes GJB2 and GJB6 in patients with bilateral deafness and sensorineural deafness and healthy members (235 persons) is studied. From 100 families, and also frequency heterozygote carrier mutations 35delG, 235delC, 167delT gene GJB2 in the populations, living on territory of the Volga-Ural region is revealed. The 35delG mutation has been revealed at 53 patients, from them 13 (24,5%) were heterozygote and at 40 patients (75%) deletion was in a homozygous condition. Most often the 35delG mutation gene GJB2 meets on chromosomes of patients Tatar and Russian origins, its frequency has made, 40,9 and 55,2%, accordingly. Among the investigated populations of the Volga-Ural region heterozygote carrier 35delG mutation most often meets at Mordvinians (1/16), Udmurts (1/27), Russian (1/46), less often at Tatars (1/96), and 167delT it is found out in populations of Chuvashs (1/50) and Komi (1/40). In samples the Bashkir (four ethnogeographical groups), Chuvashs and Komi the mutation 35delG has not been found out. On the average, in populations of the Volga-Ural region frequency of a mutation 35delG makes 0,14, that corresponds to frequency in populations of Northern and Central Europe.

Keywords: ethnogenetics, the ethnogeography, hereditary diseases, deafness.

УДК 615.373.6: 612.017.1

ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ БЕТА НА РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА У ЖИВОТНЫХ С МОДИФИЦИРОВАННОЙ ИММУНО-РЕАКТИВНОСТЬЮ

Г.М. СЫСОЕВА, В.А. ФАДИНА, Е.Д. ДАНИЛЕНКО, В.И. МАСЫЧЕВА

*Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ ФГУП ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
г. Бердск Новосибирской области*

Проведено исследование влияния рФНО-бета на развитие реакции ГЗТ у мышей в условиях модифицированной иммунореактивности. Показано, что препарат рФНО-бета обладает способностью усиливать реакцию ГЗТ. Эффект препарата зависит от генотипа экспериментальных животных и проявлялся в условиях иммунодепрессии. Повышение интенсивности реакции ГЗТ при введении рФНО-бета, по-видимому, связано со стимулирующим воздействием препарата на реакцию миграции макрофагов и окислительный метаболизм макрофагов.

Ключевые слова: лимфотоксин, гиперчувствительность замедленного типа, макрофаги.

Фактор некроза опухоли бета (ФНО-бета, лимфотоксин) является полипотентным белком-модулятором иммунных реакций, обладает противоопухолевым, противоионфекционным действием, оказывает влияние на воспалительные процессы [2]. Важную роль в механизме реализации этих эффектов играют клеточные иммунные реакции, интегральным показателем интенсивности которых может служить реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [7]. Как было показано авторами работы [6], продукция лимфотоксина лимфоидными клетками, как правило, напрямую коррелирует с выраженностью реакции ГЗТ. В то же время хорошо известно, что ФНО-бета модулирует активность различных клеток, участвующих в реализации специфического иммунного ответа. В экспериментах на культуре клеток было показано, что данный цитокин усиливает индуцированную антигеном пролиферацию Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток [6, 7]. ФНО-бета является мощным стимулятором активности фагоцитирующих клеток: усиливает их фагоцитарную и антиген-представляющую активность, высвобождение биологически активных веществ, регулирующих межклеточные взаимодействия в

ходе иммунного ответа. Показано, что данный белок воздействует на сосудистый эндотелий, увеличивая его проницаемость, способствует миграции лейкоцитов в ткани, усиливает адгезию клеток к эндотелию, результатом чего является усиление местной воспалительной реакции [8, 9].

Целью данной работы являлось исследование влияния рекомбинантного ФНО-бета на развитие клеточной иммунной реакции ГЗТ у линейных мышей, различающихся по чувствительности к развитию местной воспалительной реакции, на фоне модифицирующих воздействий.

Методы исследования

В работе была использована лекарственная форма препарата рекомбинантного человеческого фактора некроза опухоли бета (рФНО-бета), полученного из штамма *E.coli* SG 200-50/ЛТ21, с активностью 1×10^8 Е/мл, установленной в стандартном цитолитическом тесте на культуре мышинных фибробластов L-929. Метод получения препарата был описан ранее [2]. Лекарственная форма препарата рФНО-бета с активностью $8,75 \times 10^5$ Е/ампулу содержала в качестве наполнителя реополиглокин (2%).

Исследования проводили на мышах линий СВА и С57В1/6, самцах, массой тела 20–22 г,

* Автор для переписки:

Сысоева Г.М.

сотрудница Научно-исследовательского конструкторско-технологического института биологически активных веществ ФГУП ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», г. Бердск Новосибирской области.

полученных из питомника ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Клеточный иммунный ответ оценивали по выраженности реакции ГЗТ к эритроцитам барана (ЭБ) [10]. Животных иммунизировали внутрибрюшинно в дозе 107 ЭБ. Для оценки величины реакции мышам на пятые сутки после иммунизации в подушечку одной из лап вводили разрешающую дозу антигена (108 ЭБ), в контрольную лапу — физиологический раствор. Через 24 часа после инъекции определяли массу опытной и контрольной лап и по разнице их масс, выраженной в процентах, вычисляли индекс реакции (ИР). Рекомбинантный ФНО-бета вводили однократно внутрибрюшинно, одновременно с иммунизацией, в дозах 103–104 Е/мышь. Контролем служили иммунизированные животные, которым в те же сроки вводили физиологический раствор.

Влияние препарата на реакцию ингибирования миграции макрофагов (РИМ) оценивали по методу Васильевой [1] в собственной модификации. Беспородных мышей иммунизировали в дозе 107 ЭБ/мышь. Разрешающую инъекцию антигена осуществляли через 4 дня после иммунизации внутрибрюшинным введением эритроцитов барана в дозе 108 ЭБ. Препарат рФНО-бета вводили внутрибрюшинно одновременно с антигеном в дозах 103–104 Е/мышь. Контролем служили мыши, иммунизированные той же дозой ЭБ, которым одновременно с АГ вводили физиологический раствор в том же объеме.

Через 24 часа после разрешающей инъекции антигена брюшную полость животных промывали раствором Хенкса, содержащим сыворотку крупного рогатого скота (10%) и гепарин (15 ед/мл). В полученных суспензиях с помощью камеры Горяева определяли концентрацию клеток. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1000 об/мин, осадок ресуспендировали в 0,1 мл физиологического раствора и делали мазки, которые после высушивания фиксировали в абсолютном этиловом спирте и окрашивали по Романовскому — Гимзе. В мазках подсчитывали количество макрофагов. Процент исчезновения макрофагов (% ИМ) вычисляли по формуле:

$$\% \text{ ИМ} = (a-b)/a \times 100\%,$$

где a — число макрофагов в экссудате контрольных мышей, b — число макрофагов в экссудате опытных мышей.

Модификацию эффекторной фазы иммунного ответа осуществляли введением гидрокортизона в

дозе 1,0 мг/мышь за 5 часов до разрешающей инъекции антигена. ФНО-бета вводили однократно внутрибрюшинно, одновременно с иммунизацией, в дозах 103–104 Е/мышь.

Местную воспалительную реакцию (адьювантный артрит) у мышей обеих использованных линий индуцировали по методу [4] введением 0,05 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Как известно, мыши этих линий оппозитно различаются по своей чувствительности к развитию экспериментального адьювантного артрита, вызванного введением полного адьюванта Фрейнда [4].

Препарат рФНО-бета вводили трижды внутрибрюшинно в дозах 103 и 104 Е/мышь, начиная введение через сутки после индукции артрита. Контролем служили животные, которым инъекцировали ПАФ. Об интенсивности воспалительной реакции судили по разнице массы опытной и контрольной лап через 7 суток после инъекции ПАФ. В качестве теста, характеризующего интенсивность воспалительной реакции, использовали показатель количества макрофагов с включениями восстановленного нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Определение количества НСТ-положительных макрофагов мышей с адьювантным артритом выполняли по методу [12] в собственной модификации. На монослой перитонеальных макрофагов наносили 0,4%-ную взвесь опсонизированных нормальной мышшиной сывороткой частиц зимозана и 0,2%-ный раствор нитросинего тетразолия в объеме 0,15 мл на 2,5 мл культуральной среды 199. После 30-минутного культивирования монослой отмывали и готовили для микроскопической оценки. Подсчитывали число макрофагов с отложениями диформаза (НСТ+ макрофаги), в процентах к общему числу (500) исследованных клеток.

Данные экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.3.0» (Statistical Graphics Corp., USA) на компьютере IBM PC/AT 286/287. Достоверность обнаруженных различий оценивали по t -критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Сравнительная оценка влияния препарата на выраженность реакции ГЗТ у мышей линий СВА и С57Bl/6 показала, что введение рФНО-бета не приводило к изменению индекса реакции у мышей линии СВА, в то время как у мышей линии С57Bl/6 препарат усиливал реакцию ГЗТ (табл. 1). Стимулирующий эффект рФНО-бета проявлялся лишь в одной

Таблица 1
Влияние препарата рФНО-бета на выраженность реакции ГЭТ у мышей линий СВА и С57В1/6

| Группа животных | Индекс реакции ГЭТ | |
|-----------------|--------------------|-----------|
| | СВА | С57В1/6 |
| Интактные | 17,7 ±1,7 | 6,4±2,6 |
| Контроль | 23,9±1,9 | 12,8±2,6 |
| рФНО 103 Е/мышь | 19,3±3,8 | 22,3±2,2* |
| рФНО 104 Е/мышь | 19,6±1,3 | 17,3±3,6 |

Примечание: * статистически значимые различия относительно контрольной группы мышей

из использованных доз, 103Е/мышь. То есть, препарат рФНО-бета обладает слабо выраженной способностью стимулировать клеточную иммунную реакцию ГЭТ, которая проявлялась у мышей линии С57В1/6.

Воспаление является обязательным компонентом эффекторной стадии развития ГЭТ и может служить индикатором клеточного иммунного ответа. В связи с чем гидрокортизон, известный своей способностью подавлять развитие местного воспалительного процесса, был использован нами в качестве агента, модифицирующего эффекторное звено иммунного ответа.

Таблица 2
Влияние ФНО-бета на выраженность реакции ГЭТ у мышей линии СВА и С57В1/6 с введением гидрокортизона

| Группа животных | Индекс реакции ГЭТ | |
|---------------------------------|--------------------|----------|
| | СВА | С57В1/6 |
| Контроль | 17,2 ±1,8 | 15,3±1,3 |
| Гидрокортизон | 4,8±0,7 | 4,9±0,8 |
| Гидрокортизон + рФНО 103 Е/мышь | 4,5±0,9 | 7,8±0,5* |
| Гидрокортизон + рФНО104 Е/мышь | 5,6±0,8 | 4,3±1,2 |

Примечание: * различие достоверно относительно группы мышей с введением гидрокортизона

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что введение гидрокортизона за 5 часов до разрешающей инъекции антигена вызывало резкое ослабление реакции ГЭТ у мышей обеих использованных линий. Уменьшение индекса реакции составило 72 и 68% у мышей линии СВА и С57В1/6, соответственно.

Введение рФНО-бета мышам линии СВА не приводило к изменению индекса реакции по сравнению с показателями животных, которым вводили гидрокортизон. В то же время препарат значительно усиливал реакцию ГЭТ у мышей линии С57В1/6, хотя и не приводил к полному восстановлению уровня показателя. Эффект стимуляции проявлялся в эффективной дозе – 103Е/мышь. Повышение дозы препарата приводило к исчезновению эффекта стимуляции. Следовательно, рФНО-бета усиливал клеточный иммунный ответ в условиях его ингибирования под действием гидрокортизона лишь у мышей с повышенной способностью к развитию воспалительной реакции. Эти данные позволяют предположить, что модулирующему воздействию цитокина при его системном введении подвержены преимущественно клетки, обеспечивающие локальный воспалительный процесс (макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты, клетки эндотелия сосудов).

Возможно, обнаруженное в наших экспериментах свойство рФНО-бета усиливать реакцию ингибирования миграции макрофагов, которая играет стержневую роль в воспалительном ответе при развитии реакции ГЭТ, проявилось у мышей линии С57В1/6, но не линии СВА.

Для дифференцировки эффектов рФНО-бета была использована экспериментальная модель воспаления, опосредованная развитием реакции ГЭТ – адьювантный артрит у мышей.

В соответствии с данными литературы, введение ПАФ мышам линии С57В1/6 приводило к развитию более интенсивной воспалительной реакции, чем у мышей СВА. Величина артрита у высокочувствительных животных была в 1,7 раза больше, чем у устойчивых к введению флоггена мышей (табл. 3).

Введение препарата рФНО-бета мышам линии С57В1/6 усиливало воспалительный процесс. Эффект стимуляции был не слишком значительным, но статистически значимым и не зависел от дозы препарата. Увеличение размеров артрита составляло 22 и 19% при введении рФНО-бета в дозе 103 и 104 Е/мышь, соответственно. Инъекция препарата в тех же дозах мышам линии СВА не отражалась на величине данного показателя. Иными словами, способность препарата рФНО-бета усиливать местную воспалительную реакцию проявлялась лишь у мышей линии С57В1/6, имеющих низкую устойчивость к развитию адьювантного артрита.

Известно, что макрофаги мышей линий С57В1/6 и СВА отличаются по уровню функциональной активности в покое и по степени их реактивности на стадии индукции иммунного ответа [2, 5]. Существу-

**Влияние рФНО-бета на развитие адьювантного артрита
у мышей линии СВА и С57В1/6**

| Группа животных | СВА | | С57В1/6 | |
|------------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | Величина артрита узла, мг | % НСТ+ макрофагов | Величина артрита узла, мг | % НСТ+ макрофагов |
| ПАФ, физиологический раствор | 97,0±7,6 | 8,1±1,7 | 148,9±8,8 | 7,6±1,1 |
| ПАФ, рФНО-бета 103 | 93,5±4,7 | 9,4±0,1 | 181,9±8,9* | 15,6±1,3* |
| ПАФ, рФНО-бета 104 | 91,5±2,4 | 9,5±1,7 | 177,2±8,0* | 15,9±2,6* |

Примечание: * статистически значимые различия относительно контрольной группы мышей

ют данные о том, что мыши линии СВА и С57В1/6, оппозитно реагирующие на тимусзависимый антиген, различаются уровнем активности системы синтеза тканевых медиаторов, в частности, простагландинов и фактора ингибирующего миграцию макрофагов. Как было показано нами ранее [4], инъекция препарата рФНО-бета мышам линии С57В1/6 стимулировала более интенсивное поглощение ЭБ перитонеальными макрофагами, чего не наблюдалось у мышей СВА. Следовательно, особенности влияния рФНО-бета на развитие ГЭТ мышей этих линий могут быть связаны с различиями в реакции на препарат их макрофагов.

Действительно, усиление воспалительной реакции под действием рФНО-бета у мышей С57В1/6, которым индуцировали артрит, сопровождалось повышением метаболической активности макрофагов этих животных. Процент НСТ+-макрофагов при введении препарата мышам линии С57В1/6 возрос более, чем в 2 раза, в то время как у мышей линии СВА количество их оставалось на уровне контрольных показателей (см. табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что одним из механизмов провоспалительной активности рФНО-бета у чувствительных к воздействию животных является активация фагоцитов.

Активацию макрофагов в зоне воспаления часто связывают с МИФ-фактором, ингибирующим их миграцию, который продуцируется активированными Т-лимфоцитами.

Исследование влияния рФНО-бета на выраженность реакции ингибирования миграции макрофагов (ИМ) при иммунизации животных 107

ЭБ/мышь выявило, что инъекция препарата приводила к значительному снижению числа перитонеальных макрофагов в брюшной полости. Количество макрофагов в экссудате при введении препарата рФНО-бета в дозах 103 и 104 Е/20 г составляло соответственно 0,40–0,10 млн/мл и 0,40–0,10 млн/мл относительно 0,70–0,10 млн/мл в контрольной группе животных.

Следовательно, эффект стимуляции реакции ИМ при введении рФНО-бета в дозах 103–104Е/мышь был одинаковым и составил 42,8% от контроля. То есть, препарат рФНО-бета усиливал реакцию ИМ у сенсibilизированных ЭБ мышей, что свидетельствует о его стимулирующем действии на лимфоциты, продуцирующие МИФ.

Заключение

Таким образом, представленные данные позволяют сделать вывод о том, что при различных экзогенных воздействиях иммуномодулирующее действие рФНО-бета на Т-клеточную реакцию ГЭТ зависит от уровня реактивности животного и связано со стимулирующим влиянием препарата на выработку фактора, ингибирующего миграцию макрофагов и окислительный метаболизм макрофагов.

Литература

1. Васильева Г.И., Дорошенко Е.П., Киселева А.К., Пустошилова В.Л. // Иммунология. – 1988. – 6. – С. 82–84.
2. Денисов А.А., Пинегин Б.В., Еремина О.Ф. и др. Изучение иммунорегуляторных свойств рекомбинантного лимфотоксина человека // Иммунология. – 1996. – 4. – С. 34–39.
3. Лебедев Л.Р., Зернов Ю.П., Андреева И.С., Пустошилова Н.М. // Биотехнология. – 1995. – 12. – С. 19–24.
4. Маджидов У.В. Т-супрессоры при экспериментальном адьювантном артрите и иммуносупрессии // Журнал микроб. эпидем. иммунобиол. – 1984. – 1. – С. 65–68.
5. Масычева В.И., Фади́на В.А., Даниленко Е.Д. и др. Исследование иммунорегуляторных свойств рекомбинантного фактора некроза опухоли бета у оппоритно реагирующих на антиген мышей // Экспер. и клинич. фармак. – 1999. – 4. – С. 44–47.
6. Abe Y., Yamauchi K., Kimura S. // J. Leukoc. Biol. – 1995. – Vol. 57. – N 3. – P. 462–468.
7. Aframian D., Katrenellentogen M., Arad G. et al. Down regulation of human tumor necrosis factor-beta gene expression by cells with suppressive activity // Immunol. Lett. – 1996. – Vol. 54. – N 2–3. – P. 171–176.
8. Bussolino F., Camussi G., Tetta C. et al. // J. Lipid Mediat. – 1990. – 2 Suppl. – S. 15–22.
9. Cuff C.A., Schwartz J., Bergman C.M. et al. // J. Immunol. – 1998. – Vol. 161. – N 12. – P. 6853–6860.
10. Kitamura K. A footpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // J. Immunol. – 1980. – Vol. 39. – N 3. – P. 277–283.
11. Kusumi A., Abo T., Masuda T. et al. // Immunology. – 1992. – Vol. 77. – P. 177–184.
12. Rook G.A., Steele J., Umar S., Dockrell H.M. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon // J. Immunol. Methods. – 1985. – Sep. 3. – Vol. 82. – N 1. – P. 161–167.

THE EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR-BETA ON DEVELOPMENT OF THE SLOW TYPE HYPERSENSITIVITY REACTION IN ANIMALS WITH MODIFIED IMMUNOREACTIVITY

G.M.SYSOYEVA, V.A.FADINA, E.D.DANILENKO, V.I.MASYCHEVA

Research engineering and design institute of biologically active substances State Research Center of virology and biotechnology «Vector», Berdsk Novosibirsk area

The research of the influence of rTNF-beta on development of the slow type hypersensitivity reaction (STHR) in mice with modified immunoreactivity is carried out. It is shown that rTNF-beta possesses property to increase STHR. The effect of this preparation depends on a genotype of experimental animals and becomes apparent in conditions immunosuppressive. It is supposed that an increase of the intensity of STHR under the influence of rTNF-beta is caused by stimulating effect of the preparation on reaction of macrophage migration and oxidizing metabolism of macrophages.

Keywords: lymphotoxin, rTNF-beta, slow type hypersensitivity reaction, macrophages.

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ IN VITRO И IN VIVO ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МОРКОВИ И ГОРОХА

Н.В. САВЕЛЬЕВА*, Е.Э. ДУДНИК, Л.А. ЛУТОВА

Санкт-Петербургский государственный университет

В генной инженерии растений широко используется метод агробактериальной трансформации, основанный на горизонтальном переносе ДНК от бактерии к растению. Вещества, синтезируемые трансгенными растениями, активно используют в медицине, пищевой промышленности и пр. Цель работы состояла в подборе оптимальных сред для культивирования моркови (сорта Нантская, Тушон, Ротте ризен, Московская зимняя А-515, Королева осени, Витаминная-6) и гороха (сорт Адагумский) в условиях *in vitro*, а также подборе условий агробактериальной трансформации *in vitro* и *in vivo*. В наших исследованиях было использовано три способа трансформации: трансформация семян и проростков моркови в условиях *in vitro* и трансформация проростков моркови и гороха в условиях *in vivo*. Мы получили трансгенные растения гороха и моркови с применением всех трех методов, но наиболее эффективным для обоих видов оказался метод трансформации проростков в условиях *in vivo*. Таким образом, сорта были охарактеризованы по способности к трансформации и наиболее перспективные (сорт Нантская и Адагумский, 70 и 83,7% эффективность трансформации, соответственно) были отобраны для дальнейшей работы по созданию растений-продуцентов.

Ключевые слова: трансгенные растения, агробактериальная трансформация, генная инженерия.

В настоящее время использование растительных систем в качестве биореакторов приобретает все большее значение в современной биотехнологии. Разнообразие веществ, которые получают с помощью растений-продуцентов, очень велико и их количество продолжает увеличиваться с каждым годом. Эти вещества активно используют в медицине, пищевой и легкой промышленности, а также в других отраслях народного хозяйства [1–7, 10].

Производство необходимого продукта (белка, витамина, полимера и т.д.) основано на технологии трансформации — введении в геном продуцента нового гена. Сейчас биотехнология располагает самыми разнообразными методами трансформации растений, однако любой из них имеет свои ограничения [7]. Самым первым методом, позволяющим ввести новый ген в растение, является метод агробактериальной трансформации. Он основан на уникальной способности агробак-

терий осуществлять перенос генетической информации, которая локализована в Т-ДНК области Ri- или Ti-плазмид [8–10]. И несмотря на то, что с того момента арсенал методов трансформации растений значительно пополнился, ученые до сих пор широко используют агробактериальную трансформацию для решения как фундаментальных, так и прикладных задач [11, 12].

Наши исследования направлены на создание растений-вакцин. Однако для каждого вида-кандидата необходимо знать условия культивирования и выбрать высокоэффективный метод трансформации.

Целью данной работы было получение и анализ трансгенных растений моркови и гороха, которые в последствии мы планируем использовать в качестве биопродуцентов.

Наша задача состояла в подборе оптимальных сред для работы с культурами моркови и гороха в условиях *in vitro*, а также подборе наиболее эффективных методов и условий агробактериальной трансформации для данных видов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Объектами исследования стали морковь (*Daucus carota L.*) и горох посевной (*Pisum sativum L.*). Их

* Автор для переписки:

Савельева Наталья Владимировна,
сотрудница кафедры генетики и селекции
Санкт-Петербургского государственного университета,
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9
Тел.: (812) 328-15-90, тел./факс: (812) 328-05-41,
+7 921 974-52-19 (моб.)
E-mail: nata.saveljeva@gmail.com

широко применяют в качестве кормовых культур в сельском хозяйстве. Кроме того, эти виды растений активно используют в биотехнологических исследованиях [13, 14]. Из литературных источников известно, что морковь достаточно легко поддается агробактериальной трансформации, частота которой составляет 7,2–39% [15, 16]. Однако этот вид капризен при культивировании *in vitro*. С другой стороны, несмотря на то что горох является классическим модельным объектом генетики, и для него разработан широкий спектр методик по внедрению чужеродной ДНК в геном, низкая эффективность

трансформации, около 0,6–3,5%, и дальнейшие проблемы связанные с укоренением полученных трансформантов создают некоторые трудности при работе с этой культурой [17, 18].

Растительный материал. В работе были использованы 6 сортов моркови (*Daucus carota L.*; $2n = 18$). Это двудольное, двулетнее растение, входящее в семейство зонтичных. Характеристика сортов представлена в таблице 1.

Помимо этого в нашей работе мы использовали горох посевной (*Pisum sativum L.*; $2n = 14$), который относится к двудольным, однолетним растениям

Таблица 1

Характеристика сортов моркови, использованных в работе

| Сорт | Скороспелость (дни) | Описание корнеплода | | |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------|------------------------------|
| | | размер (см) | масса (гр) | форма |
| Витаминная 6 | ранний (90–120) | 18–20 | 150 | цилиндрический, тупоконечный |
| Королева осени | среднепоздний (120–130) | 25–30 | 200–300 | цилиндрический |
| Московская зимняя А-515 | среднеспелый (110–120) | до 16 | 100–180 | конический, тупоконечный |
| Нантская | среднеспелый (100–110) | 16–18 | 110–120 | цилиндрический, тупоконечный |
| Ротте ризен | позднеспелый (150) | 22–24 | 200–210 | конический, остроконечный |
| Тушон | ранний (90–120) | 18–20 | 80–150 | цилиндрический, тупоконечный |

семейства бобовых. Для исследований мы выбрали сорт Адагумский, который является овощным, высотой 70–80 см, и созревает в течение 50–75 дней.

Условия культивирования. Растительный материал культивировали в условиях *in vitro* и *in vivo*. Для культивации в условиях *in vitro* мы использовали среду Мурасига – Скуга (MS0) и среды MS1 и MS2. Жидкая среда MS1 отличается от среды MS0 кислотностью: $pH_{MS0} = 5,8$, $pH_{MS1} = 5,2$. Полужидкая среда MS2 создана на основе среды Мурасига – Скуга с небольшими модификациями: пониженное содержание азота ($KNO_3 - 0,475$ мг/л, NH_4NO_3 – отсутствует), добавление 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) и сниженное количества агара (60000 мг/л) [11, 13, 14].

Растительный материал *in vitro* и *in vivo* выращивали при $t 22-24$ °С, с фотопериодом 16 часов, при освещенности 6000 люкс [13].

Семена моркови стерилизовали в растворе 1V H_2O : 2V C_2H_5OH : 1V H_2O_2 в течение 5 минут, а семена гороха – в концентрированной серной кисло-

те в течение 10 минут. Затем обработанные семена тщательно промывали стерильной дистиллированной водой. После этого горох проращивали на влажном фильтре, в то время как морковь слегка подсушивали и высевали на среду MS0 без гормонов [13].

Характеристика штамма, использованного в работе. Для выращивания агробактерии использовалась стандартную микробиологическую среду LB, жидкую и твердую (с добавлением агара 20 гр/л) [13].

Для трансформации был использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (плазмида pART 27). Штамм содержит бинарный вектор состоящий из хелперной (*vir*-регион) и векторной плазмид. Векторная плазмида получена на основе первичного клонирующего вектора pART 7. Векторная плазмида pART 27 содержит RK2 – репликон для репликации в *A. tumefaciens*, ориджин репликации ColE1 для обеспечения высококопийности в *Escherichia coli* и бактериальный селективный маркер – ген устойчивости к спектиномицину/стрептомицину – Str/Sp. По

полилинкеру *lacZ'* встроена последовательность из плазмиды *pART7*. Она состоит из 35S-промотора и множественного сайта клонирования. За полилинкером *lacZ'* находится последовательность растительного селективного маркера — гена устойчивости к канамицину (*Km*) *nptII*, которая кодирует неомизинфосфотрансферазу II. Ген *nptII* находится под контролем промотора нопалин синтазы [19].

Штамм ЕНА105 (*pART 27*) любезно предоставлен М.В. Падкиной и Е.В. Самбук (лаборатория биохимической генетики, Санкт-Петербургский государственный университет).

Методы трансформации in vitro. Для того чтобы выбрать наиболее эффективный метод агробактериальной трансформации для сельскохозяйственных культур: моркови и гороха, мы апробировали разные вариации трансформации растений как *in vitro*, так и *in vivo*.

При работе с растениями *in vitro* были использованы два метода трансформации для моркови — трансформация набухших семян [20] и трансформация семидневных проростков [16].

Метод агробактериальной трансформации набухших семян моркови. Для агробактериальной трансформации набухших семян моркови стерилизованные семена помещали в раствор 10% H_2O_2 на 1 час для набухания и затем промывали стерильной дистиллированной водой. Далее семена помещали в суспензию ночной культуры агробактерии на 1/3 разбавленную жидкой средой MS1. Через двое суток семена промывали стерильной водой и высевали на среду MS0 с добавлением селективного антибиотика *Km* (100 мг/л) и цефотаксима (300 мг/л), для элиминации бактерий [20].

Через две недели проводили подсчет проросших на селективной среде семян. Затем проростки переносили на селективную среду MS0 с добавлением *Km* (150 мг/л). Учет выживших растений проводился через 3 недели.

Метод трансформации семидневных проростков моркови. Кроме того, для трансформации моркови мы использовали семидневные проростки. Трансгенные растения получали через стадию каллусообразования и методом прямой регенерации.

Первый этап трансформации аналогичен в обоих случаях.

В качестве эксплантов использовали семидневные проростки, достигшие высоты 1,5–2 см, но еще не давшие настоящий лист. У проростков отрезали корень, затем на каждый проросток по всей длине были нанесены поранения, включая зону апикальной меристемы между семядолями. Все манипуляции проводились в чашке

Петри с жидкой средой MS1. После этого экспланты на 40 минут помещали в суспензию ночной культуры агробактерии, на 1/3 разбавленную жидкой MS1. Затем экспланты кратковременно помещали на фильтр и переносили для кокультивации на твердую среду MS0 с добавлением дедифференцирующего агента, аналога ауксина, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) в концентрации 2 мг/л.

После двух дней кокультивации экспланты переносили на среду MS0 содержащую антибиотик цефотаксим (300 мг/л) для элиминации бактерий и селективный агент *Km* (100 мг/л). Через 2–2,5 месяца проводили учет полученных каллусов. В последствии из каллусов формировались растения-регенеранты [16].

Для получения трансформантов методом прямой регенерации, минуя стадию каллусообразования, использовали приемы, описанные выше, но ауксин в среду не добавляли. Через неделю экспланты помещали на подобранную нами среду MS2 для индукции ризогенеза [14]. После образования корней растения вновь переносились на среду MS0.

С контрольными растениями проводились те же манипуляции с использованием стерильной дистиллированной воды вместо культуры бактерии.

Трансформация in vivo. Помимо трансформации *in vitro* мы провели эксперименты по трансформации в условиях *in vivo*. Для этого мы инфицировали семидневные растения моркови и гороха в нестерильных условиях с помощью прокалывания апикальных и боковых (в случае гороха) меристем препаровальной иглой, смоченной в ночной культуре агробактериальных клеток [21].

Молекулярные методы: ПЦР-анализ. Анализ предположительно трансгенных растений осуществляли с помощью метода ПЦР. Выделение тотальной растительной ДНК и тотальной ДНК *A. tumefaciens* проводили по стандартным методикам. Полученные образцы ДНК хранили при температуре -20 °C [13].

Полимеразно-цепные реакции (ПЦР) проводили в объеме 50 мкл, при температуре отжига, подобранной для праймеров к гену *nptII*, составившую 60 °C. Концентрация каждого нуклеотида составляла 2 нмоль; праймеров — 10 мкмоль; ДНК — 0,10 мкг. Активность фермента Таq-полимеразы составила 2,5 единицы.

ПЦР, проводимый с праймерами к гену *nptII*, включал в себя 34 цикла. В работе были использованы 24-членные праймеры к гену *nptII*, последовательности которых представлены ниже:

nptII (1): 5'-GTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGAC-3'
nptII (2): 3'-CACCATGATATTTCGGCAAGCAGGC-5'

В качестве позитивного контроля мы проводили ПЦР-реакцию с тотальной ДНК агробактерии с использованием праймеров к гену *prtII*.

В качестве негативного контроля в ПЦР-реакциях использовали ДНК нетрансформированных растений.

Для разделения фрагментов ДНК использовали 1% агарозный гель. Фрагменты ДНК разгоняли при напряжении электрического поля 100 Вольт [13].

Статистические методы. Для расчета доверительных интервалов для процента трансформированных растений использовали ϕ -преобразование Фишера, для

$$\phi S\phi = 1/\sqrt{n},$$

где n — объем выборки [22].

Для расчета расщепления у потомков от самоопыления и его соответствия 3:1 использовали метод хи квадрат [22].

Результаты и обсуждение

Трансформация набухших семян моркови *in vitro*. Метод агробактериальной трансформации прорастающих семян был впервые применен и успешно используется для арабидопсиса. Выход трансгенных растений составляет до 1,2% [20]. Данный метод менее трудоемок, чем методы трансформации через эксплант, не требует работы с культурой ткани и позволяет анализировать большое количество растений.

В работе использовали семена шести сортов моркови: Витаминная-6, Королева осени, Московская зимняя А-515, Нантская, Ротте ризен и Тушон. При селекции К_m-устойчивых растений использовали метод ступенчатого отбора. На первом этапе растения моркови *in vitro* культивировали на среде, содержащей селективный агент в низкой концентрации 100 мг/л.

В данном случае могли выживать не только трансгенные растения, но и какой-то процент нетрансгенных. Затем выжившие растения пересаживали на среду с сублетальной для моркови концентрацией К_m — 150 мг/л (табл.2).

Выжившие на этой среде растения считали предположительно трансгенными (рис.1).



Рис. 1. Проростки моркови на селективной среде MS0 с К_m (150 мг/л): (А) К_m-неустойчивое растение моркови; (В) К_m-устойчивое растение моркови

В качестве контроля для обработки семян использовали Н₂О вместо культуры бактерии (табл.3).

Анализ результатов показал, что всхожесть семян моркови на среде с К_m (100 мг/л) у трансформированных семян оказалась выше, чем в контроле. Такие различия во всхожести между контрольными и трансформированными семенами обусловлены тем, что процент всхожести в опыте составляли как трансгенные, так и устойчивые к данной концентрации антибиотика нетрансгенные растения, тогда как процент всхожести в контроле составили только устойчивые к данной концентрации антибиотика нетрансгенные растения. Однако в процессе культивации на среде с К_m (150 мг/л) большинство выживших проростков погибло. Таким образом, в данном случае выживали только единичные растения, которые были

Таблица 2

Результаты ступенчатого отбора проростков моркови из трансформированных семян по устойчивости к К_m

| Сорт | Количество семян | Всхожесть в % (К _m 100 мг/л) | Выжило в % (К _m 100 мг/л) | Выжило растений (К _m 150 мг/л) |
|-------------------------|------------------|---|--------------------------------------|---|
| Витаминная-6 | 206 | 21±0,64 | 9,7±1,2 | 1 |
| Королева осени | 92 | 33,7±0,81 | 23,9±1,1 | 0 |
| Московская зимняя А-515 | 152 | 22,4±0,76 | 1,3±1,2 | 1 |
| Нантская | 90 | 42,2±0,66 | 18,8±1,5 | 2 |
| Ротте ризен | 140 | 48,6±0,37 | 6,4±2,7 | 2 |
| Тушон | 108 | 16,6±1,4 | 3,8±6,1 | 1 |

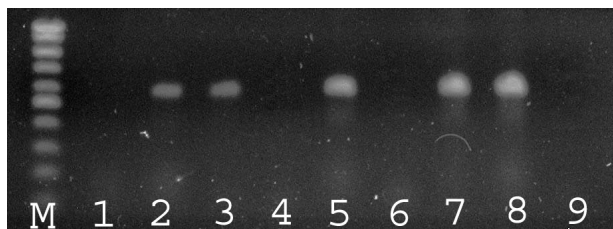


Рис. 2. Результаты полимеразной цепной реакции ДНК Км-устойчивых растений моркови с праймерами к гену *nptII* *A. tumefaciens*: М – молекулярный маркер 100–1000 н.п.; 1 – К-, тотальная ДНК нетрансформированной *Daucus carota*; 2 – К+, тотальная ДНК *A. tumefaciens*; 3 – тотальная ДНК трансформированного растения сорта Витаминная-6; 4 и 7 – тотальная ДНК трансформированных растений сорта Ротте ризен; 5 и 6 – тотальная ДНК трансформированных растений сорта Нантская; 8 – тотальная ДНК трансформированного растения сорта Московская зимняя; 9 – тотальная ДНК трансформированного растения сорта Тушон

отнесены к трансгенным. Впоследствии эти проростки анализировали методом ПЦР (рис. 2).

Анализ показал наличие гена *nptII* только у четырех из семи Км-устойчивых растений. Присутствие устойчивых к Км нетрансгенных растений, вероятно, является примером спонтанной мутации. В ходе эксперимента нами выявлены сортовые различия по чувствительности к антибиотику. Так, контрольные растения разных сортов, выращенные на среде MS0 с добавлением Км, проявляли различную чувствительность (см. табл. 3). Наиболее чувствительным оказался сорт Тушон, у которого всхожесть на среде с Км (100 мг/л) составила 2,7%, а наиболее устойчивым – сорт Нантская со всхожестью в тех же условиях: 22,0%.

Итак, мы выявили внутрисортную изменчивость растений моркови по чувствительности к Км, что необходимо учитывать при подборе сублетальной концентрации селективного агента. Кроме того, выявлены различия по способности к трансформации между сортами. Для анализируемых сортов моркови уровень

трансформации составил 0,48–1,1%. Максимальной способностью к трансформации характеризуется сорт Нантская (табл. 4).

Несмотря на относительно низкий процент трансформации для моркови (см. табл. 4), мы считаем, что этот метод применим для данной культуры, так как он позволяет работать с достаточно большой выборкой растений, что повышает выход продукта, в данном случае трансгенных растений.

Трансформация проростков моркови *in vitro*.

Необходимо отметить, что при разработке методов трансформации важно учитывать физиологические и биохимические особенности вида для создания оптимальных условий культивирования.

Различия по способности к образованию каллусов, определяемые генотипом, выявлены для многих видов растений [7, 14]. Поэтому мы провели предварительный опыт для сравнения способности к каллусообразованию разных сортов моркови. Для получения рыхлого, хорошо растущего

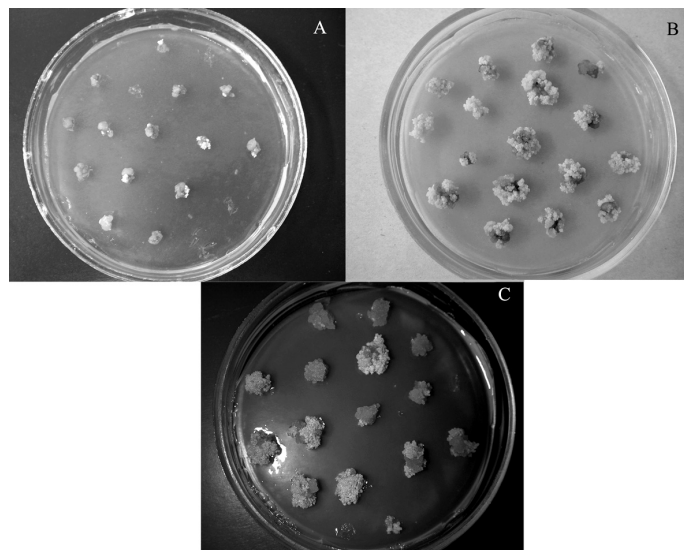


Рис. 3. Каллусы, полученные из настоящих листьев *Daucus carota*: А) каллус моркови сорта Витаминная-6; В) каллус моркови сорта – Нантская; С) каллус моркови сорта Ротте ризен

Таблица 3

Всхожесть контрольных растений на обычной и селективной средах

| Сорт | Всхожесть % | | | |
|-------------------------|------------------|-----------|------------------|--------------------|
| | Количество семян | MS0 | Количество семян | MS0 + Км (100мг/л) |
| Витаминная-6 | 30 | 30,0±2,75 | 104 | 18,2±1,3 |
| Королева осени | 99 | 42,4±0,6 | 59 | 18,3±2,5 |
| Московская зимняя А-515 | 67 | 23,8±1,6 | 63 | 4,3±8,1 |
| Нантская | 35 | 34,0±2,1 | 27 | 22,0±4,1 |
| Ротте ризен | 88 | 27,2±1,05 | 145 | 17,2 ±1,0 |
| Тушон | 58 | 18,9±2,2 | 145 | 2,7±6,1 |

калуса чаще используют 2,4-D. Мы использовали среду Мурасиге — Скуга (сахароза 20%) с добавлением 2,4-D в количестве 2 мг/л. В качестве эксплантов использовались молодые, настоящие листья трех сортов моркови: Витаминная-6, Нантская и Ротте ризен.

Через два с половиной месяца культивации было проведено визуальное сравнение полученных каллусов (рис. 3).

Как и предполагалось, мы выявили сортоспецифические различия по способности к каллусообразованию. Так, каллусы сорта Витаминная-6 оказались медленно растущими, а каллусы сортов Нантская и Ротте ризен были крупными и активно пролиферирующими (см. рис. 3).

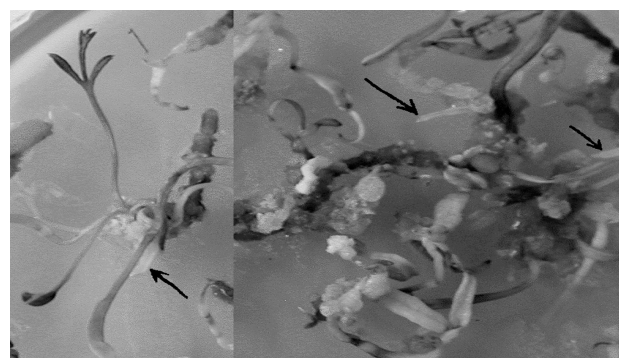


Рис. 4. Ризогенез у эксплантов сорта Витаминная-6 на среде MS1 (НУК 0,5 мг/л) (стрелками указаны молодые корешки)

Таблица 4

Процент трансгенных растений моркови, полученных методом трансформации семян

| Сорт | Количество трансформированных семян | % трансформации |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Витаминная - 6 | 206 | 0,48±23 |
| Московская зимняя | 152 | 0,65±23 |
| Нантская | 90 | 1,1±23 |
| Ротте ризен | 140 | 0,71±23 |

Помимо сортовых различий по способности к каллусообразованию, мы показали, что у сорта Витаминная-6 на среде MS2 с добавлением НУК (0,5 мг/л) ризогенез происходит быстрее и активнее, чем у сорта Ротте ризен, что важно для заключительного этапа трансформации — укоренения.

При трансформации *in vitro* мы использовали два подхода:

- 1) культивация обработанных агробактерией эксплантов на среде MS0 с добавлением 2,4-D (2 мг/л), Km (100 мг/л) и цефотаксима (300 мг/л), для элиминации бактерий.
- 2) получение трансформантов методом прямой регенерации (из апикальной меристемы побега) с образованием корня *de novo*. Культивацию обработанных агробактерией эксплантов проводили на среде MS0, содержащей Km (100 мг/л) и цефотаксим (300 мг/л), но без добавления 2,4-D.

Источником эксплантов, в обоих случаях, служили семидневные проростки моркови. Через 2,5 месяца мы получили Km-устойчивые пролиферирующие каллусы: сорт Нантская — 40%, сорт Ротте ризен — 40% и сорт Тушон — 72,5%.

Полученные каллусы были перенесены на среду MS0 с Km (100 мг/л) и тидиазуоном (TDZ) (1 мг/л) для индукции побегообразования. Через

3–4 дня мы наблюдали появление первых очагов регенерации.

При прямой регенерации, которая позволяет избежать длительной стадии образования каллуса и индукции побегообразования, в качестве стимулятора корнеобразования, как правило, используют ауксины: индолилуксусная кислота (ИУК) или НУК. Укоренение побегов возможно двумя способами:

- 1) выдерживание побегов в течение нескольких часов (2–24) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20–50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов (импульсная обработка);
- 2) непосредственное культивирование побегов в течение 3–4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (0,1–5 мг/л, в зависимости от объекта) [14]. Мы использовали второй способ. После переноса эксплантов на модифицированную среду для индукции ризогенеза MS2 с добавлением НУК (0,5 мг/л) корнеобразование из органогенного каллуса наблюдали через месяц (рис. 4).

Данная методика трансформации была апробирована на двух сортах моркови: Витаминная-6 и Ротте ризен. Результаты указанного эксперимента представлены в таблице 5.

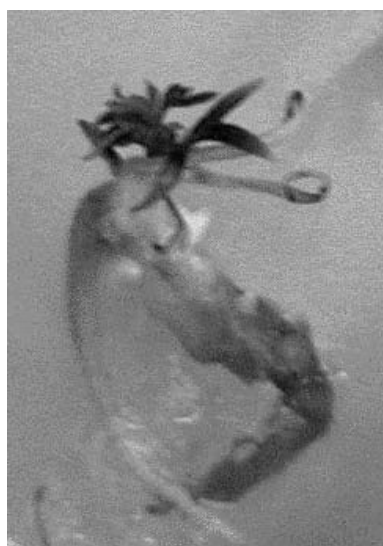


Рис. 5. Измененный фенотип: сорт Витаминная-6

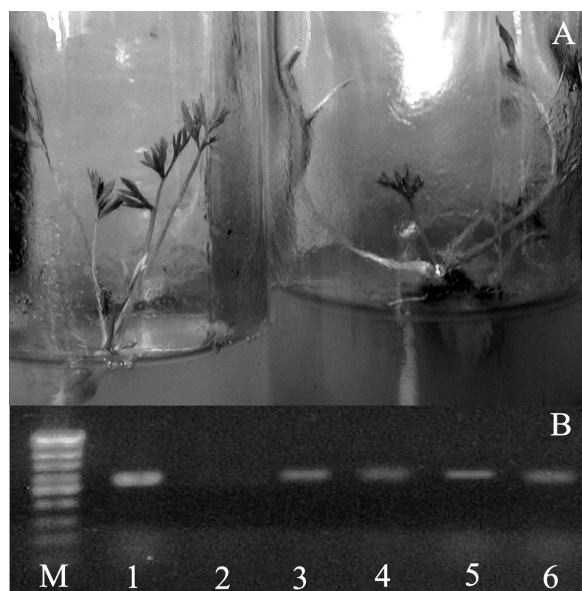


Рис. 6. Растения моркови сорта Ротте ризен, полученные методом прямой регенерации (А) и результаты полимеразной цепной реакции ДНК трансформантов с праймерами к гену *prtII A. tumefaciens* (В): М — маркер молекулярной массы 100–1000 н.п., 1 — К+, тотальная ДНК *A. tumefaciens*, 2 — К-, тотальная ДНК нетрансформированной *Daucus carota* сорта Ротте ризен, 3–6 — тотальная ДНК трансформированных растений сорта Ротте ризен

Следует отметить, что у обоих сортов, часть растений, из числа давших настоящий лист, имели измененный фенотип — карликовость, слаборассеченные листья (рис. 5).

Это можно объяснить, с одной стороны, токсическим действием накапливающихся в тканях гормонов [23], а с другой стороны — проявлением так называемого «шока развития» и соматической изменчивостью недифференцированных

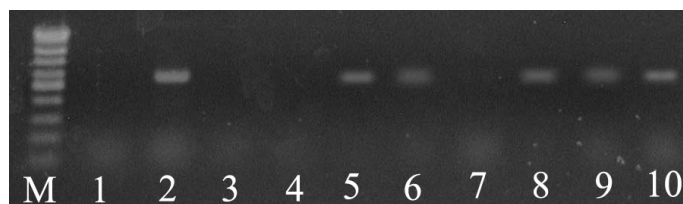


Рис. 7. Результаты полимеразной цепной реакции ДНК трансформантов моркови сорта Королева осени с праймерами к гену *prtII A. tumefaciens*: М — маркер молекулярной массы 100–1000 н.п., 1 — К-, тотальная ДНК нетрансформированной *Daucus carota* сорта Королева осени, 2 — К+, тотальная ДНК *A. tumefaciens*, 3–10 — тотальная ДНК трансформированных растений сорта Королева осени

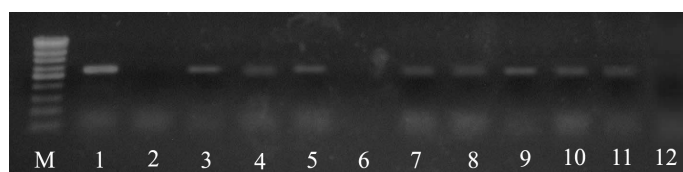


Рис. 8. Результаты полимеразной цепной реакции ДНК трансформантов моркови сорта Нантская с праймерами к гену *prtII A. tumefaciens*: М — маркер молекулярной массы 100–1000 н.п., 1 — К+, тотальная ДНК *A. tumefaciens*, 2 — К-, тотальная ДНК нетрансформированной *Daucus carota* сорта Нантская, 3–12 — тотальная ДНК трансформированных растений сорта Нантская

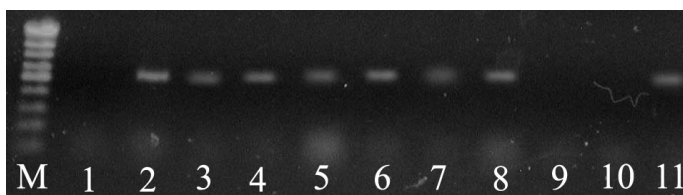


Рис. 9. Результаты полимеразной цепной реакции ДНК трансформантов моркови сорта Ротте ризен с праймерами к гену *prtII A. tumefaciens*: М — маркер молекулярной массы 100–1000 н.п., 1 — К-, тотальная ДНК нетрансформированной *Daucus carota* сорта Ротте ризен, 2 — К+, тотальная ДНК *A. tumefaciens*, 3–11 — тотальная ДНК трансформированных растений сорта Ротте ризен

енцированных клеток апикальной меристемы [7]. Такие растения не образовывали корней. Среди контрольных растений мы также наблюдали подобное явление.

ДНК четырех растений сорта Ротте ризен, имеющих нормальный фенотип (рис. 6 А), проанализировали методом ПЦР на наличие гена *prtII*. Все четыре растения содержали вставку, соответствующую гену *prtII* (рис. 6 В).

Итак, несмотря на некоторые технические трудности, данный метод является достаточно продук-

Таблица 5

Использование метода прямой регенерации для получения трансгенных растений моркови

| Сорт | Получено эксплантов | Растения, давшие настоящий лист (%) | Из них укоренилось (%) |
|--------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Витаминная-6 | 30 | 10,0±8,1 | 3,3±2,3 |
| Ротте ризен | 32 | 46,8±1,65 | 31,25±2,5 |

тивным и его можно применять для агробактериальной трансформации моркови.

Трансформация in vivo: трансформация проростков моркови и гороха in planta.

В опыте использовали проростки моркови сортов Королева осени, Нантская и Ротте ризен и проростки гороха сорта Адагумский. Трансформацию проводили по методике, предложенной А.В. Корневой для гороха [21]. На апикальную меристему семидневных проростков наносили поранения иглой, смоченной в ночной культуре агробактерии.

Данный метод генетической трансформации растений представляется наиболее перспективным и не

требует стерильных условий. Метод является достаточно эффективным, более быстрым и наименее сложным технически по сравнению с используемыми методами in vitro. Преимуществом также является сохранение растениями сортового фенотипа. Нами получены трансгенные растения моркови и гороха, которые не отличались от контроля. Всего было протрансформировано 27 растений моркови и 81 растение гороха.

Анализ предположительно трансгенных растений методом ПЦР показал наличие вставки более чем у половины растений моркови (Рис. 7, 8, 9) и почти у всех растений гороха (табл. 6).

Таблица 6

Результат ПЦР анализа трансформированных растений гороха

| № растения | Праймеры к гену nptII (положительный +/- отрицательный - рез-ты) | № растения | Праймеры к гену nptII | № растения | Праймеры к гену nptII |
|------------|--|------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| 1 | + | 25* | + | 49* | + |
| 2 | + | 26* | + | 50 | + |
| 3 | - | 27 | + | 51 | + |
| 4 | + | 28* | + | 52* | + |
| 5 | + | 29 | - | 53 | + |
| 6 | + | 30 | + | 54 | + |
| 7 | + | 31* | + | 55 | + |
| 8 | + | 32 | + | 56 | - |
| 9 | + | 33 | + | 57* | + |
| 10 | + | 34* | + | 58 | + |
| 11 | + | 35* | + | 59 | + |
| 12 | + | 36 | + | 60 | + |
| 13 | + | 37* | + | 61 | + |
| 14 | - | 38 | + | 62 | + |
| 15 | - | 39 | - | 63* | + |
| 16* | + | 40 | + | 64 | + |
| 17 | - | 41 | + | 65* | + |
| 18* | + | 42 | + | 66 | + |
| 19 | + | 43 | + | 67* | + |
| 20 | + | 44 | - | 68 | + |
| 21 | + | 45* | + | 69 | + |
| 22 | + | 46 | - | 70 | + |
| 23 | + | 47 | + | 71* | + |
| 24* | + | 48 | + | | |

Трансформированных растений 87,3 ± 0,4%

Примечание: * от растения получены семена

Таким образом, мы получили 62,5% трансгенных растений моркови сорта Витаминная-6, 70,0% — сорта Нантская и 77,7% — сорта Ротте ризен. В дальнейшем мы планируем исследовать наследование гена *prtIII* в поколении T1.

Протрансформированные проростки гороха были также проанализированы методом ПЦР. Результаты работы представлены в таблице 6.

Трансгенные растения гороха цвели и завязывали бобы, но семена дали только некоторые из них. Всего получено 18 семян. После необходимого периода покоя они будут высажены в почву и растения поколения T1 будут проверены методом ПЦР.

Используя данный метод, мы получили достаточно высокий процент трансформации для обеих культур. Для моркови, как уже упоминалось выше, показатель составил 62,5% (сорт Королева осени), 70% (сорт Нантская) и 77,7% (сорт Ротте ризен). Уровень трансформации гороха сорта Адагумский составил 83,7%. Высокий процент трансформации, полученный нами для обеих культур, вероятно, может иметь место, однако причиной этого может быть химерность исследуемых растений поколения T0.

Поэтому, чтобы оценить стабильность наследования трансгена, необходимо провести молекулярно-генетический анализ растений поколения T1. Несмотря на то, что, возможно, при анализе растений поколения T1 процент трансгенных растений может снизиться, по нашим данным, эта методика оказалась самой эффективной. Ее можно рекомендовать для применения не только для гороха, для которого уже ранее было показано стабильное наследование трансгена в ряду поколений [21], но и для других культур, в том числе и для моркови.

Заключение

В данной работе мы осуществили агробактериальную трансформацию двух видов сельскохозяйственных растений: моркови и гороха по 3 методикам, включающим в себя методы трансформации как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, мы провели предварительные исследования по выявлению сортов с высокой способностью к трансформации, на основе которых в дальнейшем возможно будут созданы растения-продуценты.

Выявлена внутрисортная изменчивость по регенерационной способности и способности к трансформации у различных сортов моркови.

Наиболее эффективным и простым для обеих видов оказался метод трансформации апикальной меристемы

проростков *in vivo*. Процент трансформантов T0 составил в среднем 70% для моркови и 87,3% — для гороха. Но окончательные выводы об эффективности методов можно сделать, проследив наследование трансгена в ряду поколений.

Работа выполнена при поддержке грантов Минобразования РФ ST-012-0 CRDF и Президента РФ на поддержку ведущих научных школ НШ-2214.2003.4.

Литература

1. Smith M.L., Mason H.S. & Shuler M.L. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form // *Biotechnol. Bioeng.* — 2002. — Vol. 80. — P. 812–822.
2. Thomas B.R., Deynze A.V., Bradford K.J. Production of therapeutic proteins in plants // *Agricultural biotechnology in Californiaseries.* — 2002. — Publication 8078.
3. Пирузян Э.С. Экспрессия гетерологичных генов в растениях для целей биотехнологии / Биотехнология: состояние и перспективы развития. Тезисы докладов участников II Московского международного конгресса. — М., 2003. — С. 160.
4. Gao Y., Ma Y., Li M *et al.* Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg // *Gastroenterol.* — 2003. — Vol. 9. — P. 996–1002.
5. Know T.H., Seo J.E., Kim *et al.* Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture // *Biotechnol. Bioeng.* — 2003. — Vol. 81. — P. 870–875.
6. Menassa R., Zhu H., Karatza N.C. *et al.* Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production // *Plant Biotech. J.* — 2004. — Vol. 2. — P. 431–438.
7. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. — СПб.: СПбГУ, 2003. — 228 с.
8. Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений. — Наука, 1988. — 539 с.
9. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений. — СПб.: Наука, 2000. — 540 с.
10. Чумаков М.И. Механизм агробактериальной трансформации растений. — Саратов, 2001. — 266 с.
11. Лутова Л.А., Павлова Э.Б., Иванова М.М. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений // *Генетика.* — 1998. — Т. 34. — 2. — С. 165–182.
12. Фролова Н.В., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Использование метода агробактериальной трансформации *in vitro* для получения фенокопий опухолеобразования у безопухоловой линии редиса *Raphanus sativus* L. // *Биотехнология.* — 2004. — 4. — С. 3–7.

13. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. – Мир, 1991. – 408 с.
14. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высшая школа, 2003. – 469 с.
15. Herdegger M., Sturm A. Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.) // *Mol. Breed.* – 1998. – Vol. 4. – P. 119–127.
16. Matsubayashi Y., Goto T., Sakagami Y. Chemical nursing: phytosulfokine improves genetic transformation efficiency by promoting the proliferation of surviving cells on selective media // *Plant Cell. Rep.* – 2004. – Vol. 23. – P. 155–158.
17. Polowick P.L., Quandt J., Mahon J.D. The ability of pea transformation technology to transfer genes into peas adapted to western Canadian growing conditions // *Plant Science.* – 2000. – Vol. 153. – P. 161–170.
18. Chandra A. and Pental D. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview // *Current science.* – 2003. – V. 84(3). – P. 381–387.
19. Gleave A.P. A versatile binary vector system with a T-DNA organisation structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome // *Plant Molecular Biology.* – 1992. – Vol. 20. – P. 1203–1207.
20. Томилов А.А. Идентификация методом инсерционного мутагенеза генов, участвующих в контроле морфогенеза *Arabidopsis thaliana* (На примере мутанта с нарушением развития корня): Дис. канд. биол. наук. Институт общей генетики РАН. – 2000.
21. Коренева А.В., Рекославская Н.И., Салеев Р.К. Перенос соевого гена *glsl* в растения гороха *Pisum sativum* L. с помощью агробактериальной трансформации *in planta* // *Вестник Башкирского университета.* – 2001. – 2(II). – С. 14–16.
22. Большов Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. – Наука, 1965. – 476 с.
23. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983.

Принятые сокращения:

MS0 – среда Мурасига–Скуга

MS1 – жидкая среда Мурасига – Скуга с рН 5,2

MS2 – полужидкая среда Мурасига – Скуга с

небольшими модификациями: пониженным содержанием азота (KNO_3 – 0,475 мг/л, NH_4NO_3 – отсутствует), добавлением 0,5 мг/л НУК и сниженным количеством агара (60000 мг/л)

LB – микробиологическая среда для поддержания

штамма *A. tumefaciens*

Str/Sp – стрептомицин/спектиномицин

nptII – ген неомизинфосфотрансферазы *A. tumefaciens*

Km – канамицин

2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

НУК – нафтилуксусная кислота

TDZ – тидиазурон

ИУК – индолилуксусная кислота

MODIFICATION OF METHODS OF THE AGROBACTERIAL TRANSFORMATION IN VITRO AND IN VIVO FOR GENERATION CARROT AND PEA TRANSGENIC PLANTS

N.V. SAVELYEVA, E.E. DUDNIK, L.A. LUTOVA

Department of Genetics and Breeding, St.-Petersburg State University

Method of agrobacterial transformation, based on the horizontal DNA transfer from bacteria to plants, is widely used in plant gene engineering. Specific molecules, synthesized by transgenic plants, are actively used in medicine, food industry etc. The aim was to define optimal contents of culture media for carrot (cv. Nantskaya, Tushon, Rotte Risen, Moskovskaya zimnyaya A-515, Koroleva oseni, Vitaminnaya-6) and pea (cv. Adagumsky) plants in vitro, as well as conditions of pea and carrot agrobacterial transformation in vitro and in vivo. Three transformation procedures were applied in our research: carrot seed and seedlings transformation in vitro, and carrot and pea seedlings transformation in vivo. Transgenic pea and carrot plants were produced in every case, but the most effective method for both of species was procedure of seedlings transformation in vivo. Thus, characterization of plants on transformation efficiency was done, and the most perspective cultivars (cv. Nantskaya and cv. Adagumsky, 70% and 83,7% of transformation efficiency, respectively) were chosen for the further work to generate plant-producers.

Keywords: transgenic plants, agrobacterial transformation, gene engineering

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ГИДРОБИОНТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЫБНЫХ ДЕЛИКАТЕСОВ В ГЕРМАНИИ

О.Я. МЕЗЕНОВА^{1*}, К. ЛЕШЕ²

¹ Калининградский государственный технический университет, Россия;

² Бремерхафенский институт пищевой техники и биотехнологии (VILB),
Высшая школа Бремерхафена, Германия

Исследована возможность улучшения процесса созревания балтийской сельди (салаки) в технологии маринованного полуфабриката, направляемого на производство деликатесной рыбной продукции. Установлено, что при внесении в маринады протеолитических препаратов, полученных на основе жидкой фракции автоферментолиза отходов атлантической сельди, достигается формирование общепринятого уровня качества созревшей соленой сельди. Изучено влияние препаратов, изготовленных в виде водных растворов и сублимированных продуктов из кишечника, икры и молок атлантической сельди, на динамику органолептических показателей и содержания аминного азота в филе салаки. Установлено, что препараты из внутренностей наиболее эффективно улучшают процесс созревания салаки в крепких маринадах.

Ключевые слова: ферменты, гидробионты, морепродукты, биотехнология.

Морские организмы, обладающие удивительным разнообразием видов и химического состава, доминируют на нашей планете. В последнее время они интенсивно изучаются, находя все большее применение в прикладной биотехнологии, например, в качестве перспективных источников биологически активных субстанций [1].

Все чаще привлекают внимание ученых биорегуляторы (ферменты) гидробионтов, использование которых в соответствующих системах позволяет изготавливать ценные продукты. Важнейшие свойства данных ферментов — чрезвычайно высокая активность и специфичность действия.

Гидробионты содержат тысячи ферментов, основная функция которых состоит в проведении, ускорении и регуляции биохимических реакций в морских тканях. Особенно высокой активностью отличаются ферменты внутренностей рыб (кишечника, гонад, печени). В России было впервые

предложено использовать натуральные ферменты рыб в технологии созревающих рыбных продуктов, например, солено-маринованных изделий, добиваясь заданного уровня протекания протеолитических процессов в тканях путем обоснования технологии получения и применения соответствующих ферментных препаратов.

В мышечных тканях рыб содержатся протеолитические ферменты группы катепсинов (А, В, С и D), в пищеварительном тракте рыб, особенно в пилорических отростках, отмечено значительное количество трипсина.

В настоящее время выполнены работы по выделению и очистке катепсина D из мышечной ткани ряда рыб. Основными свойствами катепсина D являются рН-оптимум в пределах от 2,6 (у кеты) до 4,0 (у атлантической трески), стабильность при температуре 0–5 °С, высокая гемоглобинрасщепляющая активность. Отличительной особенностью этого фермента является его термостабильность (при нагревании в течение 10–15 мин до 50–60 °С он практически не теряет активности в зоне рН-оптимума), а также высокая удельная активность, которая значительно выше, чем у катепсина D млекопитающих.

Исследование показало, что многие виды рыб являются прекрасным сырьем для промышленного выделения протеиназ, нуклеаз и дегидрогеназ (табл. 1).

*** Автор для переписки:**

Мезенова Ольга Яковлевна, доктор технических наук, профессор, заведующая кафедрой пищевой биотехнологии Калининградского государственного технического университета, руководитель регионального отделения Общества биотехнологов России 236000 Калининград, ул. Профессора Баранова, 43, Учебный корпус 1
Телефон: (0112) 46 35 69
E-mail: mezenova@klgtu.ru

Общие принципы получения ферментных препаратов из гидробионтов предполагают очистку водных и солевых экстрактов, полученных из соответствующих тканей, от балластных белковых веществ и выделение активной фракции ферментов различными методами — солевого фракционирования, криоконцентрированием и т.д. Далее требуется их концентрирование — гельфильтрацией, иммобилизацией и другими способами. Все операции проводят в условиях, исключающих возможность денатурации ферментов — низкая температура, ограничение продолжительности, контроль за рН, отсутствие примесей тяжелых металлов и др.

Так, в основу технологии ферментного препарата «Океан», получаемого из кильки, внутренностей скумбрии, ставриды, сардинеллы, трески и других рыб, положено использование эффекта активации ферментов при частичном гидролизе ферментсодержащего сырья с максимальным выходом пептидгидролаз — по данным Шендерюк В.И. и др. [3]. В качестве сырья рекомендовано использовать внутренности названных рыб целиком, но при условии, что масса ожирков и гонад не должна превышать 20% от массы внутренностей. Основные этапы: приготовление ферментсодержащего полуфабриката, выделение из него активизированного щелочного комплекса пептидгидролаз, консервирование и хранение ферментного препарата.

Традиционно деликатесными рыбными продуктами в Германии являются изделия на основе солено-маринованного филе сельдевых рыб. Предварительная обработка такого филе в уксусно-солевых растворах, а также комбинация с овощами, пряностями и заливками с последующей герметичной упаковкой в красочной таре позволяют выпускать значительный ассортимент рыбной продукции, пользующейся повышенным спросом у населения (Fischfeinkosten).

Однако из балтийской сельди (салаки) названная технология не позволяет получать продукцию с высокими гастрономическими свойствами, так как мышечные ткани данной рыбы отличаются пониженной активностью пептидгидролаз. В итоге маринованный полуфабрикат имеет повышенную плотность, сухость, в нем отсутствует признак нежности, характерный для деликатесной продукции, а также специфические «селечные» вкус и аромат.

Для повышения качества деликатесной рыбопродукции было предложено на стадии подготовки маринованного филе салаки применять ферментные препараты, приготовленные из внутренностей сельдевых рыб.

Материалы и методы

Работы выполнялись в Бремерхафенском институте пищевой техники и биотехнологии, а также фирме «Nadler-Feinkosten» (г. Бремерхафен, Германия). Последняя изготавливает маринованный полуфабрикат из сельдевых рыб по следующей технологической схеме:

Мороженое филе сельдевых рыб Размораживание в две стадии: на воздухе (1-я стадия), паро-вакуумное (2-я стадия) Мойка, удаление излишней влаги Первое выдерживание в уксусно-солевом растворе — 35 суток («консервирование») Удаление раствора Второе выдерживание в уксусно-солевом растворе — 18 суток («облагораживание») Удаление раствора Замораживание маринованного полуфабриката или направление на изготовление деликатесной рыбопродукции

Первая стадия обработки проводится в концентрированном уксусно-солевым растворе, содержащем, соответственно, уксусной кислоты и соли 7 и 14%, путем выдержки рыбы в течение 35 суток. Данный процесс обеспечивает антисептическое консервирование и безопасность продукции. Вторая стадия, продолжающаяся 18 суток, осуществляется в менее концентрированном растворе и предназначена для улучшения органолептических свойств готового филе, что называется «облагораживанием». Обработка проводится при температурах от 0 до -5 °С, при этом соотношение рыбы и рассола составляет 3:1.

Полуфабрикат сельди после первого этапа обработки («консервированное филе») имеет следующие показатели качества: кислотность мышечной ткани (в пересчете на уксусную кислоту) — 2,4–2,8% (в пересчете на тканевую жидкость); рН ткани — 3,8–4,2; массовая доля жира, белка, поваренной соли и воды, соответственно (в %): 4–15; 17–20; 6–6,8 (в пересчете на тканевую жидкость); 60–70%. «Облагороженное филе» имеет меньшие значения кислотности ткани (1,1%) и ее солености (3,5%), чем полуфабрикат первой стадии маринования, что обеспечивает его повышенные вкусовые качества. Эти данные регламентируются стандартом фирмы Nadler 28107.

В связи с актуальностью проблемы безопасности соленых продуктов в России интересно привести перечень и соответствующие номинальные значения микробиологических показателей, нормируемых для маринованного полуфабриката сельди (обеих стадий):

- Общее количество аэробных микроорганизмов (кл/г) — менее 1000;

Характеристика ферментов рыб Атлантического океана

| Фермент | Вид рыбы и органы, в которых обнаружена максимальная ферментативная активность |
|-------------------------------------|--|
| Карбоксипептидаза В | Отонерка (целиком) |
| Аминопептидаза | Зеленоглазка (ганглии глаз), акула (глаза) |
| Лейцинаминопептидаза | Тунец (сердце), отонерка (целиком) |
| Дезоксирибонуклеаза щелочная | Синагропс (целиком) |
| Рибонуклеаза щелочная | Отонерка (целиком) |
| Протеиназы | Синагропс, отонерка, тригла, зуб (целиком) |
| Лактатдегидрогеназа | Отонерка (целиком), тунец (сердце) |
| Каталаза | То же |
| Глицеральдегидрофосфатдегидрогеназа | То же |
| Малатдегидрогеназа | То же |
| Альдолаза | То же |

- Энтеробактерии (кл/г) — менее 100;
- Энтерококки (кл/г) — менее 100;
- Дрожжевые клетки (кл/г) - менее 100;
- Плесневые грибы (кл/г) — менее 10;
- Лактобактерии (кл/г) — менее 100;
- *Coli*-формы (кл/г) — отсутствие в 1 г;
- Сальмонеллы — отсутствие в 25 г;
- Листерии — отсутствие в 25 г;
- Другие формы патогенных микроорганизмов — отсутствие в 25 г;
- Токсичные формы микроорганизмов — отсутствие в 25 г.

Нормируется также содержание гистамина (менее 20 мг/кг) и тяжелых металлов, в мг/кг: свинца — менее 0,5; кадмия — менее 0,1; ртути — менее 0,5.

При обработке салаки описанным выше способом последняя не приобретает характерных для других созревших сельдевых аромата и вкуса, а также нежной консистенции. Для решения данной проблемы были проведены специальные исследования, направленные на внесение в жидкую систему (маринад) протеолитических препаратов, приготовленных из отходов атлантической сельди (кишечника, икры, молоко), в замороженном и сублимированном состояниях. Препараты вносили как на первой, так и второй стадиях обработки уксусно-солевым раствором.

При приготовлении протеолитических препаратов измельченное сырье термостатировали при температуре

37–40 °С, центрифугированием отделяли жидкую часть, которую замораживали при температуре -18 °С, после чего использовали (после дефростации). Параллельно партию препарата консервировали сублимированием, для чего его предварительно замораживали при температуре -51 °С и давлении 0,6 мбар. Сублимированный препарат в виде мелких пластинок характеризовался цветом от светло-желтого до темно-коричневого (в зависимости от сырья) и специфическим рыбным запахом, в котором отсутствовали порочащие признаки.

Замороженный ферментный препарат вносили в жидкую часть маринадной системы (уксусно-солевой раствор) в количестве 2, 5 и 10% массы рыбы, а сублимированный препарат добавляли в количестве 1% массы рыбы.

Базовые режимы технологии полуфабриката сельдевых были оставлены без изменения. По окончании экспериментов определяли качество образцов.

Оценивали сенсорно общее качество готовой продукции (по 5-балльной шкале), а также химически — степень созревания (по содержанию аминного азота, определяемого методом формольного титрования). Данный метод общепринят в России и Германии, причем в немецких стандартах его называется «азотом свободных аминокислот». В отличие от регламентированного в России метода определения аминного азота формольным титрованием (ГОСТ 7636), использованная методика в Германии имеет ряд особенностей. В частности, осажде-

ние белковых веществ в водной вытяжке мышечной ткани ведут раствором хлорида бария, а титрование водного раствора аминокпродуктов, обработанных формалином с рН 7,07 и концентрацией 35–37%, ведут 0,1 N раствором NaOH до рН 9.

Известно, что чем выше количество аминного азота в тканях рыбы, тем выше уровень созревания ее тканей, характеризующийся накоплением «осколков» белковых макромолекул. Следствием является улучшение нежности консистенции, появление приятных специфических вкуса и аромата продукции (Леванидов И.П., 1976).

Результаты и обсуждение

Динамика органолептических показателей, а также количественной оценки степени накопления низкомолекулярных азотистых веществ в тканях салаки, обработанной растворами протеолитических препаратов, приготовленных из внутренностей атлантической сельди, приведены в таблице 2 и на рисунке 1. Полученные данные позволяют проследить динамику прироста показателя аминного азота в филе салаки в результате внесения в жидкую часть ферментных препаратов, приготовленных из различных субстратов.

Из данных таблицы 2 видно, что внесение раствора препарата, приготовленного из внутренностей сельди, существенно ускоряет процесс накопления низкомолекулярных продуктов гидролиза белка в тканях маринованной рыбы. Так, показатель аминного азота

возрастает за 20 суток хранения с 32,7 до 190 мг/100 г, в то время как в контрольном образце он повышается только до уровня 108 мг/100 г. Таким образом, по уровню прироста низкомолекулярных продуктов гидролиза белка ускорение достигается на 43,2–76%, в зависимости от дозировки вносимого препарата.

Количественным уровнем созревшей соленой рыбы принято считать содержание в ней аминного азота 100–160 мг/100 г [2]. Анализ полученных данных свидетельствует, что созревание экспериментальных образцов салаки наступает уже на 7-е сутки, так как показатель аминного азота достигает значения 102–142,4 мг/100 г. Без препарата данный уровень накопления продуктов протеолиза имеет место лишь на 20-е сутки, однако при этом органолептическая оценка контрольной продукции уступает экспериментальной (значения аромата, вкуса и консистенции находятся на уровне 4 баллов).

Полученные результаты позволяют рекомендовать вносить на первом этапе маринования салаки («консервирование») в уксусно-солевой раствор 2–5% массы рыбы жидкий протеолитический препарат, представляющий собой замороженные продукты автопротеолиза внутренностей сельдевых. В данном случае имеет место рациональная динамика накопления низкомолекулярных продуктов гидролиза белка, а перезревания мышечной ткани рыбы не происходит.

Результаты экспериментов с сублимированным препаратом (см. рис. 1) показывают, что все виды

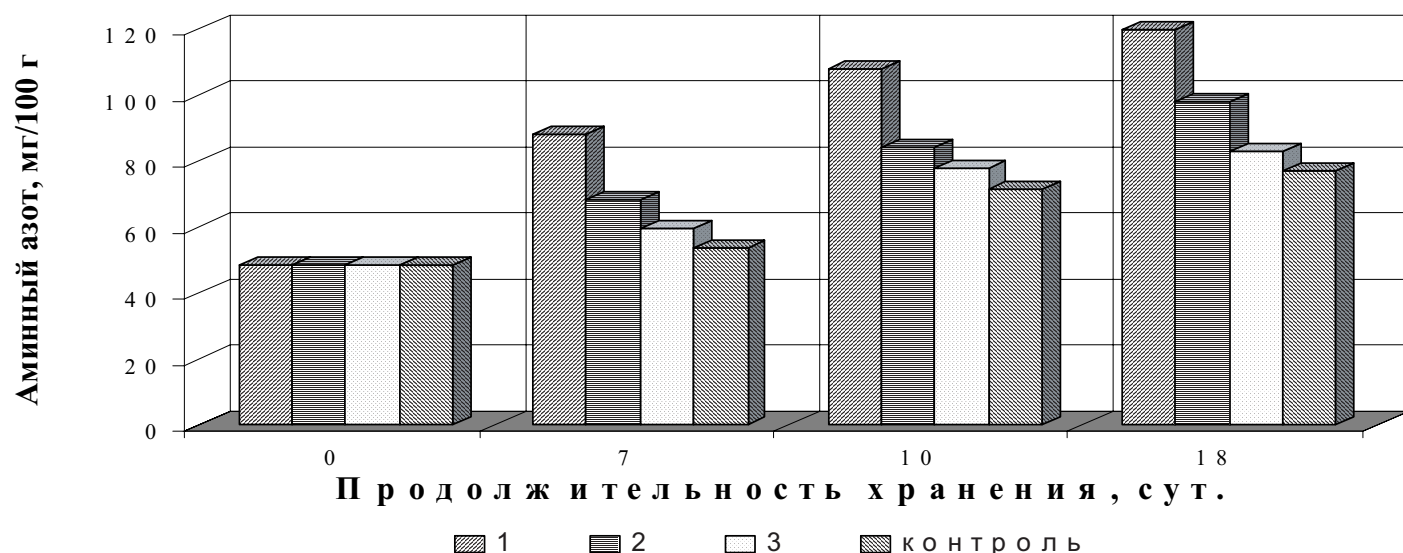


Рис.1. Динамика показателя аминного азота в процессе хранения экспериментальных образцов маринованной салаки, установленная при добавлении в жидкую часть сублимированных протеолитических препаратов на основе: 1 — кишечника, 2 — икры, 3 — молок атлантической сельди

протеолитических добавок (из икры, молоко и внутренностей сельдевых) на 8–56% ускоряют накопление небелковых (аминных) продуктов в мышечной ткани салаки, причем наиболее интенсивно данный процесс идет при внесении препарата из внутренностей. В последнем случае заданный количественный уровень созревания тканей салаки (105 мг/100 г) достигается уже на десятые сутки ее хранения в маринаде первой стадии.

Установленное позволяет сделать вывод, что сублимация сохраняет протеолитические ферменты в активном состоянии. К преимуществам такого способа, помимо высокого уровня консервирования, относятся малый объем препарата, удлинение сроков его хранения, удобства в использовании.

Анализ динамики сенсорной оценки образцов салаки, приготовленных с применением сублимированного ферментного препарата из внутренностей рыб, показал, что аромат и вкус такой продукции достигали уровня

четырёх баллов уже на 10 сутки хранения в маринаде, тогда как в других образцах соответствующие значения оставались между двумя-тремя баллами. На 18-е сутки хранения названные экспериментальные образцы имели уже высшую 5-балльную оценку, в то время как аромат и вкус салаки других вариантов обработки не оценивался выше 3–4 баллов.

С учетом полученных результатов, а также принимая во внимание тот факт, что в Германии внутренности, икра и молоки сельдевых направляются только на производство кормовой продукции, рекомендуется получать из данных тканей ферментные препараты и использовать их в качестве регуляторов формирования свойств деликатесности рыбных продуктов. Данные препараты имеют выраженное протеолитическое действие и при внесении в пищевые системы, включающие в себя слабо созревающие ткани рыб (балтийской сельди, ставриды, терпуга, тресковых и др.), которые не обладают активным комплексом собственных ферментов, позволяют получать продукты с заданными свойствами.

Таблица 2

Результаты оценки маринованного филе салаки (протеолитический препарат из внутренностей сельди в виде водного раствора введен на второй стадии обработки)

| Продолжительность хранения образца | Массовая доля препарата, % | Аминный азот, мг/100г | Органолептическая оценка образца, балл | | | |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------|--|---|--------------|--------------------------------------|
| | | | Аромат и вкус | | Консистенция | |
| | | | Балл | Сенсорная характеристика | Балл | Сенсорная характеристика |
| 0 | 0 | 32,7 | 2 | Не свойственные созревшей соленой сельди | 2 | Жесткая |
| 7 суток | | 79,5 | 3 | Отсутствуют признаки «селёдочного» запаха и вкуса | 3 | Плотная, признак нежности не выражен |
| | 2 | 102,0 | 4 | Соответствуют созревшей сельди, приятные | 4 | Размягченная, но не нежная |
| | 5 | 121,0 | 5 | Соответствуют хорошо созревшей сельди, приятные | 5 | Мягкая, нежная |
| | 10 | 142,4 | 5 | Соответствуют хорошо созревшей сельди, приятные | 5 | Мягкая, нежная |
| 14 суток | | 97,0 | 4 | Соответствуют созревшей сельди, приятные | 4 | Размягченная, но не нежная |
| | 2 | 120,0 | 5 | Соответствуют хорошо созревшей сельди, приятные | 5 | Мягкая, нежная |
| | 5 | 147,0 | 5 | Соответствуют хорошо созревшей сельди, приятные | 5 | Мягкая, нежная |
| | 10 | 148,0 | 5 | Соответствуют хорошо созревшей сельди, приятные | 5 | Мягкая, нежная |

Заключение

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы.

1. Морские организмы — перспективный источник получения биологически активных веществ, препаратов и концентратов.

2. Ферменты гидробионтов обладают чрезвычайной активностью и специфичностью, позволяя изготавливать уникальные биопрепараты направленного действия. Благоприятным источником их получения являются внутренние органы рыб — кишечник, пилорические придатки, печень, гонады.

3. Ферментные препараты, полученные из гидробионтов, рационально использовать в биотехнологиях пищевой рыбной продукции из слабо созревающих видов рыб, в процессе изготовления которых не предусматривается термическая обработка.

4. Протеолитические препараты, приготовленные из кишечника и гонад атлантической сельди по принципу автоферментолиза в виде водных экстрактов,

позволяют существенно повысить качество маринованной балтийской сельди до уровня деликатесного продукта.

5. Протеолитические препараты, изготовленные из внутренностей сельдевых рыб, проявляют свою функциональную активность в пищевых маринадах как в замороженном, так и сублимированном состоянии.

Литература

1. Байдалинова Л.С., Киселев В.И., Лысова А.С., Мезенова О.Я., Сергеева Н.Т., Степанцова Г.Е., Терещенко В.П. Биотехнология гидробионтов / Под ред. О.Я. Мезеновой и В.П. Терещенко — Калининград: КГТУ. — 2005. — 461 с.
2. Слуцкая Т.Н. Биохимические аспекты регулирования протеолиза. — Владивосток: ТИПРО-центр, 1977. — 148 с.
3. Шендерюк В.И., Лисовая В.П., Солянка Ю.И. и др. Технология малосоленых деликатесных пресервов из разделанной рыбы в мелкой расфасовке: Технология деликатесных малосоленых пресервов и копченой рыбы / Сб. научных трудов АтлантНИРО. — Калининград, 1991. — С. 42–61.

THE USE OF HYDROCOLES ENZYMES FOR AN IMPROVEMENT OF THE FISH DELICACIES QUALITY IN GERMANY

O.Ya. MEZENOVA, KLAUS LOESCHE

*Kaliningrad state technical university, Russia;
BILB, The higher school of Bremerhaven, Germany*

There was investigated a possibility to improve a process of Baltic herring maturing in the technology of marinated semi-finished product used for further production of fish delicacies. It was found that adding to marinade of proteolytic preparations made on the basis of the liquid fraction of enzymatic degradation of the Atlantic herring waste, helps to achieve a common level quality of the mature salted herring. An influence of preparations made in the form of liquid solutions and sublimated products of Atlantic herring's bowels, caviar and milts, on the dynamics of organoleptic indices and content of aminonitrogen in Baltic herring fillet was also studied. It was stated that preparations of the fish guts effectively improve the maturing of Baltic herring in strong marinades.

Keywords: enzymes, hydrocoles, seafoods, biotechnology.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ

С.М. ГАЙНУЛЛИНА

*Департамент физиологии и биофизики и Институт молекулярной кардиологии,
Государственный университет Нью-Йорка, Стони Брук, Нью-Йорк, США*

Известно несколько типов стволовых клеток (СК) человека. Прежде всего, это эмбриональные СК [1]. Другой тип стволовых клеток — это мезенхимные СК (МСК), происходящие из костного мозга. Схема развития СК представлена в работе [2]. Костный мозг дает начало гемопоэтическим клеткам и семейству иммунных клеток. Стромальные клетки костного мозга продуцируют предшественники жировых клеток, костных клеток, а также могут быть предшественниками МСК [3, 4]. Третий тип СК обнаружен в различных тканях организма, включая мозг, глаза, кожу, мышцы, мягкие ткани зубов, ткани сосудов и пищеварительного тракта. Хотя многие исследователи не уверены полностью, происходят ли эти клетки из данных тканей или они являются потомками циркулирующих гемопоэтических СК. Вопрос состоит в том, могут ли СК быть использованы в качестве терапевтического инструмента и каким критериям они должны отвечать.

Существуют три важных критерия принадлежности клеток к СК. Во-первых, СК должны делиться симметрично, то есть должны быть клоногенными. Во-вторых, они должны быть способными дифференцироваться в нужный тип клеток. В-третьих, они должны происходить из эмбриональных, либо из МСК [2]. Необходимо найти надежные маркеры, с помощью которых можно отличить настоящие плюрипотентные СК. При этом важно исследовать межклеточные контакты в этих системах [13, 14]. Критическим свойством при использовании СК в качестве клеточной системы для трансплантации является их способность образовывать межклеточные щелевые контакты (ЩК) друг с другом и другими

клеточными типами, то есть умение формировать гетерологические контакты [13, 14].

В настоящее время известно более двадцати генов белков коннексинов, участвующих в формировании межклеточных ЩК [5–7]. Молекулярная масса коннексинов варьирует между 20 и 70 кД. Каждый коннексин состоит из четырех альфа-спиральных мембранных доменов, двух внеклеточных петель и трех цитоплазматических областей [8]. Канал ЩК состоит из 12 коннексиновых субъединиц, при этом он формируется объединением двух полуканалов из шести субъединиц, принадлежащих каждой контактирующей клетке. Эти два полуканала, соединяясь друг с другом, формируют полный ЩК. Внеклеточные петли каждого коннексина содержат цистеиновые остатки, которые являются инструментом при стыковке 2 полуканалов. Разными авторами [8, 9] предложены модели, достаточно ясно представляющие структурную организацию ЩК. К вышеописанному следует добавить, что несколько близко расположенных друг к другу каналов образуют на мембране диски, составленные этими каналами.

Тип каналов, составленный коннексинами одного вида, называется гомотипичным каналом. В отличие от этого гетеротипичный канал — это канал, в котором полуканалы составлены различными коннексинами. Возможно существование также третьей группы каналов, которая потенциально очень гетерогенна. В том случае, если в клеточной популяции экспрессируются два или более коннексинов, имеется потенциальная возможность содержания в полуканалах более одного типа этих белков. Этот случай называется гетеромерным, то есть при этом должны образовываться гетеромерные ЩК. В отличие от гомотипичных и гетеротипичных вариантов, когда возможен только один тип каналов, в случае гетеромерных каналов возможно разнообра-

* Автор для переписки:

Гайнуллина С.М.,
сотрудница Департамента физиологии и биофизики и Института молекулярной кардиологии, Нью-Йоркский университет (New York State University, at Stony Brook, New York, USA)

зие коннексиновых комбинаций. Для клеток, экспрессирующих несколько видов коннексинов, существует возможность того, что гетеромерные формы каналов будут доминирующими [10].

Биофизические исследования гомотипичных ЦК, составленных коннексинами с молекулярной массой 43 кД (Cx43), 40 кД (Cx40) и 37 кД (Cx37) показали, что они обладают различными электрофизиологическими особенностями, но все они демонстрируют симметричную потенциал-зависимость [10]. Valiunas V. с коллегами осуществили эксперименты с HeLa клетками, трансфицированными Cx43, Cx40 и Cx45, и показали, что СК способны образовывать сцепления с HeLa клетками, экспрессирующими данные коннексины. У HeLa клеток, трансфицированных Cx32 и Cx26, также изучали способность образовывать сцепление с СК, однако этого не удалось обнаружить. При соединении СК с HeLa клетками, экспрессирующими либо Cx43, либо Cx45, наблюдалась симметричная потенциал-зависимость. Но HeLa клетки, экспрессирующие Cx45, обнаружили асимметричную потенциал-зависимость при образовании контактов с СК, демонстрируя тем самым, что имеется слабая экспрессия коннексина 45 (если таковая вообще имеется) в СК [12, 13].

Нами были проведены иммуноцитохимические исследования в культуре МСК человека (ЧМСК), когда использовалось иммуноцитохимическое окрашивание антителами против Cx43, Cx45 и Cx40, подтверждаемое иммуноблотингом этих белков. Иммуноцитохимическая реакция выявляет типичное пунктирное окрашивание флуоресцирующими антителами к Cx43 и Cx40 в областях, близких к контактам между соседними МСК. Иммуноокрашивание образцов антителами против Cx45 обнаружило типичные гранулярные цитоплазматические структуры с едва заметными пунктирными контурами, характерными для Cx43 и Cx40. Сходные характеристики СК наблюдались при формировании контактов с миоцитами желудочка, причем такие контакты характеризовались как слабо асимметричные [13]. Более того, после инъекции ЧМСК, трансфицированных пейсинговым геном HCN2, в левый желудочек сердца собаки, пейсинг наблюдался в отсутствие нормальной активности синусного узла [14].

Использование ЧМСК даже в исследовательских целях ставит ряд проблем, не говоря уже о клиническом использовании. Хотя вышеупомянутые исследования проводились с ЧМСК от

доноров не старше 20 лет, клетки в культуре старели очень быстро. Не было гарантии получения стабильного развития культуры после шестого или седьмого пассажей. Эти наблюдения перекликаются с данными М.А. Baxter и коллег [15], которые изучали длину теломер ЧМСК, взятых из костного мозга, в процессе роста *in vitro*. Как известно, теломеры — это особые структуры, присутствующие на концах хромосом эукариот и связанные с молекулярными механизмами репликации, то есть с жизненно важными функциями организма. Их укорачивание является сигналом процесса старения [16, 17].

К. Vieback и коллеги описали СК, полученные из пуповины здоровых новорожденных. Эти клетки имели характерную мезенхимную морфологию и иммунный фенотип ЧМСК-подобных клеток. Авторы расценивают пуповину в качестве дополнительного источника СК как для экспериментальных, так и в дальнейшем для клинических целей [18].

Yumi Fukuchi с соавторами изучали СК, происходящие из плаценты человека, и также показали их потенциал как мезенхимных предшественников. Авторы выделяли эти клетки из плаценты доношенного новорожденного методом переваривания трипсином и получили два клона. Была исследована морфология этих клеток, поверхностные маркеры и образцы генной экспрессии, а также изучена их способность к дифференцировке. Установлено, что эти клетки экспрессировали несколько маркеров СК, гены гемопоэтических и эндотелиальных клеток, а также специфические гены ряда органов (это было определено с помощью методов обратной транскрипции и компьютерного флуоресцентного анализа клеток). В работе был показан остеогенный и адипогенный потенциал этих клеток при культивировании в соответствующих условиях. Авторы полагают, что СК из плаценты обладают множественным потенциалом дифференцировки и могут быть очень полезным и важным источником ЧМСК.

Требуется преодолеть много технических препятствий, прежде чем СК могут быть использованы для лечения пациентов. И несмотря на то, что клетки-предшественники, очевидно, способны легко адаптироваться к измененным условиям окружающей среды и инициировать новые ткани, остается проблема иммунного отторжения. В настоящее время единственный путь избежать нежелательной иммунной реакции — это создание клеточных линий с использованием собственного генетического материала пациента. В любом случае способность клеток-предшественников

формировать ЦК с нужной тканью будет играть важную роль в их обновлении.

Благодарности. Автор благодарит доктора Питера Бринка и доктора Виргиса Валюнаса за постоянную поддержку, обсуждение и консультации, а также доктора Марвина О'Нила и доктора М. Раафата Эль-Магхраби за консультации и помощь в проведении иммунохимических экспериментов и иммуноблотинга.

Литература:

1. *Lanza R. and Rosenthal N*, The Stem Cell Challenge. Scientific American, June 2004, 93–99
2. *Rosenthal N.*, Prometheus Vulture and the Stem Cells Promise. New England Journal of Medicine, July 17, 2003, V.349, N3:267–274
3. *J. E. Grove, E. Bruska, D.S.Krause*, Plastrity of Bone Marrow-Derived Stem Cells
4. *Minguell J. J., Alejandro E., & Conget P.* Mesenchymal stem cells. Minireview. Copyright 2000 by the Society for Experimental Biology and Medicine, 507–5194. .
5. *Goodenough, J.A., Goliger, J.A., Paul, D.L.*, Connexin, connexons, and intercellular communication, Annu. Rev. Biochem. 1996; 65: 475–502.
6. *Kumar, N.M., Gilula*, The gap junction communication canal, Cell 1996;84:381–388.
7. *Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutch, U., Sohl G.*, Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome Biol Chem. 2000; 383:725–737.
8. *Yeagar, M. & Nicholson, B.J.* 1996. Structure of gap junction intercellular channels. Current Opinion Structural Biol. 6, 183 – 192.
9. *Makowsky, L., Caspar, D.L.D., Phillips, W.C. & Goodenough, D.A.* 1977 Gap junction structures II. Analysis of the X-ray diffraction data. J Cell Biol A, 179–189.
10. *Bukauskas et al.* 1995 Heterotypic gap junction channels violate the paradigm of unitary conductance. Pflugers Arch, 429, 470–482.
11. *Veenstra R.D. et al.* Selective Permeability of Connexin Channels Circ Res. 1995; vol 77, N6:1156–1165
12. *Valiunas V., Weingart R., Brink P.R.* Formation of heterotypic gap junction channels from different connexins 40 and 43. Circ Res. 2000; 86:42–49.
13. *Valiunas V. et al.* Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. J Physiol. 2004 Mar 16; 555 (Pt. 3):617–26. Epub 2004 Feb 06.
14. *Potapova I. et al.* Human mesenchymal Stem Cells as a Gene Delivery System to Create Cardiac Pacemakers Circ Res. 2004; 94:952–959
15. *Baxter M.A. et al.* Stem Cells, Study of Telomerase Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion 2004;22:675–682
16. *Wright W.E., Shay.* Historical claims and current interpretations of replicative aging. Nat Biotechnol. 2002;20:682–688.
17. *Blackburn E.H.* Switching and signaling at the telomere. Cell 2001;106:661–673.
18. *Bieback K. et al.* Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood, Stem Cells 2004; 22: 625–634.
19. *Yumi Fukuchi et al.* Human Placenta –Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. Stem Cells 2004; 22:649–658
19. *Yumi Fukuchi et al.* Human Placenta –Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. Stem Cells 2004; 22:649–658)

УДК 577.15.03

РЕГУЛЯТОРЫ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У БАКТЕРИЙ: БЕЛКОВЫЕ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ И НЕТРАНСЛИРУЕМЫЕ РНК

ОЗОЛИНЬ О.Н.*, ШАВКУНОВ К.С., ТУТУКИНА М.Н.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область

Введение

Расшифровка полной нуклеотидной последовательности ряда геномов и возможность тотального анализа спектров синтезируемых белков и РНК позволяют приступить к масштабному моделированию клеточного метаболизма, направленному на создание организмов с заданными свойствами, коррекцию возникающих патологий и оптимизацию условий культивирования промышленных микроорганизмов. Необходимым условием для полноценной реконструкции функциональных взаимоотношений в живой клетке является наличие информации обо всех регуляторных элементах, влияющих на экспрессию индивидуальных генов, то есть на частоту их транскрипции, эффективность трансляции соответствующих мРНК и стабильность синтезированных продуктов. Кишечная палочка является самым изученным микроорганизмом, поэтому именно ее чаще всего используют в качестве модели для системного анализа регуляторных сетей. Методы сравнительной геномики позволяют использовать полученную при этом информацию для других организмов, облегчая аннотацию неизвестных геномов. В обзоре собраны сведения обо всех известных в настоящее время белковых регуляторах транскрипции у *E. coli*, а также данные о свойствах всех обнаруженных разными методами нетранслируемых РНК. Обсуждаются методические подходы, предоставившие информацию о регуляторах небелковой природы, и перспективные направления дальнейших исследований.

Белковые регуляторы транскрипции

Регуляцию транскрипции у бактерий традиционно подразделяют на несколько функциональных уровней. Важнейшим элементом транскрипционного

аппарата являются σ -факторы, которые принято считать субъединицами РНК-полимеразы, хотя они используются ферментом только во время формирования специфического комплекса с промотором. У кишечной палочки, кроме основной (σ^D), известно 6 альтернативных σ -субъединиц (σ^E , σ^F , σ^H , σ^{EecI} , σ^N и σ^S) [1–6].

Каждая из них (в комплексе с остальными субъединицами фермента или самостоятельно) узнает свою собственную последовательность оснований в регуляторных областях генов и покидает комплекс (или остается связанной с промотором) при переходе синтеза в фазу продуктивной элонгации.

Альтернативные σ -субъединицы продуцируются в клетке на определенных этапах развития (σ^S) или в условиях различных стрессов (σ^E , σ^H , σ^N и σ^S), но и во время обычного роста содержащие их полимеразы транскрибируют ряд оперонов.

Так, например, содержание в клетках σ^F , контролирующей экспрессию генов подвижности и хемотаксиса, и σ^N , ответственной за транскрипцию генов разной функциональной принадлежности, сопоставимо с σ^D [7]. Относительное содержание разных определяется эффективностью транскрипции соответствующих генов, стабильностью РНК-продуктов и белков и присутствием анти- σ -факторов (Rsd для σ^D ; RseA, RseB и RseC для σ^E ; FlgM для σ^F ; FecR для σ^{EecI} ; по-видимому, DnaJ-DnaK для σ^H и, возможно, YhbH и YfiA для σ^N), образующих с ними неактивные комплексы [8–12]. Не содержащий σ -субъединиц фермент может вести неупорядоченный синтез РНК, но для специфической инициации транскрипции с промоторов присутствие одной из σ -субъединиц является, по-видимому, обязательным.

На следующем уровне экспрессия многих генов регулируется специальными белками, активаторами и репрессорами, которые не являются обязательными компонентами транскрипционного

* Автор для переписки:

Озолин О.Н.,
сотрудница Института биофизики клетки РАН
142290 Пущино, Московская область

комплекса, не входят в состав РНК-полимеразы, но способны связываться с ней или определенными последовательностями в промоторах. Таких белков у *E. coli*, по-видимому, 240–260 [13] (рис. 1), а используемые ими механизмы регуляции чрезвычайно разнообразны. Они включают простую конкуренцию с полимеразой или другими регуляторными белками за места специфического контакта; стабилизацию образованных комплексов за счет дополнительных белок-белковых взаимодействий; модификацию структурно-конформационного состояния ДНК и др. Внутриклеточное содержание активаторов и репрессоров обычно, в том или ином виде, контролируется продуктами регулируемых генов с помощью каскада обратных связей и в большинстве случаев не является высоким, а размер регулонов варьирует от одного до многих десятков генов.

Так, например, в регулоне белка активатора катаболитных генов (CAP или cAMP-CRP) уже идентифицировано 128 генов. Один и тот же регуляторный белок может активировать синтез РНК с одних промоторов и ингибировать его с других, причем многие регуляторные белки способны влиять на транскрипцию с промоторов разных σ , в том числе σ^N , использующих особый механизм взаимодействия с промотором.

Процессивность транскрипции зависит от белков GreA и GreB, предотвращающих паузы транскрипции вовремя элонгации, от антитерминатора NusG и терминатора ρ ; от множества различных по своей природе небелковых соединений, в том числе ppGpp и тРНК^{F_{met}}, от солевого состава цитоплазмы и суперскрученности ДНК, а также от более чем 20 ДНК-связывающих белков, упаковывающих ее в относительно компактный нуклеоид [14]. Часть из белков нуклеоида (Rob, DnaA, Fis, IHF и Lrp) обладает специфичностью к определенным последовательностям оснований, другие — к структурным особенностям двойной спирали (CbrA, H-NS, Hfq, IciA), а некоторые могут взаимодействовать с любыми участками ДНК (Dps, HU, StrA). Изменяя конформационное состояние двойной спирали, эти белки влияют на все функциональные свойства ДНК.

Для транскрипции это влияние может быть как активаторным, так и ингибиторным [15] и необходимо для адекватной экспрессии многих генов. Так, например, в регулон Lrp входит более 75 генов или оперонов [16], а в регулон H-NS — 35 [17]. Большинство белков нуклеоида присутствует в клет-

ке в больших количествах (до 60000 молекул) [18], проявляя зависимость от фазы роста, а регуляторные механизмы, влияющие на продукцию этих белков, обладают большим плейотропным эффектом.

Свойствами, похожими на белки нуклеоида и специфические регуляторы транскрипции обладает одна из субъединиц РНК-полимеразы — α . Ее свободные димеры присутствуют в клетке в количествах, многократно превышающих число молекул РНК-полимеразы [19]. Они могут избирательно связываться с имеющими специфическую конфигурацию малой бороздки участками ДНК [20–22]. Соответствующие последовательности часто присутствуют в промоторах [23–26].

Установлено, что их взаимодействие с α_2 может влиять на образование транскрипционных комплексов [24], а способность формировать белок-белковые контакты с регуляторами транскрипции [27] и другими субъединицами фермента повышает регуляторный потенциал этой субъединицы. Ген α (groA) входит в состав оперона, кодирующего несколько рибосомных белков. Его экспрессия и, соответственно, синтез α строго адаптированы к потребностям клетки. Поэтому α -субъединица РНК-полимеразы может быть одним из факторов, согласующих интенсивность транскрипции со скоростью трансляции.

На рисунке 1 представлены все известные в настоящее время белковые регуляторы транскрипции. Так как только ~70% бактериальных генов пока что аннотировано, в будущем это число может увеличиться, но не более чем в 1.5–2 раза, то есть вряд ли больше, чем 500 генов кодирует такие белки.

Нетранслируемые РНК как потенциальные модуляторы генной экспрессии

Современные методы аннотации расшифрованных последовательностей с высокой точностью распознают гены, кодирующие аминокислотные последовательности белков. Различные подходы основываются на таких характеристических особенностях, как нуклеотидный состав кодирующих участков, триплетность кода, взаимное расположение иницирующих и терминирующих кодонов, наличие модулей взаимодействия с рибосомами. Кроме этого учитываются данные об N-концевых последовательностях клеточных белков, а также любая другая доступная информация [28].

В дальнейшем используются методы сравнительной геномики и структурного моделирования, которые по гомологии нуклеотидной последова-

Исторически первой исследованной sRNA у *E. coli* была *MicF* [32]. В отличие от ранее обнаруженных aRNA бактериофагов, плазмид и транспозонов, содержащую 93 нуклеотида (нт) *MicF*, кодирует специальный ген, а ген, экспрессия которого зависит от *MicF*, находится совсем в другом месте на хромосоме. Взаимодействуя с 5'-концом мРНК поринового белка *ompF*, *MicF* блокирует ее ассоциацию с рибосомой, ингибируя продукцию белка. Аналогичный механизм используют несколько других sRNA:

- *DicF* (53 нт) влияет на деление клеток, ингибируя трансляцию мРНК *FtsZ* [33];
- *GcvB* (204 нт), модулирует экспрессию оперонов транспорта пептидов *pprABCDF* и *oprABCDF* [34];
- *UptR* (92 нт), регулирует секрецию токсичных продуктов, снижая продукцию дисульфидизомеразы (*DsbA*) [35];
- *Crp Tis* (*CrpT*, 300 нт), модулирует трансляцию регуляторного белка *CRP* [36].

Причем транскрипция *GcvB* контролируется двумя регуляторными белками *GcvA* и *GcvR*, а транскрипция *Crp Tis* – сAMP-CRP.

Немного другой механизм регуляторного воздействия обнаружен для РНК *Spot42* (109 нт), которая формирует дуплексы не с 5'-концом длинной мРНК галактозного оперона *galETKM*, а перед мРНК-копией *galK*, влияя на пропорцию ферментов утилизации галактозы [37].

Содержащая 87 нуклеотидов *DsrA*, в зависимости от упаковки, образует РНК-РНК дуплексы с мРНК *groS* (σ^S) или *H-NS* (белок нуклеоида). Взаимодействие с *H-NS* ингибирует ее трансляцию, а образование комплексов с мРНК σ^S разрушает неблагоприятную для взаимодействия с рибосомой вторичную структуру и активирует трансляцию [38]. Кроме этого, *DsrA* имеет участки, комплементарные еще трем мРНК [39], а экспрессию *groS* регулируют еще две нетранслируемая РНК: *RrgA* (101 нт) и *OxuS* (109 нт). *RrgA* связывается с тем же участком мРНК, что и *DsrA* [40], оказывая аналогичное воздействие, а *OxuS* защищает *RpoS* от деградации [41]. *OxuS*-РНК влияет на экспрессию еще ~40 генов, в том числе регулятора транскрипции *FhlA* [42]. Связывание *OxuS* со многими мРНК облегчает белок *Hfg* [43], являющийся своеобразным шапероном для РНК, а синтез *OxuS*-РНК индуцируется белком-активатором *OxuR*.

Совсем другой механизм регуляторного воздействия был установлен для *RyhB*. В нормальных

условиях синтез этой РНК блокирован комплексом Fe^{2+} -*Fur*, являющимся репрессором для большинства генов транспорта железа. При недостатке ионов железа *Fur* диссоциирует из промоторной области гена, активируя синтез *RyhB*, которая вызывает деградацию некоторых мРНК, в том числе мРНК супероксиддисмутазы [44]. *CsrB* (~360 нт), также как *CsrC* (245 нт), взаимодействует не с РНК, а с белком *CsrA*, контролирующим содержание углерода в клетке, функционально удаляя его из метаболических реакций [45, 46]. Синтез самой *CsrB* находится под контролем регулятора транскрипции *UvrY*, который является репрессором для транскрипции гена *csrA* [47].

Выяснена оставшаяся долгое время неясной функция 6S-РНК (184 нт), которая формирует стабильный комплекс с σ^D , β - и β' -субъединицами РНК-полимеразы, снижая активность фермента на генах, имеющих σ^D -зависимые промоторы, и способствуя переключению транскрипционного аппарата на копирование других генов [48].

RnpB (377 нт) является каталитической субъединицей РНКазы *P*, процессирующей транспортные РНК [49], а 114-нуклеотидная *Ffs* (4.5S РНК) в комплексе с белками *Ffh* и *FtsY* формирует прокариотический аналог структур, осуществляющих транслокацию секретлируемых пептидов к эндоплазматическому ретикулуму. Кроме этого, она взаимодействует с рибосомой и имеет 10-нуклеотидный участок, идентичный модулю связывания фактора элонгации трансляции EF-G в 23S РНК. Недостаток *Ffs* приводит к повышенному содержанию EF-G в рибосомах [50]. РНК *SsrA* (*tmRNA*, 363 нт) обладает свойствами как транспортной, так и матричной РНК. Аминоацилированная *tmRNA* присоединяется к А-сайту рибосомы, остановившей по каким-то причинам трансляцию. Синтезированный полипептид переносится на *tmRNA*. После транслокации *Ffs* замещает мРНК, предоставляя матрицу для трансляции короткой последовательности [51].

Таким образом, практически все ныне известные sRNA напрямую вовлечены в регуляцию генной экспрессии. В большинстве случаев регуляторное воздействие направлено на синтез белкового продукта, но зависимость функционального состояния РНК-полимеразы от 6S-РНК и зависимость синтеза многих белковых регуляторов транскрипции от sRNA означает их влияние и на спектр транскрибируемых генов.

Осознание важности малых РНК привело к их целенаправленному поиску. Только за последние 5 лет

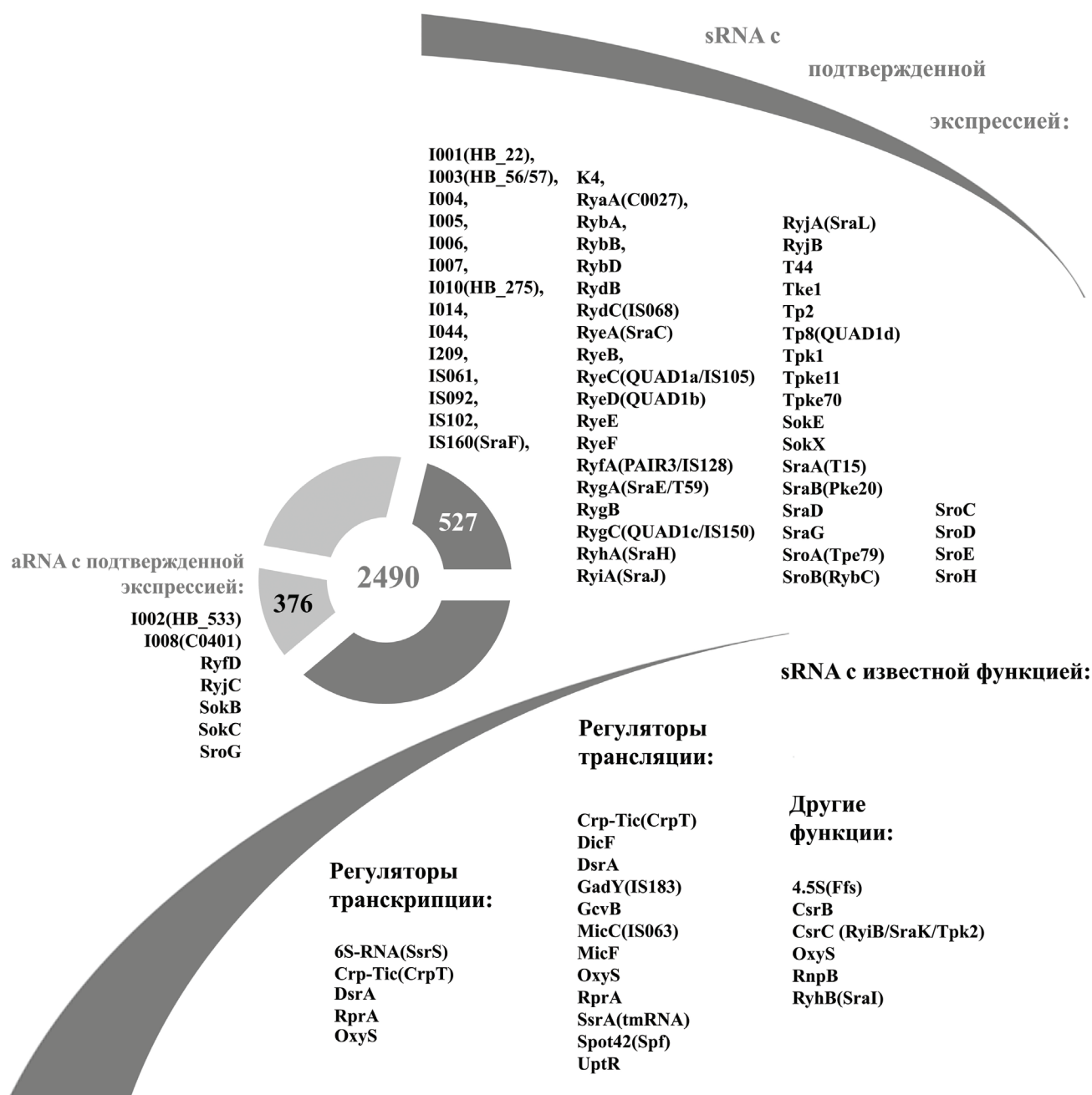


Рис. 2. Известные (перечислены) и предсказанные (представлены круговой диаграммой) гены sRNA и aRNA у *E. coli*. Диаграмма отражает общее число предсказанных генов aRNA (светлая часть) и sRNA (темная часть). Для sRNA указано число генов, предсказанных несколькими коллективами, для aRNA указано число генов, находящихся вблизи 5'-конца кодирующей последовательности (<400 н.п.). В центральной части перечислены гены, экспрессия которых подтверждена с помощью адекватных тестов (гибридизация со специфическими зондами, обратная транскрипция продукта со специфического праймера или определение 5'- и 3'-концов). В круглых скобках приведены альтернативные названия. Все данные взяты из процитированных в тексте работ.

было найдено 58 генов, но функции пока установлены только для двух новых РНК. Одним из первых был использован метод олигонуклеотидных микроматриц, которые имели зонды на обе нити ДНК в межгенных участках [52]. Синтез РНК был обнаружен в 1102 участках. В принципе, это позволяет оценить число неизвестных пока генов, часть из которых может

кодировать sRNA, но высокая чувствительность метода (способен обнаружить 1 молекулу РНК на 5 клеток) может быть причиной завышения этой оценки из-за ошибок терминации на концах соседних структурированным РНК какие-то гены могут быть упущены.

Самый большой вклад в число известных в настоящее время sRNA дало комплексное исследование, базирующееся на консервативности их нуклеотидной последовательности [53]. Поиск гомологий в межгенных областях у близкородственных бактерий с учетом ряда ген-специфичных элементов позволил предсказать около 400 новых кодирующих участков. Экспрессия 59 из них была исследована экспериментально, и для 17 кандидатов было обнаружено наличие в клетках соответствующих РНК-продуктов. Ограничением этого подхода было предположение о консервативности первичной структуры, в то время как для sRNA более существенной может быть консервативность трехмерной упаковки. Компенсирующий это ограничение подход был предложен в работе [54], в которой в межгенных участках геномов родственных бактерий искали участки, способные кодировать похожие по вторичной упаковке РНК. Оценивая минимальное число замен, позволяющих приблизить вторичную структуру попарно сравниваемых последовательностей, было предсказано 275 генов. Сорок девять из них были исследованы экспериментально, и для 11 было подтверждено наличие экспрессии, причем 3 из них уже были обнаружены ранее [53]. Похожий метод был использован Картером с соавторами [55], которые оценивали частоту встречаемости в межгенных участках нуклеотидов, динуклеотидов, мотивов, типичных для формирующих вторичные структуры РНК, а также свободную энергию фолдинга для потенциальных РНК-продуктов. Было предсказано 562 гена для sRNA, включая 10 обнаруженных ранее.

Подходы, учитывающие биологические свойства sRNA, были использованы тремя коллективами. В первом случае [56] анализировали фракцию клеточных РНК, имеющих типичную для sRNA длину (50–400 нт). Клонирование их кДНК-копий с определением нуклеотидной последовательности выявило 451 фрагмент, большинство из которых оказались частью кодирующих последовательностей и могли быть продуктами деградации. Около 5% оказались комплементарными мРНК, указывая на возможность антисмысловой транскрипции с бактериальных генов. Остальные (18%) были синтезированы в межгенных участках и включали 20 известных к тому времени sRNA. Тридцать четыре межгенных участка были исследованы экспериментально, что позволило выявить 7 новых РНК-продуктов. Во втором случае использовали аналогичный подход, но нетранслируемые РНК искали среди фрагментов

длиной 35–60 нт [57]. Была определена последовательность 641 кДНК-копии. Кроме возможных продуктов деградации мРНК, тРНК и рРНК были обнаружены: 2 гена, предположительно кодирующих короткие пептиды; фрагменты, синтезированные на прилегающих к генам нетранслируемых участках (5'- и 3'-UTR); 2 новых гена sRNA и 3 aRNA. В третьем случае [58], анализировали РНК, взаимодействующие с РНК-связывающим белком Hfq. Это позволило предсказать 20 новых РНК, из которых одна является антисмысловой. Экспериментальное тестирование подтвердило экспрессию 5 новых генов.

Первичная селекция потенциальных кандидатов по сигналам транскрипции была использована тремя коллективами. В первом случае [59] анализировали межгенные области, уделяя особое внимание терминаторам, а поиск промоторов, точность предсказания которых гораздо ниже, проводился в прилегающих к ним областях. Участки, находящиеся между промоторами и терминаторами, удаленными на 50–400 н.п., исследовали методами сравнительной геномики и области гомологичные у *E.coli*, *S.typhimurium*, *K.pneumoniae* и *Y.pestis* тестировали экспериментально. Была подтверждена экспрессия 14 из 24 предсказанных генов, но 10 из них к тому времени были уже обнаружены другими авторами. Очень похожий подход был использован в работе [60]. Полный анализ генома *E.coli* выявил 6635 предполагаемых терминаторов. Кроме стоп-сигналов, расположенных на концах генов в межгенных участках было найдено еще 600–700 возможных терминаторов и 4098 промоторов. Учитывая их расположение, было отобрано 227 кандидатов. Среди них оказались 32 обнаруженных ранее гена sRNA и 51 рамка считывания для коротких пептидов, а 144 участка были предсказаны, как гены sRNA. Восемь из них были проверены экспериментально и в 6 случаях соответствующие РНК-продукты были обнаружены. Для двух уже установлены функции. Так, GadY (IS183) участвует в регуляции генной экспрессии в условиях кислотного стресса [61], а MicC регулирует трансляцию OmpC аналогично тому, как MicF регулирует трансляцию OmpF [62]. В последнем случае участки потенциального кодирования новых РНК-продуктов искали с использованием алгоритма поиска промоторов PlatProm, имеющего высокую точность предсказания стартовых точек транскрипции [63]. В межгенных областях было обнаружено 720 промоторов, способных контролировать экспрессию новых

генов. Из них 246 находятся перед генами sRNA, уже предсказанными или обнаруженными другими авторами. Кроме этого, было предсказано 977 мест потенциального синтеза aRNA.

Создание приемлемой для статистического анализа компиляции генов, кодирующих малые нетранслируемые РНК (несколько десятков), позволило использовать информационные подходы для алгоритмизации их структурных особенностей [64]. Созданный алгоритм (GPboost_{Reg}) использовали для поиска похожих участков в межгенных областях, что позволило предсказать 306 потенциальных мест кодирования sRNA. Шестнадцать участков было проверено экспериментально и в 12 случаях соответствующие РНК-продукты были обнаружены.

Всего в межгенных участках различными методами предсказано 1493 неперекрывающихся места возможного синтеза РНК, не имеющих рамок считывания для синтеза белка. Это гораздо больше, чем ожидаемое число таких генов в бактериальных клетках — 50–260 [29, 30, 65, 66]. И хотя многие предсказанные гены могут быть ложными, 527 участков потенциального кодирования sRNA обнаружены несколькими группами авторов. Если учитывать только их, то вместе с известными генами sRNA общее число возможных мест кодирования таких молекул уже сейчас более чем в 2 раза превышает общее число известных и предсказанных генов, кодирующих белковые регуляторы транскрипции. Какова вероятность того, что эта пропорция сохранится в будущем?

Средний размер генов, кодирующих регуляторы транскрипции — 830 н.п. (~300 аминокислотных остатков), а среднее расстояние между кодирующими участками в геноме *E.coli* ~ 150 н.п. Это, а также то, что открытые рамки считывания такого размера хорошо идентифицируются компьютерными программами, снижает вероятность обнаружения в будущем большого числа новых генов типичного для регуляторов размера. И хотя не исключено, что в дальнейшем будут открыты какие-то новые регуляторные механизмы с участием коротких пептидов или среди белков, выполняющих другие функции в клетке, будут найдены такие, которые окажутся способными регулировать транскрипцию, основная масса генов, кодирующих белковые регуляторы транскрипции, по-видимому, идентифицирована.

Основная масса генов, кодирующих малые нетранслируемые РНК, по-видимому, еще не идентифицирована, хотя в межгенных областях число

предсказанных участков их кодирования вряд ли существенно увеличится. Размер межгенных участков пока не является лимитирующим для размещения этих маленьких генов (самая короткая из известных sRNA имеет длину всего 40 нт [54]), но степень перекрытия наборов генов, предсказываемых с помощью каждого нового подхода, с теми, которые уже предсказаны другими авторами, проявляет явную тенденцию к росту, а число уникальных кандидатов, наоборот, падает. Учитывая высокий процент позитивных тестов для проверенных экспериментально генов, можно думать, что большая часть генов, предсказанных несколькими коллективами авторов, действительно кодирует новые продукты. В таком случае более реалистичной является оценка, предполагающая существование нескольких сотен sRNA у *E.coli* [66]. Кроме этого, весомый вклад в регуляторный потенциал нетранслируемых РНК могут внести тРНК, играющие роль структурных переключателей при трансляции мРНК некоторых аминоксил-тРНК синтетаз (см. например [67]), и aRNA, целенаправленный поиск которых только начинается [63]. Регуляция, основанная на формировании альтернативных структур мРНК (riboswitch) в зависимости от аминокислотирования регуляторной тРНК, может затрагивать много генов, но число потенциальных регуляторов известно и не может превысить общее число различных тРНК в клетках. Распространенность aRNA пока оценить сложно. Несколько таких РНК уже обнаружено среди фракционированных по размерам и взаимодействующих с Hfq РНК [56–58] (см. рис. 2), но только небольшая часть из них была проверена с помощью специфических тестов. Данные, полученные с использованием микроматриц, допускают возможность антисмысловой транскрипции для нескольких тысяч генов [68]. Об этом же свидетельствует целенаправленный поиск таких генов по наличию необходимых для антисмысловой транскрипции внутригенных промоторов [63]. В 376 из 997 генов, имеющих внутренние промоторы, стартовые точки оказались расположенными в пределах 400 н.п. от иницирующего кодона трансляции. То есть синтезированные с них РНК должны иметь типичную для регуляторных РНК длину. Количество регуляторных РНК в бактериальных клетках может, таким образом, быть намного больше, чем ранее ожидалось, а число конститутивных генов в будущем может сильно сократиться.

В заключение следует обратить внимание на взаимозависимость двух типов регуляторов в бактериальной клетке. Имеющаяся информация свидетель-

ствуется о том, что синтез многих sRNA контролируется регуляторами транскрипции и, наоборот, содержание в клетках многих регуляторных белков зависит от sRNA. Даже среди генов, предположительно подверженных антисмысловой регуляции, процент таких, которые кодируют регуляторы транскрипции (11%), выше, чем в геноме (~6,5%). Пока не понятно, какие преимущества дает клетке использование комбинированных систем с участием белковых регуляторов транскрипции и нетранслируемых РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства промышленности и науки Московской области (гранты 03-04-48339 и 04-04-97280).

Литература

1. Erickson J.W., Gross C.A. Identification of the sigma E subunit of Escherichia coli RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression // *Genes Dev.* – 1989. – Vol. 3. – P. 1462–1471.
2. Helmann J.D. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression // *Mol. Microbiol.* – 1991. – Vol. 5. – P. 2875–2882.
3. Yura T., Nagai H., Mori H. Regulation of the heat-shock response in bacteria // *Annu.Rev.Microbiol.* – 1993. – Vol. 47. – P. 321–350.
4. Angerer A., Enz S., Ochs M., Braun V. Transcriptional regulation of ferric citrate transport in Escherichia coli K-12. Fecl belongs to a new subfamily of sigma 70-type factors that respond to extracytoplasmic stimulus // *Mol. Microbiol.* – 1995. – Vol. 18. – P. 163–174.
5. Merrick M.J. In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N) // *Mol. Microbiol.* – 1993. – Vol. 10. – P. 903–909.
6. Henge-Aronis R. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression // *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol. 21. – P. 887–893.
7. Maeda H., Fujita N., Ishihama A. Competition among seven Escherichia coli subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase // *Nucl. Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 3497–3503.
8. Jishage M., Ishihama A. A stationary phase protein in Escherichia coli with binding activity to the major subunit of RNA polymerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 4953–4958.
9. Missiakas D., Mayer M.P., Lemaire M., Georgopoulos C., Raina S. Modulation of the Escherichia coli sigma E (RpoE) heat-shock transcription factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 24. – P. 355–371.
10. Kutsukake K. Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in Salmonella typhimurium // *Mol. Gen. Genet.* – 1994. – Vol. 243. – P. 605–612.
11. Van Hove B., Staudenmaier H., Braun V. Novel two-component transmembrane transcriptional control: regulation of iron dicitrate transport in Escherichia coli K-12 // *J. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 172. – P. 6749–6758.
12. Hughes K.T., Mathee K. The anti-sigma factors // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1998. – Vol. 52. – P. 231–286.
13. Robinson, K., McGuire A.M., Church G.M. A comprehensive library of DNA-binding site matrices for 55 proteins applied to the complete Escherichia coli K-12 genome // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 284. – P. 241–254.
14. Talukder A.A., Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from Escherichia coli. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 33105–33113.
15. Pruss G.J., Drlica K. DNA supercoiling and prokaryotic transcription // *Cell.* – 1989. – Vol. 56. – P. 521–523.
16. Newman E.B., Lin R. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in E.coli // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1995. – Vol. 49. – P. 747–775.
17. Atlung T., Ingmer H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 24. – P. 7–17.
18. Azam T.A., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – P. 6361–6370.
19. Ishihama A. Molecular assembly and functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase // *Adv. Biophys.* – 1990. – Vol. 26. – P. 19–31.
20. Jeon Y.H., Negishi T., Shirakawa M., Yamazaki T., Fujita N., Ishihama A., Kyogoku Y. Solution structure of the activator contact domain of the RNA polymerase subunit // *Science.* – 1995. – Vol. 270. – P. 1495–1497.
21. Yasuno K., Yamazaki T., Tanaka Y., Kodama T.S., Matsugami A., Katahira M., Ishihama A., Kyogoku Y. Interaction of the C-terminal domain of the E.coli RNA polymerase alpha subunit with the UP element: recognizing the backbone structure in the minor groove surface // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 306. – P. 213–225.
22. Ross W., Ernst A., Gourse R.L. Fine structure of E.coli RNA polymerase-promoter interactions: subunit binding to the UP element minor groove // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 491–506.
23. Ross W., Gosink K.K., Salomon J., Igarashi K., Zou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R.L. A third

- recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – P. 1407–1413.
24. *Purtov Yu.A., Ishihama A., Ozoline O.N.* Free dimer of E.coli RNA polymerase subunits is a potential transcription regulator // *J. Biomol. Struct. Dynam.* – 2005. – Vol. 22. – P. 796.
 25. *Estrem S.T., Gaal T., Ross W., Gourse R.L.* Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 9761–9766.
 26. *Estrem S.T., Ross W., Gaal T., Chen Z.W.S., Niu W., Ebright R.H., Gourse R.L.* Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal of the RNA polymerase subunit // *Gen. Dev.* – 1999. – Vol. 13. – P. 2134–2147.
 27. *Heyduk E., Heyduk T.* Physical studies on interaction of transcription activator and RNA polymerase: fluorescent derivatives of CRP and RNA polymerase // *Cell Mol. Biol. Res.* – 1993. – Vol. 39. – P. 401–407.
 28. *Blattner F. R., Puskett III G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y.* The complete genome sequence of Escherichia coli K12 // *Science*. – 1997. – Vol. 277. – P. 1453–1462.
 29. *Storz G., Opdyke J.A., Zhang A.* Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs // *Current Opinion in Microbiology.* – 2004. – Vol. 7. – P. 140–144.
 30. *Hershberg R., Altuvia S., Margalit H.* A survey of small RNA-encoding genes in Escherichia coli // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – P. 1813–1820.
 31. *Gottesman S., Storz G., Rosenow C., Majdalani N., Repoila F., Wassarman K.M.* Small RNA regulators of translation: mechanisms of action and approaches for identifying new small RNAs // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* – 2001. – Vol. 66. – P. 353–362.
 32. *Mizuno T., Chou M.-Y., Inouye M.* A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – Vol. 81. – P. 1966–1970.
 33. *Tetart F., Bouche J.-P.* Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules // *Molecular Microbiology.* – 1992. – Vol. 6. – P. 615–620.
 34. *Urbanowski M.L., Stauffer L.T., Stauffer G.V.* The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in E.coli // *Molecular Microbiology.* – 2000. – Vol. 37. – P. 856–868.
 35. *Guigueno A., Dassa J., Belin P., Boquet P.L.* Oversynthesis of a new Escherichia coli small RNA suppresses export toxicity of DsbA'-PhoA unfoldable periplasmic proteins // *J. of Bacteriology.* – 2001. – Vol. 183. – P. 1147–1158.
 36. *Okamoto K., Hara S., Bhasin R., Freundlich M.* Evidence in vivo for autogenous control of the cyclic AMP receptor protein gene (*crp*) in Escherichia coli by divergent RNA // *J. of Bacteriology.* – 1998. – Vol. 170. – P. 5076–5079.
 37. *Moeller T., Franch T., Udesen C., Gerdes K., Valentin-Hansen P.* Spo42 RNA mediates discoordinate expression of the E.coli galactose operon // *Genes and Development.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1696–1706.
 38. *Majdalani N., Cunning C., Sledjeski D., Elliott T., Gottesman S.* DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 12462–12467.
 39. *Lease R.A., Belfort M.* From the cover: a trans-acting RNA as a control switch in Escherichia coli: DsrA modulates function by forming alternative structures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 9919–9924.
 40. *Majdalani N., Chen S., Murrow J., John K.S., Gottesman S.* Regulation of *rpoS* by a novel small RNA: the characterization of RprA // *Molecular Microbiology.* – 2001. – Vol. 39. – P. 1382–1394.
 41. *Altuvia S., Weinstein-Fischer D., Zhang A., Postow L., Storz G.* A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator // *Cell.* – 1997. – Vol. 90. – P. 43–53.
 42. *Altuvia S., Zhang A., Argaman L., Tiwari A., Storz G.* The E.coli OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17. – P. 6069–6075.
 43. *Zhang A., Wassarman K.M., Ortega J., Steven A.C., Storz G.* The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs // *Mol. Cell.* – 2002. – Vol. 9. – P. 11–22.
 44. *Masse E., Gottesman S.* A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 4620–4625.
 45. *Liu M., Gui G., Wei B., III JP, Oakford L., Yuksel U., Gierdoc D., Romeo T.* The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in E.coli // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 17502–17510.
 46. *Weilbacher T., Suzuki K., Dubey A.K., Wang X., Gudapaty S., Morozov I., Baker C.S., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T.* A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of Escherichia coli // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 48. – P. 657–670.

47. Suzuki K., Wang X., Weilbacher T., Pernestig A., Melefors O., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – P. 5130–5140.
48. Wassarman K.M., Storz G. 6S RNA Regulates *E. coli* RNA Polymerase Activity // *Cell.* – 2000. – Vol. 101. – P. 613–623.
49. Kim S., Sim S., Lee Y. In vitro analysis of the processing at the 3'-end of precursors of M1 RNA, the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNAse P: multiple pathways and steps for the processing // *Nucl. Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – P. 895–902.
50. Nakamura K., Fujii Y., Shibata T., Yamane K. Depletion of *Escherichia coli* 4.5S RNA leads to an increase in the amount of protein elongation factor EF-G associated with ribosomes // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 259. – P. 543–550.
51. Keiler K.C., Waller P.R.H., Sauer R.T. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA // *Science.* – 1996. – Vol. 271. – P. 990–993.
52. Tjaden B., Saxena R.M., Stolyar S., Haynor D.R., Kolker E., Rosenow C. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* using high-density oligonucleotide probe assays // *Nucl. Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 3732–3738.
53. Wassarman K.M., Repoila F., Rosenow C., Storz G., Gottesman S. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays // *Genes and Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1637–1651.
54. Rivas E., Klein R.J., Jones T.A., Eddy S.R. Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics // *Curr. Biol.* – 2001. – Vol. 11. – P. 1369–1373.
55. Carter R.J., Dubchak I., Holbrook S.R. A computational approach to identify genes for functional RNAs in genomic sequences // *Nucl. Acids Res.* – 2001. – Vol. 19. – P. 3928–3938.
56. Vogel J., Bartels V., Tang T.H., Churakov G., Slagter-Jager J.G., Hutterhofer A., Wagner E.G. RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria // *Nucl. Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – P. 6435–6443.
57. Kawano M., Reynolds A.A., Miranda-Rios J., Storz G. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli* // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. 1040–1050.
58. Zhang A., Wassarman K., Rosenow C., Tjaden B.C., Storz G., Gottesman S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 50. – P. 1111–1124.
59. Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E.G., Margalit H., Altuvia S. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli* // *Curr. Biol.* – 2001. – Vol. 11. – P. 941–950.
60. Chen S., Lesnik E.A., Hall T.A., Sampath R., Griffey R.H., Ecker D.J., Blyn L.B. A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the *Escherichia coli* genome // *BioSystems.* – 2002. – Vol. 65. – P. 157–177.
61. Opdyke J.A., Kang J.-G., Storz G. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – P. 6698–6705.
62. Chen S., Zhang A., Blyn L.B., Storz G. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – P. 6689–6697.
63. Brok-Volchanski A.S., Masulis I.S., Shavkunov K.S., Lukyanov V.I., Purtov Yu.A., Kostyanicina E.G., Deev A.A., Ozoline O.N. Predicting sRNA genes in the genome of *E. coli* by the promoter-search algorithm PlatProm // In: *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure II.* (Eds. Kolchanov N. and Hofstaedt R.). – Springer Science+Business Media, 2005, Inc. – P. 11–20.
64. Saetrom P., Sneve R., Kristiansen K.I., Snove Jr. O., Grunfeld T., Rognes T., Seeberg E. Predicting non-coding RNA genes in *Escherichia coli* with boosted genetic programming // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. 3263–3270.
65. Eddy S.R. Noncoding RNA genes // *Curr. Opin. Genet. Devel.* – 1999. – Vol. 9. – P. 695–699.
66. Zhang Y., Zhang Z., Ling L., Shi B., Chen R. Conservation analysis of small RNA genes in *Escherichia coli* // *Bioinformatics.* – 2004. – Vol. 20. – P. 599–603.
67. Rodionov D.A., Vitreschak A.G., Mironov A.A., Gelfand M.S. Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems // *Nucl. Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. 3340–3353.
68. Selinger D., Cheung K., Mei R., Johansson E., Richmond C., Blattner F., Lockhart D., Church D. RNA expression analysis using a 30-base pair resolution *Escherichia coli* genome array // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 1262–1268.

УДК 577.2.08:681.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА И ДИЗАЙН БИО- И НАНОСТРУКТУР

К.В. ШАЙТАН*, Е.В. ТУРЛЕЙ, Д.Н. ГОЛИК, К.Б. ТЕРЕШКИНА,
О.В. ЛЕВЦОВА, И.В. ФЕДИК, А.К. ШАЙТАН, М.П. КИРПИЧНИКОВ

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Молекулярная динамика и молекулярное моделирование играют важную роль в построении гипотез, формулировании основных принципов и направлении развития новых материалов. Так, например, в [1] для моделирования рекомендуются четыре области, которые имеют большой потенциал промышленного воздействия в ближайшие годы: новые стратегии моделирования сложных систем и материалов, дизайн новых функциональных материалов *in silico*, компьютерно-ориентированные методы нанотехнологии и моделирование биологических и биомиметических материалов. Методы молекулярной динамики широко применяются при изучении фундаментальных проблем естествознания, а также в прикладных задачах молекулярной биоинженерии, биотехнологии, нанотехнологии, материаловедения и др. [2, 3]. Решение системы большого числа классических уравнений движения для атомных частиц проводится, как правило, с использованием разностной схемы Верле. Силовое поле задается системой парных атом-атомных потенциалов, которые специально калибруются для определенного типа молекулярных объектов (биополимеры, минералы, сплавы и пр.). Обычно используются также специальные алгоритмы для поддержания постоянной температуры и давления (или объема). Применяются варианты как равновесной молекулярной динамики, то есть молекулярной динамики только под воздействием межатомных взаимодействий, так и неравновесной (или управляемой) молекулярной динамики (Steered Molecular Dynamics, [4]) под действием дополнительных силовых воздействий и (или) специальных граничных условий. Использование неравновесной молекулярной динамики в применении к сложным и гетерогенным молекулярным системам

является в настоящее время более перспективным. Это обусловлено принципиальной возможностью целенаправленно планировать вычислительный эксперимент и изучать отклик системы на внешнее воздействие. Однако здесь требуется более совершенное программное обеспечение и дополнительные усилия при интерпретации результатов. В статье кратко рассмотрены некоторые направления использования управляемой молекулярной динамики для исследования достаточно сложных молекулярных систем, развиваемые на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ.

Динамика биомембран. Биологические мембраны в последние годы являются предметом пристального изучения [5–9]. Однако данные по кинетическим свойствам фосфолипидного бислоя с учетом его анизотропии и неоднородности мало доступны. Ниже обсуждается проблема неоднородности и анизотропии фосфолипидного бислоя по отношению к диффузионным процессам. Подробно рассматривается мембрана, состоящая из бислоя 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), содержащего 64 молекулы липида. Степень сольватации – 44 молекулы воды на молекулу липида. Используется модель воды TIP3P, причем валентные связи и валентные углы в молекулах воды не фиксированы, а определяются соответствующими потенциалами. Поверхностная плотность липидов близка к экспериментальным значениям (62–68, [10–13]).

Расчеты молекулярной динамики (МД) такой системы проводились пакетом PUMA [14], который был специально модифицирован для включения управляющих воздействий [6, 7]. Решение системы классических уравнений движения атомов производилось в силовом поле Amber99 [15]. Использовались периодические граничные условия, столкновительный термостат [14] ($T=300\text{K}$) и баростат Берендсена [16]. Контролировалось достижение локального равновесия системой по флуктуациям объема, давления и температуры [6].

* Автор для переписки:

Шайтан К.В.,

сотрудник МГУ им. М.В. Ломоносова

Москва, Воробьевы горы

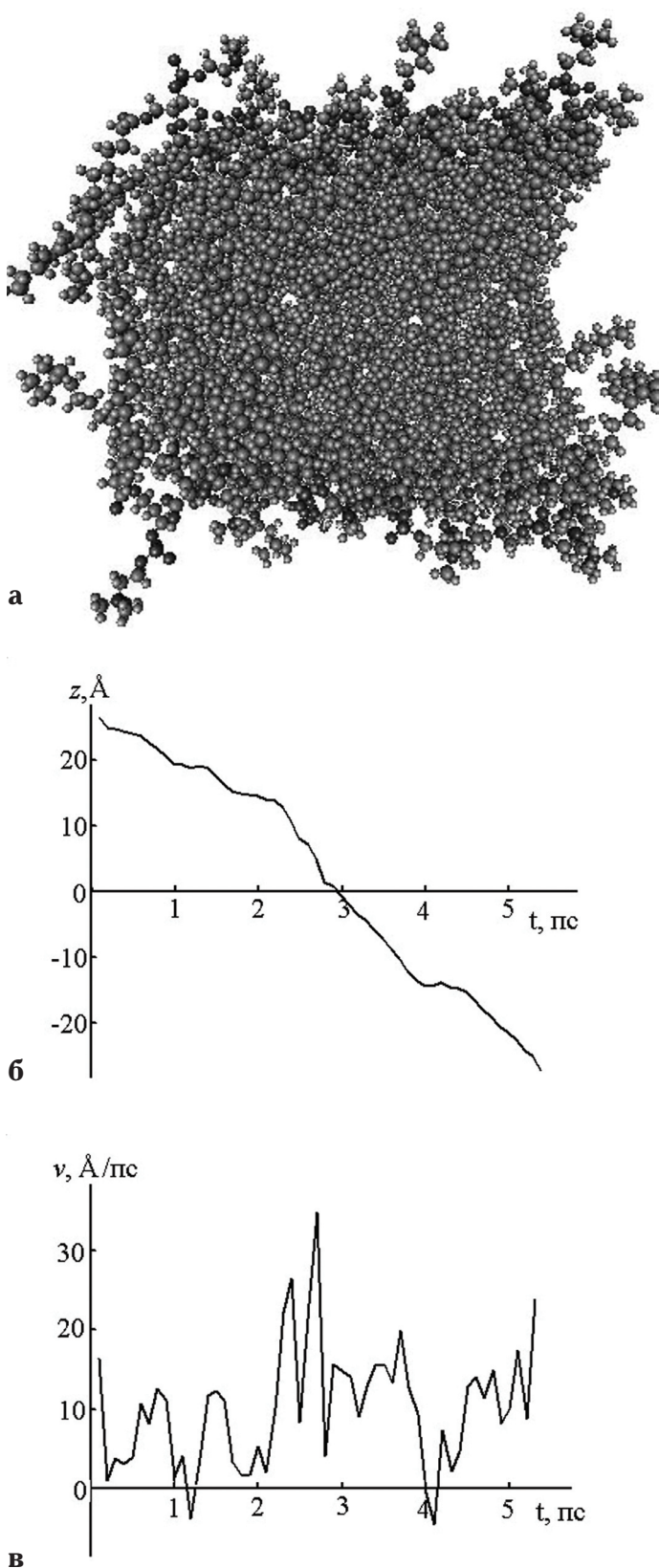


Рис. 1. Структура бислоя ПОФХ (а). Кинетика прохода пробного ван-дер-ваальсовского шара радиуса 2 под действием силы $10 \text{ ккал/моль}^{-1}$ в направлении нормали (б). Положение шара на оси Z (нормали мембраны). Центр бислоя находится при $z=0$, границы — при $z=\pm 20$ (в). Скорость продвижения шара, усреднённая по интервалу 0.1 пс .

Диффузия модельных сфер в биомембране.

Для тестирования свойств системы и вычисления параметров, определяющих диффузию молекул в мембране, использовалась управляемая молекулярная динамика. При этом к некоторым частям системы прилагались дополнительные силы (постоянные или переменные). Использовались пробные шары массой 18 Да с радиусами 2 и 4 (то есть порядка радиуса атома углерода и небольшой функциональной группы, соответственно), взаимодействующие с остальными атомами только посредством сил Ван-дер-Ваальса (константа взаимодействия $= 0,15 \text{ ккал/моль}$), к которым прикладывалась дополнительная постоянная сила F_{ext} , действующая в направлении нормали или плоскости мембраны. В первом случае пробный шар предварительно фиксировался на расстоянии 2 от мембраны, во втором — помещался в центр мембраны, и релаксация системы проводилась в течение 2 пс. Далее прикладывалась сила величиной от $0,3 \text{ ккал/моль}^{-1}$ до 4 ккал/моль^{-1} ($1 \text{ ккал/моль}^{-1} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ дин}$). В случае шара с радиусом 2 бралось также значение силы $10 \text{ ккал/моль}^{-1}$ (рис. 1).

Отметим, что на молекулярных масштабах наблюдаются довольно существенные отклонения от гидродинамической формулы Стокса, что вполне естественно, так как приближение сплошной среды для частиц такого размера практически не работает. Соотношение Стокса может использоваться лишь для качественных оценок.

Расчет траекторий SMD в мембранной системе проводился до первого полного прохода ван-дер-ваальсовских шаров через мембрану, но не более чем 2 нс. Шары радиусом 2 при силе $1-10 \text{ ккал/моль}^{-1}$ проникали через мембрану за время, меньшее 2 нс. В остальных случаях шары застревали на поверхности либо успевали погрузиться в мембранный слой только на некоторую глубину. При величине силы менее 1 ккал/моль влияние возмущений среды на шар радиусом 4 было сравнимо с приложенной силой, и в ряде случаев пробная молекула отклонялась от начального положения также и в противоположную от мембраны сторону на расстояния до 2.

При величине силы больше критического значения (например 1 ккал/моль^{-1} для шара радиуса 2) молекула относительно быстро проникает в мембрану. Скорость проникновения при этом определяется, в основном, дрейфом под действием внешней силы, а вклад диффузии крайне мал.

В случае латерально приложенной силы использовались значения $F_{\text{ext}} = 1, 2, 4$ и $10 \text{ ккал/моль}^{-1}$. В случае с $F_{\text{ext}} = 1 \text{ ккал/моль}^{-1}$ при ана-

лизе кинетических характеристик учитывался 75-пс участок траектории, в течение которого частица оставалась в центре бислоя.

Коэффициент вязкого трения определялся как отношение внешней силы к скорости дрейфа частицы:

$$\gamma = \frac{F_{ext}}{v}$$

Формально коэффициент трения можно пересчитать в терминах коэффициента диффузии, пользуясь известным соотношением Эйнштейна и в терминах микровязкости среды с использованием формулы Стокса.

В настоящее время имеются ограниченные данные относительно вязкости при движении частицы по нормали к поверхности мембраны и в латеральном направлении в центре бислоя. Экспериментально известна усредненная величина вязкости поверхностного слоя, составляющая от 30 до 190 сПз для различных липидных мембран [17–19]. Для ПОФХ известна также экспериментальная оценка усредненной вязкости порядка 18 сПз [20]. Поскольку значения микровязкости различны для разных участков мембраны, целесообразно выделить несколько структурных и динамически неоднородных областей мембраны. В первом приближении можно выделить области липидных голов и алкильных цепей. На рисунке 2 приведены графики зависимости коэффициента трения в терминах микровязкости для различных частей системы, полученные при различных значениях внешней силы, действующей на частицу радиуса 2 в направлении нормали к мембране.

Рассчитанные значения эффективной вязкости воды для шара радиуса 2 составляют порядка 0,3–0,4 сПз, что в 2–3 раза меньше экспериментального значения. Эти величины согласуются с известными оценками вязкости воды в модели ТРЗР [21]. Поперечная вязкость мембраны для частиц такого размера не превышает 6 сПз. Вязкость в центральной части бислоя в несколько раз меньше этого значения.

Для латерального смещения шара под действием силы данные представлены на рис. 3. Значения вязкости в данном случае очень близки к значениям вязкости, измеренной в области алкильных хвостов в направлении нормали.

Отметим, что для частиц радиусом 2 формула Стокса в области алкильных хвостов практически не работает. В целом, полученные результаты свидетельствуют о неньютоновском характере среды

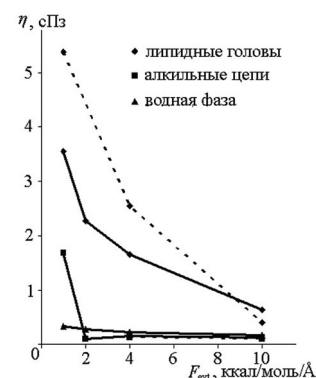


Рис. 2. Вязкость в системе ПОФХ-вода. Радиус пробного ван-дер-ваальсовского шара 2. Сплошной линией отмечены данные для системы после предварительной релаксации системы в течение 500 пс, пунктирной — после окончательной релаксации в течение 1 нс

и слабой неравновесности данной системы при скоростях движения порядка 1–10 /пс.

Скорость проникновения молекулы под действием внешней силы зависит также от химической природы молекулы. Для сравнения была рассчитана динамика проникновения в бислой остатков триптофана (эффективный радиус 4,8), аланина (эффективный радиус 3,1, рис.4) и ван-дер-ваальсовской сферы радиуса 2. Полученные значения вязкости приведены на рисунке 5. В случае многоатомных молекул сила прикладывалась равномерно ко всем атомам системы.

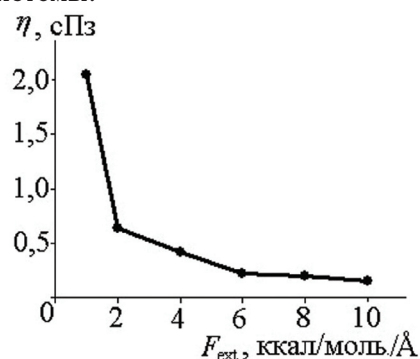


Рис. 3. Вязкость в центре бислоя ПОФХ. Радиус пробной ван-дер-ваальсовского шара 2

Отметим, что более полярный остаток триптофана развивает большую скорость в области липидных голов, чем остаток аланина, поэтому эффективное значение микровязкости для него оказывается ниже. На участке гидрофобных алкильных цепей ситуация обратная, причём разница в скоростях здесь достигает пятнадцати раз. Наиболее чувствительным к природе молекул при прохождении через мембрану оказывается участок голов липидов. Гидрофобная сердцевина бислоя с большим свободным объемом чувствительна к размеру частиц.

Латеральная самодиффузия липидов в бислое.

О коэффициентах латеральной диффузии липидов в мембранах имеется значительно более подробная экспериментальная информация. Эти данные могут быть использованы для тестирования методики динамического моделирования. Коэффициент латеральной

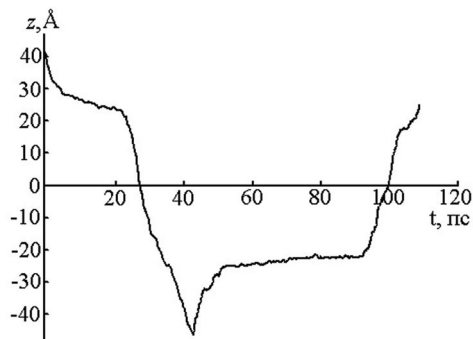


Рис. 4. Динамика прохождения остатка аланина через липидную мембрану. Показано положение геометрического центра остатка. Границы бислоя находятся в положениях ± 22 . В точке излома направление силы было изменено на противоположное



Рис. 5. Зависимость микровязкости от эффективного радиуса пробных молекул в системе ПОФХ-вода. Суммарная сила $F_{\text{ext}} = 10$ ккал/моль \cdot с $^{-1}$

самодиффузии липидов D_{xy} определялся в соответствии с известным соотношением,

$$\langle (x(t) - x(0))^2 + (y(t) - (y(0)))^2 \rangle = 4D_{xy}t$$

где в угловых скобках находится квадрат отклонения центра масс липида в плоскости бислоя. Усреднение проводится по всем липидам. Траектория общей длиной 3 нс поделена на 12 участков по 250 пс. Зависимости квадрата смещения (рис. 6) получали в результате усреднения по всем 12 участкам.

Вычисленное для ПОФХ значение $D_{xy} = 2,4 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с, что близко к данным по квазиупругому рассеянию нейтронов на бислоях дипальмоилфосфатидилхолина ($1 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [22]) и диолеилфосфатидилхолина ($2 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [23]). Результаты импульсного ЯМР для бислоев ПОФХ дают значения $2,0 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с при 298 К и

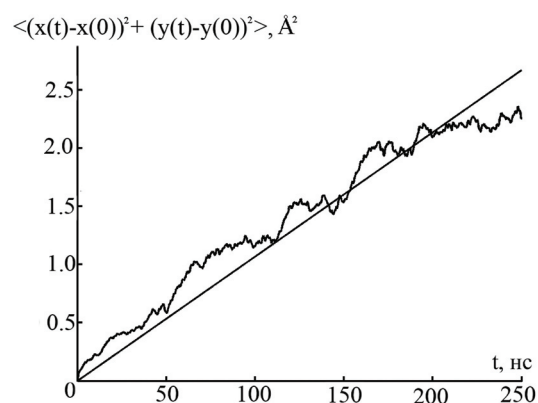


Рис. 6. Средний квадрат смещения центров масс липидов в плоскости бислоя ПОФХ. Прямая — линейная аппроксимация

$2,5 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с при 303 К [24], что практически совпадает с полученными здесь значением. Отметим, что полученное значение коэффициента латеральной диффузии оказалось гораздо ближе к экспериментальным значениям, чем коэффициенты, получаемые в МД-расчетах в соответствии с другими методиками (для дипальмоилфосфатидилхолиновых бислоев $3 \pm 0,6 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [25]; $4,0$ - $4,5 \cdot 10^{-7}$ см 2 /с [26] и бислоя ПОФХ $7,3 \cdot 10^{-5}$ см 2 /с [9]).

Оценка гидрофобных свойств аминокислотных остатков на границе вода-мембрана. Рассмотрим пример использования техники введения специальных граничных условий. Методами управляемой молекулярной динамики исследовалось поведение отдельных аминокислотных остатков на границе раздела фаз между водой и неполярным растворителем.

Расчет был произведен как для раздела фаз вода/гексан, так и для модельной системы вода/вакуум. В последнем случае водный слой был отделен от вакуума плоской виртуальной стенкой, задаваемой, как дополнительный отталкивающий потенциал для молекул воды. При этом стенка оставалась проницаемой для молекул аминокислотных остатков. Использовался столкновительный термостат, который оказывал воздействие на молекулу и в том случае, если она находилась в слое вакуума. Таким образом, частично компенсировалось отсутствие гидрофобной среды.

Аминокислотные остатки брались в форме бирадикального мономерного звена, в виде $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}-$, то есть как незаряженный мономер с формально ненасыщенными связями. Использовался программный комплекс RUMA. Выбирались периодические граничные условия, силовое поле Amber 99 и модель воды TIP3P с нефиксированными внутренними степенями свободы. Для системы вода/гексан использовался баростат Берендсена вдоль оси пер-

пендикулярной границе раздела фаз. Система вода/вакуум моделировалась в NVT ансамбле, плотность воды соответствовала нормальным условиям.

Для оценки гидрофобных свойств аминокислотных остатков проводилась статистическая обработка траекторий и анализировались пространственные и ориентационные распределения остатков. Ниже проведено сравнение этих двух моделей.

Рассмотрим поведение фенилаланина на границе раздела фаз вода/гексан. На рисунке 7 приведены усредненные по времени профили плотности воды и гексана. Видно, что граница раздела фаз представляет собой переходный слой толщиной около 5 Å. На рисунке 8 приведены распределения для положений центров масс остова и боковой цепи фенилаланина. Максимумы распределений практически точно соответствуют середине межфазного слоя, то есть молекула проявляет поверхностно-активные свойства. При этом графики распределений для гидрофобной боковой цепи и полярного остова смещены в сторону фазы гексана и водной фазы соответственно. Анализ ориентаций молекулы показывает, что боковая цепь преимущественно смещена в сторону гексана. Вектор соединяющих центры масс остова и боковой цепи образует с поверхностью раздела фаз угол в среднем около 30 градусов, то есть молекула как бы лежит на границе раздела.

Рассмотрим далее динамику фенилаланина в системе с виртуальной отталкивающей стенкой. Из рисунка 8 видно, что для системы с отталкивающей стенкой крутизна профиля плотности водной фазы больше, чем в системе вода/гексан. Отсутствие неполярной фазы гексана несущественно меняет форму и ширину распределений для аминокислотного остатка (рис. 10). Однако хорошо заметно смещение наиболее вероятного положения центров масс остова и бокового радикала в сторону водной фазы по сравнению со случаем раздела фаз вода/гексан. Наиболее вероятное положение молекулы при этом находится в приграничном к разделу фаз слое воды, а не на самой границе раздела фаз. Отметим, что динамика ориентации молекулы в системах вода/вакуум и вода/гексан отличается незначительно.

Таким образом, модель искусственной отталкивающей плоскости может использоваться для быстрой оценки гидрофобных и поверхностно-активных свойств молекулярных структур. Эта модель была также использована нами для анализа свойств и классификации гидрофобности

большинства аминокислотных остатков. Оценка параметров гидрофобности используется как для построения профилей гидрофобности белков [27, 28], так и широко применяется в фармакокинетике [29]. Гидрофобность является одним из важнейших параметров для реакций, катализируемых ферментами. Сайты связывания последних весьма восприимчивы к гидрофобным участкам молекул субстрата [30]. При анализе распределений остатки всех основных типов аминокислот в первом приближении разделились на две группы. Первая группа проявляет явные поверхностно-активные свойства. К этой группе относятся все остатки с неполярными боковыми группами, включая глицин. Остатки второй группы десорбировались с поверхности и уходили в водную фазу. К этой группе относятся остатки, боковые группы которых являются либо полярными, либо заряженными. Подчеркнем, что развиваемый подход позволяет разрабатывать систему количественных показателей, характеризующих гидрофобные свойства молекул.

Динамика функционирования ионных каналов. Ионные каналы, сформированные полипептидными структурами, являются достаточно новыми и сложными объектами для молекулярной динамики, и здесь методы управляемой (неравновесной) динамики оказываются наиболее эффективными. Ниже рассмотрены примеры катион (Na^+) проводящего грамицидинового канала и анион (Cl^-) проводящего канала рецептора глицина.

Динамика грамицидинового канала. Грамицидин А - природный антибиотик, активная форма которого является димером. При встраивании в мембрану он образует канал, проводящий протоны и одновалентные катионы по градиенту концентраций, что вызывает понижение мембранного потенциала покоя и сопротивления мембраны [31–33]. Известны две конформации грамицидинового канала в мембране: спиральный димер и двойная спираль [34], которые различаются по стабильности и функциональной активности [35]. Рассматривалась полноатомная структура комплекса фосфолипидного бислоя ПОФХ с грамицидиновым каналом, состоящим из двух молекул грамицидина А в конформации спирального димера. Расчеты проводились с помощью пакета молекулярной динамики Gromacs 3.1.4 (потенциальное поле Gromos-96) [36]. Использовалась стохастическая динамика с параметром 0,02 пс, периодические граничные условия, баростат Берендсена (вдоль оси нормали мембраны поддерживалось давление 1 бар,

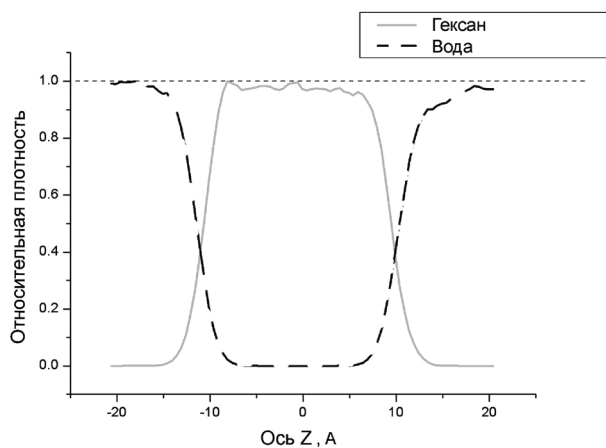


Рис. 7. Профили плотности воды и гексана вдоль оси, перпендикулярной разделу фаз, нормированные к единице, в системе вода/гексан

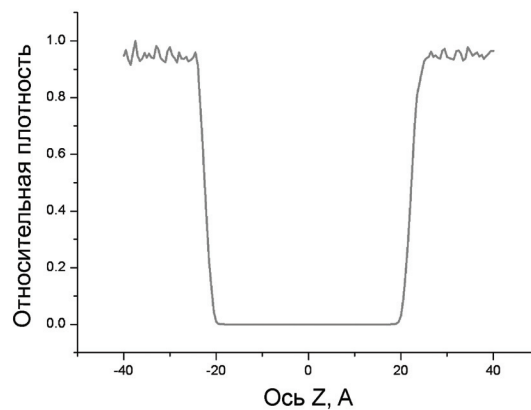


Рис. 9. Профиль плотности воды вдоль оси, перпендикулярной отталкивающей стенке, в системе вода/вакуум

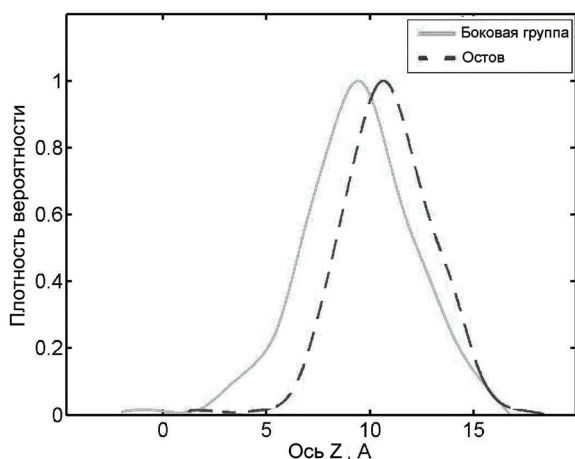


Рис. 8. Графики плотности вероятности для положений центров масс остова и боковой группы аминокислотного остатка в системе вода/гексан

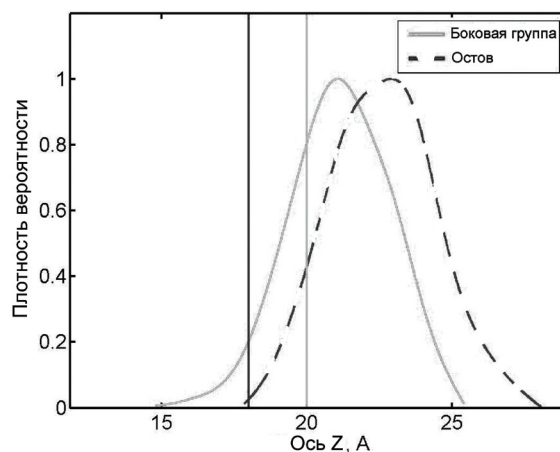


Рис. 10. Графики плотности вероятности для положений центров масс остова и боковой группы аминокислотного остатка в системе вода/вакуум

перпендикулярно нормали -260 бар, коэффициент баростатирования 10 пс), модель воды TIP3P, $T = 300$ К, $\epsilon = 2$. Катион натрия помещался в водную среду на расстоянии 5 над порой канала. Вокруг катиона достаточно быстро формировалась гидратная оболочка из 6 молекул воды. К иону натрия прикладывалось ускорение 25 нм/пс^2 вдоль оси нормали мембраны (эквивалентно силе $13 \text{ ккал/моль} \cdot \text{с}^{-1}$).

Катион натрия при вхождении в полость поры раздвигает атомы полярных головок липидов и молекул грамицидина (рис. 11). На этой стадии происходит замена 6 молекул гидратной оболочки иона натрия в водной среде на 2 молекулы воды в поре канала. Уменьшение скорости движения иона соответствует локальным энергетическим минимумам, связанным с притяжением катиона к отрицательно заряженным

атомам кислорода и отталкиванием от положительно заряженных атомов водорода.

Подвижность или эффективный коэффициент диффузии единичного катиона в канале можно оценить исходя из модели вязкого трения:

$$D(z) = \frac{kT}{\gamma}, \gamma = \frac{F}{v},$$

где $D(z)$ — коэффициент диффузии по оси z , γ — коэффициент трения, F — приложенная внешняя сила, v — средняя скорости прохождения иона через канал.

Эта оценка дает для коэффициента диффузии в грамицидиновом канале значение $0,6 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$, что более чем в 2 раза меньше значения коэффициента диффузии иона в воде TIP3P, полученного тем же методом ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$). Отметим, что расчеты, проведенные для

катиона натрия в канале ацетилхолинового рецептора и аниона хлора в канале глицинового рецептора, дают для коэффициентов диффузии близкие значения.

Динамика канала глицинового рецептора.

Глициновые рецепторы относятся к семейству лиганд-зависимых ионных каналов и наряду с рецепторами -аминомасляной кислоты ГАМКА и ГАМКС обеспечивают быструю нейротрансдукцию в различных отделах ЦНС, формируя тормозные синапсы. Все лиганд-зависимые рецепторы имеют пентамерную структуру [37]. Каждая субъединица рецептора (рис. 12а) состоит из четырех -спиралей и содержит четыре трансмембранных домена ТМ1-ТМ4 [38]. Активация глициновых рецепторов, приводящая к открытию хлорных каналов, происходит при связывании глицина, при этом считается, что основную роль в миграции ионов играют домены ТМ2, непосредственно формирующие пору канала (рис.12б) и таким образом являющиеся наиболее важным компо-

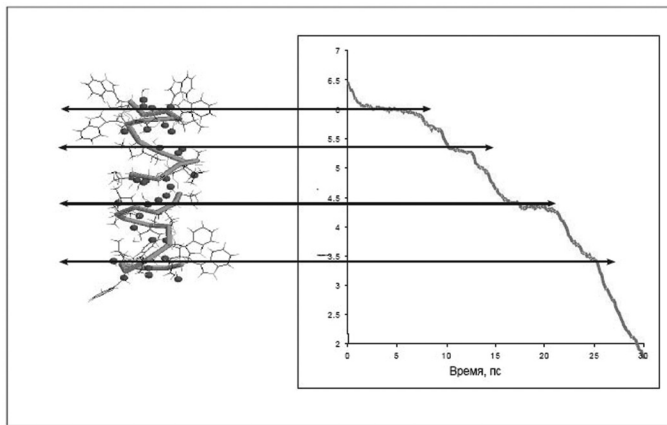


Рис. 11. Динамика прохождения иона Na⁺ через пору канала. Показаны области замедления ионного транспорта за счет взаимодействия с областями локализации частично отрицательно заряженных атомов кислорода основной цепи молекул грамицидина А

нентом с точки зрения функциональной активности рецептора [39, 40]. С мутациями в субъединицах глицинового рецептора связаны некоторые патологии, в частности, рефлекс гиперстраха в ответ на неожиданные раздражения [41].

В работе использовалась модель канала, состоящего из пяти -спиралей ТМ2, подтипа 1 (PDB: 1MOT). Для получения функционально-активного канала был разработан специальный алгоритм, позволяющий получить пентамерный канал, исходя из структуры одной субъединицы. При этом субъединицы были повернуты таким образом, чтобы канал был открыт. Для моделирования взаимодействия с мембраной была предложена модель неразветвленного

углеводородного кольца C₁₅₀H₃₀₀ (рис. 13). Для предотвращения схлопывания канала использовалась специальная процедура усиления энергии невалентных взаимодействий между атомами Leu (Gly-Leu-Gly) и наиболее близкими к ним атомам углерода примерно на порядок по сравнению с обычными значениями для таких пар атомов. Расчеты проводились при T = 300 К в столкновительной среде с массой виртуальных частиц 18 а.е.м. и частотой столкновений 55 пс⁻¹. Использовалась полноатомная модель молекулы, силовое поле Amber99. К иону Cl⁻ прикладывалась постоянная сила 5 ккал/моль ·⁻¹ вдоль оси нормали.

На рис. 14 представлена динамика прохождения иона Cl⁻ сквозь пору глицинового рецептора под действием

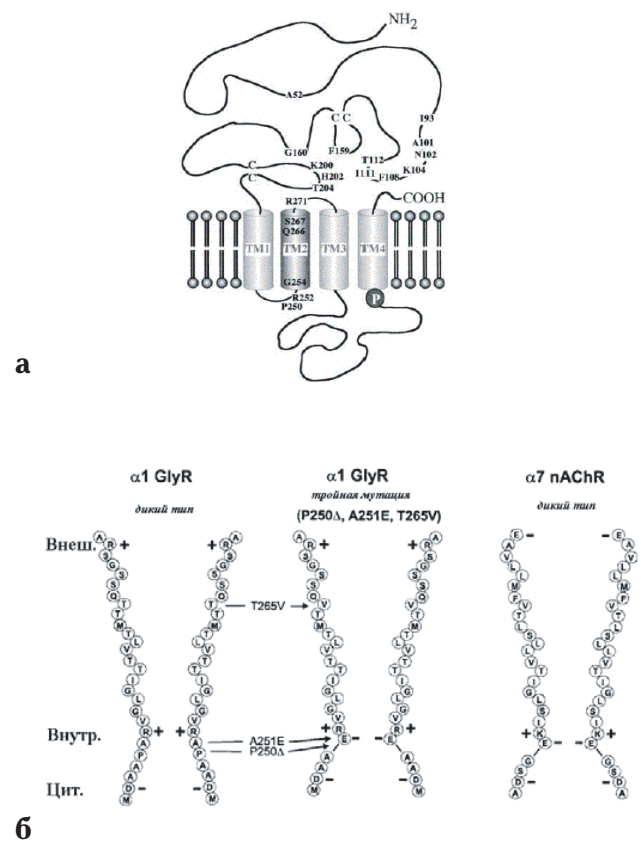


Рис. 12. -субъединица глицинового рецептора. Мембранная топология (а); более темный на рисунке — трансмембранный домен ТМ2, формирующий пору (по [33]). Схематическое представление двух трансмембранных доменов ТМ2 и соответствующих сечений пор гомомерных рецепторов: глицинового рецептора дикого типа и глицинового рецептора с тройной мутацией, из 1-субъединиц, а также никотинового ацетилхолинового рецептора из 7-субъединиц (по [35]) (б)

внешней силы. Как оказалось, в пору глицинового рецептора существует два основных минимума энергии для отрицательных ионов. Оба минимума соответствуют положительным аргининовым кольцам внутри канала

(см. рисунке 126). Значение эффективного коэффициента диффузии иона Cl^- колеблется в пределах $1,38 \cdot 10^{-5}$ – $1,45 \cdot 10^{-6}$ $\text{см}^2/\text{с}$ в различных частях канала. В варианте равновесной динамики выявляется также дополнительный минимум энергии в поре канала, образованный положительно заряженными атомами бокового радикала Met.

Взаимодействие углеродной нанотрубки с фосфолипидным бислоем. Наноструктуры и их комплексы с биологическими макромолекулярными структурами являются новым полем для применения методов неравновесной молекулярной динамики. В работе [42] рассматривался, в частности, процесс спонтанного встраивания модельной нанотрубки в фосфолипидный бислой с использованием крупномодульного (coarse-grain) приближения. Однако до сих пор практически нет публикаций по динамике взаимодействия биомембран с углеродными нанотрубками в полноатомном приближении.

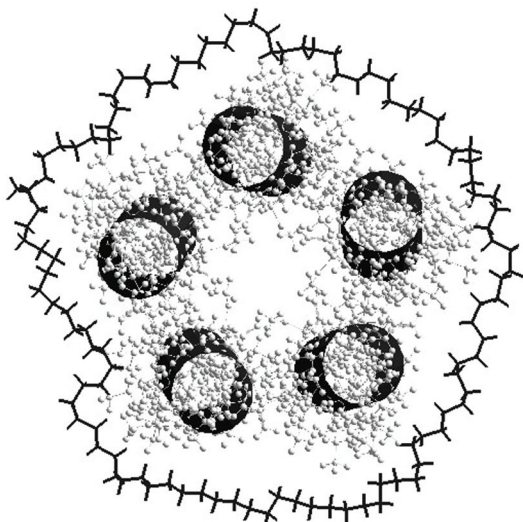


Рис. 13. Канал, стабилизированный углеводородным кольцом

В настоящей работе изучалась динамика проникновения углеродной нанотрубки диаметром 13,5 и длиной 32 через гидратированный бислой ПОФХ под действием внешней силы. Нанотрубка ориентировалась нормально к плоскости мембраны. К атомам углеродной нанотрубки равномерно прилагалась сила в направлении нормали. Результирующее давление составляло порядка $7 \cdot 10^4$ бар (для сравнения отметим, что давление детонации тротила существенно выше и порядка $2 \cdot 10^5$ бар). При таком давлении нанотрубка проходит через фосфолипидный бислой за время порядка 200 пс (рис. 15), выталкивая из бислоя две молекулы фосфолипида.

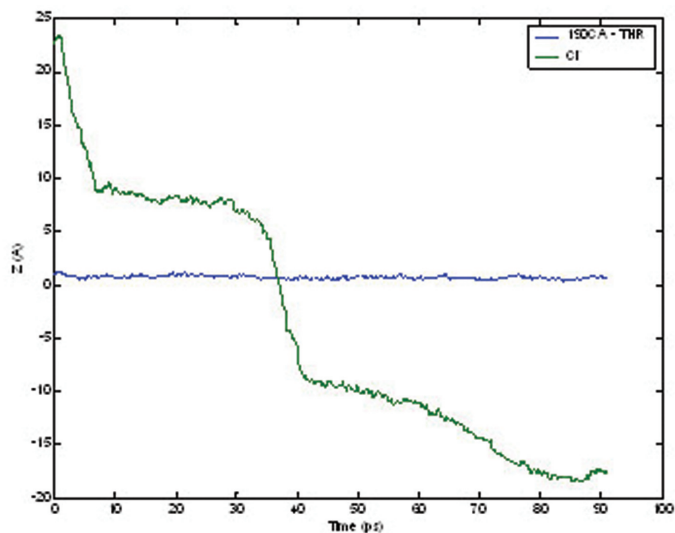


Рис. 14. Динамика прохождения иона Cl^- через пору канала. Внешняя сила 5 ккал/моль. Для сравнения показана динамика атома углерода основной цепи одной из субъединиц

Взаимодействие полипептида с углеродной нанотрубкой. Методы молекулярной динамики позволяют прогнозировать поведение новых молекулярных систем, перспективность использования которых экспериментально пока не изучалась. Одним из важнейших направлений исследований в этой области является взаимодействие нанотрубок с биологическими молекулами. Уже в ближайшее время подобные системы могут вызвать и большой практический интерес в связи с проблемой селективной доставки лекарств в клетки. Так, в работе [43] проводится расчет проникновения однонитчатого ДНК-олигонуклеотида в нанотрубку в водной среде. Авторы работы [44] рассматривают прохождение РНК под действием приложенной силы через отверстия в коротких нанотрубках, организованных в монослой. В [45] изучалась адсорбция амилозы на нанотрубке в водной среде и ее проникновение внутрь.

В наших численных экспериментах обнаружено явление самосборки полиаланина и углеродной нанотрубки с образованием структуры в виде спирали полиаланина внутри нанотрубки.

При 300 К за время порядка 200 пс происходит адсорбция (рис. 16) полипептида в альфа-спиральной конформации на поверхности нанотрубки (исходное положение пептида на расстоянии 30 от нанотрубки).

Дальнейшая эволюция комплекса может быть прослежена с использованием метода ускорения надбарьерных переходов путем повышения температуры. При этом наблюдается процесс спонтанного проникновения полиаланина в нанотрубку. Несмотря на то что вы-

игрыш в энергии в этом случае значительно больше, чем при адсорбции пептида на внешней поверхности, переход пептида из состояния снаружи нанотрубки в состояние внутри нанотрубки связан с преодолением определенного энергетического барьера, т.к. энергия адсорбции полипептида уменьшается при смещении пептида к краю нанотрубки.

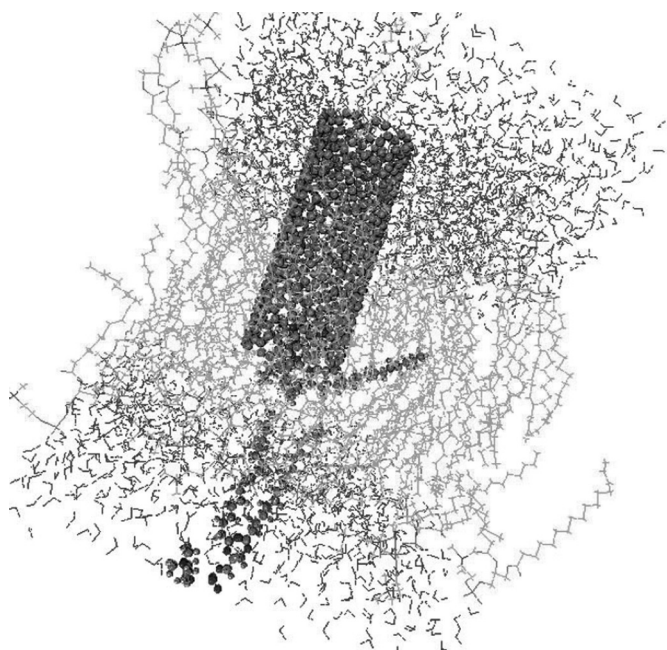


Рис.15. Углеродная нанотрубка протыкает фосфолипидный бислой. Молекулы ПОФХ, выталкиваемые из слоя, изображены более подробно

На рисунке 17 приведена детальная картина акта самосборки обсуждаемой структуры. Находясь на внешней стенке нанотрубки, пептид подавляющую часть времени проводит около ее центральной части. Изредка один из концов пептида оказывается около отверстия. Вследствие флуктуаций происходит перемещение пептида вдоль нанотрубки на такое расстояние, когда большая часть атомов не соприкасается с поверхностью трубки. Затем конец пептида притягивается к отверстию, после чего весь пептид быстро проникает в нанотрубку. Эта стадия при 1000 К занимает 130 пс. При 2000 К самосборка идет по такому же механизму, однако при повышении температуры процесс становится более обратимым, и за счет этого время от начала до завершения акта встраивания увеличивается до 300 пс.

Время формирования активной для самосборки конфигурации при 1000 К составило 4,64 нс, при 2000 К - 0,655 нс. Это дает оценку величины энергии активации порядка 7,8 ккал/моль. Ожидаемое время самосборки при 300 К составляет в этом случае 43

мкс. Отметим, что рассматриваемый процесс моделировался в вакууме. В органических растворителях энергия активации самосборки должна быть ниже за счет влияния энергии сольватации полипептида и нанотрубки.

Динамика функциональных наноструктур.
Наношприц. Рассмотренный выше комплекс полипептида и нанотрубки с закрытым концом может быть, в принципе, использован для доставки пептида (или иной молекулы) через биологическую мембра-

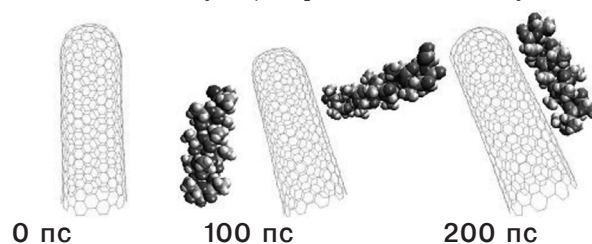


Рис. 16. Последовательные стадии прилипания полиаланина к внешней поверхности нанотрубки

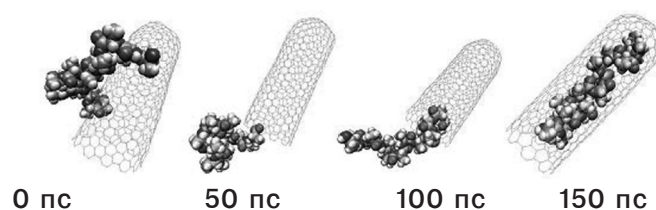


Рис. 17. Последовательные стадии самосборки комплекса пептида и нанотрубки при 1000 К

ну в клетку или отдельный компартмент. Зачастую требуется селективная доставка низкомолекулярных синтетических молекул, которые имитируют работу природных биологических макромолекул и имеют терапевтический потенциал, который сочетается с практичностью при широкомасштабном производстве биофармацевтических веществ. Эти конструкции могут быть также использованы и для изучения механизмов молекулярного распознавания [46].

Отметим, что создание таких систем может породить в ближайшее время новое направление — нанофармакологию. Молекулярная динамика в данном случае выступает как инструмент проектирования функциональной молекулярной конструкции, позволяя определить необходимые параметры устройства. В качестве примера нами был смоделирован наношприц, использующий акт выталкивания пептида из нанотрубки в бислойную мембрану и в воду.

В качестве действующего агента, выталкивающего полиаланин из нанотрубки, брались восемь расширяющихся ван-дер-ваальсовых сфер. Увеличение

радиуса сфер происходило со скоростями 0,25 и 0,5/пс (время расширения 26 или 13 пс, соответственно) до значений радиуса порядка радиуса нанотрубки. Это создавало практически «нановзрыв, и система срабатывала как «нанопушка. На рисунке 18 и 19 приведен сценарий выброса пептида при таких экстремальных параметрах «выстрела» с максимумом давления в нанотрубке порядка 10^5 бар. В момент «выстрела» нанотрубка несколько

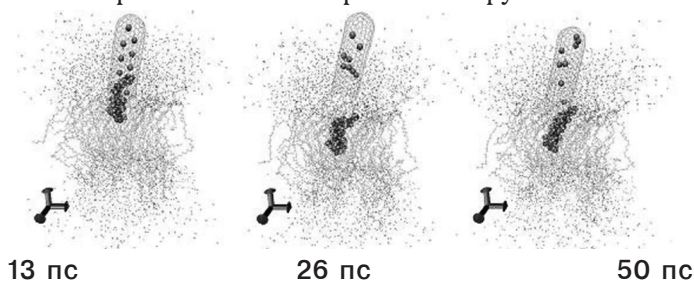


Рис. 18. Последовательные стадии выталкивания пептида в мембрану

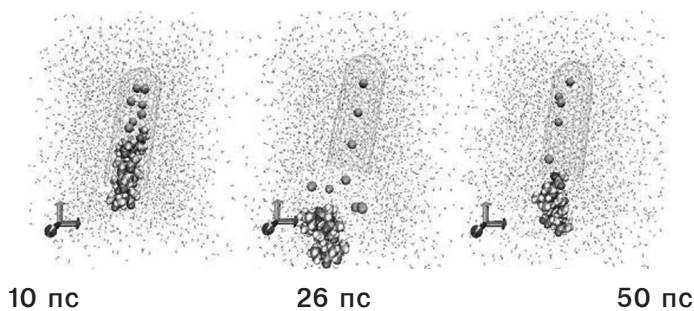


Рис. 19. Последовательные стадии выталкивания пептида в воду

деформируется, но эти деформации не выходят за пределы ее прочности. По окончании процесса выталкивания пептида нанотрубка полностью восстанавливает первоначальную конформацию за время порядка 3 пс.

Полиаланин испытывает конформационные изменения в ходе рассматриваемого процесса. Начальная спиральная конформация наиболее сильно деформируется при выбросе полипептида в вакуум и менее всего - в мембрану. По-видимому, среда играет в этом процессе демпфирующую и структурирующую роль. На рис. 20 видно также, что при уменьшении скорости «нановзрыва» конформационные изменения полипептида обычно уменьшаются. Небольшое уширение распределения по конформациям при выбросе полиаланина в воду может быть связано с дополнительным напряжением, возникающим при входе гидрофобной молекулы в водную среду.

Фолдинг модельных полимерных структур. Методами молекулярной динамики исследовано сворачивание (фолдинг) относительно простой модели полимера. Закономерности формирования пространственной

структуры полимеров и биополимеров в настоящее время остаются малоизученными, несмотря на их важнейшую роль при функционировании биологических систем [47, 48]. Отметим, что специфическое сворачивание характерно даже для обычной свободно-сочлененной цепочки с включенными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между звеньями [49–51]. Проводились вычислительные эксперименты по сворачиванию гомополимерной цепочки [52]. Взаимодействия соседних атомов определялось потенциалом валентной связи. Взаимодействия атомов (звеньев цепи), разделенных двумя и более валентными связями, описывалось потенциалом Леннард-Джонса. В качестве возникающих структур наблюдались всевозможные слои, правые и левые спирали, двойные спирали, шпильки, а также структуры, состоящие из свернутых петель. В системе из двух взаимодействующих полимерных цепей могут образовываться двойные спирали, причем то, каким образом цепи будут взаимно ориентированы в конечной структуре, также зависит от начальной конфигурации системы [52].

Рассматривалась также динамика сворачивания при взаимодействии со вспомогательными структурами, которые позволяли формировать строго определенные упорядоченные структуры независимо от начальной конфигурации полимера. Следует отметить, что в биологических системах молекулярные комплексы, способствующие специфическому сворачиванию, часто имеют форму трубки (шаперонины группы Hsp60, мембранные каналы) [53–55].

Был рассмотрен рефолдинг полимерной глобулы в спираль при специфическом взаимодействии полимера с модельной нанотрубкой. Полимерная цепочка, проходя через нанотрубку, разворачивается, а затем формирует новую упорядоченную структуру (рис. 21). Модельное устройство функционирует при определенном строении поверхности потенциальной энергии для взаимодействия нанотрубки с цепочкой. Устройство этой поверхности иллюстрируется сечениями, изображенными на рисунке 22.

Энергетическая поверхность системы в этом случае образует своего рода ущелье, которое расширяется и становится не таким глубоким ближе к выходу из нанотрубки.

Сходство ряда конечных упорядоченных структур с основными элементами вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот в рассмотренных простых примерах обусловлено, по-видимому, тем, что существенная роль в формировании конечной структуры макромолекул принадлежит грубому рельефу энергетической поверхности, который определяется соотношениями между геометрическими параметрами различных типов взаимодействий.

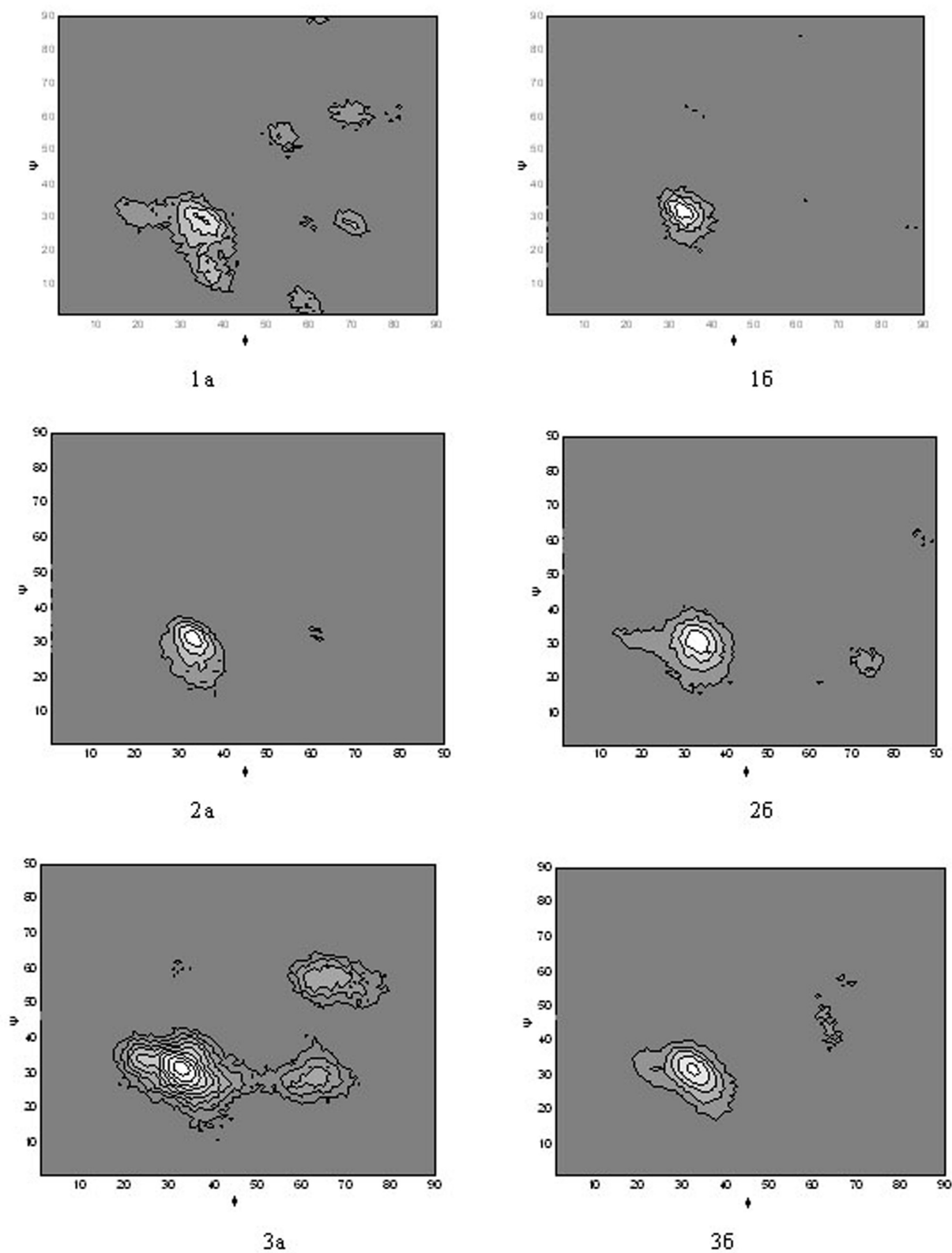


Рис. 20. Сечения Пуанкаре для полиаланина по углам ψ и ϕ основной цепи при выталкивании в мембрану (1), воду (2) и вакуум (3) с расширением выталкивающих сфер за времена 13 (а) и 26 пс (б).

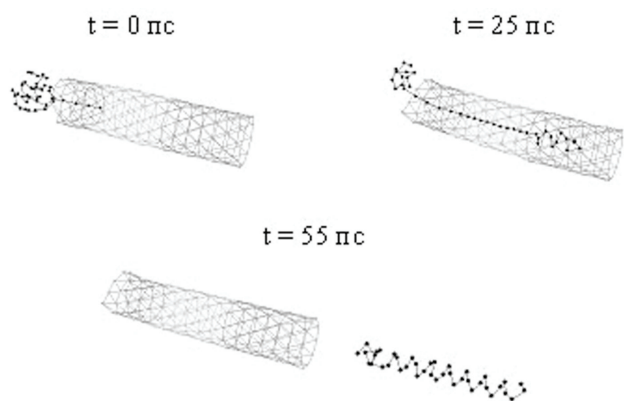


Рис. 21. Рефолдинг полимерной цепочки при взаимодействии с модельной нанотрубкой

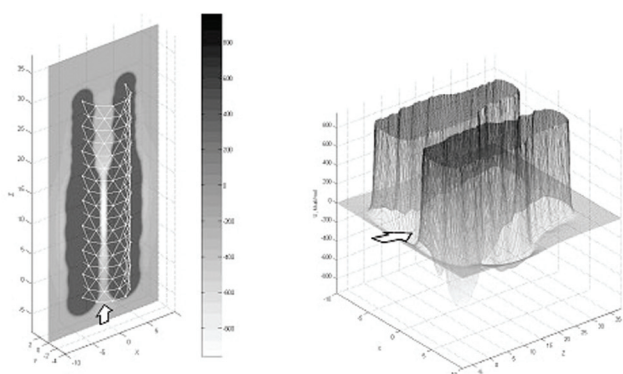


Рис. 22. Трехмерное сечение гиперповерхности потенциальной энергии взаимодействия нанотрубки с цепочкой, проходящее через ось нанотрубки

Заключение. Неравновесная (или управляемая) молекулярная динамика оказывается полезным инструментом для получения детальной и экспериментально трудно доступной информации о структуре, динамических и кинетических свойствах неоднородных и анизотропных систем типа биомембран, биополимеров, комплексов нанотрубок с биополимерами и в других, в том числе и достаточно экзотических в настоящее время, случаях. Здесь очень важны два момента. Во-первых, в рамках этого метода мы принципиально отказываемся от термодинамически равновесных траекторий. То есть не требуем достижения системой полного равновесия и отказываемся от изучения процессов только в рамках анализа равновесных термодинамических флуктуаций. Для систем содержащих более 1000 частиц такой способ мало продуктивен. Во-вторых, в рамках развиваемого неравновесного подхода осуществляется контроль над локальным равновесием по наиболее значимым параметрам (флуктуации объема, давления, температуры). Далее, на этом фоне разыгрывается сценарий молекулярного процесса, стимулированного внешним воздействием

или специальным граничным условием. Имеющиеся данные показывают, что данный метод оказывается весьма полезным для прогноза структурных и функциональных свойств широкого класса молекулярных с линейным масштабом до нескольких нанометров.

Благодарность. Авторы признательны Российскому фонду фундаментальных исследований (грант 04-04-49645), Минобрнауки РФ, Роснауке и Правительству Москвы за финансовую поддержку проводимых научных исследований.

Литература.

1. Gao H. Modelling strategies for nano- and biomaterials. In European white book on fundamental research in materials science. // Van der Woorde M.H. et al. (eds.). Max Planck Gesellschaft. — 2001. — P. 144–148.
2. Frenkel D., Smit B. Understanding molecular simulation: from algorithms to applications, 2nd ed. — Academic Press, San Diego, 2002.
3. Шайтан К.В., Терешкина К.Б. Молекулярная динамика белков и пептидов (методическое пособие) — М.: Ойкос, 2004. — 103 с.
4. Park S., Schulten K. // J. Chem. Phys. — 2004. — Vol. 120. — P. 5946–5961.
5. Chizmadzhev Y.A. // Bioelectrochem. — 2004. — Vol. 63. — P. 129–136.
6. Турлей Е.В., Шайтан К.В., Балабаев Н.К. // Биол. мембраны. — В печати.
7. Турлей Е.В., Шайтан К.В., Балабаев Н.К. // Биофизика. — В печати.
8. Rabinovich A.L., Balabaev N.K., Alinchenko M.G., Voloshin V.P., Medvedev N.N., Jedlovsky P. // J. Chem. Phys. — 2005. — Vol. 122. — P. 84906.
9. Heller H., Schaefer M., Schulten K. // J. Phys. Chem. — 1993. — Vol. 97. — P. 8343–8360.
10. Pabst G., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P. // Phys. Rev. — E. — 2000. — Vol. 62. — P. 4000–4009.
11. Israilewitz B., Gao M., Schulten K. // Curr. Opin. Struct. Biol. — 2001. — Vol. 11. — P. 224–230.
12. Smaby J.M., Mornsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E. // Biophys. J. — 1997. — Vol. 73. — P. 1492–1505.
13. Hyslop P.A., Morel B., Sauerheber R.D. // Biochem. — 1990. — Vol. 29. — P. 1025–1038.
14. Lemak A.S., Balabaev N.K. // Mol. Simul. — 1995. — Vol. 15. — P. 223–231.
15. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. // J. Comp. Chem. — 2000. — Vol. 21. — P. 1049–1074.
16. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // J. Chem. Phys. — 1984. — Vol. 81. — P. 3684–3690.

17. Nagle J.F., Zhang R., Tristram-Nagle S., Sun W.J., Petrache H.I., Suter R.M. // *Biophys. J.* — 1996. — Vol. 70. — P. 1419–1431.
18. Wiener M.C., White S.H. // *Biophys. J.* — 1992. — Vol. 61. — P. 434–447.
19. Reiter G., Siam M., Falkenhagen D., Gollneritsch W., Baurecht D., Fringeli U.P. // *Langmuir.* — 2002. — Vol. 18. — P. 5761–5771.
20. Seelig A., Seelig J. // *Biochem.* — 1977. — Vol. 16. — P. 45–50.
21. Seelig J., Seelig A. // *Q. Rev. Biophys.* — 1980. — Vol. 13. — P. 19–61.
22. Sackmann E. In *Handbook of Biological Physics*, Vol. 1, Structure and Dynamics of Membranes. — Eds. Lipowsky R. and Sackmann E. Elsevier Sci. Pubs. B.V., Amsterdam, 1995. — P. 213–304.
23. Pfeiffer W., Henkel T., Sackmann E., Knoll W., Richter D. // *Europhys. Lett.* — 1989. — Vol. 8. — P. 201–206.
24. Filippov A., Oradd G., Lindblom G. // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 84. — P. 3079–3086.
25. Essmann U., Berkowitz M.L. // *Biophys. J.* — 1999. — Vol. 76. — P. 2081–2089.
26. R g T., Murzyn K., Pasenkiewicz-Gierula M. // *Acta Biochim. Polon.* — 2003. — Vol. 53. — P. 789–798.
27. Kyte J., Doolittle R.F. // *J. Mol. Biol.* — 1982. — Vol. 157. — P. 105–142.
28. Hopp T.P., and Woods K.R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1981. — Vol. 78. — P. 3824–3828.
29. Sotomatsu-Niwa T., Ogino A. // *J. Mol. Struct. (Theochem).* — 1997. — Vol. 392 — P. 43–54.
30. Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed. — W.H. Freeman & Co., NY, 1995. — Part I. — Chapter 1.
31. Doebler J.A. // *Cell Biol. Toxicol.* — 1999. — Vol. 15. — P. 279–289.
32. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // *Biophys. J.* — 2002. — Vol. 82. — P. 865–873.
33. Williams R.J.P. // *J. Theor. Biol.* — 2002. — Vol. 219. — P. 389–396.
34. Pascal S.M., Cross T.A. // *J. Mol. Biol.* — 1994. — V. 241. — P. 431–439.
35. Groot B.L., Tieleman D.P., Pohl P., Grubmuller H. // *Biophys. J.* — 2002. — Vol. 82. — P. 2934–2942.
36. Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. // *J. Mol. Mod.* — 2001. — Vol. 7. — P. 306–317.
37. Langosch D., Thomas L., and Betz H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1988. — Vol. 85. — P. 7394–7398.
38. Legendre P. // *Cell. Mol. Life Sciences.* — 2001. — Vol. 58, — P.760–793.
39. Yushmanov V.E., Mandal P.K., Liu Z., Tang P., Xu Y. // *Biochem.* — 2003. — Vol. 42 — P. 3989–3995.
40. Keramidis A., Moorhouse A.J., French C.R., Schofield P.R., Barry P.H. // *Biophys. J.* — 2000. — Vol. 79 — P. 247–259.
41. Jentsch T. J., V. Stein, F. Weinreich, Zdebik A. A. // *Physiol. Rev.* — 2002. — Vol. 82 — P. 503–568.
42. C. F. Lopez, S. O. Nielsen, P. B. Moore, M. L. Klein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 4431–4434.
43. Gao H., Kong Y., Cui D., Ozkan C. S. // *Nano Letters.* — 2003. — Vol. 3. — P. 471–473.
44. Yeh I.-C., Hummer G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 12177–12182.
45. Xie Y.H., Soh A.K. // *Materials Letters.* — 2005. — Vol. 59. — P. 971–975.
46. Li R., Dowd V., Stewart D.J., Burton S.J., Lowe C.R. Design, synthesis, and application of a Protein A mimetic. — *Nat. Biotech.*, 1998. — Vol. 16. — P. 190–195.
47. Fersht A. *Enzyme structure and mechanism*, 2nd ed. — W.H. Freeman & Co., NY, 1985.
48. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка.* — М.: Книжный дом “Университет», 2002. — 376 с.
49. Khalatur P.G., Novikov V.V., Khokhlov A.R. // *Phys. Rev. — E.* — 2003. — Vol. 67. — P. 051901.
50. Ivanov V.A., Chertovich A.V., Lazutin A.A., Shusharina N.P., Khalatur P.G., Khokhlov A.R. // *Macromol. Symp.* — 1999. — Vol. 146. — P. 259.
51. Chertovich A.V., Ivanov V.A., Zavin B.G., Khokhlov A.R. // *Macromol. Theory Simul.* — 2002. — Vol. 11. — P. 751.
52. Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н., Терешкина К.Б., Левцова О.В., Федик И.В., Шайтан А.К., Кирпичников М.П. // *Хим. физика.* — В печати.
53. Koronakis V. // *FEBS Lett.* 2003. — Vol. 555. — P. 66–71.
54. Levitt M. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1997. — Vol. 66. — P. 549–579.
55. Miranker A.D., Dobson C.M. // *Curr. Opin. Struc. Biol.* — 1996. — Vol. 6. — P. 31–42.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПРОФИЛЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

О.Ф. ГОРДЕЕВА*, Н.Ю. КРАСНИКОВА, А.В. ЛАРИОНОВА

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Эмбриональные стволовые клетки млекопитающих являются постоянными клеточными линиями с высокой пролиферативной активностью, сохраняющими плюрипотентный фенотип и нормальный кариотип в течение длительного периода культивирования *in vitro*. Линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) представляют собой ранние эмбриональные клетки и могут быть использованы в качестве новой эффективной клеточной системы для фармакологических исследований, для тестирования тератогенности и эмбриотоксичности новых препаратов и биологически активных веществ. Разрабатываемые на их основе клеточные тест-системы обладают уникальными преимуществами, которые отсутствуют у используемых клеточных моделей. ЭСК, с одной стороны, являются нетрансформированными клетками и более адекватно отражают метаболизм нормальных клеток, а с другой стороны, представляют достаточно однородную, постоянную клеточную популяцию по сравнению с первичными клеточными культурами, получаемыми из тканей человека, что дает более точную и воспроизводимую оценку фармакологических эффектов. С помощью одной линии ЭСК можно получить в культуре различные типы соматических, а в перспективе и половых клеток, и оценить действие новых субстанций на всем спектре клеток различных млекопитающих. И, наконец, линии ЭСК человека представляют собой аналоги ранних эмбриональных клеток, что делает их уникальными для тестирования эмбриотоксичности и других аномалий раннего развития человека.

***Автор для переписки:**

Гордеева Ольга Федоровна, сотрудница Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
117808, Москва, ул. Вавилова, 26;
Тел.: 135-87-80; 135-82-83,
E-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Однако, несмотря на очевидные преимущества этих линий, разработки тест-систем на их основе пока находятся на начальном этапе. Основным ограничением является отсутствие универсальной культуральной системы для поддержания плюрипотентного статуса ЭСК и разработанных стандартных протоколов для получения определенного типа клеток с высокой степенью чистоты популяции. Другой не менее важный аспект — выбор наиболее значимых клеточных параметров для ЭСК и разработка методов оценки их изменений.

На данный момент исследователи, работающие с линиями ЭСК в отечественных и зарубежных лабораториях, пришли к выводу о необходимости регулярного цитогенетического мониторинга, а также контроля эпигенетического статуса ЭСК, в частности, изменения профиля метилирования импринтированных генов (Rugg-Gunn et al, 2005; Mitalipova et al., 2005). В особенности, это необходимо учитывать при действии различных веществ, стимулирующих пролиферативную активность. Таким образом, хромосомный анализ и эпигенетический контроль обязательно будут включены как существенные параметры при создании тест-системы.

При изучении эмбриотоксичности веществ стандартные методы оценки цитотоксичности и метаболической активности предполагается дополнить тестированием отложенных эффектов, связанных с изменением плюрипотентного статуса ЭСК. Для оценки этого параметра необходимо исследование экспрессионного портрета используемых линий ЭСК с помощью современных высокоэффективных методов молекулярно-генетического анализа.

Проведенные в последние несколько лет широкомасштабные исследования транскрипционных профилей недифференцированных ЭСК различных линий и дифференцирующихся в различных направле-

ниях их клеточных потомков представили огромный экспериментальный материал для анализа фундаментальных механизмов плюрипотентного статуса, процессов коммитирования и дифференцировки клеток в различных направлениях, а также модулирующих эффектов культуральной среды для регуляции этих процессов. Для характеристики профилей генной экспрессии в стволовых клетках используют разнообразные молекулярные технологии: серийный анализ генной экспрессии SAGE (Velculescu et al., 2000; Anisimov et al., 2002), анализ репрезентативных различий RDA (Lisitsyn, Wigler, 1993), кДНК и олигонуклеотидные микрочипы (Pietu et al, 1996; Ramalo-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002; Fortunel et al., 2003). Каждый метод обладает определенными преимуществами, технология кДНК и олигонуклеотидных микрочипов позволяет исследовать экспрессию нескольких тысяч генов и сравнивать молекулярные портреты различных клеточных популяций. С помощью других методов были выявлены гены высокоспецифичные для гемопоэтических, мезенхимных, нервных стволовых клеток, а также различных линий ЭСК. На основании полученных результатов фундаментальных исследований различными компаниями разработаны и продолжают создаваться новые специализированные транскрипционные микрочипы для детекции экспрессии различных регуляторов и для идентификации компонентов различных сигнальных путей в стволовых клетках. Наиболее популярны кДНК микрочипы GeArrays компании SuperArrays Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA) и Atlas Array jn BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA), а также олигонуклеотидные микрочипы GeneChip, в которых используется двойное флуоресцентное мечение, известной компании Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). Транскриптомные микрочипы позволяют проводить количественную оценку изменения уровней генной экспрессии, например, в недифференцированных ЭСК и на начальных, стадиях их дифференцировки, когда такие изменения являются наиболее существенными.

В одной из первых работ (Kelly, Rizzino, 2000) по исследованию генной экспрессии в ЭСК мыши было выявлено из 588 генов 292, которые активны на начальных стадиях дифференцировки, причем снижение экспрессии более чем в 2,5 раза было отмечено для 18 генов. Другая группа исследователей (Tanaka et al, 2000; Tanaka et al, 2002) сравнивая транскрипционные профили ЭСК и клеток трофоб-

ласта (ранних внезародышевых клеток) выявила соответственно 124 и 94 гена, которые специфически экспрессируются в каждом из этих типов клеток, причем в обеих популяциях экспрессировался 51 ген из них. На мышинных линиях ЭСК были установлено, что высоко специфическими для ЭСК являются транскрипционные факторы Oct3/4, Rex1, Zfp57, Dnmt3A, Sox2, регуляторы клеточного цикла Cdc10, cyclin B1, ростовые факторы и их рецепторы LIF, FGF4, FGF13 и специфический регулятор Esg-1(Dppa5), паттерн экспрессии которого сходен с Oct4.

С целью установления молекулярных механизмов, контролирующих процессы самообновления стволовых клеток в нескольких сравнительных исследованиях транскрипционных профилей гемопоэтических стволовых клеток, нейтральных стволовых клеток и ЭСК мыши были получены близкие данные: во всех трех популяциях была выявлена экспрессия 283 гена (Ivanova et al., 2002) и 216 генов (Ramalo-Santos et al., 2002), и также 385 общих экспрессирующихся генов в нейтральных стволовых клетках, клетках-предшественниках сетчатки и ЭСК (Fortunel et al., 2003). Наиболее интересным выводом из этих работ является тот факт, что JAK/STAT и TGF β регуляторные пути активны во всех исследованных типах стволовых клеток, что указывает на существование общих регуляторных программ самообновления и коммитирования. Однако различия при анализе полученных разными авторами экспериментальных данных все же ставят вопросы об идентичности клеточных популяций, используемых в этих работах, и методических различиях. Показательной в этом смысле является работа по сравнительному анализу транскрипционных профилей нейтральных и эмбриональных стволовых клеток, которые предварительно были отсортированы по экспрессии введенной конструкции с геном GFP и регуляторной последовательностью транскрипционного фактора Sox2, который экспрессируется в этих клетках (D'Amour, Gage, 2003). Используя такой подход, авторами было показано разительное различие в профилях экспрессии этих двух популяций.

В большинстве работ, выполненных на различных линиях ЭСК человека, была использована та же стратегия исследований, что и для мышинных линий. Эти работы были направлены на определение молекулярных механизмов плюрипотентного статуса, выявление видовых различий в этих механизмах при сравнении с мышинными ЭСК, а также на понимание закономерностей начальных событий диффе-

ренцировки ЭСК. Используя олигонуклеотидные микрочипы Affymetrix, Sato с соавторами идентифицировали 918 генов в ЭСК линии H1, которые ответственны за регуляцию плюрипотентного статуса в этих клетках, и установили их принадлежность к регуляторным и сигнальным путям, контролируемым факторами FGF, TGF /BMP и Wnt (Sato et al., 2003). При сравнении профиля этой линии ЭСК человека с мышиными ЭСК было выявлено сходство по 227 генам, включая основные регуляторы плюрипотентности Oct4, Nanog, LeftyB, TDGF1 и др. Эти данные свидетельствуют о консервативности фундаментальных механизмов поддержания плюрипотентности у различных видов. Однако известно и о существовании различий, так как регуляторный путь LIF/JAK/STAT путь не является критическим для поддержания плюрипотентности ЭСК человека, но активен в ЭСК мыши.

Следующим шагом в исследованиях плюрипотентности ЭСК стали сравнительные анализы транскрипционных профилей шести линий ЭСК человека GE01, GE07, GE09, BG01, BG02, TE06 (Bhattacharia et al., 2004). Авторы использовали собственные разработанные олигонуклеотидные микрочипы для детекции по 16 659 различных транскриптов, предположительно идентифицирующей 2121 протеин. В этой работе был установлен набор из 92 генов, которые экспрессировались на высоком уровне, во всех шести линиях. Важно отметить, что в этой работе использовались и другие методы анализа (RT-PCR, направленные кДНК микрочипы, иммуноцитохимия) для подтверждения получаемых данных. Помимо генов, которые высокоспецифичны для плюрипотентных клеток (OCT4, NANOG, GDF3), во всех линиях была выявлена экспрессия LEFTY B, TDGF1, PITX2, GTCM-1, CRABP1,2, SET, cyclin A, B1, CDC20 и др., однако гены SOX2, DNMT3B, ACVR2B экспрессировались на разных уровнях в этих линиях, причем только в четырех экспрессия их была сходна. Авторы отметили, что для определения экспрессии высокоспецифических для ЭСК генов важную роль играет минимальная гетерогенность клеточной популяции, используемой для анализа, в то время как условия культивирования, по их мнению, на экспрессию ключевых генов не оказывают существенного влияния (в работе использовали линии, растущие и в присутствии, и в отсутствие фидерных клеток).

Другая группа исследователей из Универси-

тета штата Джорджии (Rao et al., 2004; Calhoun et al., 2004), сравнив экспрессионные профили двух линий ЭСК человека BG01 и H1, а также профили ЭСК линии BG01, растущих в различных по составу культуральных средах, пришла к выводу, что из 133 генов, идентифицированных ими во всех трех исследованных клеточных популяциях, уровни экспрессии различаются для некоторых из них. Так, например, при использовании кондиционированной среды MEDII, уровень экспрессии генов NODAL/TDGF1 пути значительно повышается, при этом экспрессия OCT4, NANOG, SSEA-4 не изменяется. Эти данные согласуются с другой работой, в которой исследовали влияние условий культивирования с использованием фетальной сыворотки или ее заменителя на ЭСК человека и была установлена дифференциальная экспрессия 1417 генов (Skottman et al., 2005).

Масштабные исследования для получения транскриптомной характеристики сигнальных путей в плюрипотентных клетках были выполнены на трех линиях ЭСК человека H1, H7 и H9 с использованием микрочипов включавших 148453 экспрессирующихся последовательности (EST) (Brandenberger et al., 2004). При сравнении профилей экспрессии недифференцированных ЭСК, эмбрионидных тел и дифференцирующихся из этих линий ЭСК нейральных предшественников и предшественников гепатоцитов было обнаружено 32 000 EST в ЭСК; в недифференцированных ЭСК увеличение уровня экспрессии было выявлено для 532 генов, а снижение для 140 генов по сравнению с дифференцирующимися популяциями. Особенностью данного исследования стал подход, сфокусированный на изучении определенных сигнальных путей, а также выявлении членов семейств различных факторов роста. В работе был осуществлен детальный анализ экспрессии генов, вовлеченных в сигнальные пути LIF/IL6ST, FGF, WNT и NODAL.

Экспрессия генов, ассоциированных с LIF/IL6ST, сигнальным путем не детектировалась или была выявлена на низком уровне, за исключением факторов STAT3 и STAT1, однако эти результаты свидетельствуют об инактивации этого сигнального пути в недифференцированных ЭСК и усилении его активности в эмбрионидных телах. Исследование экспрессии 23 генов семейства FGF и 4 генов рецепторов к этим факторам показало, что все мРНК всех четырех рецепторов экспрессировались на высоком уровне в недифференцированных ЭСК, в то время

как факторы роста фибробластов FGF1, FGF2 и FGF11 экспрессировались на низком уровне, что объясняет потребность ЭСК человека в экзогенном факторе FGF2. Идентифицированы и другие компоненты этого пути — RPTN11, RAF1, SOS1 в недифференцированных ЭСК, что свидетельствует об участии этого пути в поддержании ЭСК человека *in vitro*. С другой стороны, как показывают результаты этой работы, WNT сигнальный путь активен не только в недифференцированных ЭСК, но и во всех изученных дифференцированных клетках, и регуляция процессов дифференцировки осуществляется на основе поддержания баланса агонистов и антагонистов этого пути. Наиболее интересные данные были получены при анализе NODAL/ TDGF пути. Одновременное присутствие транскриптов TDGF1 и LEFTYB в недифференцированных ЭСК, имеющих противоположные эффекты для пути NODAL пока трудно объяснить. К тому же экспрессия генов рецепторов для NODAL и других белков, участвующих в этом сигнальном пути, не обнаружена; поэтому, как происходит координация активации и ингибирование этого сигнального пути, остается неясным.

Результаты всех рассмотренных работ наглядно демонстрируют важность однородности изучаемых клеточных популяций и стандартизации условий культивирования для адекватных сравнений профилей их экспрессии, свидетельствуют о необходимости корректного определения наиболее значимых факторов. Важным является не просто идентификация наиболее

повторяющихся транскриптов, и не только экспрессирующихся на высоком уровне, на данном этапе исследований необходимо выявление всех известных компонентов различных сигнальных и регуляторных путей, определение их функциональной активности на белковом уровне. Другим существенным аспектом для развития этого направления исследований

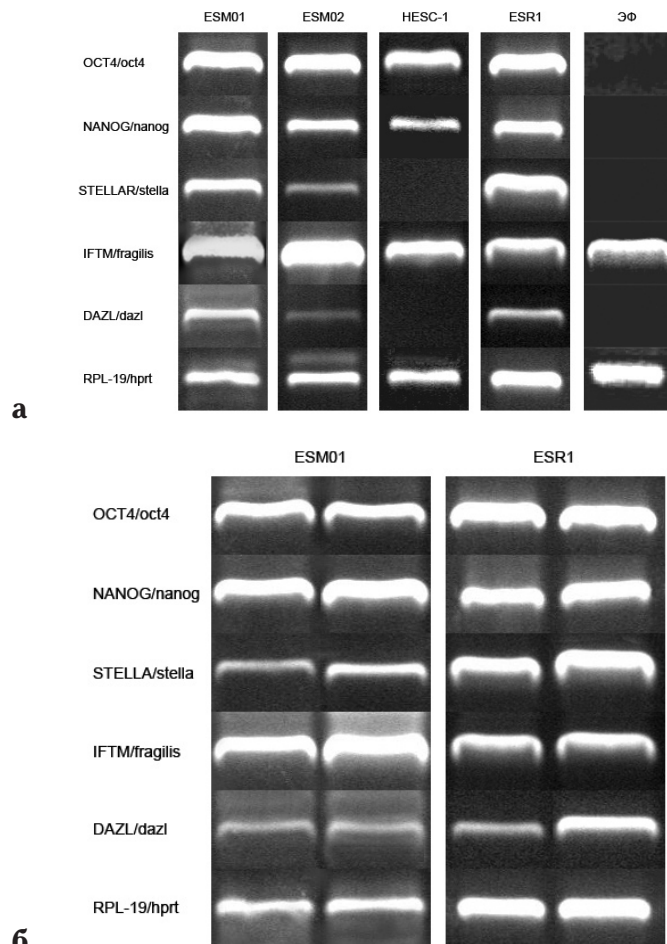


Рис.2. Экспрессия генов, специфических для линии половых клеток, в линиях ЭСК человека и мыши:

а — недифференцированные клетки линий ЭСК ESM01, ESM02, HESC-1 и R1, первичные эмбриональные фибробласты мыши (ЭФ); б — эмбрионные тела и дифференцирующиеся эмбрионные тела линий ESM01 и R1.

является определение стратегии, которая основана на понимании природы плюрипотентных клеток и основных процессов, происходящих в ЭСК при культивировании *in vitro*. Только в этом случае появляется возможность адекватной оценки воздействия различных биологически активных соединений на различные линии ЭСК человека при скрининге и доклинических испытаниях.

Разрабатывая комплексную тест-систему на основе ЭСК, мы включили в нее как существен-

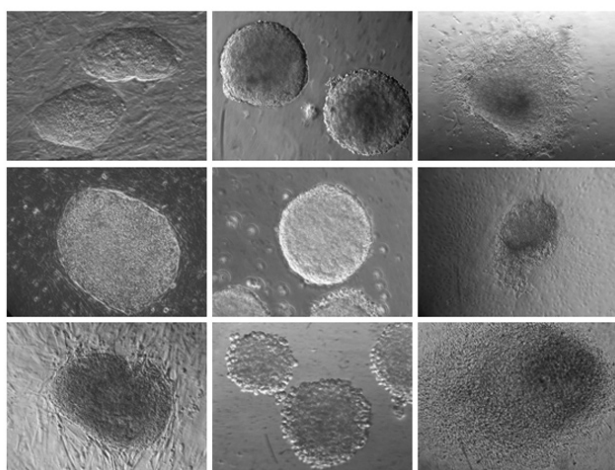


Рис.1. Линии ЭСК человека и мыши на ранних стадиях дифференцировки в культуре: недифференцированные ЭСК, эмбрионные тела и дифференцирующиеся эмбрионные тела. а, б, в, — линия R1 ЭСК мыши; г, д, е — линия ЭСК человека ESM01; ж, з, и — линия ЭСК человека HESC — 1. Ув. а,б, г, д, ж, з — 200X; в, е, и — 100x.

ные параметры для оценки стабильности кариотипа, паттерна метилирования импринтированных генов и профиля экспрессии специфических генов, ассоциированных с плюрипотентным статусом ЭСК человека. Для получения достоверных, воспроизводимых результатов первоочередной задачей стало создание максимально стандартизированной системы для поддержания недифференцированных ЭСК и мониторинг изменения этих параметров в ней.

Разработки тест-системы для скрининга и доклинических испытаний мы проводим на линиях ЭСК человека и мыши. В нашей работе используются линии ЭСК человека, полученные в ИИЦ РАН и ИБГ РАН (рис. 1).

Линии ЭСК человека, полученные в российских институтах, были ранее охарактеризованы по стандартным тестам, детектирующим экспрессию эмбриональных поверхностных антигенов SSEA3 и SSEA4, транскрипционных факторов OCT4 и NANOG, активность щелочной фосфатазы и теломеразы (Krylova, 2003). Нами были изучены профили экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и первичных половых клеток, в линиях ЭСК человека ESM01, ESM02 (ИБГ РАН), HESC-1 (ИИЦ РАН) и линии ЭСК мыши R1 (Гордеева и др., 2005). При выборе генов-кандидатов мы предположили, что если экспрессия генов OCT4, NANOG, STELLAR, IFTM/fragilis, DAZL (Saitou et al., 2002) в клетках ранних эмбрионов и затем в клетках линии половых клеток обеспечивает непрерывность зародышевого пути, то, возможно, экспрессия этих генов в ЭСК также отражает эту тенденцию. Различия профилей экспрессии для разных линий может быть следствием различий в потенциале этих линий или различий в метаболической активности различных субпопуляций с разными генотипами. Однако экспрессия генов, обеспечивающих недифференцированный статус для ЭСК в культуре и детерминацию линии половых клеток в ходе нормального развития, должна оставаться стабильной для плюрипотентных линий, обладающих способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и линию половых клеток. Таким образом, для создания тест-системы необходима стандартизация линий ЭСК человека, т.е. отбор истинно плюрипотентных линий.

Результаты нашего исследования показали, что профили экспрессии линии ЭСК человека ESM01, ESM02 и мышинной линии ЭСК R1 совпадают, причем все пять изучаемых генов экспрессировались эти-

ми клетками. Напротив, профиль экспрессии линии HESC-1 отличался. Экспрессия генов транскрипционных факторов OCT4 и NANOG, а также гена IFTM была выявлена в недифференцированных клетках линии HESC-1, а экспрессия генов STELLAR и DAZL не была обнаружена (рис. 2а). Далее был проведен сравнительный анализ профилей экспрессии на начальных стадиях дифференцировки линий ЭСК человека ESM01 и ЭСК мыши R1 (рис. 2б).

Он продемонстрировал, что плюрипотентные популяции эмбрионидных тел и дифференцирующихся эмбрионидных тел имели идентичные профили экспрессии изучаемых генов и сохраняли их неизменными, как и в недифференцированных клетках. Различия профиля экспрессии изучаемых генов для линии HESC-1 от остальных линий, - отсутствие экспрессии генов STELLAR и DAZL - указывает на иной характер детерминации доминирующей субпопуляции в стандартных условиях культивирования с использованием заменителя фетальной сыворотки. Таким образом, при создании тест-систем необходим отбор стабильных линий ЭСК человека — с постоянным профилем экспрессии специфических генов и кариотипа — в стандартных условиях культивирования.

Начатые нами разработки тест-системы с использованием линий ЭСК человека для оценки цито- и эмбриотоксичности фармакологических препаратов основываются на результатах собственных фундаментальных исследований и анализе баз данных по экспрессионным профилям, полученных зарубежными авторами. На сегодняшний день такие разработки проводят компании Cellartis AB (Goteborg, Sweden), Cellular Dynamics International (Madison, WI, USA), Axiogenesis (Cologne, Germany). Стремительное развитие современных высокопроизводительных технологий молекулярного анализа и методов культивирования линий ЭСК позволяет предположить, что интерес к таким тест-системам будет возрастать, т.к. они обладают значительными преимуществами по сравнению с существующими клеточными системами.

Литература:

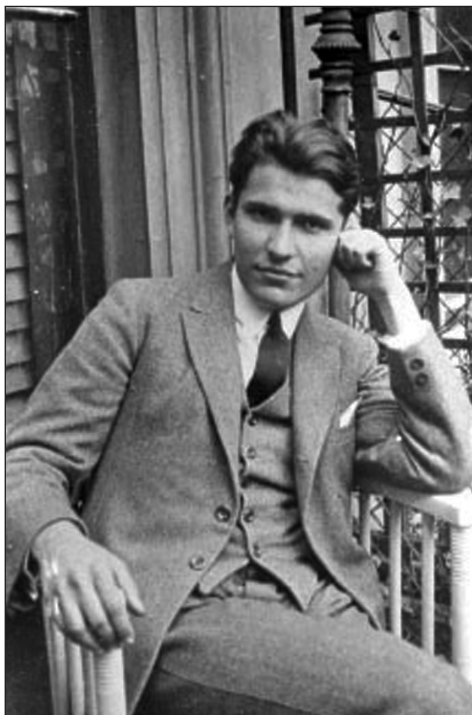
1. Гордеева О.Ф., Красникова Н.Ю., Ларионова В. и др. Анализ экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и первичных половых клеток, в эмбриональных стволовых клетках человека и мыши // Докл. РАН. 2005 (в печати).

2. *Anisimov SV, Tarasov KV, Tweedie D, Stern MD, Wobus AM, Boheler KR.* SAGE identification of gene transcripts with profiles unique to pluripotent mouse R1 embryonic stem cells // *Genomics*. — 2002. — Vol. 79(2). — P. 169–176.
3. *Bhattacharya B., Miura T., Brandenberger R., Mejido J., Luo Y. et al.* Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature // *Blood*. — 2004. — Vol. 103(8). — P.2956–2961.
4. *Brandenberger R., Wei H., Zhang S. et al.* Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. // *Nat. Biotechnol.* — 2004. — Vol.22. — 6. — P. 707–716
5. *Calhoun J.D., Rao R.R., Warrenfeltz S. et al.* Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — Vol. 323. — P.453–464
6. *D'Amour K.A., Gage F.H.* Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100(suppl 1). — P. 11866–11872.
7. *Fortunel N.O., Out H.H., Ng H.H., et al.* Comment on “Stemness”: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells” and “stem cell molecular signature” // *Science* — 2003. — Vol. 302(5644). — P. 393; author reply 393.
8. *Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J.A., Moore K.A., Lemischka I.R.* A stem cells molecular signature // *Science*. — 2002. — Vol. 298. — P. 601–604.
9. *Kelly D.L., Rizzino A.* DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells // *Mol. Reprod. Dev.* — 2000. — Vol. 56. P. 113–123.
10. *Krylova T.A., Zenin V.V., Musorina N.S., et al.* Isolation and characterisation of continuous human embryonic stem cell lines // *Tsitologiya*. — 2003. — Vol. 45(12). — P.1172–1178.
11. *Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M.* Cloning the differences between two complex genomes // *Science* 1993. — Vol. 259(5097). — P. 946–951.
12. *Mitalipova M.M., Rao R.R., Hoyer D.V., Johnson J.A., et al.* Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells/ *Nat. Biotechnol.* — 2005. — Vol.23. — P. 19–20.
13. *Pietu G, Alibert O, Guichard V, Lamy B, Bois F, Leroy E, Mariage-Sampson R, Houlgatte R, Soularue P, Auffray C.* Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array // *Genome Res.* — 1996. — Vol. 6(6). — P. 492–503.
14. *Ramalho-Santos M., Yoon S., Matsuzaki Y., Mulligan R.C., Melton D.A.* «Stemness»: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells // *Science* — 2002. — Vol. 298. — P. 597–600.
15. *Rao R.R., Stice S.L.* Gene expression profiling of embryonic stem cells leads to greater understanding of pluripotency and early developmental events // *Biol.Reprod.* — 2004. — Vol.71. — P. 1772–1778.
16. *Rao R.R., Calhoun J.D., Qin X., Rekaya R., Clark J.K., Stice S.L.* Comparative transcriptional profiling of two human embryonic stem cell lines // *Biotech. Bioengin.* — 2004. — Vol.88. — 3. — P. 273–286.
17. *Rugg-Gunn P.J., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A.* Epigenetic status of human embryonic stem cells // *Nat. Genetics* 2005. — Vol.37. — 6. — P. 585–587.
18. *Saitou M., Barton S.C., Surani M.A.* A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice // *Nature* 2002. — Vol.418. — P. 293–300.
19. *Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., et al.* Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse // *Dev. Biol.* — 2003. — Vol.260. — P. 404–413.
20. *Skottman H, Stromberg A.M., Matilainen E, Inzunza J, Hovatta O, Lahesmaa R.* Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage // *Stem Cells*. — 2005.
21. *Tanaka T.S., Kunath T., Kimber W.L., Jaradat S.A., Stagg C.A., Usuda M., Yokota T., Niwa H., Rossant J., Ko M.S.* Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity // *Genome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 1921–1928.
22. *Tanaka T.S., Jaradat S.A., Lim M.K., Kargul G.J., Wang X., Grahovac M.J., Pantano S., Sano Y., Piao Y., Nagaraja R., Doi H., Wood W.H. 3rd, Becker K.G., Ko M.S.* Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* // 2000. — Vol. 97(16). — P. 9127–9132.
23. *Velculescu V.E., Vogelstein B., Kinzler K.W.* Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. — *Trends Genet*// — 2000. — Vol. 16(10). — P. 423–425.

УДК 54.092

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЭРВИНА ЧАРГАФФА – ПРОВОЗВЕСТНИКА МАТРИЦЫ ДНК

Р.Г. ВАСИЛОВ*, В.С. ВОРОБЬЕВ

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

Два года минуло с того момента, когда весь мир торжественно отметил 50-летие одного из эпохальных рубежей в истории биологии — раскрытия тайны наследственной молекулы, двойной спирали ДНК. Это беспрецедентное, выдающееся событие уже давно стало мифологией, чему в немалой степени способствовали его главные действующие лица — молодые люди, один из которых был физиком, а другой — начинающим биологом. Наверное, не последнюю роль здесь сыграла и автобиографическая книга Дж. Уотсона «Двойная спираль», в которой перипетии научного поиска изложены с изрядным чувством юмора и

*Автор для переписки:

Василов Р.Г., д.б.н, профессор, вице-президент ОБР
119296 Москва, Университетский пр-т, 9
Тел.: (095) 938-29-29, Факс: (095) 938-26-62
E-mail: obr@biorosinfo.ru

нарочитой, показной легкостью. Но факт остался фактом — в гонке за приоритет столь желанного открытия победили формально лица «со стороны», а те, кто реально готовили базу для него, отстали на финише. А ведь среди них были знаменитости по тем временам — Освальд Эйвери, Лайнус Полинг, Макс Дельбрюк, будущие знаменитости, в их числе дважды Нобелевский лауреат Александр Тодд, не говоря уже об активно работавших бок о бок с Дж. Уотсоном и Ф. Криком Розалинде Франклин и Морисе Уилкинсе. Но особый драматизм в этой ситуации констатируется в отношении человека, ближе всех подошедшего к разгадке структуры ДНК, но по непонятным причинам остановившегося перед стеной этой тайны. Речь идет об Эрвине Чаргаффе. Именно о нем и хотелось бы рассказать, тем более имеется прямой повод — в 2005 году исполняется 100 лет со дня его рождения.

Кратко напомним *curriculum vitae* ученого. Он родился 11 августа 1905 г. в Черновцах, на Буковине, которая входила тогда в состав Австро-Венгрии. Поэтому в энциклопедиях о нем нередко говорят как об австрийском биохимике, а в англоязычной литературе он представляется как американский исследователь (он принял американское подданство в 35-летнем возрасте, в 1940 г.). Украинские источники также начинают упоминать о своем знаменитом земляке (сейчас Черновцы их территория).

Чаргафф изучал химию в Вене с 1923 по 1928 гг. В 1928 — 1930 гг. он был стипендиатом Милтона Кэмпбелла по органической химии в Йельском университете (США). После этого он вернулся в Европу и работал в Берлинском университете на должности ассистента кафедры микробиологии с 1930 по 1933 гг., а затем в течение года трудился в Пастеровском институте, в Париже.

В 1935 г. он окончательно переезжает в США, в Нью-Йорк и занимается научной работой

на кафедре биохимии Колумбийского университета, где он в 1938 г. становится адъюнкт-профессором, а с 1952 г. — профессором. В 40–50-е годы он публикует многочисленные статьи, посвященные главным образом изучению нуклеиновых кислот (ДНК) с использованием хроматографического метода. Особенно важный цикл работ был сделан в конце 40-х и в 1950 – 1953 гг., когда им были описаны основополагающие факты о химическом составе ДНК, впоследствии названные «правилами Чаргаффа».

Принято говорить о двух главных правилах Чаргаффа: 1) Во всех ДНК содержится равное количество азотистых оснований тимина (Т) и аденина (А) и сходным образом равное количество гуанина (Г) и цитозина (Ц). 2) Относительное содержание Т/А и Г/Ц специфично для каждого вида. Конкретные цифры измерений Чаргаффа, сделанные на ДНК человека, таковы: А = 30,9% – Т = 29,4%; Г = 19,9% – Ц = 19,8%. В ответ на утверждения, что изменения в эквимолярном соотношении оснований являются артефактами (ошибкой измерения), он доказал, что видовая вариабельность реальна. Причем, он подтвердил это с помощью новых методов — бумажной хроматографии и ультрафиолетовой спектрофотометрии.

По сути дела, задним числом видно, что Чаргафф вплотную подошел к доктрине пар оснований, строящих ДНК. Но что-то остановило его. Возможно, сыграло роль его неприятие тетрануклеотидной гипотезы Фибуса Левина (Rheobus Levene, 1869 – 1940, ученый США, выходец из России) о том, что ДНК состоит из многочисленных повторов ГАЦТ. Спустя много лет, в 1985 г. он так комментировал этот факт (крайне интересная самооценка): «Факт комплементарности, позднее названный правилами Чаргаффа, был существенным при решении вопроса о структуре ДНК. Оглядываясь на прошлое, можно сказать, что комплементарное парное расположение нуклеотидов сильно наводило на мысль, что молекула ДНК может разбиваться на две части. Только комплементарные основания могут образовывать связи и встраиваться в новую нить ДНК». Но при этом ученый находит в себе мужество признать объективно, что идея двойной спирали ему не пришла в голову: «Термин «расположение парное (или «спаривание» — «pairing») я использовал позже, переведя свое название в то, что стало слоганом. Я не говорил, что они были в двойной структуре, нет. Это — Крик и Уотсон... Факт, что спираль

двойная, важен, потому что это автоматический путь репродукции. Я никогда не считал это моей идеей и не желаю этого».

Конечно, слова, произнесенные в интервью через много лет после события 1953 года, вряд ли должны рассматриваться как абсолютный критерий. Нам не известно, были ли у Чаргаффа «нобелевские притязания», как, например, у Р. Франклин или М. Уилкинса, но такой талантливый человек, столько сделавший для раскрытия одной из сокровенных тайн природы, не мог наедине с собой не сожалеть о том, что он был в двух шагах от великого открытия, но не сделал их.

История науки со временем стирает персональный оттенок сущности тех или иных явлений и факты рассматривает как интегральное, преемственное, анонимное знание. Вряд ли кто вспоминает Галилея или Коперника, убеждаясь собственными глазами во вращении Земли. Скорее всего, и нынешние начинающие биохимики, говоря о сути правил Чаргаффа, вряд ли будут интересоваться вопросами приоритетов научных открытий

Да, по-видимому, с исторической точки зрения, хорошо, когда в учебных программах теорию Максвелла подтверждают опытами Фарадея, а принципы Дирака, Паули или Шредингера подтверждают рассуждениями Максвелла. В случае Чаргаффа на фоне представлений о реальной структуре ДНК всегда ретроспективно ссылаются на его правила. Это, очевидно, один из непреложных законов развития науки, когда к истине идут эволюционным путем, а не так ярко и бесконкурентно, как это сделали в свое время первопроходцы в химии Пастер или Вант Гофф.

Но домысливать за автора — дело безнадежное. Поэтому лучше обратиться к фактам. Известно, что в 1952 г. Чаргафф встречался в Кембридже с Дж. Уотсоном и Ф. Криком и, несмотря на личную неприязнь (об этом сообщает и Дж. Уотсон в своей «Двойной спирали») подробно объяснил им суть своих данных о парных основаниях в ДНК. Однако, если верить Уотсону, то Чаргафф, скорее всего, был убежден, что два «фантазера», один из которых (Крик) в разговоре запутался в химических формулах азотистых оснований, вряд ли способны сделать что-то серьезное. Об отношении Чаргаффа к первооткрывателям структуры ДНК свидетельствует и более поздний его отзыв о них (1972): «Крик и Уотсон отличаются друг от друга. Уотсон ныне очень

способный, эффективный администратор. В этом отношении он очень хорошо представляет собой американский тип антрепренера... Совсем иное Крик: он ярче Уотсона, однако много говорит, хотя все, что он говорит, полно бессмыслицы».

По-видимому, обе стороны хорошо знали себе цену и действовали по своему усмотрению. Имеется любопытная цитата из книги Дж. Уотсона: «Но что бы там ни думал саркастический Чаргафф, кто-то должен был объяснить [!] его результаты.» Из нее видно, что будущий Нобелевский лауреат отдавал отчет в ключевом значении работ Чаргаффа.

Развитие событий показало справедливость такого подхода.

На этом можно закончить анализ эпопеи с двойной спиралью и рассмотреть ход жизни и деятельности Чаргаффа после 1953 года. В это время он исследовал метаболизм аминокислот и инозитола, свертывание крови, обмен липидов и липопротеинов, биосинтез фосфотрансфераз.

В 1974 г. после выхода в отставку и получения звания заслуженного профессора он перешел на работу в Госпиталь Рузвельта, где трудился до 1992 г. Скончался Эрвин Чаргафф 20 июня 2002 года в возрасте неполных 97 лет.

В заключение следует сказать о том, что начиная с 50-х годов в его высказываниях по общим вопросам биологии стала звучать тревога за веру особенно молекулярных биологов в безграничность возможностей вмешательства человека в природное равновесие. Ему, в частности, принадлежит фраза: «Имеем ли мы право противодействовать эволюционной мудрости миллионов лет только для того, чтобы удовлетворить амбиции и любопытство нескольких ученых». Свои взгляды по данному вопросу он обобщил в специальной книге «Гераклитово пламя» (Heraclitean Fire: Sketches from a Life before Nature, 1978). Здесь сложно давать комментарий. Однако в любом случае — и с исторической, и с содержательной точки зрения столь выдающаяся личность, безусловно, имеет право на свое особое мнение, которое, в конечном итоге, может оказаться верным.

Литература:

1. *Лауреаты Нобелевской премии.* Энциклопедия: Пер. с англ. В 2-х т. — М.: Прогресс, 1992. — 775 — 861 с.
2. *Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение.* Нобелевские премии по медицине 1901 — 2002. — Спб.: Издательство ДЕАН, 2003. — 800 с.
3. *Уотсон Дж. Двойная спираль.* Воспоминания об открытии структуры ДНК / Пер. с англ. — М.: Мир, 1969..
4. *Чаргафф Э., Дэвидсон Дж. (Ред.)* Нуклеиновые кислоты. Химия и биология. / Пер. с англ. — 1957.

5. *Чолаков В.* Нобелевские премии. Ученые и открытия: Пер. с болг. / Под ред. и с предисл. А.Н. Шамина. — М.: Мир, 1986. — 368 с.
6. *Chargaff E.* Heraclitean Fire: Sketches from a Life before Nature. — N.Y. The Rockefeller University Press, 1978.
7. *Nobel Lectures in Molecular Biology 1933 — 1975.* — N.Y. Elsevier, 1977. — 534 p.

Были также использованы интернет-материалы, особенно сайт <http://osulibrary.orst.edu>

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ

СОБЫТИЯ

1945 — публикация книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физика?»: Schroedinger E. *What is Life? The physical Aspect of the Living Cell.* Cambridge, England: Cambridge University Press, 1945 (русский перевод 1947 г. А.А. Малиновского, видного российского биолога, сына революционера и философа А.А. Богданова). Имеется переиздание на русском языке 1972 г. Эрвин Шредингер (1887 — 1961), великий австрийский физик, удостоен Нобелевской премии в 1933 г. совместно с П. Дираком. Именно в этом широко известном произведении 1945 г. Э. Шредингер сказал, что ген — это аperiодический кристалл. Под влиянием данной книги Ф. Крик переключился с физики на биологию, ознакомился с книгой и 17-летний Дж. Уотсон, вскоре вместе сделавшие свое сенсационное открытие. Общеизвестно также, что биологические идеи Э. Шредингера родились под влиянием его общения с генетиком Н.А. Тимофеевым-Ресовским.

1950 — Эрвин Чаргафф широко обнародовал открытые им знаменитые правила: в молекуле ДНК количество аденина = кол-ву тимина ($A = T$) и кол-во гуанина = кол-ву цитозина ($G = C$), а относительное содержание азотистых оснований видоспецифично. В 1950 — 1953 гг. он уточнял и подтверждал эти правила новыми методами.

1950 — Андре Львов открыл профаг. Впоследствии за цикл работ в этой области был удостоен Нобелевской премии в 1966 г (вместе с Ф. Жакобом и Ж.Л. Моно).

1955 — Северо Очоа с помощью выделенного из микроорганизма *Azotobacter vinelandi* фермента РНКазы (он назвал его «полинуклеотидфосфорил азой») синтезировал РНК *in vitro*. Позже в 1957 г. Артур Корнберг синтезировал ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Оба в 1959 году удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за исследование биологического синтеза РНК и ДНК.

1960 — Уильям Хоуард Стайн, Стэнфорд Мур определили последовательность соединения аминокислотных оснований в панкреатической рибонуклеазе. В 1972 г. им была присуждена Нобелевская премия по химии (пополам с Кристианом Анфинсеном) за работы по химической структуре рибонуклеазы.

1965 — Роберт Холли (будущий Нобелевский лауреат) определил структуру тРНК, переносящей аланин в клетках дрожжей.

1965 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине французским ученым Андре Львову, Франсуа Жакобу и Люсьену Моно за открытие генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов.

1965 — Фредерик Сенгер начал исследования первичной структуры нуклеиновых кислот.

1965 — Ренато Дульбекко открыл, что вирус полиомиелита может присоединяться к клеточной ДНК, становясь его частью. Механизм такого присоединения позже выяснил Х.М. Темин, открыв ревертазу, который, кстати, будучи студентом, работал в лаборатории Р. Дульбекко.

1965 — обнаружен *int*-ген (регулирует контроль присоединения профага) в лаборатории генетики человека Мичиганского университета.

1970 — Х.М. Темин и независимо от него Д. Балтимор открыли РНК-зависимую ДНК-полимеразу, или обратную транскриптазу.

1970 — Х.О. Смит описал фермент рестрикции (рестриктазу). За это открытие он был удостоен Нобелевской премии 1978 г по физиологии и медицине (совместно с В. Арбером и Д. Натансом).

1970 — Х.Р. Корана с сотрудниками синтезировали первый ген (дрожжевой) — молекулу ДНК, состоящую из 27 нуклеотидов.

1975 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине: Дейvidу Балтимору, Хоуарду Мартину Темину — за открытие обратной транскриптазы и Ренато Дульбекко — за исследование механизма действия онкогенных вирусов.

1980 — присуждение Нобелевской премии по химии Полу Бергу (одна половина) за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в частности, рекомбинатной ДНК, и Уолтеру Гилберту и Фредерику Сенгеру (другая половина) за их вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах. Для Ф. Сенгера это была вторая Нобелевская премия — первую он получил в 1958 г. за исследование структуры белков, прежде всего, инсулина.

ПЕРСОНАЛИИ

100 лет со дня рождения Эрвина Чаргаффа (Erwin Chargaff, 1905–2002), крупного биохимика, австрийца по происхождению (с 1930 по 2002 гг. жил и работал в США). Открыл знаменитые «правила Чаргаффа», показавшие четкие количественные взаимоотношения: $A = T$, $G = C$ в ДНК. О нем помещена мемориальная статья в настоящем журнале, в разделе «Страницы истории» (с. 85–87).

100 лет со дня рождения Северо Очоа (Severo Ochoa, 1905–1993), выдающегося биохимика, испанца по происхождению (с 1941 по 1993 гг. проживал в США, где в 1956 г. получил гражданство). Открыл РНКазу, за что удостоен Нобелевской премии в 1959 г. (вместе с А. Корнбергом, первооткрывателем ДНК-полимеразы).

95 лет со дня рождения Жака Люсьена Моно (Jacques Lucien Monod, 1910–1976), лауреата Нобелевской премии 1965 г. Совместно с Франсуа Жакобом создали теорию регуляции генной активности. Им принадлежат термины иРНК (или мРНК), оперон.

85 лет со дня рождения Франсуа Жакоба (Francois Jacob, род. в 1920), лауреата Нобелевской премии. Является вместе с Ж.Л. Моно создателем теории регуляции генной активности.

80 лет со дня рождения Джошуа Ледерберга (Joshua Lederberg, род. в 1925 г.), известный исследователь генетики бактерий. Получил в

1958 г. половинную Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытия, касающиеся генетической рекомбинации у бактерий и структуры их генетического аппарата. Вторая половина премии была присуждена Д. Бидлу и Э. Тейтему за открытие способности генов регулировать определенные химические процессы.

50 лет со дня смерти Освальда Эйвери (Oswald Theodore Avery, 1877–1955), американского исследователя. В 1944 г. Освальд Эйвери совместно с Колином Маклеодом (C. MacLeod) и Маклином Маккарти (M. MacCarthy) показали, что наследственные признаки могут быть переданы от одной бактерии к другой путем переноса (трансдукции) чистой ДНК (без белка). До них в 1928 г. Фредерик Гриффит в ходе опытов смешал невирулентные пневмококки с убитыми болезнетворными бактериями того же вида. Он заметил, что происходит какое-то взаимодействие, в результате которого живые микроорганизмы приобретают вирулентные свойства. В 1944 г. Эйвери с коллегами повторили этот эксперимент, используя чистую ДНК, — они обнаружили то же самое превращение. Таким образом, это первое в истории прямое доказательство роли ДНК в передаче наследственности (генетической информации).

30 лет со дня смерти Эдварда Лаури Тейтема (Edward Lawrie Tatum, 1909–1975), американского исследователя, лауреата Нобелевской премии (в доле половинной премии с Джорджем Уэллсом Бидлом) 1958 г. Автор концепции «один ген — один фермент» (совместно с Д.У. Бидлом), то есть идеи, что структура каждого синтезируемого белка закодирована в одном из генов.

СОБЫТИЯ ПЕРВОГО ПОЛУГОДИЯ 2005 ГОДА

8 февраля 2005 г. в Москве, в Государственной Думе Федерального Собрания РФ состоялся круглый стол «Законодательное обеспечение развития биотехнологической отрасли промышленности», организованный Комитетом Государственной Думы РФ по промышленности, строительству и наукоемким технологиям. В круглом столе приняли участие депутаты Государственной Думы РФ, представители Министерства промышленности и энергетики Российской Федерации, Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, Федерального агентства по промышленности, Правительства Кировской области, Общества биотехнологов России, предприятий и организаций отрасли, ученые и эксперты в сфере биотехнологии, СМИ. Присутствовали заместитель Председателя Государственной Думы РФ О.В. Морозов, председатель Комитета по промышленности, строительству и наукоемким технологиям ГД ФС РФ М.Л. Шаккум, председатель Экспертного совета по химии и нефтехимии при Комитете по промышленности, строительству и наукоемким технологиям А.А. Губкин, заместитель председателя Комитета по охране здоровья Н.Ф. Герасименко. В обсуждении проблемы участвовали крупные специалисты и эксперты в области биотехнологии: директор ГосНИИГенетика член-корреспондент РАН В.Г. Дебабов, директор ВИЛАР академик РАСХН и РАМН В.А. Быков, член Совета по науке, образованию и технологиям при Президенте РФ академик РАСХН К.Г. Скрыбин, заместитель директора ИБХ РАН академик РАН А.И. Мирошников, сопредседатель Совета директоров Союза биотехнологов А.И. Иваненко и др. Выступали представители регионов — заместитель председателя Правительства Кировской области Э.А. Носков. От имени Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова выступил его вице-президент Р.Г. Василев, который изложил концепцию и механизмы реализации комплексной программы «Развитие биотехнологии в России на 2006-2015 гг.». Обобщали дискуссию руководители Комитета М.Л. Шаккум и А.А. Губкин..

На круглом столе были приняты рекомендации (впоследствии утверждены профильным Комитетом ГД РФ).

Из рекомендаций круглого стола:

I. «... Правительству Российской Федерации:

1. Разработать механизмы государственной поддержки инновационной деятельности в области биотехнологии, в том числе:

1.1. Меры по привлечению в сферу биотехнологии частных инвестиций, включая механизмы частно-государственного партнерства, в целях создания биотехнологических производств для импортозамещающей продукции.

1.2. ... Рассмотреть вопрос о разработке и принятии подпрограммы «Приоритетные научно-практические направления биотехнологии» в составе Федеральной целевой программы «Национальная технологическая база» на 2002–2006 годы.

1.3. Формирование сети технопарков и технико-внедренческих зон в сфере биотехнологии, включив в перечень приоритетных проектов....»

II. «... Государственной Думе Федерального Собрания Российской Федерации совместно с Правительством Российской Федерации:

1. В соответствии с программой разработки технических регламентов обеспечить подготовку, внесение и принятие Государственной Думой проектов федеральных законов об основных технических регламентах, касающихся безопасности биотехнологических производств, в том числе:

1.1. Общего технического регламента «О биологической безопасности».

1.2. Специального технического регламента «О безопасности биотехнологических и микробиологических производств...».

Материалы круглого стола опубликованы — Законодательное обеспечение развития биотехнологической отрасли промышленности: Материалы круглого стола в Государственной Думе РФ. 8 февраля 2005 г. — М.: «Русская панорама», 2005. — 144 с. Информация: <http://www.biorosinfo.ru>

14 — 18 марта 2005 г. в Москве прошел III Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Мероприятие состоялось в здании Правительства г. Москвы, где одновременно была развернута международная специализированная выставка

«Мир биотехнологии». Научная часть конгресса состояла из пленарных и секционных заседаний, тематика которых охватывала многие аспекты современной теоретической и практической биотехнологии. Кроме специалистов из России, присутствовали участники и гости из различных стран. Более подробная информация: Тел./ факс: (095) 124-56-68; E-mail: bio@biotechworld.ru; 117036 Москва, Профсоюзная ул., 3, офис 219.

18-22 апреля 2005 г. в Москве состоялась конференция VI Международного Форума «Высокие технологии XXI века». Организатор конференции — Российский Фонд развития высоких технологий (РФРВТ). В целом Форум проводится под патронатом Торгово-промышленной палаты РФ при поддержке Правительства Российской Федерации и Правительства г. Москвы. В рамках указанной конференции была организована секция «Биотехнологии. Задачи развития отрасли», в работе которой принимали участие академик РАН А.И. Мирошников, член-корреспондент РАН и академик РАСХН В.Г. Дебабов, академик РАМН В.И. Швец, профессора В.А. Вахитов, А.В. Чемерис и другие известные специалисты в данной области. Организаторами и научными руководителями секции были вице-президенты Общества биотехнологов России академик РАН А.И. Мирошников и Р.Г. Василев. Материалы конференции опубликованы. Более подробная информация: <http://www.hightechno.ru>, <http://www.biorosinfo.ru>.

22-23 июня 2005 года в г. Калининграде состоялась научно-практическая конференция «Значение биотехнологии для здорового питания и решения медико-социальных проблем». Конференция была организована Обществом биотехнологов России (ОБР) им. Ю.А. Овчинникова вместе с администрацией Калининградской области и Калининградским государственным техническим университетом и была приурочена к 750-летию Калининграда (Кенигсберга). Главная тема — биотехнология морепродуктов, в которой в основном были представлены ученые и практики Калининграда. В конференции также приняли участие представители других регионов России (Москва, Санкт-Петербург, Воронеж, Белгород и др.). Опубликованы тезисы. Информация: <http://www.biorosinfo.ru>.

ПУБЛИКАЦИИ

В последнее время вышел в свет ряд сборников и книг по физико-химической биологии и биотехнологии. Среди них:

Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы научно-практической конференции. Казань, 17 – 18 июня 2004 г. Труды молодых ученых / Под ред. Р.Г. Василовой. — М.: Панорама, 2004. — 168 с.

Аннотация. В сборнике представлены труды молодых ученых, доложенные в виде стендовых сообщений на научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004). Тематика работ затрагивает широкий спектр проблем фундаментальной и прикладной биотехнологии. Книга рассчитана на биологов, биотехнологов, студентов и аспирантов биологического профиля.

Байдалинова Л.С., Киселев В.И., Лысова А.С., Мезенова О.Я., Сергеева Н.Т., Степенцова Г.Е., Терещенко В.П. Биотехнология гидробионтов / Под ред. О.Я. Мезеновой и В.П. Терещенко. — Калининград: КГТУ 2005. — 461 с.

Аннотация. В монографии дана биохимическая характеристика гидробионтов как сырья для производства биологически активных компонентов и обогащенных ими продуктов, Приведены научные основы процессов в биотехнологии. Охарактеризованы ключевые технологические направления получения и применения биологически активных веществ и изделий повышенной пищевой ценности из органов и тканей гидробионтов — белковых продуктов, препаратов на основе липидов, ферментов, витаминов. Описаны научные основы технологии получения и применения биополимеров-структуро-образователей и высокоминерализованных биопродуктов.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2005 ГОДА

Конференции

21–24 августа 2005 г. в Копенгагене (Дания) состоится 12-й Европейский конгресс по биотехнологии (ЕСВ12). Организатор – Европейская федерация биотехнологии (EFB). Председатель Оргкомитета – Ларс Педерсен, председатель научного комитета – Йенс Нильсен. Информация: сайт Европейской федерации биотехнологии.

12–14 сентября 2005 г. в Анапе состоится Вторая научно-практическая конференция «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии». Организаторы: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова совместно с Департаментом образования и науки Краснодарского края и Кубанским государственным медицинским университетом. Сопредседатели оргкомитета: А.А. Воробьев, С.Б. Ткаченко, Б.Г. Ермошенко. Справки: <http://www.biorosinfo.ru>.

16 сентября 2005 г. в Белгороде состоится Вторая научно-практическая конференция «Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии». Организаторы: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова совместно с Правительством Белгородской области и Белгородской государственной сельскохозяйственной академией. Сопредседатели Оргкомитета: С.Н. Алейник, Р.Г. Василев, А.В. Турьянский. Справки: <http://www.biorosinfo.ru>.

19–21 сентября 2005 г. в Генте (Бельгия) состоится конференция «Renewable resources and biorefineries» («Возобновляемые ресурсы и биоочистка»). Организаторы: Европейская федерация биотехнологии и Гентский университет. Информация: <http://www.rtbconference.ugent.be/>

18–20 октября 2005 г. в Ганновере (Германия) будет проходить Международная специализированная выставка-ярмарка «БИОТЕХНИКА 2005». Выставка является крупным мероприятием подобного рода и проводится 1 раз в 2 года. Главная тема – биотехнология и связанные с нею отрасли. Российскую экспозицию курирует Федеральное агентство по науке и инновациям. Отбор участников выставки и формирование экспозиции выполняет Инновационно-технологический центр «Биологически активные соединения и их применение» РАН. Справки: 119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 5. Телефон: (095)-954-1367. Факс: (095)-952-2260. <http://www.bioinnovation.ru>, e-mail: cit@inbi.ras.ru

25–27 октября 2005 г. в Москве состоится Третий съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Председатели Оргкомитета – Н.А. Платэ, А.А. Воробьев. Одна из главных тем – обсуждение концепции и механизмов реализации комплексной программы «Развитие биотехнологии в России на 2006 – 2015 гг.». Адрес рабочей группы: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9, Тел./ факс: (095) 938-29-29, 938-26-62. E-mail: obr@biorosinfo.ru. Более подробная информация: <http://www.biorosinfo.ru>.

15–16 ноября 2005 г. в Москве состоится Международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и генетические ресурсы России: методологические, правовые и экономические аспекты». Организаторы – Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова совместно с Отделением биологических наук РАН. Председатели Оргкомитета: А.И. Григорьев, В.А. Грачев, А.А. Воробьев. Справки: <http://www.biorosinfo.ru>.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).

2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт – Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются краткие сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адрес для переписки и факсимильной и электронной связи).

3. Объем рукописи: оригинальные статьи – не более 12 – 14 стр. (в среднем 22000 знаков без пробела), не более 25 цитированных авторов; обзоры – не более 20 – 24 стр. (в среднем 40000 знаков без пробела), список литературы – не более 50 авторов.

3. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи – УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения и т.д.) представляются в произвольной форме.

4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.

5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале – литература на русском языке, затем – на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр.

В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.

8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.

9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.

10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.

11. Адрес редакции указан в конце журнала.

12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию. Подписка на журнал в течение 2005–2006 гг. проводиться не будет.

Научно-практический журнал
ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией Ф.Ф. Шаги-Мухаметова
Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9
Тел.: (095) 938-29-29, Факс: (095) 938-26-62
E-mail: obr@biosinfo.ru, <http://www.biosinfo.ru>

Формат 60x90¹/₈. Бумага офсетная 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0.

Общество биотехнологов России

Общество биотехнологов России (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом РФ.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственно-техническим опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Ежегодно проводится Съезд биотехнологов.

Издается журнал "Вестник биотехнологии и физико-химической биологии".

ОБР имеет отделения в 50 регионах России и объединяет свыше 1000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и Фондом развития биотехнологии.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Тел./Факс: (095) 545-37-84, 8-916-640-76-18

E-mail: obr@biorosinfo.ru

Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9