

УДК 575.11+576.3+577.1+577.2+577.3+576.5+579.22 +579.23+579.25+578.2+57.05+57.085+593.1+616.006+616.8

**МАТЕРИАЛЫ VIII МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИМ
ТЕХНОЛОГИЯМ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН
(11–14 ОКТЯБРЯ 2022 г., ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН,
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ)¹**

DOI: 10.31857/S004137712207001X

СЕКЦИЯ “ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ”

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕЗОКСИГИПУЗИНСИНТАЗЫ DHS И ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО
ТРАНСЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА 5A EIF5A *CANDIDA ALBICANS***

Э. Э. К. Агбоигба^{1,*}, Э. Э. Валиахметов¹, К. С. Усачев¹, Ш. З. Валидов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: kouranelvis@gmail.com

Гипузинирование представляет собой посттрансляционную модификацию эукариотического трансляционного фактора 5a (eIF5A), в ходе которой из специфичного остатка лизина образуется гипузин. Реакция гипузинирования катализируется ферментами дезоксирибозилтрансферазой (DHS) и дезоксирибозилгидроксилазой (DOHN) в присутствии кофактора NAD⁺ и спермидина (Cwhen et al., 2020). Данная работа посвящена изучению взаимодействия между ферментом DHS и субстратом EIF5A в присутствии никотинамидадениндинуклеотида NAD⁺ и спермидина, что в дальнейшем поможет понять механизм гипузинирования у *Candida albicans*.

DHS представляет собой цитозольную трансферазу, участвующую в первой стадии гипузинирования (Wator et al., 2020). Для своей каталитической активности фермент требует NAD⁺ в качестве кофактора. DHS катализирует перенос 4-аминобутильной части спермидина на специфический лизин предшественника eIF5A, что приводит к образованию дезоксирибозилгипузина, который затем гидроксилируется с помощью DOHN до гипузина (Chen et al., 2020).

Гены *elf5a*, *dhs* и *dohh* амплифицировали из выделенной тотальной ДНК *Candida albicans* штамм SC5314. Полученные фрагменты генов клонировали в вектор pCYCduet-1 для их совместной экспрессии. Далее фрагмент с тремя генами трансформировали в вектор pETGB1a, содержащий 6xHIS Tag на N-конце DHS. Полученную конструкцию pETGB1a:DHS:DOHN:EIF5A трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) pLys. Трансформанты культивировали в среде LB при 37°C до оптической плотности 0.6 при 600 нм. Потом культуру делили на четыре равных части и в каждую из них добавляли соответственно 1 – NAD⁺, 2 – Спермидин, 3 – NAD⁺ + Спермидин, 4 – необработанный контроль. После добавления изопропил-d-1-тиогаляктопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 0.5 М клетки культивировали еще 6 ч при 30°C, после чего осаждали и лизировали. Лизат центрифугировали при 4500 rpm в течение 45 мин. Белки выделяли металлохелатной аффинной хроматографией на никелевой колонке (NI-NTA). Белок 6xHIS-GB1-DHS:DOHN:EIF5A элюировали с 300мМ раствором имидазола. Полученные фракции белка в каждом случае собирали и проводили электрофорез в нативных и в денатурирующих условиях.

В ходе экспериментов мы сделали вывод о том, что в условиях коэкспрессии наблюдается функциональная активность DHS, о чем свидетельствует наличие тримерной формы белка на нативном электрофорезе в ПААГ. Также мы наблюдали, что DHS и EIF5A образуют комплекс и поэтому выделяются вместе, несмотря на то, что 6xHIS присутствует только на DHS. Наконец, мы наблюдали, что добавление NAD⁺ стимулирует димеризацию и тримеризацию DHS и усиливает его связывание EIF5A.

¹ Конференция проведена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 г.), проект “Использование генетических технологий для поиска биомаркеров, моделирования и терапии заболеваний человека”.

сти распознавания мотива для выборки заданного объема. Наконец, вычисляется значение *p-value* по обогащению для рассматриваемого мотива. Инструмент был протестирован на данных RNA-seq *H. sapiens* и *A. thaliana*. Наш новый инструмент позволяет эффективно идентифицировать обогащенные ССТФ на основе результатов экспериментов RNA-seq.

Работа поддержана государственным бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0006 и FWNR-2022-0020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hrdlickova R., Toloue M., Tian B.* 2017. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. WIREs RNA. V. 8. P. e1364.
Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T. 2018. The human transcription factors. Cell. V. 172. P. 650.
Tsukanov A. 2021. enREST, <https://github.com/ubercomrade/enrest>

ТАНДЕМНО ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В СОСТАВЕ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМЫ W У ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА

К. Н. Цуканова^{1,*}, М. М. Кулак¹, С. А. Галкина¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: tsukanovaksenia03@gmail.com

У организмов с хромосомным определением пола в кариотипах различают аутосомы и половые хромосомы. Аутосомы — хромосомы, одинаковые в мужских и женских организмах, а половые хромосомы — те, по которым отличаются мужские и женские особи. В зависимости от того, какой пол является гетерогаметным, выделяют системы половых хромосом XX/XY и ZW/ZZ. Несмотря на то, что система половых хромосом ZZ/ZW у птиц описана довольно давно, механизм детерминации пола остается неизвестным. Существуют две гипотезы: согласно первой, пол зависит от соотношения Z-хромосом и аутосом, согласно второй — специфичная для самок W-хромосома содержит доминантный ген, детерминирующий развитие яичников. Организация W-хромосомы наилучшим образом изучена у домашней курицы — показано, что в ее составе около 50 млн п.н., при этом всего 28 генов, тогда как ~40 млн п.н. занимают различные повторяющиеся последовательности (Bellott et al., 2017, Komissarov et al., 2018). Для остальных птиц точное строение W-хромосомы неизвестно, что затрудняет формулировку каких-либо обобщающих выводов о ее роли в регуляции половой дифференцировки.

Цель нашей работы — изучить строение гетерохроматиновой части W-хромосомы у японского перепела *Coturnix japonica* (Phasianidae, Galliformes). В ходе работы мы картировали известные тандемно повторяющиеся последовательности (ТП) на хромосоме W в фазе ламповых щеток (ЛЩ) методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и составили ее цитогенетическую карту. На пике стадии ЛЩ в составе W-хромосомы можно различить 17 хромомеров. Гетерохроматиновый блок из 8 хромомеров обогащен ТП CjarSAT и CJA-ApaI. CjarSAT занимает также прицентромерные DAPI-позитивные хромомеры. Другие ТП обнаружены в терминальных хромомерах Wqter и Wpter. Положение Cjar31B совпадает с BglII, оба ТП локализируются в районе центромеры, так же, как и в микрохромосомах. Только два хромомера, несущие небольшие латеральные петли оказываются не занятыми ТП. По-видимому, именно здесь должны располагаться W-сцепленные гены. Картированные ТП не являются W-специфичными, они обнаруживаются в составе и других хромосом, что подтверждается в том числе результатами FISH. В целом, W-специфические повторяющиеся последовательности сильно различаются между разными видами (Yamada et al., 2006). Выполняют ли картированные нами повторы перепела структурную или, возможно, регуляторную роль, пока остается непонятным. Однако детальные данные о составе W-хромосомы, несомненно, важны для выяснения ее роли в половой дифференцировке у птиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bellott D.W., Skaletsky H., Cho T.-J., Brown L., Locke D., Chen N., Galkina S., Pyntikova T., Koutseva N., Graves T., Kremitzki C., Warren W.C., Clark A.G., Gaginskaya E., Wilson R.K. et al.* 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. Nat. Genet. V. 49. P. 387.
Komissarov A.S., Galkina S.A., Koshel E.I., Kulak M.M., Dyomin A.G., O'Brien S.J., Gaginskaya E.R., Saifitdinova A.F. 2018. New high copy tandem repeat in the content of the chicken W chromosome. Chromosoma. V. 127. P. 73.
Yamada K., Nishida-Umehara C., Ishijima J., Murakami T., Shibusawa M., Tsuchiya K., Tsudzuki M., Matsuda Y. 2006. A novel family of repetitive DNA sequences amplified site-specifically on the W chromosomes in Neognathous birds. Chromosome Res. V. 14. P. 613.