

**ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЇ, ГЕОГРАФІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ
КАФЕДРА ГЕОГРАФІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ**

Кундельчук О.П., Сидорович М.М.

МОЛЕКУЛЯРНА ЕКОЛОГІЯ
Частина 1. Молекулярні основи функціонування
організмів.

Матеріали для підготовки до лабораторних та
семінарських занять



УДК 502/504:577.2](075.8)

К 91

Кундельчук, О.П., Сидорович, М.М.

К 91 **Молекулярна екологія.** Частина 1. Молекулярні основи функціонування організмів. Матеріали для підготовки до лабораторних та семінарських занять: Навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавр спеціальностей 091 Біологія, 014.05 Середня освіта (Біологія), 101 Екологія денної та заочної форм навчання / О.П. Кундельчук, М.М. Сидорович – Херсон: ФОП Вишемирський В.С., 2021. – 162 с.

ISBN 978-617-7941-04-9

Навчально-методичний посібник містить матеріали для підготовки до лабораторних та семінарських занять по окремим питанням курсу «Молекулярна екологія. Частина 1. Молекулярні основи функціонування організмів» для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавр спеціальностей 091 Біологія, 014.05 Середня освіта (Біологія), 101 Екологія денної та заочної форм навчання, які включають теоретичний матеріал, завдання лабораторних занять, схеми та малюнки необхідні для виконання завдань, перелік рекомендованої літератури. Навчальний посібник рекомендований студентам і викладачам біологічних та екологічних спеціальностей вищих навчальних закладів для підготовки до лабораторних та семінарських занять.

Рецензенти:

Пічура В.І., д.с.-г.н., професор, зав. кафедри екології та сталого розвитку імені професора Ю.В. Пилипенка Херсонського державного аграрно-економічного університету;

Загороднюк Н.В., к.б.н., доцентка кафедри ботаніки Херсонського державного університету.

*Рекомендовано до друку
на засіданні Вченої ради Херсонського державного університету
(протокол № 7 від 21.12.2020 р.).*

УДК 502/504:577.2](075.8)

ISBN 978–617–7941–04–9

© Кундельчук О.П., 2021
© Сидорович М.М., 2021
© ФОП Вишемирський В.С., 2021

ЗМІСТ

Програма дисципліни	4
Заняття 1. Генодіагностика присутності вірусів. Мінливість вірусів. Рекомбінація ДНК у вірусів.....	7
Заняття 2. Репарація пошкоджень ДНК.....	19
Заняття 3. Порушення репарації ДНК.....	25
Заняття 4. Природна генна інженерія.....	34
Заняття 5. Методи виявлення РНК. ДНК-мікрочип аналіз.....	40
Заняття 6. Сплайсинг РНК.....	43
Заняття 7. Процесинг і деградація молекул РНК за участю екзосомного комплексу.....	48
Заняття 8. Нонсенс-опосередкована деградація мРНК. Процесинг і деградація РНК- транскриптів в Р-тілях.....	57
Заняття 9. Редагування молекул РНК.....	70
Заняття 10. Транспортування мРНК і мікроРНК до клітин-мішеней в екзосомах.....	82
Заняття 11. Рибозими - молекули РНК з каталітичною активністю.....	90
Заняття 12. РНК-інтерференція.....	96
Заняття 13. Міртронні мікроРНК.....	107
Заняття 14. Кільцеві РНК.....	115
Заняття 15. РНК-термометри.....	120
Заняття 16. РНК-рибосвічі – регулятори активності роботи генів.....	124
Заняття 17. Структура білків. Порушення і відновлення структури білків. Шаперони.....	127
Заняття 18. Ізоформи білків.....	134
Заняття 19. Пост-трансляційні модифікації білків.....	138
Заняття 20. Інтеїни.....	143
Заняття 21. Природні внутрішньо неструктуровані білки.....	148

Програма дисципліни «Молекулярна екологія. Частина 1. Молекулярні основи функціонування організмів»

Вступ. Клітинно–молекулярні механізми життя. Властивості живого. Хімічний склад клітини. Головні біополімери клітини. Клітина – структурно-функціональна одиниця життя, її системна організація. Різновиди клітин, риси відмінності і подібності. Функціональні клітинні системи як місця локалізації молекулярних механізмів життя. Віруси як особлива форма життя. Загальна характеристика вірусів. Життєвий цикл ДНК- і РНК-вірусів. Віруси – як вектори перенесення спадкової інформації до клітини. Жири, білки і вуглеводи – основні трофічні та енергетичні біополімери клітини, загальна характеристика їх організації та функціонування. Провідна роль білків у життєдіяльності клітини. Властивості амінокислот та їх класифікація. Рівні структурної організації білкової молекули. ДНК і РНК – спадкові молекули клітини, що забезпечують декодування програми життя і перетворення її на молекулу первинного білка. Структура ДНК. РНК як месенджер перенесення спадкової інформації з ДНК на поліпептид. Риси відмінності організації РНК від ДНК.

Особливості мембранної організації клітини. Молекулярні механізми рецепції зовнішніх чинників. Клітинні мембрани, їх риси подібності та відмінності. Генезис поглядів на організацію мембрани та експериментальні докази її моделей. Риси відмінності і подібності клітинних мембран. Основні функції зовнішньої мембрани. Молекулярні механізми реалізації основних функцій зовнішньої мембрани. Провідна роль функцій зовнішньої мембрани клітини в здійсненні спеціалізованої діяльності системами органів (проведення нервового імпульсу, міжклітинні взаємодії під час імунної відповіді, механізми гормональної регуляції, секреторні процеси в залозах тощо).

Спадковий апарат клітини: особливості прокаріот та еукаріот. Склад і функції спадкового апарату: загальні риси у про- і еукаріот. Особливості організації спадкового апарату еукаріот. Рівні компактизації фібрили ДНП при формуванні хромосом з хроматину: молекулярні механізми. Хроматин і хромосоми: загальна характеристика, хромосоми «типа лампових щіток» і політенні хромосоми. Ядерний матрикс як організатор роботи хроматину. Особливості організації спадкового апарату прокаріот, рівні компактизації нуклеоїду.

Організація геному вірусів і прокаріот. Поняття геном і генотип. Організація вірусного геному. Вірусний геном як вектор спадкової інформації. (НІ)-технологія рекомбінантної ДНК на основі специфічної трансдукції. Особливості організації геному прокаріот. Мобільні елементи: загальна характеристика. Вірусний геном як мобільний елемент клітини. Пластичність геному як результат існування в ньому мобільних елементів. Характеристика мобільних елементів прокаріот: транспозони та інсерційні послідовності. Значення мобільних елементів прокаріот для живої природи.

Особливості організації геному еукаріот. Риси подібності в організації геному у про- і еукаріот. Мобільні елементи геному еукаріот або «пригаючі гени»: транспозони еукаріот, ретротранспозони вірусної суперродини, ретропозони (ретрогени, процесовані псевдогени). Риси відмінності двох геномів. Характеристика «надлишковості» геному еукаріот. Інтронно-екзонна організація геному еукаріот. Характеристика геномів мітохондрій і хлоропластів як складових геному еукаріот.

Транскрипція геному вірусів і прокаріот. Загальні аспекти транскрипції, що притаманні всім типам геномів: центральна догма молекулярної біології, властивості генетичного коду, полі-функціональність гену, початкові події механізмів транскрипції (пошук промотору). Загальна характеристика транскрипції як матричного процесу. Особливості транскрипції у вірусного геному. Транскрипція на геномі прокаріот: функціонування оперону.

Особливості транскрипції в еукаріот. Особливості організації генів (функціональних одиниць транскрипції) у еукаріот порівняно з опероном. Відмінності загальної схеми транскрипції у еукаріот і прокаріот. Інші риси відмінності транскрипції двох геномів. Механізми регуляції транскрипції у еукаріот або епігенетичні фактори: посттрансляційна модифікація гістонів хроматину, що описується теорією «гістонового коду»; функціонування малих або «інтерферуючих» РНК; деацетилювання, деметилювання і дефосфорилування гістонів хроматину; посттранскрипційний і посттрансляційний сайленсинг гену, пов'язаний з РНК-інтерференцією. Рівні регуляції транскрипції у клітині. Характеристика сплайсингу як складової синтезу мРНК у еукаріот. Різновиди альтернативного сплайсингу: загальні механізми. Механізми збільшення ємності генетичного коду в клітині еукаріот.

Реплікація, репарація і рекомбінація ДНК. Загальна характеристика реплікації ДНК як матричного процесу в клітині. Механізми реплікації у зоні реплікаційної вилки. Загальні особливості реплікації ДНК у геномах прокаріот і еукаріот. Загальні риси процесу репарації. Основні різновиди ушкоджень ДНК, що спричиняють «точкові» мутації. Процес рекомбінації ДНК: загальні риси.

Молекулярні механізми трансляції та фолдингу білка. Структурна організація білкової молекули. Функції білка в клітині. Порівняльна характеристика провідних інформаційних молекул клітини: ДНК, мРНК, тРНК. Загальна характеристика білоксинтезуючого комплексу і білоксинтезуючої системи. Рибосоми – провідні органели трансляції. Фази трансляції як матричного процесу. Процес фолдингу білка в клітині: загальна схема його різновидів, умови для успішного фолдингу, моделі і фактори фолдингу. Характеристика двох різновидів фолдингу за локалізацією в структурах цитоплазми. Характеристика ролі шаперонів у фолдингу білка. Поняття «білкова спадковість».

Список рекомендованої літератури

Основна література:

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Т. 1–3. – М.: Мир, – 1994.
2. Белясова Н. Биохимия и молекулярная биология. М.: Книжный дом, 2004.
3. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство [Электронный ресурс] : учеб.-метод. пособие. Саратов. гос. ун-т им. Н. Г. Чернышевского. - Саратов : Саратов. гос. ун-т, 2012. – 79 с. : ил., табл. - Библиогр.: с. 70. - Б. ц.
4. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие для вузов / И. Ф. Жимулев; Под ред. Е.С.Беляева. - Издание 3-е, испр. - Новосибирск: Сибирское университетское издательство. ISBN 5-94087-309-X 2006 12 1 5. 2006.
5. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология: учеб. для вузов/ М.: Академия. ISBN 5-7695- 1965-7 2005 10 - 2. 2005.
6. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Основные термины молекулярной биологии: Учебное пособие для вузов/ М.: КолосС. ISBN 5-9532- 0327-6 2006 10 - 4. 2006.
7. Курчанов Н.А. Генетика человека с основами общей генетики: учебное пособие / Н. А. Курчанов. - СПб.: СпецЛит. ISBN 5-299-00307-2 2006 107 - 3. 2006.
8. Ленинджер А. Основы биохимии (В 3 томах)/ Пер. с англ. – М.: Мир 1985 1 2, электронная версия. 1985.
9. Мари Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека (В 2 томах)/ Пер. с англ.: М.: Мир. ISBN 978-5-03-003853-7. 2009.
10. Мушкхамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. Учебное пособие для вузов - 2 изд. М.: МИА, 2007.

Додаткова література:

1. Великов В.А, Кузнецов П.Е. Практикум по молекулярной биологии: Методы биоинженерии / Под ред. проф. В.В. Игнатова. 2006. – Саратов: Издательство СГУ, 2006, – 80 с.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002.
3. Кнорре Д.Г. Биологическая химия: Учебник для вузов/ Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 3-е изд., испр. – М.: Высшая школа. ISBN 5-06-003720-7 2003 5. 2003.
4. Кольман Я., К.-Г. Рём Наглядная биохимия/ Пер. с нем. – М.: Мир. ISBN 5-03-003593-1 2004 1 1, электронная версия. 2004.
5. Коничев А.С. Биохимия и молекулярная биология. Словарь терминов. М.: Дрофа, 2008.
6. Рис Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию (от клеток к атомам)/ Пер. с англ. – М.: Мир. ISBN 5-03-003521-4 2002 2 1. 2002.
7. Сингер М. Гены и геномы: В 2-х т.:Пер. с англ./ М. Сингер, П. Берг. - М.: Мир. ISBN 5-03-002848-X 1998 1 1. 1998.
8. Соросовский образовательный журнал на сайте www.issep.rssi.ru
9. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структуры и функции белков - 3 изд. М.: Издательство МГУ, 2005.
10. Элиот В., Элиот Д. Биохимия и молекулярная биология/ Пер. с англ. – М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». ISBN 5- 7846-0036-2. 2002.

Интернет-джерела:

- <http://www.biotechnolog.ru> – молекулярная биология и биотехнология;
<http://www.molbiol.edu.ru> – практическая молекулярная биология;
<http://www.rusbiotech.ru> – молекулярная биология и биотехнология;
<http://www.sci-lib.com> – наука, новости науки и техники для студентов;
<http://www.humbio.ru> – биология человека;
MOLBIOL.RU – Методы, информация и программы для молекулярных биологов
// www.molbiol.ru.
National Center for Biotechnology Information *// www.pubmed.com.*
Fermentas Life Sciences *// www.fermentas.com.*

Заняття 1

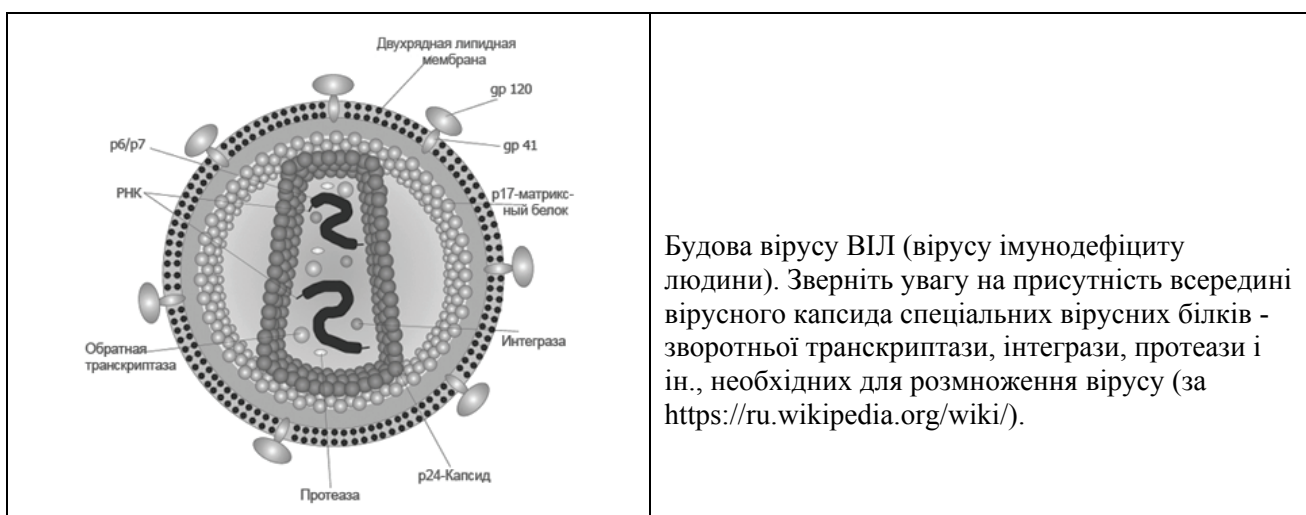
Тема: Генодіагностика присутності вірусів. Мінливість вірусів. Рекомбінація ДНК у вірусів.

Лабораторна діагностика вірусних інфекцій базується на трьох групах методів: а) вірусологічний метод - виділення вірусу з біологічного матеріалу і його ідентифікація; б) серологічний метод - визначення в сироватці крові хворих специфічних протівірусних антитіл за допомогою різноманітних імунологічних реакцій; в) генодіагностика - виявлення в матеріалі від хворого специфічних для даного вірусу фрагментів нуклеїнових кислот за допомогою методу зондів (гібридизація нуклеїнових кислот) або полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (за http://studopedia.ru/10_139724_metodi-laboratornoy-diagnostiki-virusnih-infektsiy.html).

Використання методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення інфікування організму хазяїна вірусами. Для виявлення можливого інфікування організму хазяїна ДНК-вірусами - з плазми крові людини виділяють ДНК і потім в ПЛР-машині використовуючи ДНК-затравку, яка розпізнає вірусні кДНК, накопичують тільки той фрагмент кДНК, який містить один з вірусних генів. Надалі - продукти ампліфікації розділяють за допомогою електрофорезу. Оцінка результатів ПЛР-дослідження проводиться за наявністю або відсутністю на електрофореграмі специфічних смуг ампліфікованих фрагментів ДНК одного з генів вірусу. Подальше секвенування продуктів ампліфікації дозволяє виявити мутації в вірусних генах.

*NB! Для виявлення інфікування РНК-вірусами (зокрема, ретровірусами) – з плазми крові людини виділяють РНК, переводять її за допомогою зворотної транскриптази в кДНК форму і лише потім в ПЛР-машині починають ампліфікацію вірусних кДНК фрагментів.

ДНК-затравки для виявлення ретровірусів. Розмноження ретровірусів вимагає роботи ферментів, які зазвичай відсутні в неінфікованих клітинах-господаря. У зв'язку з цим, дані ферменти повинні бути закодовані в геномі вірусу і експресуватися протягом розгортання життєвого циклу вірусу. Таким чином, в якості ДНК-затравок для проведення ПЛР-реакції можуть використовуватися ДНК-фрагменти, комплементарні власним генам ретровірусів: генам зворотної транскриптази, інтегрази, протеази і ін., необхідних для розмноження вірусу.



*NB! У деяких родинях РНК-вірусів присутність відповідних вірусних білків є необхідною на самих перших стадіях інфекційного циклу, що вимагає наявності упакованих в віріон полімераз та інших ферментів, необхідних для здійснення наступного циклу інфекції (цитовано за Новикова, 2007). На рисунку представлена будова вірусу імунодефіциту

людини (ВІЛ): зверніть увагу на присутність всередині вірусного капсида спеціальних вірусних білків - зворотньої транскриптази, інтегрази, протеази і ін. - необхідних для розмноження вірусу.

Мінливість РНК-вірусів. Полімерази, які каталізують реплікацію молекул РНК на РНК-матриці, і зворотня транскриптаза, яка каталізує реплікацію РНК на ДНК-матриці, - мають мінімальні можливості для виправлення помилок синтезу. В результаті, частота виникнення помилок при реплікації РНК приблизно в 10 тисяч разів вище, ніж при реплікації ДНК, і вона залежить від числа нуклеотидів, складових вірусного геному. Це означає, що геном будь-якого індивідуального РНК-вірусу буде містити одну або кілька мутацій, що відрізняють його від послідовності дикого типу даного вірусного різновиду.

Цей простий факт має далекосяжні наслідки для біології і еволюції РНК-вірусів, оскільки потомство РНК-вірусу являє собою не сукупність однорідних двійників, а суміш споріднених нуклеотидних послідовностей, згрупованих в місці їх синтезу. Ці "квазі-різновиди" РНК-вірусів є джерелом фенотипичних варіантів, які можуть швидко відповісти на тиск природного відбору. Як наслідок, РНК-віруси можуть еволюціонувати в мільйон разів швидше ніж, ДНК-організми.

У той же час висока мінливість РНК не забезпечує швидку еволюцію самих РНК-вірусів, оскільки розміри геному вірусів накладають верхні межі на високу норму помилок полімерази. Комбінація двох факторів - рівня реплікаційних помилок і розмірів геному - визначає "порог помилки", вище якого вірус не може підтримувати цілісність послідовностей своїх квазі-різновидів. В результаті, дуже мала кількість РНК-вірусів має розмір геному більше 30 кілобаз (kb), найчастіше він коливається в межах 5-15 kb. Беручи до уваги, що генетично різноманітне потомство може нести летальні мутації, що знижує потенціал для швидкої еволюційної відповіді, РНК-геноми саме цього розміру (5 – 30 kb) збалансовані нижче їх порогів помилки (цитовано за Новиковою, 2007).

Фактори, які впливають на швидкість появи мутацій в геномі вірусів. Проведені дослідження показали, що мутації в геномі вірусів з'являються внаслідок змін умов навколишнього середовища, т.т. носять адаптивний характер.

РНК-віруси мутують швидше, ніж ДНК-віруси. Однією з причин цього є те, що полімерази РНК-вірусів, порівняно з полімеразами інших організмів, є менш точними під час копіювання геному. Але, дослідження показали, що в стресових умовах віруси спроможні в кілька разів підвищувати точність роботи своїх полімераз в наслідок точкових амінокислотних замін в первинній послідовності своїх ферментів реплікації. Цей захисний механізм сприяє підтриманню стабільності геному вірусів в стресових умовах.

Другою причиною більш швидкого накопичення мутацій в геномах РНК-вірусів порівняно з ДНК-вірусами є відсутність у них механізму корегування продуктів синтезу: полімерази більшості РНК-вірусів не володіють 3'-екзонуклеазною корекційною здатністю (на відміну від ДНК-вірусів). Крім того, віруси не використовують пост-реплікативну міс-мач репарацію знов синтезованих полінуклеотидних ланцюгів.

Значним джерелом мутацій в геномах вірусів є редагування вірусних іРНК ферментними системами едитосом клітини-господаря (АРОВЕС і ін.), які призводять до накопичення мутацій в геномі вірусів; гіпернакопичення мутацій в вірусному геномі призводить до втрати інфекційності вірусу і, таки чином, захищає організм господаря. Однак, АРОВЕС також може забезпечувати появу помірної кількості мутацій, сумісних з життєздатністю вірусів. Таким чином, внутрішньоклітинний АРОВЕС-механізм з одного боку - може призводити до інактивації вірусів, а з іншого боку - сприяти появі розмаїття вірусів і їх еволюції.

Геноми одноланцюгових вірусів більш швидко мутують внаслідок їх більш високої чутливості до оксидативного стресу порівняно з геномами двохланцюгових вірусів. Крім того, відмінності в швидкості появи мутацій між одно- і двох ланцюговими ДНК-вірусами пов'язані з тим, що в геномі одноланцюгових вірусів немає ділянки GATC: метилювання цієї

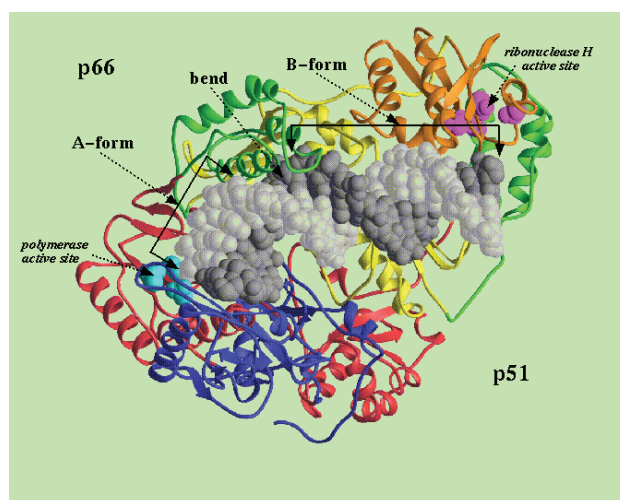
ділянки дозволяє клітинним системам, які забезпечують міс-матч репарацію, відрізнити матричний ланцюг ДНК від знову синтезованого ланцюга ДНК і провести його репарацію (mismatch repair). Уникнення вірусами GATC послідовностей, мабуть, є наслідком селекції на високу швидкість мінливості.

Була також встановлена негативна кореляція між розмірами геному вірусу і швидкістю появи мутацій: чим більшим є геном вірусу - тим менше швидкість появи в ньому мутацій. Віруси з маленькими геномами мутовують швидше, ніж віруси з великими геномами. Можливою причиною цього феномена є те, що маленькі віруси активують клітинні противірусні захисні механізми для своєї вигоди (заражена клітина зупиняється в S-фазі клітинного циклу, що створює оптимальні умови для розмноження вірусів). Однак, активація цих механізмів супроводжується роботою ДНК-полімерази з низькою точністю копіювання - що може забезпечувати високу швидкість появи мутацій у малорозмірних вірусів (за Sanjuan & Domingo-Calap, 2016).

Крім того, значну роль в розмаїтті РНК-транскриптів відіграють також рекомбінація вірусів і обмін вірусними сегментами (реасортмент) (за Elena et al., 2000).

Формування стійкості вірусів до антивірусних лікарських препаратів (на прикладі вірусу ВІЛ). В якості анти-ВІЛ лікарських препаратів використовуються речовини, які вибірково порушують роботу вірусних білків, необхідних для розмноження вірусу ВІЛ, таких як зворотня транскриптаза, інтеграза, протеаза і т.н. Але, тривале використання противірусних препаратів певного типу призводить до розвитку резистентності вірусів до лікування. З чим пов'язаний розвиток нечутливості вірусів ВІЛ до лікарських препаратів?

В організмі ВІЛ-інфікованої людини, яка не отримує антиретровірусну терапію, реплікація ВІЛ відбувається з величезною швидкістю, з утворенням мільйонів нових вірусних частинок щодня. Оскільки фермент зворотня транскриптаза припускається помилок під час синтезу провірусної ДНК, то на етапі зворотної транскрипції циклу реплікації вірусу утворюється певна кількість штамів з випадковими мутаціями. Багато мутантних штамів є нежиттєздатними, але деякі мутації роблять вірус резистентним до дії ретровірусних лікарських препаратів. Іншими словами, з'являються віруси зі зміненими генами, що кодують зворотню транскриптазу, інтегразу або протеазу, зі зниженою чутливістю до одного або декількох антиретровірусних препаратів. Резистентність до лікарських препаратів обумовлена структурними змінами молекул цих ферментів, які зменшують ступінь зв'язування ферменту з даними препаратами (за матеріалами Виїзного навчального семінару з лікування дітей з ВІЛ-інфекцією для лікарів-фахівців Вірменії, Білорусі, Грузії, Молдови та України, 18-20 червня 2013 р.).



Структура білка зворотної транскриптази вірусу ВІЛ-1 в комплексі з молекулою ДНК. На схемі вказані сайти з полімеразною і рибонуклеазною активністю білка зворотної транскриптази (за

http://www3.cabm.rutgers.edu/~kalyan/RT_imgs/rtd.html). Зворотню транскрипцію з РНК в ДНК супроводжує високий рівень помилок, що відрізняє зворотню транскриптазу від інших ДНК-полімераз. Ці помилки можуть призводити до мутацій, що відповідають за формування стійкості вірусів до лікарських препаратів (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Встановлення причин резистентності вірусу до інгібіторів з різними мішенями дії (на прикладі вірусу ВІЛ). Для встановлення причин резистентності вірусу до противірусних препаратів певного типу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ампліфікують виділений з плазми крові вірусний ген - мішень цього інгібітору. Потім, за допомогою секвенування, встановлюють нуклеотидну послідовність даного гена, а на підставі отриманої нуклеотидної послідовності - визначають послідовність амінокислот в даному вірусному білку. Далі отриману амінокислотну послідовність білка вірусу, виділеного з плазми крові пацієнта, порівнюють з «еталонними» амінокислотними послідовностями білків вірусу дикого типу (тобто, вірусу, який не володіє резистентністю до лікарських препаратів), виявляючи наявність відомих мутацій резистентності.

На сьогоднішній день виявлено більше 50 замін амінокислот, що забезпечують резистентність вірусу ВІЛ до препаратів; ці мутації можуть виявлятися окремо або в комбінаціях. Таким чином, існує величезна кількість різних поєднань цих мутацій, і для того, щоб зробити правильні висновки про чутливість вірусу до лікарських препаратів, необхідно використовувати складні комп'ютерні алгоритми (системи інтерпретації даних) (наприклад, див. базу даних Стенфордського університету (Stanford Database) на сайті <http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>).

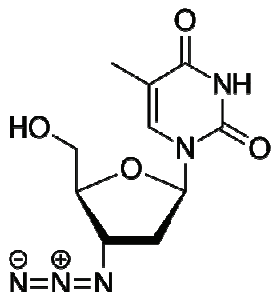
Для позначення мутацій застосовуються літеро-цифрові поєднання типу «літера-число-літера», наприклад, «M184V». Перша літера позначає амінокислоту, яка присутня у нерезистентних вірусів, а друга літера позначає амінокислоту, яка присутня у резистентного вірусу. Число вказує положення даної амінокислоти в вірусному білку. Таким чином, абревіатура «M184V» означає, що у вірусу сталася мутація в 184-ій амінокислоті білка зворотньої транскриптази, в результаті якої амінокислота метіонін (M) - 184-я амінокислота білка зворотньої транскриптази у вірусів дикого типу, що не володіють резистентністю до препаратів, була замінена на амінокислоту валін (V), що забезпечило резистентність високого рівня до противірусного препарату ламівудину. Запис «M184M/V» позначає змішану популяцію вірусів (тобто в ході дослідження були виявлені обидва варіанти вірусу - мутантний вірус і вірус дикого типу).

Кількість мутацій, виявлених в популяції виділеного з крові пацієнта вірусу, в цілому відображає тривалість активної реплікації вірусу протягом лікування. Якщо знати, які саме мутації цієї категорії присутні в популяції вірусу, і їх кількість, то можна передбачити ймовірну ефективність препаратів цієї групи. Абакавір, тенофовір, діданозин, ставудін і зидовудин зберігають антиретровірусну активність в присутності однієї або двох мутацій, але активність цих препаратів різко знижується, якщо мутацій стає більше трьох або чотирьох. Цікаво відзначити, що у одного і того ж пацієнта мутації K65R і L74V у вірусі ВІЛ - одночасно невідомі. (за матеріалами Виїзного навчального семінару з лікування дітей з ВІЛ-інфекцією для лікарів-фахівців Вірменії, Білорусі, Грузії, Молдови та України, 18-20 червня 2013 р.).

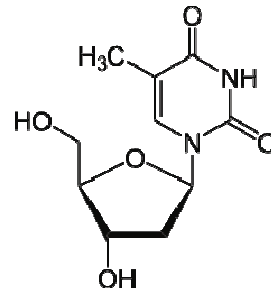
Резистентність до нуклеозидних та нуклеотидних аналогів інгібіторів зворотньої транскриптази. Нуклеозидні і нуклеотидні інгібітори зворотньої транскриптази сприяють обриванню ланцюга ДНК, який синтезується, оскільки після їх вбудовування через відсутність групи 3'ОН - припиняється приєднання інших нуклеозидів (нуклеотидів) до ланцюга ДНК (за <http://lifebio.wiki/>).

Виявлені в зворотній транскриптазі вірусу ВІЛ мутації, які забезпечують стійкість вірусів до лікарських препаратів даного типу, впливають на три різні процеси. По-перше, такі мутації, як M184V і K65R, здатні зменшувати ступінь зв'язування лікарського препарату з активним центром зворотньої транскриптази. По-друге, деякі мутації, такі, як L74V,

змінюють конфігурацію молекули зворотньої транскриптази, в якій до неї приєднана молекула вірусної РНК (служить матрицею для синтезу провірусної ДНК). Нарешті, третя група мутацій, що забезпечують стійкість до даного типу протівірусних препаратів - здатні прискорювати від'єднання антиретровірусних препаратів, які вбудувалися в ланцюг провірусної ДНК під час його синтезу, що дозволяє вірусу продовжити перерваний цикл реплікації.



Структура молекули зидовідину - лікарського препарату, аналога нуклеозидів, який використовується для пригнічення роботи зворотньої транскриптази вірусу ВІЛ (відсутність ОН-групи на залишку дезоксирибози - перешкоджає приєднанню наступного нуклеозиду і зупиняє ріст ланцюга ДНК) (https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcriptase).



Структура молекули тимідину - дезоксирибонуклеозиду, задіяного в побудові молекули ДНК (за <https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleoside>).

Резистентність до нуклеозидних інгібіторів зворотньої транскриптази.

Препарати цієї групи зв'язуються з дуже маленьким ділянкою молекули зворотньої транскриптази (з т.зв. гідрофобною «кишенею»), яка розташовується за межами домену зв'язування ферменту з аналогами нуклеозидів. З цієї причини мутації, що забезпечують резистентність вірусу до одного з препаратів цієї групи, також забезпечують резистентність і до інших протівірусних препаратів зазначеного типу (за Матеріалами Виїзного навчального семінару з лікування дітей з ВІЛ-інфекцією для лікарів-фахівців Вірменії, Білорусі, Грузії, Молдови та України, 18-20 червня 2013 р.).

Ненуклеозидні інгібітори порушують роботу зворотньої транскриптази за рахунок зв'язування або з її алостеричною (регуляторною) ділянкою, або з її активною каталітичною ділянкою. Зв'язування цих інгібіторів зі зворотною транскриптазою зупиняє реплікацію вірусів ВІЛ через запобігання копіюванню молекул РНК у вигляді молекул ДНК. Препарати даної групи називаються ненуклеозидними інгібіторами, тому що вони діють на тих же стадіях процесу, що і нуклеозидні аналоги, але іншим чином (за <http://www.studfiles.ru/preview/5242598/page:54/>; <http://lifebio.wiki/>).

Завдання 1. Виявлення присутності вірусів в організмі господаря за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

1) У чому полягає сутність методу полімеразної ланцюгової реакції? _____

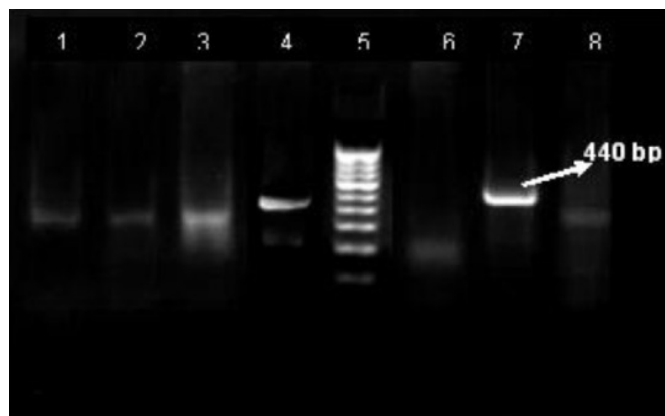
2) За допомогою якого ферменту можна РНК вірусу ВІЛ перевести в кДНК? _____

3) Яку ДНК-затравку необхідно використовувати для проведення ПЛР-реакції, якщо необхідно виявити інфікування вірусом ВІЛ? _____

4) Для чого після проведення ПЛР-реакції - фрагменти кДНК піддають електрофорезу? _____

5) На рисунку наведено результат електрофорезу фрагментів кДНК, отриманих при дослідженні зразків крові здорових і заражених вірусом ВІЛ немовлят. Лінія 1 на електрофорезі - відповідає негативному контролю, а лінія 7 - позитивному контролю. З якою метою в експерименті обов'язково ставлять негативний і позитивний контролю? _____

6) Чому дослідники зробили висновок про те, що лінія 4 на електрофорезі відповідає зразку крові немовляти, інфікованого вірусом ВІЛ? _____



Результати електрофорезу фрагментів провірусної кДНК дозволяють виявити факт зараження немовлят вірусом ВІЛ. Де: лінія 1 - негативний контроль; лінії 2 і 3 - результати аналізу крові здорових немовлят; лінія 4 - результат аналізу крові немовляти, зараженого вірусом ВІЛ (маса ампліфікованого фрагмента вірусної кДНК 440 bp); лінія 5 - фрагменти ДНК різної маси з кроком в 100 bp; лінія 6 - результат аналізу крові здорового немовляти (негативний контроль); лінія 7 - позитивний контроль; лінія 8 - негативний ПЛР-контроль; bp – пари нуклеотидів (за Ahir et al., 2013).

Завдання 2. Формування стійкості вірусів до антивірусних лікарських препаратів на прикладі вірусу ВІЛ

1) До якої групи вірусів відноситься вірус ВІЛ? _____

2) Яку роль відіграє білок зворотня транскриптаза в життєвому циклі ретровірусів? _____

3) Який механізм дії противірусних препаратів, які використовуються для лікування хворих на СНІД? _____

4) Поява стійкості до противірусних препаратів пов'язана з точковими мутаціями в вірусних генах, які кодують зворотню транскриптазу, інтегразу, протеазу та інші білки, необхідні вірусу ВІЛ для розмноження. Який механізм появи точкових мутацій в геномі вірусу ВІЛ?

В яких умовах швидкість мутагенезу в геномі вірусів зростає? _____

5) За допомогою якого методу можна виявити мутації в геномі вірусів? _____

6) На схемах 1 і 2 наведені результати дослідження мутантних штамів вірусу ВІЛ, які придбали стійкість до противірусних препаратів. Використовуючи дані схеми, заповніть таблиці 1 і 2. NB! У таблиці № 1 розглянуто приклад мутацій для препарату абакавір.

Схема 1. Мутації в зворотній транскриптазі вірусу ВІЛ, які забезпечують стійкість вірусу до нуклеозидних і нуклеотидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази (за Johnson et al., 2011).

MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (nRTIs)^a

Multi-nRTI Resistance: 69 Insertion Complex^b (affects all nRTIs currently approved by the US FDA)

M	A	▼ K	L	T	K
41	62	69 70	210 215 219		
L	V	Insert R	W	Y	Q
			F	E	

Multi-nRTI Resistance: 151 Complex^c (affects all nRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)

A	V	F	F	Q
62	75 77	116	151	
V	I	L	Y	M

Multi-nRTI Resistance: Thymidine Analogue-Associated Mutations^{d,e} (TAMs; affect all nRTIs currently approved by the US FDA)

M	D	K	L	T	K
41	67	70	210 215 219		
L	N	R	W	Y	Q
			F	E	

Abacavir ^{f,g}	K	L	Y	M
65	74	115	184	
R	V	F	V	

Didanosine ^{a,h}	K	L		
65	74			
R	V			

Emtricitabine	K			M
65			184	
R			V	I

Lamivudine	K			M
65			184	
R			V	I

Stavudine ^{d,e,g,i,j,k}	M	K	D	K	L	T	K
41	65	67	70	210 215 219			
L	R	N	R	W	Y	Q	
				F	E		

Tenofovir ^l	K	K		
65	70			
R	E			

Zidovudine ^{d,e,i,j,k}	M	D	K	L	T	K
41	67	70	210 215 219			
L	N	R	W	Y	Q	
			F	E		

Схема 2. Мутації в зворотній транскриптазі вірусу ВІЛ, які забезпечують стійкість вірусу до ненуклеозидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази (за Johnson et al., 2011).

Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{a,m}

Efavirenz	L	K	K	V	V	Y	Y	G	P
100 101 103 106 108	181	188 190	225						
	I	P	N	M	I	C	L	S	H
			S			I	A	A	

Etravirine ⁿ	V	A	L	K	V	E	V	Y	G	M
90 98 100 101	106	138	179 181	190	230					
	I	G	I*	E	I	A	D	C*	S	L
			H			A	F	I*	A	
			P*			Q	T	V*		

Nevirapine	L	K	K	V	V	Y	Y	G
100 101 103 106 108	181	188 190						
	I	P	N	A	I	C	C	A
			S	M		I	L	H

Rilpivirine ^o	K	E	V	Y	H	F	M
101	138	179 181	221	227 230			
	E	A	L	C	Y	C	I
	P	G		I			L
		K*		V			
		Q					
		R					

Де: над рядком вказано амінокислотний залишок у вихідній дикої формі зворотньої транскриптази, а під рядком - амінокислотна заміна в мутантній лінії вірусу ВІЛ, резистентній до противірусного препарату; цифра на лінії - позначає положення заміненої амінокислоти в поліпептидному ланцюзі (за Johnson et al., 2011).

Таблиця 1. Мутації в зворотній транскриптазі вірусу ВІЛ, які забезпечують стійкість вірусу до нуклеозидних і нуклеотидних аналогів інгібіторів зворотньої транскриптази.

Лікарський препарат:	Абакавір (Abacavir)	Ламівудин (Lamivudine)	Ставудин (Stavudine)	Зідовудин (Zidovudine)
Мутації, що забезпечують стійкість до препарату:	K65R L74V Y115F M184V			

Таблиця 2. Мутації в зворотній транскриптазі вірусу ВІЛ, які забезпечують стійкість вірусу до нуклеозидних аналогів інгібіторів зворотньої транскриптази.

Лікарський препарат:	Ефавіренц (Efavirenz)	Етравізин (Etravirine)	Невірапін (Nevirapine)	Рілпівірін (Ralpivirine)
Мутації, що забезпечують стійкість до препарату:				

7) Використовуючи дані таблиць 1 і 3, розшифруйте, які амінокислотні заміни забезпечили стійкість вірусів ВІЛ до противірусного препарату зідовудину (Zidovudine). Наприклад, M184V - в положенні 184 амінокислота метіонін була замінена на амінокислоту валін, що дало вірусу резистентність до лікарського препарату. _____

Таблиця 3. Відповідність латинської абрєвіатури назві амінокислоти.

<p style="text-align: center;">MUTATIONS</p> <p> Amino acid, wild-type → K L Amino acid position → 65 100 Amino acid substitution conferring resistance → R I* → Asterisk </p> <p>Де: Amino acid, wild-type - амінокислотний залишок у вихідній дикої формі вірусного білка; Amino acid substitution conferring resistance – аміно-кислотна заміна в мутантній лінії вірусу ВІЛ, яка забезпечила резистентність до дії вірусного препарату; Amino acid position – положення даної амінокислоти в поліпептидному ланцюзі; Insertion – вставки додаткових амінокислот (за Johnson et al., 2011).</p>	<p><u>Латинські абрєвіатури амінокислот:</u> A, alanine - аланін; C, cysteine - цистеїн; D, aspartate - аспарат; E, glutamate - глутамат; F, phenylalanine - фенілаланін; G, glycine - гліцин; H, histidine - гістидин; I, isoleucine - ізолейцин; K, lysine - лізин; L, leucine - лейцин; M, methionine - метіонін; N, asparagine - аспарагін; P, proline - пролін; Q, glutamine - глутамін; R, arginine - аргінін; S, serine - серин; T, threonine - треонін; V, valine - валін; W, tryptophan - триптофан; Y, tyrosine - тирозин.</p>
---	--

8) Використовуючи дані таблиць 1 і 2 вкажіть, на якій ділянці амінокислотної послідовності білка зворотної транскриптази повинні відбутися амінокислотні заміни для появи стійкості вірусу ВІЛ до противірусних препаратів:

а) нуклеозидних і нуклетидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази _____

б) ненуклеозидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази _____

Чим викликані дані відмінності? _____

9) Який механізм дії противірусних препаратів - нуклеозидних і нуклеотидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази? _____

10) Який механізм дії противірусних препаратів - ненуклеозидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази? _____

11) Чому мутації стійкості до нуклеозидних і ненуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази знаходяться на різних ділянках білкової молекули зворотної транскриптази? _____

Завдання 3. Фактори, які впливають на швидкість накопичення мутацій в геномі вірусів

1) Проаналізуйте дані, наведені в таблиці, і зробіть висновок про те:

а) як впливає тип вірусу (РНК - ДНК віруси) на швидкість появи мутацій _____

б) як впливає кількість ланцюгів вірусу (одно-дволанцюгові віруси) на швидкість появи мутацій _____

в) як впливає розмір генома вірусу на швидкість появи мутацій: _____

2) Перерахуйте, від яких ще факторів залежить швидкість появи мутацій в геномі вірусів: _____

Таблиця. Швидкість появи мутацій у різних вірусів (за Sanjuan & Domingo-Calap, 2016).

Клас вірусу:	Вірус:	Розмір геному, кб:	Середня швидкість накопичення мутацій:
ss(+)RNA	Бактеріофаг Q β	4,22	1,4 x 10 ⁻⁴
	Вірус тютюнової мозаїки	6,40	8,7 x 10 ⁻⁶
	Ріновірус людини 14	7,13	6,9 x 10 ⁻⁵
	Поліовірус 1	7,44	9,0 x 10 ⁻⁵
	Норовірус людини G1	7,65	1,5 x 10 ⁻⁴
	Тютюновий вірус	9,49	1,2 x 10 ⁻⁵
	Вірус гепатиту С	9,65	3,8 x 10 ⁻⁵
	Вірус мишачого гепатиту	31,4	3,5 x 10 ⁻⁶
ss(-)RNA	Вірус везикулярного стоматиту	11,2	3,7 x 10 ⁻⁵
	Вірус грипу А	13,6	2,5 x 10 ⁻⁵
	Вірус кору	15,9	3,5 x 10 ⁻⁵
dsRNA	Бактеріофаг Ф6	13,4	1,6 x 10 ⁻⁶
	Качиний вірус гепатиту В	3,03	2,0 x 10 ⁻⁵
	Вірус некрозу селезінки	7,80	3,7 x 10 ⁻⁵

Reverse transcribing	Мишачий вірус лейкемії	8,33	3,0 x 10 ⁻⁵
	Бичачий вірус лейкемії	8,42	1,7 x 10 ⁻⁵
	Вірус лейкемії Т-клітин людини	8,50	1,6 x 10 ⁻⁵
	Вірус ВІЛ-1 (вільні віріони)	9,18	6,3 x 10 ⁻⁵
	Вірус ВІЛ-1 (клітинна ДНК)	9,18	4,4 x 10 ⁻³
	Foamy virus	13,2	2,1 x 10 ⁻⁵
	Вірус саркоми Рауса	9,40	1,4 x 10 ⁻⁴
ssDNA	Бактеріофаг ФХ174	5,39	1,1 x 10 ⁻⁶
	Бактеріофаг m13	6,41	7,9 x 10 ⁻⁷
dsDNA	Бактеріофаг λ	48,5	5,4 x 10 ⁻⁷
	Вірус герпесу	152	5,9 x 10 ⁻⁸
	Бактеріофаг T2	169	9,8 x 10 ⁻⁸
	Цитомегаловірус людини	235	2,0 x 10 ⁻⁷

Де: ss(+)RNA – одноланцюговий РНК-вірус позитивної полярності; ss(-)RNA – одноланцюговий РНК-вірус негативної полярності; dsRNA Reverse transcribing – дволанцюговий РНК-вірус зі зворотньою транскрипцією; ssDNA – одноланцюговий ДНК-вірус; dsDNA – дволанцюговий ДНК-вірус (за Sanjuan & Domingo-Calap, 2016).

Частина 2. Рекомбінація ДНК у вірусів

Рекомбінація у вірусів. При зараженні клітини двома спорідненими вірусами можливий обмін генетичним матеріалом, в результаті чого виникають гібридні віруси. Цей процес називають рекомбінацією (а гібридні віруси - рекомбінантами), якщо має місце ковалентне вбудовування ділянок геному одного вірусу в генوم іншого; або реасортацією (а гібридні віруси - реасортантами), якщо в процесі беруть участь віруси з сегментованим геномом і відбувається обмін геномними сегментами (за <http://humbio.ru/humbio/vir1pdd/00091fd4.htm>).

Віруси, геном яких представлений лінійною молекулою ДНК, використовують механізм інтрамолекулярної рекомбінації, відомий як механізм «розрив - возз'єднання». Віруси з сегментованим геномом (ортоміксовіруси, реовіруси, буньявіруси, аренавіруси) використовують механізм випадкового пересортування сегментів (генів) без розриву ковалентних зв'язків.

Механізм «розрив - возз'єднання» вперше був сформульований А. Херші в зв'язку з аналізом потомства змішаного зараження h- та r-мутантами фага T2. Виявивши, що в цьому потомстві крім вірусних частинок двох батьківських генотипів присутні частинки h+r+ і h-r-, він припустив, що геном вірусу складається з розташованих в лінійному порядку генів, кожен з яких несе генетичну інформацію про будь-яку ознаку вірусу. При змішаному зараженні бактеріальної клітини два «співіснуючих» вірусних геноми спроможні обмінюватися між собою гомологічними ділянками в результаті розриву двох лінійних структур в точно відповідних точках між генами, що визначають r+- і h+- ознаки, і подальшого перехресного возз'єднання фрагментів. Таке перехрещення або кросинговер генетичного матеріалу може відбуватися в будь-якій точці двох різних генетичних структур.

Гіпотеза «розрив - возз'єднання» була підтверджена пізніше на дослідах по змішаному зараженню міченим вірусом. R. Holliday, H. Potter, D. Dressier запропонували універсальну модель одно- і двохланцюгового обміну між двома лінійними молекулами, згідно з якою рекомбінація - це складний багатоетапний процес, який починається з розриву ланцюгів ДНК кожного партнера за допомогою нуклеаз. На цьому місці відбувається перехрещення ланцюгів і зшивання кінців, потім точки схрещування переміщуються за рахунок розплітання і сплетення спіралей і обертаються навколо точки перетину, створюючи при цьому симетричну структуру - «хі»-інтермедіат. Залежно від того, на яку вісь інтермедіата (вертикальну або горизонтальну) діють нуклеази, рекомбінант, що утворюється після

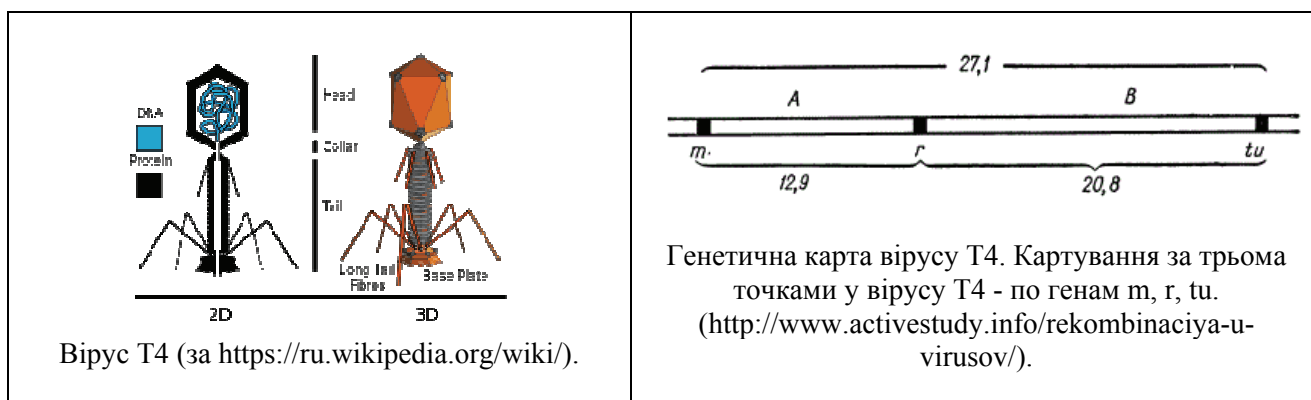
розділення і зшивання, буде гетерозиготним або по одному, або по двом ланцюгам (за http://studbooks.net/1418738/meditsina/rekombinatsiya_i_geneticheskiy_analiz_bakteriofagov).

Завдання 1. Рекомбінація у вірусів (на прикладі вірусу Т4, що заражає бактерії кишкової палички).

1) Що таке рекомбінація генома? _____

2) Який механізм появи рекомбінантних вірусів в зараженій клітині? _____

3) Вірус Т4 вражає бактерії кишкової палички. Це дволанцюговий ДНК-вірус, який використовує тільки літичний шлях розвитку (тобто, руйнування зараженої клітини), але не лізогенний. Геном вірусу Т4 повністю укладений в одну хромосому.



Існують Т4 віруси з генотипом r-m+ (тобто, з мутантним геном r-), що обумовлює появу на культурі кишкової палички великих світлих плям (зон лізису або пригнічення росту бактерій), і віруси Т4 з генотипом r+m- (т.т., з мутантним геном m-), які зумовлюють появу маленьких темних плям зон лізису бактерій.

Культуру кишкової палички заражали одночасно мутантними штамми вірусів з генотипами r-m+ і r+m-. Через деякий час на культурі кишкової палички з'явилися чотири типи плям: великі світлі, маленькі темні, маленькі світлі і великі темні. Перші два типи плям відповідали вихідним мутантним вірусам r-m+ і r+m-, а два останні, вочевидь, мали нове поєднання генів r-m- і r+m+ (за <http://www.activestudy.info/rekombinaciya-u-virusov/>).

А) Гени r і m розташовуються на одній хромосомі вірусу Т4 (див. рис). Намалуйте схеми розташування генів r і m у всіх чотирьох ліній вірусу Т4 і підпишіть відповідний морфологічний тип колоній кишкової палички, який формується:

Вірус з генотипом r-m+	Вірус з генотипом r+m-	Вірус з генотипом r-m-	Вірус з генотипом r+m+
На культурі кишкової палички - великі світлі плями	На культурі кишкової палички	На культурі кишкової палички	На культурі кишкової палички

Б) Поясніть, яким чином стала можливою поява штамів вірусів з генотипами r-m- і r+m+? _____

Контрольні питання:

1. Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій.
2. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення інфікування організму хазяїна вірусами.
3. ДНК-затравки для виявлення ретровірусів.
4. Мінливість РНК-вірусів.
5. Фактори, які впливають на швидкість появи мутацій в геномі вірусів.
6. Формування стійкості вірусів до антивірусних лікарських препаратів (на прикладі вірусу ВІЛ).
7. Встановлення причин резистентності вірусу до інгібіторів з різними мішенями дії (на прикладі вірусу ВІЛ).
8. Резистентність до нуклеозидних та нуклеотидних аналогів інгібіторів зворотної транскриптази.
9. Резистентність до нунуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази.
10. Рекомбінація у вірусів.

Література:

Матеріали Выездного обучающего семинара по лечению детей с ВИЧ-инфекцией для врачей-специалистов Армении, Беларуси, Грузии, Молдовы и Украины, 18-20 июня 2013 г

Новикова Н.А. Хранение и реализация генетической информации вирусом. Учебно-методические материалы по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах». Нижний Новгород. 2007. 84 с.

Ahir S.P., Chavan V., Kerkar S., Samant-Mavani P., Nanavati R., Mehta P.R., Mania-Pramanik J. Antiretroviral treatment, viral load of mothers & perinatal HIV transmission in Mumbai, India // Indian J. Med. Res. – 2013. – Vol. 138(2). – P. 201 – 208.

Elena S.F., Miralles R., Cuevas J.M., Turner P.E., Moya A. The two faces of mutation: extinction and adaptation in RNA viruses. // IUBMB Life. – 2000. – Vol. 49(1). – P. 5 - 9.

Johnson V.A., Calvez V., Günthard H.F., Paredes R., Pillay D., Shafer R., Wensing A.M., Richman D.D. 2011 Update of the drug resistance mutations in HIV-1 // Top Antivir. Med. – 2011. – Vol. 19(4). – P. 156 - 164.

Sanjuan R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation // Cell. Mol. Life Sci. – 2016. – Vol. 73(23). – P. 4433 - 4448.

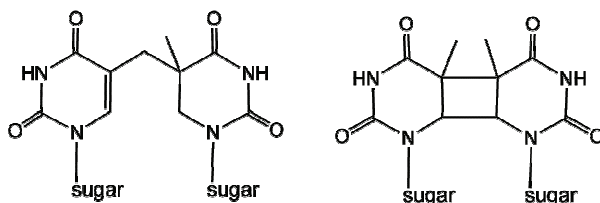
Заняття 2

Тема: Репарація ДНК

Частина 1. Фоторепарація молекул ДНК. ДНК-фотоліази.

Механізм пошкодження молекул ДНК ультрафіолетовими променями.

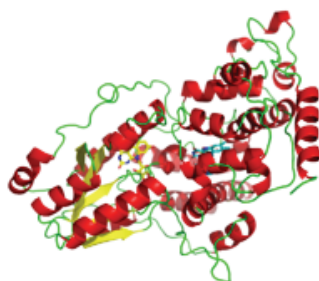
Ультрафіолетове випромінювання вибірково поглинається молекулами ДНК і призводить до появи в ДНК зшивок між сусідніми азотистими основами. Ці зшивки перешкоджають правильному зчитуванню молекул ДНК в процесах трансляції та реплікації, що може призводити до розвитку патологічних процесів в клітинах.



Зшивки між сусідніми азотистими основами в молекулі ДНК після впливу ультрафіолетового випромінювання. Зліва: 6,4-фотопродукт (6,4-PP). Справа: циклобутановий димер (CD) (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Репарація пошкоджень ДНК, викликаних ультрафіолетовим випромінюванням.

ДНК-фотоліази. ДНК-фотоліази – це ферменти репарації ДНК, активація яких відбувається під дією видимого світла. ДНК-фотоліази різних типів видаляють фотопродукти і піримідин-піримідинові димери (тобто димери між сусідніми залишками тиміну і цитозину: Т = Т, Ц = Ц і Т = Ц), що утворюються в молекулі ДНК під дією короткохвильового УФ-випромінювання. Процес, в якому беруть участь ці ферменти, називається фотореактивацією. Такі фотореактивуємі ферменти є у бактерій і нижчих еукаріотичних організмів, але в клітинах плацентарних ссавців вони не виявлені (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).



ДНК-фотоліаза (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

При опроміненні клітин ультрафіолетовим світлом в їх ДНК утворюються або циклобутанові димери між сусідніми піримідиновими основами, або піримідинові фотопродукти, такі як 6,4-PP. Такі сполуки блокують реплікацію ДНК, і для збереження життєздатності клітини їх необхідно видаляти. Один із способів видалення піримідинових димерів полягає в ферментативному перетворенні їх в мономери при освітленні видимим світлом в діапазоні довжин хвиль 300 - 600 нм. ДНК-фотоліаза утворює стабільний комплекс з піримідиновим димером і, використовуючи енергію поглиненого світла, руйнує димер без розриву ланцюгів ДНК.

Фотоліази були знайдені у прокариот і у еукаріот (у найпростіших, грибів (дріжджів), у деяких видів комах і у хребетних тварин, крім плацентарних ссавців). У плацентарних ссавців (в т.ч. у людини) фотоліази відсутні. Вони були втрачені приблизно 113-95,3 млн.р.т. в епоху панування динозаврів, коли древнім ссавцям доводилося вести нічний спосіб життя. Тому, втрата фотоліаз не перебувала під селективним тиском факторів навколишнього середовища і пройшла, мабуть, «непоміченою» у древніх плацентарних ссавців. Сьогодні у

цієї групи організмів відновлення УФ пошкоджених ділянок ДНК здійснюють ферменти ексцизійної репарації (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 1. Фоторепарація пошкоджень ДНК, викликаних ультрафіолетовим випромінюванням.

- 1) Який тип пошкоджень ДНК викликають ультрафіолетові промені? _____
- 2) Чому поява цього типу пошкоджень є небезпечною для клітин? _____
- 3) Які ферменти здійснюють репарацію даного типу пошкоджень ДНК? _____
- 4) У плацентарних ссавців фермент ДНК-фотоліаза не був виявлений. За рахунок яких ферментів клітини плацентарних ссавців ліквідують УФ-індуковані пошкодження ДНК? _____
- 5) Дослідження механізмів репарації ДНК у рослин після УФ пошкодження показало, що вплив УФ-випромінювання на рослини в темному приміщенні – призводить до загибелі рослин, але якщо експеримент проводити в освітленому приміщенні - то рослини виявляються не чутливими до навіть дуже високих доз ультрафіолетового випромінювання. Поясніть результати даного експерименту. _____

Завдання 2. Оцінка ефективності репарації УФ пошкоджень ДНК за допомогою різних механізмів: ДНК-фотоліаз і ферментів ексцизійної репарації.

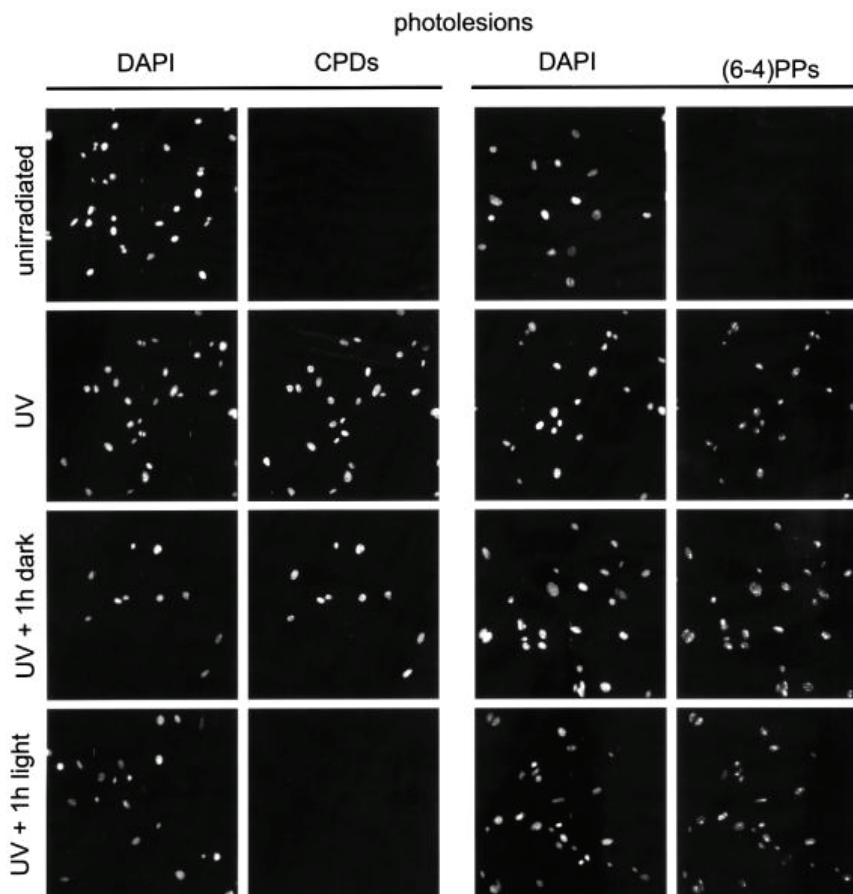
В ході еволюції плацентарні ссавці втратили CPD ДНК-фотоліази - фермент, який за рахунок енергії видимого світла каталізує ліквідацію УФ-індукованих циклобутан-піримідинових димерів (CPD) в ДНК. Втрата даного ферменту призвела до того, що плацентарні ссавці змушені використовувати інший механізм усунення пошкоджень в ДНК - механізм ексцизійної репарації.

Для встановлення ефективності репарації УФ ушкоджень за допомогою різних клітинних механізмів, Schul W. з колегами (2002) була отримана трансгенна лінія мишей, в геном яких був вбудований ген CPD ДНК-фотоліази, здатний усувати даний тип УФ-пошкоджень ДНК.

В ході подальших експериментів фібробласти отриманих трансгенних мишей експонували на УФ променях в культурі *in vitro* (див. рис.) (за Schul et al., 2002).

Проаналізуйте отримані результати і дайте відповіді на наступні питання:

- 1) Присутні чи ні CPDs і (6-4)PPs фотопошкодження ДНК в фібробластах, які не піддавалися УФ-опроміненню? _____
Чому? _____
- 2) Присутні чи ні CPDs і (6-4)PPs фотопошкодження ДНК в фібробластах, які були піддані УФ-С опроміненню в дозі 20 Дж/м²? _____
Чому? _____
- 3) Присутні чи ні CPDs і (6-4)PPs фотопошкодження ДНК в фібробластах, які були піддані УФ-С опроміненню і потім перебували в протягом 1 години в темряві? _____
Чому? _____
- 4) Присутні чи ні CPDs і (6-4)PPs фотопошкодження ДНК в фібробластах, які були піддані УФ-С опроміненню і потім перебували в протягом 1 години на світлі? _____
Чому після 1 години експозиції на світлі - CPDs фотопошкодження ДНК були відсутні в фібробластах, тоді як (6-4)PPs фотопошкодження ДНК - збереглися? _____



Фотоактивація репарації молекул ДНК після УФ-опромінення в культурі фібробластів, отриманих від трансгенних мишей, в геном яких був вбудований ген CPD ДНК-фотоліази. Де: unirradiated - неопромінені фібробласти; UV - фібробласти, опромінені УФ-С променями в дозі 20 Дж/м²; UV + 1h dark - фібробласти, експоновані після УФ-опромінення в темряві протягом 1 години; UV + 1h light - фібробласти, експоновані після УФ-опромінення на світлі протягом 1 години; DAPI - фарбування ядер фібробластів флюоресцентним барвником 4',6-diamidino-2-phenylindole, який вибірково зв'язується з ДНК; CPDs і (6-4)PPs - імуно-флюоресцентне фарбування ядер фібробластів, яке дозволяє виявити CPDs і (6-4)PPs пошкодження ДНК за допомогою специфічних антитіл до цих фотопродуктів, кон'югованих з флюоресцентною міткою (за Schul et al., 2002).

Довгострокові результати впливу УФ-опромінення на дорослих мишей різних ліній наведені на рисунку (Garinis et al., 2006). Проаналізуйте отримані графіки і дайте відповіді на наступні питання:

5) Перерахуйте лінії мишей, у яких після УФ-опромінення на 20 тижень експерименту розвинулися ракові пухлини: _____

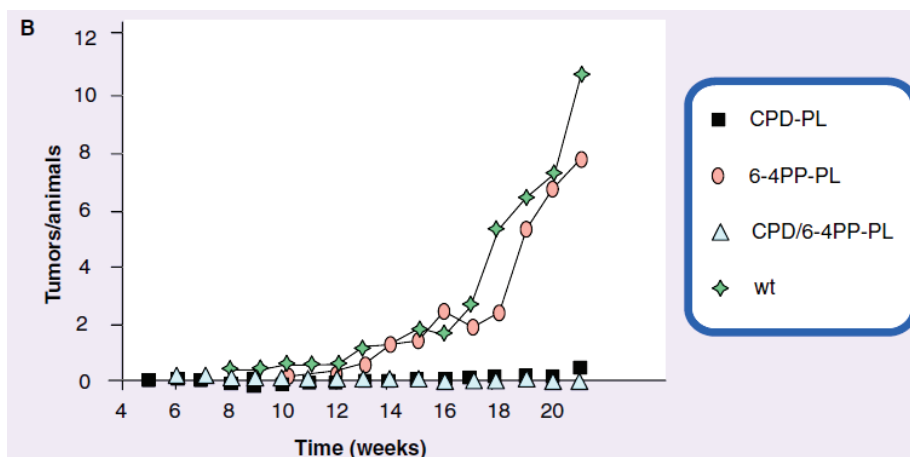
і лінії мишей, у яких ракові пухлини не були виявлені: _____

6) Чому УФ-опромінення привело до розвитку ракових пухлин у звичайних нетрансгенних мишей? _____

7) Чому у лінії CPD-PL трансгенних мишей, в геном яких був перенесений ген ДНК-фотоліази, що усуває CPD-фотопошкодження ДНК, ракові пухлини після УФ-опромінення не сформувалися? _____

8) Порівняйте результати розвитку ракових пухлин у трансгенних мишей двох ліній: мишей, в геном яких був перенесений ген ДНК-фотоліази, що усуває CPD-фотопошкодження ДНК, і мишей, в геном яких був перенесений ген, що усуває 6-4PP-фотопошкодження ДНК. Який з типів пошкодження ДНК - CPDs або (6-4)PPs - є потенційно найбільш небезпечним за можливим розвитком ракових пухлин? _____

9) Використовуючи отримані дані з розвитку ракових пухлин у трансгенних і диких мишей, зробіть висновок про ефективність усунення УФ-пошкоджень в молекулах ДНК двома репараційними системами: ДНК-фотоліазами і ферментами ексцизійної репарації ДНК _____



Середня кількість ракових пухлин, що припадають на одну тварину, у досліджених мишей після опромінення ультрафіолетом. Де: по осі ОХ - час в тижнях (Time (weeks)), що минув з початку експерименту; по осі ОУ - середня кількість пухлин, що припадає на одну тварину (Tumor/animals); 6-4PP - 6-4 фотопродукти пошкодження ДНК ультрафіолетовими променями; CPD - циклобутан-піримідинові димери; PL - фотоліаза;

- ◆ wt – звичайні не трансгенні миші;
- CPD-PL – лінія трансгенних мишей, в геном яких був перенесений ген ДНК-фотоліази, що усуває CPD-фотопошкодження ДНК ультрафіолетом;
- 6-4PP-PL – лінія трансгенних мишей в геном яких був перенесений ген ДНК-фотоліази, що усуває 6-4PP-фотопошкодження ДНК ультрафіолетом;
- ▲ CPD/6-4PP-PL – лінія трансгенних мишей, в геном яких були перенесені гени фотоліаз двох типів: тих, що усувають і CPD, і 6-4PP фотопошкодження ДНК (цитовано за Garinis et al., 2006).

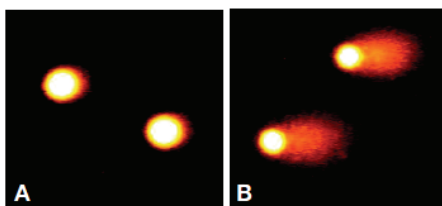
Література:

- Garinis G.A., Jans J., van der Horst G.T. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer // *Future Oncol.* – 2006. – Vol. 2(2). – P. 191 - 199.
- Schul W., Jans J., Rijksen Y.M., Klemann K.H., Eker A.P., de Wit J., Nikaido O., Nakajima S., Yasui A., Hoesjmakers J.H., van der Horst G.T. Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21(17). – P. 4719 - 4729.

Частина 2. Методи встановлення ефективності і швидкості репарації ДНК: кометний тест.

Встановлення ефективності і швидкості репарації ДНК за допомогою кометного тесту. Серед молекулярних методів виявлення розривів в ДНК одним з найбільш зручних є т.зв. кометний тест. Для проведення даного тесту предметне скло покривають м'яким легко застигаючим поживним середовищем. Потім на скло розкачують клітини тестованого організму (клітини крові, суспензію рослинних клітин і т.н.). Після цього за допомогою

м'якого детергенту розчиняють і видаляють клітинну і ядерну мембрани. В результаті на предметному склі залишається вміст ядер окремих клітин. До предметного скла під'єднують електроди. Неушкоджені молекули ДНК є досить великими і важкими, тому в електричному полі вони не рухаються і залишаються на місці. Якщо ж під впливом стресового чинника в молекулах ДНК з'явилися розриви - фрагменти ДНК починають свій рух в електричному полі. При цьому негативно заряджені фрагменти молекул ДНК починають рухатися до позитивно-зарядженого електроду. На предметне скло додають флуоресцентний барвник, який зв'язується з ДНК клітин. В результаті при дослідженні за допомогою флуоресцентного мікроскопу вчений бачить на чорному фоні яскраво-пофарбовані «голови» комет (вміст клітин з неушкодженою ДНК) і «хвости комет» - що складаються з фрагментів ДНК різного розміру. Чим більше пошкоджена ДНК клітин - тим більшим буде «хвіст у комети».



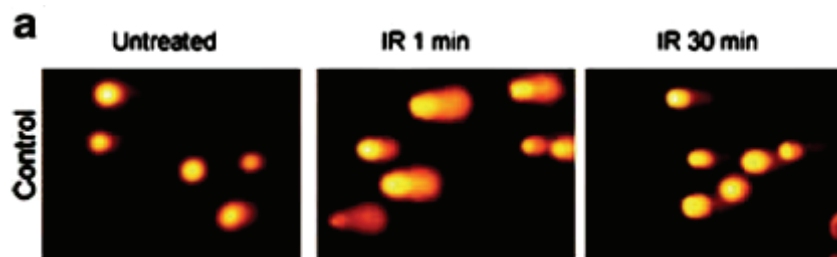
Результати кометного дослідження клітин коренів цибулі *Allium cepa* L., які зазнали впливу 800 мкМ іонів алюмінію Al^{3+} протягом 3 годин. Де: А - клітини в контрольних умовах (без обробки іонами алюмінію); В - клітини коренів після експозиції з іонами алюмінію: поява «хвостів», які світяться, свідчить про те, що іони алюмінію викликають розриви в молекулах ДНК (за Panda & Achary, 2014).

Завдання 1. Швидкість відновлення пошкоджень ДНК клітин людини після впливу іонізуючого випромінювання.

Клітини людини в культурі *in vitro* піддали дії іонізуючого випромінювання в дозі 10 Гр (за Kumar et al., 2011).

- 1) Опишіть, як провести кометний тест для того, щоб виявити появу пошкоджень в ДНК клітин людини після впливу іонізуючого випромінювання _____
- 2) З чого складається «голова комети»? _____
- 3) З чого складається «хвіст комети»? _____
- 4) На рисунку показані результати проведення кометного тесту для клітин людини, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання. Чому в контрольних умовах на склі світяться тільки «голови комет»? _____
- 5) Чому клітини, відібрані через 1 хвилину після впливу іонізуючого випромінювання, в результаті проведення тесту показали формування довгих «кометних хвостів»? _____
- 6) Яким є механізм шкідливого впливу іонізуючого випромінювання на ДНК клітин? _____
- 7) Чому у клітин людини, відібраних через 30 хвилин після впливу іонізуючого випромінювання, кометний тест вже не виявив довгих «кометних хвостів»? _____
- 8) Перерахуйте, які механізми репарації двониткових розривів ДНК використовують клітини? _____
- 9) У чому полягає сутність гомологічної рекомбінації в ході репарації двониткових розривів ДНК? _____

10) У чому полягає сутність негомологічної рекомбінації в процесі репарації двониткових розривів ДНК? _____



Кометний тест на виявлення впливу іонізуючого випромінювання в дозі 10 Гр на цілісність молекул ДНК в культурі клітин людини. Де: Untreated - світіння ядер контрольних клітин, т.т. таких, що не піддавалися дії іонізуючого випромінювання; IR 1 min – поява у ядер клітин «кометних хвостів» через 1 хвилину після впливу на ці клітини іонізуючого випромінювання в дозі 10 Гр свідчить про появу двониткових розривів в ДНК під впливом радіації; IR 30 min - відсутність «кометних хвостів» через 30 хвилин після впливу іонізуючого випромінювання свідчить про повну репарацію двониткових розривів ДНК (за Kumar et al., 2011).

Контрольні питання:

1. Типи пошкоджень молекул ДНК.
2. Шляхи репарації різних типів пошкодження молекул ДНК.
3. Екцизійна репарація ДНК.
4. Механізм пошкодження молекул ДНК ультрафіолетовими променями
5. Репарація пошкоджень ДНК, викликаних ультрафіолетовим випромінюванням. ДНК-фотоліази
6. Встановлення ефективності і швидкості репарації ДНК за допомогою кометного тесту.

Література:

Kumar A., Oskouian B., Fyrst H., Zhang M., Paris F., Saba J.D. S1P lyase regulates DNA damage responses through a novel sphingolipid feedback mechanism // Cell Death Dis. – 2011. – Vol. 2(2): e119. doi: 10.1038/cddis.2011.3 PMID: PMC3101703.

Panda B.B., Achary V.M.M. Mitogen-activated protein kinase signal transduction and DNA repair network are involved in aluminum-induced DNA damage and adaptive response in root cells of *Allium cepa* L. // Front. Plant Sci. – 2014. – Vol. 5: 256. doi: 10.3389/fpls.2014.00256 PMID: PMC4046574.

Частина 1. Генетичні і епігенетичні причини порушення репарації ДНК

Порушення роботи ДНК-репараційної системи клітин. Близько 169 білків беруть участь в процесах репарації ДНК. Неробочий стан генів, які забезпечують репарацію молекул ДНК в клітинах організму, у великому відсотку випадків призводить до розвитку патологій. Серед таких порушень роботи організму - ракове переродження клітин, передчасне старіння організму, пігментна ксеродерма та ін.

При цьому неробочий стан генів репарації ДНК може бути пов'язаний як з точковими мутаціями в первинній нуклеотидній послідовності, так і з епігенетичним замовчуванням роботи генів репарації ДНК. Проведені дослідження показали, що не більше 6% випадків відключення репараційних систем пов'язані з точковими мутаціями. Основною причиною дисфункції репараційних систем є або епігенетичне відключення генів репарації, або – епігенетичне гіперактивування генів, які гальмують роботу репараційних систем.

Наприклад, в 119 випадках розвитку колоректального раку у пацієнтів була виявлена дисфункція міс-мач репараційної системи ДНК через неробочий стан гена PMS2. Тільки у 6 пацієнтів неробочий стан даного гена був пов'язаний з мутацією в цьому гені. В інших 103 випадках - недостатність функцій гена була викликана епігенетичною репресією гена MLH1 - партнера для гена PMS2. У різних пацієнтів ген був зарепресований епігенетично різними способами: за рахунок метилювання його промотора, за рахунок епігенетичної надекспресії регуляторних молекул microRNA і miR-155, які знижують активність гена MLH1 (за https://en.wikipedia.org/wiki/O-6-methylguanine-DNA_methyltransferase).

Як можна за допомогою методів молекулярної біології встановити, в якому стані знаходиться промотор гена-інтересу: в робочому або в відключеному, внаслідок його метилювання? Зі зразка тканин виділяють всю ДНК. Потім за допомогою полімеразної ланцюгової реакції накопичують в пробірці ген-інтересу, використовуючи в якості ДНК-затравки - послідовність, що розпізнає метильований промотор гена-інтересу. Після проведення електрофорезу на платівці гелю виявляють смуги, які відповідають фрагментам метилованого промотора гена-інтересу.

Завдання 1. Відключення генів, які відповідають за репарацію ДНК, сприяє раковому переродженню клітин.

1) Зразки тканин 113 пацієнтів, хворих на колоректальний рак, були досліджені Halford S. з колегами (2005) на наявність синтезу білка MGMT, який бере участь у репарації молекул ДНК. *NB! MGMT (O6-метилгуанін метилтрансфераза) - це білок, який в клітинах людини забезпечує репарацію спонтанної мутації метилгуаніна в гуанін, що захищає клітини від помилок під час реплікації і транскрипції молекул ДНК (за https://en.wikipedia.org/wiki/O-6-methylguanine-DNA_methyltransferase).

За допомогою якого методу можна встановити синтезується чи ні конкретний білок в клітинах організму? _____

2) У чому полягає сутність методу двомірного гель-електрофорезу білків? _____

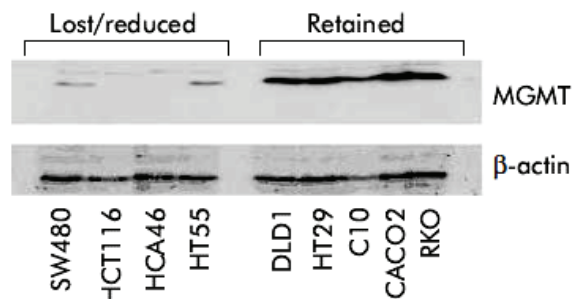
3) За допомогою якого методу на платівці гелю серед тисяч білків можна виявити білки MGMT? _____

4) Результати двомірного гель-електрофорезу клітинних білків із зразків пухлин для 9 випадків колоректального раку наведені на рисунку. Перерахуйте, для яких пацієнтів було

виявлено припинення або редукцію експресії білка MGMT, який бере участь у репарації ДНК: _____

Перерахуйте, для яких пацієнтів було показано збереження експресії білка MGMT: _____

Поясніть, для чого на схемі крім експресії білка MGMT наведений також рівень експресії клітинного цитоскелетного білка β -актина? _____



Інтенсивність синтезу білка MGMT в різних клітинних лініях колоректального раку. Де: SW480, HCT116, HCA46, HT55, DLD1, HT29, C10, CACO2, RKO - зразки пухлин 9 різних онкохворих на колоректальний рак; MGMT - білок, який бере участь в репарації ДНК; β -actin – клітинний цитоскелетний білок β -актин, який використовувався в якості контролю клітинної експресії білків; Retained - збереження експресії білка; Lost / reduced - повне припинення або редукція експресії білка (за Halford et al., 2005).

4) В результаті аналізу зразків тканин 113 онкологічних хворих в більш ніж 50% випадків було виявлено, що розвиток колоректального раку корелював з пригніченням або з повним припиненням синтезу білка MGMT, який бере участь у репарації ДНК. Поясніть, чому більше ніж у половини пацієнтів припинення синтезу бека, який бере участь у репарації ДНК - призвело до розвитку злоякісної пухлини? _____

5) Аналіз гена, що кодує білок MGMT, тільки в 6 випадках з 113 виявив точкові мутації в первинній структурі даного гена. В інших випадках пригнічення експресії гена, що кодує білок MGMT, було пов'язано з епігенетичними механізмами регуляції роботи генів. Перерахуйте, які епігенетичні механізми регуляції роботи генів Вам відомі: _____

Завдання 2. Виявлення механізмів епігенетичного замовчування роботи генів, що беруть участь у репарації ДНК.

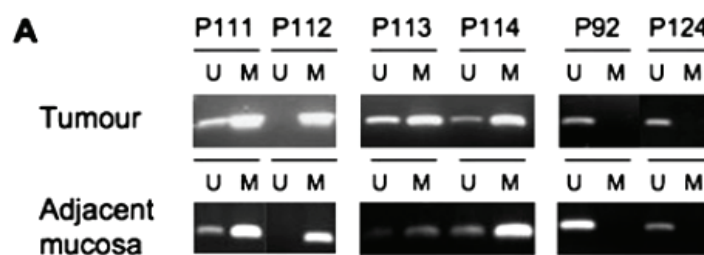
1) Одним з основних механізмів епігенетичного відключення роботи генів є метилювання їх промотора. За допомогою якого методу можна встановити в якому стані знаходиться промотор гена - в робочому або в відключеному за допомогою метилювання? _____

2) На рисунку представлений результат ПЛР-реакції з подальшим електрофорезом зразків тканин, узятих з пухлини і сусідніх з нею ділянок слизової оболонки кишечника для шести пацієнтів (P111, P112, P113, P114, P92, P124), хворих на колоректальний рак. Перерахуйте, в яких пацієнтів промотор гена MGMT знаходиться в метильованому стані _____

Перерахуйте, в яких пацієнтів промотор гена MGMT знаходиться в неметилюваному (робочому) стані _____

Метилювання промотора гена MGMT було виявлене тільки для пухлинних клітин або й для сусідніх здорових тканин? _____

Виходячи з результатів даного експерименту зробіть висновок про те, яка подія була первинною: відключення роботи гена MGMT або розвиток пухлини? _____



Метилування промотора гена MGMT в клітинах пухлин (Tumour) і в клітинах сусідніх з пухлиною слизових оболонок (Adjacent mucosa) у пацієнтів з колоректальним раком, виявлене за допомогою специфічної ПЛР-реакції з використанням ДНК-затравок, які розпізнають метильовані ділянки генів-інтересу. Де: U - неметильований промотор гена MGMT; M - метильований промотор гена MGMT; P111, P112, P113, P114, P92, P124 - зразки тканин, узятих для дослідження у різних пацієнтів, хворих на колоректальний рак (за Svrcek et al.б 2010).

3) З 14 обстежених пацієнтів, хворих на колоректальний рак, у 8 пацієнтів було виявлено метилування промотора гена MGMT і відповідне відключення його роботи. Який відсоток ймовірності розвитку ракової пухлини в клітинах з відключеним геном MGMT, які беруть участь у репарації ДНК? _____

*NB! Залишки гуаніну в складі молекул ДНК є однією з основних мішеней для впливу багатьох канцерогенних речовин з алкілюючим механізмом дії. Метилуючі компоненти, такі як нітросоаміни, знаходяться в складі тютюну, багатьох харчових продуктів, напоїв, лікарських препаратів. Крім того, алкілюючі речовини можуть утворюватися ендогенно, всередині організму людини як в ході нормальних клітинних процесів, так і в результаті впливу кишкової флори організму. В таких умовах у організмів з відключеним геном MGMT зростає ризик розвитку ракових пухлин, пов'язаних з накопиченням в ДНК мутацій метилування залишків гуаніну (за Svrcek et al.б 2010).

Література:

Halford S., Rowan A., Sawyer E., Talbot I., Tomlinson I. O(6)-methylguanine methyltransferase in colorectal cancers: detection of mutations, loss of expression, and weak association with G:C>A:T transitions // Gut. – 2005. – Vol. 54 (6). – P. 797 – 802.

Svrcek M., Buhard O., Colas C., Coulet F., Dumont S., et al. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers // Gut. – 2010. – Vol. 59(11). – P. 1516 - 1526. doi: 10.1136/gut.2009.194787.

Частина 2. Порушення репарації ДНК і старіння організмів.

Методи виявлення дволанцюгових розривів ДНК. Для виявлення двонитевих розривів ДНК використовуються цитологічні (мікроядерний тест і ін.), імунофлюоресцентні, молекулярні методи досліджень і т.н.

Кометний тест (див. заняття 2). *NB! Кількісно ступінь пошкодження ДНК при використанні кометного тесту визначають денситометрично, встановлюючи концентрацію фрагментів ДНК в «хвості комети» за оптичною щільністю «хвоста».

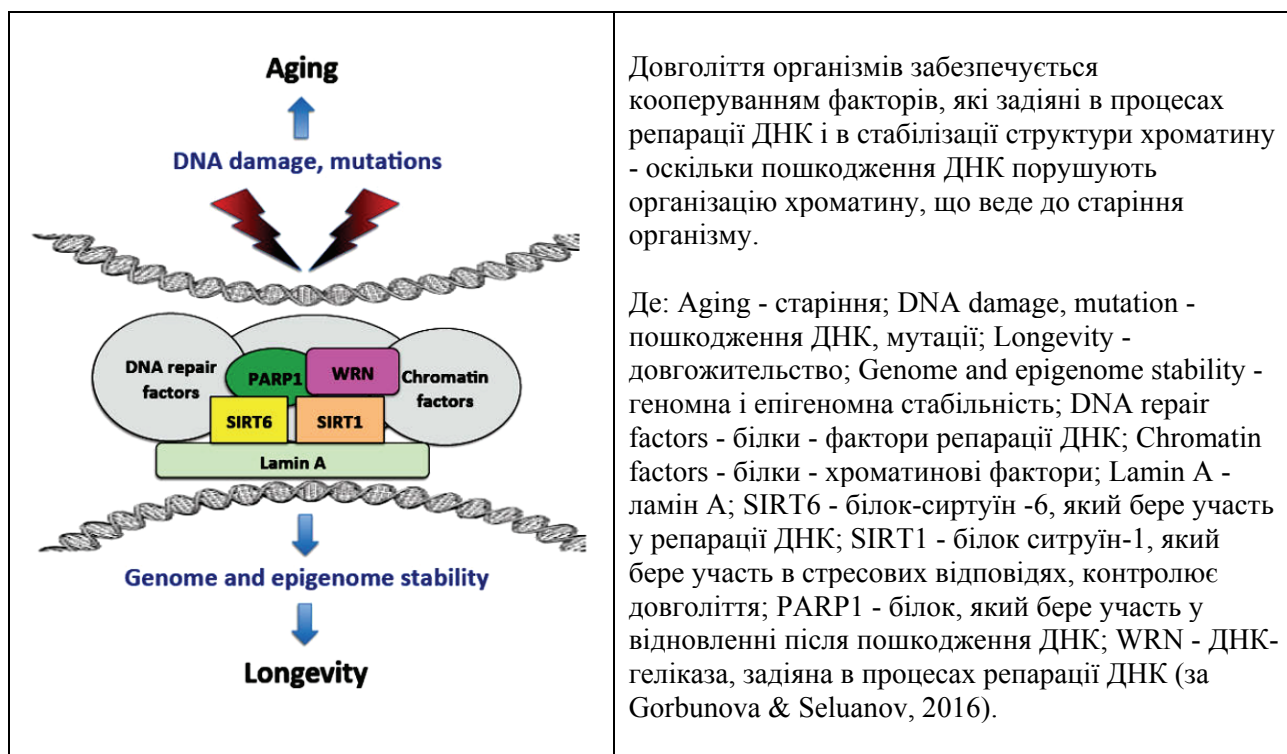
Імунофлюоресцентне виявлення сайтів двонитевих розривів в молекулах ДНК. Білок H2AX є одним з нуклеосомних білків, які беруть участь у формуванні нуклеосом і структуруванні ДНК. При появі двонитевих розривів в ДНК - спеціальні білки-кінази дуже

швидко фосфорилують білок H2AX по серину-139. Такий фосфорильований білок H2AX називається гамма-H2AX (γ -H2AX).

Фосфорильована форма гістона забезпечує менш конденсований стан ДНК, що, мабуть, є необхідною умовою для правильного репарування даного типу пошкоджень ДНК (за <https://en.wikipedia.org/wiki/H2AFX>). Згідно з даними інших дослідників - фосфорилування гістона H2AX запускає захисну реакцію клітини на двонитеве пошкодження ДНК.

В ході дослідження клітини, в яких необхідно виявити появу двонитевих розривів ДНК, обробляють антитілами, що розпізнають фосфорильований білок γ -H2AX, а приєднання до антитіл флуоресцентної мітки - дозволяє візуалізувати даний білок за допомогою флуоресцентного мікроскопа. Таким чином, імуофлуоресцентне виявлення в клітинах білка γ -H2AX є одним із чутливих маркерів присутності двонитевих розривів ДНК.

Онтогенетичне і передчасне старіння організмів, пов'язане з порушенням репарації дволанцюгових розривів ДНК. Проблема вікового старіння організмів - є однією з найбільш актуальних в сучасній медицині. На сьогоднішній день загальновизнаною причиною, яка запускає програму старіння окремих клітин і організму в цілому, вважається накопичення пошкоджень в молекулах ДНК як в результаті дії стресових факторів навколишнього середовища, так і внаслідок розгортання спеціальних програм старіння у організмів різних груп.

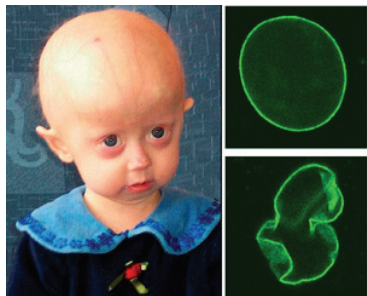


Крім онтогенетичного старіння, вчені зіткнулися з феноменом передчасного старіння організмів - з прогеріями. Вивчення причин розвитку прогерій показало, що в основі передчасного старіння організмів також лежить надмірне накопичення пошкоджень в ДНК клітин.

В цілому, результати експериментальних робіт свідчать про те, що пошкодження в ДНК призводять до старіння. Відомо, що мутації не тільки порушують роботу конкретних генів, але і призводять до порушення структури хроматину. Проведені дослідження показали, що велика кількість білків, задіяних в процесах старіння, - приймають також участь у процесах репарації ДНК і в ремодельованні хроматину. Це дозволило вченим припустити, що саме кооперування цих двох механізмів - репарації ДНК і ремодельовання хроматину - забезпечує довголіття організмів (цитовано за Gorbunova & Seluanov, 2016).

У ряді робіт було показано вікове зниження ефективності репарації ДНК. Дослідники пов'язують таке зниження репараційних можливостей клітин з віковим збільшенням нестабільності ДНК через накопичення в ній пошкоджень. *NB! Зверніть увагу на те, що стабілізація генома затримує розвиток симптомів старіння.

Прогерія. У дітей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда, шкіра стає зморшкуватою, розвивається атеросклероз і інші вікові захворювання організму. Пацієнти з даним типом прогерії, як правило, живуть приблизно до 10-13 років і потім вмирають від старечих хвороб.



Дитина, хвора на прогерію (зліва). Ядро здорової клітини (праворуч, зверху) і ядро клітини при захворюванні на прогерію (праворуч, внизу) (за <https://en.wikipedia.org/wiki/Progeria>).



Ламін А (за <https://en.wikipedia.org/wiki/LMNA>).

Причина розвитку дитячої прогерії Хатчінсона-Гілфорда - порушення формування ядерної ламіни, що призводить до порушень організації хроматину і, як наслідок, - до дисфункції механізмів репарації дволанцюгових розривів ДНК. Ядерна ламіна побудована з білків-ламів А, В і С. Дозрівання білків-попередників ламіна А супроводжується відщепленням залишку фарнезилу. У хворих на прогерію через мутації в самому гені ламіна А чи в гені ZMPSTE24, який відповідає за дозрівання молекули-попередника ламіна А, - в клітинах накопичується дефектний ламін А - т.зв. прогерін, що порушує формування ядерної ламіни і організацію хроматину в ядрі клітин (за <https://en.wikipedia.org/wiki/LMNA>).

Проведені дослідження показали, що при синдромі Хатчінсона-Гілфорда (дитяча прогерія) різко зростає кількість пошкоджень в ДНК і кількість хромосомних аберацій, крім того - підвищується чутливість до речовин, що викликають дволанцюгові розриви в ДНК, оскільки при цьому синдромі порушуються механізми репарації ДНК, засновані як на гомологічній рекомбінації, так і на негомологічному з'єднанні кінців хромосом (non-homologous end joining) (за <https://en.wikipedia.org/wiki/ZMPSTE24>).

Крім дитячої прогерії Хатчінсона-Гілфорда - відомі прогерії, що розвиваються у дорослих людей, наприклад, прогерія Вілсона. Однак і в цьому випадку - передчасне старіння організму дорослої людини пов'язане з накопиченням пошкоджень в ДНК клітин.

Завдання 1. Залежність ефективності репарації ДНК від віку людини. У ряді наукових робіт було показано, що з віком здатність клітин до репарації ушкоджень ДНК знижується. Тоді як результати досліджень інших вчених - свідчать про те, що здатність клітин до репарації ушкоджень ДНК - з віком не змінюється. Piregakis S.M. з колегами (2009) використовували кометний тест для вивчення впливу віку людини на ефективність репарації пошкоджень ДНК, викликаних пероксидом водню і іонізуючим випромінюванням.

*NB! Обробка пероксидом водню призводить до генерування в клітинах реактивних форм кисню, які по вільно-радикальному механізму викликають появу двонитевих розривів в ДНК.

1) Як провести кометний тест з лімфоцитами людини? _____

2) За допомогою якого методу можна кількісно оцінити інтенсивність накопичення пошкоджень в ДНК клітин в кометному тесті? _____

3) Результати проведених Piperakis S.M. з колегами (2009) досліджень наведені в таблиці.

Таблиця. Кількість пошкоджень ДНК в клітинах дітей, дорослих і літніх людей при впливі пошкоджуючи ми факторами (за Piperakis et al., 2009).

Експериментальні умови:	Процентний вміст ДНК в «кометному хвості», середнє ± похибка		
	Діти, 5–10 років	Дорослі, 40-50 років	Люди похилого віку, 70-80 років
Базовий рівень	3,2 ± 0,12	10,2 ± 0,13	22,5 ± 0,18
50 мкМ H ₂ O ₂	13,1 ± 0,31	20,1 ± 0,20	28,3 ± 0,07
50 мкМ H ₂ O ₂ + репарація	5,0 ± 0,30	12,2 ± 0,17	24,5 ± 0,09
100 мкМ H ₂ O ₂	15,4 ± 0,12	28,8 ± 0,19	38,7 ± 0,21
100 мкМ H ₂ O ₂ + репарація	6,6 ± 0,11	16,5 ± 0,18	29,8 м 0,11
150 мкМ H ₂ O ₂	25,7 ± 0,12	36,1 ± 0,19	45,5 ± 0,18
150 мкМ H ₂ O ₂ + репарація	11,2 ± 0,31	25,6 ± 0,18	38,4 ± 0,07
0,8 Гр ⁶⁰ Со	9,8 ± 0,32	17,6 ± 0,10	27,4 ± 0,18
0,8 Гр ⁶⁰ Со + репарація	4,0 ± 0,51	11,3 ± 0,05	24,0 ± 0,11
2,5 Гр ⁶⁰ Со	13,5 ± 0,53	26,1 ± 0,11	34,1 ± 0,18
2,5 Гр ⁶⁰ Со + репарація	5,3 ± 0,41	14,7 ± 0,18	27,7 ± 0,12
4,2 Гр ⁶⁰ Со	20,1 ± 0,31	34,5 ± 0,08	42,8 ± 0,20
4,2 Гр ⁶⁰ Со + репарація	8,3 ± 0,59	23,8 м 0,18	35,3 ± 0,11

*Де: мкМ H₂O₂ – концентрація пероксиду водню в мікромолях; Гр ⁶⁰Со – доза опромінення радіоактивними ізотопами кобальту-60 в греях.

Яким є джерело базових пошкоджень ДНК в досліджених лімфоцитах людей різного віку (тобто чому в контролі - дослідники виявили певний рівень пошкоджень ДНК)? _____

4) Як відрізняється базовий рівень пошкоджень ДНК в лімфоцитах дітей, дорослих і літніх людей? _____

5) Чому з віком кількість пошкоджень в молекулах ДНК - збільшується? _____

6) Як вплинула обробка пероксидом водню на кількість пошкоджень в ДНК лімфоцитів? _____

7) Яким є механізм шкідливого впливу пероксиду водню на клітини? _____

8) Яка кількість додаткових ушкоджень у ДНК лімфоцитів, в порівнянні з базовим рівнем, з'явилася у кожної з обстежених груп після впливу на клітини пероксидом водню в концентрації 150 мкМ? _____

9) Чи відрізняються обстежені вікові групи за чутливістю ДНК до пошкоджуючої дії пероксиду водню? _____

10) Як змінилася кількість пошкоджень ДНК в лімфоцитах кожної вікової групи після репараційного періоду? _____

11) На підставі отриманих даних зробіть висновок про те, репараційна система яких вікових груп є найбільш ефективною в стресових умовах? _____

12) Чому з віком ефективність роботи клітинних систем репарації ДНК - знижується? _____

13) Порівняйте вихідний базовий рівень пошкоджень у кожній віковій групі з залишковим накопиченням пошкоджень ДНК після впливу пероксидом водню і проходження репараційного періоду. Вкажіть, на скільки відсотків зросла кількість пошкоджень ДНК в кожній віковій групі після стресової обробки пероксидом водню в концентрації 150 мкМ + репараційний період в порівнянні з базовим рівнем пошкоджень у відповідній групі: _____

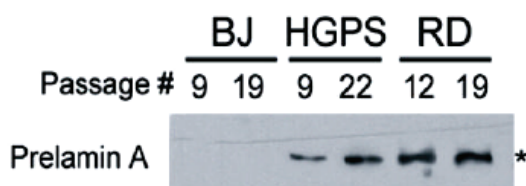
*NB! Рівень пошкоджень ДНК і у дорослих людей, і у літніх людей після обробки пероксидом водню в концентрації 150 мкМ і відновного періоду зріс, приблизно на 15,5-15,9% порівняно з вихідним базовим рівнем пошкоджень, не дивлячись на більш ефективну роботу репараційних механізмів у дорослих людей ніж у літніх людей.

Отримані результати узгоджуються з даними, згідно з якими, клітини, в яких включилася програма старіння характеризуються дуже великою стійкістю до пошкоджень факторами навколишнього середовища. Механізм цієї стійкості - невідомий (при одночасно виявленому зниженні рівня репараційної здатності клітин людей похилого віку).

Завдання 2. Причини передчасного старіння клітин при прогерії Хатчінсона-Гілфорда. Накопичення пошкоджень в ДНК супроводжується як звичайним, так і передчасним старінням клітин. При прогерії Хатчінсона-Гілфорда передчасне старіння пов'язане з накопиченням дволанцюгових розривів ДНК, які призводять до нестабільності генома і розвитку симптомів передчасного старіння організму. Дивним є те, що при цьому - накопичення двонитевих розривів в молекулах ДНК відбувається, не дивлячись на присутність в клітинах інтактних білків репарації ДНК.

1) Основною причиною розвитку прогерії Хатчінсона-Гілфорда є порушення структури і, як наслідок, функцій ядерної ламіни. Використовуючи результати Вестерн-блот аналізу, наведені на рисунку, поясніть причини порушення структури ядерної ламіни при даному захворюванні _____

2) Як провести Вестерн-блот аналіз клітинних білків? _____



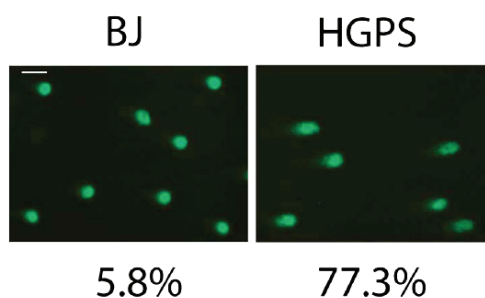
Накопичення преламіна А відбувається в клітинах людей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда (HGPS) і обмежуючу дермопатію (restrictive dermopathy, RD). Вестерн-блот аналіз клітинних екстрактів з використанням специфічних антитіл проти преламіна А (ці антитіла розпізнають специфіку кінцевого С-домену преламіна А) не виявив накопичення преламіна А в клітинах здорових людей (BJ) (за Liu et al., 2008).

*Вестерн-блот аналіз (Western blot analysis) - аналітичний метод, який використовується для визначення специфічних білків в зразку. На першому етапі проводять електрофорез білків в поліакриламідному гелі для поділу денатурованих поліпептидів за довжиною (як правило, в присутності SDS) або за тривимірною структурою білка (в нативному стані). Далі білки переносять на нітроцелюлозну мембрану і потім виявляють конкретний білок за допомогою антитіл, специфічних до даного білку (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

3) Відомо, що для здійснення ефективної репарації - необхідна мобілізація білків Rad50 і Rad51, задіяних в репарації ДНК, до сайтів двонитевих розривів ДНК. Дослідження, проведені Liu Y. з колегами (2008), показали, що в клітинах людей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда, такої мобілізації білків репарації до сайтів репарації не відбувається (за Liu et al., 2008). *NB! Сайти двонитевих розривів ДНК були візуалізовані за допомогою антитіл до гістонові білку γ -H2AX. Поясніть, чому у хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда не відбувається мобілізація білків репарації до сайтів двониткових розривів ДНК?_

4) Використовуючи результати кометного тесту, наведені на рисунку, вкажіть базовий рівень дволанцюгових розривів ДНК в клітинах здорових людей і людей з синдромом Хатчінсона-Гілфорда _____

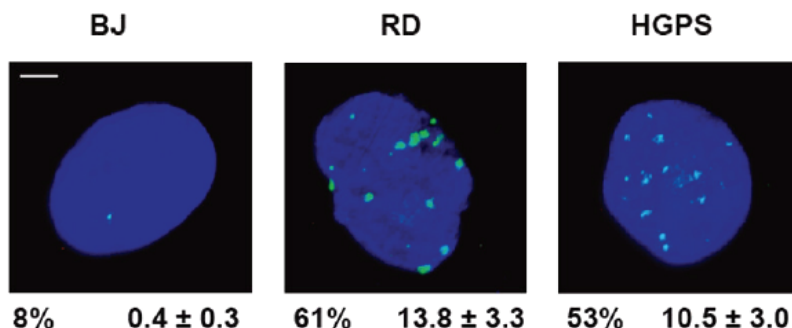
5) Чому у хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда порушуються репарація двонитевих розривів ДНК? _____



Результати кометного тесту по встановленню базового рівня дволанцюгових розривів в ДНК клітин здорових дітей (BJ) і дітей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гідфорда (HGPS). Для дослідження відбиралися довільно по 100 клітин для кожного варіанту і визначалася концентрація ДНК в «кометному хвості». Клітини, у яких «кометний хвіст» містив понад 17% ДНК, вважалися «кометно-позитивними». Тільки 6% клітин здорових дітей були «кометно-позитивними», тоді як серед дітей, хворих на прогерію, - цей показник склав 77,3%. 1 бар = 85 мкм (за Liu et al., 2008).

6) Як провести імунофлуоресцентне виявлення сайтів двонитевих розривів в молекулах ДНК? _____

7) Використовуючи дані по імунофлуоресцентному виявленню сайтів двонитевих розривів ДНК, наведені на рисунку, вкажіть відсоток клітин, що містять ділянки зі специфічним фарбуванням на γ -H2AX зони, які відповідають ділянкам двонитевих розривів ДНК, для здорових дітей і дітей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда _____



Виявлення двонитевих розривів ДНК за допомогою імунофлуоресцентного фарбування гістонового білка γ -H2AX (антитіла, які розпізнають γ -H2AX помічені зеленим флуоресцюючим барвником); блакитний колір ядер отримували за допомогою флуоресцентного барвника DAPI. Відсоток клітин, що містять ділянки зі специфічним фарбуванням на γ -H2AX зони - вказано зліва під рисунком. У здорових дітей цей показник склав 8%, тоді як у хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда - 53%.

Кількість γ -H2AX локусів, що припадає на одну клітину, зазначено праворуч під рисунком. У здорових дітей цей показник склав $0,4 \pm 0,3\%$, тоді як у дітей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда – $10,5 \pm 3,0\%$. 1 бар = 12 мкМ. Де: BJ - клітини здорових людей; RD - клітини людей, хворих на обмежуючу дермопатію; HGPS - клітини дітей, хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда (за Liu et al., 2008).

8) Чи корелюють дані по накопиченню двонитевих розривів в ДНК, отримані з допомогою кометного тесту і за методом імунофлюоресцентного виявлення білка γ -H2AX? _____

9) Які переваги і недоліки має імунофлюоресцентний метод виявлення двонитевих розривів в ДНК порівняно з кометним тестом? _____

10) Як Ви вважаєте, чому бажаним є використання обох методик для виявлення двонитевих розривів в ДНК? _____

Контрольні питання:

1. Порушення роботи ДНК-репараційної системи клітин
2. Епігенетичне замовчування роботи системи репарації ДНК.
3. Методи виявлення дволанцюгових розривів ДНК.
4. Онтогенетичне і передчасне старіння організмів, пов'язане з порушенням репарації дволанцюгових розривів ДНК.
5. Прогерії.

Література:

Gorbunova V., Seluanov A. DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection // *Mutat. Res.* – 2016. – Vol. 788. – P. 2 – 6. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2016.02.004.

Liu Y., Wang Y., Rusinol A.E., Sinensky M.S., Liu J., Shell S.M., Zou Y. Involvement of Xeroderma Pigmentosum Group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22(2). – P. 603 – 611. doi:10.1096/fj.07-8598com.

Piperakis S.M., Kontogianni K., Karanastasi G., Iakovidou-Kritsi Z., Piperakis M.M. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations // *Cell Biol. Toxicol.* – 2009. – Vol. 25(1). – P. 65 - 71.

Suo Q.F., Du W.T., Yang M.M., Fan X.J., Liu J. The study of hydrogen peroxide induced DNA damage and recovery in normal aging and premature aging human cells // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* – 2011. – Vol. 42(5). – P. 610 - 615.

Горизонтальне перенесення генів між неспорідненими організмами в природних умовах. В природних умовах горизонтальне перенесення генів між неспорідненими організмами забезпечується вірусами і бактеріальними плазмідами. Цей процес настільки поширений, що в останні роки все більше визнання отримують еволюційні побудови не у вигляді філогенетичних дерев, а у вигляді еволюційних сітчастих структур, які формуються внаслідок масованого горизонтального обміну генами між неблизькоспорідненими організмами.

Механізм горизонтального перенесення копій генів вірусами. При зараженні організма-хозяїна вірус починає синтезувати в його клітинах свої білки, серед яких присутні зворотні транскриптази і інтегрази. Зворотня транскриптаза каталізує синтез кДНК-копій вірусних генів з їх РНК-матриць, а інтеграза - забезпечує вбудовування цих кДНК-копій вірусних генів в ДНК нового господаря. При цьому зворотня транскриптаза може робити копії не тільки вірусних РНК, а й РНК господаря, а інтеграза - може вбудовувати ці кДНК-копії хазяйських генів в ДНК вірусу. Коли потім такий вірус покидає клітини свого господаря, то в своєму складі він несе і копії деяких його генів. Під час зараження таким вірусом іншого господаря – в його організм може бути перенесена копія гена від іншого господаря.

Наприклад, агробактерії *Agrobacterium tumefaciens* паразитують на коренях рослин і при цьому викликають пухлинні розростання тканин кореня. Проведені дослідження показали, що агробактерії впорскують у клітини кореня рослини свою плазмиду, яка містить фактори патогенності: а) гени синтезу амінокислот – опинів, які є їжею для агробактерії; б) гени синтезу ауксину й цитокініну, які забезпечують пухлинне розростання клітин кореня і тим самим збільшують кормову базу бактерії. Методами молекулярної біології було встановлено, що гени синтезу ауксину й цитокініну – мають рослинне походження: їх копії були горизонтально перенесені вірусами від рослин до бактерій.

Механізм горизонтального перенесення копій генів при підселенні одноклітинних організмів всередину клітини господаря (при підселенні бактерій, одноклітинних водоростей і т.н.). Підселення іншого організму всередину клітини - це стрес. При стресі клітини дозволяють своїм транспозонам активуватися. Більшість транспозонів - це віруси, колись одомашені клітиною. Під час їх активування в клітині синтезуються білки - зворотні транскриптази і інтегрази, які забезпечують самокопіювання транспозонів і їх вбудовування в ДНК господаря. Під час своєї роботи - зворотня транскриптаза переписує будь-яку РНК у вигляді кДНК копій, а інтеграза – вбудовує ці копії або в ДНК господаря, або в ДНК організма-підселенця. Таким чином, з часом, в ДНК господаря з'являються копії генів організма-підселенця, а в ДНК організма-підселенця - копії генів господаря.

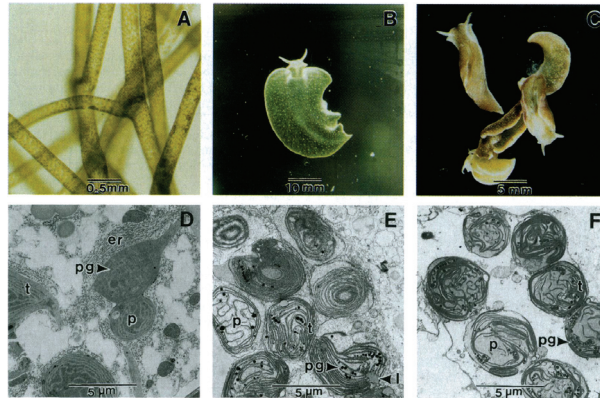
Наприклад, внутрішньоклітинні паразитичні бактерії вольбахії придбали копію хазяйського гена комах, який відповідає за поділ клітин, і це дозволило бактеріям контролювати розмноження клітин господаря.

Наприклад, мітохондрії в наших клітинах - це нащадки давніх α -протеобактерій, одомашених клітиною еукаріотів близько 1,2 млрд.р.т. На сьогоднішній день близько 600 копій генів мітохондрії перенесено в ядро і тільки 13 генів залишилося в ДНК самої бактерії.

Завдання 1. Горизонтальне перенесення ядерних генів, необхідних для функціонування хлоропластів, від водоростей *Vaucheria litorea* в ядерний геном морських слимаків *Elysia chlorotica*.

Морський слимак *Elysia chlorotica* після поїдання водорості *Vaucheria litorea* не перетравлює її хлоропласти, а залишає їх жити всередині своїх клітин. Це дозволяє слимаку

перейти на фотосинтез як основний тип харчування. Дана симбіотична асоціація зберігається понад 8 місяців, протягом яких морський слимак *Elysia chlorotica* не харчується водоростями, однак, має доступ до світла і вуглекислого газу, необхідних для проходження реакцій фотосинтезу. У вчених виникло питання - як є можливим нормальне функціонування хлоропластів в чужих клітинах протягом такого тривалого часу? Адже компоненти живої системи повинні постійно оновлюватися, а в клітинах морського слимака були виявлені тільки хлоропласти водорості, але не її ядро, в якому закодовані багато генів, необхідних для нормального функціонування хлоропластів (за Mujer et al., 1996).



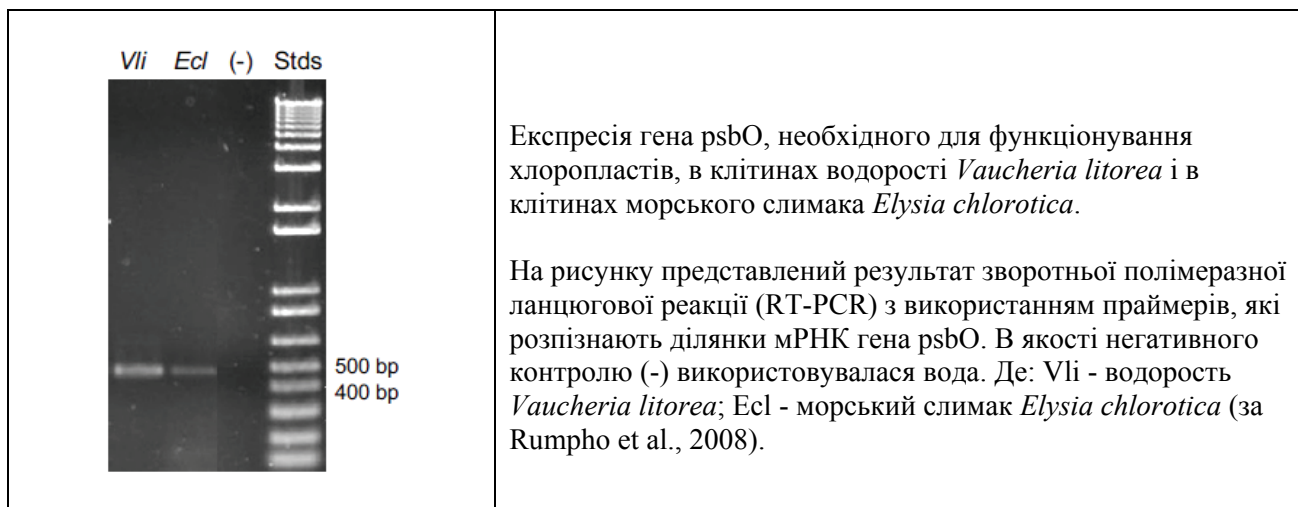
Навіть через 8 місяців після припинення харчування водоростями *Vaucheria litorea* - всередині клітин морського слимака *Elysia chlorotica* зберігаються хлоропласти (рис. F). Де: (A) - водорість *Vaucheria litorea*; (B) і (C) - морський слимак *Elysia chlorotica* через 2 і 8 місяців голодування по водоростевій їжі, відповідно; D, E і F - електронні мікрофотографії хлоропластів в клітинах відповідних організмів: er – ендоплазматичний ретикулум, l - ліпідні депозити, p - піреноїд, pg - пластоглобули, t - тилакоїди (за Mujer et al., 1996).

Rumpho M.E. з колегами (2008) був секвенований пластидний геном *Vaucheria litorea* і підтверджено, що він не має повного набору генів, необхідних для фотосинтезу. Для виявлення можливої присутності та експресії ядерних водоростевих генів в ДНК морського слимака, авторами роботи було проведено пошук таких генів за допомогою методу зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) з використанням праймерів, які розпізнають ділянки мРНК гена *psbO*. *NB! Відомо, що фотосистема II є високо чутливою до фото-оксидативного пошкодження і вимагає постійного синтезу *de novo* своїх компонентів. Тому в якості об'єкта тестування був обраний ген *psbO*, який є ядерним геном водоростей і вищих рослин, і який кодує хлоропластний білок *PsbO*, що є важливим компонентом фотосистеми II.

1) У чому полягає сутність методу зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) з використанням специфічних праймерів? _____

***Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (RT-PCR)** являє собою метод ампліфікації специфічного фрагмента рибонуклеїнової кислоти (РНК). Одноланцюгову молекулу РНК перетворюють в реакції зворотної транскрипції в комплементарну кДНК (сДНК) і далі ампліфікують вже одноланцюгову молекулу ДНК, використовуючи традиційну ПЛР (PCR). RT-PCR є чутливою методикою, за допомогою якої може бути виявлена мала кількість молекул РНК. RT-PCR широко використовується для діагностики генетичних захворювань та напівкількісного визначення специфічних молекул РНК в клітині або тканини, а також - як індикатор експресії відповідних генів (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

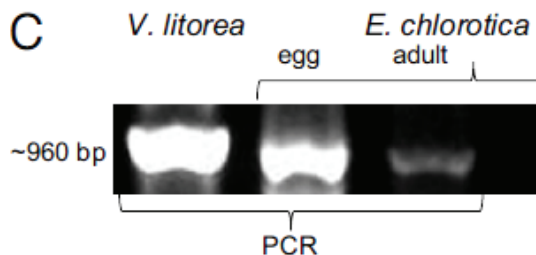
2) Результати пошуку експресії ядерного водоростевого гена psbO в клітинах морського слимака за допомогою методу зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) наведені на рисунку. Експресується чи ні ядерний водоростевий ген psbO в клітинах морського слимака? _____.



3) Порівняйте інтенсивність експресії ядерного гена psbO в клітинах морського слимака і в клітинах водорості. З чим може бути пов'язаний різний рівень експресії даного гена у цих двох організмів? _____.

4) У чому полягають відмінності між методом зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) і методом прямої полімеразної ланцюгової реакції (PCR)? _____.

5) Результати зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) дозволяють виявити в клітинах РНК-транскрипти гена-інтересу, тоді як результати прямої полімеразної ланцюгової реакції (PCR) - дозволяють виявити власне наявність гена-інтересу в тестованій ДНК. Використовуючи результати прямої полімеразної ланцюгової реакції, наведені на рисунку С, порівняйте інтенсивність смуг, які відповідають фрагменту ядерного гена psbO, в клітинах морського слимака і в клітинах водорості. З чим можуть бути пов'язані відмінності в результатах прямої ПЛР-реакції, виявлені для клітин водорості і клітин морського слимака? _____.



Результати проведення прямої полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з виявлення ядерного гена psbO, необхідного для функціонування хлоропластів, в клітинах водорості і морського слимака. Де: *V. litorea* - водорість *Vaucheria litorea*; *E. chlorotica* - морський слимак *Elysia chlorotica*; egg - яйця; adult - дорослі особини; PCR - полімеразна ланцюгова реакція; 960 bp - маса тестованого фрагмента (за Rumpho et al., 2008).

***Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)** - експериментальний метод молекулярної біології, що дозволяє домогтися значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі) (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

5) Використовуючи результати прямої полімеразної ланцюгової реакції (PCR), наведені на рисунку С, порівняйте інтенсивність смуг, що відповідають фрагменту ядерного гена *psbO* в клітинах дорослого слимака і в клітинах яєць слимака. З чим можуть бути пов'язані відмінності в результатах ПЛР-реакції, виявлені на різних стадіях онтогенезу слимака? _____

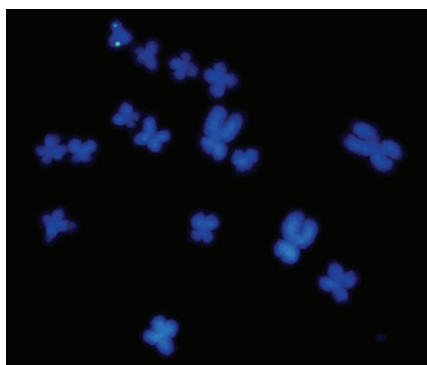
6) На рисунку D наведені результати аналізу амінокислотної послідовності білка *psbO* для клітин водорості *Vaucheria litorea* і морського слимака *Elysia chlorotica*. На підставі результатів цього аналізу, що ви можете сказати про походження водоростевого гена *psbO* в клітинах морського слимака? _____

7) Яким чином міг ядерний водоростевий ген потрапити в клітини морського слимака, якщо методами мікроскопії в клітинах слимака були виявлені тільки хлоропласти водорості, але не її ядро? _____

D MKVPSALVALSAFSAFVKTSAFRPAFAGLKTNAKSSSALTMVSVQDDI
KTLAGVALTILAGVSI LNAPVEAITKQIESLSYLQVKGTGLANRCP
EVFGTGSIDVNGKT KIVDMCIEPKTFQVLEETSSKRGEAKKEYVNT
KLMTRQTYTLYGIDGSFAPENKIFREKDGIDYAATTIQLPGGERV
PFLFTVKELVAQATTPGNSVTPGLQFGGPFSTPSYRTGLFLDPKGR
GGSTGYDMAVALPGHQSGIEGDAELFGENNKTFDVTKGNIEFEVN
RVDPNSNGEIGGVFVSKQKGD TDMGSKVPKDLIKGFYGRLESE

Результати аналізу амінокислотних послідовностей білка *psbO* для клітин водорості *Vaucheria litorea* і морського слимака *Elysia chlorotica* - показали ідентичність цих послідовностей. Червоним кольором виділена сигнальна послідовність, зеленим - домен доставки білка в тілакоїдну мембрану хлоропласта (за Rumpho et al., 2008).

*NB! Згідно з останніми дослідженнями - більше 50 ядерних генів, необхідних для функціонування хлоропластів, було перенесено з ядерного геному водорості в ядро молюска *Elysia chlorotica*. Експресія цих генів дозволяє молюскам підтримувати життєздатність «одомашених» хлоропластів протягом усього життя молюска.



Schwartz J.A. з колегами (2014) використовували методику флюоресцентної *in situ* гібридизації для виявлення ядерного гена *prk* водорості *Vaucheria litorea* в складі геному морського слимака *Elysia chlorotica*. На мікропрепараті - хромосоми морського слимака пофарбовані DAPI. При цьому на тлі блідо-блакитної флюоресценції DAPI на одній з хромосом видно дві яскраві флюоресцюючі крапки. Ці дві крапки, що світяться, - відповідають локалізації водоростевого ядерного гена *prk* на двох сестринських хроматидах однієї з хромосом морського слимака (за Schwartz et al., 2014).

Завдання 2. Горизонтальне перенесення гену пектинази від симбіотичних бактерій в клітини жуків-довгоносиків.

Рослиноїдні тварини не мають власних ферментів для розщеплення компонентів рослинної клітинної стінки і тому змушені використовувати організми симбіонти (бактерій, найпростіших, гриби), здатних синтезувати ферменти, що розщеплюють целюлозу, пектин та інші компоненти рослинних клітинних стінок. Однак, в деяких випадках, дослідникам вдалося виявити у багатоклітинних тварин наявність власних генів целюлази, пектинази і ін., які дозволяють розщеплювати компоненти рослинних клітинних стінок. При цьому

секвенування таких генів показало їх бактеріальне або грибне походження, внаслідок подій горизонтального переносення генів між господарем і симбіонтом, який допомагає господареві перетравлювати рослинну їжу.

У ряді досліджень було показано присутність кількох типів ферментів пектиназ в клітинах жуків-довгоносиків. Однак, не відомо – чи ці пектинази кодуються власними генами довгоносиків або генами організмів-симбіонтів? Для відповіді на це питання Shen Z. з колегами (2005) були отримані і секвеновані молекули кДНК, які кодують пектинметилестеразу в клітинах рисового довгоносика (*Sitophilus oryzae* L.).

1) Опишіть, за допомогою якого методу можна отримати молекули кДНК? _____



Рисовий довгоносик (*Sitophilus oryzae* L.) (за <https://animalreader.ru/risovyiy-dolgonosik-vreditel-risa-i-zernovyih-kultur.html>).

Сиквенс пектинметилестерази з клітин жуків рисових довгоносиків показав її високий рівень подібності з бактеріальною пектинметилестеразою. Тому, для підтвердження або спростування гіпотези наявності власного гена пектинметилестерази в геномі самих рисових довгоносиків - жуків піддали антибактеріальному лікуванню тетрацикліном протягом 7 тижнів. Для оцінки ефективності лікування антибіотиком і підтвердження або спростування факту присутності власного гена пектинметилестерази - тотальну ДНК з клітин жуків рисових довгоносиків Shen Z. з колегами (2005) піддали прямий полімеразній ланцюговій реакції (PCR) з накопиченням специфічних генів-інтересу в зразку.

2) Як провести пряму полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) для накопичення гена-інтересу в зразку? _____

3) Результати проведення прямої полімеразної ланцюгової реакції для виявлення різних генів-інтересу в тканинах жуків рисових довгоносиків після їх лікування антибактеріальним антибіотиком тетрацикліном, наведені на рисунку. Перерахуйте, які з тестованих генів-інтересу продовжують бути присутніми в клітинах рисових довгоносиків через 7 тижнів лікування їх тетрацикліном _____.

4) Чому перестають ідентифікуватися інші тестовані гени? _____

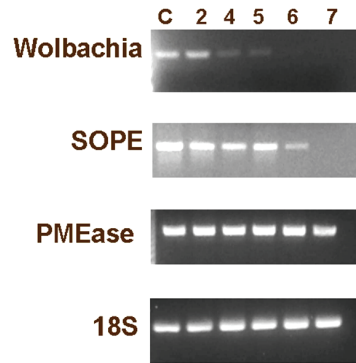
5) З якою метою рисові жуки-довгоносики піддавалися лікуванню тетрацикліном? _____

6) На який тиждень годування довгоносиків борошном з тетрацикліном - мета лікування антибіотиком була досягнута? _____.

7) Однакову або різну є чутливість до тетрацикліну мають дві симбіотичні для рисових довгоносиків бактерії? _____.

8) Про що свідчить присутність гена пектинметилестерази в клітинах рисових жуків довгоносиків на 7 тиждень лікування антибіотиком? _____

9) Аналіз сиквенсу пектинметилестерази з клітин рисових жуків довгоносиків показав його значну схожість з сиквенсом бактеріальної пектинметилестерази. Який можливий механізм появи бактеріального гена в геномі жуків-довгоносиків? _____



Результат проведення прямої полімеразної ланцюгової реакції (PCR) для деяких генів, після лікування рисових довгоносиків від бактерій за допомогою годування борошном з тетрацикліном. ДНК, виділена з клітин рисових довгоносиків, аналізувалася після 2, 4, 5, 6 і 7 тижнів експозиції довгоносиків на тетрацикліні (0,5 мкг/г борошна для годування). Контроль (C) - результат аналізу ДНК рисових довгоносиків, які не піддавалися лікуванню тетрацикліном. ПЛР аналіз проводився для виявлення в клітинах рисових довгоносиків наступних генів: доріжка Wolbachia - для прокаріотичного гена 16SPHK бактерії вольбахії; доріжка SOPE - для прокаріотичного гена 16SPHK основного бактеріального ендосимбіонта довгоносика; доріжка PMEase - для гена пектинметилестерази; доріжка 18S - для еукаріотичного гена 18S-РНК рисового довгоносика (за Shen et al., 2005)

Контрольні питання:

1. Горизонтальне перенесення генів між неспорідненими організмами в природних умовах.
2. Механізм горизонтального перенесення копій генів вірусами.
3. Механізм горизонтального перенесення копій генів при підселенні одноклітинних організмів всередину клітини господаря (при підселенні бактерій, одноклітинних водоростей і т.н.).
4. Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
5. Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (RT-PCR).

Література:

- Mujer C.V., Andrews D.L., Manhart J.R., Pierce S.K., Rumpho M.E. Chloroplast genes are expressed during intracellular symbiotic association of *Vaucheria litorea* plastids with the sea slug *Elysia chlorotica* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93(22). – P. 12333 - 12338.
- Rumpho M.E., Worful J.M., Lee J., Kannan K., Tyler M.S., Bhattacharya D., Moustafa A., Manhart J.R. Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105(46). – P. 17867 - 17871. doi: 10.1073/pnas.0804968105.
- Schwartz J.A., Curtis N.E., Pierce S.K. FISH labeling reveals a horizontally transferred algal (*Vaucheria litorea*) nuclear gene on a sea slug (*Elysia chlorotica*) chromosome // Biol. Bull. – 2014. – Vol. 227(3). – P. 300 - 312.
- Shen Z., Pappan K., Mutti N.S., He Q.J., Denton M., Zhang Y., Kanost M.R., Reese J.C., Reeck G.R. Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme // J. Insect. Sci. – 2005. – Vol. 5:21. Epub 2005 Aug 8.

Заняття 5

Тема: Методи виявлення РНК. ДНК-мікрочип аналіз.

ДНК мікрочип аналіз (DNA-microarray). Перед проведенням дослідження - виготовляють ДНК-мікрочип. Для цього до прозорого твердого носія (скло або інший матеріал) пришивають хімічними методами короткі одноланцюгові фрагменти ДНК завдовжки 25-60 азотистих основ (відстань між сусідніми фрагментами - 300 мкм). Фрагменти ДНК синтезують штучно в ДНК-синтезаторі. Кожен з фрагментів ДНК комплементарен конкретному гену даного організму.

Таким чином, при зустрічі ДНК фрагмента з комплементарною йому молекулою РНК (або з ДНК-копією, синтезованою з даної молекули РНК) - відбувається їх з'єднання за принципом комплементарності азотистих основ. І роз'єднати їх можливо тільки при досить високій температурі. Слід зазначити, що до твердого носія пришивають не менше 11 ДНК-фрагментів для впізнавання кожного гена. Сьогодні з використанням одного ДНК-мікрочіпа можна виявити до 40 000 різних генів.

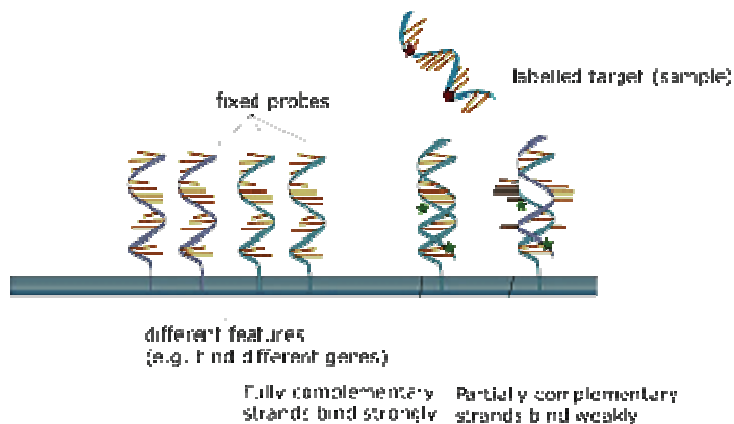


Схема будови ДНК мікрочіпа (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Методика проведення ДНК-мікрочип аналізу. З клітин виділяють всю РНК і ці молекули можна використовувати для проведення ДНК-мікрочип аналізу. Однак, молекули РНК не досить стабільні. Крім того, гібридні комплекси ДНК-ДНК є більш міцними в порівнянні з гібридними комплексами РНК-ДНК. Тому, якщо необхідно отримати дуже точні результати - дослідники за допомогою ферменту зворотної транскриптази перетворюють молекули РНК в молекули кДНК (тобто копії ДНК, отримані з РНК матриць) і подальші дослідження проводять з цими кДНК копіями. На наступному етапі до кДНК молекул пришивають флуоресцентні мітки і суміш таких кДНК наносять на ДНК-мікрочип матрицю. Інкубація триває протягом 10 годин при температурі + 62⁰С на шейкері. Цей період часу необхідний для того, щоб кожна молекула кДНК могла приєднатися до свого фрагменту на ДНК-мікрочип матриці.

Потім ДНК-мікрочип переносять на предметний столик лазерного скануючого мікроскопа. Лазерний промінь викликає світіння флуорохромів мітки і на екрані монітора комп'ютера з'являється флуоресцентне світіння в тих ділянках ДНК-мікрочіпа, де приєдналися кДНК молекули. У програму комп'ютера введена інформація про відповідність конкретних ділянок ДНК-матриці конкретним генам. Отже, за наявністю світіння в конкретній точці ДНК-мікрочіпа і за його інтенсивністю встановлюють, працює даний ген чи ні, і якщо працює - то наскільки інтенсивно.

Якщо при фарбуванні кДНК фрагментів, виділених з клітин різних організмів, використовувати різні флуорохроми (наприклад, червоний і зелений), то можна на одну ДНК-мікрочип матрицю посадити кДНК фрагменти різних організмів і побачити відмінності в роботі генів у чутливих і стійких до різних стресорів організмів, у здорових і хворих клітин, у клітин одного і того ж організму на різних етапах онтогенезу і т.н.

Завдання 1. Порівняння експресії генів у рослин в контрольних умовах і в умовах абіотичного стресу.

1) Опишіть, як необхідно провести ДНК-мікрочип аналіз для того, щоб порівняти характер експресії генів у рослин картоплі в контрольних умовах і в умовах посухи?

2) Результати такого дослідження, проведеного Zhang N. з колегами (2016), показали активування експресії 842 генів і інгібування експресії 494 генів в листях рослин картоплі в умовах посухи. Дані для 20 з 7284 досліджених генів, наведені в таблиці (за Zhang et al., 2016). Проаналізуйте таблицю і гістограми і дайте відповіді на нижченаведені питання.

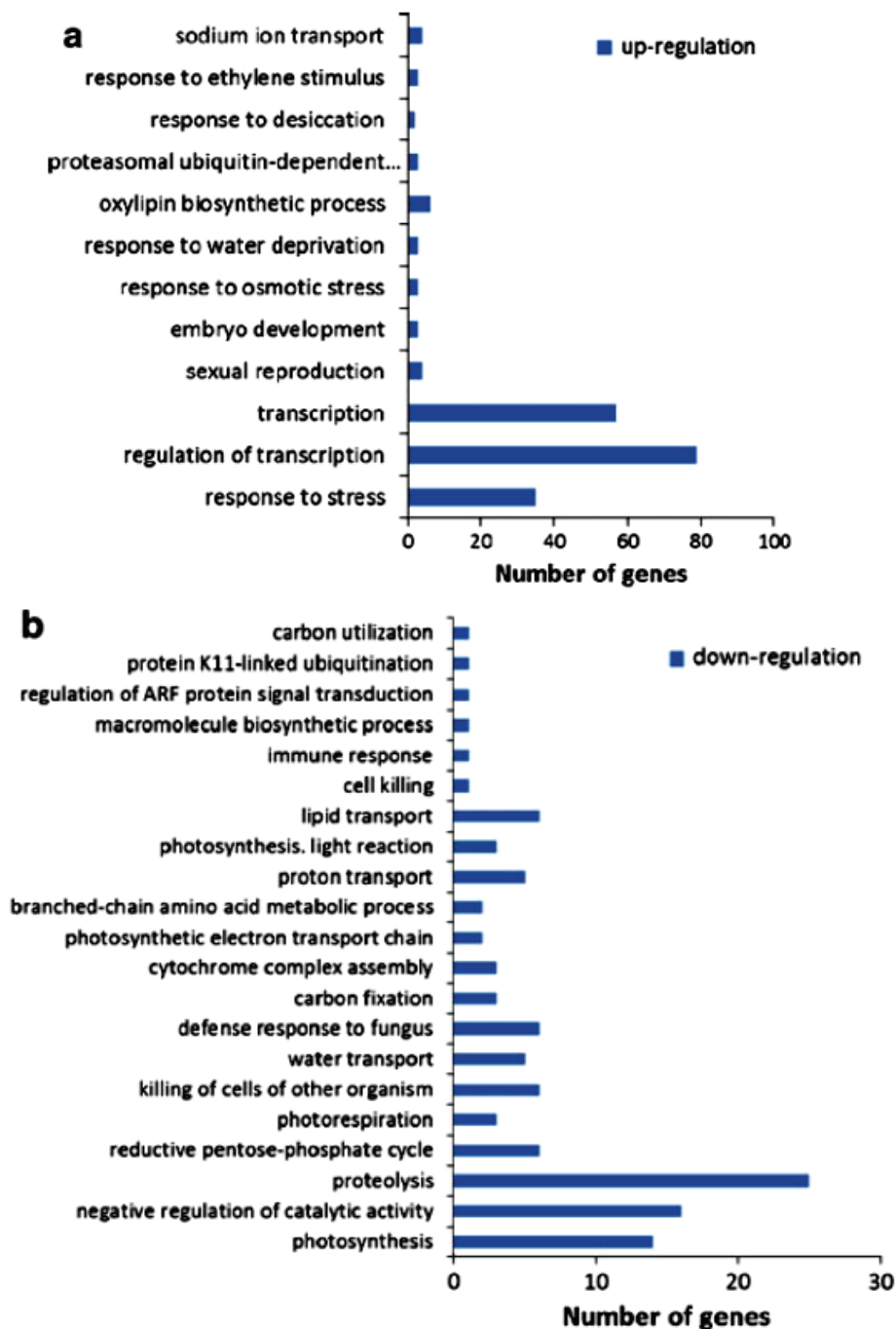
3) Активність яких груп генів підвищилася у відповідь на стрес посухи? _____

4) Активність яких груп генів знизилася у відповідь на стрес посухи? _____

5) Результати численних досліджень свідчать про те, що формування стійкого до посухи фенотипу у рослин потребує зміни експресії значної кількості генів. Проте, нещодавно були отримані трансгенні рослини рису, стійкі до посухи завдяки генно-інженерному перенесенню лише одного гена. Яким чином перенесення одного гена могло забезпечити зміни в активності десятків генів і формування посухостійкої лінії рослин рису? _____

Таблиця. Зміна інтенсивності експресії генів в листі картоплі у відповідь на стрес посухи (дані для 20 генів, експресія яких змінилася найбільш значним чином) (цитовано за Zhang et al., 2016).

Шифр гена, ID:	Назва гена:	Кратність зміни рівня експресії в порівнянні з контролем
10 генів, експресія яких посилилася найбільш істотно у відповідь на стрес посухи:		
PGSC0003DMG400035200	Бензо-діазепіновий рецептор периферічного типу	18,00
PGSC0003DMG400026221	Головний пилковий алерген, Ory s 1	17,86
PGSC0003DMG402007944	Ген з невідомою функцією	16,95
PGSC0003DMG400011438	Протеїн LE25	16,94
PGSC0003DMG400015495	Дегідрин DH2a	16,85
PGSC0003DMG400028543	Ген з невідомою функцією	16,51
PGSC0003DMG400003569	Тауматиновий протеїн	10,83
PGSC0003DMG400014293	Протеїн, що індукується низкою температурою 65 кДа	9,21
PGSC0003DMG400007815	Естераза/ліпаза GD5L	8,85
PGSC0003DMG400018744	Цитохром P450-залежна гідроксилаза жирних кислот	8,13
10 генів, експресія яких знизилася найбільш істотно у відповідь на стрес посухи:		
PGSC0003DMG400030979	Некаталітична субодиниця полігалактуранози AroGP3	- 15,82
PGSC0003DMG400021877	Ксилоглюкан ендотранс-глікозилаза	- 5,84
PGSC0003DMG400014027	Гермін	- 5,09
PGSC0003DMG401001384	Протеїн GAST1	- 5,08
PGSC0003DMG400032534	Ранній нодулін 75	- 4,84
PGSC0003DMG400000207	Арабіногалактановий пептид 16	- 4,65
PGSC0003DMG400017536	Збагачений гліцином структурний протеїн клітинної стінки 1,8	- 4,58
PGSC0003DMG400015810	Збагачений гліцином протеїн	- 4,52
PGSC0003DMG400037894	Аспартат-протеїназа непентезин-1	- 4,48
PGSC0003DMG400024819	Протеїн родини нодулінів MtN3	- 4,31



Функціональні групи генів рослин картоплі, для яких було показано значну зміну рівня транскрипції у відповідь на стрес посухи. Де: Number of genes - кількість генів, для яких було виявлено зміну інтенсивності експресії; up regulation - посилення експресії генів; down-regulation - зниження експресії генів (за Zhang et al., 2016).

Контрольні питання:

1. ДНК мікрочип аналіз (DNA-microarray): принцип методу.
2. Методика проведення ДНК-мікрочип аналізу.
3. Використання методу в сучасних молекулярно-біологічних дослідженнях.

Література:

Zhang N., Liu B., Ma C., Zhang G., Chang J., Si H., Wang D. Transcriptome characterization and sequencing-based identification of drought-responsive genes in potato // Mol. Biol. Rep. – 2014. – Vol. 41(1). – P. 505 -517. doi: 10.1007/s11033-013-2886-7.

Сплайсинг - процес вирізання певних нуклеотидних послідовностей з молекул РНК і з'єднання послідовностей, що зберігаються в «зрілій» молекулі, в ході процесингу РНК. Найбільш часто цей процес зустрічається при дозріванні інформаційної РНК (мРНК) у еукаріот, при цьому шляхом біохімічних реакцій за участю РНК і білків з мРНК видаляються ділянки, що не кодують білок (інтрони) і з'єднуються одна з одною ділянки, які кодують амінокислотну послідовність - екзони. Таким чином незріла пре-іРНК перетворюється в зрілу мРНК, з якої зчитуються (транлюються) білки клітини. Більшість генів прокариот, що кодують білки, не мають інтронів, тому у них сплайсинг пре-мРНК зустрічається рідко. У представників еукаріот, бактерій і архей зустрічається також сплайсинг транспортних РНК (тРНК) і інших некодуючих РНК (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Сплайсосома. Сплайсинг каталізується сплайсосомою - великим комплексом, що складається з РНК і білків і включає п'ять малих ядерних рибонуклеопротеїдів (мяРНП). РНК-складова мяРНП взаємодіє з інтроном і, можливо, бере участь в каталізі. Виявлено два типи сплайсосом (головна і додаткова), які відрізняються за мяРНП, які входять до їх складу. Головна сплайсосома бере участь в сплайсингу інтронів, що містять гуанін і урацил (GU) в 5'-сайті, і аденін і гуанін (AG) в 3'-сплайсинг-сайті. Вона складається з мяРНП: U1, U2, U4, U5 и U6.

Альтернативний сплайсинг. Пре-мРНК деяких генів еукаріот можуть піддаватися альтернативному сплайсингу. При цьому інтрони в складі пре-мРНК вирізаються в різних альтернативних комбінаціях, при яких вирізаються і деякі екзони. Різні варіанти альтернативного сплайсингу однієї пре-мРНК можуть здійснюватися в різні періоди розвитку організму або в різних тканинах, а також у різних особин одного виду. Альтернативний сплайсинг дозволяє збільшити різноманітність білкових продуктів генів, не збільшуючи пропорційно цьому розмір генома, в тому числі, не створюючи додаткових копій генів. Біологічний сенс альтернативного сплайсингу для багатоклітинних еукаріот полягає в тому, що він, мабуть, є ключовим механізмом збільшення різноманітності білків, а також дозволяє здійснювати складну систему регуляції експресії генів, в тому числі тканеспецифічну. Крім того, схема альтернативного сплайсингу може змінюватися в стресових умовах, що забезпечує пристосування організмів до нових умов життя (наприклад, до низьких температур, до нестачі кисню в навколишньому середовищі і т.н.).

Аутосплайсинг. РНК тетраімєни володіє рибозимною активністю і може сплайсувати сама себе, замикаючись в кільце і одним своїм кінцем вирізаючи інтрони з іншого кінця.
Транс-сплайсинг. Транс-сплайсинг - це особлива форма сплайсингу у еукаріот, при якій кінцем до кінця з'єднуються і лігуються екзони двох різних РНК-транскриптів (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Помилки сплайсингу

Помилки сплайсингу можуть провокувати розвиток захворювань нервової системи. Дослідження, проведені Yin S. з колегами (2017), показали, що причиною розвитку аміотрофічного бокового склерозу і лобно-скроневої деменції, які супроводжуються прогресивним погіршенням рухових і когнітивних здібностей, є помилки сплайсингу РНК-попередників. Причина помилок сплайсингу - токсичні пептиди, які з'являються в клітині в результаті мутації в гені C9ORF72, і які перешкоджають збірці сплайсосоми. У свою чергу, порушення збірки сплайсосоми призводить до неправильного сплайсингу пред-іРНК генів, що контролюють роботу мітохондрій і нейронів.

Виявлена дослідниками мутація в гені C9ORF72 (поширення гексануклеїдного повтору), призводить до синтезу білків GR і PR, що складаються з дипептидних повторів і є токсичними для клітин людини і дріжджів. Ці токсичні білки призводять до значного збільшення кількості помилок сплайсингу. Проведені дослідження показали, що ці пептиди

порушують збірку сплайсосоми: вони зв'язуються з U2 snRNP компонентом сплайсосоми, змушуючи його агрегуватися в цитоплазмі клітини, а не в ядрі, де повинна бути зазвичай розташована сплайсосома (за <https://hms.harvard.edu/news/assembly-failure-0>).

Завдання 1. Реконструкція *in vitro* роботи сплайсосоми і дослідження впливу токсичних пептидів, синтезованих в клітинах хворих людей, на процес сплайсингу.

1) Що таке сплайсинг? _____

2) З яких компонентів складається сплайсосома? _____

3) Yin S. з колегами (2017) в клітинах людей, хворих на аміотрофічний бічний склероз і лобно-скроневу деменцію, виявили синтез незвичайних пептидів - GR і PR, які, імовірно, є причиною дисфункції нервових клітин у обстежених пацієнтів. Для вивчення впливу виявлених пептидів на роботу сплайсосоми - дослідники реконструювали процес синтезу попередників мРНК і подальший сплайсинг незрілих транскриптів в пробірці *in vitro*.

Для цього, генетичну конструкцію, яка містить ген Ftz під стартовим вірусним промотором, інкубували *in vitro* в реакційній суміші, що містить компоненти, необхідні для транскрипції і подальшого сплайсингу синтезованих транскриптів. Інкубацію проводили 15 хвилин для синтезу пред-мРНК транскриптів, потім транскрипцію зупиняли за допомогою а-аманітину і після - інкубували реакційну суміш 45 хв для сплайсингу отриманих попередників мРНК: в контрольних умовах, а також в присутності 10 мкМ токсичних пептидів GR і PR або флагового пептиду FLAG (пептиду, який не впливає на складання сплайсосоми і процес сплайсингу).

Потім, продукти транскрипції і сплайсингу поділяли за допомогою електрофорезу і виявляли на платівці гелю, використовуючи специфічні антитіла. Отримані результати представлені на рисунку (за Yin et al. 2017). Проаналізуйте отримані дані і дайте відповіді на нижченаведені питання.

4) Яку молекулярну масу мають молекули попередники РНК (pre-mRNA)? _____

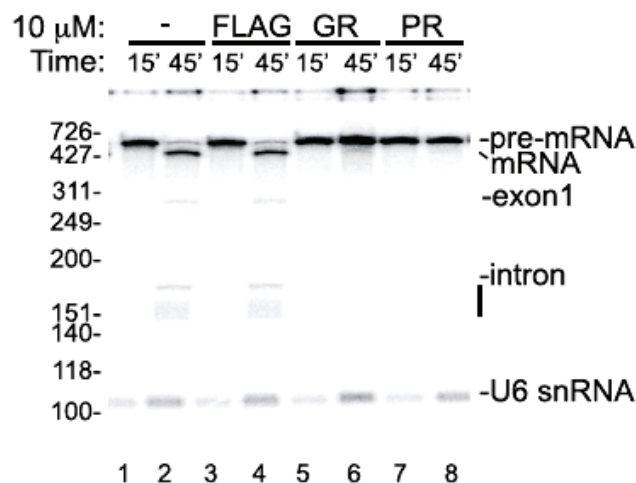
5) Яку молекулярну масу має зріла мРНК (mRNA)? _____

6) Яку масу мають екзон 1 _____ та інтрон _____?

7) Вкажіть, в яких варіантах експерименту через 15 хв інкубування в реакційній суміші відбулося накопичення молекул попередників мРНК (pre-mRNA)? _____

8) Вкажіть, в яких варіантах експерименту через 45 хвилин відбулося накопичення зрілих молекул мРНК (mRNA), що пройшли сплайсинг? _____

9) Вкажіть, в яких варіантах експерименту не з'явилися зрілі молекули мРНК (mRNA)? _____



Результати реконструкції *in vitro* процесу транскрипції і подальшого сплайсингу синтезованих транскриптів. Де: 15' - 15 хвилин для синтезу пред-мРНК транскриптів; 45' - 45 хвилин для

сплайсингу отриманих РНК-попередників; 10 μ M - додавання до реакційної суміші 10 мкМ нейтрального флагового пептиду FLAG (негативний контроль) (доріжки на гелі 3 і 4), і токсичних пептидів GR (доріжки на гелі 5 і 6) і PR (доріжки на гелі 7 і 8); - контрольні умови без додавання будь-яких пептидів (позитивний контроль) (доріжки на гелі 1 і 2); pre-mRNA - РНК-попередник; mRNA - зріла мРНК; exon1 - екзон 1, продукт сплайсингу; intron - інтрон, продукт сплайсингу, вертикальна лінія біля інтрона - позначає продукти розпаду інтрона; U6 snRNA, the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) - один з компонентів сплайсосоми - U2 маленька ядерна рибонуклеопротеїнова частка; цифри біля осі ОУ - молекулярна маса РНК-фрагментів (за Yin et al., 2017).

10) Про що свідчить відсутність зрілих молекул мРНК, ексона 1 і інтрона в реакційній суміші, в яку додавали пептиди GR і PR? _____

NB! Подальші дослідження показали, що в реакційній суміші токсичні пептиди GR і PR зв'язуються з U2 snRNPs компонентами сплайсосоми, що, мабуть, і призводить до порушення процесу сплайсингу.

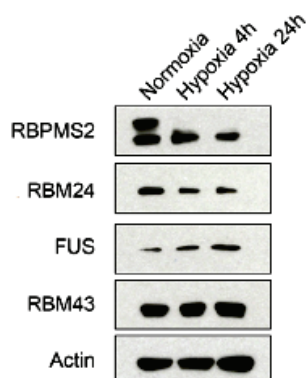
Завдання 2. Вплив гіпоксії на характер альтернативного сплайсингу в ракових клітинах.

Відомо, що ракові пухлини характеризуються дуже високою пристосованістю до умов нестачі кисню - тобто, до гіпоксії. Han J. з колегами (2017) був проведений повний транскриптомний аналіз ракових клітин молочної залози в звичайних умовах нормоксії і в умовах гострої і хронічної гіпоксії. Дослідниками було виявлено 2005 і 1684 подій альтернативного сплайсингу, характер яких регулювався умовами гострої і хронічної гіпоксії, відповідно, включаючи утримання інтрона, проскакування екзона і альтернативне використання першого екзону. При цьому домінуючим типом альтернативного сплайсингу, індукованого гіпоксією, було утримання інтрона.

Багато з генів, які в умовах гіпоксії піддавалися альтернативному сплайсингу - були задіяні в клітинному метаболізмі, в регуляції транскрипції, в організації актинового скелета, в проліферації, міграції та інвазивності ракових клітин (за Han et al. 2017). Деякі результати проведених досліджень - наведені на рисунках.

1) Для того, щоб встановити, змінився чи ні характер експресії білків, що беруть участь в сплайсингу РНК-попередників, з клітин ракових пухлин виділяли білки, розділяли їх за допомогою електрофорезу і потім білки-інтересу виявляли за допомогою специфічних антитіл (рис.). Проаналізуйте результати даного експерименту:

Вкажіть, як в умовах гіпоксії змінилася інтенсивність експресії білків, що беруть участь в процесі сплайсингу: RBPMS2 _____, RBM24 _____, FUS _____, RBM43 _____



Результати Вестерн-блот аналізу експресії білків - чинників сплайсингу: RBPMS2, RBM24, FUS і RBM43 в умовах нормоксії (Normoxia), а також гострої (Hypoxia, 4h) і хронічної (Hypoxia, 24 h) гіпоксії. Білок актин (Actin) був використаний в якості контролю (за Han et al., 2017).

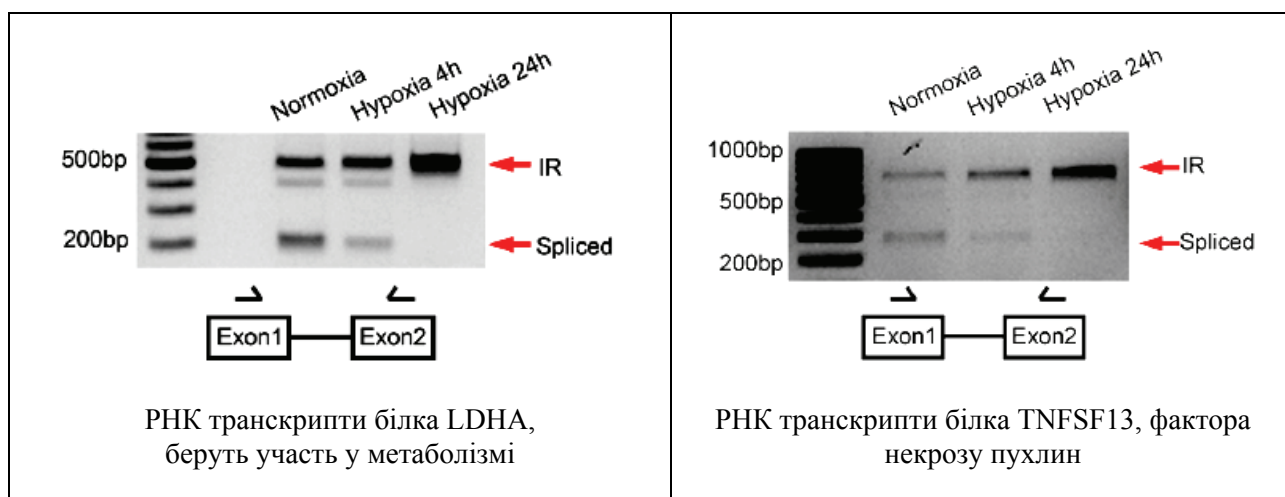
2) На підставі отриманих результатів - зробіть припущення про те, як умови гіпоксії могли вплинути на характер процесів сплайсингу молекул попередників мРНК _____

3) Для дослідження процесів сплайсингу молекул попередників мРНК - з клітин ракових пухлин виділяли всю РНК, за допомогою зворотної транскриптази переводили її в кДНК молекули і, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію, накопичували молекули кДНК-інтересу в реакційній камері.

Потім, продукти ПЛР-реакції розділяли за допомогою електрофореоза і візуалізували, використовуючи специфічні флюоресцентні барвники для нуклеїнових кислот. Проаналізуйте отримані результати (див. рис) і дайте відповіді на наступні питання: чи відбувається сплайсинг РНК-попередників молекул білків:

LDHP в умовах нормоксії _____, в умовах гіпоксії _____;
TNFSF13 в умовах нормоксії _____, в умовах гіпоксії _____.

4) До яких наслідків може привести утримання інтрона між екзонами 1 і 2 в зрілій молекулі мРНК? (т.т., які можливі наслідки відсутності сплайсингу інтрону між 1 і 2 екзонами) _____



Результати RT-PCR дослідження впливу гіпоксії на утримання інтронів в процесі сплайсингу РНК-попередників клітинних білків LDHA і TNFSF13 в клітинах ракових пухлин. Де: по осі ОУ - маса фрагментів кДНК в парах азотистих основ, bp; Normoxia - умови нормоксії; Нурохіа 4h - умови гострої гіпоксії, 4 години; Нурохіа 24 h - умови хронічної гіпоксії, 24 години; IR - фрагмент кДНК з утриманим інтроном між екзонами 1 і 2; Spliced - фрагмент кДНК без інтрона між екзонами 1 і 2 (тобто, сплайсований кДНК) (за Han et al., 2017).

5) Дослідження, проведені Хан J. з колегами (2017), показали, що основною особливістю процесів сплайсингу в клітинах ракових пухлин в умовах гіпоксії є утримання інтрона. Як вплине утримання інтрона в зрілій молекулі мРНК на синтез білка TNF (Tumor Necrosis Factor, фактора некрозу пухлин) _____

До яких наслідків для ракових клітин і організму пацієнтів це призведе? _____

6) Утримання інтрона призводить до появи передчасних стоп-кодонів і до дисфункції білків, синтезованих з таких мРНК-матриць. Дослідження, проведені Хан J. з колегами (2017), показали, що багато білків, для яких було показано зниження інтенсивності експресії внаслідок утримання інтрона, - залучені в молекулярні шляхи репарації ДНК. Пояснить, як

інгібування механізмів репарації пошкоджень в ДНК може підвищувати агресивність ракових пухлин в умовах гіпоксії? _____

Контрольні питання:

1. Сплайсинг РНК.
2. Сплайсосома.
3. Альтернативний сплайсинг
4. Помилки сплайсингу

Література:

Han J., Li J., Ho J.C., Chia G.S., Kato H., Jha S., Yang H., Poellinger L., Lee K.L. Hypoxia is a key driver of alternative splicing in human breast cancer cells // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7(1):4108. doi: 10.1038/s41598-017-04333-0.

Yin S., Lopez-Gonzalez R., Kunz R.C., Gangopadhyay J., Borufka C., Gygi S.P., Gao F.B., Reed R. Evidence that C9ORF72 Dipeptide Repeat Proteins Associate with U2 snRNP to Cause Mis-splicing in ALS/FTD Patients // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 19(11). – P. 2244 - 2256. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.056.

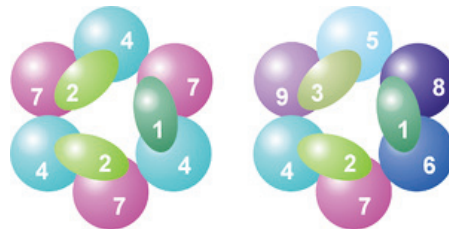
Заняття 7

Тема: Процесинг і деградація молекул РНК за участю екзосомного комплексу

Екзосомний комплекс – це мультибілковий комплекс, здатний до процесингу і руйнування різних типів молекул РНК. Екзосоми є у еукаріот і архей, в той час як у бактерій подібні функції виконує більш просто побудований комплекс - деградосома.

*NB! Не плутати з екзосомами - позаклітинними везикулами, які виділяються в міжклітинний простір усіма клітинами організмів.

Корову (центрально) частину екзосоми становить шестичленне кільце, до якого прикріплюються інші білки. У еукаріот екзосоми присутні в цитоплазмі, ядрі і особливо в ядерці. У цих компартментах є білки, які взаємодіють з екзосомами і регулюють їх активність по деградації РНК-субстратів, специфічних для цих клітинних компартментів. До субстратів екзосомного комплексу відносять мРНК, рРНК і багато інших видів малих РНК. Екзосома володіє екзорибонуклеолітичною активністю, тобто руйнує молекули РНК, починаючи з одного їхнього кінця (3'-кінця), а у еукаріот для неї характерна також ендорибонуклеолітична активність, тобто вона здатна розрізати РНК в місцях (сайтах), розташованих у внутрішній частині молекули.



Будова екзосомних комплексів архей (зліва) і еукаріот (праворуч). Різні білки пронумеровані: видно, що екзосома архей складається з 4 різних білків, а еукаріот - з 9 різних білків (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Крім перерахованих вище дев'яти корових білків, з екзосомами еукаріот також часто асоційовані два інших білки. Один з них - Rgp44, гідролітична РНКаза, яка належить до родини РНКаз R гідролітичних екзорибонуклеаз (які використовують воду для розриву зв'язків між нуклеотидами). Крім екзорибонуклеолітичної активності, Rgp44 також може функціонувати як ендорибонуклеаза, цю активність проявляє окремий домен цього білка. Інший білок, часто асоційований з екзосомами, - Rgp6 (у дріжджів) або PM/Scf-100 (у людини), як і Rgp44, цей білок є гідролітичною екзорибонуклеазою, проте належить до родини РНКаз D.

У еукаріот усі субодиниці РНКаз РН втратили свою каталітичну активність, тобто корове кільце людської екзосоми не містить жодного активного ферменту. Незважаючи на втрату каталітичної активності, структура кора екзосоми є висококонсервативною від архей до людини, підтверджуючи, що цей комплекс є життєво необхідним для функціонування клітини.

Крім двох вищезгаданих білків, міцно пов'язаних з екзосомним комплексом, багато білків взаємодіють з екзосомами в цитоплазмі і ядрі клітини. Ці білки слабо зв'язуються з екзосомою і можуть регулювати активність і специфічність екзосомних комплексів. У цитоплазмі екзосома взаємодіє з білками KRSP і ТТР, які стимулюють або запобігають деградації РНК. Ядерні екзосоми зв'язуються з РНК-зв'язуючими білками (в тому числі MPP6/Mpp6 і C1D/Rgp47 у людини/дріжджів), які необхідні для процесингу деяких субстратів.

З екзосомами взаємодіють не лише поодинокі білки, а й білкові комплекси. Один з них - цитоплазматичний Ski-комплекс, до якого входять РНК-хелікази (Ski2); він бере участь в деградації мРНК. В ядрі процесинг рРНК і малих ядерцевих РНК за допомогою екзосом

управляється комплексом TRAMP, який проявляє РНК-хеліказну (Mtr4) і поліаденилюючу (Trf4) активність.

Екзосоми залучені в деградацію і процесинг багатьох РНК, в цитоплазмі клітини вони залучені в колооберт мРНК. Екзосоми можуть руйнувати мРНК, які були помічені для деградації через те, що містять помилки, через взаємодію з білками, що забезпечують нонсенс-опосередкований розпад і нон-стоп-розпад. З іншого боку, руйнування становить обов'язковий етап в життєвому циклі мРНК. Кілька білків, що стабілізують або дестабілізують мРНК через зв'язування з АУ-збагаченими елементами, розташованими в 3'-нетрансльованій області мРНК, взаємодіють з екзосомним комплексом. В ядрі екзосоми є необхідними для нормального процесингу декількох видів малих ядерних РНК. Більшість екзосом знаходиться в ядерцях. Тут вони беруть участь в процесингу 5,8S рРНК (перша ідентифікована функція екзосом) і деяких малих ядерцевих РНК.

Екзосома є головним комплексом, що забезпечує контроль якості клітинної РНК. На відміну від прокариотів, еукаріоти мають високоактивні системи, які контролюють клітинні РНК і розпізнають непроцесовані або неправильно процесовані РНК-білкові комплекси (наприклад, рибосоми) до того, як вони покинуть ядро. Вважається, що ці системи запобігають участі бракованих комплексів в важливих клітинних процесах, наприклад, синтезі білка. Крім участі в процесингу, колооберт і контролі якості РНК, екзосоми відіграють важливу роль в деградації так званих кріптичних нестабільних транскриптів (CUT), які у дріжджів зчитуються з тисяч локусів. Важливість цих нестабільних РНК і їх деградації залишаються невідомими, однак схожі РНК були виявлені і в людських клітинах.

Хоча більшість клітин мають і інші ферменти, що руйнують РНК з їх 3'- або 5'-кінця, екзосоми є необхідними для виживання клітини. Якщо експресія екзосомних білків штучно зменшується або припиняється, наприклад, шляхом РНК-інтерференції, клітина зупиняється в рості і незабаром помирає. Мутації за білками екзосомного комплексу призводять до розвитку патологічних процесів в клітинах і до захворювання організму (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 1. Встановлення ролі білків центрального каналу екзосом еукаріот у виконанні ними своїх функцій.

Екзосомний комплекс еукаріот складається з каталітично інертних білкових субодиниць, які формують кільце з утворенням центрального каналу, і «шапочкових» білків з КН/S1 доменами, локалізованими на верхівці комплексу. У дріжджів каталітична активність екзосоми забезпечується білком Dis3 (відомим також як білок Rrp44), який володіє як ендо- так і екзорибонуклеазною активністю, а також - білком Rrp6, що володіє екзонуклеазною активністю в складі ядерних екзосом.

1) Які функції виконує екзосомний комплекс в клітинах еукаріот і архей? _____

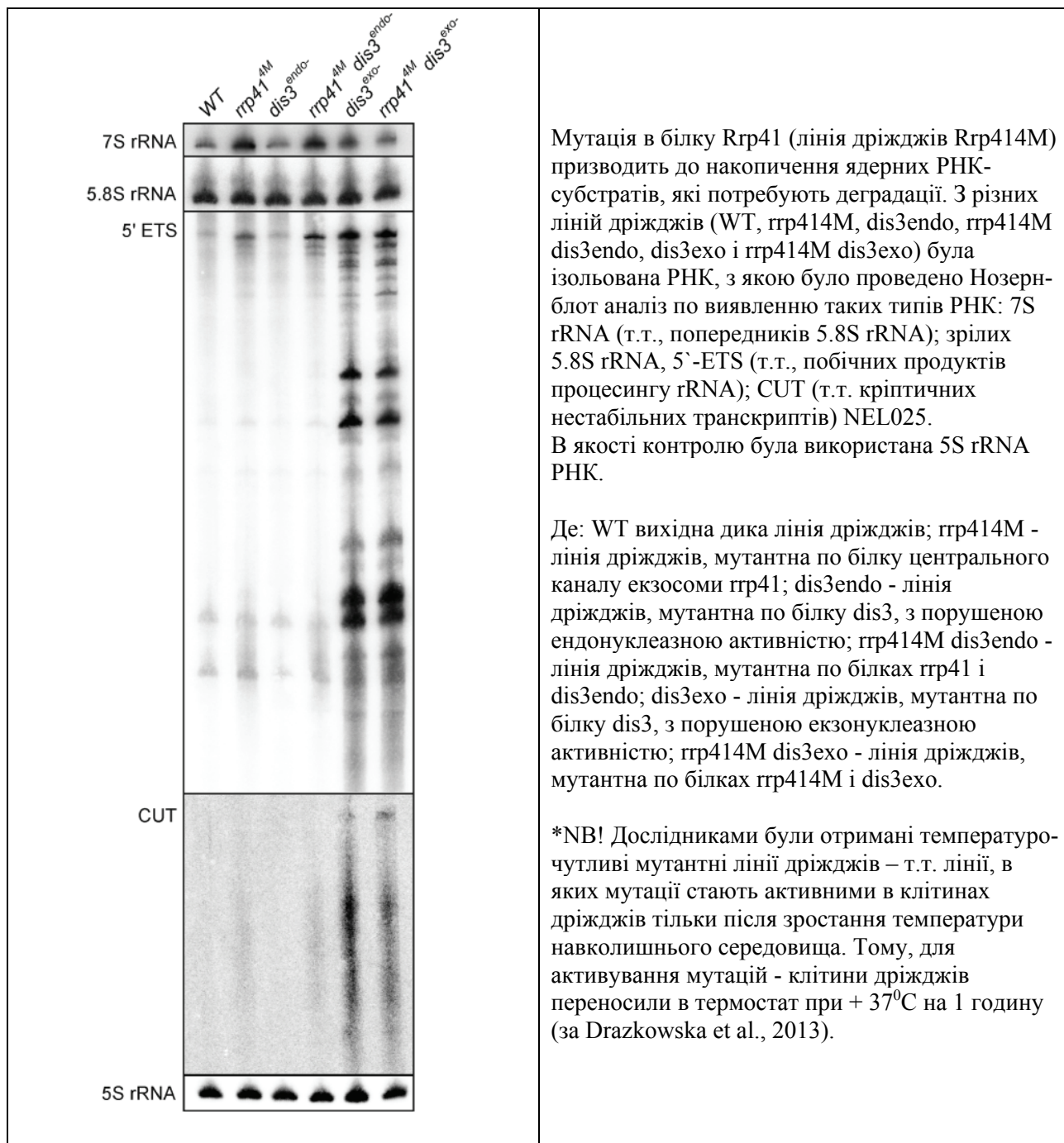
2) Якою є структура екзосомного комплексу в клітинах еукаріот? _____

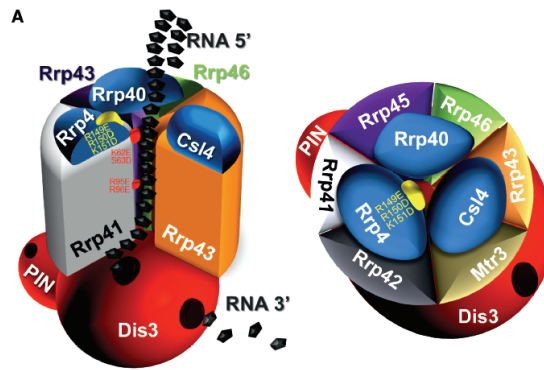
3) Drazkowska K. з колегами (2013) були досліджені лінії дріжджів, що мають різні мутації в білках екзосомного комплексу. Для виявлення функціональності мутантних екзосом, авторами роботи було проведено Нозерн-блот аналіз клітинної РНК. Як провести Нозерн-блот аналіз для виявлення присутності конкретних РНК в клітинах? _____

4) Проаналізуйте результати Нозерн-блот аналізу молекул РНК, виділених з клітин різних мутантних по білках екзонуклеазного комплексу ліній дріжджів. Вкажіть, відбувається чи ні (в порівнянні з дикою WT лінією дріжджів) процесинг і деградація РНК наступних типів 7S rRNA, 5.8S rRNA, 5'-ETS і CUT для кожної з досліджених ліній, з огляду на те, що 7S rRNA - це попередники зрілих 5.8 S rRNA; 5'-ETS - це побічні продукти процесингу молекул rRNA; CUT - це кріптичні нестабільні транскрипти:

а) вихідна дика WT лінія дріжджів: _____ ;

- б) *grr414M* – лінія дріжджів, мутантна по білку центрального каналу екзосоми *grr41*: _____;
- в) *dis3endo* – лінія дріжджів, мутантна по білку *dis3*, з порушеною ендонуклеазною активністю через заміну D171N: _____;
- г) *grr414M dis3endo* – лінія дріжджів, мутантна по білках *grr41* і *dis3endo*: _____;
- д) *dis3exo* – лінія дріжджів, мутантна по білку *dis3*, з порушеною екзонуклеазною активністю через заміну D551N: _____;
- е) *grr414M dis3exo* – лінія дріжджів, мутантна по білках *grr414M* і *dis3exo*: _____.
- 5) Яка функція - екзонуклеазна чи ендонуклеазна - для білка Dis3 є найбільш важливою в роботі ядерних екзосом дріжджів? _____.

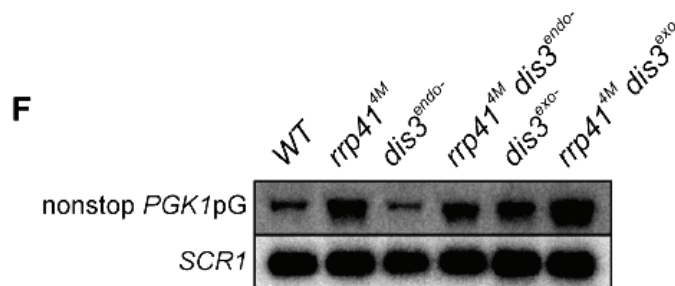




Архітектура екзосомного комплексу з клітин дріжджів. Положення мутантних сайтів в білку Rrp41 зазначено червоним і жовтим кольорами. Мутація в білку Rrp41 (лінія Rrp414M), що блокує центральний канал, призводить до пригнічення росту дріжджів при підвищених температурах (за Drazkowska et al., 2013).

6) У всі тестовані лінії дріжджів була введена конструкція, яка містить nonstop decay репортер (nonstop PGK1pG), для якого деградація залежить або від ендорибонуклеазної, або від екзорибонуклеазної активності білка Dis3. Результати тестування здатності різних мутантних цитоплазматичних екзосом розщеплювати браковану non-stop decay репортерну мРНК наведені на рисунку. Вкажіть, які з тестованих мутантних ліній дріжджів: а) здатні розщеплювати мутантні мРНК (nonstop PGK1pG) так само, як і дика лінія дріжджів (WT):

_____;
 б) не здатні розщеплювати мутантні мРНК (nonstop PGK1pG): _____



Оцінка здатності різних мутантних типів цитоплазматичних екзосом дріжджів здійснювати розщеплення бракованих nonstop decay репортерних мРНК (nonstop PGK1pG). Де: SCR1 - контроль (за Drazkowska et al., 2013).

7) У клітинах еукаріот білки, що формують центральний канал екзосоми, є каталітично інертними (тобто, вони не виконують каталітичних функцій, на відміну від білків центрального каналу екзосом в клітинах архей). Мутації по субодиниці Rrp41 частково блокують проходження РНК-субстрату через центральний канал екзосоми. На підставі результатів, отриманих для мутантної по субодиниці Rrp41 лінії дріжджів, зробіть висновок про можливу роль центрального каналу екзосоми в здійсненні нею каталітичних функцій в цитоплазмі і в ядрі: _____

Завдання 2. Полі(А)-полімеразний комплекс задіяний в контролі якості РНК транскриптів, що спрямовуються на деградацію в екзосоми.

Vanacova S. з колегами (2005) досліджували роль білка Trf4p, що входить до складу нового полі(А)-полімеразного комплексу, який крім Trf4p містить також білки Air1p або Air2p в якості потенційних РНК-зв'язуючих одиниць і геліказу Mtr4p. Імовірно, білок Trf4p є

основною каталітичною субодиницею даного полі(А)-полімеразного комплексу. Для підтвердження даного припущення, дослідники реконструювали *in vitro* роботу білка Tgf4p. Для цього, очищений білок Tgf4p був змішаний з РНК-нуклеотидними затравками з додаванням молекул АТФ і аденозин-фосфату (А). Потім, отримані РНК-продукти були розділені за допомогою електрофорезу. Результати проведених досліджень наведені на рисунку. В якості позитивного контролю була використана дріжджова полі(А)-полімераза Pap1; доріжка 1 - негативний контроль (суміш олігонуклеотидів оліго(А)₁₅ без додавання білків полі(А)-полімерази). Використовуючи рисунок, дайте відповідь на наступні питання:

1) На доріжках 3-4 представлені результати експерименту *in vitro* впливу дріжджової полі(А)-полімерази Pap1 на довжину олігонуклеотидів. Стрілкою вказано положення вихідних олігонуклеотидів (А)₁₅. Як вплинула дріжджова полі(А)-полімераза на довжину вихідних олігонуклеотидів? _____

Якою є причина збільшення довжини РНК олігонуклеотидів в присутності білка Pap1, молекул АТФ і аденозин-фосфату? _____

Як залежить довжина сформованого протягом 30 хвилин експерименту полі(А)-хвоста у олігонуклеотидів від концентрації молекул Pap1 в розчині? _____

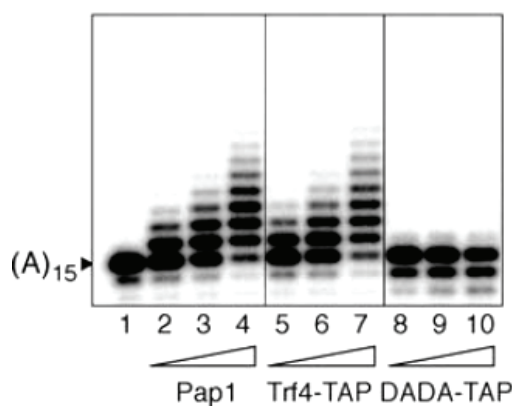
2) На доріжках 5-7 представлені результати експерименту *in vitro* впливу передбачуваної нової дріжджової полі(А)-полімерази - білка Tgf4p - на довжину олігонуклеотидів. Як вплинула присутність білка Tgf4p на довжину вихідних олігонуклеотидів? _____

Як залежить довжина сформованого протягом 30 хвилин експерименту довжина полі(А)-хвоста у олігонуклеотидів від концентрації молекул Tgf4p в розчині? _____

Якою є причина збільшення довжини РНК олігонуклеотидів в присутності білка Tgf4p, молекул АТФ і аденозин-фосфату (А)? _____

Підтвердилося чи ні припущення про те, що білок Tgf4p є новою полі(А)-полімеразою? _____

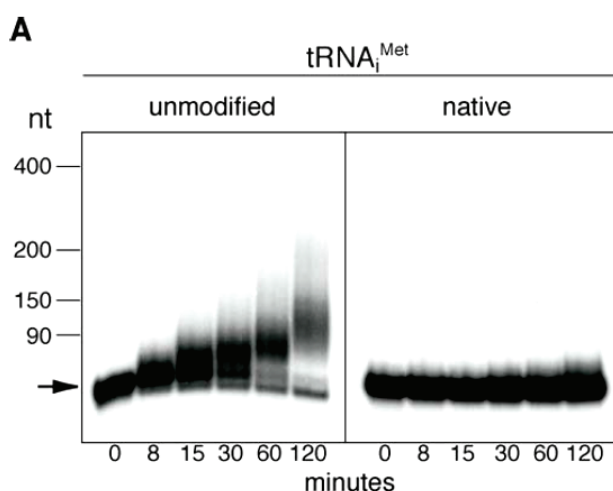
3) На доріжках 8-10 представлені результати експерименту *in vitro* впливу мутантного дріжджового білка Tgf4p (із заміною аспарагінової кислоти в положеннях 236 і 238 на аланін) (білок DADA-TAP на блоті) - на довжину олігонуклеотидів. Як вплинула присутність мутантного білка Tgf4p на довжину вихідних олігонуклеотидів? _____
Яка ділянка молекули Tgf4p є каталітично значимою для здійснення нею полі(А)-полімеразної функції? _____



Білок Tgf4p є каталітичною субодиницею нової полі(А)-полімерази. Tgf4p комплекс має полі(А)-полімеразну активність. Мічені олігонуклеотиди довжиною 15 азотистих основ були інкубовані протягом 30 хв з 5, 10 або 20 нг очищеного білка Tgf4p: з диким типом білка (білок Tgf4-TAP тобто

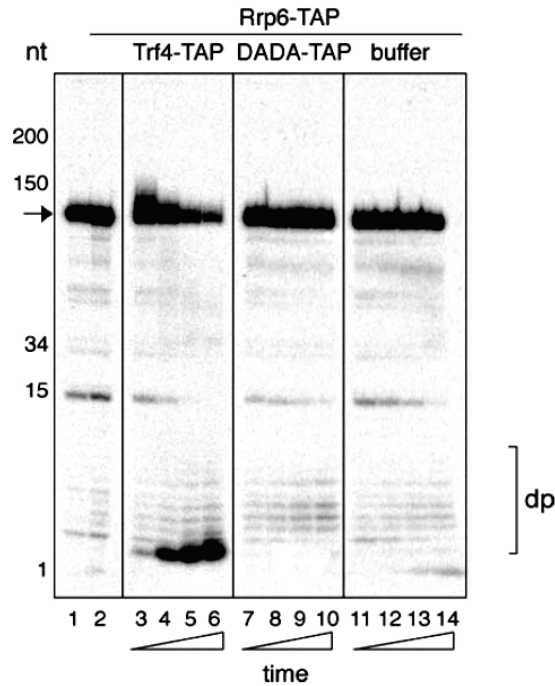
TAP-tagged Trf4p) або з мутантною формою білка з заміною аспарагінової кислоти в положеннях 236 і 238 на аланін (білок DADA-TAP). Білок був пропущений по доріжці 1. Рекombінантна дріжджова полі(А)-полімераза (Pap1) в концентрації 1, 2 і 4 нг була використана в якості позитивного контролю. Стрілкою вказано положення вихідних олігонуклеотидів оліго(А)15. Доріжка 1 - негативний контроль (суміш олігонуклеотидів оліго(А)15 без додавання білків полі(А)-полімерази; доріжки 2-4 - суміш олігонуклеотидів оліго(А)15 після додавання дріжджової Pap1 полі(А)-полімерази в різних концентраціях; доріжки 5-7 - суміш олігонуклеотидів оліго(А)15 після додавання дріжджового білка Trf4p (Trf4-TAP) з передбачуваною полі(А)-полімеразною функцією в різних концентраціях; доріжки 8-10 - суміш олігонуклеотидів оліго(А)15 після додавання мутантного дріжджового білка Trf4p (DADA-TAP) з передбачуваною полі(А)-полімеразною функцією в різних концентраціях. По осі ОУ - маса олігонуклеотидних фрагментів (мінімальна внизу рисунка) (за Vanacova et al., 2005).

4) Вважають, що білковий комплекс Trf4p бере участь в контролі якості РНК-транскриптів. Для перевірки цього припущення, дослідниками *in vitro* були реконструйовані умови роботи білка Trf4p з нативними (якісними) тРНК-транскриптами і з тРНК-транскриптами бракованими, немодифікованими відповідним чином. Результати проведеного дослідження наведено на рисунку. До яких тРНК-транскриптів - нативних (якісних) або до немодифікованих (бракованих) - білок Trf4p пришиває полі(А)-хвости? _____



Білковий комплекс Trf4 переважно поліаденілує немодифіковані молекули тРНК (tRNA_i Met). Був проведений тест на поліаденілуєчу здатність білка Trf4p-TAP з використанням в якості субстрату нативної модифікованої тРНК і не модифікованої тРНК (tRNA_i Met). Мічені тРНК були інкубовані з 50 нг білкового комплексу Trf4 протягом 8 - 120 хв і потім розділені за допомогою гелелектрофорезу. Міграційне положення вихідної для експерименту тРНК вказано стрілкою. Де: native - нативні молекули тРНК (модифіковані, tRNA_iMet); unmodified - немодифіковані молекули тРНК; nt - кількість нуклеотидів; minutes - тривалість (у хвиликах) експериментального впливу білкового комплексу Trf4 на молекули тРНК; tRNA_iMet - транспортна РНК для перенесення метионіну) (за Vanacova et al., 2005).

5) Для встановлення можливої ролі поліаденілування бракованих РНК-транскриптів в їх розщепленні екзосоною, Vanacova S. з колегами (2005) *in vitro* змішали немодифіковані (браковані) тРНК (tRNA_i Met) з білками Rrp6-TAP екзосомного комплексу. Потім були додані: або функціональний білок Trf4 (Trf4-TAP), або мутантний білок (DADA-TAP), або - буфер А (buffer А). Результати проведеного дослідження наведено на рисунку. Вкажіть, в якому з трьох варіантів експерименту, екзосоми проявили свою активність по розщепленню бракованої тРНК (тобто в якому варіанті відбулося накопичення продуктів розщеплення тРНК)? _____



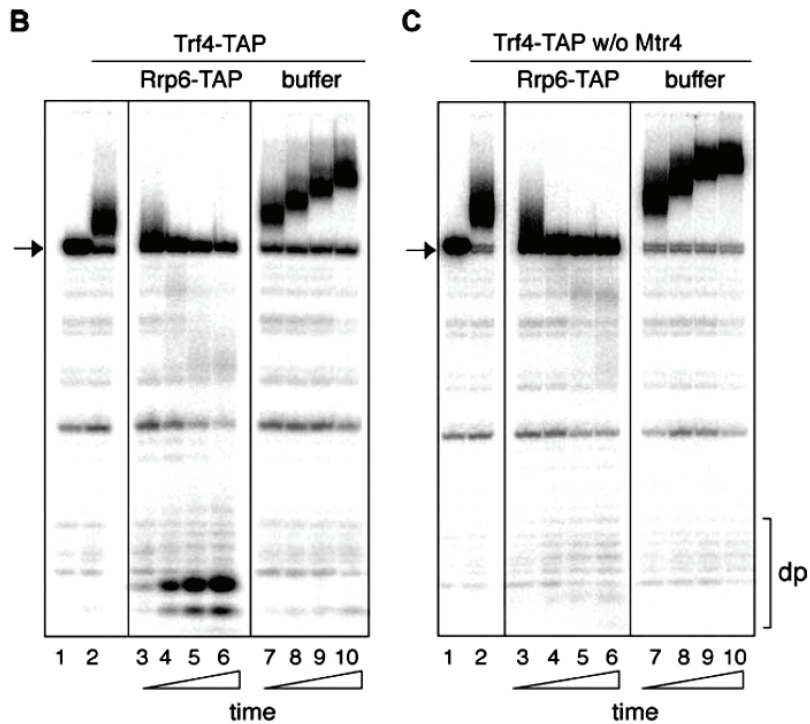
Полі(А)-полімеразна активність Trf4 білкового комплексу стимулює деградацію немодифікованих (бракованих) тРНК молекул (tRNAⁱ Met) за допомогою екзосом. Мічені немодифіковані тРНК (tRNAⁱ Met) були інкубовані з 50 нг очищеного білка Rrp6-TAP протягом 30 хв. Потім були додані: або 50 нг функціонального білка Trf4 (Trf4-TAP), або 50 нг мутантного білка (DADA-TAP), або - буфер А (buffer А). Перебіг реакції було зупинено після 10 хв (лінії 3, 7 і 11), 30 хв (лінії 4, 8 і 12), 60 хв (лінії 5, 9 і 13) і 90 хв (лінії 6, 10 і 14) експерименту. Потім отримані продукти реакції були розділені за допомогою гель-електрофорезу. Стрілками вказано положення вихідної введеної в експериментальну суміш тРНК. Доріжка 1 - без додавання будь-яких білків. Дужкою вказано міграційне положення продуктів деградації (dp) тРНК (за Vanasova et al., 2005).

Як Ви вважаєте, чому в присутності мутантного білка Trf4 і просто буфера - екзосоми не провели розщеплення бракованої тРНК? _____

Зробіть висновок про роль поліаденілування бракованих РНК-транскриптів в їх деградації екзосомами: _____

б) Для встановлення ролі білка Mtr4p, що входить до складу Trf4 білкового комплексу, в деградації РНК-субстратів, Vanasova S. з колегами (2005) *in vitro* змішали мічені немодифіковані тРНК (tRNAⁱ Met) або з повноцінним Trf4-TAP білковим комплексом (рис. В), або з білковим комплексом Trf4p-TAP, що не містить білок Mtr4p (Trf4-TAP w/o Mtr4). Потім були додані білки екзосомного комплексу (Rrp6-TAP) або буфер А (buffer). Отримані продукти реакції розділили за допомогою гель-електрофорезу. Стрілками вказано положення вихідної введеної в експериментальну суміш тРНК. Доріжка 1 - без додавання будь-яких білків; доріжка 2 - поява продуктів поліаденілування тРНК-транскриптів; доріжки 3-6 - інкубування з білками екзосоми; доріжки 7-10 - інкубування з буфером. Дужкою вказано міграційне положення продуктів деградації (dp) тРНК.

Відбувається чи ні поліаденілування бракованих тРНК-транскриптів при використанні в ході експерименту Trf4p-TAP білкового комплексу, що не містить білок Mtr4p (тобто, чи з'явилися на доріжках більш важкі тРНК-транскрипти в порівнянні з вихідними тРНК)?



Відсутність білка Mtr4p в складі Trf4 білкового комплексу призводить до порушення процесів деградації тРНК-транскриптів. (B) Тест на полі(А)-полімеразну активність і активність екзосом в присутності повноцінних білків Trf4 білкового комплексу. Мічені немодифіковані тРНК (tRNAⁱ Met) були попередньо аденільовані за допомогою 50 нг очищеного Trf4-TAP білкового комплексу протягом 30 хв (лінія 2). Потім було додано 50 нг білків екзосомного комплексу (Rrp6-TAP) або буферу А (buffer). Перебіг реакції було зупинено після 10 хв (лінії 3, 7 і 11), 30 хв (лінії 4, 8 і 12), 60 хв (лінії 5, 9 і 13) і 90 хв (лінії 6, 10 і 14) експерименту. Потім отримані продукти реакції розділили за допомогою гель-електрофорезу. Стрілками вказано положення вихідної введеної в експериментальну суміш тРНК. Дужкою вказано міграційне положення продуктів деградації (dp) тРНК. (C) Відсутність білка Mtr4p в складі Trf4 білкового комплексу призводить до неповної деградації тРНК-транскриптів. Мічені немодифіковані тРНК (tRNAⁱ Met) були пред-інкубовані протягом 30 хв з Trf4p-TAP білковим комплексом, що не містить білок Mtr4p (Trf4-TAP w/o Mtr4). Потім до реакційної суміші було додано 50 нг білкового комплексу екзосоми Rrp6-TAP або буферу А і інкубація тривала, як описано в пункті B (за Vanasova et al., 2005).

Відбувається чи ні деградація бракованих поліаденільованих тРНК-транскриптів екзосомами, якщо в ході експерименту використовувався Trf4p-TAP білковий комплекс, який не містить білок Mtr4p? _____

Бере участь чи ні білок Mtr4p в реакціях поліаденілування тРНК-транскриптів? _____
 Припускають, що білок Mtr4p є геліказою. Яку функцію виконують білки-гелікази в клітинах? _____

Поясніть можливу причину пригнічення деградації бракованих поліаденільованих тРНК-транскриптів при використанні в експерименті Trf4p-TAP білкового комплексу, який не містить білок Mtr4p _____

***NB! Поліаденілування** - це процес приєднання великої кількості залишків аденозинмонофосфата (полі(А)-хвоста) до 3'-кінця первинної мРНК (пре-мРНК). У еукаріот поліаденілування є частиною процесингу мРНК - процесу дозрівання первинного транскрипту в зрілу мРНК, готову для трансляції. Полі(А)-хвіст відіграє важливу роль в транспорті мРНК з ядра, її трансляції та стабільності. Згодом полі(А)-хвіст коротшає, і, коли

його довжина стане досить малою, мРНК руйнується під дією спеціальних ферментів. Однак в клітинах деяких типів мРНК з короткими полі(А)-хвостами запасуються в цитозолі для подальшої активації шляхом реполіаденілування.

У бактерій, навпаки, поліаденілування запускає руйнування транскрипта. Подібний ефект поліаденілування відзначений і для багатьох еукаріотичних некодуючих РНК. Так, для тРНК, рРНК, малих ядерних РНК і малих ядерцевих РНК поліаденілування є міткою для їх деградації, зокрема, у дріжджів. Поліаденілування таких РНК здійснює комплекс TRAMP, що приєднує близько 4 нуклеотидів до їх 3'-кінця. Мічена таким чином РНК руйнується екзосоною (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Контрольні питання:

1. Будова екзосомного комплексу.
2. Функціонування екзосомного комплексу.
3. Роль поліаденілування мРНК транскриптів у функціонуванні екзосомного комплексу.

Література:

Delan-Forino C., Schneider C., Tollervey D. Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex // PLoS Genet. – 2017. – Vol. 13(3):e1006699. doi: 10.1371/journal.pgen.1006699.

Drazkowska K., Tomecki R., Stodus K., Kowalska K., Czarnocki-Cieciura M., Dziembowski A. The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities *in vivo* and *in vitro* // Nucleic Acids Res. – 2013. – Vol. 41(6). – P. 3845 - 3858. doi: 10.1093/nar/gkt060.

Vanacova S., Wolf J., Martin G., Blank D., Dettwiler S., Friedlein A., Langen H., Keith G., Keller W. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control // PLoS Biol. – 2005. – Vol. 3(6):e189.

Заняття 8

Тема: Нонсенс-опосередкована деградація мРНК. Процесинг і деградація РНК-транскриптів в Р-тілях.

Нонсенс-опосередкована деградація бракованих мРНК транскриптів (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD). Нонсенс-опосередкована деградація мРНК - це шлях контролю якості молекул мРНК, який знайдений у всіх еукаріот. Основна функція цього шляху - редукувати помилки в експресії генів за рахунок елімінації мРНК транскриптів, які містять передчасні стоп-кодони, оскільки трансляція таких аберантних мРНК може призвести до синтезу токсичних для клітини білків. Система нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів розпізнає не тільки передчасні стоп-кодони, але також і транскрипти, що містять відкриту рамку зчитування (uORF) в 5'-некодуючій ділянці (5'-UTR) молекули мРНК; а також мРНК, що мають у своїй структурі довгі 3'-некодуючі ділянки (3'UTRs) і т.н.

Консервативний білковий кор, що забезпечує функціонування системи нонсенс-опосередкованої деградації молекул мРНК представлений трьома найважливішими білками: UPF1, UPF2 і UPF3 (UPF3A і UPF3B у людини). Це т.зв. up-frameshift proteins (UPF). У ссавців білки UPF2 і UPF3 є частиною комплексу, що з'єднує екзони один з одним (the exon-exon junction complex, EJC). Цей комплекс, разом з іншими білками (eIF4AIII, MLN51 і Y14/MAGOH), приєднується до молекули мРНК після сплайсингу. Всі перераховані вище білки задіяні у функціонуванні системи нонсенс-опосередкованої деградації молекул мРНК. Фосфорилування білка UPF1 контролюється білками SMG-1, SMG-5, SMG-6 і SMG-7.

Процес виявлення аберантних мРНК транскриптів відбувається під час трансляції молекули мРНК. Згідно з однією з моделей, розробленої для клітин ссавців, під час першого кола трансляції молекули мРНК - рибосома видаляє білкові комплекси, які приєдналися до зони з'єднання екзонів в процесі сплайсингу. Якщо після цього першого кола трансляції будь-які з перерахованих вище білків залишаються пов'язаними з молекулою мРНК - це активує систему нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів (оскільки наявність таких білків на вже трансльованому транскрипті свідчить про присутність в його послідовності передчасного стоп-кодону).

*NB! При наявності передчасного стоп-кодону, білкові комплекси в зоні з'єднання екзонів нижче стоп-кодону не видаляються, оскільки рибосома від'єднується від транскрипта після стоп-кодону. Припинення процесу трансляції призводить до того, що на молекулі мРНК починається збірка комплексу, який складається з білків UPF1, SMG1 і факторів вивільнення eRF1 і eRF3. Якщо через наявність передчасного стоп-кодону на молекулі мРНК залишається білковий комплекс в зоні екзон-екзонного з'єднання, тоді молекула UPF1 вступає в контакт з молекулами UPF2 і UPF3 екзонного комплексу, що запускає процес фосфорилування молекули UPF1. У хребетних тварин розташування екзон-екзонного комплексу відносно стоп-кодону зумовлює те, чи буде молекула мРНК піддана розщепленню в системі нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів. Якщо стоп-кодон розташовується нижче або в межах 50 нуклеотидів від останнього екзон-екзонного комплексу - це означає що транскрипт буде трансльоватися нормально. Однак, якщо стоп-кодон розташовується вище, ніж на відстані 50 нуклеотидів від будь-якого екзон-екзонного комплексу, - то такий транскрипт видаляється системою нонсенс-опосередкованої деградації мРНК.

Фосфорильований білок UPF1 взаємодіє з білками SMG-5, SMG-6 і SMG-7, які промотують дефосфорування UPF1. Білок SMG-7 вважається завершальним ефектором в системі нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів, оскільки він акумулюється в процесивних Р-тілях, які знаходяться в цитоплазмі, і є цитоплазматичними сайтами деградації молекул мРНК. І в клітинах дріжджів, і в клітинах людини основний шлях, який запускає нонсенс-опосередковану деградацію мРНК транскриптів, ініціюється видаленням 5'-шапочки з молекули мРНК, за яким слідує розщеплення мРНК молекули

екзорибонуклеазою XRN1. Однак, деградація бракованих мРНК транскриптів може також проходити по іншому шляху, який включає деаденілування і деградацію в напрямку 3'-5'.

У доповнення до загальноновизнаної ролі системи нонсенс-опосередкованої деградації в видаленні бракованих молекул мРНК, є мРНК транскрипти, що містять інтрони в структурі своїх 3'-нетранслюємих ділянок (3'UTRs). Згідно зі своєю структурою, ці інформаційні молекули також повинні видалятися за допомогою системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів. Це дозволило припустити, що дана система розщеплення молекул мРНК грає також важливу роль і в деградації нормальних фізіологічних транскриптів.

Таким чином, система нонсенс-опосередкованої деградації мРНК грає важливу роль в контролі експресії генів. Порушення у функціонуванні системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів призводять до розвитку захворювань у живих організмів. Наприклад, спадкове захворювання крові - бета-таласемія - викликано мутацією в гені бета-глобіну (β -globin). Однак, якщо у індивіда тільки один аллель гена пошкоджений мутацією - то в його організмі практично повністю відсутні аберантні мРНК транскрипти внаслідок їх видалення системою нонсенс-опосередкованої деградації бракованих молекул мРНК. Однак, якщо у індивіда є мутації в системі деградації бракованих транскриптів - то захворювання яскраво проявляється клінічно навіть при гетерозиготності індивіда по мутації в гені бета-глобіну (за https://en.wikipedia.org/wiki/Nonsense-mediated_decay).

Роль системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів в регулюванні рівня нормальних фізіологічних клітинних мРНК. Проведені дослідження показали, що багато фізіологічних транскриптів теж містять ділянки розпізнавання системою нонсенс-опосередкованої деградації мРНК, проте, до певного моменту часу - ці молекули мРНК залишаються функціональними. І тільки після завершення виконання своїх функцій - вони руйнуються системою нонсенс-опосередкованої деградації.

Виявилось, наприклад, що молекули мРНК GCN4 і YAP1, що мають у своїй структурі відкриту рамку зчитування (uORFs) в 5'-некодуємих ділянках (5'-UTRs), мають крім того стабілізуючий елемент (STE), який запобігає швидкому руйнуванню даних мРНК системою нонсенс-опосередкованої деградації за рахунок зв'язування STE-елементу з білком Pub1.

Крім того, система нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів також регулює рівень молекул мРНК з довгими 3'-некодуємих ділянками (3'-UTRs). Згідно з експериментальними даними, присутність білка PABPC1 біля стоп-кодону є антагоністом системи нонсенс-опосередкованої деградації транскриптів з довгими 3'-некодуємих ділянками (3'-UTRs). Подальші дослідження показали, що гальмування роботи системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів не обмежується тільки зв'язуванням мРНК з білком PABPC1, але також може бути досягнуто за рахунок білків, що містять PABP-взаємодіючий мотив-2 (PABP-interacting motif 2, PAM2), при їх мобілізації до сайтів розпізнавання факторами системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК. В цілому, отримані дані свідчать про те, що короткі PAM2 пептиди ефективно пригнічують роботу системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК, яка активується довгими 3'-некодуємих ділянками (3'-UTR) молекул мРНК, а також білковим комплексом в зоні з'єднання екзонів.

Таким чином, проведені дослідження показали, що нормальні клітинні мРНК також містять ділянки розпізнавання системою нонсенс-опосередкованої деградації. Зокрема, це відкриті рамки зчитування в 5'-UTR нетранслюємії зоні мРНК і довгі ділянки в 3'-UTR нетранслюємії зоні мРНК. У нормі, ці ділянки у функціональних клітинних мРНК закриті захисними білками. Коли мРНК транскрипт завершує виконання своїх функцій - захисний білок знімається і мРНК транскрипт руйнується білками системи нонсенс-опосередкованої деградації.

Процесинг і деградація РНК-транскриптів в Р-тілях (Processing bodies, P-bodies). Р-тіля - це ділянки в цитоплазмі еукаріотичних клітин, що складаються з великої

кількості білків, залучених в оборот молекул мРНК. Р-тілця були виявлені в соматичних клітинах тварин, рослин і грибів. Було показано, що Р-тілця відіграють фундаментальну роль в нонсенс-опосередкованому руйнуванні молекул мРНК, в руйнуванні молекул мРНК, опосередкованому аденілат-урідилат збагаченими елементами (adenylate-uridylate-rich element mediated mRNA decay), в замовчуванні молекул мРНК, індукованному мікроРНК. Не всі молекули мРНК, що потрапили в Р-тілця піддаються деградації. Деякі з таких мРНК здатні виходити з Р-тілця і відновлювати свою трансляцію.

Таким чином, з Р-тілцями в цитоплазмі еукаріотичних клітин асоційовані такі процеси: 1) декапітування і деградація небажаних молекул мРНК; 2) зберігання молекул мРНК до ініціювання подальшої їх трансляції; 3) трансляційна репресія молекул мРНК за допомогою мікроРНК (пов'язана з механізмом РНК-інтерференції) (за <https://en.wikipedia.org/wiki/P-bodies>).

Р-тілця (за Eulalio et al., 2007). У еукаріот білкові чинники, з функціями репресії трансляції, мРНК мовчання, нагляду за мРНК (або контролю якості) і деградації, ко-локалізуються в дискретних цитоплазматичних доменах, які визначаються як мРНК-процесивні тілця (mRNA-processing bodies), тепер відомі як Р-тілця.

Р-тілця легко виявляються в клітинах багатоклітинних організмів. Їх розміри знаходяться в межах 100 - 300 нм в клітинах ссавців. В останні кілька років кількість білків, які виявляються в Р-тілцях, зростає експоненційно. На додаток до білків, які беруть участь в деградації мРНК, компоненти Р-тілця включають білки нагляду за мРНК, РНК-інтерференції і трансляційної репресії. Рибосомальні білки і білки, які беруть участь в ініціації трансляції, в Р-тілцях відсутні, за винятком кеп-зв'язуючого білка eIF4E і його партнера по зв'язуванню, eIF4E-transporter (eIF4E-T), які виявлені в Р-тілцях ссавців. Присутність білків, які діють в таких широких межах пост-транскрипційних процесів, вказує на центральну роль Р-тілця в регуляції експресії генів.

В Р-тілцях відбувається 5'→3' розщеплення молекул РНК за допомогою екзонуклеази XRN1. Розщепленню передують деаденілування молекули мРНК. Потім - за допомогою декапітуючого ензиму DCP2 видаляється структура шапочки, що робить мРНК чутливою до 5'→3' деградації за допомогою XRN1.

Видалення шапочки з мРНК є незворотнім і тому це чітко регульований процес, який потребує участі декількох білків. Ці білки відомі як ко-активатори декапітації, хоча точна молекулярна функція більшості цих ко-активаторів неясна. Дивним є той факт, що всі білки, які діють на шляху 5'→3' розпаду мРНК, розташовуються в Р-тілцях. Навпаки, компоненти екзосом і SKI-комплексу не виявляються в Р-тілцях, це вказує на певну ступінь компартменталізації шляхів деградації мРНК в цитоплазмі.

У клітинах еукаріот нагляд за якістю молекул мРНК необхідний для гарантії того, що тільки мРНК після повного процесингу і вільні від помилок будуть транслюватися. Серед таких контролюючих механізмів - механізм нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів, який розпізнає і деградує мРНК, що мають передчасні стоп-кодони, обмежуючи тим самим синтез потенційно токсичних фрагментів білків.

Механізм нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів запускається в результаті події передчасного закінчення трансляції, що веде до самозбирання так званого комплексу нагляду на мРНК. Комплекс нагляду представлений UPF1-3 білками, які є консервативними від дріжджів до людини, і 4 додатковими NMD ефекторами (SMG1 і SMG5-7), які також є високо консервативними у більшості багатоклітинних організмів, але не мають ортологів у *S. cerevisiae*. У *S. cerevisiae*, комплекс нагляду за якістю молекул мРНК рекрутує декапітуючі ензими і XRN1, але може також прискорювати деаденілування і 3'→5' деградацію за допомогою екзосом і SKI комплексу (за Eulalio et al., 2007).

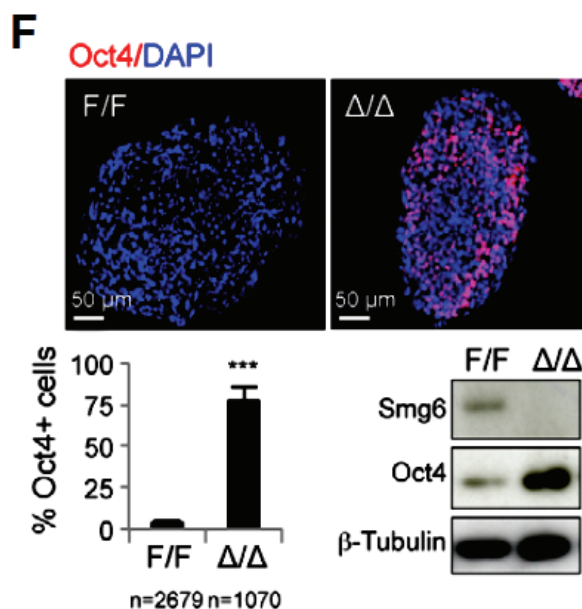
В Р-тілцях також здійснюються процеси РНК-інтерференції. Крім того, в Р-тілцях зберігається нормальна РНК, яка в умовах стресу починає зчитуватися в білки. Аберантні мРНК в Р-тілцях піддаються руйнуванню.

Завдання 1. Роль нонсенс-опосередкованої деградації мРНК в процесах клітинного диференціювання.

Li T. з колегами (2015) була отримана ембріональна клітинна лінія мишей з відключеним геном Smg6, який кодує білок - ключову нуклеазу в нонсенс-опосередкованому шляху деградації мРНК. Оскільки повна втрата Smg6 призводить до летальності у мишей на стадії бластоцисти, то в роботі використовували індукуєму делецію в Smg6, яка є сумісною з проліферацією ембріональних стовбурових клітин (ESCs), не дивлячись на відсутність функціонального механізму нонсенс-опосередкованої деградації мРНК.

1) У ембріональних стовбурових клітин перехід від недиференційованого до диференційованого стану може бути оцінений як морфологічно, так і за допомогою імуноцитохімічних і біохімічних методів. Зокрема - шляхом виявлення експресії білка Oct4, який є маркером недиференційованих клітин. Результати імуноцитохімічного і біохімічного дослідження контрольних і дефектних по синтезу Smg6 ембріональних стовбурових клітин мишей, наведені на рисунку F. Експресується чи ні білок Oct4 в контрольних клітинах (F/F): _____, в клітинах дефектних по синтезу Smg6 (Δ/Δ) _____?

На підставі отриманих даних вкажіть, відбуваються чи ні процеси клітинної диференціації в контрольних ембріональних стовбурових клітинах: _____, в клітинах дефектних по синтезу Smg6 (Δ/Δ) _____?



Ембріональні стовбурові клітини мишей, дефектні по синтезу Smg6 не здатні диференціюватися. F. Імунозабарвлення (вгорі), кількісний аналіз (внизу зліва) і Вестерн-блот аналіз (внизу праворуч) експресії білка Oct4 (маркера недиференційованих клітин) в контрольних ембріональних стовбурових клітинах і в клітинах, дефектних по синтезу Smg6 Δ/Δ , отриманих з ембріонів на 8 добу розвитку (derived EBs on day 8). Де: Oct4 / DAPI - одночасне фарбування ембріональних стовбурових клітин антитілами проти білка Oct4 (червона флуоресценція) і забарвлення ядер DAPI (блакитна флуоресценція); F/F - контрольна лінія ембріональних стовбурових клітин; Δ/Δ - лінія ембріональних стовбурових клітин, дефектних по синтезу білка Smg6; % Oct4 + cells - відсоток позитивних по імунозабарвленню на білок Oct4 + клітин; n - кількість клітин, підрахованих для п'яти контрольних і шести дефектних по синтезу Smg6 Δ/Δ ембріонів; Oct4 - експресія білка Oct4; Smg6 - експресія білка Smg6; β -tubuline - експресія білка бета-тубуліну (використовувалася в якості контролю) (за Li et al., 2015).

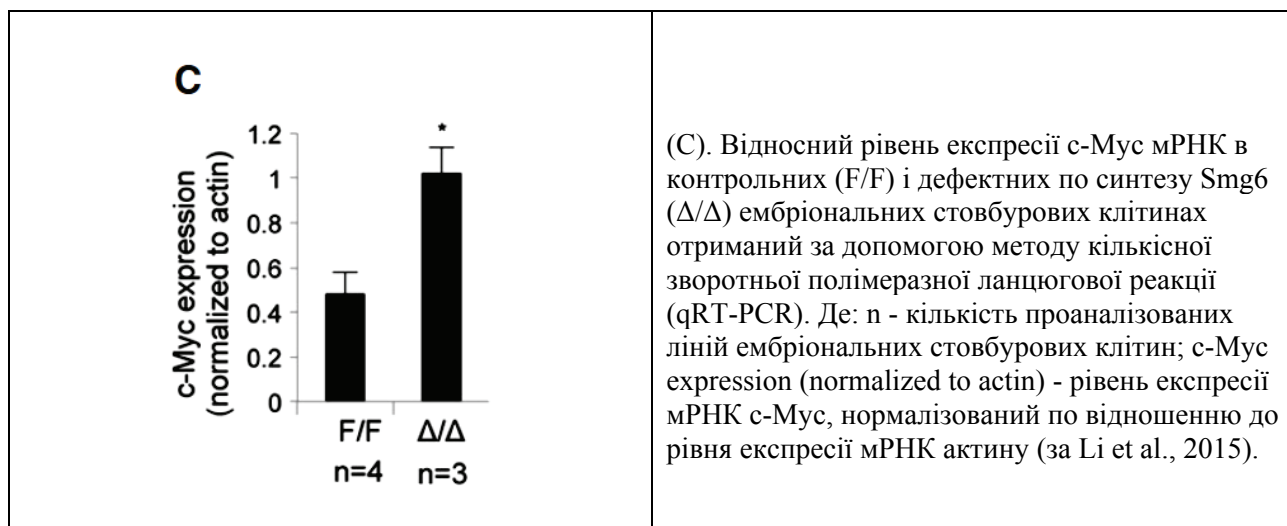
***NB! Oct-4 (Octamer-4)** – це транскрипційний фактор, який містить гомеобокс, з родини POU. Даний білок бере участь в самооновленні недиференційованих ембріональних стовбурових клітин. Широко використовується як маркер для недиференційованих клітин (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/Oct-4>).

2) У клітинах, дефектних по синтезу білка Smg6, порушені процеси нонсенс-опосередкованої деградації молекул мРНК. У чому полягає сутність процесу нонсенс-опосередкованої деградації мРНК? _____

Як Ви вважаєте, яка можлива причина порушення переходу ембріональних стовбурових клітин до диференціації в умовах нефункціонування нонсенс-опосередкованого шляху деградації мРНК? _____

3) Одним з генів, що перешкоджають переходу клітин до диференційованого стану, є ген, що кодує білок с-Мус. Лі Т. з колегами (2015) за допомогою методу кількісної зворотної полімеразної ланцюгової реакції (qRT-PCR) досліджували відносний рівень експресії с-Мус мРНК в контрольних (F/F) і дефектних по синтезу Smg6 (Δ/Δ) ембріональних стовбурових клітинах мишей. Отримані результати наведені на рисунку С. Вкажіть рівень експресії мРНК с-Мус в контрольних клітинах: _____ і в клітинах, дефектних по синтезу Smg6: _____. Поясніть можливу причину не переходу Smg6-дефектних ембріональних стовбурових клітин до процесу диференціювання:

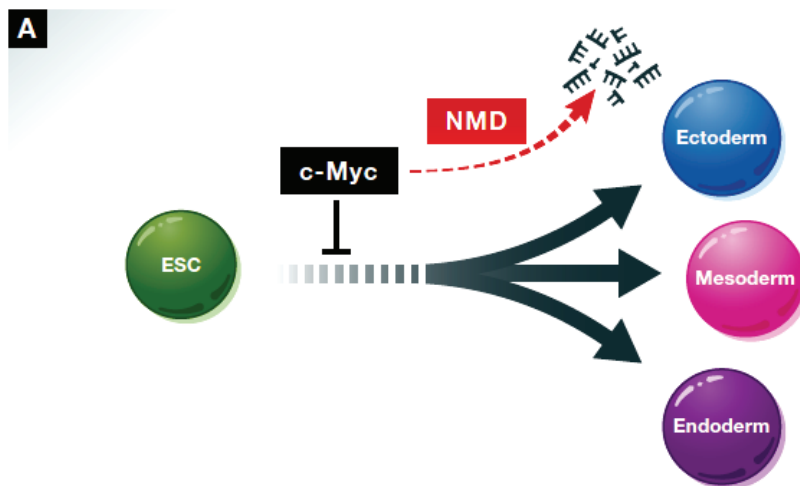
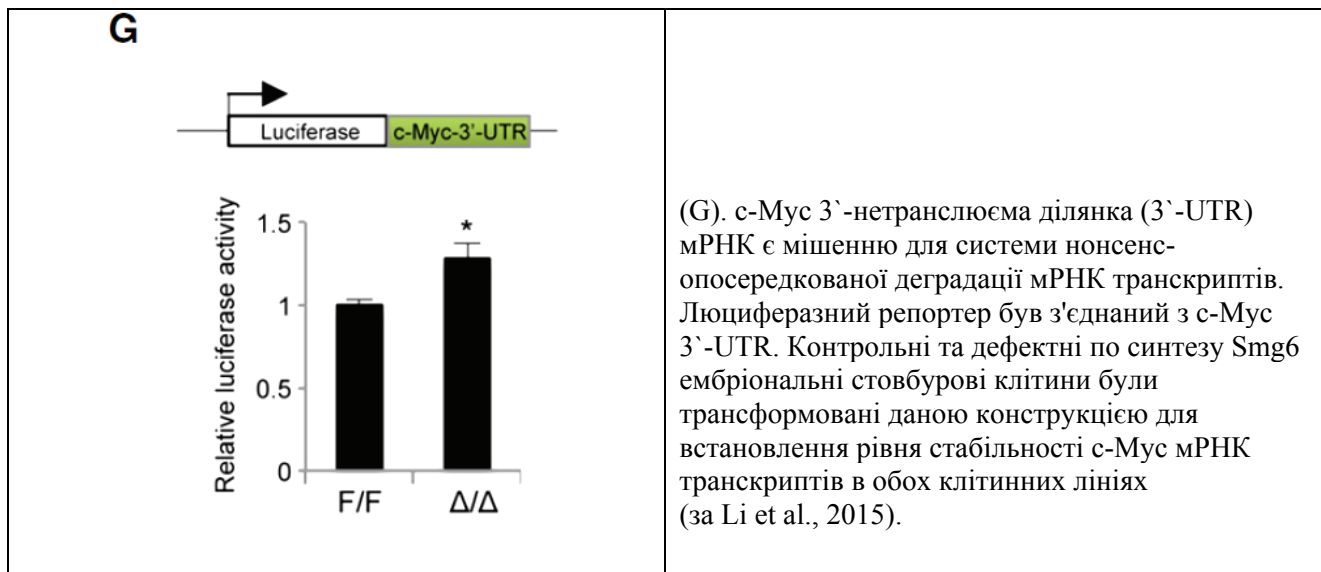
Якою є можлива причина надмірного накопичення мРНК с-Мус в клітинах, дефектних по синтезу білка Smg6? _____



(C). Відносний рівень експресії с-Мус мРНК в контрольних (F/F) і дефектних по синтезу Smg6 (Δ/Δ) ембріональних стовбурових клітинах отриманий за допомогою методу кількісної зворотної полімеразної ланцюгової реакції (qRT-PCR). Де: n - кількість проаналізованих ліній ембріональних стовбурових клітин; с-Мус expression (normalized to actin) - рівень експресії мРНК с-Мус, нормалізований по відношенню до рівня експресії мРНК актину (за Li et al., 2015).

*NB! **с-Мус** - фактор транскрипції, який у людини кодується геном MYC. с-Мус регулює експресію до 15% всіх генів, зв'язується з енансерними послідовностями в ДНК (E-boxes) і посилює активність ацетилтрансфераз гістонів (англ. НАТ). Активація с-Мус супроводжується дедиференціацією і переходом клітин до проліферації. Мутації гена MYC виявлені в багатьох пухлинах, при цьому ген експресується постійно, що призводить до порушення регуляції активності багатьох генів, в тому числі тих, що відповідають за проліферацію клітин (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/Мус>).

4) Для підтвердження гіпотези, згідно з якою мРНК с-Мус є одним з субстратів в системі нонсенс-опосередкованої деградації мРНК, Лі Т. з колегами (2015) була створена репортерна конструкція, в якій до репортерного гену люциферази було пришито с-Мус 3'-нетранслюєму ділянку (3'-UTR). Дана конструкція була трансфікована в контрольні та дефектні по білку Smg6 ембріональні стовбурові клітини. Результати люциферазного тесту наведені на рисунку G. Вкажіть відносний рівень активності репортерного гену люциферази в контрольних клітинах: _____ і в клітинах, дефектних по Smg6: _____. Чому в клітинах, дефектних по Smg6, рівень накопичення продуктів зчитування репортерної конструкції є вищим, ніж в контрольних клітинах? _____

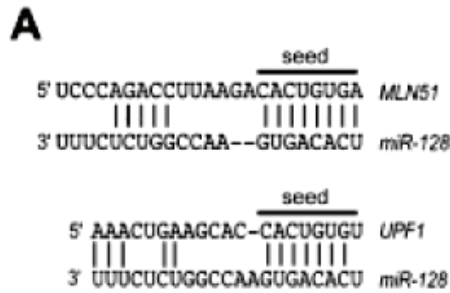


Нормальний функціональний стан механізму нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів є необхідним для переходу клітин від недиференційованого до диференційованого стану. При цьому однією з найважливіших мiшеней для нонсенс-опосередкованої деградації є мРНК c-Myc. Де: NMD - нонсенс-опосередкована деградація мРНК транскриптів; ESCs - ембріональні стовбурові клітини; Endoderm - ендодерма, Mesoderm - мезодерма, Ectoderm - ектодерма (за Lou et al., 2015).

Завдання 2. Клітинні системи регулювання нонсенс-опосередкованої деградації фізіологічних мРНК транскриптів за допомогою мікроРНК. Роль miR-128 в диференціації клітин нервової системи.

Нонсенс-опосередкована деградація мРНК транскриптів задіяна в деградації як аберантних, так і нормальних РНК транскриптів, що мають сигнал розпізнавання системою нонсенс-опосередкованої деградації. У ряді досліджень було показано, що мутації, які порушують роботу системи нонсенс-опосередкованої деградації РНК, призводять до розвитку неврологічних захворювань у людей, що свiдчить про участь даної системи деградації РНК в роботі мозку.

Комп'ютерний аналіз послiдовностей дозволив Bruno I.G. з колегами (2011) виявити передбачувану мікроРНК, здатну регулювати експресію мРНК білків UPF1 і MLN51, ключових для функціонування нонсенс-опосередкованого механізму деградації мРНК. Такою мікроРНК виявилася miR-128 (див. схему на рис. А).



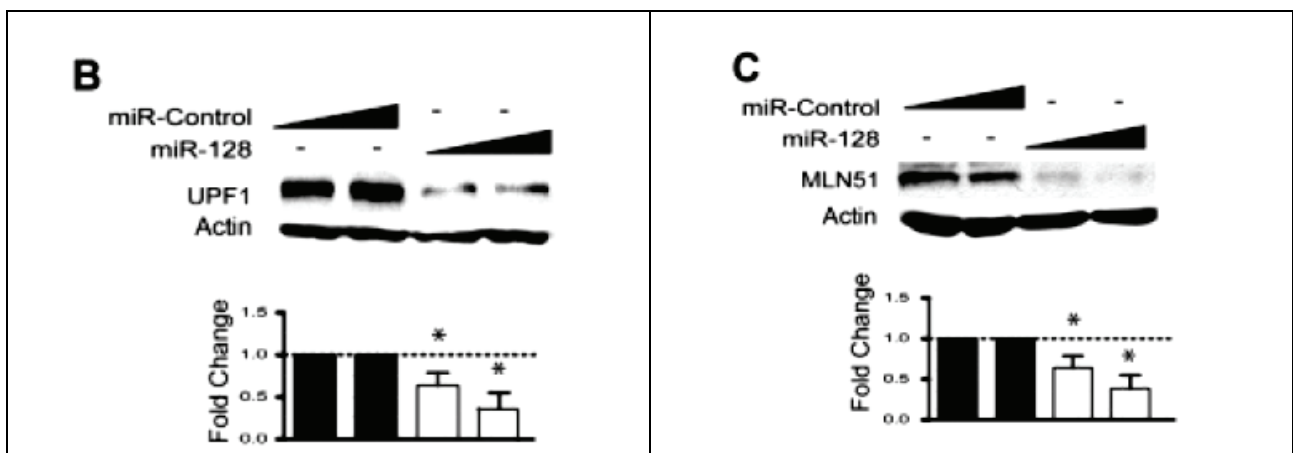
Передбачувані ділянки зв'язування мікроРНК miR-128 з 3'-нетранслюєними (3'-UTRs) ділянками мРНК MLN51 і UPF1 (за Bruno et al., 2011).

1) Для експериментального підтвердження здатності виявленої мікроРНК miR-128 регулювати експресію мРНК UPF1 і MLN51, Bruno I.G. з колегами (2011) було проведено трансфекцію клітин лінії HEK293 зрілими мікроРНК miR-128 (оскільки в нормі рівень експресії мікроРНК даного типу в цих клітинах дуже низький), а також - нефункціональними мікроРНК (контроль, miR-Control). Результати досліджень наведені на рисунках В-С. Вкажіть, як вплинула трансфекція мікроРНК miR-128 на експресію в клітинах лінії HEK293 білка UPF1: _____ . Використовуючи дані, наведені на гістограмі (рис. В), дайте відповідь, у скільки разів знизився рівень експресії білка UPF1 при трансфекції HEK293 клітин різними концентраціями мікроРНК miR-128: _____ .

Як вплинула трансфекція мікроРНК miR-128 на експресію в клітинах білка MLN51: _____ . Використовуючи дані, наведені на гістограмі (рис. С), дайте відповідь, у скільки разів знизився рівень експресії білка MLN51 після трансфекції HEK293 клітин різними концентраціями мікроРНК miR-128: _____ .

Підтвердили чи ні отримані експериментальні дані теоретичне припущення про те, що мікроРНК miR-128 здатні регулювати експресію мРНК білків UPF1 і MLN51, необхідних для функціонування системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів? _____ .

Чи правильним є ствердження, що мікроРНК miR-128 є специфічними інгібіторами роботи системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів? _____ .



Результати Вестерн-блот аналізу рівня ендогенних білків UPF1 (рис. В) і MLN51 (рис. С) в HEK293 клітинній лінії через 24 годин після трансфекції клітин або зрілими мікроРНК miR-128, або - нефункціональними мікроРНК (контроль, miR-Control). Трансфекцію проводили двома концентраціями мікроРНК. Рівень експресії білка бета-актину (β -actin) був використаний в якості внутрішнього контролю. Гістограми під блотом показують кратність зміни рівня експресії білків-інтересу в порівнянні з контролем (за Bruno et al., 2011).

2) Для встановлення можливого тканинспецифічного і онтогенез-специфічного характеру експресії мікроРНК miR-128, авторами роботи були досліджені РНК, виділені з різних тканин мишей. Результати Нозерн-блот аналізу наведені на рисунках А-В. Перерахуйте, в яких тканинах мишей експресуються мікроРНК miR-128 (рис. А): _____, в яких тканинах ці мікроРНК не експресуються: _____.

Чи правильним є ствердження, що експресія мікроРНК miR-128 є тканинспецифічною? _____.

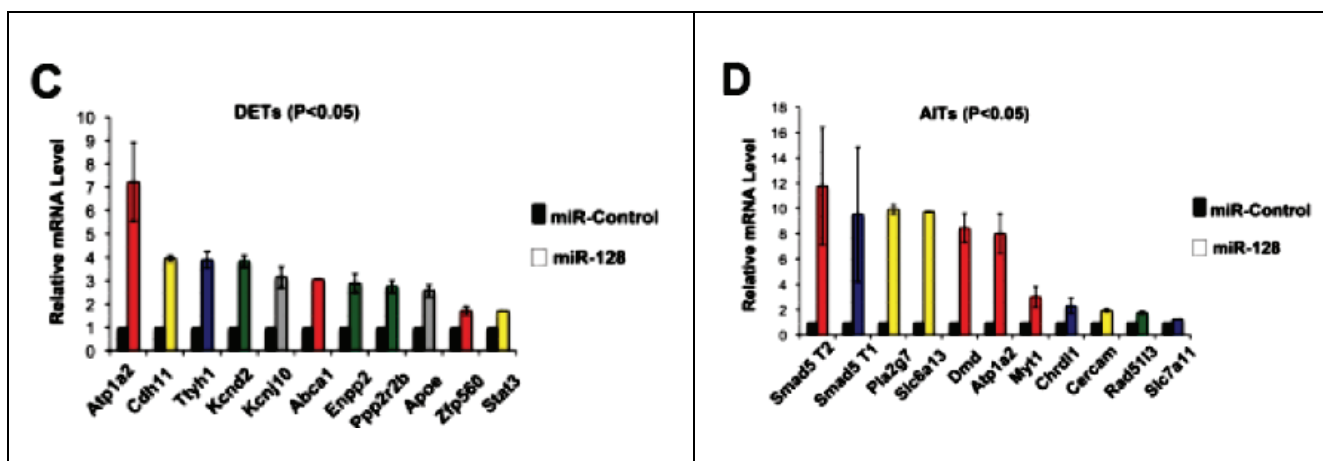
Вкажіть, як змінюється рівень експресії мікроРНК miR-128 в клітинах мозку мишей з віком (рис. В): _____.

Чи можна стверджувати, що експресія мікроРНК miR-128 в клітинах мозку залежить від стадії онтогенезу організму? _____.



(A) Результати Нозерн-блот аналізу різних тканин дорослих мишей по визначенню експресії мікроРНК miR-128. Де: Brain (Br) - мозок; heart (Ht) - серце; Intestine (Int) - кишечник; liver (Li) - печінка; lung (Lu) - легені; spleen (Spl) - селезінка; thymus (Thy) - тимус. В якості контролю використовували експресію U6 маленьких ядерних РНК (snRNA). (B) Результати Нозерн-блот аналізу клітин мозку мишей на різних стадіях ембріогенезу (E) і постнатального розвитку (P) по визначенню експресії мікроРНК miR-128. В якості контролю використовували експресію U6 маленьких ядерних РНК (snRNA) (за Bruno et al., 2011).

3) Для встановлення можливої ролі мікроРНК miR-128 в активації процесів клітинної диференціації у стовбурових клітин нервової системи, Bruno I.G. з колегами (2011) був проведений аналіз рівнів експресії мРНК, специфічних для нейронів, в клітинах, трансфікованих мікроРНК miR-128. Результати проведених досліджень представлені на рисунках С-Д.



(C,D) Результати аналізу експресії нейронспецифічних мРНК в стовбурових нервових клітинах мишей, отримані за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (qPCR). Стовбурові клітини нервової системи були трансфіковані або зрілими мікроРНК miR-128, або - нефункціональними мікроРНК (контроль, miR-Control). По осі ОУ: Relative mRNA Level - відносний рівень експресії мРНК, нормалізований по відношенню до рівня експресії L19 мРНК; по осі ОХ -

мРНК, специфічні для диференційованих клітин нервової системи; DETs (Differentially expressed transcripts) – транскрипти, що експресуються диференційно; AITs (alternative isoform transcripts) - альтернативні ізоформи транскриптів (за Bruno et al., 2011).

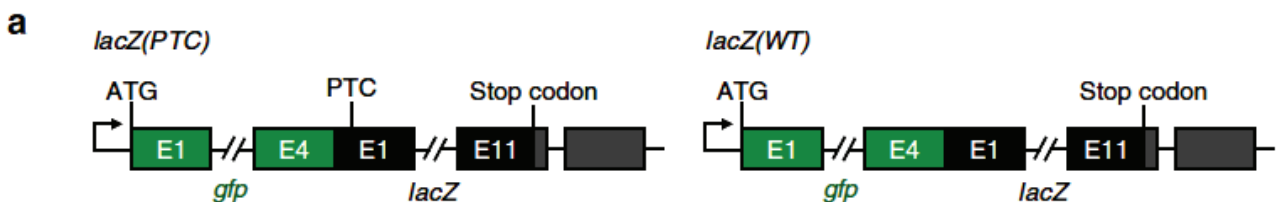
Вкажіть, як і у скільки разів змінився рівень експресії мРНК, характерних для нейронів, в стовбурових клітинах, трансфікованих мікроРНК miR-128 в порівнянні з контролем:

Чи є можливим на підставі отриманих результатів стверджувати, що в стовбурових клітинах нервової системи інгібування нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів за допомогою мікроРНК miR-128 сприяло посиленню експресії мРНК, специфічних для клітин нервової системи?

Завдання 3. Активація системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів сприяє збільшенню тривалості життя організмів.

Організми, які характеризуються довготривалістю життя, часто мають дуже хорошу систему контролю якості білків і ДНК. Однак, роль систем контролю якості РНК транскриптів у встановленні тривалості життя організмів, поки не вивчена. Зокрема, роль системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів, яка задіяна в деградації як аномальних, так і нормальних РНК транскриптів.

Для вивчення залежності активності системи нонсенс-опосередкованої деградації молекул мРНК від віку організму, Son H.G. з колегами (2017) були отримані трансгенні лінії круглих черв'яків *C. elegans*, в геном яких були введені репортерні конструкції: 1) конструкція lacZ (PTC): містить GFP-ген, з'єднаний з геном lacZ, в структурі якого є передчасний стоп-кодон (PTC) і 2) контрольна репортерна конструкція lacZ (WT): містить GFP-ген, з'єднаний з нормальним геном lacZ (див. рис а).



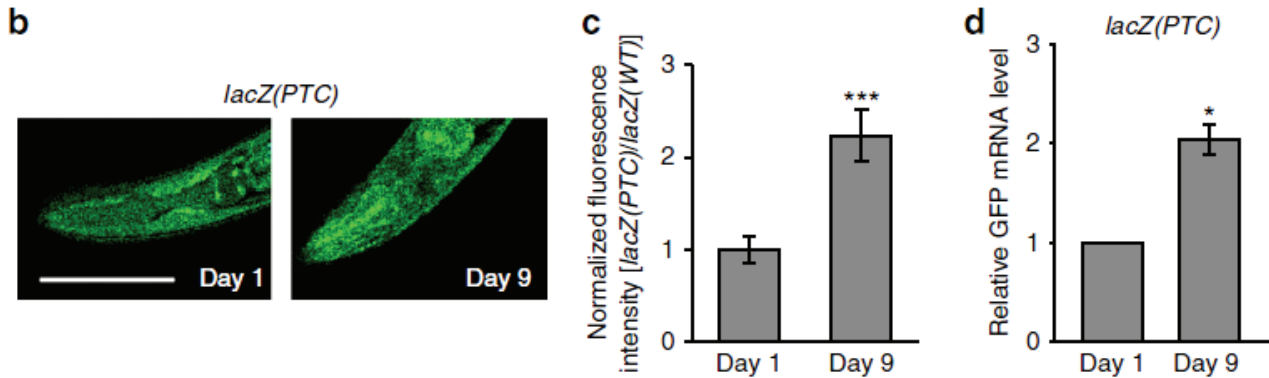
(а) Схема будови двох репортерних конструкцій: lacZ (PTC) і lacZ (WT). Репортерна конструкція lacZ (PTC): містить GFP-ген, з'єднаний з геном lacZ, в структурі якого є передчасний стоп-кодон (PTC). Контрольна репортерна конструкція lacZ (WT): містить GFP-ген, з'єднаний з нормальним геном lacZ. Зеленими прямокутниками вказані екзони гена GFP, чорними прямокутниками вказані екзони гена lacZ, сірими прямокутниками вказані 3'-нетранслюємі ділянки (3'-UTRs); Stop codon - місце положення нормального стоп-кодону; PTC - місце положення передчасного стоп-кодону. Активність репортерних конструкцій встановлювали за інтенсивністю GFP-світіння клітин хробака *C. elegans* (за Son et al., 2017).

1) Що відбувається в клітинах з мРНК транскриптами, які містять передчасний стоп-кодон?

2) Для встановлення залежності активності роботи системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК від віку організму, Son H.G. з колегами (2017) порівняли рівень експресії репортерних конструкцій у черв'яків різного віку, використовуючи інтенсивність флуоресценції репортерного білка GFP. Отримані результати наведені на рисунках b-d. Як і у скільки разів в клітинах хробаків з віком змінився рівень експресії мРНК репортерної конструкції lacZ (PTC), що містить передчасний стоп-кодон (рис. с)?

Чому в клітинах старих хробаків (9 днів) рівень експресії мРНК репортерної конструкції з передчасним стоп-кодом є набагато вищим, ніж в клітинах молодих черв'яків? _____

Чи можливо на підставі отриманих результатів зробити висновок про те, що з віком у організмів активність функціонування системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів - знижується? _____



(b) Рівень експресії репортерної конструкції *lacZ* (PTC) в клітинах молодих (1 день) і старих (9 днів) хробаків оцінювали за інтенсивністю флуоресценції репортерного білка GFP. 1 бар = 100 мкм. (c) Зміни інтенсивності флуоресценції білка GFP, закодованого в репортерній конструкції, в залежності від віку круглих черв'яків. По осі OX: вік хробака, дні; по осі OY: Normalized fluorescence intensity [*lacZ(PTC)*/*lacZ(WT)*] - рівень GFP флуоресценції в клітинах хробаків, трансформованих конструкцією з передчасним стоп-кодом *lacZ(PTC)*, нормалізований по відношенню до контрольних зразків *lacZ(WT)*. (d) Рівень експресії мРНК конструкції *lacZ(PTC)*, що містить передчасний стоп-кодон, в клітинах молодих і старих хробаків встановлений за допомогою методу кількісної зворотної полімеразної ланцюгової реакції (qRT-PCR). Де: Relative GFP mRNA level - відносний рівень мРНК конструкції *lacZ(PTC)* (за Son et al., 2017).

3) Для встановлення можливого тканинспецифічного регулювання рівня активності системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК, Son H.G. з колегами (2017) індукували експресію *lacZ(PTC)* і *lacZ(WT)* конструкцій під тканинспецифічними промоторами (т.т., під промоторами, специфічними для нейронів, гіподерми, м'язової тканини і кишечника). Результати зміни рівня активності репротерних конструкцій в різних тканинах круглих черв'яків з віком наведені на рисунку (f). Як і у скільки разів з віком змінився рівень експресії репортерних конструкцій, що несуть передчасний стоп-кодон, в наступних тканинах круглих черв'яків:

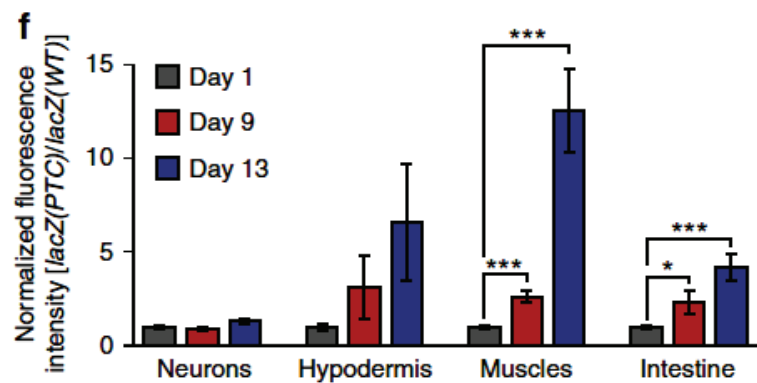
в нейронах: _____;
 в гіподермі: _____;
 в м'язових клітинах: _____;
 в клітинах кишечника: _____.

Про що свідчить зростання активності репротерної конструкції, що містить передчасний стоп-кодон, з віком в клітинах гіподерми, м'язів, кишечника? _____

Про що свідчить стабільність рівня експресії репротерної конструкції, що містить передчасний стоп-кодон, в нейронах черв'яків різного віку? _____

Зробіть висновок, у якій тканині круглих черв'яків з віком рівень активності системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів максимально знижується: _____, в якій тканині - практично залишається незмінним: _____.

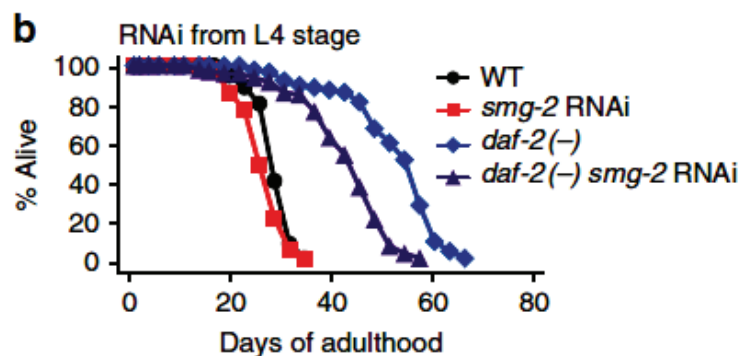
Як Ви вважаєте, чому саме клітини нервової системи є максимально захищеними від накопичення бракованих мРНК транскриптів? _____



(f) Репортерні конструкції lacZ(PTC) і lacZ(WT) були експресовані в клітинах круглих черв'яків під тканиноспецифічними промоторами, характерними для нейронів (neurons), для гіподерміса (hypodermis), для м'язової тканини (muscles), для клітин кишечника (Intestine). По осі ОУ: Normalized fluorescence intensity [lacZ(PTC)/lacZ(WT)] - рівень GFP флуоресценції в клітинах хробаків, трансформованих конструкцією з передчасним стоп-кодоном lacZ(PTC), нормалізований по відношенню до контрольних зразків lacZ(WT) (за Son et al., 2017).

4) Виявлене з віком інгібування процесів нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів дозволило припустити, що одним з факторів, що визначають тривалість життя організмів, є накопичення з віком в клітинах бракованих мРНК транскриптів. Для перевірки цієї гіпотези, були отримані лінії круглих черв'яків із заінгібованою за допомогою РНК-інтерференції експресією білка smg-2 - одного з найважливіших білків, задіяних в системі нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів. У чому полягає сутність методу пригнічення експресії генів за допомогою РНК-інтерференції? _____

Результати впливу на тривалість життя круглих черв'яків інгібування експресії білка smg-2 (за допомогою РНК-інтерференції) наведені на рисунку.



(b) У daf-2 мутантної лінії круглих черв'яків-довгожителів тривалість життя зменшується в умовах інгібування за допомогою РНК-інтерференції експресії білка smg-2 - одного з найважливіших білків, задіяних в системі нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів. Де: WT - вихідна дика лінія круглих черв'яків; smg-2 RNAi - лінія, з заінгібованою за допомогою РНК-інтерференції експресією білка smg-2; daf-2 (-) - daf-2 мутантна лінія круглих черв'яків; daf-2 (-) smg-2 RNAi - daf-2 мутантна лінія круглих черв'яків із заінгібованою за допомогою РНК-інтерференції експресією білка smg-2. По осі ОХ: Days of adulthood - тривалість життя особин, дні; по осі ОУ: % Alive - відсоток живих особин (за Son et al., 2017).

Якою є середня тривалість життя звичайних черв'яків (лінія WT)? _____.
Якою, в середньому, є тривалість життя черв'яків із заінгібованою експресією білка (лінія *smg-2 RNAi*)? _____.

Підтвердилася чи ні гіпотеза, згідно з якою тривалість життя круглих черв'яків залежить від функціонального стану системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів?

Отже, порушення функціональності системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів не зменшило тривалості життя круглих черв'яків.

Одночасно, дослідниками було виявлено, що *daf-2* мутантна лінія круглих черв'яків є лінією черв'яків-довгожителів, у порівнянні зі звичайними дикими хробаками (з максимальною тривалістю життя 70 днів і 35 днів, відповідно). *NB! У черв'яків ген *daf-2* кодує рецептор інсуліну / інсуліноподібного фактора росту 1 (IGF-1). Як вплинуло на тривалість життя черв'яків-довгожителів лінії *daf-2* інгібування за допомогою РНК-інтерференції експресії білка *smg-2*? _____.

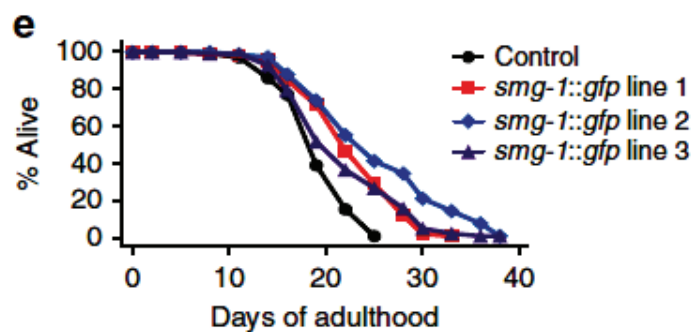
Зробіть висновок про роль процесу нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів у встановленні тривалості життя мутантної *daf-2* лінії черв'яків _____.

5) У *daf-2* лінії круглих черв'яків-довгожителів, у порівнянні з контрольними хробаками, було виявлено інгібування експресії транскриптів з передчасними стоп-кодонами (PTC), з відкритими рамками зчитування в 5'-нетранслюємій області мРНК (uORF 5'-UTR), з довгими 3'-нетранслюємими ділянками мРНК (Long 3'-UTR). Про гіпер-функціонування якої клітинної системи у *daf-2* мутантної лінії круглих черв'яків свідчить зниження кількості транскриптів подібного типу? _____.

Виходячи з отриманих результатів, авторами роботи був зроблений висновок про те, що гіперактивність системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів у *daf-2* мутантної лінії круглих черв'яків є однією з причин довголіття даної лінії.

Для перевірки гіпотези про те, що гіпер-функціонування системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів здатне збільшувати тривалість життя організмів, вченими були отримані трансгенні лінії круглих черв'яків з гіпер-експресією білка *smg-1* - також одного з важливих білків системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів. Як вплинула гіпер-експресія білка *smg-1* на тривалість життя круглих черв'яків?

Зробіть висновок про роль гіпер-функціонування системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів в тривалості життя круглих черв'яків: _____.



Гіпер-експресія білка *smg-1* збільшує тривалість життя круглих черв'яків. (E) Три незалежних гіпер-експресуючих *smg-1* трансгенних ліній круглих черв'яків показали більшу тривалість життя в порівнянні з контрольною дикої лінією черв'яків (за Son et al., 2017).

Контрольні питання:

1. Нонсенс-опосередкована деградація бракованих мРНК транскриптів.
2. Роль системи нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів в регулюванні рівня нормальних фізіологічних клітинних мРНК.
3. Роль нонсенс-опосередкованої деградації мРНК в процесах клітинного диференціювання.
4. Регулювання нонсенс-опосередкованої деградації фізіологічних мРНК транскриптів за допомогою мікроРНК.
5. Система нонсенс-опосередкованої деградації мРНК транскриптів і тривалість життя організмів.
6. Процесинг і деградація РНК-транскриптів в Р-тілях (Processing bodies, P-bodies).

Література:

- Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U., Closs E.I., Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress // *Cell*. – 2006. – Vol. 125(6). – P. 1111 - 1124.
- Bruno I.G., Karam R., Huang L., Bhardwaj A., Lou C.H. et al. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay // *Mol. Cell*. – 2011. – Vol. 42(4). – P. 500 - 510. doi: 10.1016/j.molcel.2011.04.018.
- Eulalio A., Behm-Ansmant I., Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8(1). – P. 9 - 22.
- Li T., Shi Y., Wang P., Guachalla L.M., Sun B., et al. Smg6/Est1 licenses embryonic stem cell differentiation via nonsense-mediated mRNA decay // *EMBO J.* – 2015. – Vol. 34(12). – P. 1630 - 1647. doi: 10.15252/embj.201489947.
- Lou C.H., Shum E.Y., Wilkinson M.F. RNA degradation drives stem cell differentiation // *EMBO J.* – 2015. – Vol. 34(12). – P. 1606 - 1608. doi: 10.15252/embj.201591631.
- Son H.G., Seo M., Ham S., Hwang W., Lee D., et al. RNA surveillance via nonsense-mediated mRNA decay is crucial for longevity in *daf-2/insulin/IGF-1* mutant *C. elegans* // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8:14749. doi: 10.1038/ncomms14749.

Заняття 9

Тема: Редагування молекул РНК

Редагування РНК (RNA editing). Редагування молекул РНК - це зміна їх первинної структури в результаті заміни одних азотистих основ на інші, а також - в наслідок вбудовування або видалення нуклеотидів. Редагування РНК-транскриптів було виявлено у тРНК, рРНК, мРНК, мікроРНК еукаріот і їх вірусів, а також у прокаріот. Редагування відбувається як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин, а також - всередині мітохондрій і пластид.

Події редагування РНК-транскриптів можуть включати: вбудовування додаткових нуклеотидів, видалення нуклеотидів, заміну одного нуклеотиду на інший. Наприклад, в результаті реакцій дезамінування азотистих основ відбувається заміна цитидину на уридин (C-to-U) і аденозину на інозин (A-to-I). Таким чином, в ході редагування РНК-транскриптів можуть з'являтися нові старт- і нові стоп-кодони, може зрушуватися рамка зчитування, можуть з'являтися точкові заміни амінокислот і т.н.

У рослин заміну цитидину на уридин здійснюють білки-редактори родини PPR, тоді як у людини - білки-редактори родини APOBEC. У ссавців заміну аденозину на інозин здійснюють білки-редактори родини ADAR. *NB! У процесі трансляції редагованого мРНК-транскрипту заміна А на І читається клітинними системами як заміна А на G, що призводить до заміни однієї амінокислоти на іншу і т.н.; а у некодуючих РНК - така заміна також сприймається як заміна А на G, що впливає на вторинну структуру і, відповідно, на функції регуляторних молекул (на розпізнавання мішеней дії у мікроРНК, сіРНК, РНК, що беруть участь в сплайсингу і т.н.). Редагування РНК-транскриптів створює велику різноманітність варіантів білків і регуляторних молекул, що розширює функціональні можливості організмів в межах одного і того ж генома (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Зокрема, редагування аденіну в інозин є важливим механізмом генерування молекулярної різноманітності в клітинах мозку, оскільки дозволяє отримувати модифікації транскриптів, що кодує деякі білки, необхідні для нейрональної сигналізації. O'Neil R.T. з колегами (2017) досліджували події редагування 5HT2C, MGLUR4, CADPS, GLUR2, GLUR4 і GABRA3 в тканинах мозку у людини і макаки резус. Авторами роботи був виявлений консервативний характер зразка редагування РНК-транскриптів у різних груп приматів, що свідчить про регульованість процесів редагування та про їх важливість для нормального функціонування тканин мозку (за O'Neil et al. 2017). У ракових клітин дослідниками було виявлено зміну схеми редагування РНК. Вважають, що редагування РНК створює складність транскриптома ракових клітин і забезпечує їм адаптацію до умов середовища і захисних механізмів організму господаря (за Baysal et al., 2017).

Метод виявлення подій редагування транскриптома. Для виявлення фактів можливого редагування РНК-транскриптів дослідники виділяють всю клітинну РНК, ДНК, білки та секвенують їх. Потім порівнюють послідовності амінокислот в білках і нуклеотидів в РНК з нуклеотидними послідовностями в ДНК-матриці, і якщо відбувалися події редагування РНК-транскриптів - виявляють факти невідповідності в даних послідовностях.

*NB! При трансляції мРНК, в якій аденін був замінений на інозин, дана нуклеотидна заміна зчитується як гуанін, і відповідно, в амінокислотній послідовності білка з'являються заміни однієї амінокислоти на іншу.

Завдання 1. Сиквенс-специфічний і тканино-специфічний характер процесів редагування транскриптома (на прикладі транскриптома диких кабанів).

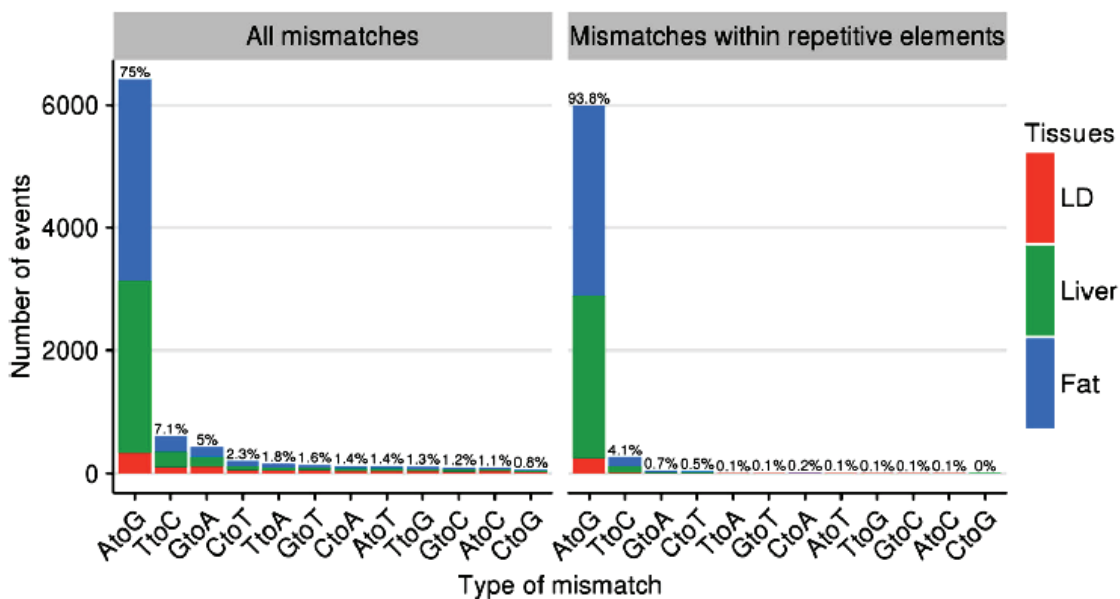
1) За допомогою якого методу можна встановити факт редагування РНК-транскриптів в клітинах? _____

2) Funkhouser S.A. з колегами (2017) досліджували редагування РНК у диких кабанів, порівнюючи сиквенс ДНК і РНК у одних і тих же тварин. Авторами дослідження були

ідентифіковані 8550 випадків розбіжностей між сиквенсами ДНК і РНК в трьох типах досліджених тканин диких кабанів. Результати проведених досліджень наведені на гістограмі № 1. Вкажіть, невідповідності між якими нуклеотидами зустрічаються в клітинах диких кабанів найчастіше? _____

3) Появу якого типу нуклеотидних невідповідностей забезпечує білок ADAR (adenosine deaminase acting on RNA)? Яким є механізм редагування РНК-транскриптів за допомогою білка ADAR? _____

4) Для якого типу тканин виявлені невідповідності нуклеотидів між ДНК і РНК були найбільш численними? _____



Невідповідності між ДНК і РНК транскриптами для різних типів тканин диких кабанів. Де: Number of events - кількість подій розбіжності сиквенсів РНК і ДНК; All mismatches - загальна кількість розбіжностей; Mismatches repetitive elements - кількість розбіжностей для повторюваних елементів геному; Tissues - тканини; LD - скелетні м'язи; Liver - печінка; Fat - жирова тканина; type of mismatch - тип нуклеотидних розбіжностей; AtoG - невідповідність між аденіном і гуаніном; TtoC - невідповідність між тиміном і цитозином і т.н. Кількість нуклеотидних розбіжностей певного типу зазначено у відсотках біля стовпчиків гістограм (за Funkhouser et al., 2017).

5) Проаналізуйте гістограму № 2. Вкажіть, в якій частині генома кількість нуклеотидних невідповідностей між аденіном і гуаніном була максимальною _____, мінімальною _____.

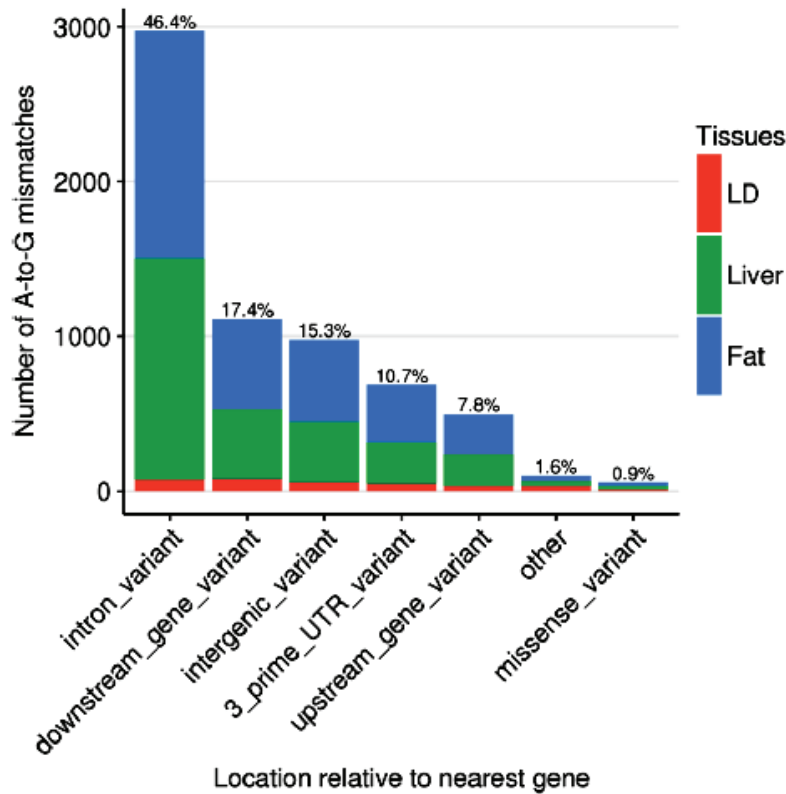
6) На підставі результатів, наведених на гістограмі № 2, вкажіть, в якій частині генома - в кодуючій або в некодуючій - переважно відбуваються події редагування РНК-транскриптів? _____

7) Яку функцію в клітинах виконують некодуючі молекули РНК? _____

8) До якого результату може привести редагування некодуючих молекул РНК? _____

9) Яку функцію в клітинах виконують кодуючі РНК? _____

10) До якого результату може привести редагування кодуючих молекул РНК? _____



Кількість нуклеотидних невідповідностей між аденином і гуаніном в різних ділянках генома диких кабанів. Де: Number of A-to-G mismatches - кількість нуклеотидних невідповідностей аденіну і гуаніну між ланцюгами ДНК і РНК; Location relative to nearest gene - місце розташування ділянки нуклеотидних невідповідностей по відношенню до найближчого гену; некодуючі ділянки геному: intron_variant - всередині інтрона; downstream_gene_variant - ділянка, розташована нижче гена; intergenic_variant - міжгенні ділянки; 3-prime_UTR_variant - 3-некодуюча UTR-ділянка; upstream_gene_variant - ділянка, розташована вище гена; other - інші ділянки; кодуючі ділянки геному: missense_variant - ділянки ексона з міссенс-мутацією (тобто із заміною однієї амінокислоти на іншу; в даному випадку - в результаті редагування РНК-транскриптів); Tissues - тканини; LD - скелетні м'язи; Liver - печінка; Fat - жирова тканина; над стовпчиками гістограми вказаний відсоток нуклеотидних невідповідностей даного типу для кожної ділянки геному по відношенню до загальної кількості A-to-G невідповідностей (за Funkhouser et al., 2017).

11) З 49 виявлених авторами дослідження випадків редагування кодуючих ділянок геному - 32 виявилися міссенс-мутаціями (тобто в результаті редагування РНК-транскриптів сталася точкова заміна однієї амінокислоти на іншу) (див. табл.). Вкажіть, для якої кількості кодуючих генів було виявлено збереження функцій їх білків (толерантність, tolerated), не дивлячись на точкову заміну амінокислот в первинній послідовності білка в результаті редагування їх РНК-транскриптів: _____; для якої кількості кодуючих генів не показано збереження функцій їх білків (шкідливу дію, deleterious) в результаті точкової заміни амінокислот в первинній послідовності білків в результаті редагування їх РНК-транскриптів: _____.

12) В результат процесу редагування РНК-транскриптів в гені, що кодує білок VLCAR з'явилася міссенс-мутація. Використовуючи дані таблиці, вкажіть, як вплинуло редагування РНК-транскрипту даного гена на функціонування відповідного білка _____, в якій тканини експресується даний ген _____. Заміна якої амінокислоти на яку сталася в результаті помилкового процесу редагування відповідного РНК-транскрипту _____.

Вкажіть, які триплетні нуклеотидів кодують дану амінокислоту в молекулах мРНК

_____ . Які зміни в триплеті нуклеотидів РНК в процесі редагування призвели до синтезу амінокислоти _____ замість амінокислоти _____

*NB! При трансляції мРНК, в якій аденін був замінений на інозин, дана нуклеотидна заміна зчитується як гуанін, і відповідно, в амінокислотній послідовності білка з'являються заміни однієї амінокислоти на іншу.

*NB! У клітинах людини редагування РНК-транскриптів білка BLCAP, в наслідок якого відбувається амінокислотна заміна Y/C (тобто заміна тирозину на цистеїн), призводить до зляккісного переродження клітин печінки (гепатокарцинома): транскриптомний аналіз пухлинних клітин виявив у них значно вищий рівень присутності редагованого білка BLCAP в порівнянні з нередатованими формами цього білка. У нормі, білок BLCAP пригнічує розмноження клітин. Відключення роботи цього білка внаслідок редагування його РНК-транскриптів - призводить до пухлинного переродження клітин печінки.

Таблиця. Заміни амінокислот в кодуючій частині генома диких кабанів, пов'язані з редагуванням РНК-транскриптів (виявленні на підставі невідповідності між аденіном і гуаніном в ДНК і РНК транскриптах) (за Funkhouser et al., 2017).

Position:	Gene symbol/ID:	AA:	SIFT:	Tissues:
1:63408856	ENSSSCG00000029003	L/P	tolerated	Fat, LD, Liver
1:125424444	ENSSSCG00000024660	Q/R	tolerated	Fat, LD, Liver
2:12622576	LDHB	I/M	tolerated	Fat, LD, Liver
2:49316285	ARNTL	K/E	tolerated	Liver
4:98044799	COPA	I/V	deleterious	Fat
5:42375023	KRR1	I/T	deleterious	Liver
6:92516721	PTPRM	K/R	tolerated	Fat
6:146168578	NDC1	E/G	deleterious	Liver
7:62951442	NEIL1	K/R	deleterious	Fat, LD
7:81602273	ENSSSCG0000002045	C/R	tolerated	Fat, LD, Liver
7:102789222	ACOT4	T/A	tolerated	Fat
7:129322238	RPS21	C/R	-	Fat, LD, Liver
8:28015971	ENSSSCG00000008767	H/R	tolerated	Fat, LD, Liver
8:31629014	TLR1	I/V	tolerated	Liver
8:32309809	RPL9	I/V	tolerated	Fat
8:32309814	RPL9	E/G	deleterious	Fat
8:48244993	GRIA2	Q/R	tolerated	Fat
9:41146365	ENSSSCG00000023913	Q/R	deleterious	Fat
9:74510703	ENSSSCG00000015294	K/R	tolerated	Liver
9:83273454	SLC25A13	E/G	deleterious	LD
11:22178068	COG3	I/V	tolerated	Fat, LD, Liver
12:20231860	AOC3	Q/R	tolerated	Liver
13:131377159	EIF2B5	Q/R	tolerated	Fat
13:156760971	UBE2B	D/G	tolerated	Fat, LD, Liver
13:206979572	SON	R/G	-	Fat
14:40832826	PLBD2	R/G	tolerated	Fat
14:52398588	IGLV-3	E/G	tolerated	Fat
14:59613334	LYST	S/G	-	LD
14:81796679	OIT3	S/G	tolerated	Liver
15:59811585	HNRNPA2B1	L/P	tolerated	Fat, LD, Liver
15:98217885	ENSSSCG00000028949	R/G	tolerated	Fat, LD, Liver
16:29335640	ENSSSCG00000016869	N/D	tolerated	Fat, LD
16:42512978	ELOVL7	S/G	tolerated	Fat
17:46041505	BLCAP	Y/C	deleterious	Fat, Liver

Де: Position - розташування редагованої ділянки; Gene symbol / ID - символічне позначення гена; AA - заміна амінокислот, пов'язана з редагуванням відповідного гена; SIFT - наслідки редагування кодуєчої ділянки геному для функціонування гена; tolerated - збереження функцій білка, не дивлячись на редагування його РНК-транскриптів; deleterious - не збереження функцій білка внаслідок редагування його РНК-транскриптів; Tissues - тканини, в яких експресується даний ген; LD - скелетні м'язи; Liver - печінка; Fat - жирова тканина (за Funkhouser et al., 2017).

*NB! Відповідність латинської абрєвіатури назви амінокислоти: G, Gly - гліцин; L, Leu - лейцин; Y, Tyr - тирозин; S, Ser - серин; E, Glu - глутамінова кислота; Q, Gln - глутамін; D, Asp - аспарагінова кислота; N, Asn - аспарагін; F, Phe - фенілаланін; A, Ala - аланін; K, Lys - лізин; R, Arg - аргінін; H, His - гістидин; C, Cys - цистеїн; V, Val - валін; P, Pro - пролін; hP, Hyp - гідроксипролін; W, Trp - триптофан; I, Ile - ізолейцин; M, Met - метіонін; T, Thr - треонін; hK, Hyl - гідроксилізин.

Таблиця. Генетичний код молекули мРНК

Положення азотистої основи в кодоні									
1-е осно-ва	2-е основа								3-е осно-ва
	У		Ц		А		Г		
У	УУУ	Фен	УЦУ	Сер	УАУ	Тир	УГУ	Цис	У
	УУЦ		УЦЦ		УАЦ		УГЦ		Ц
	УУА	Лей	УЦА		УАА	Стоп	УГА	Стоп	А
	УУГ		УЦГ		УАГ		УГГ	Три	Г
Ц	ЦУУ	Лей	ЦЦУ	Про	ЦАУ	Гіс	ЦГУ	Арг	У
	ЦУЦ		ЦЦЦ		ЦАЦ		ЦГЦ		Ц
	ЦУА		ЦЦА		ЦАА	Глі	ЦГА		А
	ЦУГ		ЦЦГ		ЦАГ		ЦГГ		Г
А	АУУ	Іле	АЦУ	Тре	ААУ	Асн	АГУ	Сер	У
	АУЦ		АЦЦ		ААЦ		АГЦ		Ц
	АУА		АЦА		ААА	Ліз	АГА	Арг	А
	АУГ	Мет: «Поча-ток»	АЦГ		ААГ		АГГ		Г
Г	ГУУ	Вал	ГЦУ	Ала	ГАУ	Асп	ГГУ	Глі	У
	ГУЦ		ГЦЦ		ГАЦ		ГГЦ		Ц
	ГУА		ГЦА		ГАА	Глу	ГГА		А
	ГУГ	Вал: «Поча-ток»	ГЦГ		ГАГ		ГГГ		Г

Скорочення назв амінокислот: фен - фенілаланін, лей - лейцин, іле - ізолейцин, мет - метіонін, вал - валін, сер - серин, про - пролін, тре - треонін, ала - аланін, тир - тирозин, гіс - гістидин, глі - гліцин, асн - аспарагін, ліз - лізин, асп - аспарагінова кислота, глу - глутамін, цис - цистеїн, три - триптофан, арг - аргінін.

Завдання 2. Зразок редагування РНК є еволюційно консервативним і підтримується у близькоспоріднених груп організмів (на прикладі схеми редагування РНК у людини та інших приматів).

1) Яку роль виконує механізм редагування РНК-транскриптів в клітинах? _____

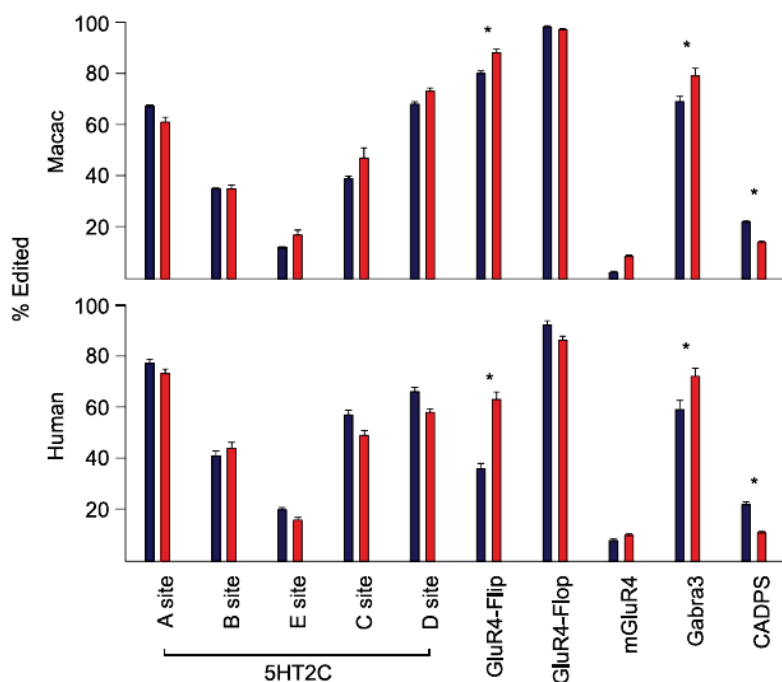
2) O'Neil R.T. з колегами (2017) досліджували події редагування аденіну в інозин в РНК-транскриптах для найважливіших сигнальних білків 5HT2C, MGLUR4, CADPS, GLUR2, GLUR4 і GABRA3, що беруть участь в синаптичній передачі сигналу в тканинах мозку у людини і макаки резус. Проаналізуйте отримані дані (див. гістограми). Перерахуйте, для

яких білків людини рівень редагування їх РНК-транскриптів в клітинах мозку виявився вищим, порівняно з клітинами мозку макаки резус: _____

3) До яких наслідків для функціонування клітин мозку людини привело посилення редагування РНК-транскриптів сигнальних білків? _____

4) З'єднайте суцільною лінією верхівки стовпчиків гістограм для клітин мозку людини і макаки резус. Що можна сказати про подібність або відмінності в загальній схемі інтенсивності процесів редагування РНК-транскриптів різних сигнальних білків в клітинах приматів різних видів? _____

5) Про що свідчить подібність в загальній тенденції інтенсивності редагування РНК-транскриптів сигнальних білків в клітинах мозку людини і макаки резус? _____



Порівняння рівня редагування РНК-транскриптів в тканинах смугастого тіла (стріатум, striatum) і кори мозку людини (Human) і макаки резус (Macac). Де: червоні стовпчики гістограми - дані для клітин кори мозку, сині стовпчики гістограми - дані для смугастого тіла мозку, по осі ОУ - відсоток редагованих РНК-транскриптів, % Edited; по осі ОХ - найважливіші сигнальні білки в клітинах мозку; статистично достовірні відмінності в рівні редагування РНК-транскриптів між клітинами смугастого тіла і кори головного мозку, виявлені одночасно у обох видів приматів, вказані астеріском (*) над стовпчиками гістограм (за O'Neil et al., 2017).

*NB! Аналіз ступеня редагування РНК-транскриптів клітин смугастого тіла і кори головного мозку дозволив виявити консервативний характер просторової регуляції редагування в клітинах мозку приматів, що свідчить про регульованість процесів редагування та про їх важливість для нормального функціонування тканин мозку.

Завдання 3. Редагування РНК забезпечує адаптацію організмів до умов навколишнього середовища (наприклад, у рослин сої - до сольового стресу).

1) Для рослин найбільш поширеним типом редагування нуклеотидів є заміна цитозину на урацил. За допомогою якого білка здійснюється даний тип редагування РНК-транскриптів? _____

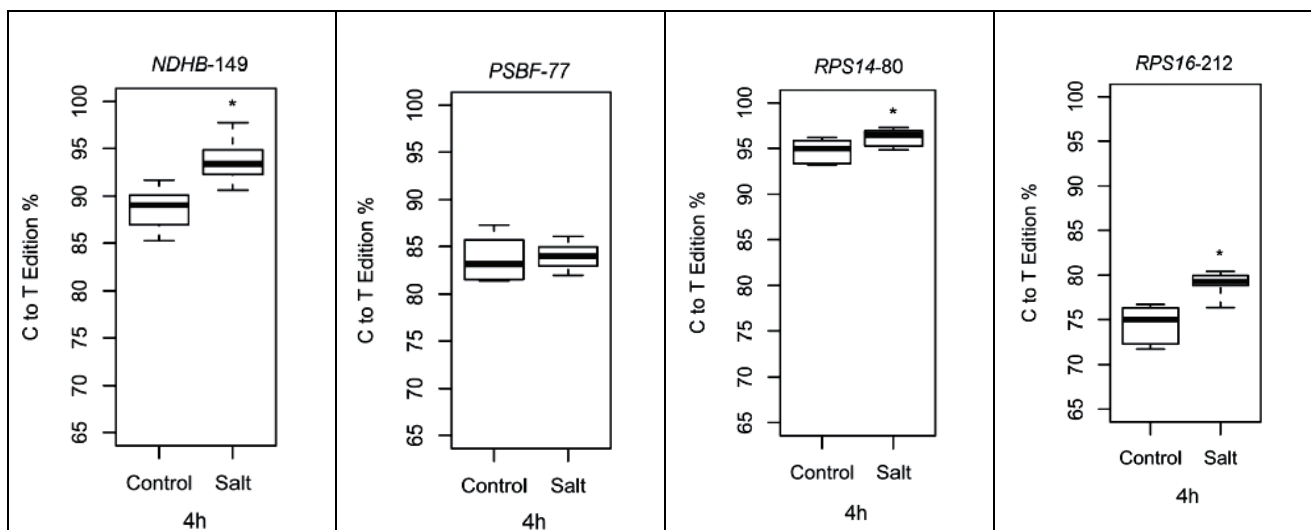
2) До якого ефекту для клітин призводить заміна цитозину на урацил в результаті процесу редагування? _____

3) Рослини ведуть малорухливий спосіб життя. Тому, засолення навколишнього середовища для них є одним з сильних стресорів. Rodrigues N.F. з колегами (2017) досліджували процеси редагування РНК в хлоропластах рослин сої в умовах сольового стресу. Результати проведених досліджень для хлоропластних генів NDHA, NDHB, RPS14 і RPS16, що відповідають за роботу електронно-транспортного ланцюга, фотосистеми і комплексів трансляції білка, представлені на рисунку. *NB! В ході дослідження автори роботи переводили мРНК в кДНК копії і досліджували їх нуклеотидну послідовність. При цьому урацил мРНК транскриптів перекодовувався в тимін. Таким чином, дослідники виявляли заміни Ц-нуклеотидів вихідної ДНК на Т-нуклеотиди кДНК, перекопійованої з мРНК ланцюга.

Який рівень Ц → Т редагування є характерним для РНК-транскриптів хлоропластних генів NDHA, NDHB, RPS14 і RPS16 в контрольних умовах _____

Вкажіть, як змінився рівень Ц → Т редагування РНК-транскриптів хлоропластних генів NDHA, NDHB, RPS14 і RPS16 через 4 години перебування в умовах засолення навколишнього середовища: _____

Яку користь отримує рослина в результаті підвищення рівня редагування своїх РНК-транскриптів в стресових умовах навколишнього середовища? _____



Рівень Ц → Т редагування РНК-транскриптів хлоропластних генів NDHA, NDHB, RPS14 і RPS16 рослин сої в контрольних умовах і в умовах засолення навколишнього середовища. Де: C to T Edition% - рівень Ц → Т редагування, тобто заміни цитозину на тимін; Control - контрольні умови; Salt, 4 h - умови засолення протягом 4 годин. Астеріском (*) вказані достовірні відмінності в рівні Ц → Т редагування РНК-транскриптів між контрольними значеннями і умовами сольового стресу (за Rodrigues et al., 2017).

Завдання 4. Зміна редагування РНК-транскриптів в стресових умовах навколишнього середовища (на прикладі найпростішого динофлагелята симбіодініума).

Liew Y.J. з колегами (2017) досліджували процеси редагування РНК-транскриптів у найпростішого динофлагелята симбіодініума (*Symbiodinium microadriaticum*) в звичайних

умовах і в умовах дії стресових факторів навколишнього середовища (низьких температур, високих температур і темряви). Результати роботи наведені в таблиці.

1) Яка загальна кількість подій редагування РНК-транскриптів була виявлена дослідниками у найпростішого симбіодініума: _____.

2) Яка кількість змін характеру редагування РНК-транскриптів була виявлена у найпростішого симбіодініума в стресових умовах навколишнього середовища: _____.

3) Який відсоток становлять випадки зміни характеру редагування РНК-транскриптів в стресових умовах в порівнянні зі звичайними умовами? _____.

4) Яку користь може отримати організм, змінивши в стресових умовах характер редагування своїх РНК-транскриптів? _____.

5) Який тип редагування РНК-транскриптів переважає в клітинах найпростішого симбіодініума в звичайних умовах? _____.

6) А в стресових умовах? _____.

7) До яких наслідків призводить поява несинонімічних змін в послідовності РНК? _____.

*NB! Авторами дослідження було встановлено, що для несинонімічного редагування - найбільш переважним типом змін був перехід від неполярного білкового ланцюга до поляризованого внаслідок амінокислотних заміни аргініну на валін (в 62 випадках) і проліну на лейцин (в 48 випадках). Крім зазначених вище, було знайдено багато інших змін, які впливають на структуру і функції білка. Наприклад, було встановлено 45 випадків заміни неполярного проліну на полярний серин і 10 випадків заміни лужного лізину на кислотний глутамат.

Таблиця. Редагування РНК-транскриптів в клітинах найпростішого динофлагелята симбіодініума (*Symbiodinium microadriaticum*) в звичайних і в стресових умовах навколишнього середовища (за Liew et al., 2017).

Тип редагування РНК-транскриптів:	Події зміни характеру редагування РНК-транскриптів в стресових умовах:		Події редагування РНК-транскриптів в звичайних умовах:	
	кількість	%	кількість	%
Редагування 5' - UTR нетранслюємої ділянки	59	3,7%	63	2,4%
Посилення стартового кодону	12	0,7%	14	0,5%
Втрата стартового кодону	0	0,0%	1	0,0%
Поява синонімічних змін в послідовності	176	11,0%	263	9,9%
Поява несинонімічних змін в послідовності	692	43,1%	859	32,4%
Редагування інтрона	658	41,0%	1408	53,0%
Посилення стоп-кодону	7	0,4%	13	0,5%
Втрата стоп-кодону	0	0,0%	1	0,0%
Редагування 3' UTR нетранслюємої ділянки	2	0,1%	34	1,3%
Всього:	1606	100%	2656	100%

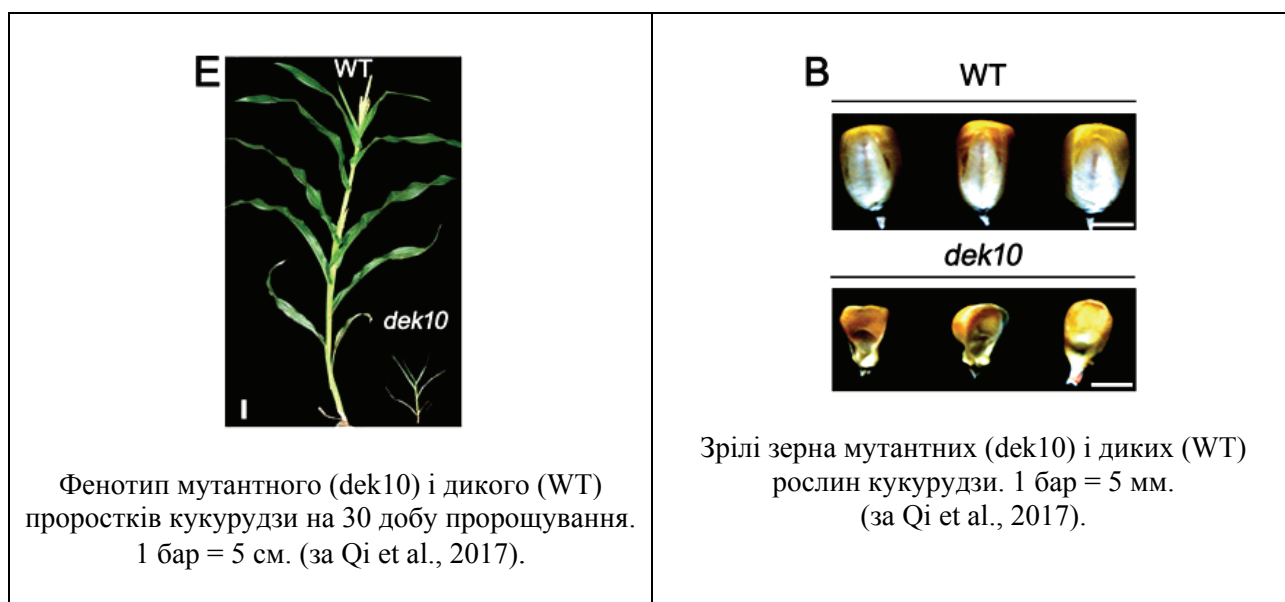
8) Liew Y.J. з колегами (2017) було показано, що в умовах дії стресорів, для РНК-транскриптів одних генів було показано посилення редагування, для інших - навпаки, ослаблення рівня редагування. Авторами дослідження були ідентифіковані 114 генів, які змінювали характер редагування своїх РНК-транскриптів у відповідь на дію стресових умов навколишнього середовища. Серед виявлених 114 генів - 47 змінювали характер редагування своїх РНК-транскриптів у відповідь на дію всіх трьох тестованих стресових факторів (низькі температури, високі температури, затінення). 73 досліджених гена відповіли зміною характеру редагування у відповідь на температурний стрес, редагування інших генів - по-

різному змінилося у відповідь на холододовий і темновий стреси (49 генів і 53 гена, відповідно).

Існує гіпотеза, згідно з якою зміна рівня редагування РНК-транскриптів в стресових умовах (посилення або ослаблення редагування) пов'язана просто з відповідним посиленням або ослабленням експресії білків-редакторів РНК-транскриптів і не є специфічною адаптивною відповіддю клітин на дію стресора певного типу. Спираючись на дані, отримані Liew Y.J. з колегами (2017), підтвердіть або спростуйте цю гіпотезу _____

Завдання 5. Мутації в гені білка-редактора РНК-транскриптів призводять до аномального розвитку у рослин.

Мутантна лінія кукурудзи (*dek10*) - є класичним мутантом з маленькими зернами і затримкою розвитку.



1) Qi W. З колегами (2017) було знайдено, що причиною мутантного фенотипу у рослин кукурудзи є мутація в гені білка Dek10. Білок Dek10 є білком-редактором, який відповідає за C-to-U редагування РНК-транскриптів мітохондріальних білків Nad3 і Cox2. За допомогою якого методу можна перевірити, як в клітинах рослин кукурудзи експресуються білки, необхідні для функціонування мітохондрій? _____

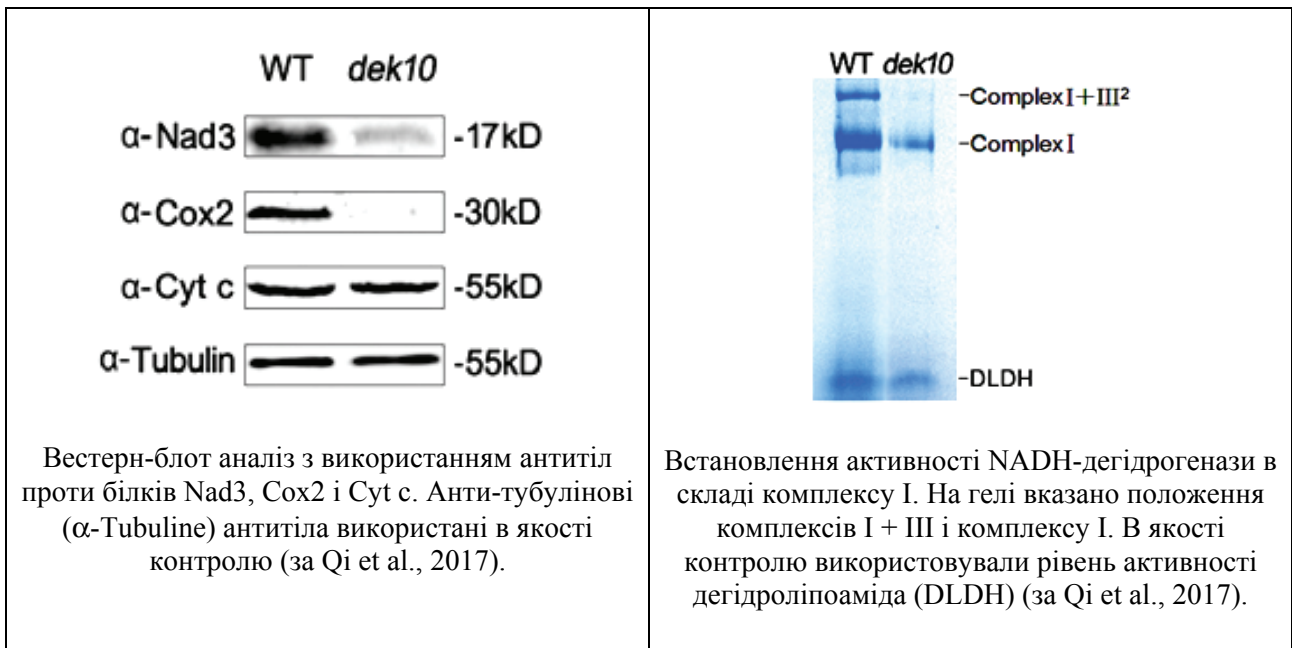
2) Результати аналізу експресії білків Nad3, Cox2 і Cyt c, важливих для функціонування мітохондрій, наведені на рисунку.

Перерахуйте, які з досліджених білків, експресуються в клітинах диких рослин кукурудзи (WT): _____

Які з цих білків експресуються в клітинах мутантних рослин кукурудзи *dek10*? _____

3) Результати гістохімічного аналізу рівня активності NADH-дегідрогенази в складі електронно-транспортного комплексу I мітохондрій наведені на рисунку. Порівняйте рівень активності NADH-дегідрогенази в клітинах диких (WT) і мутантних (*dek10*) рослин кукурудзи _____

4) Зробіть висновок про ефективність роботи мітохондрій в клітинах диких і мутантних рослин кукурудзи _____



5) Якою є можлива причина затримки в онтогенетичному розвитку рослин кукурудзи та формування дефектних зерен? _____

6) Зробіть висновок про роль редагування РНК-транскриптів в нормальному онтогенетичному розвитку рослин: _____

Завдання 6. Розвиток ракових клітин супроводжується зміною схеми редагування їх транскриптома в порівнянні з оточуючими здоровими тканинами.

1) З одного боку - порушення процесів редагування РНК-транскриптів може призводити до розвитку ракових пухлин. З іншого боку - численні дослідження свідчать про те, що в клітинах ракових пухлин змінений характер редагування РНК-транскриптів: в одних типах пухлин рівень редагування підвищений в порівнянні зі здоровими клітинами тих же тканин, тоді як в інших типах пухлин - знижений (за Baysal et al. 2017). Яку користь можуть отримати ракові клітини, змінюючи схему редагування своїх РНК-транскриптів?

2) Перерахуйте білки-редактори, які працюють в клітинах людини: _____

3) Яким є механізм редагування РНК-транскриптів білками-редакторами родини APOBEC? _____

4) Яким є механізм редагування РНК-транскриптів білками-редакторами родини ADAR? _____

5) Якою є функціональна роль редагування РНК-транскриптів білком-редактором ADAR _____

і білком-редактором ADARB1 _____

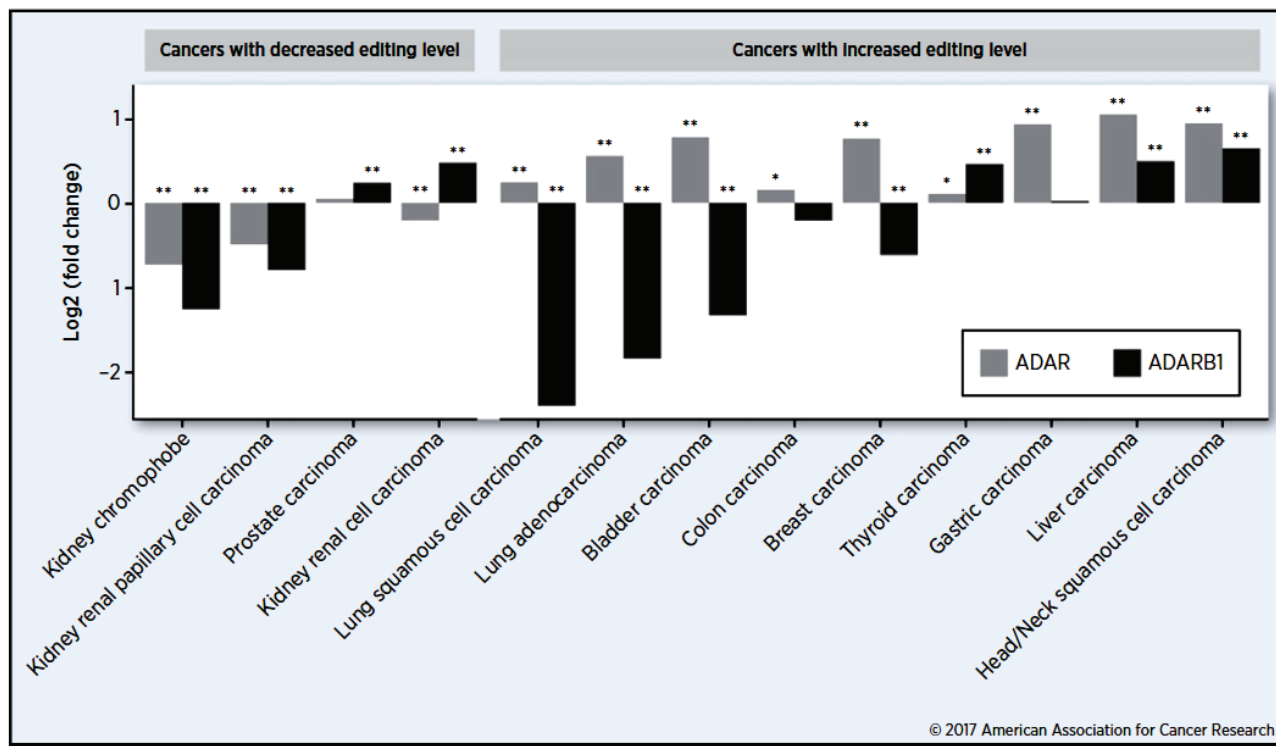
Таблиця. Основні білки, що редагують РНК-транскрипти в клітинах людини (не наведено ADARB2, APOBEC1) (за Baysal et al., 2017).

Білки-редактори:	Функціональна роль РНК-редагування:	Клітинні типи, в яких редагується РНК:	Субклітинна локалізація:	Мішені РНК-редагування:
ADAR (A>I)	Поява нових варіантів білків і супресія вродженого імунітету	Багато типів клітин	Ядро	Деякі
ADARB1 (A>I)	Поява нових варіантів білків для забезпечення нормальної нейрональної сигналізації	Багато типів клітин, але в основному клітини ЦНС	Ядро	Десятки
APOBEC3A (C>U)	Поява нових варіантів білків	Моноцити і макрофаги	Ядро, цитоплазма	Сотні і тисячі
APOBEC3G (C>U)	Поява нових варіантів білків	Невідомо	Цитоплазма	Сотні

*ADARp150 ізоформа локалізована в цитоплазмі.

б) На рисунку наведені результати оцінки рівня експресії білків-редакторів родини ADAR в клітинах різних типів пухлин. Вкажіть, як змінюється рівень експресії білків-редакторів ADAR в пухлинах, що знижують рівень редагування своїх транскриптів _____, в пухлинах, що підвищують рівень редагування своїх транскриптів _____.

Як змінюється рівень експресії білків-редакторів ADARB1 в пухлинах, що знижують рівень редагування своїх транскриптів _____, в пухлинах, що підвищують рівень редагування своїх транскриптів _____.



Гістограми, що вказують кратність зміни рівня експресії білків-редакторів РНК-транскриптів ADAR і ADARB1 в різних типах ракових пухлин в порівнянні з нормальними клітинами цих же типів тканин. Де: Cancers with decreased editing level - ракові пухлини зі зниженим рівнем редагування РНК-

транскриптів; Cancers with increased editing level - ракові пухлини з підвищеним рівнем редагування РНК-транскриптів в порівнянні зі здоровими клітинами; Log₂ (fold change) - кратність зміни рівня редагування РНК-транскриптів в ракових клітинах в порівнянні зі здоровими клітинами. Більшість ракових клітин з підвищеним рівнем редагування РНК-транскриптів демонструє посилення експресії білка-редактора ADAR в порівнянні з клітинами здорових тканин. У клітинах карциноми нирок кількість сайтів з гіперредагуванням перевищує кількість сайтів з гіпоредугуванням, хоча глобальний рівень редагування РНК-транскриптів - знижений (за Baysal et al., 2017).

7) На підставі отриманих даних за спрямованістю і інтенсивністю експресії різних білків-редакторів в різних типах злоякісних пухлин - чи можна стверджувати, що має місце індивідуальний характер зміни схем редагування транскриптома в пухлинах різних типів?

У свою чергу наявність індивідуальних схем редагування транскриптома у пухлин різних типів свідчить про регульованість цього процесу.

Контрольні питання:

1. Редагування РНК (RNA editing). Едитосома.
2. Метод виявлення подій редагування транскриптома.
3. Поняття про сиквенс-специфічний і тканино-специфічний характер процесів редагування транскриптома.
4. Роль редагування РНК в адаптації організмів до умов навколишнього середовища.
5. Роль редагування РНК в онтогенетичному розвитку організмів.
6. Редагування РНК і патологічні зміни в організмах.

Література:

Baysal B.E., Sharma S., Hashemikhabir S., Janga S.C. RNA editing in pathogenesis of cancer // *Cancer Res.* – 2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0520.

Funkhouser S.A., Steibel J.P., Bates R.O., Raney N.E., Schenk D., Ernst C.W. Evidence for transcriptome-wide RNA editing among *Sus scrofa* PRE-1 SINE elements // *BMC Genomics.* – 2017. – Vol. 18(1):360. doi: 10.1186/s12864-017-3766-7.

Liew Y.J., Li Y., Baumgarten S., Voolstra C.R., Aranda M. Condition-specific RNA editing in the coral symbiont *Symbiodinium microadriaticum* // *PLoS Genet.* – 2017. - Vol. 13(2):e1006619. doi: 10.1371/journal.pgen.1006619.

O'Neil R.T., Wang X., Morabito M.V., Emeson R.B. Comparative analysis of A-to-I editing in human and non-human primate brains reveals conserved patterns and context-dependent regulation of RNA editing // *Mol Brain.* – 2017. – Vol. 10(1):11. doi: 10.1186/s13041-017-0291-1.

Qi W., Tian Z., Lu L., Chen X., Chen X., Zhang W., Song R. Editing of Mitochondrial Transcripts nad3 and cox2 by Dek10 Is Essential for Mitochondrial Function and Maize Plant Development // *Genetics.* – 2017. – Vol. 205(4). – P. 1489 - 1501. doi: 10.1534/genetics.116.199331.

Rodrigues N.F., Fonseca G.C.D., Kulcheski F.R., Margis R. Salt stress affects mRNA editing in soybean chloroplasts // *Genet. Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 40(1 suppl 1). – P. 200 - 208. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0055.

Solomon O., Oren S., Safran M., Deshet-Unger N., Akiva P. et al. Global regulation of alternative splicing by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) // *RNA.* – 2013. – Vol. 19(5). – P. 591 - 604. doi: 10.1261/rna.038042.112.

Заняття 10

Тема: Транспортування мРНК і мікроРНК до клітин-мішеней в екзосомах

Екзосоми – мікроскопічні позаклітинні везикули діаметром 30-100 нанометрів, які виділяються в міжклітинний простір клітинами різних тканин і органів. Порожнина екзосом має цитоплазматичне походження і містить білки, РНК і ліпіди; мембрана екзосом утворюється в результаті втягування всередину ендосомальної мембрани. Екзосоми виявлені в різних тканинних рідинах організму, таких як сироватка крові, спинномозкова рідина, а також в сечі, слині і грудному молоці.

До функцій екзосом відносять: здійснення міжклітинної комунікації, передача необхідної інформації від однієї клітини в іншу в процесі метаболізму, участь в неklasичній секреції білків, полегшення імунної відповіді, презентація антигенів, в патогенезі хвороб, пов'язаних з розладами метаболізму і в розвитку злоякісних пухлин. Екзосоми сечі містять антимікробні білки і пептиди, а також бактеріальні та вірусні рецептори, завдяки чому сприяють імунному захисту сечових шляхів. Крім того, за допомогою екзосом в організмі може здійснюватися координація процесів клітинного старіння. Екзосоми можуть брати участь в ключовому шляху взаємодії між стовбуровими клітинами і їх мікрооточенням - передачі мікроРНК між клітинами. РНК, які екзосоми переносять від однієї клітини до іншої, називають човниковими РНК (exosomal shuttle RNA - esRNA) (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 1. Сигнальна роль екзосомної мікроРНК при взаємодії м'язової і кісткової систем.

М'язи і кістки тісно асоційовані анатомічно і функціонально. Однак, механізми, які координують їх взаємодію, залишаються погано вивченими. Міостатин - це міокін, який секретується м'язами, і який пригнічує ріст м'язів. Руйнування гена міостатина призводить до м'язової гіпертрофії і росту кісткової маси. Qin Y. з колегами (2017) припустили, що міостатин може відігравати критичну роль в системі взаємин між м'язами і кістками і може здійснювати прямий вплив на остецити і на секретуемі ними екзосомні мікроРНК, впливаючи таким чином на інші клітини кісткової системи.

1) Для встановлення механізму впливу міостатина на експресію генів регуляторів формування кісток, таких як склеростин (SOST), DKK1 і RANKL в клітинах-остеоцитах, Qin Y. з колегами (2017) була проведена обробка остеоцитів лінії Ocy454 розчином 100 нг/мл міостатина протягом 48 год.

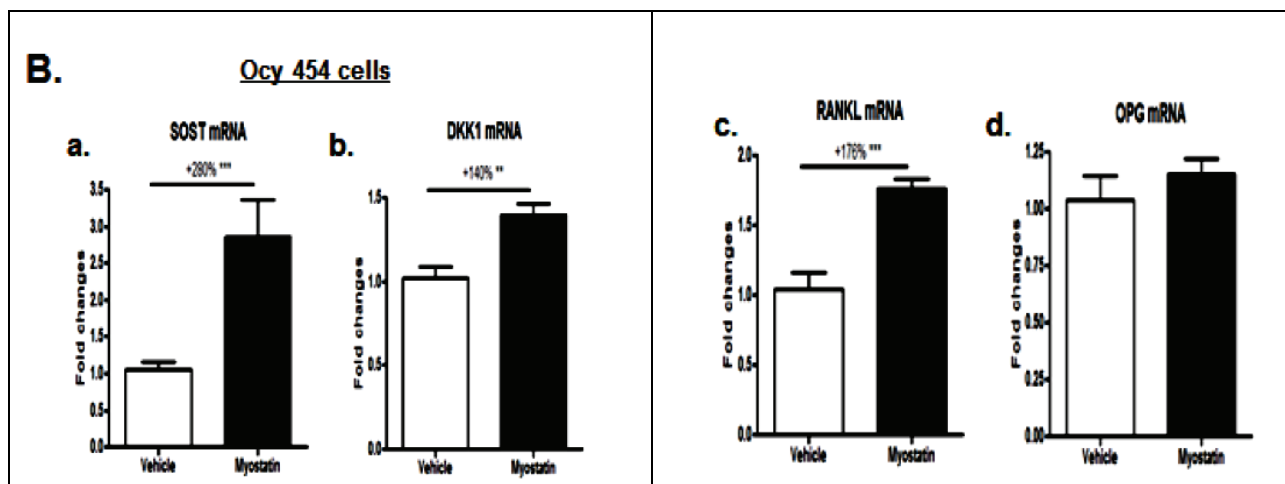
2) Як провести дослідження рівня певних мРНК в клітині, використовуючи ПЛР в реальному часі? _____

***Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) в реальному часі (кількісна ПЛР, Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR)** - лабораторний метод, заснований на методі полімеразної ланцюгової реакції, використовується для одночасної ампліфікації і вимірювання кількості даної молекули ДНК. Метод ПЛР в реальному часі включає в себе одночасно виявлення і кількісне визначення (вимірювання безпосередньо кількості копій, або вимір копій щодо внесеної ДНК або додаткових калібрувальних генів) специфічної послідовності ДНК в зразку. Метод використовує загальні принципи ПЛР. Основна відмінність полягає в тому, що вимірюється кількість ампліфікованої ДНК в реальному часі після кожного циклу ампліфікації. Для кількісного визначення використовують два методи - флюоресцентні барвники, що вбудовуються в дволанцюгові молекули ДНК, і модифіковані олігонуклеотиди (ДНК-зонди), які флюоресциують після гібридизації з комплементарними ділянками ДНК. Часто ПЛР в реальному часі комбінують із ЗТ-ПЛР (зворотня транскрипція) для вимірювання малих кількостей мРНК, що дозволяє досліднику отримувати кількісну

інформацію про вміст даної мРНК в клітині і, відповідно, дозволяє судити про рівень експресії даного гена в окремій клітині або тканині (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

3) Результати аналізу вмісту мРНК SOST, DKK1, RANKL і OPG в остеоцитах, оброблених міостатином, наведені на рисунку. Як вплинула обробка міостатином на експресію генів SOST (рис. a) _____, DKK1(рис. b) _____, RANKL (рис. c) _____ і OPG (рис.d) _____.

4) Зробіть висновок про вплив міостатина на експресію генів SOST, DKK1 і RANKL - регуляторів формування кісток _____.



Вплив міостатина на експресію мРНК SOST, DKK1, RANKL і OPG в остеоцитах лінії Осу454. Остеоцити клітинної лінії Осу454 на 12 день диференціювання були оброблені 100 нг/мл міостатина або допоміжною речовиною - носієм (vehicle, контроль) протягом 48 год. (B) Рівні мРНК SOST, DKK1, RANKL і OPG були встановлені з використанням ПЛР в реальному часі. Де: білі стовпчики гістограм - контроль; чорні стовпчики гістограм - обробка міостатином (за Qin et al., 2017).

***NB! Остеоцити** - клітини кісткової тканини хребетних тварин і людини. Утворюються з остеобластів в процесі розвитку кісткової тканини. **Остеобласти** - молоді остеоцит-утворюючі клітини кістки, які синтезують міжклітинну речовину - матрикс. У міру накопичення міжклітинної речовини, остеобласти замуруються в неї і стають остеоцитами.

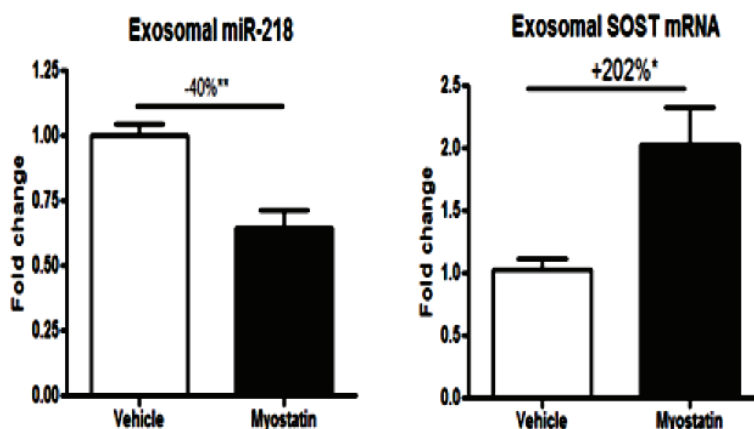
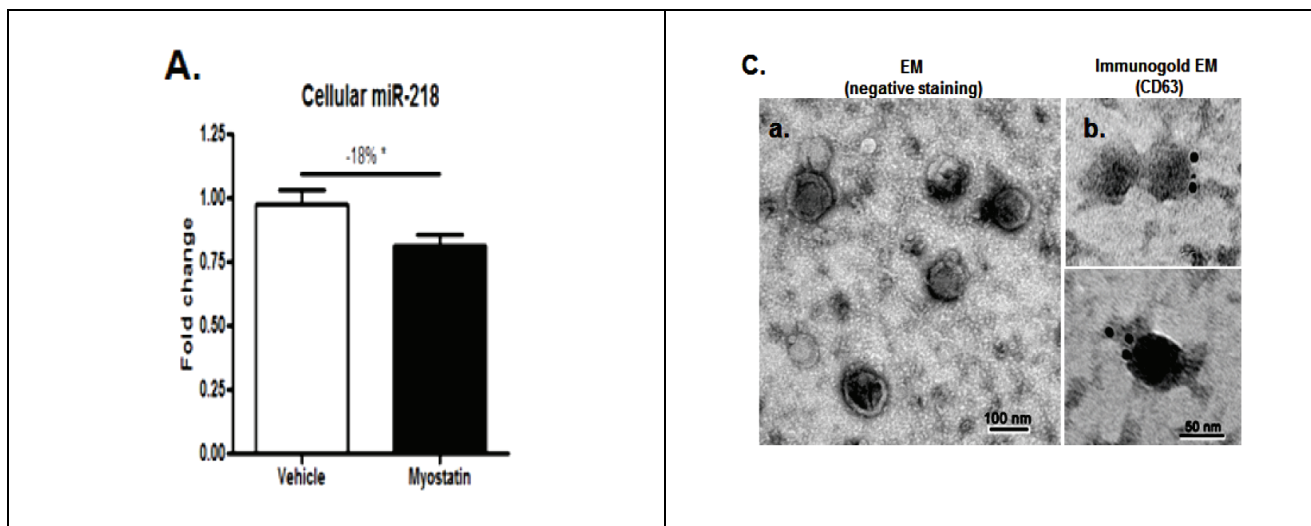
Остеокласти - гігантські багатоядерні клітини хребетних тварин, що видаляють кісткову тканину за допомогою розчинення мінеральної складової і руйнування колагену. У поєднанні з остеобластами остеокласти контролюють кількість кісткової тканини (остеобласти створюють нову кісткову тканину, а остеокласти руйнують стару) (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

5) Результати аналізу експресії мікроРНК miR-218 в остеоцитах лінії Осу454 з використанням ПЛР в реальному часі, наведені на рисунку. Як вплинула обробка міостатином на експресію miR-218 в остеоцитах? _____.

6) Qin Y. з колегами (2017) з поживного середовища були виділені екзосоми, які секретувалися остеоцитами лінії Осу454, і проведено кількісний аналіз мРНК і мікроРНК, що в них містилися. Результати дослідження для екзосомних miR-218 мікроРНК і SOST мРНК наведені на рисунку. Порівняйте кількість miR-218 мікроРНК в складі екзосом і в складі остеоцитів, що їх секретували (остеоцити лінії Осу454, оброблені міостатином): _____.

Порівняйте рівень SOST мРНК в складі екзосом і в складі остеоцитів, що їх секретували (остеоцити лінії Осу454, оброблені міостатином): _____.

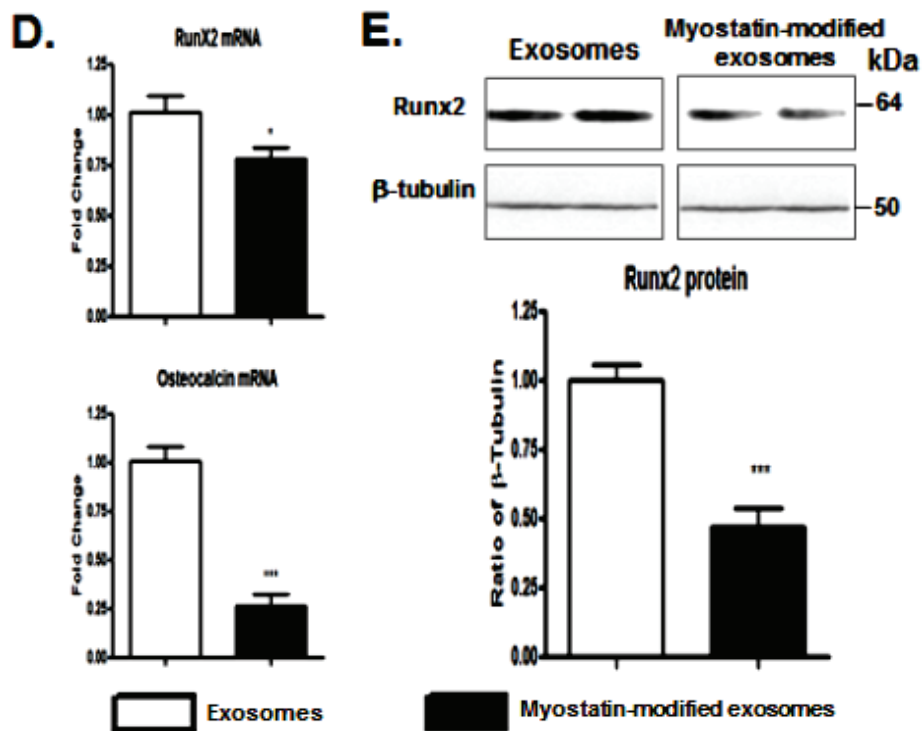
Якими є причини відмінностей в рівнях даних мікроРНК і мРНК між батьківськими клітинами-остеоцитами і секретованими ними екзосомами? _____



Міостатин пригнічує експресію мікроРНК miR-218 в остеоцитах клітинної лінії Осу454 і в їх екзосомах. На 12 добу диференціації - остеоцити лінії Осу454 були оброблені міостатином в концентрації 100 нг/мл або допоміжною речовиною-носієм (vehicle, контроль) протягом 48 год. Потім з поживного середовища були виділені екзосоми, що секретувалися остеоцитами, а також - була проведена екстракція тотальної РНК з клітин остеоцитів лінії Осу454. (А) Рівні клітинних мікроРНК miR-218 в остеоцитах лінії Осу454 були встановлені за допомогою ПЛР у реальному часі. Де: білі стовпчики гістограм - контроль; чорні стовпчики гістограм - обробка міостатином. (С) Результати електронно-мікроскопічного аналізу екзосом: а) екзосоми, пофарбовані ураніл-ацетатом (EM-negative staining); б) екзосоми, мічені 10-нм імунозолотом з використанням антитіл проти екзосомного мембранного маркера CD63 і пофарбовані ураніл-ацетатом (Immunogold EM-CD63). (Е) Рівні miR-218 мікроРНК і SOST мРНК в екзосомах, що продукуються остеоцитами клітинної лінії Осу454, були встановлені за допомогою ПЛР у реальному часі. Де: білі стовпчики гістограм - контроль; чорні стовпчики гістограм - обробка міостатином (за Qin et al., 2017)

7) Остеобласти лінії МС3Т3 культивували разом з екзосомами, які були секретовані до навколишнього середовища остеоцитами лінії Осу454, обробленої міостатином. Мікроскопічні дослідження показали, що остеобласти ендочитували екзосоми всередину своїх клітин. Через 48 годин після поглинання екзосом, в клітинах остеобластів лінії МС3Т3 за допомогою ПЛР в реальному часі було проведено аналіз експресії генів Runx2 і остеокальцину - найважливіших генів, залучених в процеси диференціації остеобластів. Результати проведеного аналізу представлені на рисунку. Вкажіть, як змінилася експресія мРНК генів Runx2 і остеокальцину в остеобластах, які поглинули екзосоми? _____

8) Ген Runx2 - є ключовим регулятором диференціації остеобластів. Зробіть висновок про роль екзосомного транспорту регуляторних мікроРНК і мРНК в регулюванні процесів диференціації остеобластів _____



Остеобласти лінії MC3T3 культивували протягом 48 год з екзосомами, виділеними з культуральної рідини остеоцитів лінії Осу454, обробленої міостатином. Ці екзосоми поглинаються остеобlastами лінії MC3T3, що призводить до пригнічення процесів диференціації в цих остеобlastах. *NB! Екзосоми були флюоресцентно забарвлені, що дозволило візуалізувати їх проникнення в остеобlastи; (3-E) Ко-культивування міостатин-модифікованих екзосом остеоцитів лінії Осу454 з остеобlastами лінії MC3T3 інгібувало диференціацію даних остеобlastів; (D) Зміни рівня мРНК Runx2 і остеокальцину в клітинах остеобlastів лінії MC3T3 встановлені за допомогою ПЛР у реальному часі; (E) Оцінка кількості білка Runx2 в клітинах остеобlastів лінії MC3T3 з використанням імуно-блот аналізу; в якості контролю - використовували рівень білка β -тубуліна в клітинах (за Qin et al., 2017).

9) Для встановлення можливої ролі зниження рівня miR-218 мікроРНК в модифікованих міостатином екзосомах в інгібуванні процесів диференціації в остеобlastах, Qin Y. з колегами (2017) було проведено ко-культивування остеобlastів клітинної лінії MC3T3 з модифікованими міостатином екзосомами в умовах екзогенної лентвірусної експресії молекул мікроРНК miR -218. Результати зміни рівня експресії мРНК генів RunX2 (рис. А), osteocalcin (рис. В), OPG (рис. С) і SOST (рис. D) при відновленому рівні мікроРНК miR-218 представлені на рисунку. Як вплинуло екзогенне внесення мікроРНК miR-218 на рівень експресії мРНК RunX2, osteocalcin, OPG і SOST в порівнянні з його пригніченням в умовах культивування остеобlastів з модифікованими міостатином екзосомами? _____

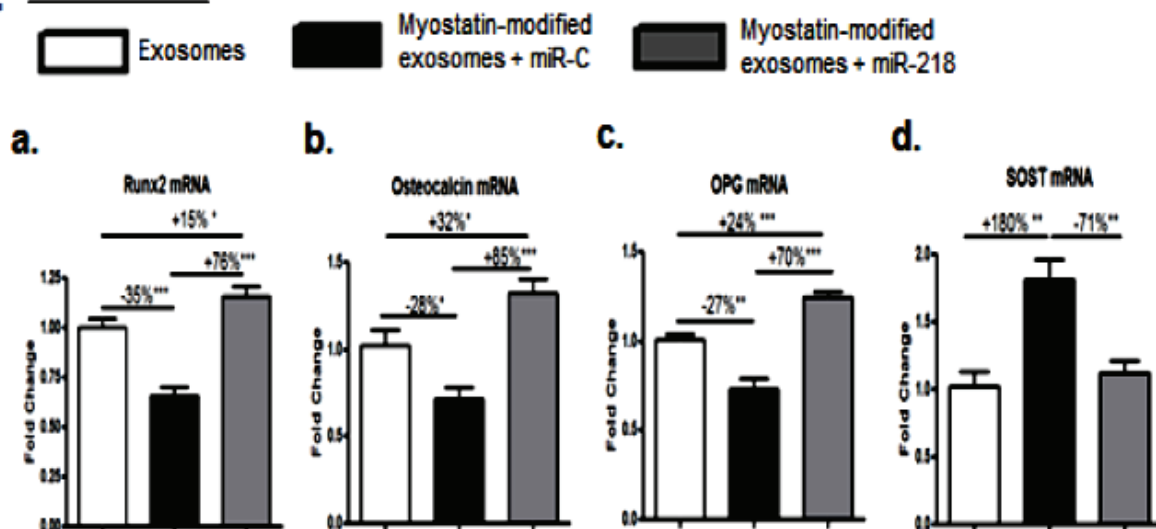
Зробіть висновок про роль miR-218 мікроРНК в активації/інгібуванні процесів диференціації остеобlastів _____

10) Для встановлення можливої ролі міостатин-модифікованих екзосом в регулюванні диференціації інших кісткових клітин - остеокластів, Qin Y. з колегами (2017) було

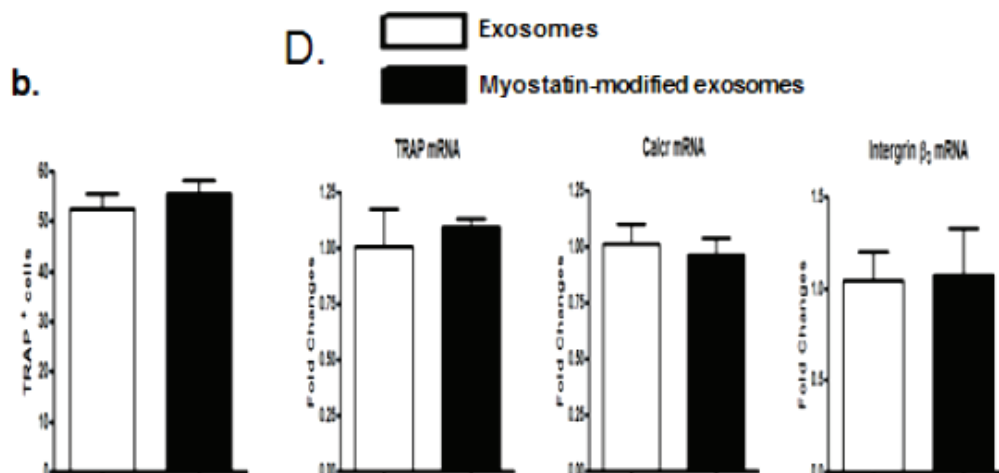
проведено ко-культивування остеокластів з міостатин-модифікованими екзосомами, що були секретовані остеоцитами. Результати впливу даних екзосом на експресію мРНК генів, задіяних в диференціації остеокластів, наведені на рисунку. Вкажіть, як вплинули міостатин-модифіковані екзосоми на експресію мРНК генів TRAP, кальцітонового рецептора (Calcr) і інтегрину (integrin β 3) в остеокластах клітинної лінії RAW 264.7

Зробіть висновок про вплив міостатин-опосередкованого екзосомного сигнального шляху на процеси диференціації остеокластів

B. MC3T3 cells

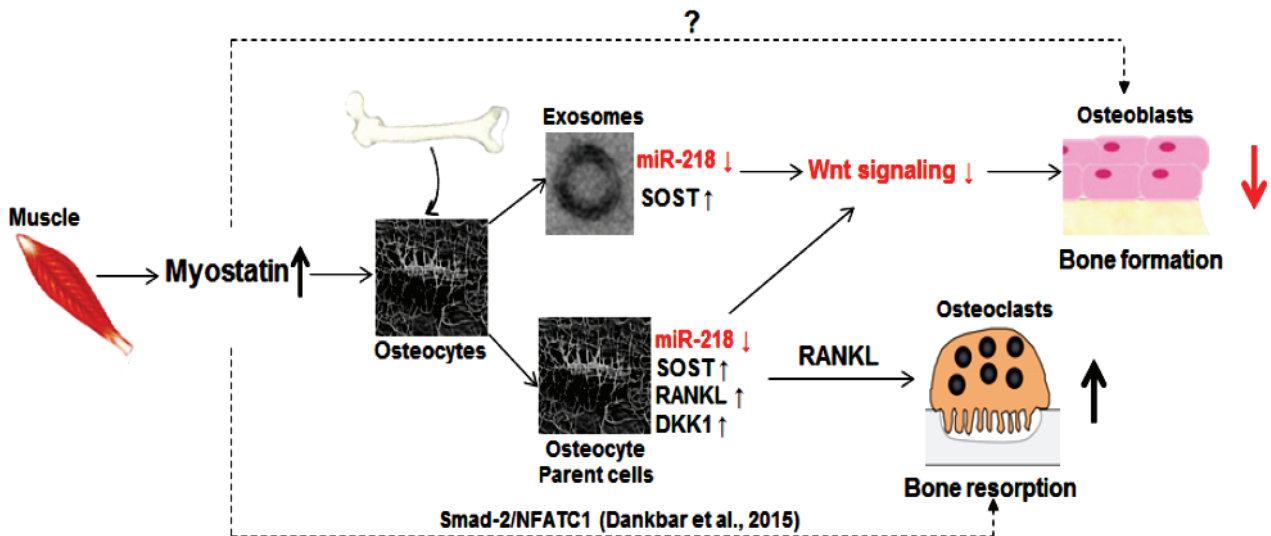


Експресія екзогенної мікроРНК miR-218 знімає інгібиторний ефект міостатин-модифікованих екзосом на диференціацію остеобластів. Ко-культивування остеобластів клітинної лінії MC3T3 з міостатин-модифікованими екзосомами в присутності опосередкованої лентівірусами екзогенної експресії miR-218 або контрольної плазмиди miR-C протягом 48 годин. Тотальна РНК була ізольована на 3 добу експерименту і піддана ПЛР в реальному часі. (B) Зміни в рівні експресії мРНК генів RunX2 (рис. А), osteocalcin (рис. В), OPG (рис. С) і SOST (рис. D) в остеобластах клітинної лінії MC3T3 з використанням ПЛР в реальному часі. Де: білі стовпчики гістограм - обробка звичайними екзосомами; чорні стовпчики гістограм - обробка екзосомами, модифікованими обробкою міостатином; сірі стовпчики гістограм - обробка міостатин-модифікованими екзосомами + лентівірус-опосередкований екзогенний синтез мікроРНК miR-218 (за Qin et al., 2017).



Міостатин-модифіковані екзосоми, що секретуються остеоцитами, не впливають на рівень диференціації остеокластів. Ко-культивування міостатин-модифікованих екзосом з остеоцитів з остеокластами клітинної лінії RAW 264.7 не вплинуло на диференціацію остеокластів. Де: (D) - зміни

в рівні мРНК генів of TRAP, calcitonin receptor (Calcr) і integrin $\beta 3$ в остеокластах клітинної лінії RAW 264.7 були встановлені за допомогою ПЛР у реальному часі (за Qin et al., 2017)



Передбачуваний механізм регулювання міостатином функціонування клітин кісткової тканини. Міостатин впливає на диференціацію остеобластів через вплив на остеоцити і подальше вивільнення ними екзосом, що містять miR-218 мікроРНК через механізм, який включає активування SOST і інгібування Wnt-сигнального шляху. Крім того, міостатин промотує продукування RANKL в остеоцитах і таким чином сприяє посиленню диференціації, активності і життєздатності остеокластів. Нещодавно було показано, що міостатин безпосередньо прискорює формування остеокластів, опосередковане RANKL, через Smad2-залежне регулювання NFATC1 (за Qin et al., 2017).

Завдання 2. У екзосомах транспортуються фактори інвазивності ракових пухлин.

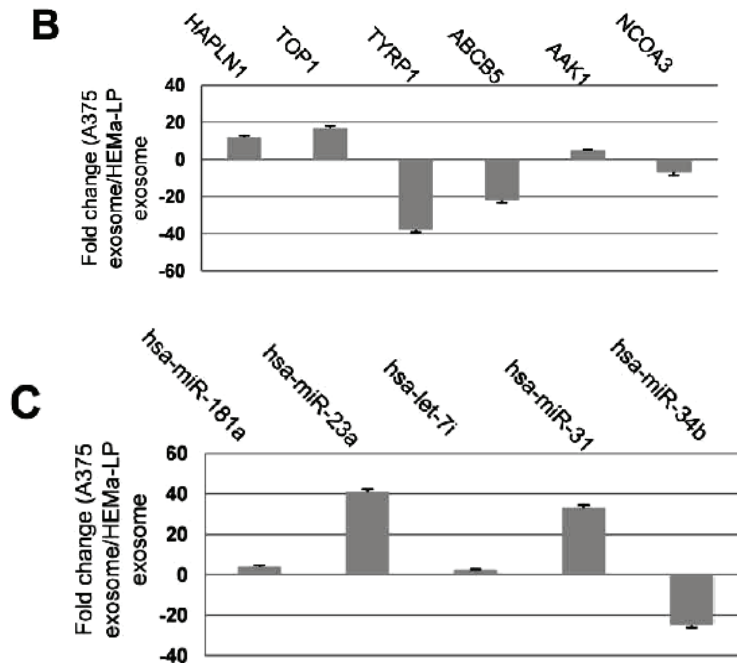
У ряді досліджень було показано, що екзосоми пухлинних клітин містять функціональні мРНК, мікроРНК і білки, які можуть змінювати клітинне оточення в напрямку, що сприяє росту пухлини. Xiao D. з колегами (2012) працювали з двома здоровими (HEMa-LP і NHEM-c) і з двома злоякісними (A375 і SK-MEL-28) клітинними лініями меланоцитів. Авторами дослідження були ідентифіковані мРНК, мікроРНК і білки, які входять до складу екзосом, що секретуються здоровими і злоякісними меланоцитами. Результати проведених досліджень наведені на рисунку (за Xiao et al., 2012).

1) Перерахуйте мРНК, рівень яких виявився підвищеним _____ і мРНК, рівень яких виявився зниженим _____ в екзосомах злоякісних меланоцитів в порівнянні зі здоровими меланоцитами (рис. В).

2) Перерахуйте мікроРНК, рівень яких виявився підвищеним _____ і мікроРНК, рівень яких виявився зниженим _____ в екзосомах злоякісних меланоцитів в порівнянні зі здоровими меланоцитами (рис. С).

3) Зробіть висновок про подібність / відмінність складу мРНК і мікроРНК в екзосомах, що продукуються здоровими і злоякісними меланоцитами _____

3) Клітини здорових меланоцитів лінії HEMa-LP інкубували 5 днів з екзосомами злоякісних меланоцитів лінії A375. Потім досліджували експресію генів в клітинах здорових меланоцитів з використанням методу зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR). Результати наведені на рисунку. Вкажіть, як і у скільки разів в здорових меланоцитах змінилася експресія мРНК: NAPLN1 _____; PYGB _____; ANXA1 _____; ANXA2 _____; syntenin _____.



Відмінності в складі мРНК і мікроРНК екзосом, що секретуються злоякісними (лінія А375) і здоровими (лінія НЕМa-LP) меланоцитами, виявлені на підставі результатів RT-PCR дослідження. Де: В - дані для мРНК; С - дані для мікроРНК; Fold change (A375 exosome / НЕМa-LP exosome) - кратність відмінностей у вмісті мРНК (рис. В) і мікроРНК (рис. С) в екзосомах між злоякісними і здоровими меланоцитами (за Xiao et al., 2012).

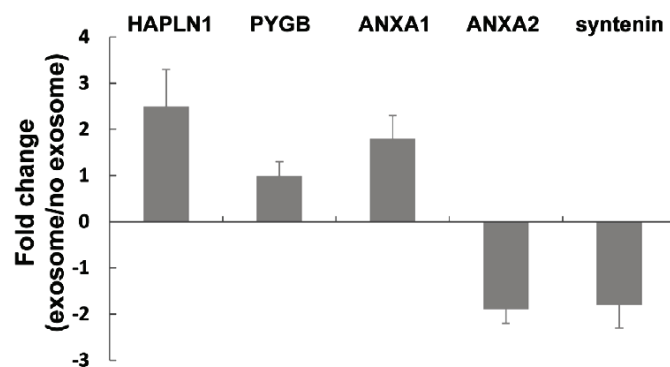
4) Зробіть висновок про те, як вплинуло поглинання екзосом на характер експресії генів в меланоцитах _____.

5) Яким є можливий регуляторний механізм впливу молекул, що знаходяться в екзосомах, на роботу клітини-реципієнта?

мРНК: _____

мікроРНК: _____

білків _____.



Експресія генів в клітинах здорових меланоцитів змінюється після ендцитозного поглинання ними екзосом, синтезованих злоякісними меланоцитами. Клітини здорових меланоцитів лінії НЕМa-LP інкубували 5 днів з екзосомами злоякісних меланоцитів лінії А375. В якості контролю використовувалася обробка середовищем, що не містило екзосом. Потім досліджували експресію генів на рівні мРНК в клітинах здорових меланоцитів з використанням методу зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR): з клітин виділяли тотальну РНК, за допомогою зворотної транскриптази переводили її в кДНК, яку досліджували за допомогою методу ПЛР. По осі ОУ: Fold change (exosome / no exosome) - вказана кратність зміни рівня експресії мРНК в клітинах, інкубованих з екзосомами в порівнянні з неінкубованим контролем (за Xiao et al., 2012).

***NB! HAPLN1 (Hyaluronan and proteoglycan link protein 1).** Білок HAPLN1 взаємодіє з білком Versican, а посилення експресії Versican корелює з пухлинним ростом і метастазуванням в тканинах. **PYGB (Glycogen phosphorylase, brain).** Білок PYGB каталізує деградацію глікогену. Гіперекспресія цього гена корелює зі злочином процесом в тканинах.

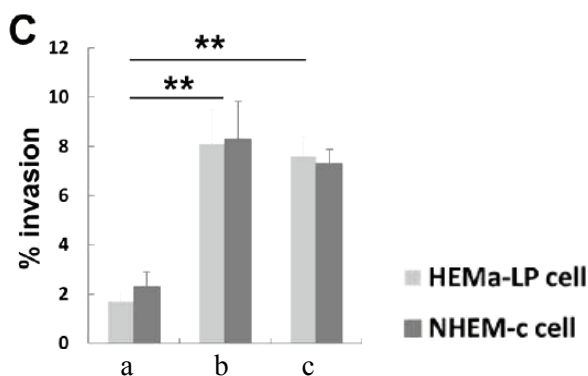
ANXA1 (annexin A1, ліпкортин-1). Білок Анексин А1 опосередковує різні імуносупресивні, протизапальні, протиалергічні ефекти глюкокортикоїдів, пригнічує різні прояви активності лейкоцитів. **ANXA2 (annexin II).** Білок Annexin 2 залучений в процеси клітинної рухливості, в зв'язуванні мембрано-асоційованих протеїнів з актиновим цитоскелетом, в процеси взаємодії з клітинним матриксом. Білки родини анексинів задіяні в процесах регулювання клітинного росту. Епігенетичне регулювання експресії Annexin A2 є ключовою подією мезенхімної трансформації при розвитку пухлин мозку. **Syntenin.** Білок синтенін впливає на організацію взаємодії цитоскелета з мембраною клітини, бере участь в процесах клітинної адгезії, в активації транскрипційних факторів і т.н. (за <https://en.wikipedia.org/wiki/>).

б) Здорові меланоцити ліній HEMa-LP і NHEM-c після ко-інкубування з екзосомами ракових меланоцитів, піддали тесту на інвазивність, в ході якого оцінюється інтенсивність міграції клітин через напівпроникні фільтри. Результати даного тесту наведені на рисунку. Вкажіть, як вплинула на інвазивність здорових меланоцитів:

інкубація з раковими екзосомами лінії A375 _____;

інкубація з раковими екзосомами лінії SK-MEL-28 _____;

Зробіть висновок про можливість передачі з екзосомами факторів патогенності ракових клітин _____.



Інкубація протягом 5 діб з екзосомами ракових клітин підвищує рівень інвазивності здорових меланоцитів (лінії HEMa-LP і NHEM-c). У камері для проведення тесту на інвазивність підраховують кількість клітин, які проникли через напівпроникну мембрану. Де: а - контрольні умови; b - інкубація з раковими екзосомами лінії A375; c - інкубація з раковими екзосомами лінії SK-MEL-28. По осі ОУ: % invasion - відсоток інвазивних клітин (за Xiao et al., 2012).

Контрольні питання:

1. Будова і функції транспортних везикул – екзосом.
2. Метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (кількісна ПЛР, Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR).
3. Роль екзосом в адаптації організму до умов навколишнього середовища.
4. Роль екзосом в розвитку патологічних процесів в організмі.

Література:

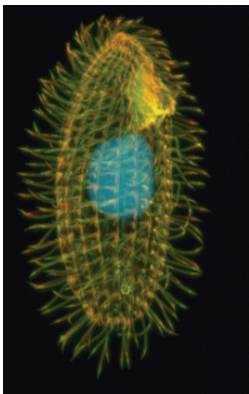
Qin Y., Peng Y., Zhao W., Pan J., Ksiezak-Reding H., et al. Myostatin inhibits osteoblastic differentiation by suppressing osteocyte-derived exosomal microRNA-218: A novel mechanism in muscle-bone communication // *J. Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 292(26). – P. 11021 - 11033. doi: 10.1074/jbc.M116.770941.

Xiao D., Ohlendorf J., Chen Y., Taylor D.D., Rai S.N., Waigel S., Zacharias W., Hao H., McMasters K.M. Identifying mRNA, MicroRNA and Protein Profiles of Melanoma Exosomes // *PLoS One.* - 2012; 7(10): e46874. doi: 10.1371/journal.pone.0046874.

Заняття 11

Тема: Рибозими - молекули РНК з каталітичною активністю

Рибозими. Молекули РНК здатні утворювати складні тривимірні структури і, завдяки цьому, спроможні виступати в ролі ферменту - прискорювати перебіг хімічних реакцій. Рибозим - це молекула РНК, що має каталітичну дію. Багато рибозимів природного походження каталізують розщеплення самих себе або інших молекул РНК, крім того утворення пептидного зв'язку в білках відбувається за допомогою рРНК рибосоми. В рамках досліджень, присвячених походженню життя, вдалося створити штучні рибозими типу РНК-полімерази, здатні за певних умов каталізувати свою власну збірку (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).



Війчаста інфузорія тетрахімена.

Каталітична активність РНК вперше була виявлена в 1980-і роки у пре-рРНК Томасом Чеком, який вивчав сплайсинг РНК у інфузорії *Tetrahymena thermophila*, і Сідні Олтменом, який працював з бактеріальною рибонуклеазою Р.

У 1989 році Томас Чек і Сідні Олтмен отримали Нобелівську премію з хімії за «виявлення каталітичних властивостей РНК» (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

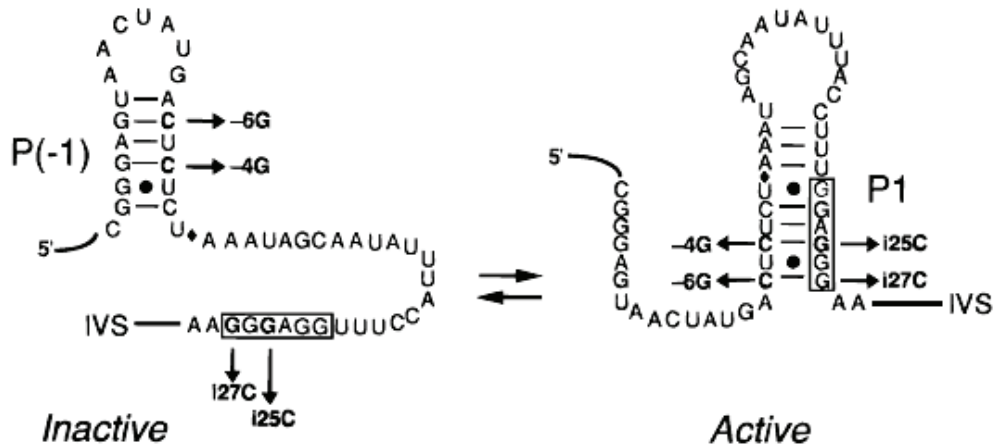
***NB!** Тетрахімена (*Tetrahymena*) - рід переважно вільноживучих прісноводних війчастих інфузорій.

Методика виявлення рибозимної активності інтронів, які забезпечують самосплайсинг РНК. Для встановлення рибозимної активності молекул РНК *in vitro* в процесі самосплайсинга інтронів - молекули РНК-попередниць поміщають в реакційну суміш, яка містить ГТФ. ***NB!** Без молекул ГТФ реакція самосплайсингу не відбувається, оскільки для самовирізання інтрону необхідна витрата енергії. Потім після інкубаційного періоду - реакційну суміш, яка вже містить не тільки вихідні молекули РНК-попередниць, але і продукти самосплайсингу, - поділяють за допомогою електрофорезу. Гель забарвлюють з використанням специфічних антитіл, які розпізнають певні типи РНК, що дозволяє ідентифікувати кожну смугу на платівці гелю.

Модифікація даної схеми експерименту дозволяє вивчати, які умови впливають на процес самосплайсингу інтронів з молекул-попередниць РНК.

***NB!** В ході ПЛР-накопичення необхідних для експерименту молекул РНК-попередниць - ці молекули знаходяться в денатурованому стані (тобто, їх нативна структура порушена). Оскільки РНК спроможні виконувати каталітичні функції тільки будучи згорнутими в нативну конформацію - перед проведенням дослідження молекули РНК ренатурують шляхом нагрівання до +95°C.

В процесі ренатурації молекули РНК-попередниць можуть упаковуватися в альтернативні конформації, для яких характерною є різна активність в процесі самосплайсингу інтрона. Цілком можливо, що саме цим пояснюється збереження деякої кількості несплайсованих молекул РНК-попередниць після додавання молекул ГТФ до реакційної суміші.



Альтернативні шляхи формування петлі в структурі pre-rRNA у інфузорії тетрахімени. Парування азотистих основ в зоні P1 між 5'-екзоном і IGS-спрямовуючою послідовністю РНК (на схемі IGS вказана як фрагмент, окреслений прямокутником) - є необхідним для розпізнавання 5'-сайту сплайсування (ця активна конформація приведена на схемі справа). rRNA P (-1) петля на схемі зліва - є конкуруючою з P1 неактивною конформацією. На схемах вказані мутації в 5'-екзоні (-4 і -6) і в ділянці IGS (i25 і i27) (цитовано за Emerick et al., 1996).

Створення рибозимів з РНК-полімеразною активністю. У сучасних живих організмів рибозимів з РНК-полімеразною активністю немає. Вважають, що в ході біологічної еволюції їх витіснили більш ефективні білкові полімерази. Тому вчені намагаються отримати такі рибозими штучно.

Серед величезної кількості різноманітних природних послідовностей РНК - вченими були знайдені рибозими, здатні каталізувати матричний синтез РНК, але - з дуже низькою ефективністю. При цьому в ролі матриці виступає одиночна нитка РНК, на якій з активованих нуклеотидів послідовно синтезується компліментарна нитка. Кращі з отриманих на сьогоднішній день рибозимів-полімераз здатні реплікувати матриці довжиною до 206 нуклеотидів, що перевищує довжину самого рибозима. Вдалося також продемонструвати синтез не просто РНК, а функціонального рибозима (правда - з іншої каталітичною активністю і меншого розміру) за допомогою рибозима-полімерази (цитовано за А. Марковим, <http://biologylib.ru/news/item/f00/s03/n0000351/index.shtml>).

Проводяться подібні експерименти за наступною схемою. Дослідники беруть молекулу РНК, яка виходячи з її структури, може виконувати функції рибозима, додають в пробірку активовані нуклеотиди і молекулу РНК-матрицю. Якщо тестована РНК-рибозим здатна до реплікації матричної РНК - тоді в пробірці будуть накопичуватися продукти такої реакції, які складаються з ланцюжків нуклеотидів. Якщо у тестованого рибозима хоча б незначно проявляється здатність до реплікації РНК-матриць - цей рибозим ампліфікують за допомогою ПЛР-реакції. Це дозволяє отримати безліч копій вихідної РНК, в тому числі з випадковими мутаціями. Потім вже серед насинтезованих мутантних молекул рибозимів проводиться відбір молекул на їх здатність каталізувати приєднання нуклеотидів до затравки. Відбираються тільки кращі молекули, які потім знову ампліфікують і проводять наступний цикл відбору. Такий метод прискореної еволюції на сьогоднішній день дозволив біологам створити кілька молекул, які більш-менш вдало каталізують полімеризацію десятків РНК-нуклеотидів на РНК-матриці.

Нещодавно групі з Кембриджа вдалося створити рибозим, який може каталізувати полімеризацію до двох сотень нуклеотидів - це вже цифра, що перевищує довжину більшості самих рибозимів. Однак до сих пір всі отримані рибозими-полімерази дуже примхливі по відношенню до природи РНК, яка синтезується. Так, в Кембріджській роботі з рекордною довжиною отриманого полінуклеотиду - йшлося про спеціальну, зручну для цього рибозима

матрицю, а не про реплікацію рибозимом самого себе - така молекула до сих пір ніким не отримана.

Примхливість рибозимів-полімераз не є випадковою, а має фундаментальну природу. Справа в тому, що хороша з точки зору полімерази матриця повинна мати лінійну структуру і не формувати вузлів і петель вторинної структури. З іншого боку, якщо РНК не утворює вузлів і петель, їй «не буде чим працювати», тобто вона не зможе виконувати будь-яку значиму функцію. У спробі подолати цю суперечність автори нової роботи розробили новий механізм відбору полімераз, який максимізує не довжину синтезованого продукту, а його функціональну здатність - наприклад, здатність пов'язувати якусь речовину.

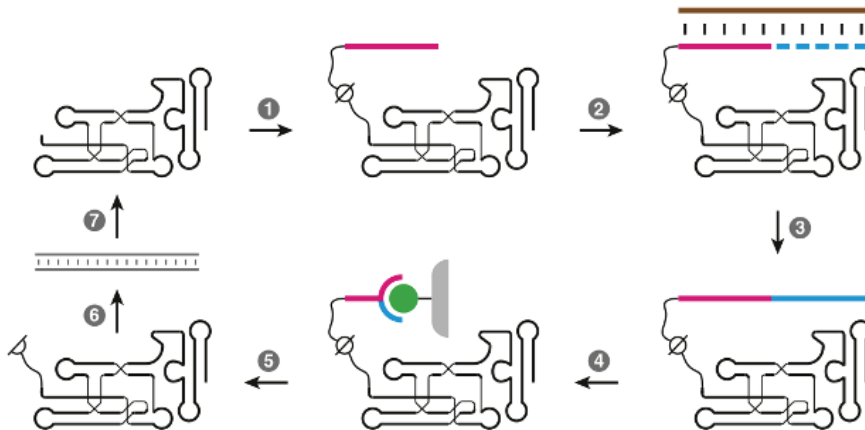


Схема відбору РНК-полімеразного рибозима. Рожева лінія - заправка, синя - синтезована РНК, зеленим показаний ціанокобаламін на хроматографічному носії (за D.P. Horninga, G.F. Joycea, PNAS, 2016).

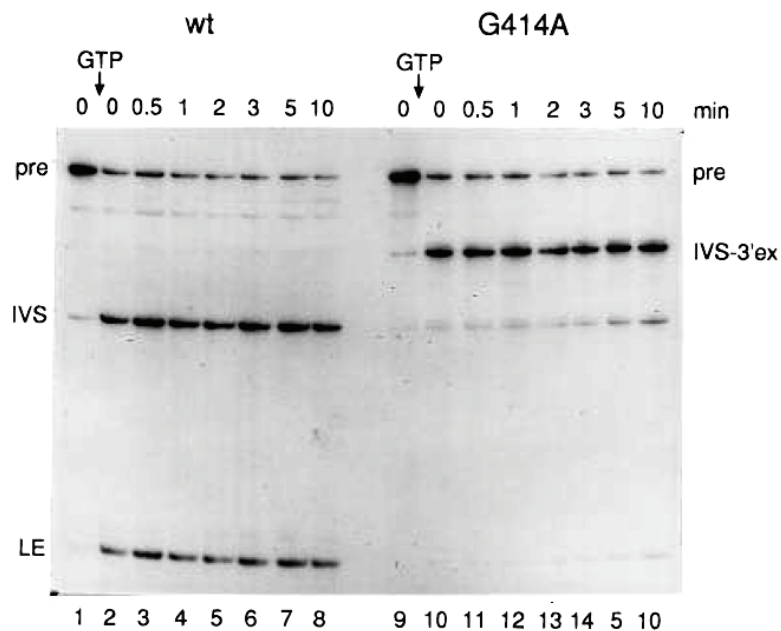
«Еволюція в пробірці», яку проводили автори, починалася з відомої РНК-полімерази, в послідовність якої вводилося близько 10 відсотків мутацій. Таким чином, формувався пул унікальних рибозимів розміром близько 10^{14} послідовностей. Рибозим повинен був каталізувати подовження РНК-заправки на основі РНК-матриці, причому заправка була ковалентно приєднана до рибозиму. Після того як відбувалося подовження заправки, заправка і знову синтезована РНК могли разом сформувати третинну структуру, яка і використовувалася для відбору. Наприклад, якщо РНК-продукт повинен був пов'язувати вітамін ціанокобаламін, то відбиралися саме ті комплекси продукт-рибозим, які зв'язувалися на хроматографічній колонці з ціанокобаламіном. Ці комплекси потім розшивалися і вдалі варіанти рибозимів ампліфікували. Після 24 циклів такого відбору вчені отримали кілька варіантів рибозима, який істотно відрізнявся від вихідної молекули.

Як виявилось, нова молекула рибозиму в середньому в сто разів швидше синтезує нуклеотидний ланцюг, ніж вихідний варіант і, що важливіше, їй практично байдужий нуклеотидний склад РНК-матриці. Точність синтезу при цьому виявилася трохи нижче вихідної (близько 92 відсотків - точність самих «поганих» природних полімераз становить близько 99 відсотків). За допомогою нової молекули автори провели синтез природної фенілаланінової транспортної РНК (цитовано за А. Ершов, <https://nplus1.ru/news/2016/08/23/rnarnrna>).

Завдання 1. Самовирізнання інтронів з молекул - попередниць зрілих РНК.

- 1) Що таке сплайсинг? _____
- 2) Які типи сплайсингу Вам відомі? _____
- 3) Для яких молекул РНК виявлено механізм самосплайсингу РНК? _____
- 4) Опишіть, як необхідно провести експеримент для того, щоб в умовах *in vitro* виявити самосплайсинг інтрону з молекули попередниці РНК _____

- 5) Для чого в реакційну суміш для проведення сплайсингу додають молекули ГТФ? _____
- 6) Результати аналізу самосплайсингу інтрона з молекул попередниць рРНК інфузорії *Tetrahymena thermophila* наведені на рисунку. Проаналізуйте отримані дані і дайте відповіді на нижченаведені запитання.
- 7) Вкажіть, що означають наступні смуги на гелі: pre - _____
 IVS - _____, LE _____
 IVS-3'ex - _____
- 8) Чому до моменту додавання молекул ГТФ (доріжки 1 і 9) - на платівці гелю рееструються тільки молекули - попередниці зрілої РНК? _____
- 9) Чому після додавання ГТФ до диких молекул РНК-попередниць - на платівці гелю з'являються доріжки, які відповідають інтрону і лігованим ексонам? _____
- 10) Вкажіть, які молекули РНК можна виявити на платівці гелю після додавання ГТФ до молекул мутантної форми РНК-попередниць _____.



Порівняння динаміки самовирізання інтрона для дикого (wt) і мутантного (G414A) типів молекул-попередниць рРНК (pre-rRNA). Де: pre - вихідні молекули попередниці рРНК; IVS - вирізані в ході самосплайсингу інтрони; LE - ліговані екзони; IVS-3'ex - проміжний комплекс, що складається з інтрона-3'ексона; GTP - молекули ГТФ. Доріжки 2-8 - перетворення диких молекул попередниць РНК (pre) в зрілу рРНК (LE) після вирізання інтрона (IVS); доріжки 10-16 - перетворення мутантних молекул попередниць РНК (G414A) в проміжний продукт, що містить інтрон-3'ексонний комплекс (IVS-3'ex) (цитовано за Emerick et al., 1996).

- 11) Поясніть відмінності в продуктах реакції самосплайсингу для диких і мутантних молекул РНК-попередниць, якщо відомо, що у мутантної молекули pre-rRNA (G414A) - порушено розпізнавання 3'-сайту сплайсингу _____
- 12) Проаналізуйте динаміку накопичення продуктів самосплайсингу протягом перших 10 хвилин реакції для диких і мутантних форм молекул РНК-попередниць. Скільки часу необхідно для протікання реакції самосплайсингу інтрона? _____
- 13) Чому, незважаючи на дуже велику швидкість реакції самосплайсингу, деяка кількість молекул РНК-попередниць залишається несплайсованою? _____

Завдання 2. Штучне отримання рибозимів, здатних копіювати молекули РНК.

Серед сучасних молекул не знайдені природні рибозими, здатні копіювати молекули РНК. Вважають, що такі рибозими еволюційно були витіснені більш ефективними білковими ферментними системами. Для підтвердження гіпотези існування древнього РНК світу, в якому реплікацію РНК здійснювали рибозими, вчені намагаються сконструювати синтетичні рибозими, здатні до реплікації РНК.

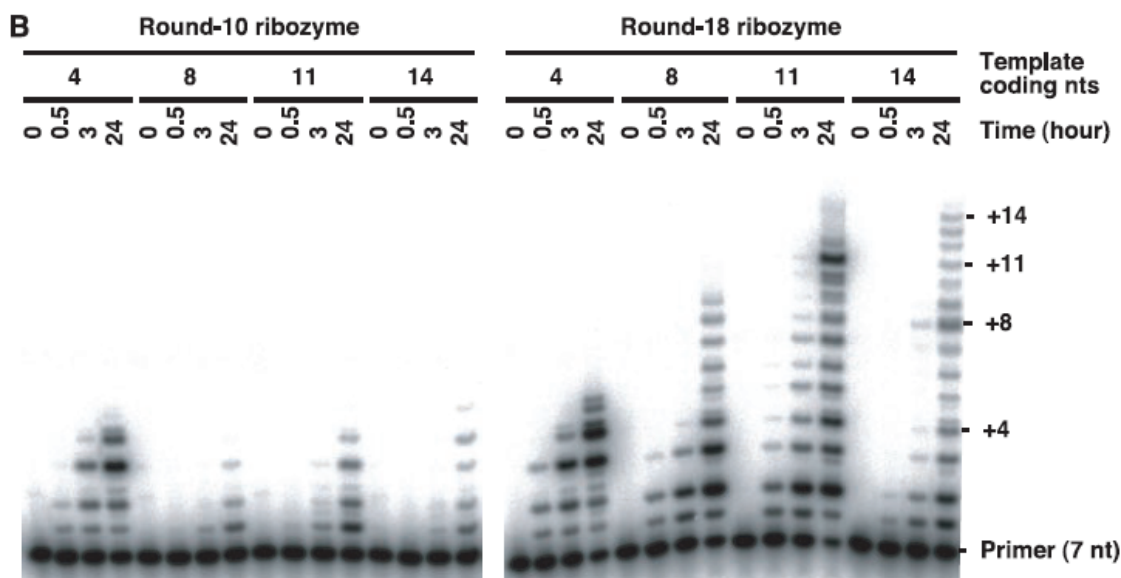
1) Опишіть методику відбору молекул РНК, здатних бути рибозимами для синтезу РНК _____

2) Johnston W.K. з колегами (2001) в результаті 18 раундів модифікації + селекції + ампліфікації вихідного рибозима і відбору оптимальних молекул були отримані штучні рибозими, здатні каталізувати полімеризацію нуклеотидних ланцюгів на РНК-матриці. Використовуючи результати гель-електрофорезу продуктів РНК-полімеразної реакції, порівняйте активність цих синтетичних рибозимів і дайте відповіді на нижченаведені запитання.

3) Вкажіть, яку кількість нуклеотидів здатний з'єднувати в ланцюжок за РНК-матрицею, що складається з 14 нуклеотидів, РНК-рибозим, отриманий після 10 раунду модифікації + селекції + ампліфікації _____ і РНК-рибозим, отриманий після 18 раунду модифікації + селекції + ампліфікації рибозима-попередника _____

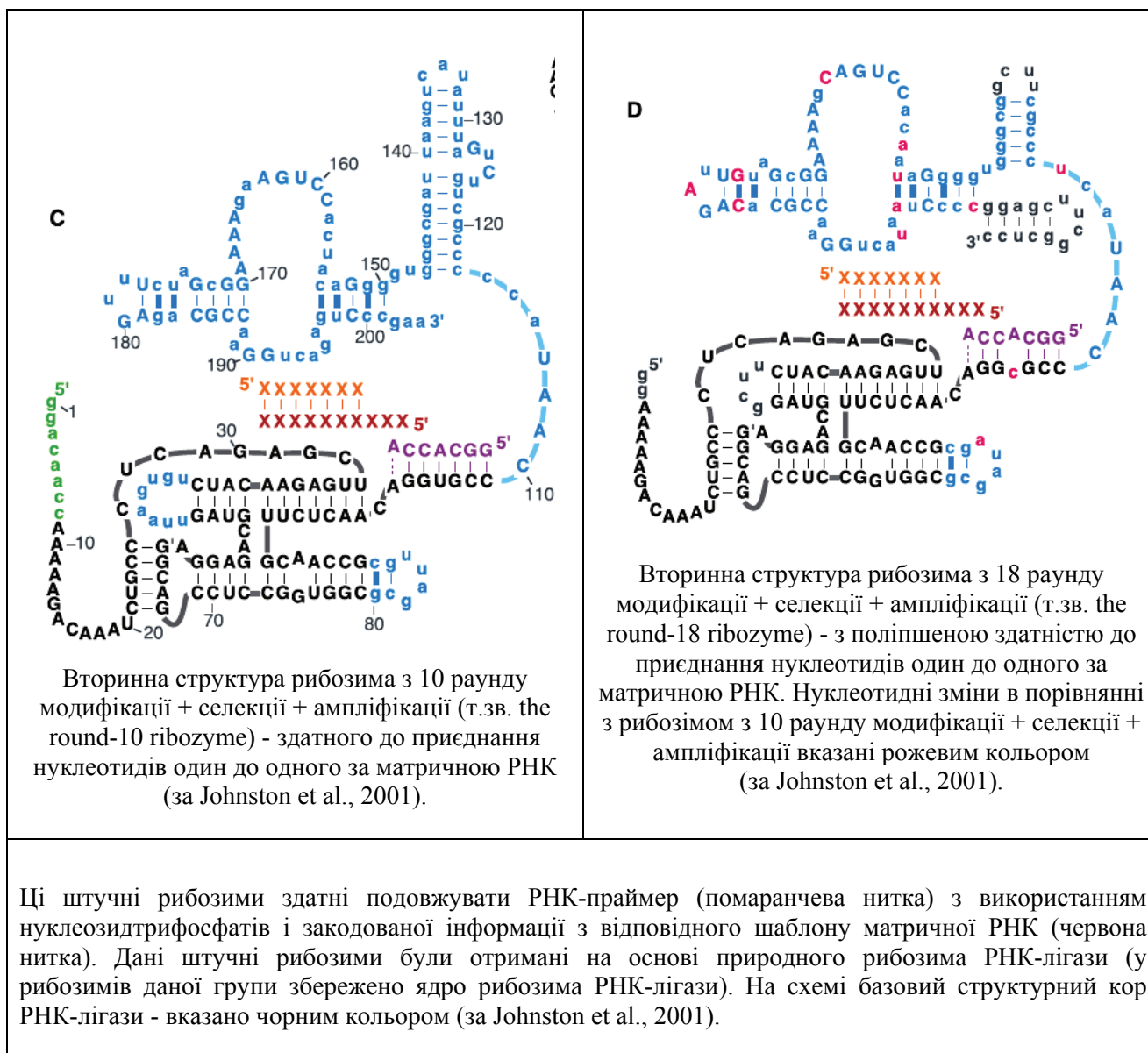
4) Рибозим, базовий для проведення пошукової роботи Johnston W.K. з колегами (2001), має структурний кор РНК-лігازی і не здатний до полімеризації нуклеотидів за РНК-матрицею. На схемах рибозима-10 і рибозима-18 базовий структурний кор РНК-лігازی - вказано чорним кольором. Порівняйте структури базового РНК-лігазного кора і структури рибозима-18 і рибозима-10. З якими структурними нововведеннями пов'язана поява у отриманих синтетичних рибозимів РНК-полімеразної активності? _____

5) Порівняйте структурні формули РНК-рибозимів, отриманих після 10-го і 18-го раундів модифікації + селекції + ампліфікації. З якими змінами в структурі рибозима-18 порівняно з рибозимом-10 пов'язано підвищення ефективності його роботи? _____



Порівняння ефективності синтезу нуклеотидних ланцюгів рибозимами, отриманими після 10-го і 18-го раундів модифікації + селекції + ампліфікації вихідного рибозима. Де: +4, +8, +11 і +14 - кількість нуклеотидів в ланцюгу, синтезованому відповідним рибозимом; the round-18 ribozyme - рибозим, отриманий в результаті 18 раунду модифікації + селекції + ампліфікації вихідного рибозима; the round-10 ribozyme - рибозим, отриманий в результаті 10 раунду модифікації + селекції + ампліфікації

вихідного рибозима; Template coding nts - кількість нуклеотидів в РНК-матриці; Time (hour) - тривалість реакції полімеризації нуклеотидів за РНК-матрицею; Primer (7nt) - праймер довжиною 7 нуклеотидів (за Johnston et al., 2001).



Контрольні питання:

1. Рибозими.
2. Методика виявлення рибозимної активності інтронів, які забезпечують самосплайсинг РНК.
3. Створення рибозимів з РНК-полімеразною активністю.

Література:

- Emerick V.L., Pan J., Woodson S.A. Analysis of rate-determining conformational changes during self-splicing of the Tetrahymena intron // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35(41). – P. 13469 - 13477.
- Johnston W.K., Unrau P.J., Lawrence M.S., Glasner M.E., Bartel D.P. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension // *Science*. – 2001. – Vol. 292(5520). – P. 1319 - 1325.

РНК-інтерференція (RNA interference, RNAi) - процес пригнічення експресії гена на стадії транскрипції, трансляції, деаденілування або деградації мРНК за допомогою малих молекул РНК. Процеси РНК-інтерференції виявлені в клітинах багатьох еукаріот: у тварин, рослин і грибів. Система РНК-інтерференції грає важливу роль в захисті клітин від вірусів, генів, що паразитують (транспозони), а також в процесах регуляції розвитку, диференціювання і експресії генів організму.

Процес РНК-інтерференції починається з дії ферменту Dicer, який розрізає довгі молекули двохланцюгової РНК (dsRNA) на короткі фрагменти завдовжки близько 21 - 25 нуклеотидів, т.зв. siRNA. Один з двох ланцюгів кожного фрагмента називається «спрямовуючим», ця одноланцюгова РНК далі включається до складу РНК-білкового комплексу RISC. В результаті активності RISC одноланцюговий фрагмент РНК з'єднується з комплементарною послідовністю молекули мРНК і викликає розривання мРНК білком Argonaute або інгібування трансляції та/або деаденілування мРНК. Ці події призводять до пригнічення експресії відповідного гена, ефективність якої обмежена концентраціями молекул малих РНК - siRNA і мікроРНК.

Селективний вплив РНК-інтерференції на експресію генів робить RNAi корисним інструментом для досліджень з використанням культур клітин і живих організмів, оскільки синтетичні дволанцюгові РНК, введені в клітини, викликають супресію специфічних генів. RNAi використовується для досліджень в галузі молекулярної біології, біохімії, біотехнології та медицини. Так, наприклад, РНК-інтерференцію використовують для систематичного «виключення» генів в клітинах і встановлення функцій генів при вивченні поділу клітини.

Рибонуклеїновий компонент системи РНК-інтерференції може бути представлений ендогенними і екзогенними короткими двохланцюговими олігонуклеотидами двох типів - мікроРНК і малими інтерферуючими РНК (small interfering RNA, siRNA).

Малі інтерферуючі РНК являють собою двохланцюгові РНК довжиною 21-25 нуклеотидів з двома неспареними виступаючими нуклеотидами на 3'-кінцях. Кожен ланцюг нуклеотидів має фосфатну групу на 5'-кінці і гідроксильну групу на 3'-кінці. Така структура siRNA утворюється в результаті активності ферменту Dicer, субстратом якого є довгі двохланцюгові РНК або короткі РНК, що містять шпильки. Дуплекси малих інтерферуючих РНК надходять далі в каталітичний комплекс RISC, де за участю білка Argonaute відбувається розплітання дуплексу і утворення комплементарного комплексу короткої антисмислової РНК зі специфічною послідовністю в кодуючій області мРНК, що призводить до подальшої деградації останньої. На відміну від мікроРНК, малі інтерферуючі РНК, як правило, точно спаровуються з мішенню і призводять до ендонуклеолітичного розщеплення специфічної мРНК.

МікроРНК (MicroRNA, miRNA) являють собою некодуєчі РНК довжиною 21-22 нуклеотиди, які беруть участь в регуляції експресії генів. МікроРНК зв'язуються зі специфічними послідовностями мРНК в 3'-нетранслюємій області і викликають інгібування трансляції або видалення полі(А)-хвоста. Молекули мікроРНК експресуються у вигляді первинних транскриптів довгих генів, що кодують попередників мікроРНК (pri-miRNA, pri-miRNA), і після процесингу в ядрі клітини являють собою pre-miRNA - структури виду стеблинка-петля завдовжки близько 70 нуклеотидів. Комплекс процесингу pri-miRNA в pre-miRNA містить фермент з активністю РНКазы III, званий Drosha, і білок, що зв'язує двохланцюгову РНК, - Pasha. Двохланцюгова частина pre-miRNA зв'язується і розрізається білком Dicer (у *Drosophila melanogaster* мікроРНК і малі інтерферуючі РНК процесуються різними ізоформами ферменту Dicer); при цьому утворюється зріла молекула мікроРНК, яка може далі надходити в RISC. Відомий також шлях утворення мікроРНК, незалежний від Dicer. Процесинг попередника мікроРНК в даному випадку здійснюється білком Argonaute 2.

У тварин мікроРНК зазвичай мають неповне спаровування з мРНК-мішенню і можуть пригнічувати трансляцію багатьох мРНК з подібними послідовностями. У рослин спаровування в багатьох випадках може бути повним.

Комплекс RISC. Каталітичною частиною білкового комплексу RISC (RNA-induced silencing complex) є білки-ендонуклеази родини Argonaute, які розрізають молекулу мРНК, комплементарно зв'язану з відповідною малою інтерферуючою РНК. Оскільки фрагменти, які утворюються після розрізання білком Dicer є двохланцюговими, потенційно кожен з ланцюгів може бути малою інтерферуючою РНК (siRNA). Однак, лише один з двох ланцюгів, т.зв. провідний або спрямовуючий ланцюг (guide strand) зв'язується з білком Argonaute і пригнічує експресію гена. Інший ланцюг, т.зв. ланцюг-супутник (passenger strand, anti-guide strand) піддається деградації під час активації RISC. Хоча раніше вважалося, що ланцюги розділяє АТФ-залежна геліказа, в даний час показано, що цей процес є АТФ-незалежним і здійснюється безпосередньо білками, що входять до складу RISC. Вибір спрямовуючого ланцюга не залежить від напрямку, в якому Dicer розрізає двохланцюгову РНК до надходження в RISC. Білок R2D2 може бути чинником, що розрізняє при зв'язуванні більш стабільний 5'-кінець ланцюга-супутника.

За допомогою рентгеноструктурного аналізу вивчено зв'язування молекул РНК з РНК-зв'язуючим доменом білка родини Argonaute. При цьому фосфорильований 5'-кінець одноланцюгової РНК потрапляє в консервативну кишеню білка, де 5'-кінцевий фосфат утримується координаційними зв'язками за участю іона Mg^{2+} , а аденіновий залишок вступає в стекінг-взаємодії з консервативним залишком тирозину. Дана ділянка білка, мабуть, стимулює зв'язування малих інтерферуючих РНК з мішенню мРНК.

До теперішнього часу механізм, за яким RISC знаходить комплементарну мРНК всередині клітини, вивчений недостатньо. Показано, що для успішної деградації мРНК комплексом siRISC трансляція не потрібна. Більш того, показано, що шлях РНК-інтерференції може бути більш ефективним проти мРНК-мішеней, трансляція яких не здійснюється в поточний момент часу. Білки родини Argonaute є каталітичним компонентом RISC, і знаходяться в специфічних районах цитоплазми, відомих як Р-тільця (P-bodies); показано, що активність малих інтерферуючих РНК і деградація мРНК є максимальними саме в Р-тільцях. Р-тільця є важливою частиною системи РНК-інтерференції. Їх руйнування призводить до зниження ефективності даного процесу.

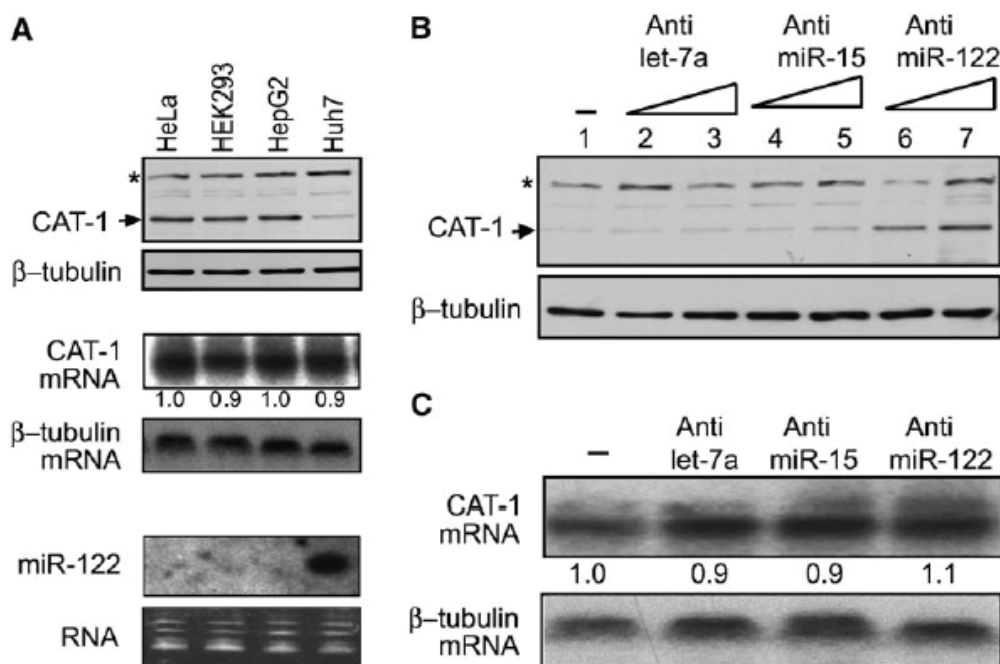
Механізм РНК-інтерференції. РНК-інтерференція є РНК-залежним процесом замовчування роботи генів, який контролюється білковим комплексом RISC. RISC активується в цитоплазмі клітини, де короткі двохланцюгові молекули РНК взаємодіють з каталітичним компонентом RISC - білком Argonaute. У разі, коли двохланцюгова РНК є екзогенною (з'являється в результаті лабораторних маніпуляцій або інфікування РНК-вірусами), РНК виявляється безпосередньо в цитоплазмі, де розрізається на короткі фрагменти (siRNA) білком Dicer. Ці фрагменти надалі утворюють функціональний комплекс з RISC (т.зв. siRISC). У випадку з пре-мікроРНК, які експресуються з генів, що кодують РНК, RNAi запускається ендегенною двохланцюговою РНК. Первинні транскрипти таких генів спочатку процесуються в ядрі з утворенням пре-мікроРНК, що містять специфічні структури «стебло-петля». Потім пре-мікроРНК експортуються в цитоплазму і розрізаються білком Dicer з утворенням мікроРНК, які включаються до складу комплексу, т.зв. miRISC. Таким чином, RISC є місцем, де перетинаються два шляхи РНК-інтерференції, індуковані екзогенними і ендегенними двохланцюговими РНК (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 1. При стресі з Р-тілець вивільняється зарепресована РНК.

У багатоклітинних організмів більшість мікроРНК спаровуються з 3'-нетранслюємим регіоном (3'UTR) своєї цільової мРНК-мішені і запобігають накопиченню білка - або за рахунок репресії трансляції, або за рахунок індукування деградації відповідної мРНК. До сих пір не відомо - чи є репресування трансляції мРНК оборотним процесом.

Для відповіді на це питання Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) досліджували мРНК і власне білки катіонного амінокислотного транспортера (CAT-1) в різних клітинних лініях людини (HeLa, HEK293, HepG2 і Huh7). Результати проведених досліджень наведені на рисунку А.

- 1) Як провести Вестерн-блот аналіз білків-інтересу? _____
- 2) Як провести Нозерн-блот аналіз молекул РНК інтересу? _____
- 3) Перерахуйте, в яких клітинних лініях експресується білок CAT-1: _____, не експресується білок CAT-1: _____.
- 4) Перерахуйте, в яких клітинних лініях синтезується мРНК білка CAT-2: _____.
- 5) У клітинах лінії Huh7 білок CAT-1 не синтезується, однак мРНК цього білка в клітинах присутня. Яка можлива причина незчитування мРНК CAT-1 в клітинах даної лінії? _____
- 6) У клітинах яких ліній була виявлена експресія мікроРНК miR-122? _____
- 7) Відомо, що мікроРНК miR-122 є специфічним інгібітором експресії мРНК білка CAT-1. Яким є механізм репресуючого впливу мікроРНК на свої мішені? _____
- 8) Для вивільнення мРНК CAT-1 з репресуючого комплексу з мікроРНК, Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) протягом 24 год обробляли Huh7 клітини анти-мікроРНК олігонуклеотидами. В експерименті використовувалися олігонуклеотиди, що зв'язуються з різними типами мікроРНК: Anti let-7a, Anti miR-15 і Anti miR-122. Вкажіть, обробка яким типом олігонуклеотидів сприяла відновленню експресії білка CAT-1 (рис. В)? _____
Яким є можливий механізм вивільнення мРНК CAT-1 з репресивного блоку з miR-122? _____
- 9) Порівняйте рівень мРНК CAT-1 в клітинах, оброблених Anti miR-15 і Anti miR-122 олігонуклеотидами (рис. С) _____
Чи призвела обробка олігонуклеотидами до посилення синтезу мРНК CAT-1? _____
Якою є причина початку синтезу білка CAT-1 в клітинах: вивільнення існуючої в клітинах зарепресованої мРНК даного білка або синтез мРНК CAT-1 *de novo*? _____



У клітинах гепатокарциноми людини (Huh7 Cells) мРНК білка CAT-1 зарепресована за допомогою мікроРНК miR-122. (А) Аналіз протеїнів (дві верхні панелі) і РНК (інші панелі), що експресуються в

чотирьох різних клітинних лініях людини (HeLa, HEK293, HepG2 і Huh7). Дві верхні панелі - результат Вестерн-блот аналізу експресії білків інтересу. На блоті видно, що білок CAT-1 в клітинах лінії Huh7 не синтезується (вказано стрілкою). Експресія цитоскелетного білка бета-тубуліну прийнята в якості позитивного контролю експресії. Решта панелей - результат Нозерн-блот аналізу РНК-інтересу в клітинах. Дослідження показало, що мРНК білка CAT-1 в клітинах лінії Huh7 - є. Рівень мРНК бета-тубуліну прийнятий в якості контролю. Більш того, в клітинах лінії Huh7 виявлена експресія мікроРНК miR-122, яка є специфічною мікроРНК, що репресує мРНК білка CAT-1 за механізмом РНК-інтерференції. (В) Експресія білка CAT-1 була індукована в Huh7 клітинах, оброблених протягом 24 годин анти-мікроРНК miR-122 олігонуклеотидами. В експерименті використовували олігонуклеотиди, що зв'язуються з різними типами мікроРНК: Anti let-7a, Anti miR-15 і Anti miR-122. Тільки анти-мікроРНК miR-122 олігонуклеотидами спровокували відновлення синтезу білка CAT-1 в клітинах. Рівень синтезу білка бета-тубуліну використовувався в якості контролю. Клітини були трансфіковані 0,1 або 0,2 мМ відповідних олігонуклеотидів. (С) Індукція експресії білка CAT-1 мала місце без зростання рівня його мРНК. Huh7 клітини були трансфіковані 0,2 мМ розчинами олігонуклеотидів (за Bhattacharyya et al., 2006).

10) Відбувається чи ні дерепресування мРНК в природних умовах? Для відповіді на це питання Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) помістили Huh7 клітини в умови голодування за амінокислотами. Результати проведених досліджень представлені на рисунках А-Д.

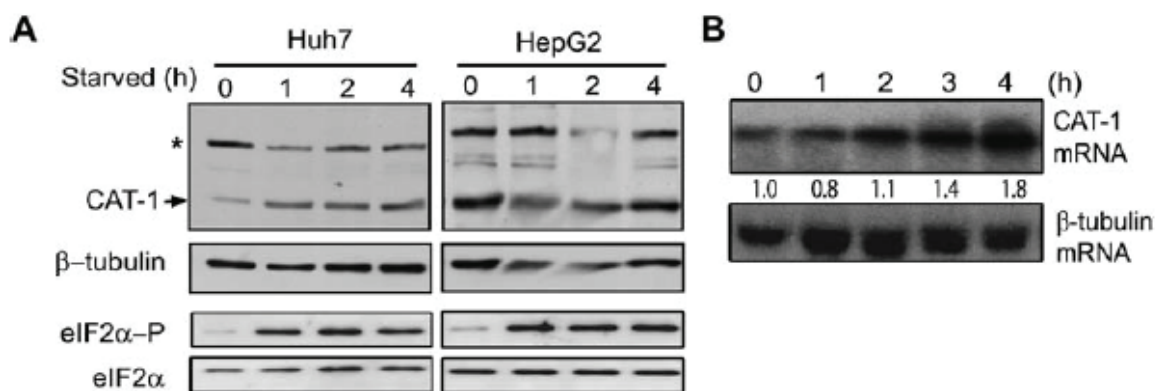
Як змінилася експресія білка CAT-1 в клітинах Huh7 через годину після початку голодування по амінокислотам (рис. А)? _____.

Як змінився рівень мРНК CAT-1 через 1 годину після початку голодування за амінокислотами (рис. В)? _____.

Чому при незмінному рівні мРНК CAT-1 - рівень білка CAT-1 в умовах голодування виріс? _____.

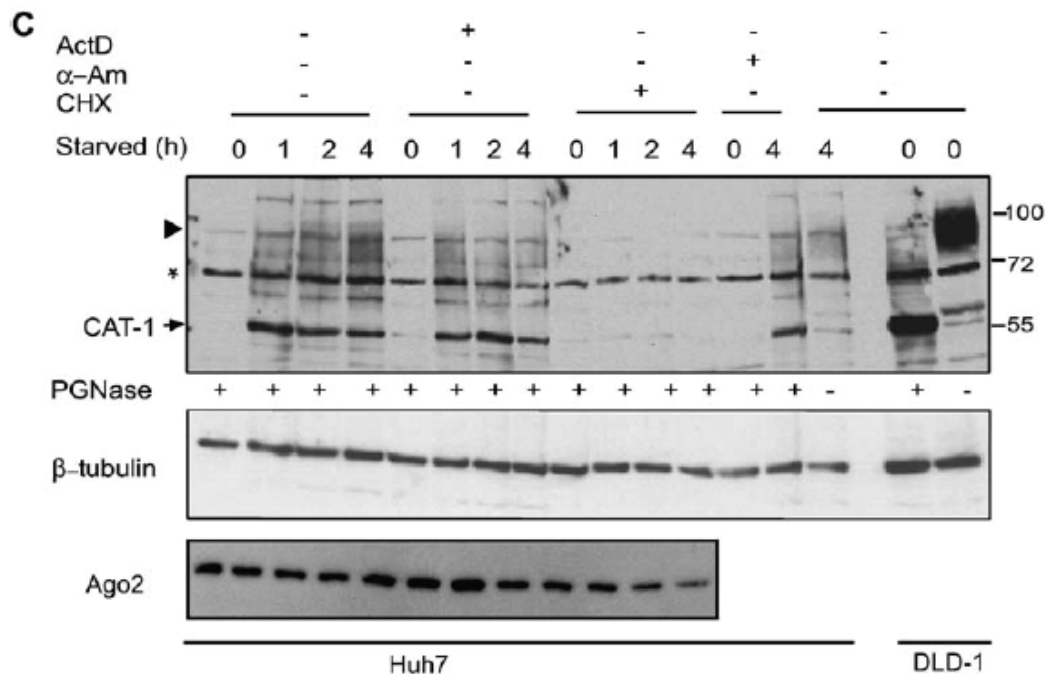
Як змінився рівень мРНК CAT-1 через 4 години після початку голодування за амінокислотами (рис. В)? _____.

Чому через 4 години голодування за амінокислотами - клітини лінії Huh7 посилили експресію мРНК CAT-1? _____.



Голодування Huh7 клітин індукує експресію білка CAT-1 незалежно від транскрипції. (А) Аналіз рівнів протеїнів в голодуючих клітинах. Клітини ліній Huh7 і HepG2 були піддані амінокислотному голодуванню протягом 0-4 г. Потім, клітинні екстракти були проаналізовані за допомогою Вестерн-блоту з використанням антитіл проти білків CAT-1, бета-тубуліну, eIF2 α і фосфорильованої форми eIF2 α . Дослідження показали, що в умовах голодування за амінокислотами - в клітинній лінії Huh7 (але - не в клітинній лінії HepG2) почалася експресія білків CAT-1. Крім того, в обох клітинних лініях почалася експресія фосфорильованої форми білка eIF2 α . (В) Рівень мРНК транскриптів CAT-1 в клітинах лінії Huh7 в умовах голодування за амінокислотами протягом 0-4 г встановлений з використанням Нозерн-блот аналізу. Відносні рівні мРНК CAT-1 скориговані по відношенню до рівня мРНК бета-тубуліна (за Bhattacharyya et al., 2006).

11) Для перевірки отриманих даних по наявності/відсутності активування синтезу мРНК CAT-1 *de novo* в умовах голодування клітин за амінокислотами, Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) піддали Huh7 клітини дії специфічних інгібіторів синтезу мРНК (актиноміцин Д, альфа-аманітин) або інгібіторів синтезу білків (циклогексимід). Як вплинула присутність в поживному середовищі інгібіторів синтезу мРНК (актиноміцину Д або альфа-аманітину) на експресію білка CAT-1 в умовах голодування за амінокислотами (рис. С)?



Голодування Huh7 клітин індукує експресію білка CAT-1 незалежно від транскрипції. (С) Стрес-індукована експресія CAT-1 в клітинах лінії Huh7 є пост-транскрипційною подією. Клітини лінії Huh7 були культивовані протягом 0 - 4 год в умовах голодування за амінокислотами у відсутності або присутності відповідних інгібіторів: ActD - актиноміцин Д (блокує ДНК-залежний синтез РНК); α -Am - альфа-аманітин (блокує роботу ферменту РНК-полімерази II, тобто блокує синтез молекул мРНК); CHX - циклогексимід (інгібітор синтезу білка). Де: Starved (h) - тривалість амінокислотного голодування, г; CAT-1 - експресія білка CAT-1; PGNase - фермент; β -tubuline - бета-тубулін; Ago2 - Аргонавт-2; Huh7 - клітинна лінія Huh7; DLD-1 - клітинна лінія DLD-1. Протеїни обробляти PGNase F і потім досліджували за допомогою Вестерн-блот аналізу, використовуючи антитіла проти CAT-1, бета-тубуліну і Ago2. Проведені дослідження показали, що тільки обробка циклогексимідом - інгібітором синтезу білка - призвела до відсутності білків CAT-1, але не обробка інгібіторами синтезу мРНК. Це свідчить про те, що в стресових умовах не відбувається активування синтезу *de novo* молекул мРНК CAT-1, а - мобілізація вже насинтезованих мРНК даного білка з зарепресованого стану. Дві лінії праворуч містять протеїновий екстракт з клітин лінії DLD-1, багатой на білок CAT-1. Положення глікозильованого і де-глікозильованого CAT-1 показано стрілками. Вестерн-блот для білка Ago-2 був проведений з тими ж зразками білків, але білки були розділені на іншому гелі (за Bhattacharyya et al., 2006).

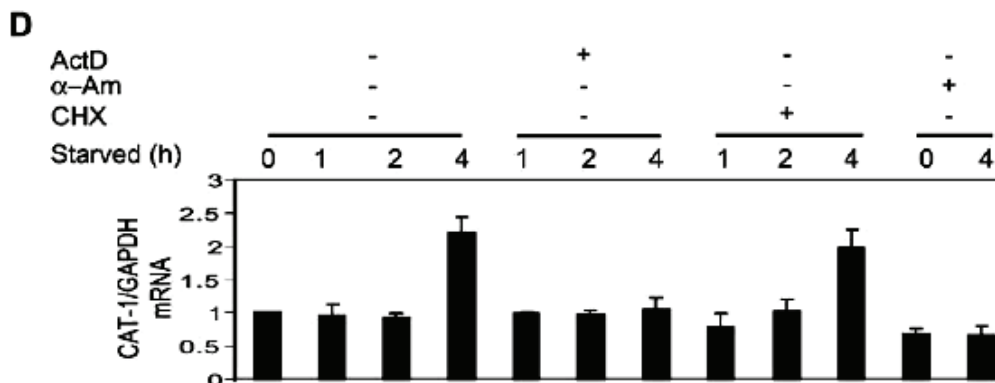
Як вплинула присутність в поживному середовищі інгібітора синтезу білка циклогексиміду на експресію білка CAT-1 в умовах голодування за амінокислотами (рис. С)?

Чому присутність інгібіторів синтезу мРНК не порушила експресію білка CAT-1 в клітинах Huh7 в умовах голодування за амінокислотами? _____

12) Результати ПЛР аналізу молекул мРНК, ізольованих з клітин лінії Huh7, які голодували за амінокислотами 0-4 год в присутності зазначених вище інгібіторів, наведені на рис. Д.

Вкажіть, як змінився рівень експресії CAT-1 мРНК в клітинах лінії Huh7 протягом 0-4 год голодування за амінокислотами:

- а) у відсутності інгібіторів: _____;
 б) в присутності інгібіторів синтезу мРНК (актиноміцину Д або альфа-аманітину) _____;
 в) в присутності інгібітора синтезу білка (циклогесиміду): _____.
- Як тривале голодування (3-4 год) вплинуло на експресію мРНК CAT-1? _____.
- Чому короточасне голодування за амінокислотами (1-2 год) не призвело до посилення експресії гена CAT-1? _____.



(D) Аналіз молекул мРНК, ізолюваних з клітин лінії Huh7, що голодували за амінокислотами 0-4 год в присутності зазначених вище інгібіторів. Верхня панель представляє результати ПЛР аналізу в реальному часі для встановлення кількості CAT-1 мРНК. Рівень GAPDH мРНК використовувався в якості внутрішнього контролю. Проведені дослідження показали, що в умовах 4 год голодування за амінокислотами рівень CAT-1 мРНК виріс при повній відсутності інгібіторів, або - в присутності інгібітора синтезу білків циклогесиміду. Це свідчить про те, що за 4 години експерименту - рівень синтезу CAT-1 мРНК виріс (тобто клітини, не дивлячись на дерепресування своїх CAT-1 мРНК - все одно відчували голод за амінокислотами, що призвело до активування транскрипції гена CAT-1) (за Bhattacharyya et al., 2006).

13) Припускають, що зв'язування інгібіторних мікроРНК miR-122 відбувається з 3'-нетранслюємим регіоном (3'UTR) молекули мРНК CAT-1. Для встановлення сайту зв'язування мікроРНК miR-122 з молекулою мРНК CAT-1, Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) провели трансфекцію Huh7 і HepG2 клітин RL-cat репортерами (A, B і C). RL-cat репортери - це конструкції, в яких до RL-кодуєчного регіону гена-репортера (в даному випадку - ген люциферази) пришитий 3'-нетранслюємий регіон (3'UTR) молекули мРНК CAT-1.

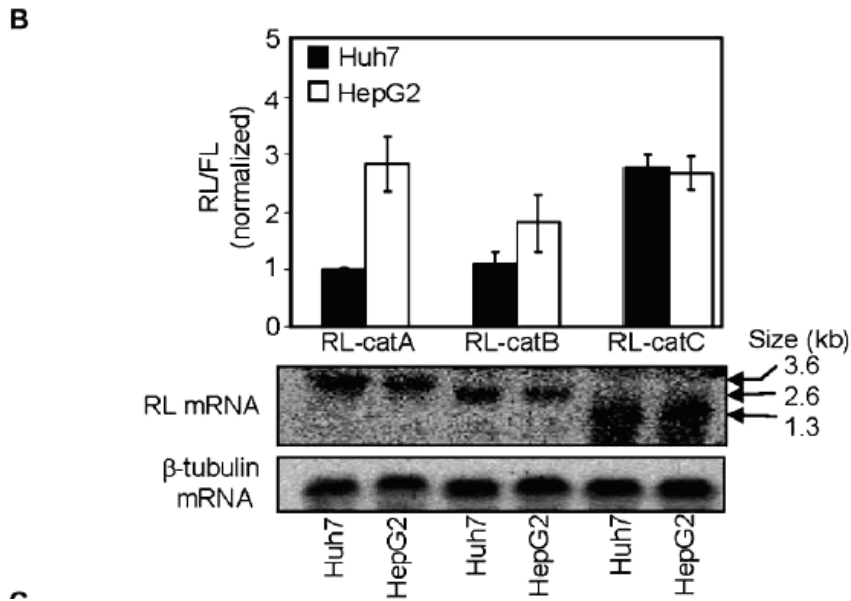
Вкажіть, як експресуються репортерні конструкції RL-catA і RL-catB в клітинах лінії Huh7 в порівнянні з клітинами лінії HepG2 (рис. В. гістограми) _____.

*NB! Рівень експресії репортерних конструкцій (тобто синтезу в клітинах репортерного білка люциферази) оцінювали за допомогою люциферазного тесту на інтенсивність світіння клітин в присутності необхідних інгредієнтів (люциферину, АТФ і т.н.).

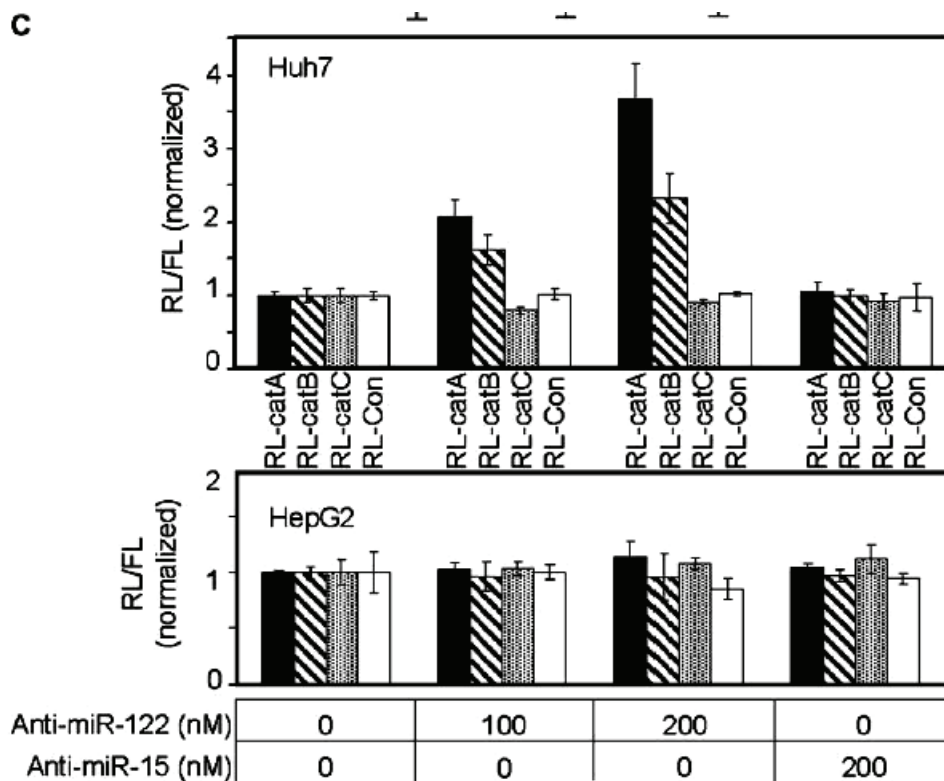
Вкажіть, як експресуються мРНК репортерних конструкцій RL-catA і RL-catB в клітинах лінії Huh7 в порівнянні з клітинами лінії HepG2 (рис. В, Нозерн-блот) _____.

Чому при однаковому рівні експресії мРНК репортерних конструкцій - активність репортерів нижче в клітинах лінії Huh7 в порівнянні з клітинами лінії HepG2? _____.

14) Для встановлення причини пригнічення експресії репортерних конструкцій RL-catA і RL-catB в клітинах лінії Huh7 в порівнянні з клітинами лінії HepG2, Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) провели обробку Huh7 і HepG2 клітин anti-miR-122 і anti-miR-15 (контроль) олігонуклеотидами. Як вплинула обробка anti-miR-122 олігонуклеотидами на експресію репортерних конструкцій RL-catA і RL-catB в клітинах лінії Huh7 (рис. С)? _____.



Активність RL-cat репортерів (A, B, C) в Huh7 і HepG2 клітинах. RL-cat репортери - це конструкції, в яких до RL-кодуючого регіону пришитий 3'-нетранслюємий регіон (3'UTR) мРНК CAT-1. (B) Активність RL-cat репортерів (гістограми) і рівні експресії їх мРНК (Нозерн-блот) в Huh7 або в HepG2 клітинах. Значення нормалізовані по відношенню до RL-catA активності в Huh7 клітинах. Де: RL mRNA - рівень експресії мРНК репортера; β-tubulin mRNA - рівень експресії мРНК бета-тубуліну (прийнятий в якості контролю). РНК, ізольована з трансфікованих клітин, була досліджена за допомогою Нозерн-блот аналізу (за Bhattacharyya et al., 2006).



(C) Результат впливу anti-miR-122 олігонуклеотидів на експресію репортерів в клітинах Huh7 (верхня панель) і в клітинах HepG2 (нижня панель). Концентрація використаних олігонуклеотидів anti-miR-122 і anti-miR-15 (контроль) вказана під гістограмами (нМ). Активність RL-cat репортерів, виміряна у відсутності олігонуклеотидів, була прийнята рівною одиниці. Результати показали, що у клітинній

лінії Huh7 анти-мікроРНК олігонуклеотиди активували експресію репортерних конструкцій RL-catA і RL-catB дозозалежним способом (тобто, олігонуклеотиди відключили мікроРНК, які репресували репортерні мРНК, репортерні мРНК почали транслюватися і репортер виявив себе візуально) (за Bhattacharyya et al., 2006).

Відомо, що мікроРНК miR-122 є специфічним інгібітором експресії мРНК CAT-1. Чому обробка anti-miR-122 олігонуклеотидами призвела до зростання рівня експресії репортерних конструкцій RL-catA і RL-catB в клітинах лінії Huh7? _____

В репортерних RL-catA і RL-catB конструкціях до RL-кодуючого регіону пришитий 3'-нетранслюємий регіон (3'UTR) мРНК CAT-1. На підставі результатів, отриманих для репортерних RL-catA і RL-catB конструкцій, припустіть, з якою ділянкою мРНК зв'язується регуляторна мікроРНК miR-122? _____

15) Виходячи зі схеми будови репортерних конструкцій RL-catA, B і C поясніть, чому експресія конструкції RL-catC була заінгібована в клітинах Huh7? _____

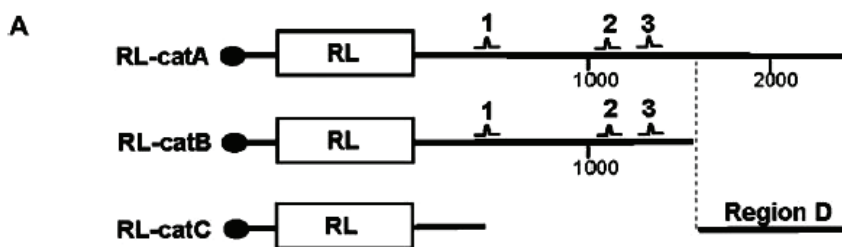


Схема будови репортерних конструкцій RL-catA, B і C. Репортери A, B і C несуть різні сегменти 3'-нетранслюємого регіону (3'UTR) мРНК CAT-1, з'єднані з кодуючим регіоном гена-репортера (RL). Положення потенційних ділянок зв'язування з мікроРНК miR-122 зазначено цифрами (1-3) (за Bhattacharyya et al., 2006).

16) В стресових умовах блокування мРНК маленькими мікроРНК знімається і мРНК починає транслюватися. Який механізм зняття репресії з мРНК, заблокованої мікроРНК? Які ділянки молекули мРНК важливі для її дерепресування? Для відповіді на це питання Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) помістили в стресові умови клітини Huh7, трансфіковані репортерними конструкціями RL-catA, B або C. Якщо механізм дерепресування молекул мРНК пов'язаний з 3'-нетранслюємою (3'UTR) ділянкою молекули мРНК - тоді репортерні конструкції також будуть дерепресовані в умовах стресу. Результати проведених досліджень представлені на рис. А-В.

Вкажіть, як змінилася експресія репортерної конструкції RL-catA в клітинах лінії Huh7 в умовах стресу голодування (рис. А)? _____

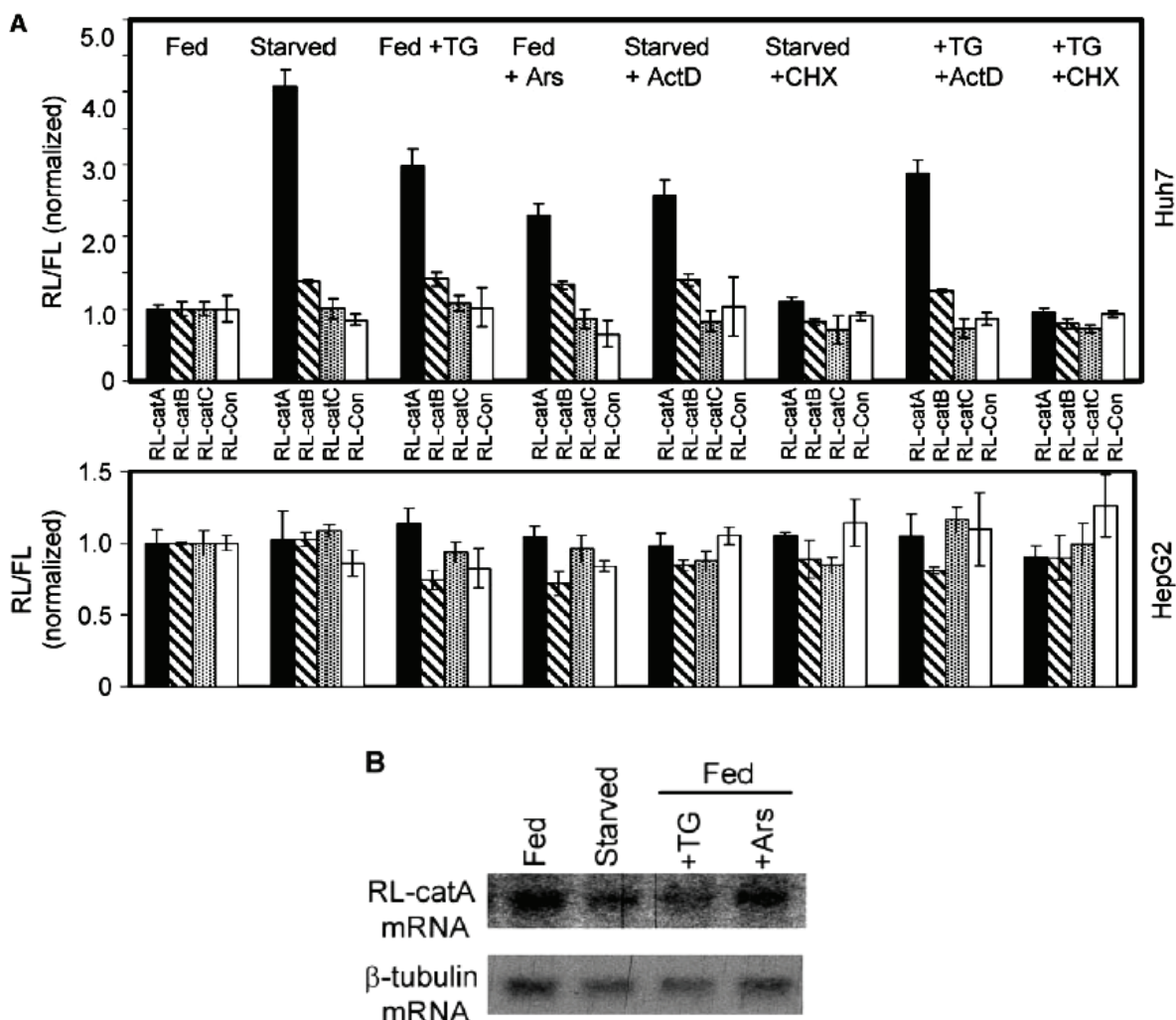
Як змінилася експресія мРНК RL-catA в умовах голодування (рис. В)? _____

Чому в умовах голодування при незмінності рівня мРНК RL-catA - рівень експресії білка репортерної конструкції виріс? _____

Яка ділянка молекули мРНК відповідає за зняття репресії, якщо відомо, що в репортерній конструкції RL-catA до RL-кодуючого регіону пришитий 3'-нетранслюємий регіон (3'UTR) мРНК CAT-1? _____

Яка з досліджених репортерних конструкцій - RL-catA, B або C - найбільш ефективно виходила зі стану репресії в умовах стресу голодування? _____

Виходячи з будови 3'-нетранслюємого регіону (3'UTR) мРНК RL-catA (в порівнянні з RL-catB і RL-catC) поясніть високу ефективність виходу мРНК даної репортерної конструкції із заблокованого стану: _____.
 З якою ділянкою 3'-нетранслюємого регіону (3'UTR) мРНК RL-catA може зв'язуватися фактор дерепресування мРНК? _____.



Вплив різних типів клітинних стресорів на активність RL-репортерів. (A) Експресія RL-catA репортера специфічно активується в стресованих Huh7 клітинах (верхня панель), але - не в HepG2 клітинах (нижня панель). Клітини, трансфіковані зазначеними репортерами були піддані голодуванню протягом 2 год (Starved), або - росли в присутності TG (2 год), або - арсеніта (Ars, 30 хв). *NB! TG - індуктор стресу ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) в клітинах; арсеніт натрію - індуктор оксидативного стресу в клітинах. Актиноміцин Д (ActD) або циклогексимід (CHX) були додані в момент початку дії стресових умов. Значення нормалізовані по відношенню до активності в нестресованих (Fed) клітинах. Проведені дослідження показали, що тільки додавання циклогексиміду (але - не актиноміцину Д) інгібувало експресію RL-catA репортера в стресових умовах. (B) Рівень мРНК репортера RL-catA залишався незмінним в стресованих клітинах лінії Huh7. Стресові умови - такі ж як на панелі A (за Bhattacharyya et al., 2006).

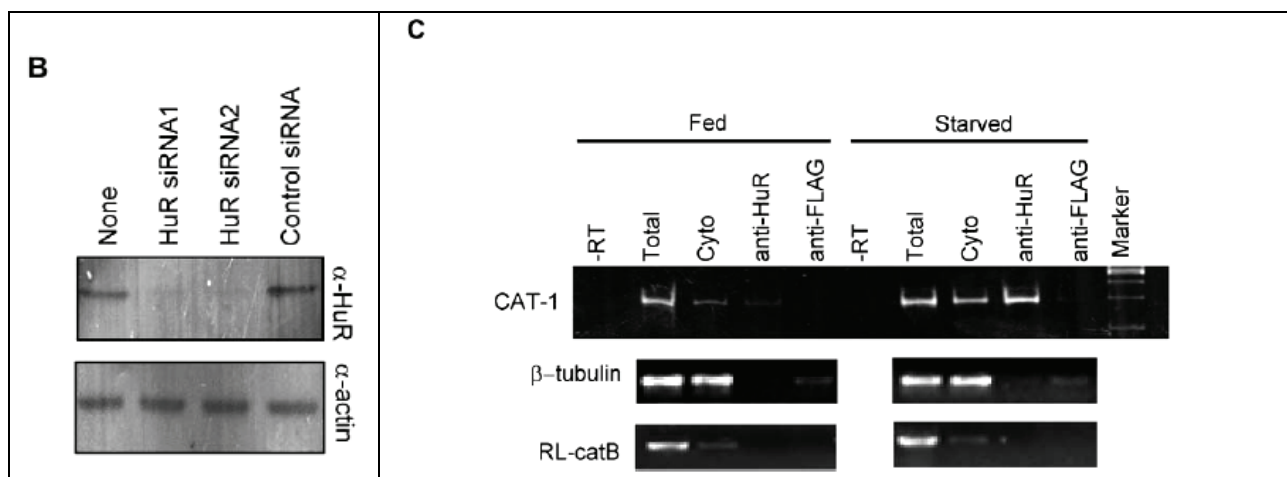
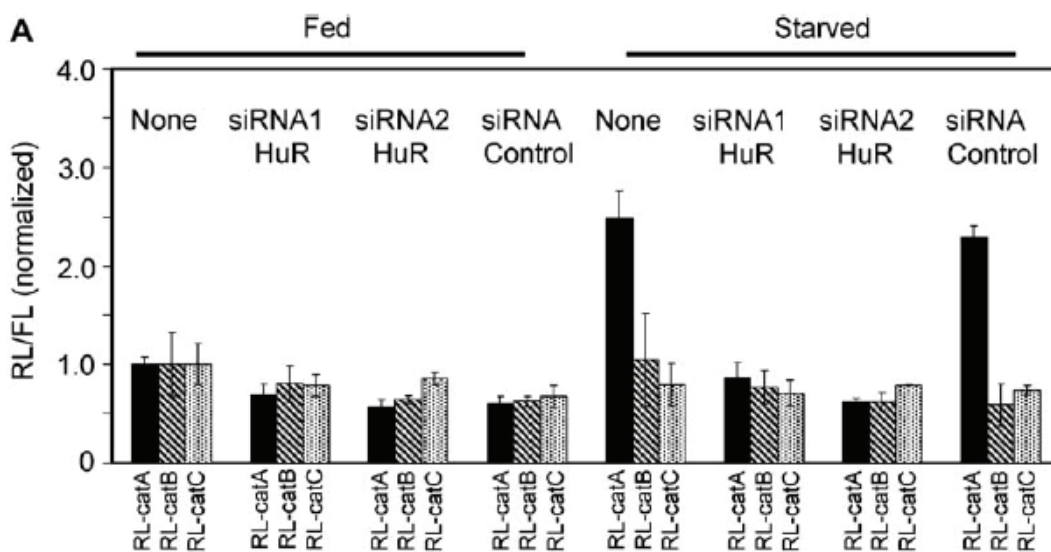
17) Відомо, що в стресових умовах білок NuR виходить з ядра в цитоплазму, де бере участь в модуляції трансляції різних мРНК. Для встановлення можливої ролі білка NuR в дерепресуванні мРНК CAT-1, Bhattacharyya S.N. з колегами (2006) методом РНК-інтерференції була відключена мРНК білка NuR. Для цього, Huh7 клітини були ко-трансфіковані RL-cat репортерами і двома типами siRNAs, здатними відключити експресію мРНК білка NuR. Результати проведених досліджень наведені на рис. А-Д. Вкажіть, як

вплинула трансфекція Huh7 клітин siRNA1 HuR і siRNA2 HuR на експресію білка HuR в клітинах (рис. B)?

Як вплинула трансфекція Huh7 клітин siRNA1 HuR і siRNA2 HuR на експресію репортерної конструкції RL-catA в умовах стресу голодування (рис. A)?

Підтверджують чи ні отримані дані припущення про те, що саме білок HuR відповідає за дерепресування молекул мРНК?

Розчинну цитозольну фракцію контрольних і голодуючих Huh7 клітин осаджували за допомогою моноклональних антитіл до білка HuR. І потім перевіряли, які мРНК випали в осад разом з моноклональними антитілами до білка HuR з використанням RT-PCR. Проведені дослідження показали, що преципітат цитозоля голодуючих клітин містив комплекс білка HuR з CAT-1 мРНК (рис. C). Ряд додаткових досліджень підтвердив, що дерепресування мРНК CAT-1 вимагає зв'язування білка HuR з 3'нетранслюємою (3'UTR) ділянкою мРНК CAT-1. Автори роботи припустили, що взаємодія білків з 3'UTR регіоном молекули мРНК порушує зв'язування мікроРНК зі своєю мішенню.



Взаємодія білка HuR з CAT-1 3'UTR нетранслюємою ділянкою мРНК необхідна для стрес-індукованої дерепресії RL-catA репортера. (A) Нокдаун HuR запобігає індукованій голодуванням дерепресії RL-catA репортера. Huh7 клітини були ко-трансфіковані RL-cat репортерами і зазначеними siRNAs. Через 72 год після трансфекції, клітини були перенесені на додаткові 2 год на середовище з амінокислотами або без амінокислот. (B) Дві різні siRNAs ефективно знизили рівень HuR. Вестерн-блот аналіз був проведений через 72 год після siRNA трансфекції. Результати Вестерн-блот аналізу підтвердили, що в клітинах, трансфікованих відповідними siRNA, - білок HuR не експресується. (C) Анти-HuR моноклональні антитіла були імунопреципітовані (осаджені) з CAT-1 мРНК з цитозоллю

голодуючих Huh7 клітин. Клітини були трансфіковані pRL-catB протягом 48 год перед перенесенням їх в умови голодування за амінокислотами. Вони були пермеабілізовані дигітоніном і відібраний супернатант (Cyto) був використаний для реакцій імунопреципітації з anti-HuR або з anti-FLAG моноклональними антитілами. РНК, екстраговані з імунопреципітата і з клітин перед пермеабілізацією (Total), були проаналізовані з використанням зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR). Жодна з двох контрольних мРНК (β -tubulin і RL-catB) не були імунопреципітовані з моноклональними антитілами проти білка HuR (за Bhattacharyya et al., 2006).

Контрольні питання:

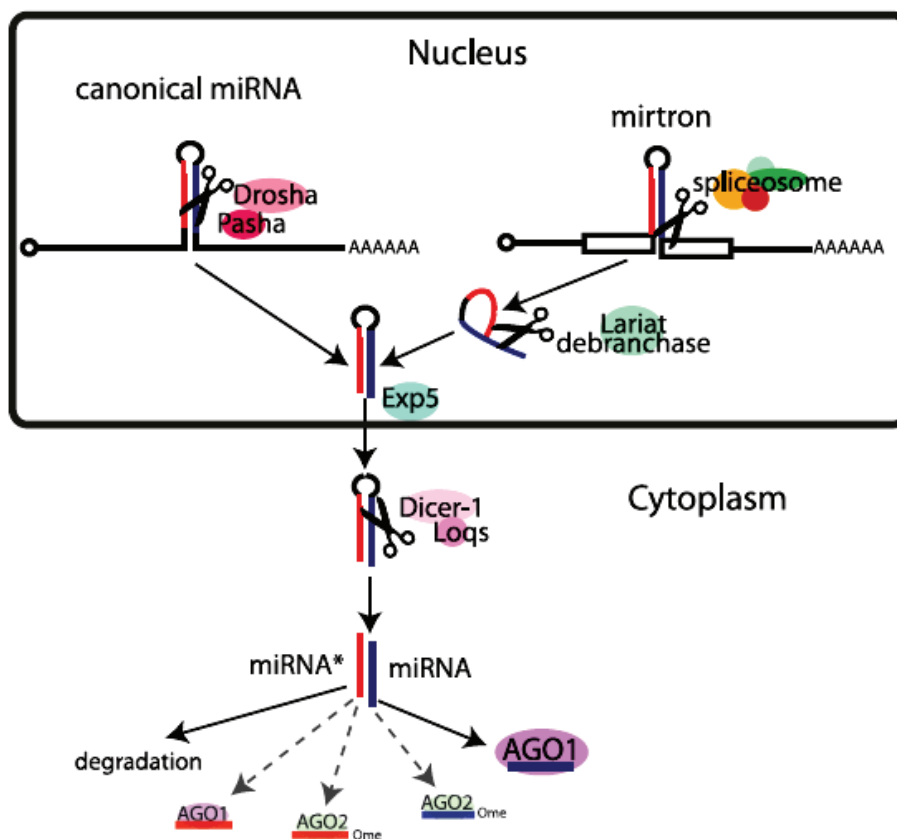
1. РНК-інтерференція. 2. Малі інтерферуючі РНК. 3. МікроРНК (MicroRNA, miRNA). 4. Комплекс RISC. 5. Механізм РНК-інтерференції. 6. Роль РНК-інтерференції в регуляції роботи генів.

Література: Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U., Closs E.I., Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress // Cell. – 2006. – Vol. 125(6). – P. 1111 - 1124.

МікроРНК. МікроРНК - це короткі, близько 22-24 нуклеотидів, некодуєчі молекули РНК, які виконують в клітинах регуляторні функції. Молекули мікроРНК були виявлені у рослин, тварин і деяких вірусів. МікроРНК кодуються ядерною ДНК рослин і тварин і вірусною ДНК у деяких ДНК-вірусів. Крім внутрішньоклітинної виявлена також позаклітинна (циркулююча) мікроРНК.

МікроРНК регулюють експресію генів як на рівні замовчування (або деградації) мРНК, так і на рівні відключення роботи самого гена (замовчування гена в результаті посадки на нього молекули мікроРНК призводить до його метилування і, як наслідок, до тривалого відключення його роботи). Оскільки мікроРНК беруть участь в регуляції експресії генів, вони виявляються втягнутими в більшу частину біологічних процесів. У різних клітинах і тканинах є різні набори мікроРНК. Відхилення в експресії мікроРНК були показані при багатьох хворобах (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Класичний механізм формування молекул мікроРНК. Більшість молекул мікроРНК формується в процесі канонічного біосинтетичного шляху. Цей шлях починається з транскрипції довгої молекули РНК - першого попередника (т.зв. pri-miRNA), який має шпилькові структури.



Класичний шлях біогенезу молекул мікроРНК і альтернативний шлях, пов'язаний з формуванням мітронів у мухи дрозофіли. Де: білки Drosha і Dicer-1 - це ендонуклеази; Pasha і Loqs - це білки, що зв'язуються з двохланцюговими молекулами попередниками мікроРНК; AGO1 і AGO2 - ефекторні білки аргонавти (Argonaute); Nucleus - ядро; mirtron - мітрон; canonical miRNA - класичний шлях формування мікроРНК; spliceosome - сплайсосома; Exp5 - ядерний транспортний білок експортин-5; Loqs - білок, який бере участь разом з білком Dicer-1 в процесингу другого попередника мікроРНК; miRNA - молекула зрілої мікроРНК. В ядрі дволанцюгова РНК в шпильках розпізнається ядерними білками: у хребетних тварин білком DGCR8, а у безхребетних тварин - білком Pasha (за Martin et al., 2009).

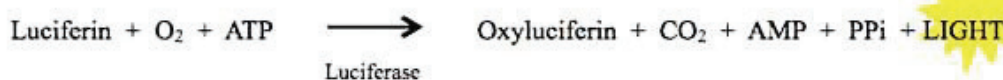
Ця молекула-попередник зазнає розщеплення ядерним ензимом Drosha за участю протеїна-партнера DGCR8 у хребетних тварин або протеїна-партнера Pasha у безхребетних тварин (в цій парі протеїн-партнер забезпечує зв'язування з двохланцюговою РНК). В результаті, формується молекула - другий попередник молекули мікроРНК (т.зв. pre-miRNA). Ця пре-мікроРНК молекула потім транспортується в цитоплазму ядерним транспортним білком експортином-5 (the Exportin-5 shuttle system). У цитоплазмі молекула пре-мікроРНК з'єднується з білками Loquacious і Dicer, при цьому Dicer «нарізає» довгу молекулу пред-мікроРНК на короткі довжиною 22-24 нуклеотида дволанцюгові фрагменти (в цій парі білок-партнер Loquacious забезпечує зв'язування з двохланцюговою РНК). Подальший процесинг включає інкорпорацію цих дволанцюгових фрагментів в білковий комплекс RISC. Після видалення одного з ланцюгів - формується зріла мікроРНК, здатна замовчувати роботу як своєї мРНК, так і свого гена. Регуляторний ефект молекул мікроРНК на процеси трансляції пов'язаний з їх спаровуванням або з нетранслюєними ділянками мРНК (5'-UTR або 3'-UTR), або – з кодуючою частиною цієї молекули.

Альтернативний шлях формування молекул мікроРНК. Нещодавні дослідження показали, що крім класичного шляху - в клітинах є і альтернативні шляхи біогенезу молекул мікроРНК. Серед них - формування мікроРНК з міртронів. Міртрони - це інтронні попередники молекул мікроРНК, які з'явилися в результаті процесу сплайсинга. Цей шлях біогенезу мікроРНК не залежить від функціонування ядерної системи Drosha/DGCR8 процесингу попередників мікроРНК. Після сплайсування інтрона, який містить шпильку, від нього відрізається ділянка розгалуження. Такий міртрон розпізнається ядерним білком експортином-5 і переноситься з ядра в цитоплазму (без втручання білків Drosha/DGCR8 в процесинг транскрипта). У цитоплазмі молекула попередник мікроРНК, що сформувалася з міртрона, зазнає подальшого процесингу, аналогічного класичному шляху формування мікроРНК.

На сьогоднішній день ідентифіковані міртрони у *D. melanogaster*, *C. elegans* і ссавців. Зараз з'являється все більше доказів існування міртронів і у рослин. Міртрони відрізняються від канонічних послідовностей miRNA, і ці відмінності можливо виявити при аналізі даних (за <https://en.wikipedia.org/wiki/Mirtron>).

Методи вивчення експресії мікроРНК. Серед методів, які найбільш часто використовують для оцінки активності мікроРНК, - люциферазний тест.

Тест на люциферазну активність (The Luciferase Reporter Assay). Люциферазний тест широко використовується для дослідження експресії генів на рівні транскрипції. Люциферази - це клас окислювальних ферментів, знайдених у ряду живих організмів, здатних до біоломінесценції (тобто, до самосвітіння). Фермент люцифераза каталізує окислення пігменту люциферину до оксилюциферина. В ході цієї реакції виділяється енергія у вигляді світлового випромінювання:

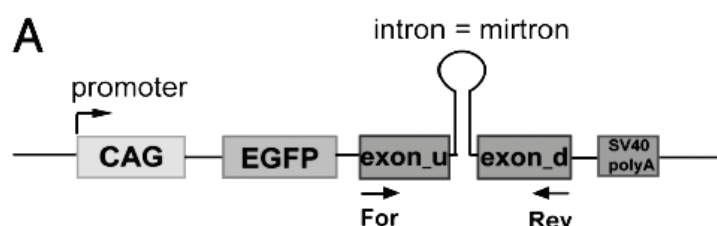


У молекулярних дослідженнях широко використовуються експресійні вектори, до складу яких входить ген люциферази (наприклад, вогняної мухи). До набору реактивів для проведення люциферазного тесту додаються пігменти люциферини, молекули АТФ і т.н. - необхідні для проходження описаної вище реакції в клітинному вмісті того організму, в який буде вбудований вектор з репортерним геном люциферази.

Для проведення люциферазного тесту на виявлення активності гена-інтересу - дослідник клонує регуляторний регіон гена-інтересу (X) вище люциферазного гена в одному з експресійних векторів. Отриманий вектор вводять в клітини і потім дозволяють клітинам деякий час рости (24 або 48 годин). Потім клітини ушкоджують - це призводить до

вивільнення всіх клітинних білків, в тому числі і люциферази. До суміші додають пігмент люциферин і всі необхідні ко-фактори і потім вимірюють ензиматичну активність реакційного середовища за допомогою приладу люмінометра. Оскільки ген-інтересу був злитий з люциферазним репортерним геном, а експресія всієї конструкції запускалася з промотора гена-інтересу - то рівень люциферазної активності опосередковано корелює з активністю експресії в клітинах гена-інтересу (за <http://bitesizebio.com/10774/the-luciferase-reporter-assay-how-it-works/>).

Створення генетичної конструкції для проведення люциферазного тесту з передбачуваними міртронними РНК. Оскільки експресія мікроРНК є тканинспецифічною і залежить від етапу онтогенезу організму і умов навколишнього середовища, то для отримання коректних результатів при тестуванні різних передбачуваних молекул-попередників мікроРНК - дослідниками були отримані культури клітин людини, стабільно експресуючі міртронні РНК певного типу. Для цього в клітини була перенесена конструкція, яка містить ділянки екзонів і сам інтрон-інтересу. Завдяки екзонним фрагментам - після синтезу молекули мРНК попередниці відбувається самовирізнання інтрона з послідовності мРНК.



Схематичне зображення вектора, який експресує міртрони. Де: CAG - сильний синтетичний промотор, який використовується для отримання високого рівня експресії гена в векторах ссавців; EGFP - ген посиленого зеленого флуоресцентного білка (enhanced green fluorescent protein); SV40 polyA - сигнал термінації транскрипції з генома вірусу SV40. Послідовності міртрона і його фланкуючих хазяйських екзонів (exon_u і exon_d) були клоновані нижче EGFP. Стрілками вказані праймери, які були використані для проведення зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) (за Schamberger et al., 2012).

Оскільки передбачуваний механізм регуляторного впливу мікроРНК міртронного походження полягає в комплементарному розпізнаванні ділянки свого інтрона на молекулі попередниці мРНК - для забезпечення проведення люциферазного тесту в задачу дослідників входило перенести в клітини одночасно наступні два вектори: а) вектор, який містить інтронну ділянку гена-інтересу з пришитим геном люциферази, а також б) вектор, що несе конструкцію, яка забезпечить появу в клітинах сплайсованих інтронів потрібного типу (після самосплайсування інтронного попередника).

*NB! В експериментах даного типу для уникнення появи технічних помилок - в якості контролю використовуються конструкції, що несуть інший тип міртрона.

Завдання 1. Експериментальне виявлення білків, задіяних в біогенезі міртронних мікроРНК.

Вважають, що класичні первинні транскрипти попередників мікроРНК і міртрони проходять різні ядерні шляхи процесингу в напрямку отримання зрілих молекул мікроРНК. Martin R. колегами (2009) досліджували формування молекул-попередників мікроРНК і зрілих мікроРНК у різних ліній мушок дрозофіл, мутантних по роботі одного з білків, що беруть участь у процесингу незрілих мікроРНК.

1) Використовуючи дані, наведені в теоретичній частині лабораторної роботи, перерахуйте, які білки беруть участь в процесингу незрілих молекул мікроРНК в:

а) класичному шляху біогенезу мікроРНК: _____;

б) міртроновому шляху біогенезу мікроРНК: _____.

2) Martin R. з колегами (2009) були протестовані лінії мушок дрозофіл, мутантні по функціонуванню наступних білків: білок аргонавт-2 (argonaute-2, лінія ago2), білок дайсер-2 (dicer-2, лінія dcr2), білок локуашес (loquacious, лінія loqs) і білок паша (pasha, лінія pasha). На підставі теоретичного очікування, вкажіть, в яких з перерахованих мутантних ліній буде порушений біогенез молекул мікроРНК, які формуються класичним шляхом: _____;

які формуються міртронним шляхом: _____.

*NB! Зверніть увагу: білок dicer-1 - розщеплює власні дволанцюгові фрагменти РНК організму, тоді як dicer-2 - розщеплює вірусні дволанцюгові РНК, що потрапили в організм ззовні; в геномі людини виявлено 8 різних білків родини аргонавт, з них чотири - ago1-4 - беруть участь у процесингу молекул попередників мікроРНК.

3) Які функції в клітинах виконують молекули мікроРНК? _____

4) Лінії мушок дрозофіл, мутантні по білку Dicer-1, виявилися нежиттєздатними, на відміну від ліній мушок, мутантних по білку Dicer-2. Поясніть отриманий результат, виходячи з відмінностей у функціях даних білків _____

5) Для встановлення ролі білків argonaute-2 (ago2), dicer-2, (dcr2), loquacious (loqs) і pasha (pasha) в процесингу молекул попередниць мікроРНК, авторами дослідження було проведено Нозерн-блот аналіз зразків тотальної РНК, виділеної з клітин личинок мушок дрозофіл. Опишіть, в чому полягає сутність методу Нозерн-блот аналізу. _____

6) Результати проведення Нозерн-блот аналізу з тотальною РНК з личинок мушок дрозофіл наведені на рисунку (на блоті незрілі мікроРНК транскрипти показані квадратною дужкою, зрілі мікроРНК - стрілкою). Використовуючи ці дані, перерахуйте, зрілі мікроРНК яких типів майже не синтезуються або синтезуються дуже слабо у мушок дрозофіл, мутантних по білку pasha: _____.

Який шлях біогенезу цих мікро РНК - класичний або міртронний? _____

7) Перерахуйте, зрілі мікроРНК яких типів синтезуються нормально у мушок дрозофіл, мутантних по білку pasha: _____.

Який шлях біогенезу цих мікро РНК - класичний або міртронний? _____

8) В ядрі білок Pasha працює в парі з білком Drosha. Яку функцію виконує білок Pasha в цій парі? _____

9) Як Ви вважаєте, чому лінії мушок дрозофіл, мутантні по білку Pasha, виявилися життєздатними? _____

10) Висловіть припущення про можливу життєздатність лінії мушок дрозофіл, мутантної по білку Pasha (виходячи з летальності лінії, мутантної по білку Dicer-1)

11) На якому етапі біогенезу молекул мікроРНК задіяний білок loqs? _____

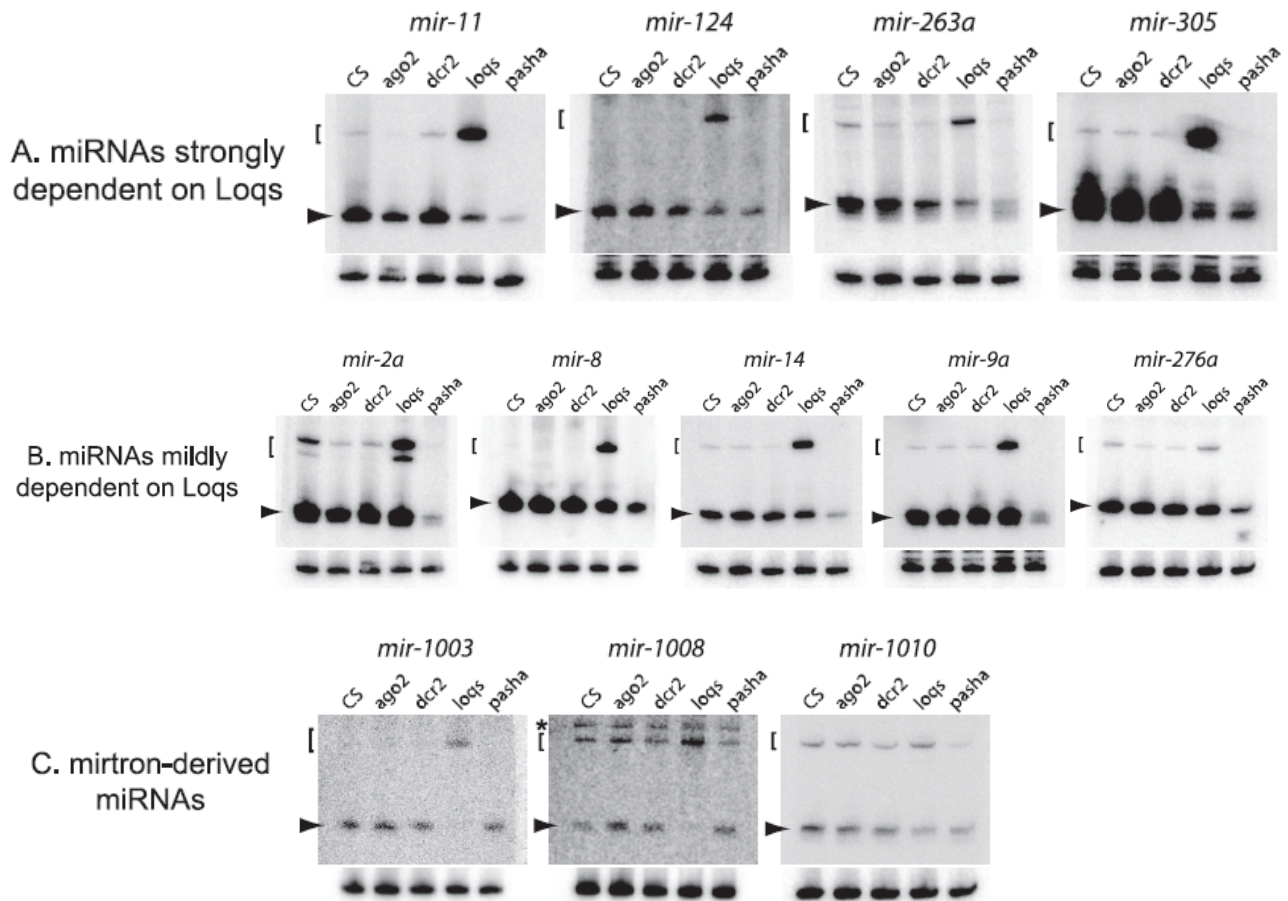
12) Білок loqs працює в парі з білком Dicer-1. Яку функцію виконує білок loqs в цій парі?

13) Чому лінія мушок дрозофіл, мутантна по білку Dicer-1, виявилася нежиттєздатною, на відміну від лінії, мутантної по білку loqs? _____

14) Чому практично для всіх тестованих мікроРНК - лінія мушок дрозофіл, мутантна по білку loqs, показала значне накопичення молекул попередниць зрілих мікроРНК (на рисунку вказано квадратною дужкою)? _____

15) Які типи зрілих мікроРНК не формуються у клітинних ліній, мутантних по білку loquacious: _____

16) Який з механізмів біогенезу мікроРНК - класичний або міртронний - виявився більш чутливим до мутацій по білку loqs? _____



Експресія молекул мікроРНК в клітинах мушок дрозофіл, мутантних по білках, необхідних для процесингу мікроРНК і маленьких інтерферентних РНК (RNAi). Тотальна РНК була екстрагована з гомозиготних личинок мушок дрозофіл наступних генотипів: CS, Canton S - дикий тип; ago2 - лінія, мутантна по білку argonaute-2; dcr2 - лінія, мутантна по білку dicer-2; loqs - лінія, мутантна по білку loquacious; pasha - лінія, мутантна по білку pasha. В якості контролю використовувалася рибосомальна РНК 2S rRNA (результат вказано під кожним мікроРНК блотом). На блоті: зрілі форми мікроРНК - вказані стрілкою, молекули попередниці мікроРНК - вказані квадратною дужкою. (А) Класичні (канонічні) мікроРНК - сильно залежать від експресії Loqs; для них - зрілі форми мікроРНК скорочені (вказано стрілкою), тоді як незрілі форми відповідних мікроРНК - накопичуються в клітинах (вказано квадратною дужкою); усі мікроРНК цієї групи показали редукцію як зрілих мікроРНК, так і мікроРНК-попередників в лініях, мутантних по експресії pasha; (В) МікроРНК, біогенез яких помірно залежить від функціонування Loqs; для кожного типу даних мікроРНК - було показано накопичення мікроРНК-попередника, при цьому остаточне формування зрілих мікроРНК не порушувалось; для всіх мікроРНК даного типу також показана редукція кількості як зрілих молекул, так і молекул-попередниць в лінії, мутантної по pasha; (С) МікроРНК - похідні від міртронів. Біогенез цих мікроРНК сильно залежить від експресії loqs, але - практично не пошкоджується в лініях, мутантних по pasha; однак, було виявлено незначну редукцію в кількості як зрілих молекул, так молекул - попередниць для мікроРНК-1010 в лінії, мутантної по pasha, проте - це пов'язано з особливостями експресії гена CG31163 господаря даної конструкції (за Martin et al., 2009).

***Нозерн-блот (Northern blot)** - метод дослідження експресії генів шляхом тестування молекул РНК (мРНК) і їх фрагментів в зразках. З клітин тестованого організму виділяють

всю РНК і поділяють її за допомогою електрофорезу. Потім, розділені молекули РНК, переносять на нейлонові або нітроцелюлозні фільтри з подальшою гібридизацією з міченими зондами. В якості зондів використовують комплементарні молекули ДНК і т.н. Метод Нозерн-блот дозволяє ідентифікувати транскрипти аналізованих генів, кількості мРНК, їх розміри (за <http://www.studfiles.ru/preview/2362146/page:13/>; <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 2. Виявлення нових функціональних міртронів в геномі людини.

Міртрони є короткими інтронними попередниками мікроРНК і представляють альтернативний, незалежний від активності Drosha/DGCR8, шлях біогенезу молекул мікроРНК. Schamberger A. з колегами (2012) за допомогою люциферазного тесту було проведено експериментальне тестування трьох, передбачуваних виходячи з їх сиквенсу, нових міртронів людини.

1) Який механізм появи світіння при проведенні люциферазного тесту? _____

2) У чому полягає принцип проведення люциферазного тесту для виявлення активності гена-інтересу? _____

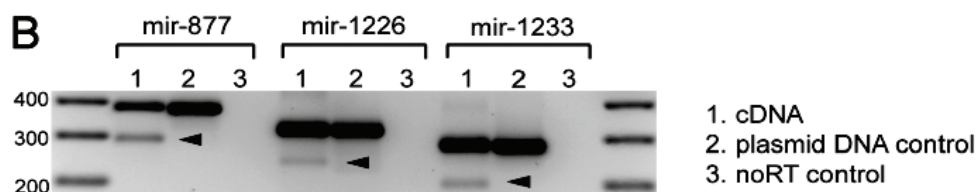
3) Який механізм появи міртронної РНК в клітині? _____

4) У чому полягає сутність регуляторного впливу мікроРНК міртронного походження на експресію генів? _____

5) Відомо, що експресія регуляторних мікроРНК є тканинспецифічною, залежить від етапів онтогенезу організму і від умов навколишнього середовища. Тому, для отримання коректних результатів при тестуванні різних передбачуваних попередників мікроРНК - дослідникам необхідно штучно відтворити експресію міртрона-інтересу в клітинах людини. Яку необхідно зробити генетичну конструкцію для отримання стабільної експресії міртронних РНК в культурі клітин? _____

6) Schamberger A. з колегами (2012) були отримані клітинні лінії, які стабільно експресують міртронні РНК певного типу. Як, використовуючи метод зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR), можна виявити присутність (або відсутність) РНК-інтересу в клітинах? _____

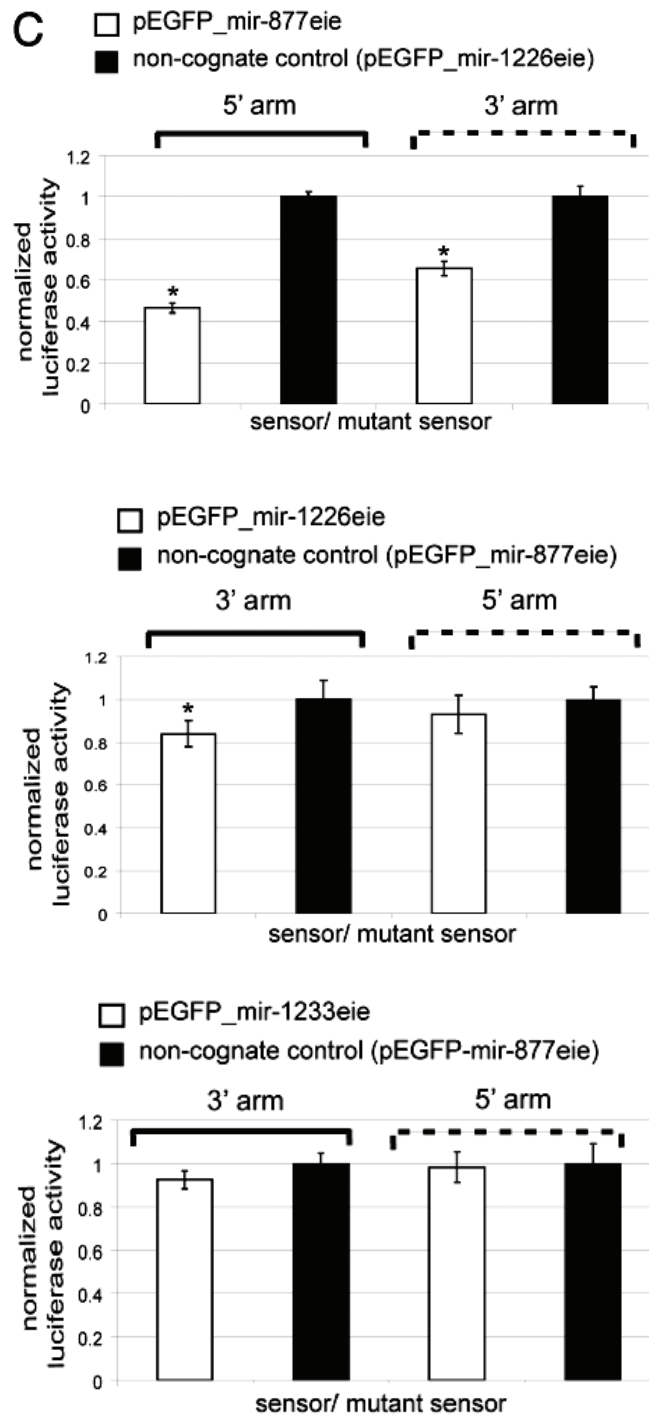
7) Результати перевірки функціональності конструкцій з вивчення міртронних РНК наведені на рисунку. Перерахуйте, які з тестованих міртронних РНК здатні здійснювати самосплайсинг? _____



За допомогою методу зворотної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) були отримані кДНК, що відповідають mir-877, mir-1226 і mir-1233 міртронним молекулам мікроРНК. Для кожного варіанта мікроРНК: на першій доріжці - довгий варіант кДНК (несплайсований, більш важкий) і короткий сплайсований варіант кДНК (більш легкий - на рисунку вказано стрілкою). В якості контролю використовувалася плазмідна ДНК (доріжка 2). Доріжка 3 - варіант, який не пройшов етап зворотної полімеразної ланцюгової реакції (за Schamberger et al., 2012).

8) Яку необхідно створити генетичну конструкцію для проведення люциферазного тесту на виявлення передбачуваних нових міртронних РНК-послідовностей? _____

9) Результати проведення люциферазного тесту з передбачуваними міртронними мікроРНК наведені на рисунку.



Аналіз передбачуваних міртронів людини. (C) - люциферазний сенсорний тест, проведений для клітинної лінії НЕК-293. Люциферазні сенсорні конструкції містили ділянку, що кодує люциферазу, і дві антисмислові копії 5'- або 3'-ділянки кожного з передбачуваних міртронів (mir-877, mir-1226 і mir-1233). Тестувалися як робочі варіанти конструкції, так і мутантні сенсори, що відрізняються від робочих нуклеотидними замінами. Плазмиди, що містять сконструйований сенсор + міртрони, переносилися в клітини лінії НЕК-293. На графіках показано відносно репресування робочого і мутантного сенсорів нормалізоване по відношенню до не свого контролю (non-cognate control) (тобто за одиницю був прийнятий рівень люциферазної активності для контрольної конструкції з іншим типом міртрона). Де: чорні стовпчики гістограм - контроль (рівень люциферазної активності,

прийнятий за одиницю); білі стовпчики гістограм - рівень люциферазної активності в клітинах, з активованим передбачуваним міртроном певного типу. Сенсори з miR-877 і miR-1226 конструкціями показали достовірне пригнічення люциферазної активності в тестовій системі (через трансфекцію двох векторів – в клітинах лінії НЕК-293 синтезуються: а) молекули - попередники мРНК, що містять послідовність люциферази і інтронний попередник міртрону; б) міртрони (внаслідок самосплайсингу перенесеної конструкції), які після процесингу утворюють зрілі мікроРНК відповідного типу. Ці мікроРНК пригнічують як трансляцію власної мРНК, так і експресію відповідного гена-інтересу. Чим більше рівень інгібування люциферазної активності в порівнянні з контролем - тим ефективніше працює міртронна мікроРНК. Для всіх трьох тестованих передбачуваних міртронів - мутантний сенсор показав менший ступінь інгібування люциферазної активності в порівнянні з контролем. Міртрон miR-877 виявився ефективним як в 5'-, так і в 3'-ділянці відповідного інтрона (за Schamberger et al., 2012).

Вкажіть, як змінився рівень люциферазної активності в клітинах, що несуть одночасно молекули попередниці міртрона miR-877 і вже функціональні miR-877 в порівнянні з контрольним рівнем люциферазної активності _____.

Відомо, що в даній тестовій системі - рівень люциферазної активності корелює з рівнем експресії гена-інтересу. Зробіть висновок про те, як змінився рівень експресії конструкції, що несе попередник міртрона miR-877, після появи в клітинах функціональних miR-877: _____.

10) Вкажіть, як змінився рівень люциферазної активності в клітинах, що несуть одночасно молекули - попередниці міртрона miR-1226 і функціональні miR-1226 в порівнянні з контрольним рівнем люциферазної активності _____.

Зробіть висновок про те, як змінився рівень експресії конструкції, що несе попередник міртрона miR-1226, після появи в клітинах функціональних miR-877: _____.

11) Вкажіть, як змінився рівень люциферазної активності в клітинах, що несуть одночасно молекули - попередниці міртрона miR-1233 і функціональні miR-1233 в порівнянні з контрольним рівнем люциферазної активності _____.

Зробіть висновок про те, як змінився рівень експресії конструкції, що несе попередник міртрона miR-1233, після появи в клітинах функціональних miR-1233: _____.

12) Виходячи з результатів люциферазного тесту, зробіть висновок про те, які з протестованих передбачуваних міртронів дійсно є справжніми міртронами (тобто, похідні від них мікроРНК інгібують експресію міртрон-вмісної послідовності) _____.

Контрольні питання:

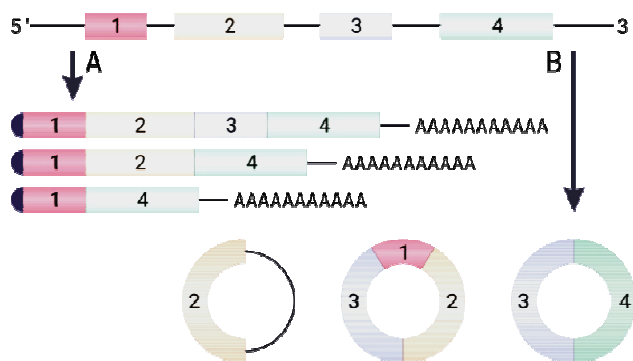
1. МікроРНК: будова, функції.
2. Класичний механізм формування молекул мікроРНК.
3. Альтернативний шлях формування молекул мікроРНК.
4. Методи вивчення експресії мікроРНК.
5. Тест на люциферазну активність (The Luciferase Reporter Assay).
6. Створення генетичної конструкції для проведення люциферазного тесту з передбачуваними міртронними РНК.
7. Нозерн-блот (*Northern blot*) аналіз.
8. Роль міртронних мікроРНК у функціонуванні організмів.

Література:

Martin R., Smibert P., Yalcin A., Tyler D.M., Schäfer U., Tuschl T., Lai E.C. A *Drosophila* pasha mutant distinguishes the canonical microRNA and mirtron pathways // *Mol Cell Biol.* – 2009. 29(3):861-70. doi: 10.1128/MCB.01524-08.

Schamberger A., Sarkadi B., Orban T.I. Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner // *RNA Biol.* – 2012. – Vol. 9(9). – P. 1177 - 1185. doi: 10.4161/rna.21359.

Кільцеві (або циркулярні) РНК (circRNA) – це нещодавно відкритий новий тип некодуєчих регуляторних молекул РНК, які формують ковалентно закриті кільце, тобто у циркулярної РНК 3' і 5'-кінці молекули з'єднані один з одним. Багато кільцевих РНК утворюються в результаті сплайсингу продуктів протеїн-кодуєчих генів і містять від одного до 5 екзонів і в 25% випадків - утриманий інтрон. Однак, не дивлячись на своє походження від білок-кодуєчих генів - кільцеві РНК не транлюються у вигляді білка. Оскільки кільцеві РНК не мають 3'- і 5'-кінців - то вони є стійкими до дії екзонуклеази, на відміну від лінійних РНК. Таким чином, обробка суміші молекул РНК екзонуклеазою дозволяє очистити суміш від лінійних молекул РНК (за https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_RNA).



Біогенез кільцевих (циркулярних) РНК. Сплайсинг мРНК молекул може проходити з утворенням як лінійних (схема А), так і кільцевих (схема В) зрілих РНК-транскриптів через механізм т.зв. бек-сплайсингу (backsplicing) (https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_RNA).

На рівні РНК-сиквенсів кільцеві РНК виявляють за незвичайним для лінійних РНК поєднанням екзонів. Кільцеві РНК були виявлені у людей, мишей, круглих черв'яків. Кільцеві РНК експресуються на специфічних стадіях розвитку організму і в специфічних тканинах і часто є антагоністами мікроРНК. Формування кільцевих РНК промотується транспозонними Alu-елементами. Кільцеві РНК є приблизно в 2,5 рази більш стабільними молекулами, ніж їх лінійні аналоги (тобто час їх існування в клітині в 2,5 рази більший, ніж у лінійних РНК). У проведених дослідженнях було показано, що кільцеві РНК повільніше відповідають на стимуляцію факторами росту, ніж їх лінійні аналоги.

Кільцеві РНК були знайдені навіть в царстві Архей. Однак, механізм формування кільцевих РНК у архей - не відомий, оскільки для прокариот не характерний сплайсинг РНК-попередників. Кільцеві РНК не транлюються в формі білка. Вони виконують в клітинах регуляторні функції. Кільцеві РНК: блокують активність мікроРНК, регулюють взаємодію РНК з РНК-зв'язуючимися білками, регулюють роботу мРНК.

***NB! МікроРНК (microRNA, miRNA)** – малі некодуєчі молекули РНК довжиною 18-25 нуклеотидів, виявлені у рослин, тварин і деяких вірусів, які беруть участь в транскрипційній і посттранскрипційній регуляції експресії генів шляхом РНК-інтерференції. МікроРНК беруть участь в пригніченні активності генів: вони комплементарно спаровуються з ділянками мРНК і блокують їх трансляцію. Крім того, комплекси мікроРНК з мРНК часто швидко розщеплюються клітиною. Також є дані, що вказують на можливість взаємодії мікроРНК безпосередньо з ДНК в процесі РНК-залежного метилування ДНК, яке є одним з ключових механізмів репресії генів, алельного виключення і запобігання активності транспозонів. Різні клітини і тканини синтезують різні набори мікроРНК. За різними оцінками, мішенями мікроРНК є від 30% до 60% генів людини, які кодуєть білок (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Кільцеві РНК містять екзони і в 25% випадків – утримані інтрони, і накопичуються в цитоплазмі клітини. Тоді як кільцеві інтронні РНК (сіRNAs) містять тільки кільцевий інтрон і накопичуються в ядрі, на відміну від кільцевих РНК (сісRNAs). Інтронні кільцеві РНК містять по кілька сайтів зв'язування з мікроРНК і їх основна функція – регулювати роботу своїх батьківських генів.

Кільцеві РНК є численними в клітинах, еволюційно консервативними і мають потенційну регуляторну роль. Експресія певного типу кільцевих РНК корелює з розвитком атеросклерозу, хвороби Паркінсона, деяких типів раку і т.н. (за https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_RNA).

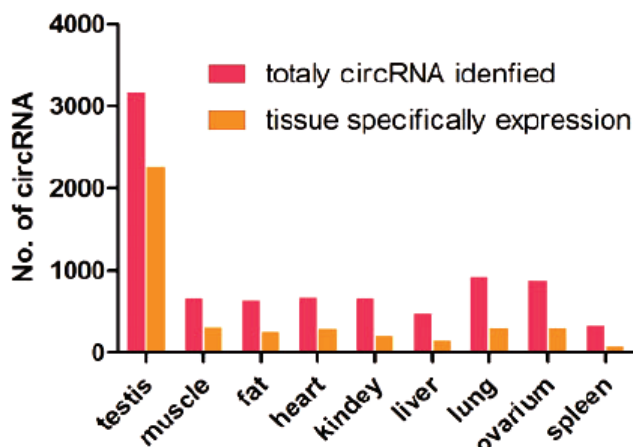
Завдання 1. Роль кільцевих РНК в функціонуванні клітин.

1) Яким є механізм появи в клітинах кільцевих РНК? _____

2) Які функції виконують кільцеві РНК в клітинах? _____

3) Молекулярні дослідження показали, що в клітинах молекули кільцевих РНК взаємодіють з молекулами мікроРНК, пригнічуючи їх активність. Виходячи з отриманих даних, зробіть висновок про можливий механізм регуляторного впливу кільцевих РНК на експресію генів (для відповіді на питання використовуйте знання про механізми регуляторного впливу мікроРНК на експресію генів) _____

4) Проаналізуйте розподіл кільцевих РНК в різних тканинах дикого кабана (*Sus scrofa*) (за Liang et al., 2017).



Тканино-специфічна експресія кільцевих РНК в клітинах дикого кабана (*Sus scrofa*). Де: по осі ОУ - кількість виявлених кільцевих РНК; по осі ОХ - тип тканин: testis - статеві залози, muscle - м'язова тканина, fat - жирова тканина, heart - серце, kindey - нирки, liver - печінка, lung - легкі, ovarium - яєчники, spleen - селезінка; totally circRNA identified - загальна кількість ідентифікованих кільцевих РНК, tissue specifically expression – тканино-специфічна експресія кільцевих РНК (за Liang et al., 2017).

В яких тканинах виявлено найбільшу загальну кількість різних кільцевих РНК? _____

В яких тканинах кількість синтезованих тканино-специфічних кільцевих РНК, в порівнянні із загальною кількістю синтезованих кільцевих РНК, є максимальною _____, мінімальною _____

5) Яку частину становить експресія тканино-специфічних кільцевих РНК у порівнянні із загальною кількістю кільцевих РНК? _____

6) Про регуляцію роботи яких генів кільцевими РНК свідчить той факт, що в клітинах різних тканин тварини синтезуються як тканино-специфічні, так і неспецифічні кільцеві РНК?

7) Дослідження, проведені Епука У. з колегами (2016), показали, що гормональні регулятори росту дуже швидко (протягом хвилин) впливають на експресію мРНК і мікроРНК транскриптів, але не кільцевих РНК (тобто їх експресія в даному місці і в даний час виявляється досить стабільною). У зв'язку з встановленим вище, як Ви думаєте, про що може свідчити виявлення в клітинах організму змін рівня транскрипції кільцевих РНК?

8) При розвитку багатьох захворювань - молекулярні біологи виявляють зміни характеру експресії кільцевих РНК (посилення експресії одних і зниження експресії інших кільцевих РНК). Поясніть можливий причинно-наслідковий зв'язок між змінами експресії кільцевих РНК і розвитком захворювання організму

Завдання 2. Дослідження ролі кільцевих РНК в розвитку захворювань організму.

1) Чому перед проведенням ДНК-мікрочіп аналізу, спрямованого на ідентифікацію експресії кільцевих РНК - необхідно попередньо відокремити кільцеві РНК від їх лінійних аналогів?

2) За допомогою якого методу можна відокремити кільцеві РНК від лінійних РНК, виділених з клітин?

3) Опишіть, як необхідно провести ДНК-мікрочіп аналіз для того, щоб ідентифікувати кільцеві РНК, що синтезуються даним типом клітин:

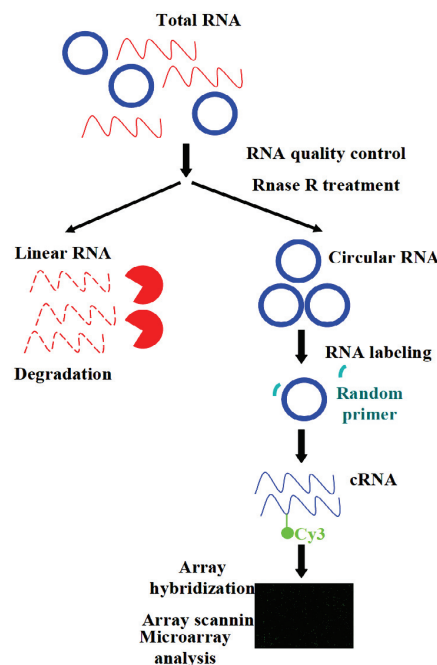
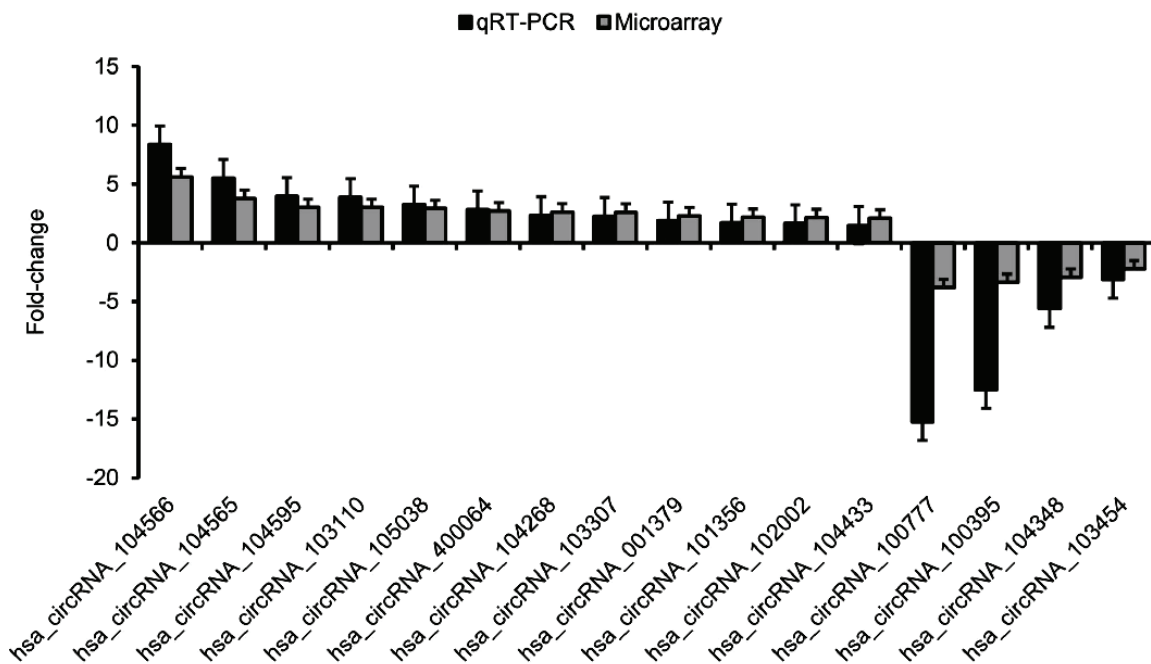


Схема проведення ДНК-мікрочіп аналізу для виявлення експресії кільцевих РНК (за Wu et al., 2016).

4) Peng N. з колегами (2017) було проведено ДНК-мікрочіп аналіз рівня експресії кільцевих РНК в клітинах злоякісних пухлин щитовидної залози. В результаті, для 88 кільцевих РНК було показано збільшення рівня експресії і для 10 кільцевих РНК - було виявлено зниження

рівня експресії в пухлинних клітинах щитовидної залози в порівнянні зі здоровими клітинами. На рисунку наведено результати аналізу для 16 досліджених кільцевих РНК. Вкажіть, у скільки разів збільшився / зменшився рівень експресії цих кільцевих РНК? _____.



Зміна рівня експресії кільцевих РНК в клітинах ракових пухлин щитовидної залози в порівнянні зі здоровими тканинами. Де: Microarray - результати ДНК-мікрочіп аналізу; qRT-PCR - результати кількісного ЗТ-ПЛР аналізу; Fold-change - кратність зміни рівня експресії кільцевих РНК в пухлинних клітинах у порівнянні з клітинами здорової щитовидної залози; по осі ОХ - 16 кільцевих РНК, рівень експресії яких змінився найбільш істотно (за Peng et al., 2017).

5) Чому зміна характеру експресії кільцевих РНК може призвести до розвитку захворювання організму? _____

6) Як Ви вважаєте, чи можливим є розвиток протилежної ситуації, коли патологічні зміни в роботі організму можуть призвести до зміни експресії кільцевих РНК? _____

7) Як необхідно провести експеримент (на прикладі онкологічних захворювань), для того, щоб відрізнити ці дві ситуації і встановити дійсну причину розвитку захворювання? _____

*NB! В ході дослідження, проведеного Peng N. з колегами (2017), була встановлена ключова роль інгібування експресії кільцевої РНК hsa_circRNA_100395 в розвитку злоякісних новоутворень в щитовидній залозі: виявилось, що ця кільцева РНК регулює роботу двох мікроРНК (miR-141-3p і miR-200a-3p), пов'язаних з онкогенезом. Зокрема, у ряді досліджень було показано, що активність miR-141-3p і miR-200a-3p мікроРНК корелює з ростом багатьох типів злоякісних пухлин і з поширенням метастазів.

Контрольні питання:

1. Кільцеві (циркулярні) РНК (circRNA).
2. Роль кільцевих РНК в функціонуванні клітин.
3. Дослідження ролі кільцевих РНК в розвитку захворювань організму.

Література:

Enuka Y., Lauriola M., Feldman M.E., Sas-Chen A., Ulitsky I., Yarden Y. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44(3). – P. 1370 - 1383. doi: 10.1093/nar/gkv1367.

Khan M.A., Reckman Y.J., Aufiero S., van den Hoogenhof M.M., van der Made I., et al. RBM20 regulates circular RNA production from the titin gene // *Circ. Res.* – 2016. – Vol. 119(9). – P. 996 - 1003.

Li H., Hao X., Wang H., Liu Z., He Y., Pu M., Zhang H., Yu H., Duan J., Qu S. Circular RNA expression profile of pancreatic ductal adenocarcinoma revealed by microarray // *Cell Physiol. Biochem.* – 2016. – Vol. 40(6). – P. 1334 - 1344. doi: 10.1159/000453186.

Liang G., Yang Y., Niu G., Tang Z., Li K. Genome-wide profiling of *Sus scrofa* circular RNAs across nine organs and three developmental stages // *DNA Res.* – 2017. doi: 10.1093/dnares/dsx022.

Lin S.P., Ye S., Long Y., Fan Y., Mao H.F., Chen M.T., Ma Q.J. Circular RNA expression alterations are involved in OGD/R-induced neuron injury // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 471(1). – P. 52 - 56. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.183.

Peng N., Shi L., Zhang Q., Hu Y., Wang N., Ye H. Microarray profiling of circular RNAs in human papillary thyroid carcinoma // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12(3):e0170287. doi: 10.1371/journal.pone.0170287.

Wu H.J., Zhang C.Y., Zhang S., Chang M., Wang H.Y. Microarray Expression Profile of Circular RNAs in Heart Tissue of Mice with Myocardial Infarction-Induced Heart Failure // *Cell Physiol. Biochem.* – 2016. – Vol. 39(1). – P. 205 - 216. doi: 10.1159/000445617.

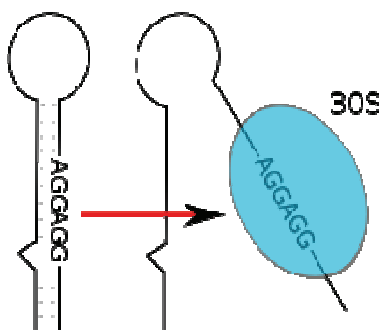
РНК-термометр або РНК-термосенсор (RNA thermometer, RNA thermosensor, RNAT) – температуро-чутлива некодуєча РНК, яка бере участь в регуляції експресії генів. РНК-термометри, як правило, регулюють гени, які необхідні для відповіді на тепловий або холодний шок, проте показано їх участь в регуляції тривалого голодування і патогенності.

Принцип роботи РНК-термометра полягає в зміні вторинної структури цієї молекули у відповідь на зміну температури. В ході цих структурних змін важливі ділянки РНК, наприклад, сайт зв'язування рибосоми, виставляються назовні або, навпаки, йдуть углиб молекули, тим самим впливаючи на трансляцію білок-кодуєчого гена.

Значна частина відомих на сьогодні РНК-термометрів розташовується в 5'-нетранслюємих ділянках (5'-UTR) прокаріотичних мРНК, які кодують білки теплового шоку. Хоча більшість відомих РНК-термометрів виявлені у прокаріотів (в тому числі ціанобактерій), можливі РНК-термометри були виявлені у ссавців, у тому числі і людини. У людини можливий термосенсор РНК теплового шоку-1 (HSR1) активує транскрипційний фактор теплового шоку-1 (HSF1) і запускає синтез захисних білків при температурі, що перевищує +37°C (нормальну температуру тіла), і тим самим захищає клітини від перегрівання. Цис-регуляторний елемент Hsp90 регулює експресію шаперона hsp90 у дрозоді, підвищуючи його трансляцію при високих температурах.

У загальному випадку довжина РНК-термометрів варіює від 60 до 110 нуклеотидів, і вони, як правило, містять шпильку, в якій невелика кількість азотистих основ є не спареною. Вони зменшують стабільність структури, завдяки чому вона може легко плавитися при підвищенні температури.

Структурні зміни в РНК-термометрі можуть прибирати сайт зв'язування рибосоми вглиб молекули і тим самим запобігати трансляції мРНК в білок. При підвищенні температури шпилькова структура РНК-термометра може плавитися, виставляючи назовні сайт зв'язування рибосоми або послідовність Шайна - Дальгарно (а в деяких випадках старт-кодон AUG), дозволяючи малій субодиниці рибосоми (30S) зв'язатися з мРНК, після чого збирається і весь апарат трансляції. Старт-кодон, що розташовується, як правило, на 8 нуклеотидів нижче послідовності Шайна - Дальгарно, відзначає початок білок-кодуєчої області, яку рибосома транслює в пептид.



Стабільна РНК «шпилька» (зліва) розплітається при високій температурі (праворуч). Виділена послідовність Шайна-Дальгарно виставляється назовні, дозволяючи малій суб'одиниці рибосоми (30S) приєднатися до мРНК (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Хоча РНК-термометри зазвичай пов'язані з експресією білків теплового шоку, вони можуть також регулювати експресію білків холодного шоку. Наприклад, у термофільної бактерії *Thermus thermophilus* експресія двох білків масою 7 кДа регулюється РНК-термометром, крім того, схожий механізм був описаний у *Escherichia coli*.

РНК-термометри, окрім відповіді на температурний стрес навколишнього середовища, також регулюють експресію прокаріотичних генів, залучених в механізми вірулентності патогенних бактерій, таких як *Yersinia*, *Neisseria*, *Salmonella* та ін. Генерування

точкових мутацій в РНК-термометрі бактерій дозволило виявити нуклеотидні заміни, які дозволяють «шпильці» розпрямлятися при більш високих температурах, з якими бактерія стикається при тепловому шоці або при інфікуванні теплокровного організму.

Крім таких цис-діючих РНК-термометрів відомий єдиний транс-діючий РНК-термометр, що розташовується в мРНК RpoS, де він, як передбачається, регулює відповідь на тривале голодування (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 1. Трансляційний контроль активності генів маленьких білків теплового шоку у мезофільних і термофільних ціанобактерій за допомогою РНК-термометрів.

РНК-термометри контролюють експресію багатьох генів теплового шоку і генів вірулентності у бактерій. Вони перешкоджають трансляції мРНК, в 5'-UTR послідовність яких вони вбудовані, при низьких температурах за рахунок спарювання азотистих основ і закриття сайту доступу для посадки рибосоми. У ціанобактерій синтез білків теплового шоку Hsp17 регулюється РНК-термометром в 5'-нетранслюємому регіоні молекул мРНК даного білка.

Cimdins A. з колегами (2014) було проведено пошук нових РНК-термометрів для двох видів мезофільних ціанобактерій *Anabaena variabilis* і *Nostoc* sp. Для цього, ціанобактерії піддавали дії стресових температур +42°C протягом години і потім аналізували мРНК транскрипти, експресія яких посилилася у відповідь на стресові температури. В результаті у кожній з досліджених ціанобактерій були виявлені по два маленьких білка теплового шоку: avashort і avalong у ціанобактерій *Anabaena variabilis*, і alrshort і alrlong у ціанобактерій *Nostoc*.

Відомо, що експресія генів теплового шоку, як правило, контролюється як на рівні транскрипції, так і на рівні трансляції. Тому, дослідники почали пошук нових РНК-термометрів в мРНК структурі двох виявлених маленьких білків теплового шоку. Для цього, авторами роботи була створена генно-інженерна конструкція (див. рис.), яка складається з гена ферменту термостабільної β-галактозидази і ділянки, кодованої передбачуваним РНК-термометром в структурі генів маленьких білків теплового шоку двох видів мезофільних ціанобактерій (avashort, avalong, alrshort, alrlong). В якості промотора для даної конструкції використовували послідовність, яка активується у відповідь на додавання до культури клітин тестованих бактерій 0,01% розчину арабінози.



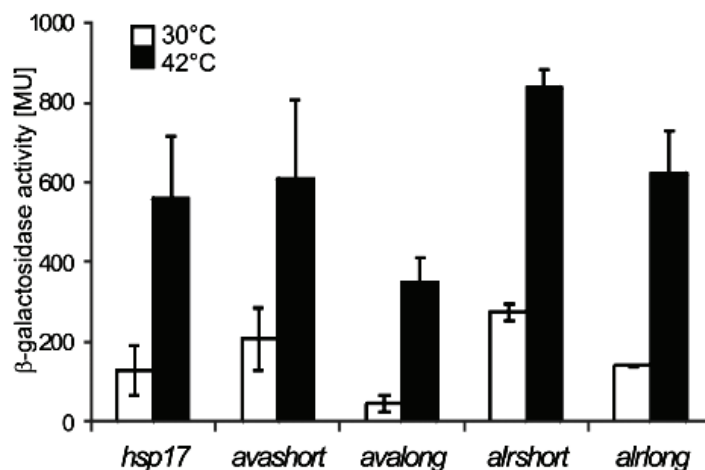
Генно-інженерна конструкція, яка була перенесена в геном кишкової палички *E. coli*. Де: 5'UTR - РНК-термометр, представлений 5'-нетранслюємым регіоном мРНК білків теплового шоку; bgaB - термостабільна β-галактозидаза (за Cimdins et al., 2014).

*NB! На відміну від маленьких білків теплового шоку - зчитування створеної дослідниками генетичної конструкції (тобто, процес її транскрипції) активується додаванням до культури бактерій 0,01% арабінози, а не температурним стресом. Тому саме ця тестова система дозволяє вивчати вплив теплового стресу на пост-трансляційне, а не на транскрипційне регулювання експресії генів маленьких білків теплового шоку.

Отримана дослідниками конструкція була перенесена в геном кишкової палички *E. coli*. Для підтвердження можливої наявності закодованих РНК-термометрів в генах маленьких білків теплового шоку, генетично-модифіковані бактерії кишкової палички піддавали дії стресових температур і досліджували активність ферменту β-галактозидази. Результати проведених досліджень наведені на рисунку (за Cimdins et al., 2014).

1) Вкажіть величину активності ферменту β -галактозидази (в умовних одиницях) в клітинах бактерій кишкової палички при використанні в генно-інженерній конструкції 5'-UTR ділянки гена маленького білка теплового шоку hsp17, який в структурі мРНК транскриптів виконує функцію РНК-термометра: при температурі +30°C _____ і при температурі +42°C _____.

2) Поясніть причину зростання активності ферменту β -галактозидази в клітинах даної трансгенної лінії бактерій кишкової палички: _____.



Виявлення передбачуваних РНК-термометрів у ціанобактерій за допомогою експресії в клітинах кишкової палички генетичної конструкції, що складається з гена термостабільної β -галактозидази і ділянки, кодованої одним з передбачуваних РНК-термометрів (avashort, avalong, alrshort, alrlong). РНК-термометр гена hsp17 з *Synechocystis* був використаний в якості позитивного контролю. По осі ОУ: β -galactosidase activity [MU] – одиниці активності білка β -галактозидази в клітинах кишкової палички при різних температурах (білі стовпчики гістограми - при +30°C, чорні стовпчики гістограми - при +42°C). По осі ОХ - тестовані РНК-термометри: гена hsp17 (позитивний контроль); передбачувані РНК-термометри мезофільних ціанобактерій avashort і avalong з *Anabaena variabilis*, і alrshort і alrlong з *Nostoc* (за Cimdins et al., 2014).

3) Вкажіть величину активності ферменту β -галактозидази (в умовних одиницях) в клітинах бактерій кишкової палички при використанні в генно-інженерній конструкції 5'-UTR ділянки гена маленького білка теплового шоку avashort ціанобактерій *Anabaena variabilis*, який в структурі мРНК транскриптів імовірно може виконувати функцію РНК-термометра: при температурі +30°C _____ і при температурі +42°C _____.

4) Чи можна на підставі результатів даного експерименту стверджувати, що 5'-UTR ділянка гена avashort виконує функції РНК-термометра в структурі мРНК транскриптів даних білків? _____.

5) Порівняйте величину активності ферменту β -галактозидази в клітинах бактерій кишкової палички при використанні в генно-інженерній конструкції 5'-UTR ділянок різних маленьких білків теплового шоку (hsp17, avashort, avalong, alrshort, alrlong). Який з протестованих РНК-термометрів найбільш ефективно активує зчитування відповідних мРНК при тепловому стресі? _____.

* Для відповіді на це питання вкажіть для кожного РНК-термометра у скільки разів підвищився рівень активності ферменту β -галактозидази в умовах теплового шоку:

для hsp17 РНК-термометра: _____,

для avashort РНК-термометра: _____,

для avalong РНК-термометра: _____,

для alrshort РНК-термометра: _____,

для alrlong РНК-термометра: _____.

б) Відомо, що регулювання роботи генів маленьких білків теплового шоку здійснюється як трансляційно, так і пост-транскрипційно за рахунок РНК-термометрів. Доведіть, що експеримент з оцінкою рівня активності ферменту β -галактозидази відображає не транскрипційний рівень, а саме пост-трансляційний рівень регуляції експресії цих генів:

	<p>Температуро-залежні зміни вторинної структури avashort 5'-нетранслюємої ділянки РНК-термометра з мезофільних ціанобактерій <i>Anabaena variabilis</i>. Де: SD, Shine-Dalgarno sequence - послідовність Шайна-Дальгарно (виділена сірими колами); AUG - стартовий кодон (виділено сірими колами). 5'-нетранслюємої ділянки формують кілька «шпильок». Послідовність Шайна-Дальгарно частково потрапляє в структуру другої «шпильки», а стартовий кодон AUG - в структуру третьої «шпильки». Кодуючий регіон мРНК утворений 4-ою і 5-ою «шпильками». При стресовому підвищенні температури навколишнього середовища - в «шпильках» розриваються зв'язки між нуклеотидами, рибосома сідає на мРНК і починає її читувати (за Cimmins et al., 2014).</p> <p>*Послідовність Шайна – Дальгарно (Shine-Dalgarno sequence) - сайт зв'язування рибосом на молекулі мРНК прокариотів, зазвичай на відстані близько 10 нуклеотидів до стартового кодону AUG.</p>
--	--

Контрольні питання:

1. РНК-термометр або РНК-термосенсор.
2. Контроль активності генів за допомогою РНК-термометрів.

Література:

Choi E.K., Ulanowicz K.A., Nguyen Y.A.H., Frandsen J.K., Mitton-Fry R.M. SHAPE analysis of the htrA RNA thermometer from *Salmonella enterica* // RNA. – 2017. pii: rna.062299.117. doi: 10.1261/rna.062299.117.

Cimmins A., Klinkert B., Aschke-Sonnenborn U., Kaiser F.M., Kortmann J., Narberhaus F. Translational control of small heat shock genes in mesophilic and thermophilic cyanobacteria by RNA thermometers // RNA Biol. – 2014. – Vol. 11(5). – P. 594 - 608.

Рибосвічі (riboswitch). Рибосвічі є некодуєчими елементами мРНК, які здатні зв'язувати низькомолекулярні ліганди і тим самим регулювати транскрипцію, трансляцію, стабільність і альтернативний сплайсинг РНК транскриптів. Контроль експресії в даному випадку відбувається без участі факторів білкової природи.

Рибосвічі складаються з двох доменів: високо-консервативного аптамера, відповідального за зв'язування ліганда, і експресійної платформи, яка регулює експресію гена, змінюючи вторинну структуру РНК. У грамнегативних бактерій зміна вторинної структури РНК в більшості випадків призводить до екранування послідовності Шайн - Дальгарно і блокування ініціації трансляції, тоді як у грампозитивних бактерій - до ослаблення транскрипції.

Рибосвічі є поширеним механізмом регуляції генної активності. Дані риборегулятори виявлені не тільки в клітинах бактерій і архей, але і в еукаріотичних організмах (деяких видах грибів і рослин). Рибосвічі беруть участь в регуляції метаболізму вітамінів, амінокислот, пуринів і деяких інших молекул (за <https://cyberleninka.ru/article/n/ribosvichi-novyy-klass-regulyatorov-gennoy-aktivnosti>).

Аптамер - це рецепторний домен рибосвіча. Молекула-метаболіт зв'язується з аптамером і це дозволяє контролювати експресію відповідного гена. Рибосвічі розташовуються в 5'-нетранслюємому регіоні (5'-UTRs) бактеріальних мРНК, де вони модулюють експресію генів, зв'язуючись з відповідними метаболітами.

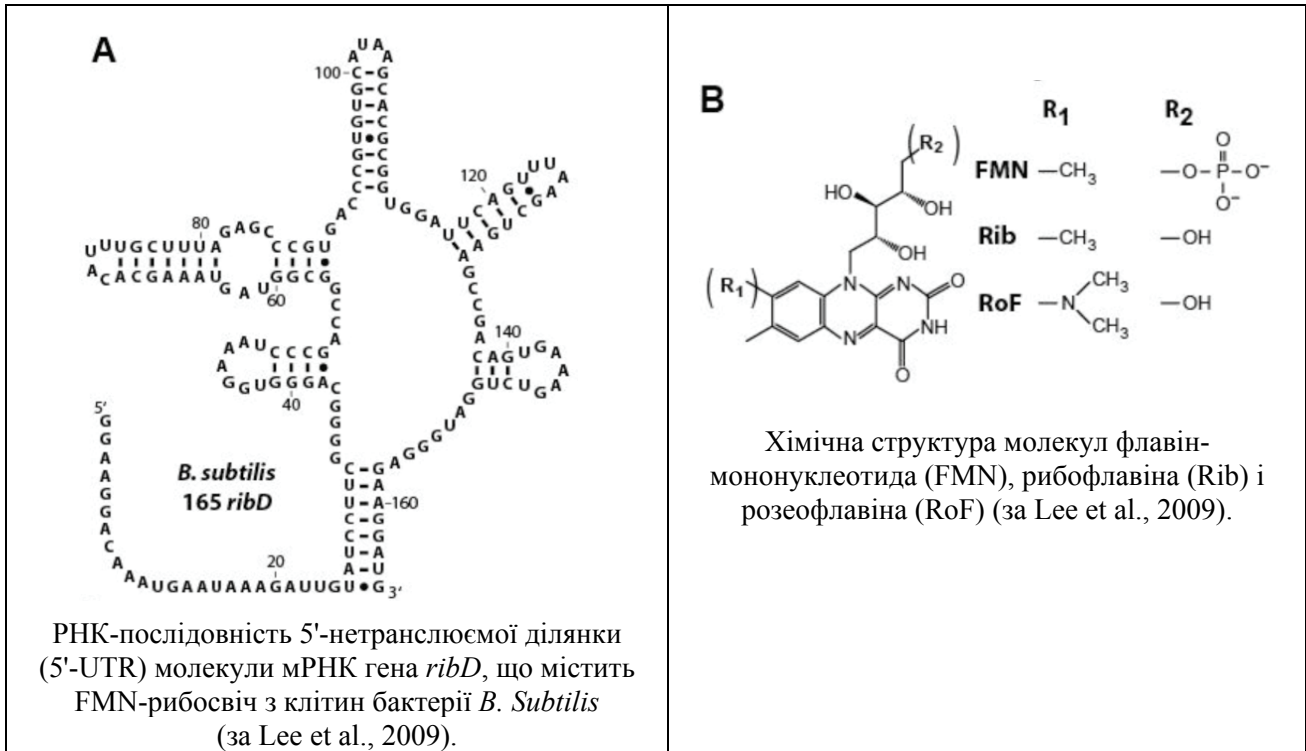
Завдання 1. Регуляція експресії генів бактерії *Bacillus subtilis* за допомогою рибосвічей.

У бактерій *Bacillus subtilis* були виявлені два класи рибосвічей, які зв'язуються з флавін-мононуклеотидом (FMN). Флавін-мононуклеотид (FMN) - це фосфорильоване похідне рибофлавіну. Зв'язування рибосвіча з молекулою FMN призводить до регулювання експресії генів, залучених в продукування і транспортування рибофлавіну (речовини - попередника FMN).

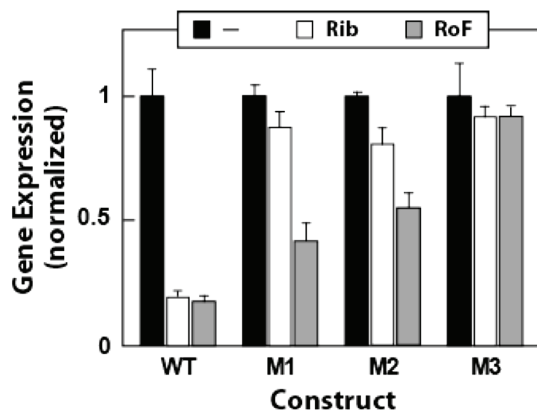
У бактерій *Bacillus subtilis* перший тип FMN-рибосвічей розташовується в 5'-UTR ділянці *ribD* оперона, який кодує п'ять генів, необхідних для біосинтезу рибофлавіну. Коли цей рибосвіч зв'язується з молекулою FMN - формується петля термінації транскрипції *ribD* мРНК. Другий FMN-рибосвіч розташований в 5'-нетранслюємому регіоні (5'-UTR) гена *uraA* (його ще називають *ribU*), який кодує рибофлавіновий транспортер. Зв'язування FMN з рибосвічем запобігає ініціації трансляції *uraA* через механізм, що включає блокування сайту зв'язування рибосоми з відповідним мРНК транскриптом.

Є ряд даних, що свідчать про те, що рибосвічі можуть бути мішенню дії антимікробних сполук. Так, розеофлавін - природний пігмент, ізольований з клітин *Streptomyces davawensis*, є антиметаболітним аналогом рибофлавіну і FMN і має протимікробні властивості.

Lee E.R. з колегами (2009) були ідентифіковані розеофлавін-резистентні лінії бактерій *Bacillus subtilis*. Виявилося, що ці бактерії мають мутації в структурі аптамеру FMN-рибосвіча. Завдяки цим мутаціям порушується зв'язування ліганда з FMN-рибосвічем. При цьому отримані мутантні лінії виявилися гіперпродуцентами рибофлавіну (виявилося, що через мутації в рибосвіч-ділянці не тільки розеофлавін, але і рибофлавін не зв'язується з аптамером; бактерія «вважає», що їй не вистачає рибофлавіну і починає його посилено синтезувати). Оскільки в нормі, FMN-рибосвічі після зв'язування зі своїм лігандом блокують транскрипцію генів, що відповідають за біосинтез рибофлавіну, - гіперпродукування рибофлавіну мутантними лініями, мабуть, викликано нездатністю мутантного рибосвіча зв'язатися з молекулою FMN і заблокувати експресію гена (за Lee et al., 2009).



- 1) Що таке рибосвіч? _____
Що таке аптамер? _____.
- 2) В якій частині молекули мРНК знаходиться ділянка, яка відповідає рибосвічу? _____.
- 3) За допомогою якого механізму рибосвіч регулює експресію свого гена на рівні транскрипції? _____.
- 4) За допомогою якого механізму рибосвіч регулює експресію свого гена на рівні трансляції? _____.
- 5) Для встановлення ролі FMN-рибосвіча в регулюванні експресії гена, в мРНК структуру якого вбудований даний рибосвіч, Lee E.R. з колегами (2009) методами генної інженерії були створені конструкції, що складаються з FMN-рибосвіча (дикого або мутантного типів), який був з'єднаний з репортерним геном *lacZ*. Дані конструкції вбудовували в клітини кишкової палички *E. coli* і досліджували їх експресію в різних умовах (за відсутності лігандів для аптамера FMN-рибосвіча і в присутності таких лігандів - рибофлавіна і розеофлавіна). У проведеному дослідженні інтенсивність експресії репортерного гена *lacZ* в клітинах трансгенних ліній кишкової палички *E. coli* в звичайних умовах (тобто, без додавання лігандів, що зв'язуються з аптамером FMN-рибосвіча - чорні стовпчики гістограми) була прийнята за одиницю. Вкажіть, як змінюється інтенсивність експресії репортерного гена *lacZ* в клітинах WT трансгенної лінії кишкової палички (з диким типом FMN-рибосвіча) в умовах додавання до культурального середовища рибофлавіна (білі стовпчики гістограми) і розеофлавіна (сірі стовпчики гістограми) в порівнянні з культивуванням бактерій без додавання лігандів (чорні стовпчики гістограми): _____.
- 6) Поясніть причину зниження рівня експресії репортерного гена *lacZ* після додавання до культурального середовища рибофлавіна і розеофлавіна _____.
- 7) Вкажіть, як змінюється інтенсивність експресії репортерного гена *lacZ* в клітинах M1, M2 і M3 трансгенних ліній кишкової палички (з мутантними типами FMN-рибосвіча) в умовах додавання до культурального середовища рибофлавіна (білі стовпчики гістограми) в порівнянні з культивуванням бактерій без додавання даного ліганду (чорні стовпчики гістограми) _____.



Послідовності, які кодують дикий тип FMN-рибосвіча, а також три родеофлавін-резистентні мутантні лінії FMN-рибосвіча з клітин бактерій *B. subtilis* були приєднані до гену *lacZ* кишкової палички *E. coli* і вбудовані в *amyE*-локус бактерій *B. subtilis*. Трансгенні бактерії вирощувалися на поживних середовищах з додаванням 100 мкМ рибофлавіна або родеофлавіна впродовж 2 годин перед проведенням тесту на рівень β -галактозидазної активності. NB! Рівень експресії репортерного гену *lacZ* оцінювали за активністю в клітинах ферменту β -галактозидази. Мутантні типи FMN-рибосвічей мають одиничні нуклеотидні заміни G на A в позиції 41 (лінія M1), в позиції 60 (лінія M2) і в позиції 133 (лінія M3) (нумерація нуклеотидів відповідає рис.). Максимальні величини Мілеровських одиниць експресії репортерного гену *lacZ* склали 68, 75, 105 і 50 одиниць для клітин, що несуть WT, M1-M3 типи FMN-рибосвічей, відповідно. На гістограмах рівень експресії репортерного гену *lacZ* зазначений не в Мілеровських одиницях, а приведений до одиниці для експериментів без додавання лігандів до культурального середовища. Де: Construct - тип трансгенних бактерій кишкової палички *E. coli*: WT - трансгенні бактерії з диким типом FMN-рибосвіча; M1, M2 і M3 - трансгенні бактерії з мутантним типом FMN-рибосвіча, який не зв'язується ні з рибофлавіном, ні з родеофлавіном; Gene Expression - рівень експресії генетичної конструкції з репортерним геном *lacZ* (оцінювали за активністю в клітинах бактерій ферменту β -галактозидази); Rib - рибофлавін; RoF – родеофлавін (за Lee et al., 2009).

8) Чому додавання ліганда рибофлавіна до культурального середовища практично не змінило рівень експресії репортерного гену *lacZ* в лініях з мутантними типами FMN-рибосвіча? _____

9) Вкажіть, як змінюється інтенсивність експресії репортерного гену *lacZ* в клітинах M1, M2 і M3 трансгенних ліній кишкової палички (з мутантними типами FMN-рибосвіча) в умовах додавання до культурального середовища родеофлавіна (сірі стовпчики гістограми) в порівнянні з культивуванням бактерій без додавання даного ліганду (чорні стовпчики гістограми) _____

10) Чому трансгенні бактерії *E. coli* з мутантними типами FMN-рибосвіча по-різному відреагували на додавання до культурального середовища рибофлавіна і родеофлавіна? Про що свідчить даний результат? _____

11) Другий FMN-рибосвіч розташований в 5'-нетранслюємому регіоні (5'-UTR) гену *uraA* (його ще називають *ribU*), який кодує рибофлавіновий транспортер. Зв'язування FMN з рибосвічем запобігає ініціації трансляції *uraA* транскрипта. Поясніть, яким є механізм блокування трансляції даного мРНК транскрипта за участю FMN-рибосвіча: _____

12) Зробіть висновок про те, яку роль відіграють рибосвічи в регуляції експресії своїх генів: _____

Контрольні питання: 1. Рибосвічи (riboswitch). 2. Регуляція експресії генів за допомогою рибосвічей.

Література: Lee E.R., Blount K.F., Breaker R.R. Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression // RNA Biol. – 2009. – Vol. 6(2). – P. 187 – 194.

Тема: Структура білків. Порушення і відновлення структури білків. Шаперони.

Структура білків. Білки мають первинну, вторинну, третинну і четвертинну структури. Первинна структура білків - це послідовність амінокислот, які формують даний білок. У процесі синтезу білка відбувається самоупаковування білка з набуттям ним вторинної структури, представленої альфа-спіралями або бета-шарами, а також третинної структури як упорядкованої комбінації альфа-спіралей і бета-шарів. Деякі білки для виконання своїх функцій з'єднуються з іншими білками, формуючи четвертинну структуру.

Порушення структури білків. Білки-шаперони. Через точкові мутації самоупаковування білків може відбуватися неправильно, що призводить до порушення структури і, як наслідок, функцій білка. Крім того, до порушення структури білка можуть призводити фактори навколишнього середовища - високі температури, високий тиск, висока іонна сила розчинів і т.н.

Шаперони - це молекули, які контролюють правильне упакування інших молекул в процесі формування ними вторинної та третинної структури. Клітинні білки-шаперони з'єднуються з білками, які мають порушення в своїй структурі, і за рахунок енергії гідролізу АТФ - розпаковують білки, створюючи для них можливість повторного правильного упакування. Відключення генів шаперонів призводить до фенотипічного прояву в клітинах значної кількості мутацій, які до цього маскувалися завдяки роботі шаперонів.

РНК-шаперони. До недавнього часу вважали, що функцію шаперонів можуть виконувати виключно білки. Однак, недавні дослідження показали, що не тільки білки володіють каталітичними функціями, але й молекули РНК, що поставило під сумнів твердження про існування виключно білків з шаперонними функціями. І дійсно, роботи в області пріонних білків та інгібіторів їх утворення дозволили виявити, що упакування клітинних білків контролюється також молекулами РНК, які входять до складу рибосоми.

З'ясувалося, що однією з причин розвитку пріонних захворювань є дисфункція РНК-шаперонів в складі рибосом. І що причиною неправильного упакування білків можуть бути мутації в молекулах рРНК, які в складі рибосоми контролюють утворення вторинної та третинної структури білків, які синтезуються. Таким чином, молекули РНК, як і білків, володіють шаперонними функціями.

Наслідки появи порушень в структурі білків. Порушення в упаковці білків призводять до порушення клітинних функцій - як внаслідок дисфункції конкретного білка, так і в результаті накопичення в клітинах бракованих білків. Зокрема, проведені дослідження показали, що в нейронах неправильно упаковані білки накопичуються через їх нерозчинність, що призводить до розвитку нейродегенеративних захворювань: пріонопатій і синуклеїнопатій.

Пріонопатії. Пріони (PrP) - це розчинні білки, які синтезуються нейронами і які необхідні для нормальної роботи нервової системи. У деяких випадках - білки-пріони упаковуються не в альфа-спіралі, а в бета-шари, які є нерозчинною формою білків-пріонів. Накопичення в нервових клітинах нерозчинних агрегатів з пріонних білків призводить до дисфункції нейронів. Одним з яскравих прикладів пріонопатії є хвороба куру або «смерть, що сміється», на яку хворіють дикуни, практикуючі ритуальний канібалізм: поїдаючи сире м'ясо хворого родича вони також захворюють на пріонопатію і вмирають. Дослідження показали, що неправильно упаковані пріонні білки поведуться як матриця - тобто вони здатні провокувати неправильне упакування всіх клітинних пріонних білків.

Відкриття пріонів у дріжджів та розробка тестового методу червоно-білих колоній дозволила вести пошук антипріонних препаратів. Завдяки цьому тестовому методу були

ідентифіковані три антипріонні сполуки: 6-амінофенантридин (6-aminophenanthridine, 6AP), гуанабензацетат (guanabenz acetate, GA) і іміквімод (imiquimod, IQ). Біохімічні та генетичні дослідження виявили, що ці препарати інгібують активність рибосоми, пов'язану з упаковкою білків, а мішенню їх дії є рибосомальна РНК (rRNA). Було встановлено, що здатність до упакування знову синтезованих білків має V-домен 23S/25S/28S rRNA великої субодиниці рибосоми. Препарати 6AP і GA - інгібують активність рибосоми, пов'язану з упаковкою білків, за рахунок конкуренції з протеїнами за сайт зв'язування з V-доменом rRNA (за Banerjee & Sanyal, 2014).

Синуклеїнопатії. Альфа-синуклеїн - це також один з білків, який в нормі є необхідним для правильного функціонування нервових клітин. Синуклеїнопатії - нейродегенеративні захворювання, пов'язані з накопиченням і агрегацією в певних групах клітин головного та спинного мозку білка альфа-синуклеїну, з утворенням специфічних внутрішньоклітинних включень. Накопичення нерозчинних агрегатів альфа-синуклеїну порушує функцію клітин і в кінцевому підсумку призводить до їх загибелі. До даної групи патологій відносяться хвороба Паркінсона, деменції з тільцями Леві, мультисистемна атрофія, хвороба Галервордена-Шпатца (за <https://www.medactiv.ru/yguide/s/guide-s-0221.shtml>).

Методика виявлення чинників, які впливають на процеси само-упакування білків після їх денатурації. Для виявлення факторів, які сприяють відновленню структури білків, використовується спеціальна тест-система, в якій будь-який білок денатурують (наприклад, в 6М гуанідин-гідрохлориді або в 8М сечовині) і потім, відмиваючи денатуруючий розчин, дозволяють білку знову упакуватися: або в умовах самоупакування, або в умовах присутності факторів, що сприяють такому упакуванню (наприклад, в присутності білків-шаперонів).

Факт упакування білка в нативну конформацію виявляють шляхом перевірки функціональності даного білка, зокрема - встановлення його ферментативної активності за допомогою стандартного колориметричного аналізу з використанням спектрофотометра. Виявлений рівень активності ренатурованого білка порівнюють з активністю білка, що не піддавався денатурації. Найбільш часто в дослідженнях використовують білок карбоангідразу людини (НСА).

Завдання 1. Виявлення участі рибосомної РНК в упаковці клітинних білків.

- 1) Опишіть, як провести експеримент по виявленню можливої ролі молекул РНК в упаковці білків (на прикладі карбоангідрази людини, НСА): _____
- 2) Результати дослідження впливу 23S rRNA рибосомної РНК, поряд з впливом різних субодиниць рибосом, на упаковку білків карбоангідрази людини (НСА) наведені на графіку. Проаналізуйте отримані дані і дайте відповіді на нижченаведені питання.
- 3) Яким є відсоток білків, які відновили свою структуру шляхом самоупакування, без додавання компонентів, які сприяють упаковці білків: _____
- 4) Перерахуйте, які фактори, що сприяють упаковці білків, використовувалися на наступних етапах експерименту: _____
- 5) Як вплинула присутність в розчині молекул 23S rRNA рибосомної РНК на відсоток білків, які відновили свою структуру? _____
- 6) Як вплинула присутність в розчині 50S субодиниць рибосом на відсоток білків, які відновили свою структуру? _____
- 7) Які молекули називають шаперонами? _____
- 8) Які типи шаперонів Вам відомі? _____
- 9) Грунтуючись на результатах проведеного експерименту чи можна стверджувати, що молекули РНК володіють шаперонною активністю, як і молекули білків? _____

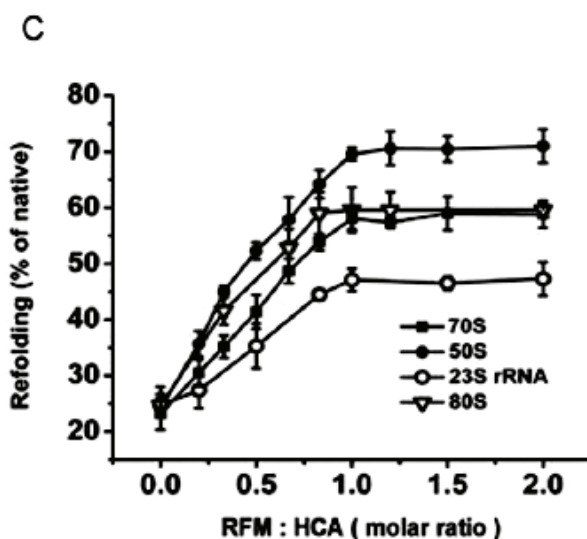
10) Як Ви вважаєте, чому ефективність 50S рибосомної субодиниці виявилася вищою, ніж ефективність молекул рРНК в процесі відновлення структури денатурованих білків?

11) При якому співвідношенні кількості молекул - чинників відновлення структури білків і молекул денатурованих білків - відсоток білків, які відновили свою структуру, був максимальним? _____

12) Як Ви думаєте, чому подальше підвищення концентрації факторів, що сприяють відновленню структури білків, не вплинуло на кількість білків, які відновили свою структуру? _____

13) Вкажіть, яким є максимальний відсоток білків, які відновили свою структуру шляхом самоупаковування за участю компонентів, що сприяють упаковці білків: _____

Як Ви вважаєте, чому цей показник не перевищує 80%? Чому не менше 20% денатурованих білків були не спроможними відновити свою структуру? _____



Переупакування білка карбоангідази людини (HCA) за участю різних рибосомних модуляторів упакування (RFMs) і при різних співвідношеннях концентрації модуляторів упакування білків і карбоангідази (RFM: HCA molar ratios). Де: рибосомні модулятори упакування білків (RFMs): 70S - 70S субодиниця рибосоми; 50S - 50S субодиниця рибосоми; 23S rRNA - 23S рибосомна РНК; 80S - 80S субодиниця рибосоми; по осі ОУ - відсоток переупакованих білків HCA після їх денатурації, Refolding, % of native; по осі ОХ - молярне співвідношення концентрації модуляторів упакування білків (RFM) і білка HCA, (RFM : HCA molar ratios) (цитовано за Banerjee & Sanyal, 2014).

Завдання 2. Встановлення механізму дії антипріонних лікарських препаратів.

Дослідження, спрямовані на пошук препаратів, що захищають пацієнтів з пріонними захворюваннями від прогресування даної смертельної хвороби, дозволили виявити ряд речовин з анти-пріонною активністю (тобто, це речовини, які запобігають накопиченню в клітинах неправильно упакованих білків). Серед них: 6-амінофенантридин (6-aminophenanthridine, 6AP), гуанабензацетат (guanabenz acetate, GA) і іміквімод (imiquimod, IQ).

1) Експерименти *in vitro* показали, що білки здатні до самоупаковування і що на цей процес спроможні впливати білки-шаперони і РНК-шаперони. Як необхідно провести експеримент *in vitro*, щоб встановити, на яку складову процесу самоупаковування білків впливають анти-пріонні лікарські препарати 6AP, GA і IQ? _____

2) Результати експериментів *in vitro* показали, що анти-пріонні лікарські препарати 6AP, GA і IQ не впливають на процес самоупаковування білків, однак - інгібують упакування білків, яке пов'язане з активністю рибосом (див. рис. D).

3) Перерахуйте, які з тестованих препаратів пригнічують відновлення структури денатурованих білків? _____

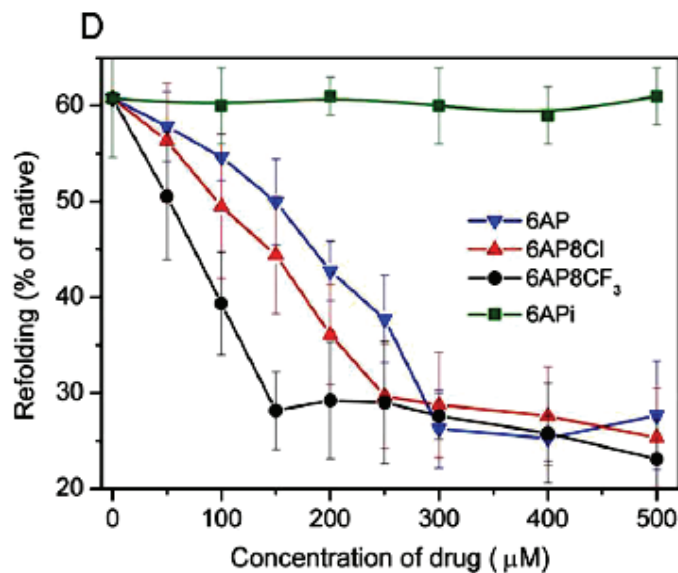
4) При максимальному рівні інгібуючої дії тестованих препаратів - який відсоток білків, здатний до відновлення своєї структури? _____

5) Виходячи з отриманих даних, зробіть висновок про те, яким є механізм інгібуючої дії лікарських анти-пріонних препаратів на упакування білків? _____

6) Вкажіть, яка з тестованих речовин не пригнічує відновлення структури денатурованих білків? _____

7) Як Ви думаєте, чи володіє цей препарат анти-пріонною активністю? _____
Чому? _____

8) Подальші дослідження показали, що анти-пріонні препарати зв'язуються з V-доменом рибосомної рРНК, яка входить до складу великої субодиниці рибосоми. При цьому антипріонні препарати конкурують з клітинними білками за сайти посадки в V-домени рибосомної рРНК. Виходячи з отриманих результатів, зробіть висновок про причини розвитку пріонних захворювань _____.



Пригнічення активності рибосом по упакуванню модельних білків карбоангідрази людини (НСА) при впливі різними похідними анти-пріонного препарату 6AP. Де: по осі OY - відсоток переупакованих білків НСА після їх денатурації, Refolding, % of native; по осі OX - концентрація анти-пріонного препарату 6AP і його похідних, Concentration of drug, μM; похідні 6AP: 6AP8Cl, 6AP8CF₃, 6APi (цитовано за Banerjee & Sanyal, 2014).

Завдання 3. Виявлення подібності в механізмах поширення патогенного процесу при синуклеїнопатіях і пріонопатіях.

Альфа-синуклеїн є розчинним клітинним білком, який під час розвитку багатьох нейродегенеративних захворювань, включаючи хворобу Паркінсона і множинну системну атрофію, формує патологічні агрегати з нерозчинних білків. У ряді досліджень було показано, що у людей міссенс мутації в гені SNCA, що кодує білок альфа-синуклеїн (наприклад, такі, що призводять до амінокислотної заміни A53T), а також мутації, що сприяють гіперекспресії нормального гена цього білка, - призводять до розвитку хвороби Паркінсона.

Оскільки неправильно упакований білок альфа-синуклеїн має ряд характеристик, які зближують його з пріонами, Vreid S. з колегами (2016) досліджували потенційну здатність

патологічно упакованого альфа-синуклеїну індукувати розвиток захворювання у здорового організму після внутрішньочеревного введення або ін'єкції в язик. В якості об'єкту дослідження використовувалися трансгенні миші (лінія мишей Tg(M83^{+/-}:Gfap-luc^{+/-}), в клітинах яких гіперсинтезується людський альфа-синуклеїн з точковою мутацією заміни амінокислот A53T. Експериментальним мишам шляхом ін'єкцій вводили патологічний неправильно упакований фібрилярний альфа-синуклеїн людини. Результати проведених досліджень наведені на рисунку і в таблиці.

1) Проаналізуйте дані, наведені в таблиці. Вкажіть, у якій кількості мишей після одноразової внутрішньочеревної ін'єкції фібрилярного альфа-синуклеїну людини розвинулися паралічі і альфа-синуклеїнова патологія нервової системи _____ (всього) _____ (% випадків захворювання); після ін'єкції в язик фібрилярного альфа-синуклеїну: _____ (всього) _____ (% випадків захворювання).

2) Який тип ін'єкцій фібрилярного альфа-синуклеїну - внутрішньочеревний або в язик - спровокував більшу кількість випадків розвитку захворювань у мишей? _____ Чому? (Для відповіді на це питання порівняйте кількість ін'єктованого фібрилярного матеріалу в обох експериментах) _____

Таблиця. Експерименти по введенню в організм мишей патологічного фібрилярного альфа-синуклеїну людини (за Breid et al., 2016).

Лінія мишей:	Інокуляція:	Шлях інокуляції:	Кількість мишей, що захворіли, у порівнянні з кількістю інокульованих мишей:	Середня тривалість життя мишей:
Миші з гіперекспресією вбудованого гена мутантного альфа-синуклеїну людини	Фібрили альфа-синуклеїну людини	В черевну порожнину, 50 мкг	4/5	229 ± 17
	Контроль, PBS буфер	В черевну порожнину	0/5	420
	Фібрили альфа-синуклеїну людини	В язик, 10 мкг	1/5	285
	Контроль, PBS буфер	В язик	0/4	420
Миші без гена альфа-синуклеїну людини	Фібрили альфа-синуклеїну миші	В язик, 10 мкг	0/8	420
	Контроль, PBS буфер	В язик	0/9	420

2) Симптоми синуклеїнопатій у піддослідних мишей розвинулися через 229 ± 17 днів після внутрішньочеревної ін'єкції і через 285 днів після ін'єкції в язик фібрилярного альфа-синуклеїну. Чому потрібний був такий тривалий період для розвитку симптомів захворювання? _____

3) До яких наслідків призвели ін'єкції мишам, які не мають вбудованого людського мутантного гена альфа-синуклеїну, ін'єкції фібрилярного альфа-синуклеїну мишей? _____

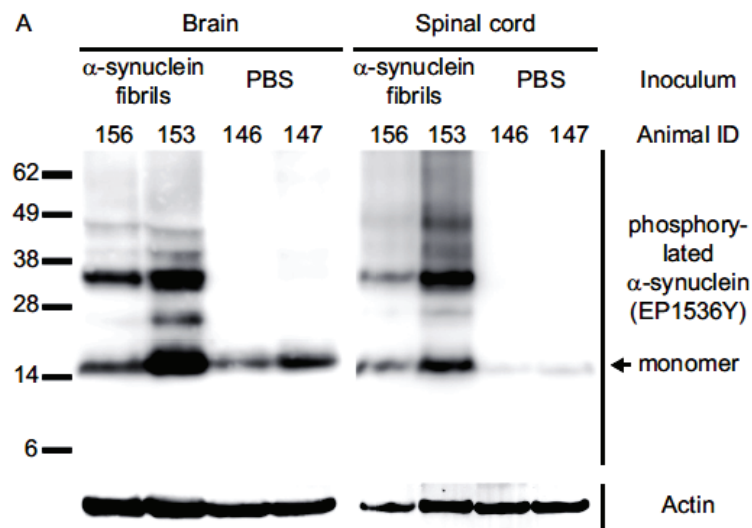
Зробіть висновок про те, чи будь-який фібрилярний альфа-синуклеїн здатний провокувати розвиток захворювання нервової системи? _____

З чим пов'язана патогенність людського фібрилярного альфа-синуклеїну? _____

4) Breid S. з колегами (2016) були виділені і проаналізовані білки з клітин мозку хворих і здорових мишей. Результати досліджень наведені на рисунку.

На гель-електрофорезі фібрилярний альфа-синуклеїн має велику масу і є сильно фосфорильованим по серину в положенні 129 порівняно з мономірною розчинною формою альфа-синуклеїну. Вкажіть шифр мишей, у яких внутрішньочеревне введення патологічного

фібрилярного альфа-синуклеїну призвело через 217 днів до накопичення в нервових клітинах головного і спинного мозку фібрилярного альфа-синуклеїну і до розвитку захворювання:



Поява високомолекулярних нерозчинних фосфорильованих по серину-129 агрегатів альфа-синуклеїну в клітинах мишей, що експресують мутантний альфа-синуклеїн людини, після внутрішньочеревного введення патологічно упакованого фібрилярного альфа-синуклеїну. Де: цифри по осі ОУ позначають молекулярну масу досліджуваних білків, кДа; цифри по осі ОХ - позначають шифр досліджуваної тварини; α-synuclein fibrils - миші, в організм яких внутрішньочеревним шляхом були введені фібрили патологічно упакованого альфа-синуклеїну людини; PBS - контрольні миші, в організм яких був введений буфер; Inoculum - характер впливу на експериментальних мишей; Animal ID - шифр тварини; Brain - клітини головного мозку; Spinal cord - клітини спинного мозку; Actin - білок актин, який використовували в якості контролю; monomer - мономер альфа-синуклеїну; phosphorylated α-synuclein (EP1536Y) - фосфорильований по залишку серину-129 полімерний альфа-синуклеїн (виявлення такого альфа-синуклеїну на платівці гелю свідчить про те, що хворі миші накопичують високомолекулярні агрегати фосфорильованого альфа-синуклеїну в клітинах головного і спинного мозку (за Breid et al., 2016).

5) На підставі отриманих даних, зробіть висновок про можливість розвитку в організмі тварини патологій нервової системи після внутрішньочеревної ін'єкції або ін'єкції в язик патологічно упакованого фібрилярного альфа-синуклеїну: _____.

6) Який можливий механізм розмноження патогенних форм білка альфа-синуклеїну в клітинах мозку? _____.

7) Випадки зараження хворобою Паркінсона від людини до людини - не відомі. Однак, дослідження, проведені колективом вчених на мишах, свідчать про те, що потрапляння в організм неправильно упакованого фібрилярного альфа-синуклеїну здатне спровокувати розвиток дегенеративних процесів в центральній нервовій системі. Поясніть, чому у мишей, з гіперекспресією мутантного гена альфа-синуклеїну людини, ін'єкція неправильно упакованого альфа-синуклеїну здатна викликати розвиток хвороби Паркінсона, тоді як від людини до людини - ця хвороба не передається (через шприци і т.н.). За яких умов можливе зараження хворобою Паркінсона однієї людини від іншої при ін'єкційному потрапленні патогенного фібрилярного білка всередину організму? _____.

8) Проведені експерименти показали, що миші, у яких гіперекспресується мутантний ген людського білка альфа-синуклеїну, в звичайних умовах не хворіють на синдром Паркінсона. Розвиток захворювання провокується потрапленням в нейрони таких мишей патогенно-упакованого фібрилярного альфа-синуклеїну. У зв'язку з вище викладеним, чи є

справедливим твердження, що для розвитку хвороби Паркінсона достатньою є експресія в нейронах мутантного гена альфа-синуклеїну або гіперекспресія здорового гена? _____

*NB! Мутації в гені білка альфа-синуклеїну сприяють агрегації мономерів альфа-синуклеїна в полімерні фібрили. Однак, для ініціації цього процесу, необхідна нуклеація таких агрегатів. І цей процес відбувається дуже повільно. Для нуклеації формування фібрилярних агрегатів з мономерів білків альфа-синуклеїну - підходять ліпідні везикули, вже сформовані фібрили цього білку і т.н. При цьому здатність ліпідних мембран ініціювати нуклеацію фібрил альфа-синуклеїну багато в чому залежить від ліпідного складу цих мембран. Значення має також клітинний рН і т.н. Тобто, для розвитку патологічного процесу мало появи місенс-мутації в гені альфа-синуклеїну. Необхідна зміна параметрів функціонування нейронів (зокрема, зміна ліпідного складу мембран, зміна кислотності внутрішньоклітинного середовища і т.н.). Однак, якщо вже з'явилися фібрилярні агрегати альфа-синуклеїну - то, потрапляючи з клітини в клітину, вони, будучи центрами нуклеації, промотують рост патологічних фібрил в інших клітинах і тканинах (за Flagmeier et al., 2016).

Контрольні питання:

1. Структура білків.
2. Причини появи порушень в структурі білків. Білки-шаперони.
3. РНК-шаперони.
4. Пріонні захворювання.
5. Методика виявлення чинників, які впливають на процеси само-упакування білків після їх денатурації.
6. Дегенеративні захворювання нервової системи, пов'язані з накопиченням в нейронах нерозчинних білків. Пріонопатії. Синуклеїнопатії.

Література:

Banerjee D., Sanyal S. Protein folding activity of the ribosome (PFAR) - a target for antiprion compounds // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6(10). – P. 3907 - 3924. doi: 10.3390/v6103907.

Breid S., Bernis M.E., Babila J.T., Garza M.C., Wille H., Tamguney G. Neuroinvasion of α -Synuclein Prionoids after Intraperitoneal and Intraglossal Inoculation // *J. Virol.* – 2016. – Vol. 90(20). – P. 9182 – 9193. doi: 10.1128/JVI.01399-16.

Flagmeier P., Meisl G., Vendruscolo M., Knowles T.P., Dobson C.M., Buell A.K., Galvagnion C. Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – Vol. 113(37). – P. 10328 - 10333. doi: 10.1073/pnas.1604645113.

Ізоформа білка – це будь-яка з декількох різних форм одного і того ж білка. Різні форми одного і того ж білка можуть бути закодовані в споріднених генах (різні алелі одного і того ж гена) або можуть виникнути з одного гена шляхом альтернативного сплайсингу його РНК-транскриптів. Велика кількість ізоформ білків викликана одонуклеотидним поліморфізмом - невеликими генетичними відмінностями між алелями одного і того ж гена. Наприклад, на сьогоднішній день в геномі людини виявлено 8 ізоформ білків альфа-тубулінів, 9 ізоформ білків бета-тубулінів і т.н.

Різні ізоформи білків експресуються на різних стадіях онтогенетичного розвитку організму і в різних тканинах і органах. Організми, які мешкають в різних умовах, часто характеризуються експресією різних ізоформ одних і тих же білків.

Методи виявлення експресії різних ізоформ білків. Для виявлення того, яка з ізоформ білка експресується в даних тканинах або у даного організму, з клітин виділяють усі білки, розділяють їх за допомогою двомірного гель-електрофорезу. Потім, за допомогою антитіл, на платівці гелю виявляють білок-інтересу, вирізають його із гелю, екстрагують і, помістивши в прилад-секвенатор, - встановлюють амінокислотну послідовність білка. На заключному етапі, перекодуючи амінокислотну послідовність в послідовність нуклеотидів, встановлюють, експресія якого з алельних генів має місце в даному організмі (або в даній тканині і т.н.).

Можливий також аналіз ізоформ білків, що експресуються, за допомогою дослідження РНК-транскриптів: з клітин виділяють всю РНК, переводять її в кДНК і потім: а) або секвенують дану кДНК; б) або за допомогою ДНК-мікročіп аналізу встановлюють, які з алелей генів експресуються в клітинах даного типу (або даного організму).

Завдання 1. Адаптація організмів до різних температурних умов проживання забезпечується точковими замінами амінокислот в ізоформах білків, що експресуються.

Мікротрубочки - це природні гетерополімери, утворені в результаті з'єднання між собою молекул альфа- і бета-тубулінів. У геномах еукаріот виявлено велику кількість алелей генів альфа- і бета-тубулінів, які відрізняються за первинною амінокислотою послідовністю.

Відомо, що мікротрубочки є дуже чутливими до низьких температур. Дослідники припустили, що мікротрубочки антарктичних риб здатні полімеризуватися при дуже низьких температурах (при - 1,8⁰С) завдяки експресії в їх клітинах ізоформ тубулінів, відмінних від ізоформ тубулінів організмів, що мешкають в помірних кліматичних умовах.

1) Опишіть, за допомогою якого методу можна встановити, яка ізоформа білка експресується в тканинах даного організму? _____

2) Результати аналізу амінокислотних послідовностей різних ізоформ білків-тубулінів, які експресуються в клітинах антарктичних риб, наведені в таблиці (за Detrich H.W. 3rd et al., 2000). У таблиці для порівняння наведені дані для атлантичної тріски (*Gadus morhua*), мікротрубочки якої при температурі 0⁰С деполімеризуються (за Modig et al., 1994).

Таблиця. Порівняння амінокислотних послідовностей різних ізоформ бета-тубулінів двох антарктичних риб *Notothenia coriiceps* (NcTbβ) і *Chionodraco rastrorpinosus* (CrTbβ) з послідовностями бета-тубулінів атлантичної тріски (Codβ) (за Detrich H.W. 3rd et al., 2000).

Ізоформа тубуліна:	Положення амінокислотного залишку в ланцюзі:							
	37	128	202	269	280	285	335	431 і С-кінець молекули:
NcTbβ1	H	G	F	I	G	S	A	EEEGEFEEEEGEYEDGA
NcTbβ2	Q	S	F	M	S	A	V	EEEGEFEDEGE-EDLA

NcTbβ3	H	S	F	M	S	S	V	EEEGEFEEEEGE-EDLA
NcTbβ4	Q	N	F	M	S	A	V	DEMGGEYEEDEIEDEEEVRHDVRH
CrTbβ2	Q	S	F	M	S	A	V	EEEGEFEDEGE-EDLA
CrTbβ5	?	?	F	M	S	S	V	EEEGEFEDEGE-EELA
Codβ1	H	S	Y	M	S	S	V	EEEGEFEEEEGE-EELA
Codβ2	N	S	F	M	S	A	Y	DEEGEFDEEAE-ED-G
Codβ3	V	N	Y	M	S	A	V	EEEENFDEEAD-EEIA

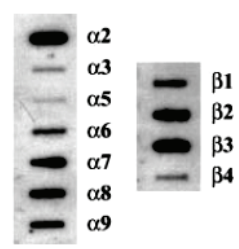
Латинські абрєвіатури амінокислот: A, alanine - аланін; C, cysteine - цистеїн; D, aspartate - аспарат; E, glutamate - глутамат; F, phenylalanine - фєнілаланін; G, glycine - гліцин; H, histidine - гістидин; I, isoleucine - ізолейцин; K, lysine - лізин; L, leucine - лейцин; M, methionine - метіонін; N, asparagine - аспарагін; P, proline - пролін; Q, glutamine - глутамін; R, arginine - аргїнін; S, serine - серин; T, threonine - треонін; V, valine - валін; W, tryptophan - триптофан; Y, tyrosine - тирозин.

3) Порівняйте амінокислотні залишки в ізоформах білків бєта-тубулінів-1 у антарктичної риби *Notothenia coriiceps* і в атлантичної трїски. Вкажіть амінокислотні заміни, що відрізняють бєта-тубулін-1 антарктичних риб від аналогічних тубулінів атлантичної трїски _____.

4) Порівняйте амінокислотні залишки в ізоформах білків бєта-тубулінів-2 у антарктичних риб і у атлантичної трїски. Вкажіть амінокислотні заміни, що відрізняють бєта-тубулін-2 антарктичних риб від аналогічних тубулінів атлантичної трїски _____.

5) Порівняйте амінокислотні залишки в ізоформах білків бєта-тубулінів-3 у антарктичної риби *Notothenia coriiceps* і в атлантичної трїски. Вкажіть амінокислотні заміни, що відрізняють бєта-тубулін-3 антарктичних риб від аналогічних тубулінів атлантичної трїски _____.

6) Зробіть висновок про можливу причину стійкості мікротрубочек антарктичних риб до низьких температур в порівнянні з мікротрубочками риб, що мешкають в помірних широтах Атлантики _____.

	<p>Експресія різних ізоформ білків-тубулінів в клітинах мозку антарктичних риб <i>Notothenia coriiceps</i> (за Detrich H.W. 3rd et al., 2000).</p>
---	--

7) Антарктичні риби є організмами резистентними до низьких температур - їх тубуліни здатні полімеризуватися в мікротрубочки при $-1,8^{\circ}\text{C}$. Атлантична трїска - організм толерантний до низьких температур: тубуліни цих риб полімеризуються при температурі $+8^{\circ}\text{C}$. Тубуліни теплокровних організмів - птахів і ссавців - не здатні полімеризуватися при температурах нижче $+20^{\circ}\text{C}$.

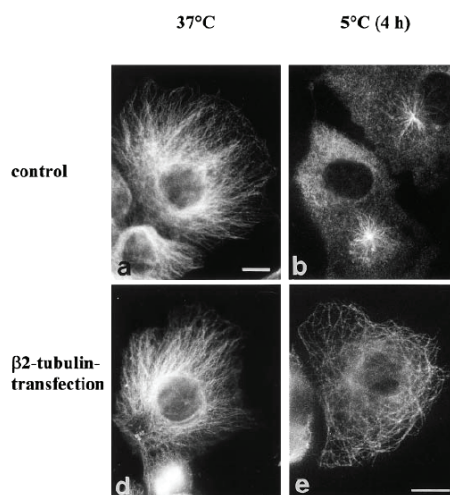
Стійкість мікротрубочек до деполімеризації в умовах низьких температур може бути пов'язана з особливостями самого тубуліну, з характером його пост-трансляційних модифікацій, з особливостями білків, асоційованих з мікротрубочками і т.н.

Modig C. з колегами (2000) припустили, що різна чутливість мікротрубочек до низьких температур у толерантних організмів (атлантична трїска) і чутливих організмів (ссавці) - теж пов'язана з експресією різних ізоформ тубулінів, як і для випадку з антарктичними рибами, резистентними до низьких температур. Для підтвердження даної

гіпотези, дослідниками була проведена трансфекція клітинної лінії людини НерG2 бета-1 і бета-2 тубулінами атлантичної тріски.

Проаналізуйте результати, представлені на рисунку. Що відбувається з кортикальними мікротрубочками в клітинах людини НерG2 при холоддовому стресі (+5⁰С, 4 години)? _____ . Що відбувається при холоддовому стресі з гібридними кортикальними мікротрубочками (мікротрубочки, які збираються з тубулінів як людини, так і атлантичної тріски, внаслідок трансфекції клітин НерG2 генами бета-2-тубуліну тріски) _____ . На підставі отриманих результатів зробіть висновок про те, яка з можливих причин стійкості мікротрубочок тріски до низьких температур підтверджується даними експериментом?

***Трансфекція** – це процес введення нуклеїнової кислоти в клітини еукаріот невірусним методом. Аналогічний процес у прокаріотів називається трансформацією. Трансфекція зазвичай включає утворення в плазматичній мембрані отворів, через які всередину клітини може проникати позаклітинний матеріал. Трансфікованим може бути генетичний матеріал, такий як ДНК або РНК, а також білки, наприклад, антитіла. Для трансфекції часто використовують сильне електричне поле (електропорація) або електростатично заряджені ліпіди, здатні до утворення ліпосом, структур, які зливаються з мембраною, внаслідок чого всередину клітини потрапляє вміщений в ліпосомі генетичний матеріал. Відомі й інші методи трансфекції (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).



Формування мікротрубочок при різних температурах навколишнього середовища (+37⁰С, +5⁰С, 4 h) в нетрансформованих і в трансформованих геном бета-2-тубуліну атлантичної тріски клітинах людини НерG2. Де: control - контроль, клітини не трансформовані геном бета-2-тубуліну; β2-tubulin transfection - клітини НерG2, трансформовані геном бета-2-тубуліну атлантичної тріски. 1 бар = 10 мм. Мережа цитоплазматичних мікротрубочок в контрольних (не трансформованих) клітинах людини при температурі + 5⁰С деполімеризується, тоді як в трансформованих клітинах - зберігається (за Modig et al., 2000).

8) Для підтвердження гіпотези про ключову роль ізоформ тубулінів у формуванні холодостійкості мікротрубочок, Modig С. з колегами (2000) були проаналізовані сиквенси бета-тубулінів, що експресуються в клітинах мозку атлантичної тріски, в порівнянні з сиквенсом бета-IVb тубулінів людини (див. рис.). Використовуючи результати сиквенсу, порухайте, скільки амінокислотних замін було виявлено між:

Codβ1 тубуліном тріски і Human βIV тубуліном людини _____

Codβ2 тубуліном тріски і Human βIV тубуліном людини _____

Codβ3 тубуліном тріски і Human βIV тубуліном людини _____.

Між якими ізоформами бета-тубулінів людини і тріски кількість виявлених відмінностей є найбільшою? _____ Найменшою? _____.

Human β_{1Vb}	MREIVHLLQAGQCGNQIGAKFWEVIVSDEHGDIDPTGTGTYHGSDLLQLERINVVYNEATGGKYVPRAVLVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNDFVFGQSGAGNN	100
Cod $\beta 1$D.....S.....A...V.....	
Cod $\beta 2$S.N.....D.S.....S.....I.....	
Cod $\beta 3$T.....N.V...V...A...NL.SSN.....T...L...I.....	
Human β_{1Vb}	WAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKEAESDCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMNTFSVVPSPKVSQDTVVEPYNATLSVHQIIVENTDETY	200
Cod $\beta 1$	
Cod $\beta 2$F.....	F
Cod $\beta 3$E.....C.N.....Q.....S...M.....A...	
Human β_{1Vb}	CIDNEALYDICFRTLKLTPTTYGDLNHLVLSATMSGVITCLRFPGLNADLRKLAVNMVFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPPELTQQMFDKNNM	300
Cod $\beta 1$S.....S.....G....	
Cod $\beta 2$V.....	
Cod $\beta 3$I..S.....A.....S.....V..S....	
Human β_{1Vb}	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKSSYFVWEVIPNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLLHWYTG	400
Cod $\beta 1$I.....A.....	
Cod $\beta 2$D.....AV.....	
Cod $\beta 3$T...Q.....V...VA.....I.....S.....F...	
Human β_{1Vb}	EGMDEMFEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEBEEGFEEEEEEVA	445
Cod $\beta 1$G...L. 445	
Cod $\beta 2$D...D...DG- 444	
Cod $\beta 3$EN.D...D..I. 445	

Результати сиквенсу бета-тубулінів, які експресуються в клітинах мозку атлантичної тріски, в порівнянні з сиквенсом бета-IVb тубулінів людини. Справа вказано положення амінокислоти в сиквенсі. Аналіз сиквенсів показав, що бета-тубуліни-1 і 2 атлантичної тріски дуже схожі за структурою з бета-1 і 4-тубулінами птахів і людини (97% ідентичності) (за Modig et al., 2000).

9) Якою є основна причина відмінностей у холодостійкості мікротрубочок між організмами чутливими (людина), толерантними (тріска) і резистентними (антарктичні риби) до низьких температур? _____.

Контрольні питання:

1. Поняття про ізоформи білків.
2. Методи виявлення експресії різних ізоформ білків.
3. Роль різних ізоформ білків в адаптації організмів до умов навколишнього середовища.
4. Метод трансфекції.

Література:

Detrich H.W. 3rd, Parker S.K., Williams R.C.Jr., Nogales E., Downing K.H. Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the alpha- and beta-tubulins of Antarctic fishes // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275(47). – P. 37038 - 37047.

Modig C., Wallin M., Olsson P.E. Expression of cold-adapted beta-tubulins confer cold-tolerance to human cellular microtubules // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – Vol, 269(3). – P. 787 - 791.

Посттрансляційна модифікація білка – це ковалентна хімічна модифікація білка після його синтезу на рибосомі. Для багатьох білків посттрансляційна модифікація виявляється завершальним етапом біосинтезу, який є частиною процесу експресії генів. Поряд з альтернативним сплайсингом, посттрансляційні модифікації збільшують різноманітність білків в клітині.

На сьогоднішній день відомо більше двохсот варіантів посттрансляційної модифікації білків, і, по всій видимості, модифікаціям піддається переважна більшість білків, більш того, один і той же білок може піддаватися кільком різним модифікаціям. Посттрансляційні модифікації здійснюють різний вплив на білки: регулюють тривалість їх існування в клітині, ферментативну активність, взаємодії з іншими білками. У ряді випадків посттрансляційні модифікації є обов'язковим етапом дозрівання білка, в іншому випадку він виявляється функціонально неактивним. Наприклад, при дозріванні інсуліну і деяких інших гормонів необхідний обмежений протеоліз поліпептидного ланцюга, а при дозріванні білків плазматичної мембрани - глікозилювання.

Посттрансляційні модифікації можуть бути як досить поширеними, так і рідкісними. Так, глікозилювання є однією з модифікацій, що зустрічаються найбільш часто: вважається, що близько половини білків людини глікозилювано, а 1-2% генів людини кодують білки, пов'язані з глікозилюванням. До рідкісних модифікацій відносять тирозилування/детирозилування і полігліцилювання тубуліна.

Виключне значення посттрансляційних модифікацій для нормального функціонування організму підтверджується тим, що існують захворювання, в основі яких лежить порушення системи посттрансляційної модифікації білків (муколіпідоз, хвороба Альцгеймера, різні види раку).

Модифікації головного ланцюга, що включають розщеплення пептидного зв'язку: видалення N-кінцевого залишку метіонину, обмежений протеоліз. Приєднання невеликих хімічних груп: N-ацилювання, N-аргінілювання, C-амідування. Приєднання гідрофобних груп для локалізації в мембрані: N-мірістоїлювання, приєднання глікозилфосфатидилінозитолу (GPI).

Модифікації бічних ланцюгів амінокислот. Приєднання чи відщеплення невеликих хімічних груп: глікозилювання, N-глікозилювання, O-глікозилювання, гідроксилування, ацетилювання, метилювання, γ -карбоксилування, O-сульфонування, фосфорилування, йодування, окислення, глікування, утворення дисульфідних зв'язків, деімінування, карбомілювання, дезамідування.

Приєднання гідрофобних груп для локалізації в мембрані: пренилювання - приєднання залишків ізопреноїдів (фарнезена і геранілгераніла), S-пальмітування. Приєднання інших білків та пептидів: убіквітування - приєднання убіквітину, сумоїлювання - приєднання SUMO (SUMO protein) (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Пост-трансляційні модифікації білків забезпечують як регулювання функцій білків, так і їх адаптацію до мінливих умов навколишнього середовища. Серед найбільш відомих пост-трансляційних модифікацій білків - гідроксилування, ацетилювання, фосфорилування, тирозилування, убіквітування і т.н. Багато з цих реакцій є зворотними, що дозволяє активувати - інактивувати білок у відповідних умовах.

Наприклад, транскрипційний фактор теплового шоку (Heat shock transcription factor 1, HSF1) в нормальних умовах - репресований в формі не активного мономера за рахунок його посттрансляційних модифікацій: ацетилювання, сумоїлювання (sumoylation) і фосфорилування. В умовах протеотоксичного стресу - гомотримери HSF1 накопичуються в ядрі, зв'язуються з ДНК, стають гіпер-фосфорильованими і активують експресію генів, що відповідають за стресову відповідь (за Batista-Nascimento et al., 2011).

Наприклад, білок фактор гіпоксії (HIF) – в умовах нормальної оксигенації клітин стає убіквітованим і спрямовується на деградацію в протеасому. Однак, в умовах нестачі кисню – білок фактор гіпоксії накопичується в клітині, йде в ядро і активує роботу генів, які захищають клітини від стресу нестачі кисню.

На сьогоднішній день для вивчення посттрансляційних модифікацій білків застосовують методи мас-спектрометрії та істерн-блотинга.

Мас-спектрометрія – метод дослідження речовини, заснований на визначенні відношення маси до заряду іонів, які утворюються під час іонізації компонентів проби. Один з найпотужніших способів якісної ідентифікації речовин, що допускає також і кількісне визначення. Можна сказати, що мас-спектрометрія - це «зважування» молекул, що знаходяться в пробі.

Класифікація методів по речовині, що вивчається:

- 1) Саузерн-блот (Southern blot) - визначення послідовності ДНК в зразку.
- 2) Саувестерн-блот (Southwestern blot) - визначення білків, пов'язаних з ДНК.
- 3) Нозерн-блот - визначення послідовності РНК в зразку.
- 4) Вестерн-блот (Western blot) - визначення специфічних білків в зразку.
- 5) Істерн-блот (Eastern blotting) – визначення посттрансляційних модифікацій білків (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Метод істерн-блота. Методика істерн-блота є біохімічним різновидом вестерн-блота. Для визначення наявності пост-трансляційних модифікацій у конкретного білка - з клітин виділяють все клітинні білки і поділяють їх за допомогою двомірного гелю електрофорезу. Потім, за допомогою специфічних антитіл виявляють білок-інтересу, переносять його на нітроцелюлозні мембрани і далі - в залежності від типу використаних антитіл - виявляють різні пост-трансляційні модифікації білка-інтересу. Наприклад, використання антитіл, котрі розпізнають ацетильовані похідні білка-інтересу, - дозволяє встановити факт ацетилювання даного білка і т.н.

Завдання 1. Вплив пост-трансляційної модифікації білків-тубулінів на стійкість мікротрубочок до деполімеризації колхіцином.

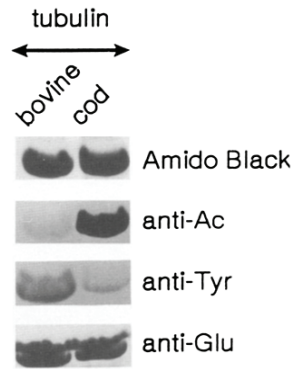
Мікротрубочки - це природні біополімери, що складаються з білків-тубулінів. Деякі природні токсини (колхіцин, вінбластин, вінкристин і т.н.) викликають деполімеризацію мікротрубочок, що порушує функціонування клітин і призводить до їх загибелі. Мікротрубочки деяких організмів виявляються стійкими до деполімеризуючого впливу антимікротрубочкових речовин. Наприклад, мікротрубочки з клітин мозку атлантичної тріски більш стійкі до деполімеризації колхіцином в порівнянні з мікротрубочками з клітин мозку бика. Причиною стійкості можуть бути різні чинники. Серед них - особливості пост-трансляційних модифікацій тубулінів різних організмів.

1) Перерахуйте, за допомогою яких методів можна виявити наявність пост-трансляційних модифікацій у білків? _____

2) В чому полягає сутність методу істерн-блота? _____

3) Результати істерн-блот дослідження білків мікротрубочок - тубулінів, виділених з клітин мозку бика і атлантичної тріски (*Gadus morhua*), наведені на рисунку. Перерахуйте, які типи пост-трансляційних модифікацій білків-тубулінів є характерними тільки для атлантичної тріски? _____

4) Якою є можлива причина стійкості мікротрубочок з клітин атлантичної тріски до деполімеризації антимікротрубочковими препаратами (колхіцином) в порівнянні з мікротрубочками з клітин бика? _____



Імуноблот білків-тубулінів мікротрубочок. Де: tubulin - білок-тубулін; bovine - бик; cod - атлантична тріска *Gadus morhua*; Amido Black - загальна кількість білків-тубулінів з усіма модифікаціями в пробі (контрольне забарвлення амідочорним після застосування специфічних антитіл проти тубуліну); anti-Ac - забарвлення антитілами проти ацетильованого тубуліну; anti-Tyr - забарвлення антитілами проти тирозильованого тубуліну; anti-Glu - забарвлення антитілами проти детирозильованого тубуліну (за Billger et al., 1991).

Завдання 2. Адаптація до зміни температури навколишнього середовища у холоднокровних організмів визначається характером пост-трансляційних модифікацій їх білків.

Холоднокровні організми спроможні пристосовуватися до досить значних коливань температури навколишнього середовища. Однак, механізми такої адаптації на молекулярному рівні - на сьогоднішній день поки мало досліджені.

1) Radermacher P.T. з колегами (2014) вивчали вплив різних температур навколишнього середовища на характер пост-трансляційних модифікацій клітинних білків, зокрема - на рівень їх ацетил-глюкозамінування у ембріонів мушки дрозофіли (*Drosophila melanogaster*). Результати досліджень наведені на рисунках А-В.

Вкажіть, яку молекулярну масу мають білки, які розпізнаються антитілами RL2 проти ацетил-глюкозамінованих клітинних білків _____.

Порівняйте на платівці гелю рівень ацетил-глюкозамінування клітинних білків при +11°C, +25°C і +29°C _____.

Використовуючи дані, наведені на гістограмі, вкажіть інтенсивність RL2-сигналу від антитіл проти ацетил-глюкозамінованих клітинних білків: при +11°C _____, при +25°C _____ і при +29°C _____.

Обчисліть, у скільки разів збільшується інтенсивність сигналу від RL2-антитіл при зростанні температур навколишнього середовища з +11°C до +25°C: _____ і з +25°C до +29°C: _____.

2) Зробіть висновок про кореляцію між рівнем ацетил-глюкозамінування клітинних білків мушки дрозофіли і температурою навколишнього середовища: _____.

3) Перерахуйте, які температури тестувалися в досліді з круглими хробаками *Caenorhabditis elegans*? _____.

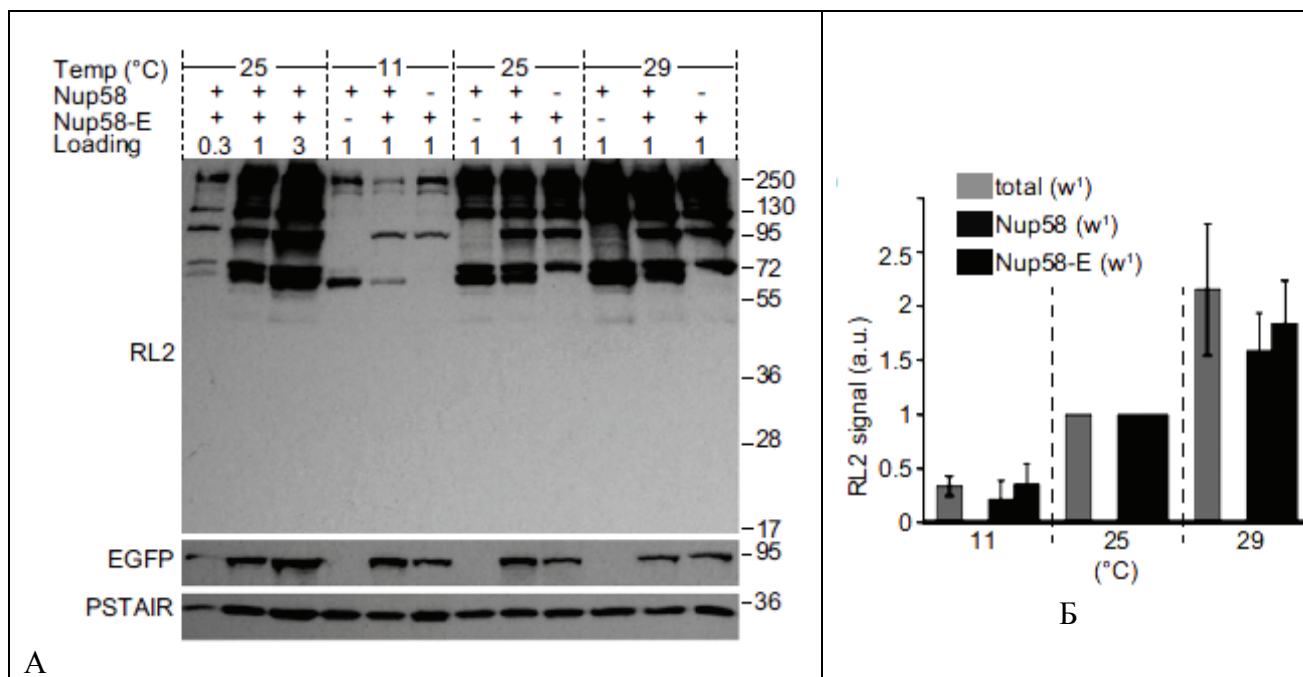
4) Вкажіть діапазон молекулярних мас білків, для яких в експерименті було виявлено ацетил-глюкозамінування _____.

5) Як змінюється рівень ацетил-глюкозамінування клітинних білків круглого хробака *C. elegans* при зростанні температур з +10°C до +28°C _____.

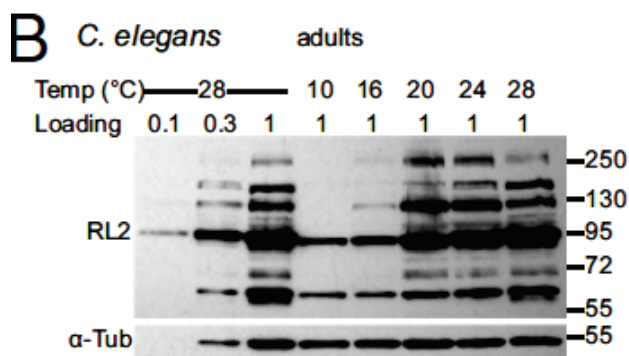
6) Radermacher P.T. з колегами (2014) виявили кореляцію між рівнем ацетил-глюкозамінування клітинних білків і температурами навколишнього середовища у мушок дрозофіл (*Drosophila melanogaster*), у круглих черв'яків (*Caenorhabditis elegans*), у риб (*Danio rerio*). Чи можна на підставі отриманих даних припустити, що зростання рівня ацетил-

глюкозамінування клітинних білків є загальною відповіддю холоднокровних тварин на зростання температури навколишнього середовища?

Аналіз інших типів пост-трансляційних модифікацій клітинних білків не виявив температуро-залежної динаміки рівня модифікування. Таким чином, баланс активності в клітинах всього двох ферментів: ферменту, що каталізує приєднання ацетил-глюкозаміну до амінокислот білків (ацетил-глюкозамінтрансферази, Ogt) і ферменту, що каталізує видалення ацетил-глюкозаміну з амінокислотних залишків білків (Oga) - здатні забезпечити адаптацію холоднокровних організмів до досить великого діапазону температур навколишнього середовища. Де: Ogt - це фермент O-linked N-acetylglucosamine transferase.



А, Б - Залежність рівня ацетил-глюкозамінування клітинних білків від температури навколишнього середовища у холоднокровних організмів (*D. melanogaster*). Для А: Temp (°C) - температура навколишнього середовища, °C; Nup58 - глікозильований білок ядерних пір з молекулярною масою 58 кДа; Nup58-E - трансгенна лінія білка Nup58; RL2 - обробка антитілами, що розпізнають ацетил-глюкозаміновані клітинні білки; PSTAIR - обробка антитілами, що розпізнають протеїн-кінази, які експресуються конститутивно (контроль); цифри по осі ОУ на гелі - молекулярна маса білка. Для Б: по осі ОХ - температура навколишнього середовища, °C; по осі ОУ - інтенсивність RL2-сигналу від антитіл проти ацетил-глюкозамінованих клітинних білків, RL2 signal (a.u.); total (w') - загальна кількість; Nups - глікозильовані білки ядерних пір; Nup58 (w') - глікозильований білок ядерних пір з молекулярною масою 58 кДа; Nup58-E (w') - трансгенна лінія білка Nup58 (за Rademacher et al., 2014).



Залежність рівня ацетил-глюкозамінування білків круглих черв'яків (*Caenorhabditis elegans*) від температури навколишнього середовища. Де: adults - дорослі особини круглих черв'яків *C. elegans*;

Temp ($^{\circ}\text{C}$) – температура навколишнього середовища, $^{\circ}\text{C}$; RL2 – обробка пластинки гелю антитілами, що розпізнають ацетил-глюкозаміновані білки; α -Tub - обробка пластинки гелю антитілами, що розпізнають клітинні білки тубуліни (контроль); цифри по осі ОУ - молекулярна маса білків, кДа; по осі ОХ - температура навколишнього середовища ($+10^{\circ}\text{C}$, $+16^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+24^{\circ}\text{C}$ і $+28^{\circ}\text{C}$) (за Radermacher et al., 2014).

Контрольні питання:

1. Поняття про пост-трансляційні модифікації білків.
2. Типи пост-трансляційних модифікацій білків.
3. Роль пост-трансляційних модифікацій білків в адаптації організмів до умов навколишнього середовища.
4. Методи вивчення пост-трансляційних модифікацій білків.

Література:

Batista-Nascimento L., Neef D.W., Liu P.C., Rodrigues-Pousada C., Thiele D.J. Deciphering human heat shock transcription factor 1 regulation via post-translational modification in yeast // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(1):e15976. doi: 10.1371/journal.pone.0015976.

Billger M., Strömberg E., Wallin M. Microtubule-associated proteins-dependent colchicine stability of acetylated cold-labile brain microtubules from the Atlantic cod, *Gadus morhua* // J. Cell Biol. – 1991. – Vol. 113(2). – P. 331 - 338.

Radermacher P.T., Myachina F., Bosshardt F., Pandey R., Mariappa D., Müller H.A., Lehner C.F. O-GlcNAc reports ambient temperature and confers heat resistance on ectotherm development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – Vol. 111(15). – P. 5592 - 5597. doi: 10.1073/pnas.1322396111.

Інтеїни. Інтеїн - це частина білка, яка здатна самовирізатися зі структури білка з подальшим з'єднанням частин протеїну, що залишилися, одна з одною (екстеїнів) в процесі т.зв. сплайсингу білка. Інтеїни іноді називають «білковими інтронами». Інтеїни були виявлені в структурі білків всіх царств органічного світу: у еукаріот, бактерій, архей і у вірусів як особливої форми життя. Мінімальна довжина відомих на сьогоднішній день інтеїнів становить 138 амінокислотних залишків, а максимальна - 844 амінокислотних залишка.

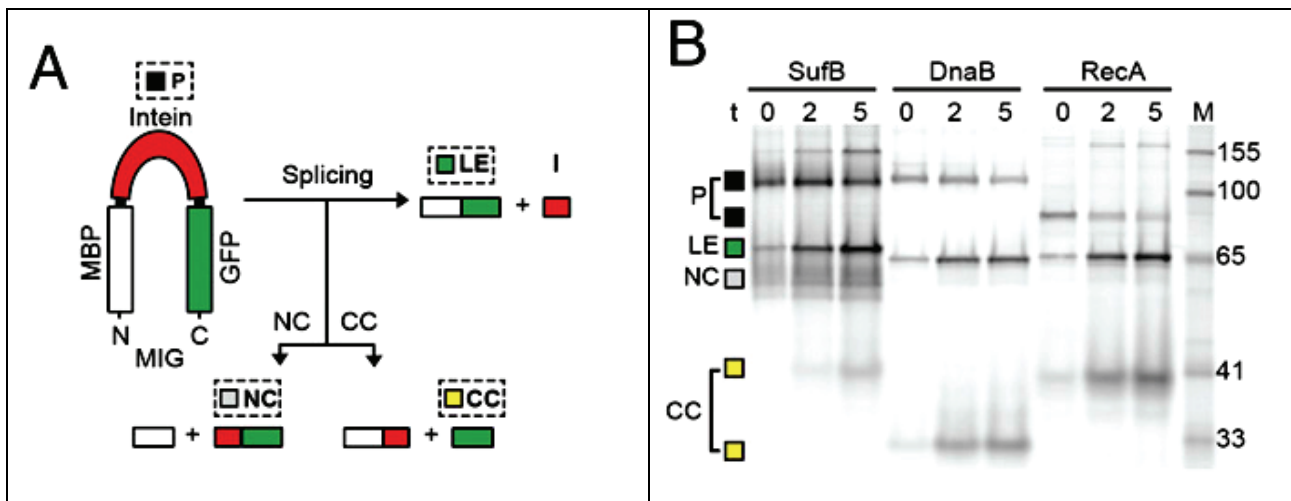
Інтеїн здатний на пост-трансляційному рівні регулювати роботу свого білка-господаря: інтеїн вбудовується в кодуєчу частину гена-господаря, а це призводить до того, що білок з вбудованим інтеїном є неактивним. Дослідження показали, що самовирізання інтеїнів відбувається, як правило, в конкретних умовах, що сприяють активуванню білка-господаря в потрібний момент часу.

Більшість інтеїнів містять у своїй структурі ендонуклеазний домен, який дозволяє їм створювати двохланцюгові розриви в ДНК гена-господаря таким чином, що в процесі репараційної конверсії генів - створюються додаткові ДНК-копії даного інтеїну в тих алелях гена, в яких вони до цього часу були відсутні (за <https://en.wikipedia.org/wiki/Intein>).

Некоректна репарація двохланцюгових розривів в гені білка-господаря, створюваних інтеїном, може призвести до розвитку патологій у організмів. Наприклад, недавно була виявлена патологія визначення статі у двох сестер (формування жіночого фенотипу при чоловічому генотипі), причиною якої стала ендонуклеазна активність інтеїна, що «живе» усередині гена DHH (ген DHH - це the desert hedgehog gene).

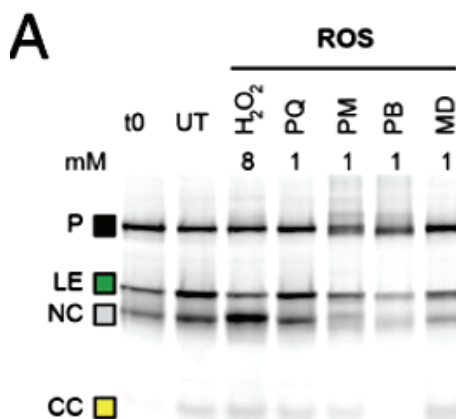
Завдання 1. Інтеїн білка SufB є сенсором оксидативного стресу у туберкульозних мікобактерій.

1) У туберкульозних мікобактерій виявлено вбудовування інтеїнів в деякі важливі гени. Використовуючи дані, наведені на рисунку 1 (за Topilina et al., 2015), перерахуйте, в які білки бактерій туберкульозної палички вбудовані інтеїни _____.



Сплайсинг деяких білків-попередників з клітин бактерій туберкульозної палички. Де: P - молекула-попередник з вбудованим інтеїном; LE - лігвані екстеїни після вирізання інтеїнів; NC і CC - продукти сплайсингу білків-попередників: NC - інтеїн і С-кінцева ділянка молекули білка-господаря; CC - просто С-кінцева ділянка молекули білка хазяїна інтеїну (при цьому інтеїн залишається приєднаним до N-кінцевої ділянки молекули білка хазяїна); по осі ОХ - час, через який моніторили проходження процесу сплайсингу білків (тобто, через 0 год, 2 год і 5 год); по осі ОУ: М - маркер мас, молекулярна маса білкових продуктів, кДа (за Topilina et al., 2015).

- 2) Яку масу мають перераховані вище зрілі білки після їх сплайсингу: _____.
- 3) Який тип продуктів утворюється після сплайсингу білка SufB _____, після сплайсингу білків DnaB і RecA _____.
- 4) Чи вищеплюються в ході сплайсингу даних білків вільні інтеїни? _____.
- 5) Про що свідчить поява слідів продуктів сплайсингу зазначених білків вже на самому початку експерименту? _____.
- 6) Про що свідчить однакова інтенсивність фарбування смуг, що відповідають білкам-попередникам і продуктам їх сплайсингу, через 2 години і через 5 годин експерименту? _____.
- 7) Використовуючи дані, наведені на рисунку, порівняйте накопичення продуктів сплайсингу білків-попередників в контрольних умовах (доріжка UT) і при впливі речовин, які продукують реактивні форми кисню (ROS). Як вплинула обробка феназин метасульфатом (доріжка PM), плюмбагіном (PB) і менадіоном (доріжка MD) на інтенсивність сплайсингу білків-попередників? _____.



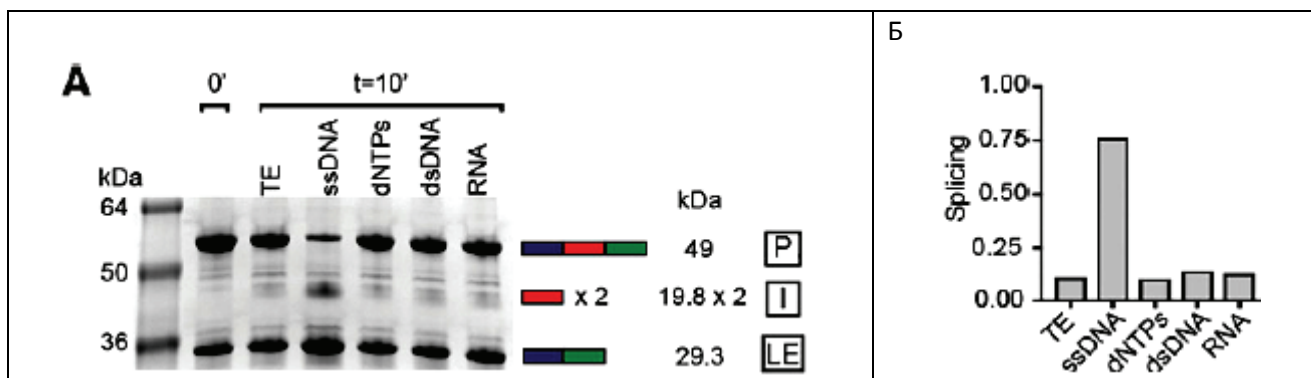
Молекули ROS (молекули реактивних форм кисню) вибірково модулюють сплайсинг білка SufB, але не інших білків туберкульозної палички: в присутності молекул ROS - сплайсинг білка-попередника сповільнюється. На рисунку наведено результат дослідження впливу 5 год обробки різними типами ROS на молекули-попередники білка SufB. Де: UT - необроблений молекулами ROS контроль; типи молекул ROS: H₂O₂ (H) - пероксид водню; paraquat (PQ) - паракват; phenazine methosulfate (PM) - феназин метосульфат, plumbagin (PB) - плюмбагін; menadione (MD) - менадіон; по осі OX - концентрація речовин, які продукують ROS, mM; P - молекула-попередник з вбудованим інтеїном; LE - ліговані екстеїни після вирізання інтеїну; NC і CC - продукти вищеплення інтеїна: NC - інтеїн і С-кінцева ділянка молекули білка-господаря інтеїну; CC - просто С-кінцева ділянка молекули білка хазяїна інтеїну (при цьому інтеїн залишається приєднаним до N-кінцевої ділянки молекули білка хазяїна інтеїну (за Topilina et al., 2015).

- 8) Зробіть висновок про вплив речовин, які продукують ROS в клітинах бактерій туберкульозної палички, на процес сплайсингу білків-попередників _____.
- 9) До яких наслідків для активності білка-попередника призводить уповільнення процесу вирізання інтеїну? _____.
- 10) Вкажіть, в якій концентрації використовувалися речовини, що індукують появу молекул ROS в клітинах бактерій _____.
- 11) Як Ви вважаєте, чому обробка H₂O₂ і PQ не вплинула на процес сплайсингу білків-попередників? _____.
- 12) У відповідь на оксидативний стрес, бактерії туберкульозної палички включають програму переходу в стан спокою. Опишіть можливий молекулярний механізм формування _____.

захисної реакції у бактерій туберкульозної палички у відповідь на оксидативний стрес, якщо відомо, що регуляторні білки, до тих пір, поки в них вбудований інтеїн, - є нефункціональними _____.

Завдання 2. Інтеїни блокують роботу свого білка до певного моменту, потім - активуються конкретним стимулом, самовирізаються і білок починає виконувати свою функцію.

Білки-рекомбінази бактерій і архей каталізують процеси гомологічної рекомбінації при двохланцюговому пошкодженні ДНК. Деякі білки-рекомбінази бактерій і архей містять у своїй структурі інтеїни. Відомо, що присутність інтеїнів - блокує функцію білка-господаря. Lennon C.W. з колегами (2016) досліджували, які чинники впливають на ініціацію самовирізання інтеїну з білка-попередника рекомбінази RadA гіпертермофільного архея *Pyrococcus horikoshii* (Pho).



Сплайсинг Pho RadA інтеїнів гіпертермофільного архея *Pyrococcus horikoshii* (Pho) стимулюється двохланцюговими розривами ДНК: молекула попередник білка RadA зв'язується з двохланцюговими розривами в ДНК, що призводить до самовирізання інтеїну і активує білок RadA. Реакційну суміш для проходження сплайсингу інтеїна інкубували протягом 10 хв при температурі +63°C, потім - білки і продукти сплайсингу розділили за допомогою електрофорезу і провели фарбування. Рівень білка-попередника (P), лігованих екстеїнів (LEs) і інтеїнів (I) вимірювали денситометрично. *NB! Молекулярний аналіз показав, що вищеплені інтеїни димеризуються. TE - контроль, буфер для ДНК з двохланцюговими розривами; ssDNA - ДНК з двохланцюговими розривами; dNTPs - дезоксинуклеотид трифосфати; dsDNA - двохланцюгова плазмідна ДНК; RNA - загальна клітинна РНК. На гістограмі - кількісні результати денситометричного аналізу проб (за Lennon et al., 2016).

- 1) Проаналізуйте дані, наведені на рисунку. Перерахуйте, дію яких факторів на інтенсивність сплайсингу білка-попередника RadA тестували дослідники? _____
- 2) Вкажіть, яку молекулярну масу має білок-попередник RadA? _____
- 3) Яку молекулярну масу має зрілий білок RadA, після вищеплення інтеїну? _____
- 4) Виходячи з отриманих даних, яку молекулярну масу повинен мати інтеїн, що був вищеплений? _____. Яку реально масу він має після вищеплення, індукованого двохланцюговими розривами ДНК (доріжка ssDNA)? _____. Як можна пояснити дворазове збільшення маси вищепленого продукту сплайсингу білка RadA, індукованого двохланцюговими розривами ДНК (ssDNA)? _____
- 5) Результати денситометричного аналізу накопичення продуктів сплайсингу білка-попередника RadA наведені на рисунку Б. Вкажіть рівень накопичення продуктів сплайсингу для контрольних умов (доріжка TE, буфер)_____, для стимулювання сплайсингу молекулами dNTPs (дезоксинуклеотид трифосфати), dsDNA (двохланцюгова плазмідна ДНК) і молекулами RNA _____

- і для ssDNA (двохланцюгові розриви ДНК) _____
- 6) Зробіть висновок про те, який з тестованих факторів активує самовирізання інтеїнів з білка-попередника RadA _____.
- 7) Чому спостерігається така принципова різниця між кількістю вищеплених інтеїнів за умови присутності різних тестованих факторів? _____
- 8) Яку роль виконують інтеїни, вбудовані в структуру свого білка-господаря? _____

Завдання 3. Вирізання інтеїнів регулює роботу білків, задіяних у бактерій *Bdellovibrio bacteriovorus* в системі взаємовідносин хижак-жертва.

Dori-Bachash M. з колегами (2009) була виявлена нова родина бактеріальних інтеїнів в структурі десяти білків у чотирьох різних видів хижих бактерій. Ці інтеїни пост-трансляційно самовирізаються зі свого білка-господаря. Виявлена нова група інтеїнів має специфічний домен (PPS-1), характерний тільки для хижих бактерій. Зокрема, білок Vd2400 синтезується в клітинах облигатно хижих бактерій *Bdellovibrio bacteriovorus*. І у структурі цього білка також був виявлений інтеїн нової родини. *NB! Хижі бактерії *Bdellovibrio bacteriovorus* ведуть вільний спосіб життя, в процесі «полювання» за здобиччю - наздоганяють бактерію-жертву, проникають у неї і, поїдаючи її з середини, завершують свій життєвий цикл розмноженням.

- 1) Вкажіть молекулярну масу білка-попередника Vd2400 _____.
- 2) Білок-попередник Vd2400 конститутивно (постійно) експресується в клітинах бделоїдних бактерій. Вкажіть, на яких фазах життєвого циклу хижих бактерій *Bdellovibrio bacteriovorus* відбувається сплайсинг білка-попередника Vd240 _____.
- 3) Однакові чи різні продукти сплайсингу утворюються в фазі AP (фаза атаки) і в ростових фазах T1, T2 і T3? _____.
- 4) Синтезується чи ні білок попередник Vd2400 в клітинах не хижої бактерії кишкової палички (доріжка ML35)? _____. Про що свідчить цей факт? _____

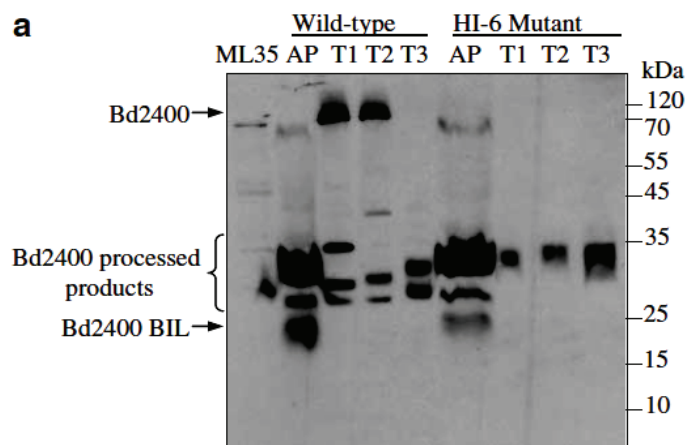
5) Порівняйте результати процесу сплайсингу білка-попередника Vd2400 в клітинах дикої лінії бделоїдних бактерій і в клітинах бактерій-мутантів, які здатні проходити всі життєві фази за межами клітини бактерії-жертви. Однакові або різні продукти сплайсингу утворюються в клітинах дикої і мутантної лінії бактерій:

- в фазі атаки _____
- в ростовій фазі T1 _____
- в ростовій фазі T2 _____
- в ростовій фазі T3 _____

6) Як Ви вважаєте, якою є причина формування різних продуктів сплайсингу в ростових фазах T1-3 у дикої бактерії, яка проходить ці фази всередині бактерії-жертви, і у мутантної бактерії, яка проходить ці етапи за відсутності бактерії-жертви _____

7) Дослідження показали, що після проникнення бделоїдних хижих бактерій всередину бактерії-жертви - метаболізм клітини бактерії-жертви радикально змінюється. Зокрема, ліпополісахариди зовнішньої мембрани частково деградують, пептидоглюкани значно хімічно модифікуються, рівень метаболізму знижується. У підсумку - бактерія-хижак виявляється в досить комфортних захищених умовах всередині клітини-жертви.

Білок Vd2400 є протеїном, що секретується з клітини бактерій *Bdellovibrio bacteriovorus*. Dori-Bachash M. з колегами (2009) припустили, що сплайсинг білка-попередника Vd2400 залучений в комплексні події взаємодії між хижакком і його жертвою. Чи згодні Ви з даним припущенням? Аргументуйте свою відповідь _____



Вестерн-блот аналіз білків *Bdellovibrio bacteriovorus* з використанням antiBIL антитіл, які розпізнають бактеріальні інтеїни. Де: Wild-type - дикий тип бактерії; HI-6 Mutant - мутантна лінія бактерії, що проходить диморфічні життєві стадії без впровадження в клітину бактерії-жертви; ML35 - білки з контрольної лінії бактерій кишкової палички; AP - фаза атаки хижої бактерії на свою жертву; T1, T2, T3 - ростові фази ініціації (T1), середини росту (T2) і фази раннього поділу бактеріальної клітини (T3); Bd2400 - білок-попередник; Bd2400 processed products - продукти процесингу білка Bd2400; Bd2400 BIL - вирізані з білка Bd2400 інтеїни; цифрами по осі ОУ вказана величина молекулярної маси досліджуваних білків і продуктів їх сплайсингу, кДа (за Dori-Bachash et al., 2009).

Контрольні питання:

1. Інтеїни.
2. Функції інтеїнів в клітинах: сенсорні функції, регуляторні функції.
3. Участь інтеїнів в розвитку патологій у організмів.

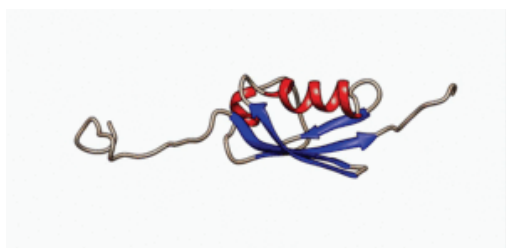
Література:

- Dori-Bachash M., Dassa B., Peleg O., Pineiro S.A., Jurkevitch E., Pietrokovski S. Bacterial intein-like domains of predatory bacteria: a new domain type characterized in *Bdellovibrio bacteriovorus* // *Funct. Integr. Genomics.* – 2009. – Vol. 9(2). – P. 153 - 166. doi: 10.1007/s10142-008-0106-7.
- Lennon C.W., Stanger M., Belfort M. Protein splicing of a recombinase intein induced by ssDNA and DNA damage // *Genes Dev.* – 2016. – Vol. 30(24). – P. 2663 - 2668. doi: 10.1101/gad.289280.116.
- Topilina N.I., Green C.M., Jayachandran P., Kelley D.S., Stanger M.J., Piazza C.L., Nayak S., Belfort M. SufB intein of *Mycobacterium tuberculosis* as a sensor for oxidative and nitrosative stresses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol. 112(33). – P. 10348 - 10353. doi: 10.1073/pnas.1512777112.

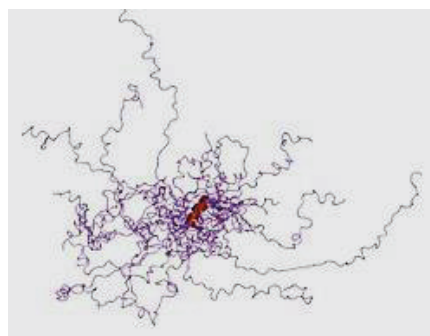
Внутрішньо неструктуровані білки (intrinsically disordered proteins). Не всі водорозчинні білки мають впорядковану просторову структуру. Досить велика кількість білків (до 40% в клітинах еукаріот) не утворюють при фізіологічних умовах жорсткої третинної структури, залишаючись неструктурованими, крім цього - до 70% білків мають у своєму складі окремі невпорядковані ділянки. Такі неструктуровані білки або окремі ділянки глобулярних білків, часто розташовані на кінцях поліпептидного ланцюга, як правило, збідненого гідрофобними амінокислотами, що робить їх невпорядкований стан енергетично більш вигідним.

До внутрішньо неструктурованих білків відноситься цілий спектр білків: від повністю неструктурованих до частково-структурованих білків. До їх складу включають: випадкові спіралі, розплавлені глобули і великі мультидоменні протеїни, пов'язані гнучкими лінкерними ділянками. Довгі внутрішньо неструктуровані сегменти характерні для 2,0% білків архей, 4,2% білків бактерій і 33% білків еукаріот.

Клітинні функції внутрішньо неструктурованих білків. Спільною рисою неструктурованих білків є їх здатність взаємодіяти з багатьма партнерами: це дозволяє таким білкам служити своєрідними платформами для збірки мультимолекулярних комплексів, виконуючи тим самим важливі функції в регуляції багатьох клітинних процесів. Часто зв'язування неструктурованого білка з іншими білками або нуклеїновими кислотами призводить до утворення певної просторової структури, яка стабілізується цими новими взаємодіями. Утворення такої структури, в свою чергу, обумовлює формування робочої поверхні, що має спорідненість до наступної макромолекули: неструктурований білок (який стає структурованим внаслідок міжмолекулярних взаємодій) спрацьовує як своєрідний перемикач, необхідний для формування мультимолекулярного комплексу, задіяного в певному регуляторному акті (за <http://worldofscience.ru/biologija/17-mikrobiologija/2169-nestrukturovannye-belki.html>).



Конформаційна гнучкість білка SUMO-1. Центральна частина молекули даного білка має відносно впорядковану структуру: одну альфа-спіраль (виділено червоним кольором) і один бета-шар (виділено синім кольором). Однак, його N- і C-термінальні ділянки є внутрішньо неструктурованими (за https://en.wikipedia.org/wiki/Intrinsically_disordered_proteins).



Розчинний тілакоїдний фосфопротеїн TSP9 має довгі внутрішньо неструктуровані ділянки поліпептидного ланцюга (за https://en.wikipedia.org/wiki/Intrinsically_disordered_proteins).

Наукова цінність відкриття внутрішньо неструктурованих білків. Відкриття внутрішньо неструктурованих білків змінило традиційну білкову структурну парадигму, згідно з якою функції білка залежать від його фіксованої тривимірної структури. Протягом останніх десятиліть ця догма поступово спростовувалася зростанням кількості доказів з різних областей структурної біології, які свідчать про те, що саме динамічність структури

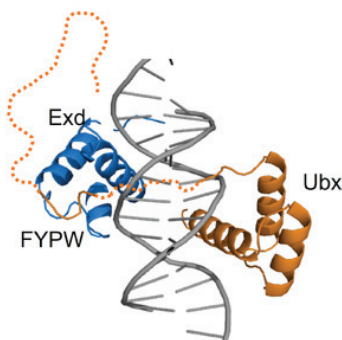
білка грає важливу роль в білок-білкових взаємодіях. Не дивлячись на відсутність внутрішньо впорядкованої структури - дані білки є найважливішою функціональною групою макромолекул в клітинах. У деяких випадках, внутрішньо неструктуровані білки здатні набувати стабільну тривимірну структуру після свого зв'язування з іншими макромолекулами клітини.

Було висловлено припущення, що гнучкість внутрішньо неструктурованих білків полегшує зв'язування даних білків з їх модифікованими білками-мішенями. Внутрішньо неструктуровані білки особливо широко представлені серед білків, задіяних в клітинній сигналізації, в транскрипції і в ремодельованні хроматину. Неструктуровані регіони часто виявляються гнучкими лінкерами або петлями контактуючих доменів білків-партнерів. Гнучкі лінкерні ділянки білків дозволяють контактуючим доменам білків-партнерів вільно обертатися один відносно одного, що забезпечує мобілізацію білка-партнера саме через динаміку протеїнових доменів.

Лінійні внутрішньо неструктуровані ділянки молекул білків задіяні в багатьох клітинних процесах: в контролі клітинної форми, в субклітинній локалізації індивідуальних протеїнів, в регульованому обороті білків і т.н. Часто пост-трансляційні модифікації білків (наприклад, такі, як фосфорилування) налаштовують афінність (іноді - на кілька порядків!) індивідуальних лінійних внутрішньо неструктурованих ділянок на специфічні взаємодії. Швидка еволюція і відносно невелика кількість структурних обмежень для встановлення нових (низько-афінних) поверхонь взаємодії роблять особливо складним виявлення таких лінійних мотивів, однак, їх значна біологічна роль і той факт, що багато вірусів мімікують свої лінійні мотиви для ефективного рекодування інфікованих клітин - створює передумови для глибокого вивчення внутрішньо неструктурованих ділянок білкових молекул.

Багато внутрішньо неструктурованих білків набувають більш впорядкованої структури після їх зв'язування зі своїми молекулами-мішенями. Внутрішньо неструктуровані ділянки деяких білків спроможні служити в якості молекулярних перемикачів в регулюванні ряду біологічних процесів за рахунок придбання ними впорядкованої структури після зв'язування з молекулою-мішенню. Наприклад, після зв'язування з малими молекулами, після зв'язування з молекулами ДНК або РНК, після приєднання іонів і т.н.

Білки, внутрішньо неструктуровані в зв'язаному стані (т.зв. нечіткі комплекси, fuzzy complexes). Внутрішньо неструктуровані білки можуть зберігати свою невпорядковану структуру (конформаційну свободу) навіть після їх специфічного зв'язування з іншими білками. У т.зв. нечітких комплексах (fuzzy complexes) структурна множинність є необхідною для їх функціонування, а маніпуляції, пов'язані з невпорядкованою областю, змінюють активність даних комплексів. Конформаційний ансамбль даних комплексів модулюється за рахунок пост-трансляційних модифікацій білків або за рахунок взаємодії з іншими протеїнами. Специфічність дії білків, що зв'язуються з молекулою ДНК, часто залежить від довжини т.зв. нечітких регіонів, яка варіює за рахунок альтернативного сплайсингу.



Приклад т.зв. нечіткого комплексу (fuzzy complexes). Внутрішньо неструктурована лінкерна ділянка (показана пунктирною лінією) фактора транскрипції Ubx (Ultrabithorax, зазначений помаранчевим

кольором) з'єднує гомеодомен даного транскрипційного фактора з гомеодоменом білка Ecd (Extradenticle, зазначено синім кольором). Альтернативний сплайсинг модулює довжину внутрішньо неструктурованої лінкерної ділянки і, таким чином, її спорідненість до ДНК (молекула ДНК вказана сірим кольором). Інші регуляторні внутрішньо неструктуровані лінкерні області білка Ubx також показані пунктирними лініями (за https://en.wikipedia.org/wiki/Fuzzy_complex).

Методи виявлення внутрішньо неструктурованих білків. Внутрішньо неструктуровані білки, після їх виділення і очищення, можуть бути виявлені за допомогою ряду експериментальних методів. Основним методом отримання інформації про неупорядковані ділянки білків - є метод ядерної магнітної резонансної спектроскопії (NMR spectroscopy). Відсутність електронної щільності в результаті проведення рентгеноструктурного аналізу (X-променевої кристалографії) також свідчить про наявність неструктурованих регіонів в молекулі білка.

Структуровані білки мають високу щільність і порівняно невеликий радіус обертання. Таким чином, неструктуровані білки можуть бути виявлені за допомогою методів, які є чутливими до розміру молекули, її щільності або гідродинамічного опору, такі як ексклюзивна хроматографія (size exclusion chromatography), аналітичне ультрацентрифугування, малокутове розсіювання рентгенівських променів, вимір константи дифузії і т.н. Неструктуровані білки також характеризуються відсутністю у них вторинної структури, що було встановлено за допомогою інфрачервоної спектроскопії, а також - за допомогою виявлення циркулярного дихроїзму дальнього ультрафіолету (170-250 nm). Неструктуровані протеїни також відкрито експонують свої скелетні пептидні групи - і тому є чутливими до дії протеаз, а також - швидко піддаються ізотопному обміну між воднем і дейтерієм і т.н.

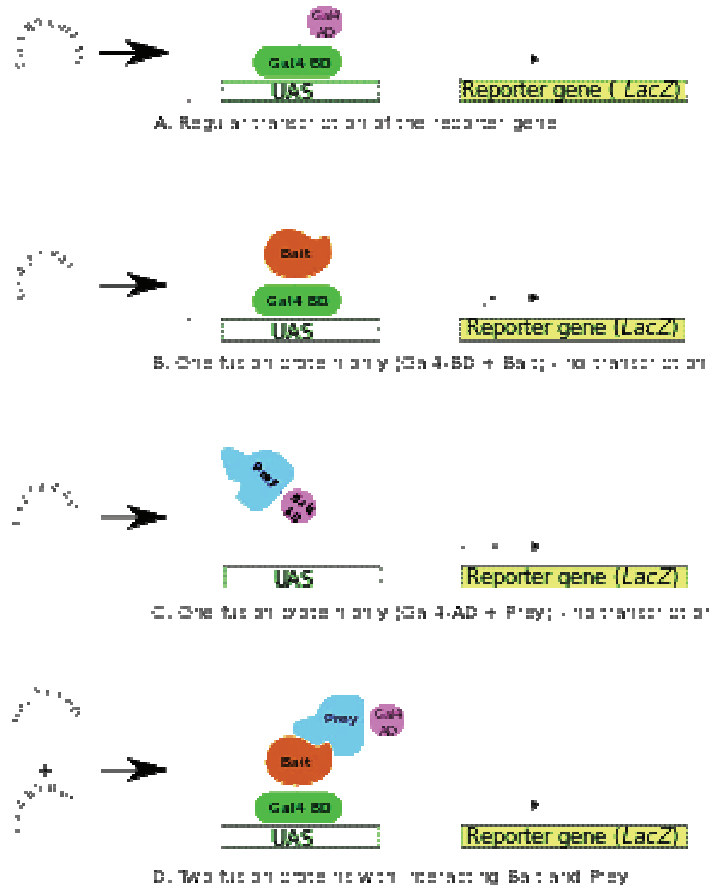
Внутрішньо неструктуровані протеїни залучені в патогенез ряду захворювань. Агрегація неупакованих білків викликає токсичний ефект в клітинах, що може призвести до розвитку неврологічних, онкологічних, серцево-судинних та інших захворювань. Наприклад, причиною розвитку синуклеїнопатій є агрегація внутрішньо неструктурованого білка альфа-синуклеїну (α -synuclein). Структурна гнучкість цього білка разом з його чутливістю до модифікацій в клітинах веде до його неправильного упакування і агрегації в великі структури всередині клітин. Генетика, оксидативний або нітратний стреси, порушення роботи мітохондрій і т.н. - спроможні вплинути на структурну гнучкість внутрішньо неструктурованого білка альфа-синуклеїну і призвести до розвитку захворювань. Багато ключових супресорів пухлин - мають великі внутрішньо неструктуровані ділянки, наприклад, білки p53 і BRCA1. Ці внутрішньо неструктуровані регіони протеїнів відповідають за утворення великої кількості міжбілкових взаємодій. Неefективність роботи внутрішньо неструктурованих ділянок цих протеїнів може бути однією з причин розвитку пухлин.

Роль природних внутрішньо неструктурованих білків у відповіді організмів на стрес. Природні внутрішньо-неструктуровані білки беруть участь у відповіді живих організмів на дію стресорів різної природи. При зневодненні організму (тварини або рослини) такі білки здатні набувати або альфа-спіральної структури, або переходити в т.зв. склоподібний стан, що дозволяє захищати клітинні макромолекули від склеювання через нестачу води в організмі. При попаданні в організм токсичних речовин - такі білки здатні активуватися і запускати захисну реакцію організму. Цілком можливо, що саме відсутність жорсткої вторинної структури дозволяє таким білкам активуватися при взаємодії з певним спектром токсичних речовин.

Двогібридний аналіз. Двогібридний аналіз - це молекулярно-біологічний метод для дослідження білок-білкових і ДНК-білкових взаємодій. Ключовим моментом в двогібридному аналізі є той факт, що у більшості транскрипційних факторів еукаріот

активуючий домен і домен зв'язування з ДНК є модульними і можуть функціонувати, будучи на невеликій відстані один від одного, тобто без необхідності безпосереднього зв'язування один з одним. Це означає, що навіть якщо транскрипційний фактор розділений на два фрагмента - він все ще залишається здатним активувати транскрипцію, не дивлячись на те, що два білкових фрагмента даного транскрипційного фактора пов'язані один з одним не прямо, а опосередковано.

Базовий компонент дріжджової двогібридної системи - це активатор транскрипції GAL4, ендогенно експресуємий білок довжиною в 881 а.з. Містить ДНК-зв'язуючий (1-147 а.з.) і активуючий (771-881 а.з.) домени. Для перевірки взаємодії між білком А і Б створюють химери А-ДНК-зв'язуючий домен (СД) і Б-активуючий домен (АТ). У складі химерних білків домени зберігають свої функції. Перебуваючи в безпосередній близькості, можливо обумовленій взаємодією між білками А і Б, відтворюється початкова функція білка GAL4, і відбувається активація репортерного гена.



Для встановлення, чи взаємодіють між собою в клітинах еукаріот два білка-інтересу А і Б, проводять дослідження в дріжджовій двогібридній системі. При цьому в клітини дріжджів вводяться два вектори. При експресії кожного з них - в клітинах дріжджів синтезуються гібридні білки: а) в першому векторі - закодований білок інтересу А з приєднаним до нього активуючим доменом транскрипційного фактора (наприклад, GAL4); б) у другому векторі - закодований білок-інтересу Б з приєднаним до нього другим доменом транскрипційного фактора - доменом зв'язування з ДНК. Якщо білки-інтересу А і Б в клітинах дріжджів взаємодіють один з одним - то це призводить до їх зв'язування. В результаті - просторово зближуються активуючий і ДНК-зв'язуючий домени транскрипційного фактора, що запускає в клітинах дріжджів експресію репортерної конструкції. Якщо білки-інтересу А і Б в клітині не взаємодіють - то експресія репортерної конструкції відсутня (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

При дріжджовому двогібридному скринінгу часто використовуються генетично модифіковані штами дріжджів, в яких біосинтез деяких поживних речовин (як правило, амінокислот або нуклеїнових кислот) відсутній. При вирощуванні на середовищах, де не вистачає цих поживних речовин, дріжджі не в змозі вижити. У мутантний штаму дріжджів

вводиться чужорідна ДНК у формі плазміди. Як правило, плазміди, що кодують АТ- і СД химерні білки вводяться в клітину окремо. Найчастіше, злитий з СД білок є заздалегідь відомим білком, до якого шукається потенційно новий партнер, і плазміда, що кодує даний химерний білок, спочатку вводиться в усі клітини. Злитий з АТ білок є або одиничним білком, або цілою бібліотекою можливих партнерів, яка може бути представлена всіма білками, які експресуються в конкретному організмі, або ж може бути отримана шляхом синтезу випадкових послідовностей ДНК. Незалежно від джерела, буде отриманий набір плазмід, які пізніше будуть трансфіковані в клітини. Методи з використанням бібліотеки припускають попадання всього однієї пари плазмід в досліджувану клітину, тим самим кожна клітина є носієм не більше одного білка з бібліотеки.

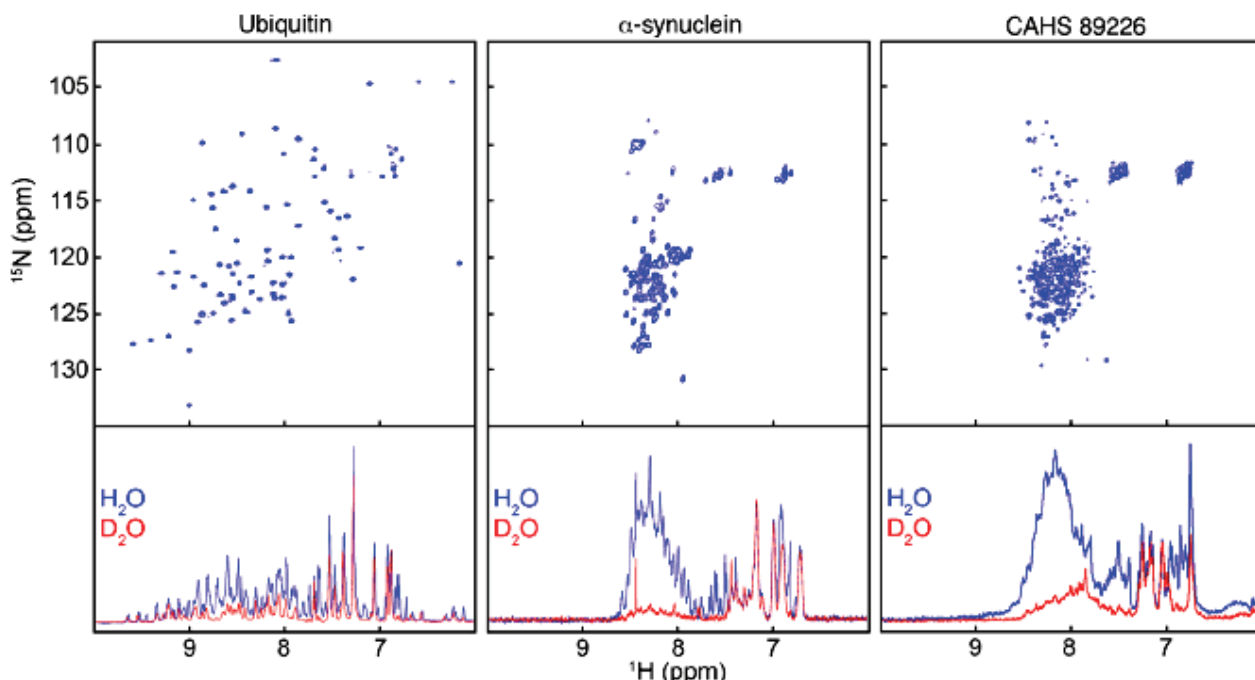
При успішній взаємодії А і Б, АТ і СД фактори стають опосередковано пов'язаними, і АТ виявляється в безпосередній близькості від сайту початку транскрипції репортерного гена. При відсутності взаємодії - відсутня і транскрипція (за <https://ru.wikipedia.org/wiki/>).

Завдання 1. Стійкість тихоходок до зневоднення організму забезпечують специфічні внутрішньо неструктуровані білки.

Тихоходки (*Tardigrada*) – це мікроскопічні тварини, які виживають в умовах дії сильних стресорів, і, зокрема, в умовах стресу зневоднення. У багатьох організмів виживання в умовах нестачі вологи забезпечує дисахарид трегалоза, однак, в клітинах різних видів тихоходок синтез цього дисахариду або не значний, або - відсутній взагалі. Таким чином, вочевидь, тихоходки мають інший механізм самозахисту своїх клітин від зневоднення.

1) Boothby T.C. з колегами (2017) було показано, що в клітинах тихоходок синтезуються специфічні для тихоходок білки. Аналіз двомірних ^{15}N - ^1H NHSQC спектрів, проведений для білків тихоходок і деяких інших білків з відомою структурою, наведено на рисунку. Порівняйте двомірні ^{15}N - ^1H NHSQC спектри структурованого білка убіквітину, внутрішньо неструктурованого білка альфа-синуклеїну і CAHS білків тихоходок. Виходячи з отриманих даних, зробіть висновок про те, до якої групи білків - структурованих або внутрішньо неструктурованих відносяться CAHS білки тихоходок? _____.

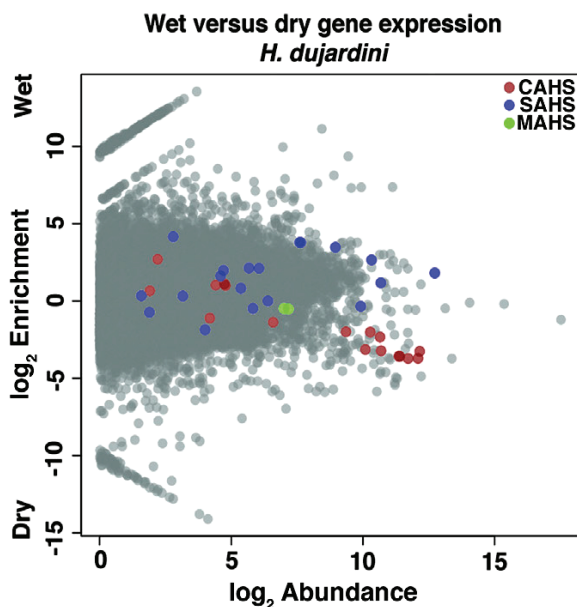
2) Що означає термін «внутрішньо неструктуровані білки»? _____.



Двомірний ^{15}N - ^1H NMR спектр: Ubiquitin - убіквітину (глобулярний білок); α -synuclein - альфа-синуклеїну (внутрішньо неструктурований білок); CAHS білки тихоходок (за Boothby et al., 2017).

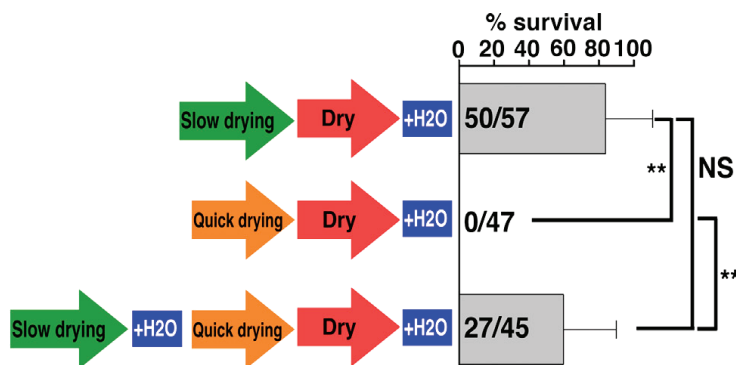
3) Результати проведеного Boothby T.C. з колегами (2017) аналізу рівня експресії виявлених у тихоходок специфічних внутрішньо неструктурованих білків наведено на рисунку. В яких умовах: зволоження, зневоднення або переходу від вологого до сухого стану рівень експресії специфічних внутрішньо неструктурованих білків тихоходок CAHS, SAHS і MAHS є максимальним і за кількістю білків, що експресуються, і за їх різноманітністю? _____

Про яку можливу роль цих білків в клітинах тихоходок свідчить виявлена закономірність? _____



Зміна інтенсивності експресії генів внутрішньо неструктурованих білків, специфічних для тихоходок *Hypsibius dujardini*, в умовах нормального зволоження (Wet), зневоднення (Dry) і переходу від вологих до посушливих умов. Кольоровими колами вказані гени CAHS (червоні кола), SAHS (блакитні кола) і MAHS (зелені кола), що кодують специфічні для тихоходок внутрішньо неструктуровані білки (за Boothby et al., 2017).

4) Використовуючи дані, наведені на рисунку, вкажіть відсоток тихоходок: а) тих, що вижили після повільного висихання і подальшої регідратації: _____; б) тих, що вижили після швидкого висихання і подальшої регідратації: _____; в) тих, що вижили після повільного висихання → регідратації → швидкого висихання → регідратації: _____.



Вживання тихоходок *Hypsibius dujardini* після повільного і швидкого висихання. Де: % survival - відсоток тихоходок, що вижили після зневоднення і регідратації організму; Slow drying - умови повільного висушування тихоходок; Dry - сухий стан; Quick drying - умови швидкого висушування тихоходок (за Boothby et al., 2017).

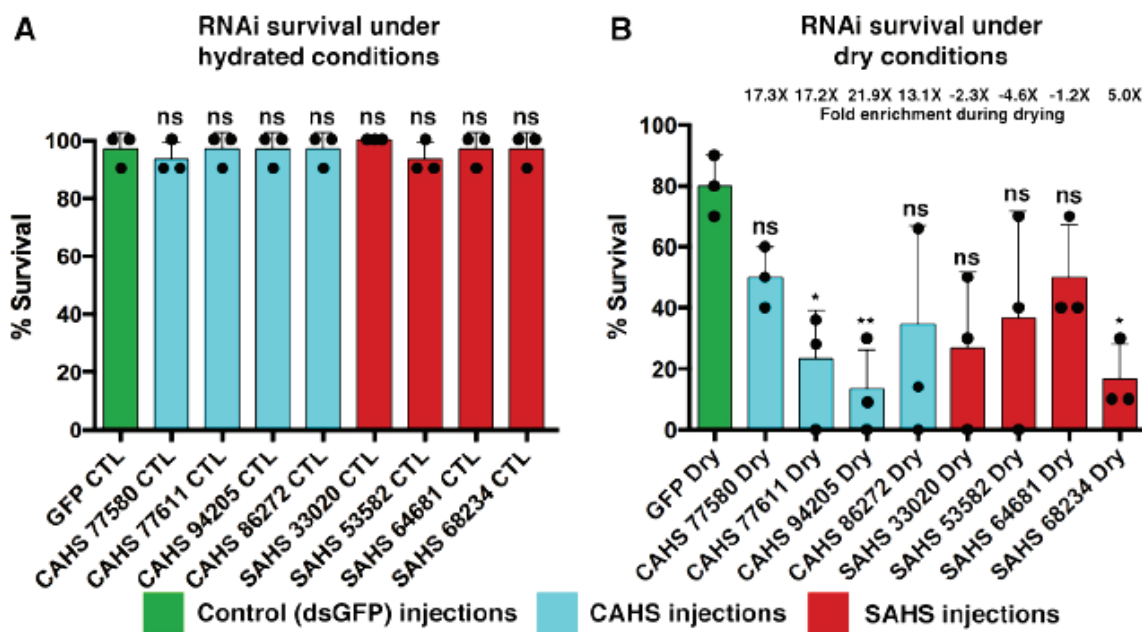
Чому після швидкого висихання і подальшої регідратації жодна з тихоходок не вижила?

5) Для підтвердження передбачуваної ролі внутрішньо неструктурованих специфічних для тихоходок білків у виживанні тихоходок в умовах зневоднення, Boothby T.C. з колегами (2017) заінгібували експресію даних білків за допомогою методу РНК-інтерференції. У чому полягає сутність методу пригнічення експресії генів за допомогою РНК-інтерференції? _____

Результати РНК-інтерференції експресії внутрішньо неструктурованих білків тихоходок CAHS і SAHS наведені на рисунку. Як вплинуло інгібування експресії білків CAHS і SAHS на відсоток виживання тихоходок в умовах нормального зволоження? _____

Як вплинуло інгібування експресії білків CAHS і SAHS на відсоток виживання тихоходок в умовах зневоднення? _____

Підтвердив чи ні даний експеримент передбачувану роль внутрішньо неструктурованих білків CAHS і SAHS в забезпеченні стійкості тихоходок до зневоднення? _____

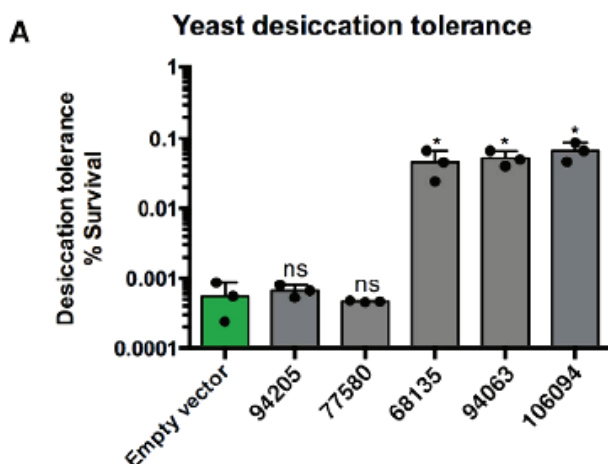


Внутрішньо неструктуровані білки тихоходок, необхідні для виживання цих тварин в умовах зневоднення. (A) і (B) - виживання тихоходок після ін'єкції дволанцюгових RNAi транскриптів наступних типів: GFP-транскриптів (контроль), CAHS-транскриптів, SAHS-транскриптів. Де: А - умови нормального зволоження, В - умови зневоднення для тихоходок *Hypsibius dujardini*. Де: RNAi survival under hydrated conditions - відсоток тихоходок, що вижили після експериментального відключення генів за допомогою РНК-інтерференції в умовах нормального зволоження; RNAi survival under dry conditions - відсоток тихоходок, що вижили після експериментального відключення генів за допомогою РНК-інтерференції в умовах зневоднення; Control (dsGFP) injections - ін'єкція двохланцюгової РНК зеленого флюоресцентного білка (контроль); CAHS injections - ін'єкція двохланцюгової РНК гена CAHS; SAHS injections - ін'єкція двохланцюгової РНК гена SAHS (за Boothby et al., 2017).

6) Високий рівень стійкості організмів до стресових факторів часто забезпечується взаємодією декількох захисних механізмів. Для виявлення вкладу внутрішньо неструктурованих білків в забезпечення стійкості організмів до зневоднення, Boothby T.C. з колегами (2017) були отримані трансгенні лінії дріжджів, які експресують різні внутрішньо неструктуровані білки тихоходок. Результати проведеного дослідження наведено на рисунку. Вкажіть відсоток клітин дріжджів, що вижили в умовах стресу зневоднення для вихідної дикої лінії дріжджів (що експресує порожній вектор): _____ і для трансгенних ліній дріжджів,

що експресують гени різних внутрішньо неструктурованих білків тихоходок: для лінії 94205: _____, для лінії 77580: _____, для лінії 68135 : _____, для лінії 94063: _____ і для лінії 106094: _____. У скільки разів відрізняється рівень виживання клітин диких і трансгенних (лінії 68135, 94063, 106094) дріжджів в умовах зневоднення? _____.

Зробіть висновок про роль внутрішньо неструктурованих білків певних груп у виживанні організмів в умовах зневоднення: _____.



Експресія генів CAHS, що кодують внутрішньо неструктуровані білки тихоходок, є достатньою для забезпечення стійкості клітин дріжджів до зневоднення. (A) Стійкість до зневоднення клітин дріжджів, що експресують CAHS гени тихоходок. По осі OY: Desiccation tolerance% Survival - відсоток клітин дріжджів, що вижили в умовах зневоднення. По осі OX - лінії дріжджів: Empty vector – клітини дріжджів, що експресують порожній вектор; 94205, 77580, 68135, 94063 і 106094 - лінії дріжджів, які експресують різні CAHS гени тихоходок (за Boothby et al., 2017).

7) Який ймовірний механізм захисту клітин від зневоднення з допомогою внутрішньо неструктурованих білків? _____

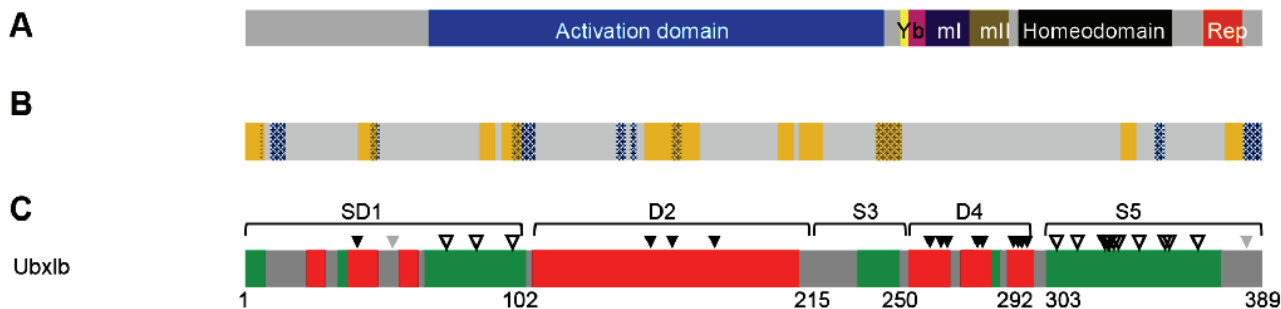
Завдання 2. Внутрішньо неструктуровані ділянки білків-транскрипційних факторів забезпечують тканинспецифічність їх дії на експресію генів.

Відомо, що взаємодії між структурними білками вимагають чіткої комплементарності їх поверхонь для забезпечення сталого зв'язування білків між собою. Однак, проведені дослідження показали, що приблизно одна третина білкових взаємодій пов'язана з внутрішньо неструктурованими областями білків. Внутрішньо неструктуровані регіони білків досить динамічні до моменту зв'язування з білком-партнером, а в деяких випадках - і після такого зв'язування. Це відкриття поставило питання про роль структурної топології молекул-партнерів у формуванні взаємодії між протеїнами.

Для встановлення того, яким чином внутрішньо неструктуровані білки коректно розпізнають своїх білків-партнерів по взаємодії, Hsiao H.C. з колегами (2014) досліджували партнерські взаємодії білка Ultrabithorax (Ubx), що відноситься до родини Нох-транскрипційних факторів мушки дрозофіли *Drosophila melanogaster*. Проведений комп'ютерний і експериментальний аналізи показали, що білок Ubx містить як структуровані, так і внутрішньо неструктуровані регіони (див. рис).

Гени родини факторів транскрипції Нох експресуються уздовж передньої/задньої осі організму під час ембріонального розвитку тварини. При цьому чинники транскрипції Нох визначають специфічність всіх тканин в межах своєї зони експресії і, отже, повинні адекватно реагувати на клітинні сигнали, щоб забезпечити правильний запуск тканинспецифічного регуляторного каскаду генів. З метою виявлення ролі різних структурованих і внутрішньо неструктурованих ділянок молекули Ubx у виконанні даними білком його функцій і, зокрема, в його взаємодії з білками-партнерами, Hsiao H.C. з колегами

(2014) були отримані мутантні лінії даного білка, дефектні по різних ділянках молекули Ubx (див. рис).



(A) Доменна організація UbxIb транскрипційного фактора. Блакитним кольором - зазначено положення домену, що активує транскрипцію; жовтим кольором - положення YPWM Exd ділянки взаємодії; чорним кольором - положення ДНК-зв'язуючого гомеодомену; помаранчевими кольором - положення домену часткової транскрипційної репресії; b element (рожевий колір), ml (фіолетовий колір) і mII (коричневий колір) - ділянки, що кодують три мікроекзона, що альтернативно сплайсуються. (B) Розташування передбачуваних ділянок взаємодії білка Ubx з іншими білками, отримані на підставі даних програм ANCHOR (жовті смужки) і MoRFpred (блакитні смужки). Ділянки, отримані на підставі результатів роботи обох алгоритмів - вказані одночасно блакитним і жовтим кольором. (C) Схематичне розташування структурованих і внутрішньо неструктурованих регіонів молекули UbxIb. Дані отримані на підставі комбінування результатів комп'ютерних і експериментальних досліджень. Дані трьох алгоритмів по встановленню внутрішньо неструктурованих регіонів молекули були усереднені і результати представлені: червоним кольором - внутрішньо неструктуровані регіони молекули, зеленим кольором - структуровані регіони молекули. Для верифікації отриманих результатів були проведені експерименти по протеолізу за допомогою трипсину - розщепленню піддаються тільки внутрішньо неструктуровані регіони молекули білка. Отримані експериментальні результати дозволили розширити межі внутрішньо неструктурованих регіонів молекули UbxIb. Ділянки, що розщеплюється трипсином, вказані чорними трикутниками; ділянки, що не розщеплюється трипсином, вказані відкритими трикутниками; ділянки, які не вдалося точно ідентифікувати, вказані сірими трикутниками (за Hsiao et al., 2014).

1) Для дослідження ролі внутрішньо неструктурованих ділянок білка Ubx в зв'язуванні з білками-партнерами, Hsiao H.C. з колегами (2014) була використана дріжджова двогібридна тест-система. У чому полягає сутність використання методу дріжджової двогібридної системи при тестуванні можливих міжбілкових взаємодій в клітинах? _____

2) Як необхідно модифікувати методіку дріжджового двогібридного аналізу для встановлення ролі окремих ділянок однієї і тієї ж білкової молекули (зокрема, білка Ubx) в зв'язуванні з білками-партнерами? _____

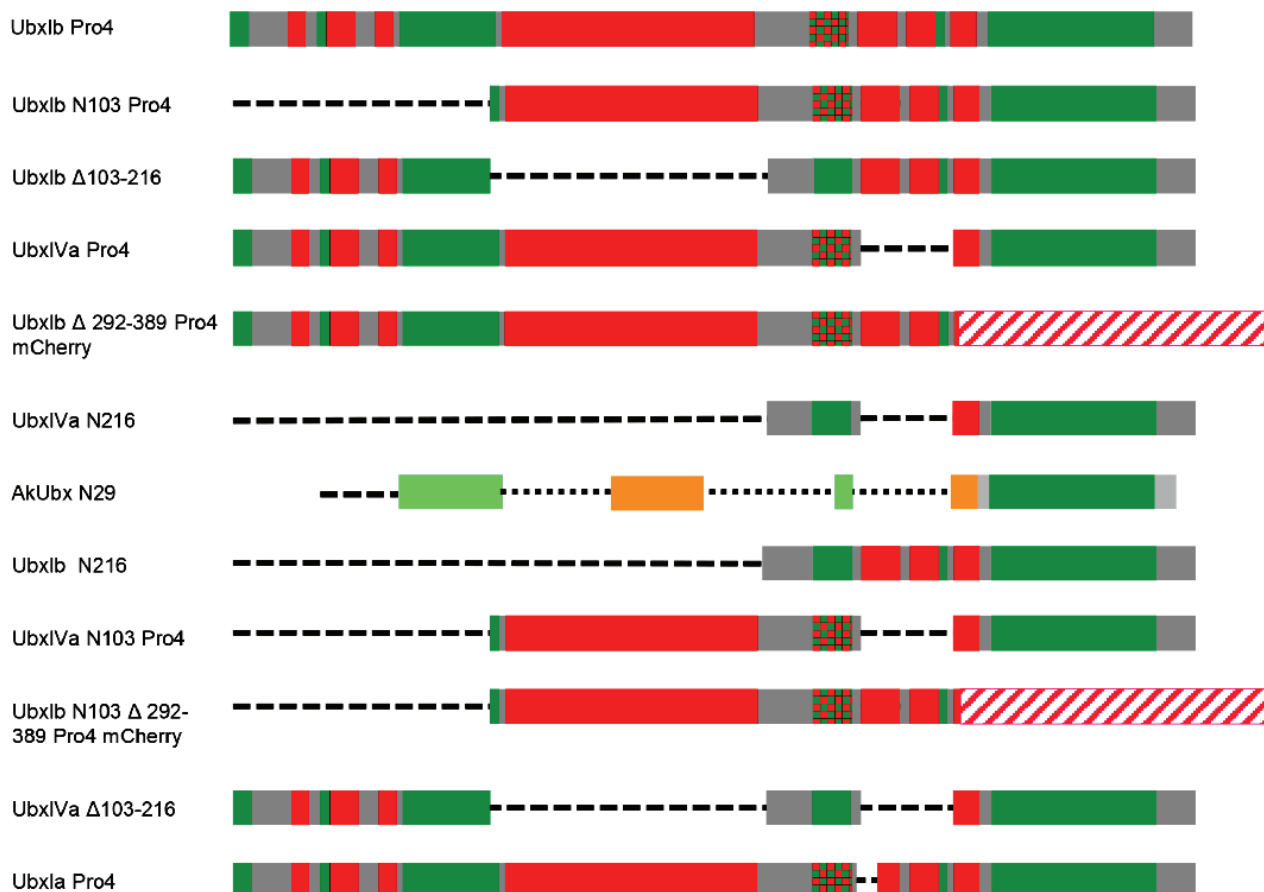
3) Результати дріжджового двогібридного аналізу взаємодії внутрішньо неструктурованих ділянок білка Ubx з білками-партнерами наведені на рисунку. *NB! У двогібридній тест-системі, якщо в клітинах дріжджів білок Ubx зв'язується з білком-партнером - то це призводить до просторового зближення двох різних доменів транскрипційного фактора, що викликає його активування і запускає експресію репортерної конструкції.

Вкажіть (в Мілерівських одиницях), як вплинула на зв'язування з білком-партнером і, як наслідок, на експресію репортерної конструкції, присутність в клітинах дріжджів мутантного білка Ubx, у якого відсутні всі внутрішньо неструктуровані ділянки молекули (лінія UbxIVa N216): _____

Як вплинула на зв'язування з білком-партнером і, як наслідок, на експресію репортерної конструкції, присутність в клітинах дріжджів примітивного білка AkUbx з клітин *Acanthokara kaputensis*, у якого природно відсутні всі внутрішньо неструктуровані ділянки молекули (лінія AkUbx N29): _____.

На підставі отриманих результатів зробіть висновок про роль внутрішньо неструктурованих ділянок в молекулі білка Ubx в його зв'язуванні з білками-партнерами: _____.

D



(D) На схемі вказані мутантні варіанти білка Ubx, використані в дріжджовій двогибридній тест-системі. UbxIb, UbxIa і UbxIVa - є ізоформами, отриманими в процесі альтернативного сплайсингу *in vivo*. Для запобігання самоактивування, домен активування білка був відключений або внаслідок видалення амінокислот на ділянці 102-216, або в результаті Pro4 мутації, в якій амінокислоти Ala і Glu були замінені на Pro в положенні 226 і 233 (вказано червоно-зеленим контуром в клітинку): ці маніпуляції запобігають формуванню альфа-спіралі, необхідної для активування транскрипції. У двох варіантах структурована С-кінцева ділянка білка Ubx була замінена на ділянку mCherry, вказану на схемі рожево-білим смугастим доменом (за Hsiao et al., 2014).

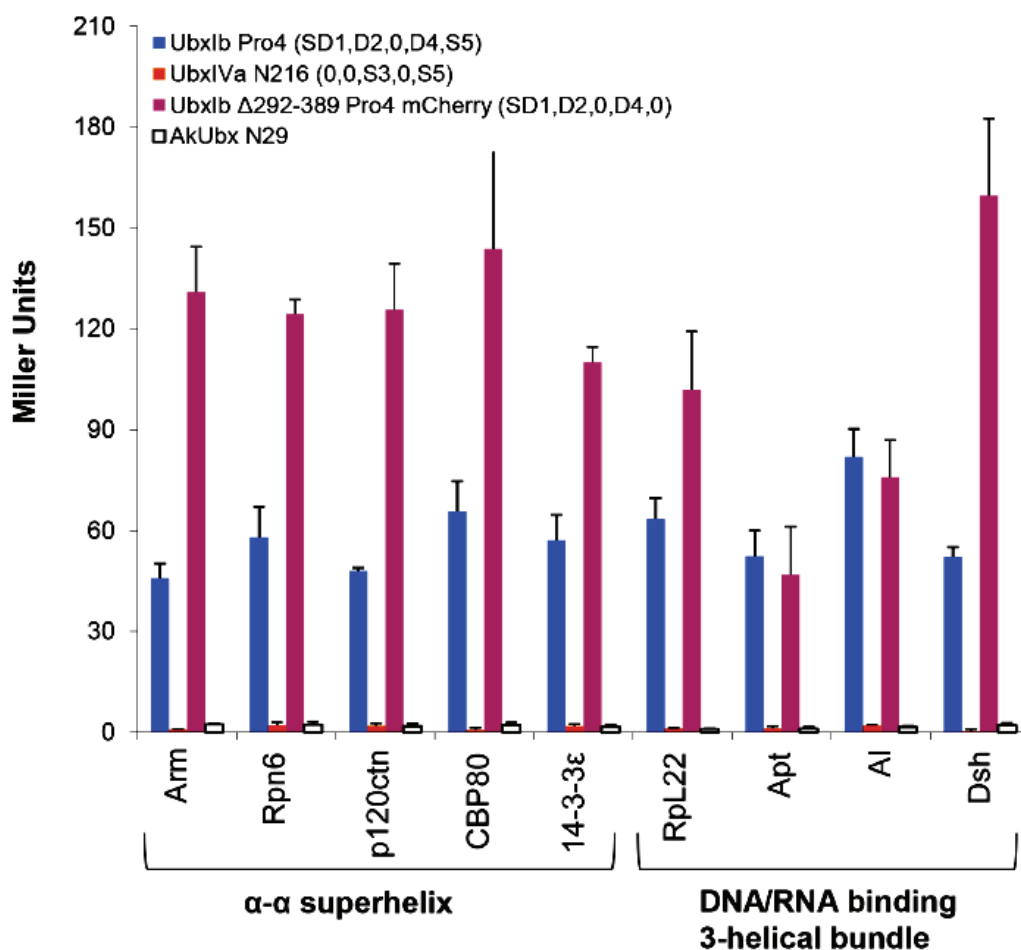
4) Білки, які взаємодіють з білком Ubx, кооперативно зв'язуються з його регіонами 1, 2 і 4. При цьому всі три регіони білка Ubx містять внутрішньо неструктуровані ділянки. Для встановлення ролі кожного з трьох регіонів білка Ubx в зв'язуванні з білками-партнерами, Hsiao Н.С. з колегами (2014) використовували дріжджову двогибридну систему, в якій протестували три мутантні лінії білка Ubx, дефектні по одному з трьох регіонів зв'язування з білками-партнерами. Результати проведених досліджень наведені на рисунку.

Вкажіть (в Мілерівських одиницях), як вплинула на експресію репортерної конструкції присутність в клітинах дріжджів білка Ubx, що має всі три регіони зв'язування з білками-партнерами (лінія UbxIb Pro 4 (SD1, D2,0, D4, S5): _____.

Як вплинула на експресію репортерної конструкції присутність в клітинах дріжджів мутантних білків Ubx, що мають тільки два з трьох регіонів зв'язування з білками-партнерами: _____.

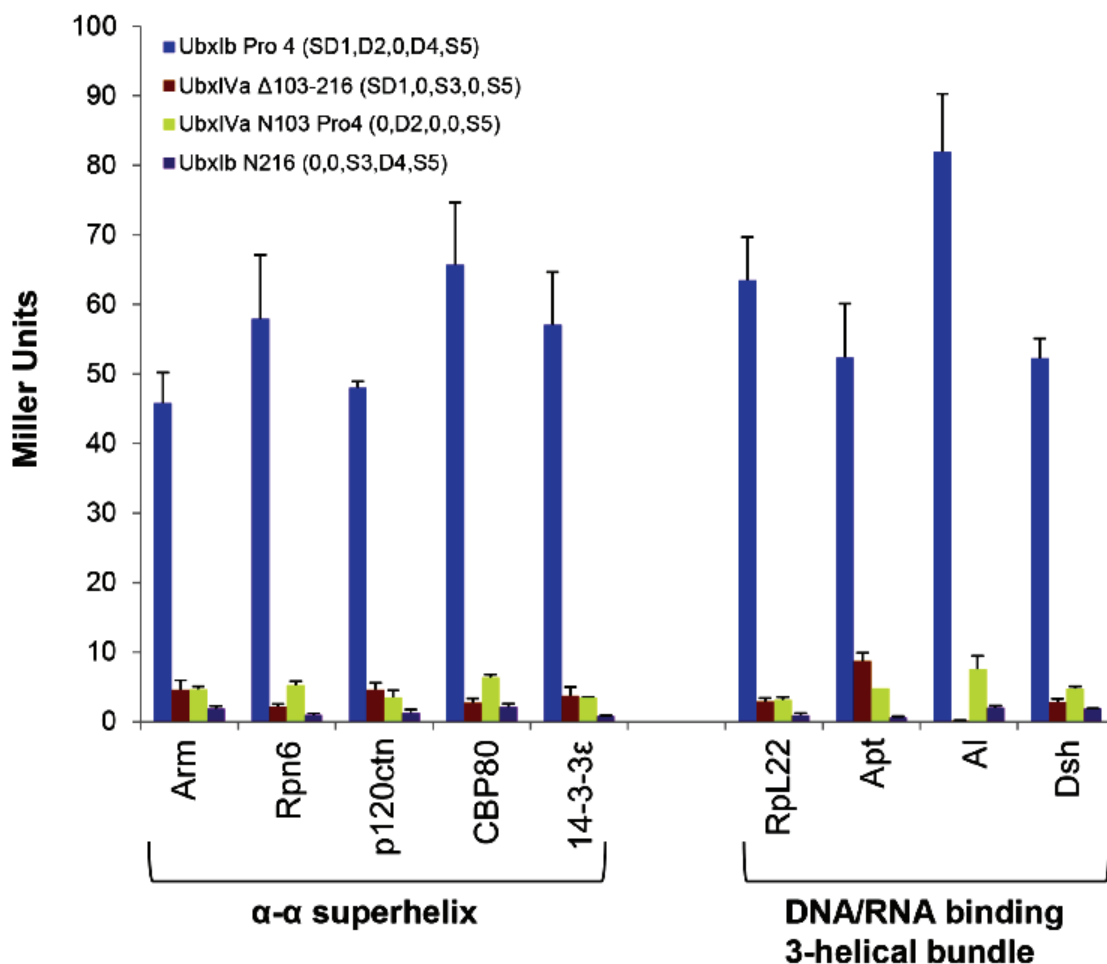
Зробіть висновок про роль всіх трьох ділянок білка Ubx в кооперативному зв'язуванні білків-партнерів: _____.

Таким чином, проведені Hsiao H.C. з колегами (2014) дослідження показали, що три внутрішньо неструктурованих регіони білка Ubx необхідні для його зв'язування з білками-партнерами. У різних тканинах організму ці регіони виявляються або альтернативно-сплайсованими, або - багаторазово фосфорильованими, забезпечуючи в клітинах тканиноспецифічну взаємодію білка Ubx зі своїми партнерами по зв'язуванню.



Внутрішньо неструктуровані регіони білка Ubx необхідні для його взаємодії з іншими молекулами. Тестування в дріжджовій двогібридній системі показало, що мутантні варіанти білка Ubx, які не мають усіх внутрішньо неструктурованих регіонів (лінія UbxIVa N216), не здатні зв'язуватися зі своїми білками-партнерами. Як і білок AkUbx - примітивний ортолог білка Ubx, отриманий з клітин *Acanthokara kaputensis*: цей ортолог природно не має більшості внутрішньо неструктурованих ділянок і також не здатний зв'язуватися з протеїнами-партнерами. По осі ОХ вказані білки-партнери білка Ubx щодо зв'язування: в регіоні α - α superhelix - альфа-альфа суперспіралі; в регіоні DNA/RNA binding 3-helical bundle - ДНК/РНК 3-альфа-спіральної ділянки зв'язування. Аббревіатури білків-партнерів для зв'язування з білком Ubx: Al, Aristaless; Apt, Apontic; Arm, Armadillo; CBP80, Car-binding protein 1; Dsh, Dishevelled; p120ctn, Adherens junction protein p120; RpL22, Ribosomal protein L22; Rpn6, Protease p44.5 subunit. Miller units - Мілерівські одиниці активності експресії репортерної

конструкції. *NB! Для запобігання самоактивації білка Ubx, Hsiao H.C. з колегами (2014) експресували в клітинах дріжджів мутантний білок UbxIb Pro4, у якого сайт самоактивування був заблокований. UbxIb Pro4 (SD1, D2,0, D4, S5) - контрольний білок, який містить всі ділянки зв'язування з білками-партнерами; UbxIVa N216 (0,0, S3,0, S5) - у даного білка видалені всі внутрішньо неструктуровані регіони; UbxIb Δ292-389 Pro4 mCherry (SD1, D2,0, D4,0) - у даного білка видалені всі структуровані регіони; AkUbх N29 - примітивний білок Ubx, природно позбавлений внутрішньо неструктурованих ділянок (за Hsiao et al., 2014).



Білки, які взаємодіють з білком Ubx, кооперативно зв'язуються з його регіонами 1, 2 і 4. При цьому всі ці регіони білка Ubx містять внутрішньо неструктуровані ділянки. Проведені дослідження показали, що жоден з внутрішньо неструктурованих регіонів білка Ubx сам по собі не є достатнім для кооперативного зв'язування з білками-партнерами. Тільки присутність всіх трьох внутрішньо неструктурованих ділянок молекули Ubx забезпечує кооперативне зв'язування білків-партнерів. Де: по осі OX - білки-партнери білка Ubx; по осі OY - активність репортерної конструкції в Мілерівських одиницях. UbxIb Pro4 (SD1, D2,0, D4, S5) - контрольний білок, який містить всі ділянки зв'язування з білками-партнерами; UbxIb N103 Pro4 (0, D2, S3, D4, S5) - у даного білка видалені структурні і внутрішньо неструктуровані елементи регіону № 1; UbxIb D103-216 (SD1,0, S3, D4, S5) - у даного білка видалений внутрішньо неструктурований регіон в ділянці № 2; UbxIVa Pro4 (SD1, D2, S3,0, S5) - у даного білка видалений внутрішньо неструктурований регіон в ділянці № 4 (за Hsiao et al., 2014).

Контрольні питання:

1. Внутрішньо неструктуровані білки.
2. Клітинні функції внутрішньо неструктурованих білків.
3. Наукова цінність відкриття внутрішньо неструктурованих білків.
4. Білки, внутрішньо неструктуровані в зв'язаному стані.
5. Методи виявлення внутрішньо неструктурованих білків.

6. Залученість внутрішньо неструктурованих протеїнів в патогенез ряду захворювань.
7. Роль природних внутрішньо неструктурованих білків у відповіді організмів на стрес.
8. Методи дослідження білок-білкових і ДНК-білкових взаємодій. Двогібридний аналіз.

Література:

Дерюшева Е.И., Селиванова О.М., Сердюк И.Н. Петли и их повторы как отпечатки молекулярной эволюции // Успехи биологической химии. – 2012. - Т. 52. - С. 177 – 202.

Boothby T.C., Tapia H., Brozena A.H., Piszkiwicz S., Smith A.E., et al. Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation // Mol. Cell. – 2017. – Vol. 65(6). – P. 975 - 984. e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.018.

Hsiao H.C., Gonzalez K.L., Catanese D.J.Jr., Jordy K.E., Matthews K.S., Bondos S.E. The intrinsically disordered regions of the *Drosophila melanogaster* Hox protein ultrabithorax select interacting proteins based on partner topology // PLoS One. – 2014. – Vol. 9(10):e108217. doi: 10.1371/journal.pone.0108217.

ДЛЯ НОТАТОК

Навчально-методичне видання

**Оксана Петрівна Кундельчук
Марина Михайлівна Сидорович**

**Молекулярна екологія. Частина 1.
Молекулярні основи функціонування організмів**

**Матеріали для підготовки до лабораторних
та семінарських занять.**

Навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавр спеціальностей 091 Біологія, 014.05 Середня освіта (Біологія), 101 Екологія денної та заочної форм навчання

ISBN 978-617-7941-04-9

Підписано до друку 22.01.2021 р. Формат 60 x 84/8.

Папір офсетний. Наклад 300 прим.

Гарнітура Times New Roman. Друк різнографія.

Ум. друк. арк. 18,18. Обл.-вид. арк. 19,55.

Замовлення № 1894.

Книжкове видавництво ФОП Вишемирський В.С.

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб'єктів видавничої справи: серія ХС № 48 від 14.04.2005 р.

видано Управлінням у справах преси та інформації.

Адреса: 73 000, Україна, м. Херсон, вул. Соборна, 2,

тел. (050) 133–10–13, e-mail: printvvs@gmail.com, vish_sveta@rambler.ru