

На правах рукописи



Ланник Наталья Ивановна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ
ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО 6-МЕТИЛУРАЦИЛА НА АКТИВНОСТЬ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ *RATTUS
NORVEGICUS***

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре генетики биолого-почвенного факультета
ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент – **Ризванов Альберт Анатольевич**

Официальные оппоненты:

Багаева Татьяна Вадимовна – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань;

Зайцев Сергей Юрьевич – доктор химических наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой органической и биологической химии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, г. Москва.

Защита состоится «26» апреля 2012 г. в 13-00 на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

Факс 8(843) 238-71-21, 233-78-40. *E-mail*: natalya.lannik@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан «__» марта 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Абрамова З.И.

Актуальность. Ацетилхолинэстераза (ацетилхолин-ацетилгидролаза, АХЭ, К.Ф. 3,1,1,7) – фермент семейства сериновых гидролаз, играющий ключевую роль при передаче возбуждения в центральной и периферической нервной системе. Известно, что АХЭ играет важную роль в патогенезе таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, черепно-мозговые травмы, сосудисто-мозговые патологии, миастения Гравис и т.д (Jeffrey & Cummings, 2000; Jones et al., 2011; Shakil et al., 2011). Эти заболевания сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Известно, что одним из основных принятых методов терапии является применение антихолинэстеразных (анти-ХЭ) препаратов. В настоящее время имеется большой выбор препаратов с анти-ХЭ действием. Однако, большинство из них характеризуются недостатками, наиболее важным из которых является неселективность действия применяемых препаратов по отношению к органам, в том числе – не требующим коррекции. Неселективность действия известных препаратов приводит к развитию широкого спектра тяжелых побочных явлений и является причиной частых патологических или смертельных исходов (Сосюкин и др., 2005; Lester et al., 2010).

В связи с этим, особую актуальность и значимость приобретает поиск и определение механизма действия новых высокоселективных, тканеспецифичных ингибиторов АХЭ. В лаборатории химико-биологических исследований Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (ИОФХ) были синтезированы производные урацила, классифицированные как новый класс необратимых и высокоселективных ингибиторов АХЭ (Резник и др., 1998; Аникиенко и др., 2001). К этому классу соединений относится и исследуемый нами ингибитор С-547 (далее по тексту С-547), проявляющий избирательность действия по отношению к АХЭ разных органов и тканей (Аникиенко и др., 2001; Petrov et al., 2006, 2009). Однако в литературе отсутствуют данные о механизмах действия С-547, приводящих к избирательному ингибированию АХЭ, что необходимо для оптимизации процессов синтеза новых высокоселективных анти-АХЭ препаратов на основе 6-метилурацила.

На основании вышеизложенного, **целью** настоящей работы явилось исследование основных факторов, определяющих избирательное влияние ингибитора С-547 на активность ацетилхолинэстеразы в разных тканях и органах *Rattus norvegicus*.

В соответствии с поставленной целью требовалось решение следующих **задач**:

1. Определить нуклеотидную последовательность 5' и 3' участков гена ацетилхолинэстеразы (*ache*) *R. norvegicus* и построить модель его интронно-экзонной структуры;

2. Выявить различия в экспрессии мРНК изоформ гена ацетилхолинэстеразы (*ache*) в органах и тканях *R. norvegicus*;

3. Установить различия в экспрессии мРНК гена бутирилхолинэстеразы (*bche*) в органах и тканях *R. norvegicus*;

4. Провести сравнительную оценку влияния ингибитора С-547 на активность различных форм ацетилхолинэстеразы, отличающихся по степени гликозилирования и наличию якорных субъединиц (коллаген Q и богатый пролином мембраносвязанный белок – PRiMA).

Научная новизна. Впервые определена нуклеотидная последовательность 5' и 3' недостающих участков гена *ache R. norvegicus* и на ее основе построена интронно-экзонная структура гена. Данные депонированы в международную базу данных GeneBank (GQ338831 и GQ338832). Впервые разработаны праймеры для ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan, позволяющие оценить уровень экспрессии мРНК изоформ гена *ache* в разных органах и тканях организма. Впервые разработаны вектора экспрессии для гена *ache R. norvegicus*, содержащие нуклеотидные замены в сайтах гликозилирования.

Научно-практическая значимость работы. Данные об интрон-экзонной структуре гена *ache R. norvegicus* имеют важное теоретическое и практическое значение, позволяют провести сравнительный анализ в строении гена *ache* разных видов животных, исследовать процессы альтернативного сплайсинга, выяснить взаимосвязи между регуляторными последовательностями гена и различными внешними и внутренними факторами, их влияние на избирательную экспрессию гена *ache* в разных органах и тканях. Практическая значимость заключается в разработке специфических праймеров и гибридизационных зондов для оценки экспрессии изоформ АХЭ, амплификации фрагментов гена, создании плазмидных и вирусных векторов, несущих ген *ache*. Полученные нами данные об уровне экспрессии мРНК АХЭ органов и тканей *R. norvegicus* расширяют представление о разнообразии изоформ фермента в синапсах, что необходимо при разработке и установлении механизмов действия новых лекарственных препаратов-ингибиторов АХЭ. Данные об уровне экспрессии мРНК гена *bche* необходимы при исследовании ее компенсаторной роли в различных органах и тканях и роли при различных

патологических процессах. Созданные генетические конструкции для экспрессии гена *ache*, содержащего нуклеотидные замены в сайтах гликозилирования в различных комбинациях, позволяют оценить влияние гликанов на биологическую активность АХЭ, транспорт к клеточной мембране, стабилизацию функциональной конформации, на функционирование головного мозга в норме и патологии (например, при болезни Альцгеймера), а также в исследовании других заболеваний, в патогенезе которых принимает участие АХЭ. Результаты исследований будут полезны для практического применения при разработке новых лекарственных препаратов селективного действия, свободных от недостатков ныне применяемых препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Структура гена ацетилхолинэстеразы (*ache*) *Rattus norvegicus* гомологична структуре гена ацетилхолинэстеразы (*ache*) *Mus musculus*;
2. Уровень экспрессии мРНК гена бутирилхолинэстеразы (*bche*) в поперечно-полосатой мускулатуре задних конечностей *Rattus norvegicus* ниже, чем в тканях сердца, головного мозга и диафрагмы;
3. Различная степень гликозилирования ацетилхолинэстеразы и образование гетероолигомеров в комплексе с якорными белками (коллаген Q и богатый пролином мембраносвязанный белок – PRiMA) не влияет на степень ингибирования АХЭ производным 6-метилурацила (С-547).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа выполнена при поддержке грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (07-04-12097 офи-м), Правительства Республики Татарстан по подготовке и переподготовке кадров в зарубежных научных центрах и «Пятьдесят лучших инновационных идей для Республики Татарстан» в номинации Молодежный инновационный проект «МИП» (Государственный контракт № р/14180). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008); Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2008, 2009); конкурсе «50 лучших инновационных идей для Республики Татарстан» (Казань, 2010); конкурсе «У.М.Н.И.К.»-2010; научной конференции, посвященной 35-летию кафедры генетики КФУ «Современные проблемы генетики» (Казань, 2011); ежегодных научных отчетных конференциях сотрудников КФУ (Казань, 2010, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 2 статьи в центральных отечественных и зарубежных

рецензируемых журналах: Ученые записки Казанского университета, секция естественные науки и British Journal of Pharmacology.

Место выполнения работы Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включает 19 рисунков и 11 таблиц. Библиография содержит 190 наименований, в том числе 177 – зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали штамм *Escherichia coli* *XL1-Blue* (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABqrlacIZ ΔM15 Tn10 (Tetr)]), крыс породы Wistar и клетки эмбриональной почечной линии 293Т человека (НЕК 293Т, коллекция ATCC CRL-11268).

Выделение нуклеиновых кислот. Для выделения геномной ДНК использовали набор EZ-10 Spin Column Genomic DNA Kit, Animal Samples (Bio Basic Inc.). Для выделения плазмидной ДНК использовали набор Plasmid Midi Kit (Qiagen). Для выделения общей РНК использовали набор RNeasy mini kit (Qiagen,). Выделения проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя. Количество и чистоту оценивали спектрофотометрически и в ходе электрофореза в агарозном геле (Sambrook et al., 2007).

Амплификация ДНК. Амплификацию исследуемых фрагментов ДНК проводили в реакционной смеси, содержащей MgCl₂, dNTP, праймеры, буфер и Taq-полимеразу (Promega) при помощи автоматического термоциклера MJ Mini (BioRad). Оценку проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (Sambrook et al., 2007).

Секвенирование ДНК. Секвенирование очищенных продуктов ПЦР осуществляли с помощью ПЦР-праймеров и набора для секвенирования ABIprism BigDye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ сиквенсных хроматограмм и ассемблинг проводили с использованием программы SeqMan, входящей в программный пакет Lasergene 5.03 (DNASTAR Inc.) (Burland, 2000).

Выравнивание последовательности гена *ache* осуществляли с помощью алгоритма needle из пакета EMBOSS с использованием штрафа за вставку 10.0, матрицы сходства EDNAFULL. Анализ EST-последовательностей проводили по базе данных UniGene (Pontius et al., 2003) с помощью программы

ASPIC (Bonizzoni et al., 2005) для поиска потенциальных сайтов сплайсинга использовали программу ASSP (Wang & Marín A. 2006).

Реакция обратной транскрипции. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием шестинуклеотидных рандом праймеров-гексамеров (Random 6) (Синтол), dNTP, буфера и обратной транскриптазы MMLV-RT (Fermentas) согласно инструкции фирмы-производителя (Qiagen).

Количественная оценка экспрессии мРНК генов *ache* и *bche* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Количественный анализ уровня экспрессии мРНК генов *ache* и *bche* проводили на приборе iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Каждая реакция включала в себя универсальный мастер-микс для ПЦР, специфичные прямой и обратный праймеры, флуоресцентную пробу TagMan (Синтол) и кДНК. Количество РНК было нормализовано по β -актину (Chintalgattu et al., 2003). Уровень экспрессии мРНК *ache* и *bche* в диафрагме был принят за единицу.

Сайт-направленный мутагенез выполнен фирмой Евроген.

Культивирование и трансформация бактерий. Культивирование проводили в среде LB (Luria-Bertani) ив агаризованной среде LB. Трансформацию бактериальных клеток *E. coli XL1-Blue* проводили с помощью CaCl_2 (Sambrook et al., 1989).

Трансфекцию культуры клеток НЕК 293Т проводили набором TransFast согласно инструкции фирмы-производителя (Promega).

Иммуноблоттинг. Клетки НЕК293Т, трансфицированные экспрессионными плазмидами, разрушали в буферном растворе для нанесения проб и использовали для электрофореза в 10% полиакриламидном SDS-PAGE геле (Laemmli, 1970). Белки переносили на PVDF мембрану (BioRad) и блокировали 5% раствором обезжиренного молока в фосфатно-солевом буферном растворе. Мембраны инкубировали с первичными антителами (АТ) к АХЭ Е-19 (1:1000, SantaCruz) и к β -актину (1:2000, Sigma) и вторичными видоспецифичными АТ, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:3000, Sigma). Анализ проводили с помощью набора DAB Substrate Kit (Vector).

Активность АХЭ в гомогенатах клеток определяли по методу Элмана (Ellman et al., 1961) спектрофотометрически, по скорости исчерпания субстрата за одну минуту, при помощи спектрофотометра PerkinElmer $\lambda 25$ при длине волны 412 нм.

Определение концентрации белка проводили при помощи спектрофотометра PerkinElmer $\lambda 25$.

Программное обеспечение. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием приложения NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) и пакета программ DNA Star Lasergene (DNASTAR Inc.), ASPIC (www.caspur.it/ASPIC/) и ASSP (Wan & Marín 2006). Разработку праймеров проводили с использованием пакета программ Primer Select (DNASTAR Inc.). Для графического представления рестрикционных карт созданных плазмид использовали программу Vector NTI 9 Software (Invitrogen).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel-2007. Статистическая достоверность разницы определялась с помощью t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение первичной нуклеотидной последовательности и интронно-экзонной структуры гена *ache Rattus norvegicus*

Интронно-экзонная структура гена *ache* млекопитающих исследована на примере гена *Mus musculus* (домовая мышь) и *Homo sapiens* (человек). Для определения взаимодействия между ферментом и ингибитором, мы проанализировали нуклеотидную последовательность гена *ache Rattus norvegicus* (крыса) из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). В ходе исследования мы обнаружили отсутствие участков нуклеотидной последовательности гена *ache* длиной 229 п.н. с 5'-конца и 391 п.н. с 3'-конца в районах гена, важных для процессов альтернативного сплайсинга.

В литературе описаны три канонические изоформы АХЭ, имеющие одинаковые каталитические свойства, но различающиеся по варибельности С-конца, характером сборки субъединиц, скоростью седиментации, а также типом ассоциации с клеточной мембраной. Из данных литературы, помимо приводящего к образованию фермента с различными вариантами С-конца 3'-альтернативного сплайсинга, происходит также альтернативный сплайсинг 5'-конца (Legay et al., 1995; Grisaru et al., 1999; Rotundo 2003; Meshorer et al., 2004; Camp et al., 2008). В связи со значимостью данных участков для альтернативного сплайсинга нами разработаны специфичные праймеры для амплификации неизвестных областей гена *ache*, проведено выделение геномной ДНК, ПЦР и секвенирование. В результате секвенирования нами получены нуклеотидные последовательности длиной 1019 п.н. для 5'-конца и 847 п.н. для

3'- конца гена *ache R. norvegicus*, которые перекрыли пробелы в последовательности гена *ache* 12-й хромосомы NW_001084677,1.

Для выявления порядкового (линейного) расположения экзонов и интронов в гене *ache R. norvegicus* мы провели глобальное выравнивание (алгоритм Нидлмана-Вунша) последовательности гена *R. norvegicus* с последовательностью гена *Mus musculus*. Выравнивание показало, что эти последовательности являются гомологичными на 84,5%. В результате выравнивания и попарного сравнения нуклеотидных последовательностей гена *ache R. norvegicus* и *M. musculus* обнаружены нуклеотидные замены, вставки и делеции. Общее число замен в нуклеотидной последовательности экзонов гена *ache R. norvegicus* составило 115 п.н., число вставок – 34 п.н., делеций – 13 п.н.

В связи с тем, что наличие делеций не позволяет достоверно определить интронно-экзонную структуру гена, мы выравнивали нуклеотидные последовательности гена с последовательностями мРНК. Поиск в базе данных UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) позволил найти 36 фрагментов экспрессированных последовательностей (EST-последовательностей) для гена *ache R. norvegicus*. С помощью программы ASPIC (www.caspur.it/ASPIC/) нами получен прогноз возможных интронов и экзонов с данными относительных позиций начала и конца в нуклеотидной последовательности гена. Из альтернативных экзонов 5'- конца в гене *R. norvegicus* подтвердилось только существование экзона E1e. Кроме того, подтвердилось наличие и позиции экзонов E2, E3, E4 и E6. В результате поиска потенциальных сайтов сплайсинга с помощью программы ASSP нами выявлены донорные сайты после экзонов E1d, E1c и E1a, что служило косвенным подтверждением границ экзонов.

На основании анализа и полученных данных, построена модель интронно-экзонной структуры гена *ache R. norvegicus* (Рис.1).

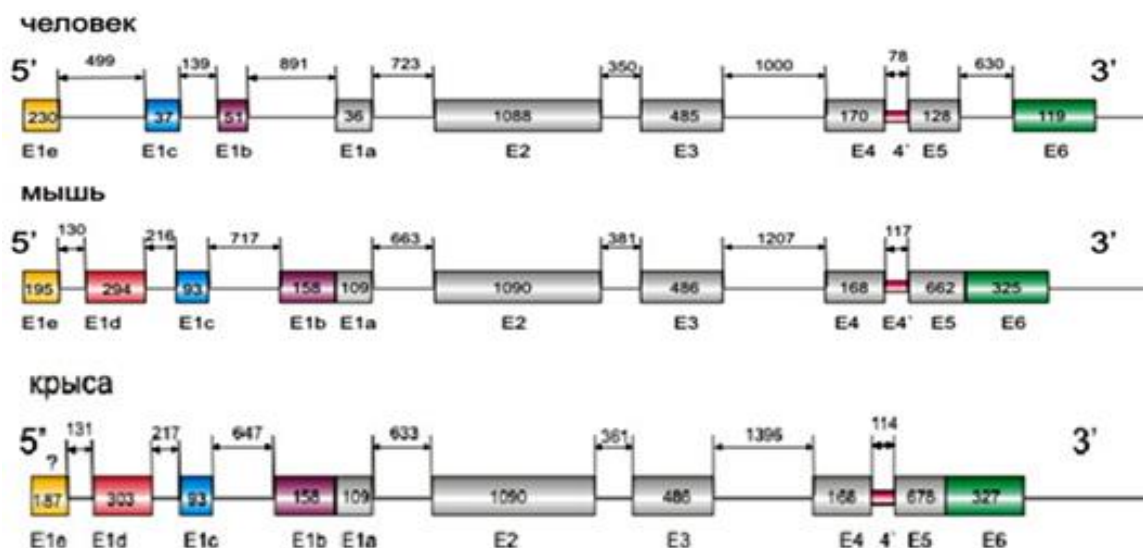


Рис. 1. Интронно-экзонная структура гена *ache* *Mus musculus*, *Homo sapiens* и *Rattus norvegicus*. Буквами с E1e по E6 отмечены экзоны, линией – интроны. Между 4 и 5 экзонам располагается короткий интрон, образующий совместно с другими экзонами изоформу «R» гена *ache* при альтернативном сплайсинге

Построенная нами модель интронно-экзонной структуры гена *ache* *R. norvegicus* отличается от последовательности гена *ache* *M. musculus* (Рис.1) разницей в количестве нуклеотидов. При сравнении с моделью гена *ache* *H. sapiens* (Рис.1) в структуре гена *ache* *R. norvegicus* отсутствует интрон, расположенный между 5 и 6 экзонам. Таким образом, структура гена *ache* *R. norvegicus* на 3' и 5' областях нуклеотидной последовательности не содержит экзонов или интронов, способных к образованию дополнительных изоформ фермента в процессе альтернативного сплайсинга, соответствующих избирательной чувствительности различных органов и тканей к производному б-метилурацила. Полученные нами данные легли в основу для проведения сравнительного анализа продуктов альтернативного сплайсинга гена *ache* *R. norvegicus*.

Различие в уровне экспрессии мРНК изоформ гена *ache* органов и тканей *Rattus norvegicus*

Экспрессия различных изоформ АХЭ происходит в большинстве тканей организма. Полиморфизм АХЭ возможен благодаря нескольким процессам, одним из которых является альтернативный сплайсинг 3' конца. В литературе описаны три канонические изоформы АХЭ, экспрессия которых различается в разных органах и тканях (Legay et al., 1993; Legay 2000; Meshorer et al., 2004; Camp et al., 2008). В поперечно-полосатой мускулатуре и в ЦНС основная масса АХЭ представлена в виде изоформы

«Т», в крови – «Н», а изоформа «R» возникает в процессе воздействия на организм различных факторов, вызывающих стресс (Meshorer & Soreq 2006; Camp et al., 2008). Из экспериментов по исследованию ингибирования АХЭ производным 6-метилурацила установлено, что АХЭ тканей диафрагмы, головного мозга и миокарда более устойчива к ингибированию С-547 по сравнению с поперечно-полосатой мускулатурой конечностей (Petrov et al., 2009). С целью количественной оценки уровня экспрессии мРНК изоформ гена *ache* и выявления их компенсаторной роли проводили ПЦР в режиме реального времени.

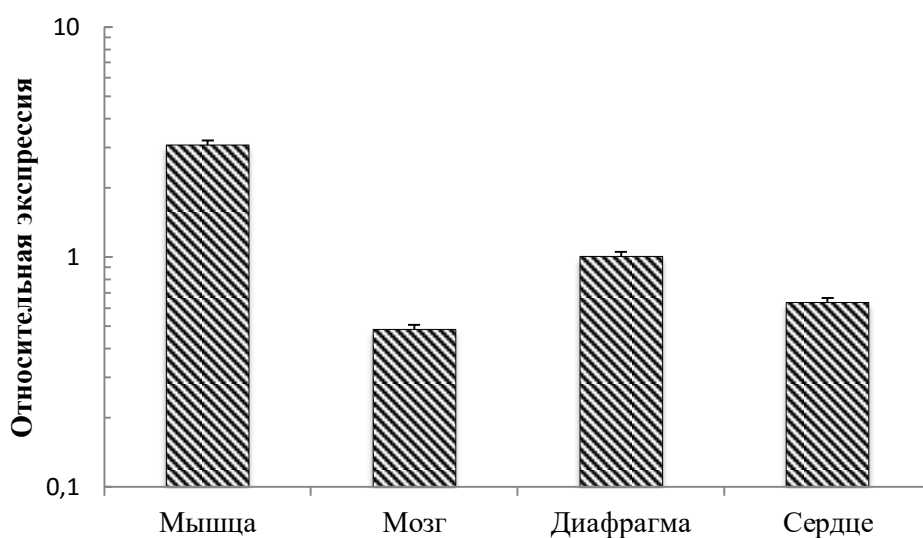


Рис. 2 Относительный уровень экспрессии мРНК изоформы «Т» гена *ache*, содержащей альтернативный экзон 6. На диаграмме представлены нормализованное по β -актину среднее значение уровня экспрессии и стандартная ошибка. Уровень экспрессии мРНК гена *ache* в диафрагме принят за единицу

Как видно из данных (Рис. 2), уровень экспрессии мРНК изоформы «Т» в скелетной мышце EDL (Extensor Digitorum Longus – длинный разгибатель пальцев) в 6 раз превышает таковой в мозге, и в 3 раза выше по сравнению с тканью диафрагмы. Согласно гипотезе избыточности АХЭ, данный аспект говорит о вероятном присутствии в синапсах тканей диафрагмы и головного мозга других ХЭ, выполняющих компенсаторную роль при ингибировании изоформы «Т». Как известно, уровень синаптической АХЭ в мышцах не остается постоянным, а меняется в процессе развития, подвержен нейротрофическому контролю, зависит от различных эндогенных факторов, один из которых – стресс. Исходя из данных литературы, стресс индуцирует изменения в сплайсинге пре-мРНК, в результате чего происходит сверхэкспрессия изоформы «R» с более длительным периодом полужизни

вместо «Т». Таким образом, изменение в стресс-индуцированном сплайсинге с образованием изоформы «R» приводит к восстановлению нормальных электрофизиологических потенциалов после изначального чрезмерного возбуждения, способствует восстановлению двигательной активности, ускоренному восстановлению нервно-мышечных контактов и повышению порога чувствительности к агонистам и антагонистам холинэргической передачи нервного импульса. Изоформа «R», как известно из данных литературы, обладает более длительным периодом полужизни (McCahill et al., 2002; Sternfeld et al., 2002; Rotundo 2003; Meshorer et al., 2005; Meshorer & Soreq, 2006). Для проверки данной гипотезы проводили анализ уровня экспрессии мРНК изоформы «R». Не наблюдалось различий в уровне экспрессии мРНК изоформы «R» между мышцами разного функционального профиля и головным мозгом. Выполнен сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК изоформы «R» и мРНК изоформы «Т».

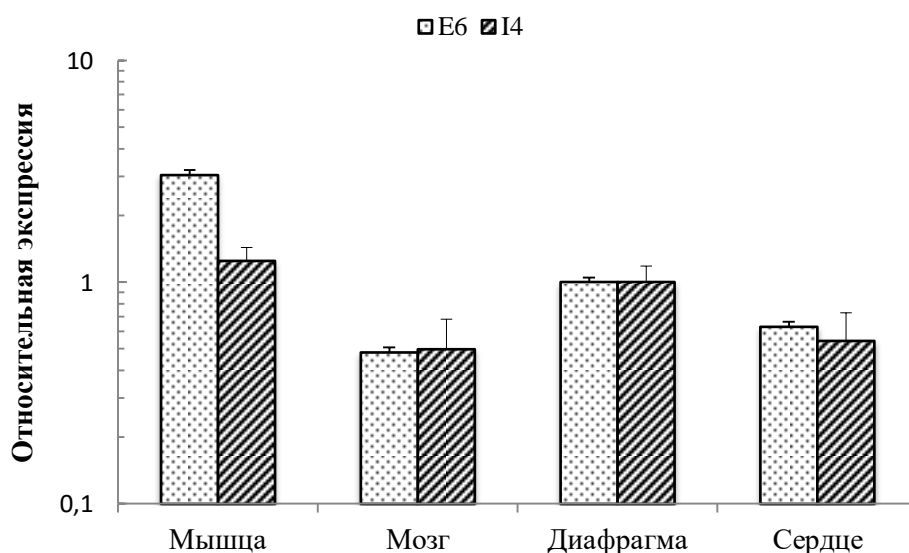


Рис. 3 Сравнительный уровень экспрессии мРНК изоформ гена *ache*, включающих экзон 6 (изоформа «Т») или 4 интрон (изоформа «R»). На диаграмме представлены нормализованное по β -актину среднее значение уровня экспрессии двух изоформ, и стандартная ошибка. Уровень экспрессии мРНК гена *ache* в диафрагме принят за единицу

Как видно из данных (Рис. 3), различия в уровне экспрессии мРНК изоформ «Т» и «R» наблюдаются лишь в мышце EDL. Так, уровень экспрессии мРНК изоформы R, включающей в результате альтернативного сплайсинга 4-й интрон, в два раза меньше по сравнению с мРНК изоформы «Т». Из этого следует, что основной пул фермента в нервно-мышечном синапсе представлен

изоформой «Т», в то время как в остальных исследуемых органах помимо экспрессии мРНК изоформы «Т» наблюдается в равной степени экспрессия мРНК изоформы «R».

Из данных, представленных на диаграмме (Рис. 3) можно сделать вывод, что в синапсах исследуемых органов и тканей помимо «Т» присутствует и определенное количество изоформы «R», вероятно менее (по сравнению с «Т») подверженной влиянию С-547 и выполняющей частичную компенсаторную роль.

Однако, как известно, в нервно-мышечном синапсе помимо АХЭ существует еще один фермент, способный гидролизовать ацетилхолин, бутирилхолинэстераза (БХЭ), которая также может компенсировать недостаток активности АХЭ (Горбунов и Резник, 2009). В связи с этим, мы проверили гипотезу о компенсаторной роли БХЭ в синапсах (Рис. 4).

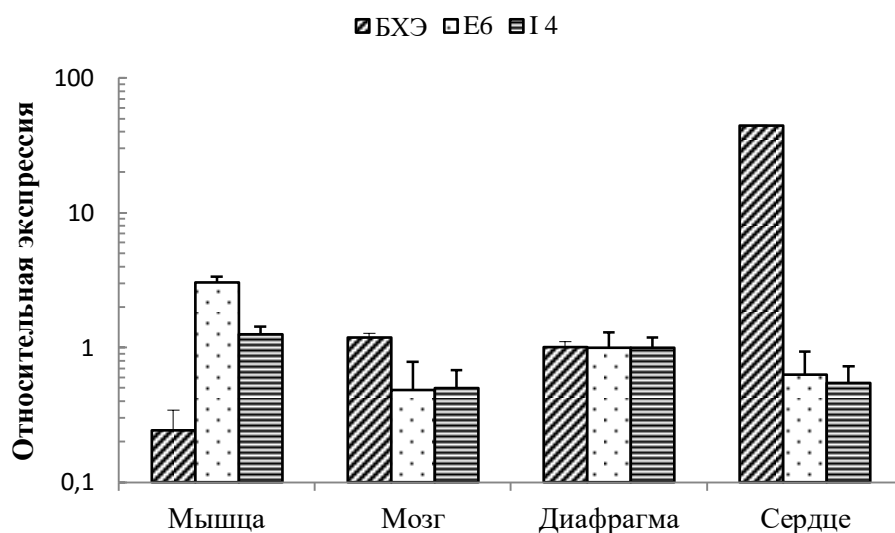


Рис. 4 Корреляция уровня экспрессии мРНК гена *bche* и изоформ гена *ache* в разных тканях и органах. На диаграмме представлены нормализованное по β -актину среднее значение уровня экспрессии гена *bche* и изоформ гена *ache*, стандартная ошибка. Уровень экспрессии мРНК гена *bche* и *ache* в диафрагме принят за единицу

Как видно из данных (Рис. 4), уровень экспрессии мРНК *bche* в ткани диафрагмы в 4,2 раза превышает таковой в скелетной мускулатуре. Уровень экспрессии мРНК *bche* в мозге – в 4,9 раза, а в сердце – в 183,5 раза выше, чем в ткани скелетной мускулатуры. При этом, установлена отрицательная зависимость уровня экспрессии мРНК гена *ache* по отношению к мРНК *bche*. Коэффициент корреляции равен – 0,4 для мРНК *bche* и мРНК изоформы «Т» и – 0,53 для мРНК *bche* и мРНК изоформы «R».

Полученные в ходе этого исследования данные полностью согласуются с данными о степени ингибирования производным 6-метилурацила БХЭ и АХЭ в

тканях диафрагмы и сердца (Petrov et al., 2009). Функциональная значимость БХЭ в синапсах диафрагмы, головного мозга и сердца может быть выше, чем в мышце EDL. Поскольку производное 6-метилурацила является избирательным ингибитором АХЭ (Anikienko et al., 2008), то активность БХЭ может компенсировать недостаток активности АХЭ. Следует отметить, эксперименты по исследованию полного ингибирования БХЭ в присутствии С-547 выявили увеличение чувствительности диафрагмы к производному 6-метилурацила. Однако, это не устраняло полностью различий между мышцей EDL и диафрагмой (Petrov et al., 2009). Таким образом, должен существовать другой механизм, который обеспечивает устойчивость дыхательных мышц, сердца и головного мозга к алкиламмониевым производным 6-метилурацила.

Влияние гликозилирования ацетилхолинэстеразы на обеспечение чувствительности к производным 6-метилурацила

Так как С-547 относится к разряду псевдонеобратимых ингибиторов неконкурентного действия (Аникиенко и др., 2001), а время жизни комплекса «лиганд-АХЭ» может превышать период полураспада фермента, поиск особенностей строения АХЭ, обеспечивающих разную чувствительность к производным 6-метилурацила, мы продолжили на уровне различий в посттрансляционной модификации белка. По данным литературы, посттрансляционной модификацией АХЭ является N-гликозилирование. АХЭ содержит три потенциальных сайта N-гликозилирования (Cohen et al., 2001; Chitlaru et al., 2002; Chen et al., 2011). Сложная разветвленная структура ингибитора свидетельствует о потенциально большом количестве контактных точек в образующемся комплексе, в связи с чем высказано предположение, что алкиламмониевые производные 6-метилурацила теоретически способны вступать во взаимодействие с N-гликанами. Для проверки данной гипотезы с помощью сайт-направленного мутагенеза мы провели аминокислотные замены Asn в позициях 296, 381 и 495 на Gln, по отдельности и в разных комбинациях с последующей экспрессией рекомбинантных АХЭ в культуре клеток и определением степени ингибирования С-547. Схема аминокислотных замен приведена на Рис. 5. С помощью программы Vector NTI 9 (Invitrogen) строили рестрикционные карты плазмид (Рис. 6).

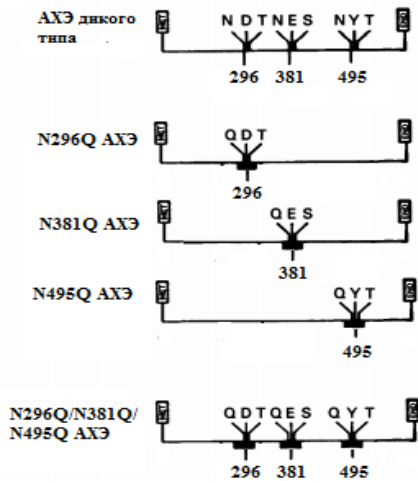


Рис. 5 Схема аминокислотных замен в сайтах гликозилирования АХЭ (Chitlaru et al., 2002).

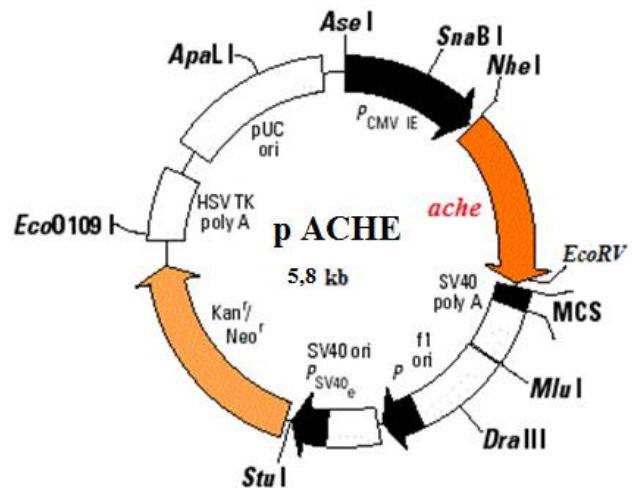


Рис.6 Плазмидный вектор pACHE.

Для оценки экспрессии гена *ache*, клонированного в плазмидный вектор и содержащего нуклеотидные замены, в ответственных за гликозилирование белка областях мы проводили трансфекцию клеток линии НЕК293Т. В ходе флуоресцентной микроскопии показана экспрессия репортерного белка EGFP в клетках НЕК293Т, трансфицированных рекомбинантными плазмидами, несущими клонированный ген *ache* с мутациями в сайтах гликозилирования. Данные результаты свидетельствуют в пользу того, что произошла генетическая модификация клеток НЕК293Т, а генетические конструкции стабильны и экспрессируют клонированный ген *ache* с мутациями в сайтах гликозилирования. Экспрессию наблюдали в течение 10 дней с момента трансфекции клеток. Для определения биосинтеза рекомбинантного белка АХЭ в трансфицированных клетках НЕК293Т мы проводили иммуноблоттинг при помощи антител к АХЭ. В ходе анализа выявлена положительная реакция с антителами к АХЭ в трансфицированных образцах и отрицательная реакция в контрольном образце. Полученные данные позволяют утверждать, что произошла плазмидная трансфекция клеток НЕК293Т. Трансфицированные конструкциями pACHE-N495Q, pACHE-3xN→Q, pACHE-N381Q, pACHE-N296Q и pACHE-wt, клетки биосинтезируют АХЭ. Эти данные коррелируют с результатами, полученными в ходе флуоресцентного анализа экспрессии репортерного гена *egfp* в трансфицированных клетках НЕК293Т. Результаты свидетельствуют в пользу того, что произошла плазмидная трансфекция и трансфицированные клетки экспрессируют белковые продукты гена *ache* с мутациями в сайтах гликозилирования.

С целью проверки влияния проведенных нами аминокислотных замен в сайтах гликозилирования АХЭ на кинетическое поведение фермента нами исследована зависимость ферментативной активности генетически модифицированной АХЭ от концентрации С-547. Лизаты модифицированных клеток НЕК293Т анализировали с помощью биохимического анализа по методу Элмана (Ellman et al., 1961). Активность АХЭ в гомогенатах клеток определяли спектрофотометрически, по скорости исчерпания субстрата за одну минуту. Влияние ингибитора первоначально оценивали по действию известной ингибирующей концентрации 10^{-5} моль (М) С-547 (Табл. 1).

Таблица 1.

Активность АХЭ с разной степенью гликозилирования

Название плазмидного вектора, содержащего ген <i>ache</i>	Активность без ингибитора $\Delta A_{412}/\text{мин}$	Активность при концентрации 10^{-5} М С-547
pACHE-N495Q	0,0122	0,0049
pACHE 3xN→Q	0,0050	-
pACHE-N381Q	0,0126	0,0050
pACHE-N296Q	0,0124	0,0049
pACHE-wt	0,0169	0,0050
«-» контроль	0,0050	0,0050

Как следует из данных (Табл. 1), фермент с тройной заменой не активен. Вероятно, это связано с полной потерей ферментативной активности из-за отсутствия гликанов на поверхности белка, что привело к возросшей чувствительности по отношению к протеолитическим ферментам. АХЭ с одной из замен (Asn на Gln) проявляет различную активность, но все они (модификации белка) при концентрации 10^{-5} М С-547 полностью ингибируются, что согласуется с данными отрицательного контроля. С целью уточнения диапазона ингибирующих мутантную АХЭ концентраций С-547 мы определили активность модифицированного белка при различных концентрациях ингибитора (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М С-547).

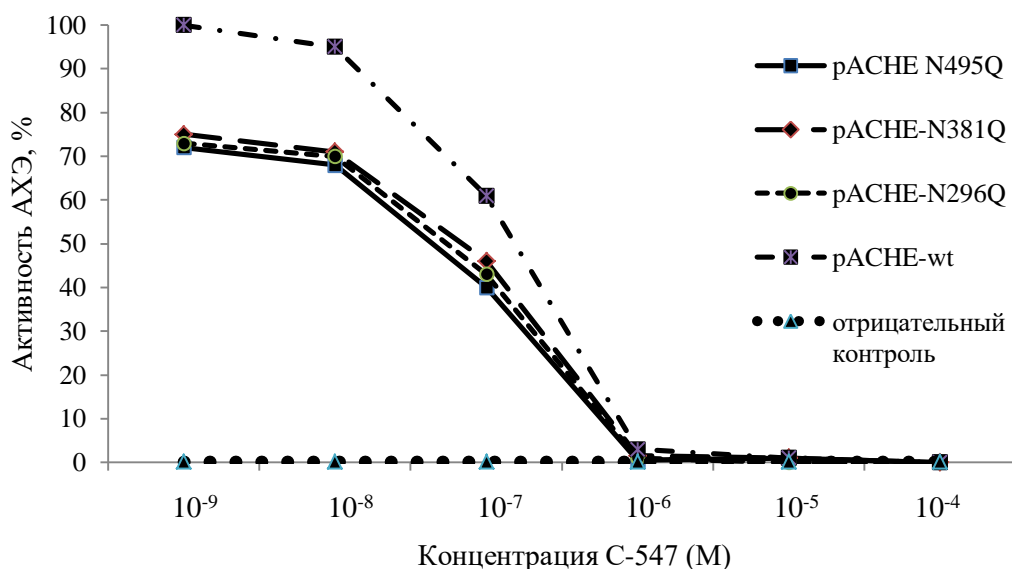


Рис. 7 График зависимости ферментативной активности АХЭ от концентрации С-547.

Как видно из данных (Рис. 7), ингибирующее действие С-547 при концентрации 10^{-9} , 10^{-8} М практически не определяется как для фермента с разной степенью гликозилирования, так и для дикого типа АХЭ. Степень полного ингибирования АХЭ С-547 варьирует в пределах от 10^{-6} до 10^{-5} М. Разница в процентном отношении активности АХЭ дикого типа и модифицированной по сайтам гликозилирования объясняется частичной потерей ферментативной активности за счет снижения стабильности функциональной конформации модифицированного белка. Для определения степени полного ингибирования мы проводили повторный анализ активности АХЭ при 10^{-6} и 10^{-5} М концентрации С-547 (Табл. 2).

Таблица 2.

Концентрация С-547, при которой происходит полное ингибирование АХЭ

Название плазмидного вектора, содержащего ген <i>ache</i>	Концентрация С-547 (М)
рАСНЕ-N495Q	$1,5 \times 10^{-6}$
рАСНЕ-N296Q	$1,5 \times 10^{-6}$
рАСНЕ-N381Q	$1,5 \times 10^{-6}$
рАСНЕ 3xN→Q	нет
рАСНЕ-wt	$0,5 \times 10^{-6}$
«←» контроль	нет

Как видно из данных (Табл. 2), полное ингибирование мутантных АХЭ происходит при концентрации С-547 10^{-6} М, кроме случая тройной мутации, где активность АХЭ не определяется. Как показал анализ, все

модифицированные по сайтам гликозилирования АХЭ, кроме белка с тройной заменой, в равной степени проявляют ферментативную активность и способность ингибироваться С-547. Полученные нами данные сопоставимы со значениями, полученными рядом авторов для АХЭ из тканей головного мозга *R. norvegicus*, и имеют большее значение, чем для АХЭ мышцы EDL (10^{-8} М) (Petrov et al., 2009). Таким образом, избирательное выключение сайтов гликозилирования не оказывает влияния на чувствительность АХЭ к С-547.

Вероятно, в случае ингибирования мышцы EDL С-547 играют роль процессы, опосредованно связанные с конформацией активного центра, но оказывающие сильное регуляторное действие. Одним из вариантов регуляции активности АХЭ может служить регуляция трехмерного пространственного расположения глобулы АХЭ в гетероолигомере, образованном с якорными белками ColQ (коллаген Q) и PRiMA (богатый пролином мембраносвязанный белок), то есть ее (АХЭ) четвертичная структура. В этом случае одна молекула С-547, занимающая положение вблизи контакта АХЭ с пролин-богатой областью ColQ, способна повлиять на активность 12-ти глобул АХЭ. В связи со сказанным, мы провели исследование влияния якорных субъединиц PRiMA и ColQ на значения ингибирования АХЭ С-547. Для этого проводили ко-трансфекцию клеток линии НЕК293Т плазмидами, содержащими гены *ache* и якорных субъединиц PRiMA и ColQ. Эффективность трансфекции оценивали при помощи флуоресцентной микроскопии. С целью проверки влияния якорных субъединиц ColQ и PRiMA на кинетическое поведение фермента нами исследована зависимость ферментативной активности АХЭ от концентрации С-547. Влияние ингибитора первоначально оценивали по действию на ферментативную активность АХЭ известной ингибирующей концентрации 10^{-5} М С-547 (Табл. 3).

Таблица 3.

Активность АХЭ с якорными белками PRiMA и ColQ

Название	Активность без ингибитора $\Delta A_{412}/\text{мин}$	Активность при концентрации 10^{-5} М С-547
АХЭ + ColQ	0,0173	0,0051
АХЭ + PRiMA	0,0167	0,0053
«-» контроль	0,0050	0,0050

Как видно из данных (Табл. 3), АХЭ в комплексе с якорными белками ColQ и PRiMA проявляет одинаковую ферментативную активность и при концентрации 10^{-5} М С-547 полностью ингибируется, в связи со значениями активности, близкими к отрицательному контролю. Для уточнения диапазона

ингибирующих концентраций С-547 мы определили активность АХЭ в комплексе с якорными белками ColQ и PRiMA, при различных концентрациях ингибитора (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М С-547; Рис. 8).

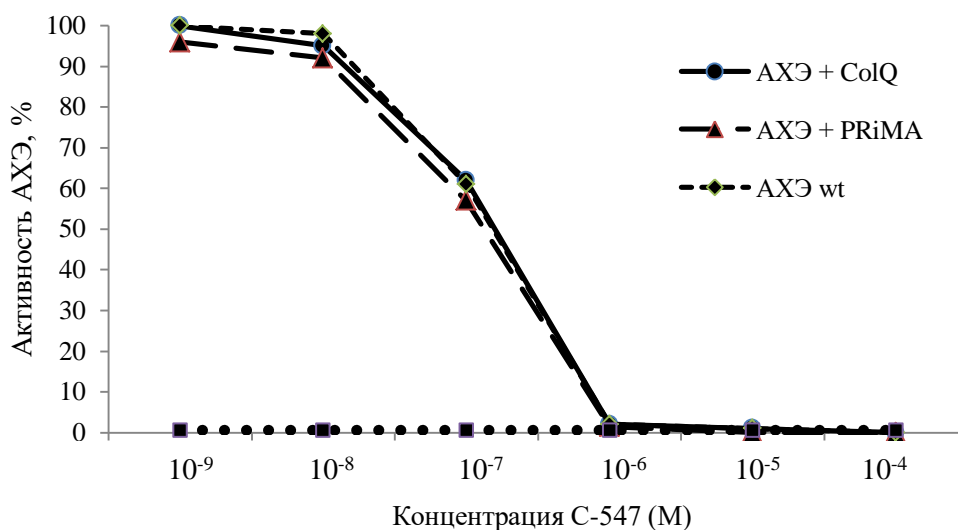


Рис. 8 График зависимости ферментативной активности АХЭ дикого типа (коэкспрессируемой совместно с якорными белками ColQ и PRiMA) от концентрации С-547

Как показал проведенный нами биохимический анализ (Рис. 8) активность АХЭ дикого типа и с якорными белками одинакова при всех использованных концентрациях С-547. Полное ингибирование АХЭ совместно с якорными белками ColQ и PRiMA характеризуется концентрацией 10^{-6} М. АХЭ, как было сказано выше, представлена в виде множества молекулярных форм, различных по своей четвертичной структуре и типу ассоциации с клеточной мембраной. Вероятно, АХЭ в гетероолигомерном комплексе с якорными белками ColQ и PRiMA существует в лишь агрегированном состоянии, т.е. приобретая лишь способность прикрепляться к поверхности клеточной мембраны, увеличивая число точек взаимодействия с субстратом и ингибиторами, однако ее каталитические свойства при этом остаются неизменными.

Таким образом, наличие якорных субъединиц и образование гетероолигомерных структур не влияет на каталитическую активность АХЭ в присутствии С-547.

Следует заключить, что при взаимодействии фермента и ингибитора, вероятно, задействованы другие механизмы, выполняющие опосредованную роль в работе фермента, но оказывающие критическое значение при ингибировании. Также следует отметить особое строение молекулы С-547,

которая может принимать множество различных пространственных конформаций, что делает затруднительным предсказание вероятных точек взаимодействия лиганда с ферментом. Сложная организация межсинаптического пространства, в котором происходит взаимодействие ингибитора и АХЭ, также может опосредованно влиять на процесс ингибирования.

ВЫВОДЫ

1. Определена первичная нуклеотидная последовательность недостающих 5' и 3' участков гена ацетилхолинэстеразы (*ache*) *Rattus norvegicus* (229 и 391 пар нуклеотидов соответственно), важных для процессов альтернативного сплайсинга. На основании компьютерного анализа построена интронно-экзонная структура гена *ache* *Rattus norvegicus*. Показано, что интронно-экзонная структура гена *ache* *Rattus norvegicus* соответствует структуре гена *ache* *Mus musculus* на 84.5%;

2. Показано, что мРНК изоформы «R» гена *ache* присутствует во всех исследуемых органах и тканях *Rattus norvegicus*. Статистически достоверное различие в уровне экспрессии мРНК изоформ гена *ache* отмечено в поперечно-полосатой мускулатуре задних конечностей, где уровень экспрессии мРНК изоформы «R» в 2 раза меньше по сравнению с мРНК изоформы «Т»;

3. Выявлены различия в экспрессии мРНК гена бутирилхолинэстеразы (*bche*) в органах и тканях *Rattus norvegicus*: уровень экспрессии мРНК гена *bche* в ткани диафрагмы в 4,2 раза, в мозге – в 4,9 раза, а в сердце – в 183,5 раза выше, чем в мышце EDL. Установлена отрицательная зависимость уровня экспрессии мРНК изоформ гена *ache* по отношению к мРНК гена *bche*;

4. Разная степень гликозилирования АХЭ *Rattus norvegicus* и образование гетероолигомеров в комплексе с якорными белками (коллаген Q и богатый пролином мембраносвязанный белок – PRiMA) не влияет на активность фермента в присутствии ингибитора С-547.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Ланник Н.И.** Уточнение первичной нуклеотидной последовательности и интронно-экзонной структуры гена ацетилхолинэстеразы *Rattus norvegicus* / Н.И. Ланник, Д.С. Тарасов, К.А. Петров, Э.А. Бухараева, Е.Е. Никольский, А.А. Ризванов // Ученые записки Казанского университета, серия «Естественные науки». – 2011. – Т.153, кн. 1. – С. 120–126.

2. K.A. Petrov Different sensitivities of rat skeletal muscles and brain to novel anti-cholinesterase agents, alkylammonium derivatives of 6-methyluracil (ADEMS) / K.A. Petrov, L.O. Yagodina, **N.I. Lannik**, G.R. Valeeva, A.D. Nikitashina, A.A. Rizvanov, V.V. Zobov, E.A. Bukharaeva, V.S. Reznik, F. Vyskočil, E.E. Nikolsky // British Journal of Pharmacology. – 2011, – V. 163, – P. 732–744.

Другие публикации по теме диссертации:

3. **Ланник Н.И.** Уточнение первичной нуклеотидной последовательности гена ацетилхолинэстеразы *Rattus norvegicus*. / Н.И. Ланник, А.А. Ризванов, А.А. Ларин, Д.С. Тарасов. // XIII Всероссийская научно–практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине», – Казань, 2008. – С.212–213.

4. **Ланник Н.И.** Изучение экспрессии гена ацетилхолинэстеразы в различных тканях *Rattus norvegicus* / Н.И. Ланник, К.А. Петров, А.А. Ризванов, Е.Е. Никольский // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно–практической конференции. – Казань, 2008. – С.71.

5 **Ланник Н.И.** Изучение экспрессии отдельных экзонов гена ацетилхолинэстеразы в различных тканях *Rattus norvegicus* / Н.И. Ланник, А.А. Ларин, К.А. Петров, А.А. Ризванов, Е.Е. Никольский // XIV Всероссийская научно–практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине», Казань – 2009, – С.169

6. **Ланник Н.И.** Изучение экспрессии сплайс–вариантов гена ацетилхолинэстеразы в дыхательной и локомоторной мышцах крысы / А.А. Ларин, Н.И. Ланник, К.А. Петров, Э.А. Бухараева, А.А. Ризванов // XIV Всероссийская научно–практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С.178

7. **Ланник Н.И.** Влияние аминокислотных замен в сайтах гликозилирования АХЭ на кинетическое поведение фермента / Н.И. Ланник, А.А. Ризванов, Е.Е. Никольский // I научно–практическая конференция с

международным участием «Современные проблемы генетики», Казань – 2011, – С. 32

Список сокращений

АХЭ – ацетилхолинэстераза

БХЭ – бутирилхолинэстераза

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.н. – пар нуклеотидов

ЦНС – центральная нервная система

ache – ген, кодирующий ацетилхолинэстеразу

bche – ген, кодирующий бутирилхолинэстеразу

ColQ – Collagen Q – коллаген Q

EDL – Extensor Digitorum Longus – длинный разгибатель пальцев

HEK293T – Human embryonic kidney cells – эмбриональные клетки почки человека

PRiMA – Proline Rich Membrane Anchor – богатый пролином мембраномсвязанный белок

Биохимический анализ проводили совместно с к.б.н. Ягодиной Л.О. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей гена *ache* проводили совместно с к.б.н., с.н.с. КФ МСЦ РАН Тарасовым Д.С.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., доценту Ризванову А.А. за постановку проблемы, внимательное отношение к работе, и помощь в расстановке приоритетов; д.м.н., профессору, академику РАН Никольскому Е.Е. за плодотворное сотрудничество, воспитание, знания и идеи; сотрудникам лаборатории биофизики синаптических процессов КИББ КазНЦ РАН за предоставленный исследуемый препарат и сотрудничество; д.б.н., профессору Барабаншикову Б.И., сотрудникам кафедры генетики и межкафедральной радиологической лаборатории за помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

Особую благодарность автор выражает своим родителям Ланник Зинаиде Ивановне и Ланнику Ивану Петровичу за безграничную любовь, личный пример, поддержку и понимание.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

420008, Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КФУ, к.104, отдел аттестации, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: Natalya.lannik@gmail.com