Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) –
обособленное подразделение Институт биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук

На правах рукописи

Башмакова Евгения Евгеньевна

ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ Ca^{2+}-РЕГУЛИРУЕМОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Франк Людмила Алексеевна

Красноярск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшей задачей современной биотехнологии является создание новых высокоспецифичных и чувствительных аналитических систем для применения в медицине, генетике, экологии, микробиологии и других смежных областях, поскольку с развитием этих наук спектр диагностически важных мишеней постоянно расширяется.

Аналитические методы, применяемые в медицинской генетике, можно условно разделить на методы генетического анализа, направленные на выявление известных клинически значимых вариаций ДНК, и методы, направленные на поиск новых вариантов и установление их значимости. Однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) является наиболее распространенным типом генетической изменчивости [1, 2]. Эти вариации ДНК относительно равномерно распределены по всему геному как в кодирующих, так и в регуляторных областях генов и могут приводить к изменению структуры и функции белков, а также влиять на экспрессию затронутого гена.

В настоящее время существует множество методов по поиску новых SNP и выявлению их ассоциации с различными заболеваниями с использованием высокотехнологичных подходов геномного секвенирования с высокой пропускной способностью (Invader анализ, Perlegen Genotyping Platform, Affymetrix GeneChips, Illumina’s Infinium Beadchips) [3]. В то же время для рутинного скринига SNP с известной локализацией и установленной значимостью используют более простые и недорогие подходы, такие как TaqMan анализ, пиросеквенирование, аллель-специфическая гибридизация [3]. Многие из этих систем основаны на регистрации светового сигнала и используют флуоресцентные или хемилюминесцентные репортеры. В связи с этим особый интерес представляет далеко не исчерпанный потенциал аналитических систем с использованием биолюминесцентных репортеров. Высокий квантовый выход биолюминесцентых реакций, высокое отношение сигнал-шум, доступность ключевых репортерных элементов –

люцифераз и люциферинов, а также наличие современных высокочувствительных фотометров различного формата определяют перспективность таких разработок.

Одним из направлений исследований лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН является разработка методов молекулярного микроанализа на основе биолюминесцентных белков особого типа – Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов.

Эти белки представляют собой стабильные нековалентные комплексы апобелка (одноцепочечный полипептид с молекулярной массой около 20 кДа) и предокисленного субстрата – пероксицелентеразина. Присоединение ионов кальция вызывает декарбоксилирование субстрата, которое сопровождается выделением кванта голубого света (максимумы биолюминесценции находятся в диапазоне от 460 до 480 нм, в зависимости от организма, из которого выделен белок). В настоящее время доступны рекомбинантные аналоги этих белков и интенсивно разрабатываются различные аналитические системы *in vitro* и *in vivo* с использованием фотопротеинов в качестве высокочувствительных репортеров. В том числе в литературе имеются единичные данные о применении Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в различных генах.

Для одного из фотопротеинов – обелина гидроидного полипа *Obelia longissima*, сайт-направленным мутагенезом аминокислот целентеразин-связывающей области белка получена группа мутантных вариантов с измененными биолюминесцентными свойствами. Например, вариант с заменой W92F,H22E с максимумом излучения при 387 нм и вариант с заменой Y138F с максимумом при 493 нм, названные «цветными обелинами» (фиолетовым и зеленым, соответственно) обладают еще и разными кинетиками сигнала (k_d = 0,6 c^{-1} и 6,1 c^{-1}, соответственно). На основе этих белков как репортеров был разработан одновременный иммуноанализ двух мишеней в одном образце [4, 5]. При этом биолюминесценция обоих репортеров инициируется единичным впрыском раствора $CaCl_2$, а разделение сигналов осуществляется с помощью спектрального и временно́го разрешения.

Целью настоящей работы являлась разработка способа одновременного выявления нескольких однонуклеотидных полиморфизмов на основе цветных вариантов Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина и демонстрация его потенциальных возможностей для выявления клинически значимых мутаций.

Для выполнения данного исследования требовалось решить следующие экспериментальные задачи:

1. Оптимизировать способ химического синтеза биоспецифических коньюгатов цветных вариантов обелина – ключевых репортерных молекул при выявлении SNP биолюминесцентным способом.

2. Разработать биолюминесцентный способ одновременного выявления нескольких полиморфизмов, локализованных в разных участках генома, на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции.

3. Показать пригодность предлагаемого способа SNP-генотипирования на примере исследования полиморфизмов гена MC1R у пациентов с диагнозом меланома и здоровых доноров.

Положения, выносимые на защиту:

1. Получены мутантные варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками и разработан сайт-направленный синтез их коньюгатов с биоспецифическими молекулами, обеспечивающий высокий выход целевых продуктов (до 70%).

2. Разработан способ одновременного выявления нескольких однонуклеотидных полиморфизмов на основе мультиплексной ПЦР и универсальных биолюминесцентных репортеров – коньюгатов цветных обелинов с биоспецифическими молекулами.

3. Установлена распространенность полиморфизмов гена MC1R (R151C, I155T, R160W, R163Q, D294H) среди населения Красноярского края, их взаимосвязь с риском развития меланомы и рядом клинико-морфологических характеристик заболевания.

Все результаты данной работы получены впервые и могут быть использованы для создания отечественных высокоэффективных и чувствительных биолюминесцентных методов для выявления известных однонуклеотидных полиморфизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда (проекты № 14-14-01119 и 14-35-00107), а также мегагранта "Биолюминесцентные биотехнологии" по Постановлению Правительства РФ № 220 от 9 апреля 2010 г. (договор № 11.G34.31.0058, 2011-2013 гг.).

Результаты диссертационной работы докладывались на международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых СФУ (Россия, Красноярск, 2014), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва, 2014), Международной конференции и выставке по аналитическим и биоаналитическим методам (Китай, Пекин, 2014), Международной научной конференции молодых ученых биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов, Open Bio (Россия, Кольцово, 2015), Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Япония, Цукуба, 2016), конференциях молодых ученых ИБФ СО РАН и КНЦ СО РАН (Россия, Красноярск, 2015, 2017).

По результатам исследования опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, и 5 тезисов в сборниках научных трудов конференций.

Список принятых сокращений

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

OL – фотопротеин обелин

WT – рекомбинантный обелин дикого типа

Ctz – целентеразин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

RLuc – люцифераза мягкого коралла *Renilla reniformis*

OLuc – люцифераза глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*

GLuc – люцифераза морского рачка *Gaussia princeps*

ALucs – искусственные люциферазы

CBP – целентеразин-связывающий белок

BDC – бисдезоксицелентеразин

ПЦР – полимеразная цепная реакция

PEXT – реакция удлинения праймера

AS-PCR – аллель-специфическая полимеразная цепная реакция

SBE – минисеквенирование

LCR – лигазная цепная реакция

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

ddNTP – дидезоксинуклеозидтрифосфат

dNMP – дезоксинуклеозидмонофосфат

RFLP – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

PNA – пептидо-нуклеиновые кислоты

DASH – динамическая аллель-специфическая гибридизация

FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии

FP – флуоресцентная поляризация

Pi – неорганический фосфат

PPi – неорганический пирофосфат

SMCC – сукцинимидный эфир 4-(N-малеимидометил-) циклогексановой кислоты

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

БСА – бычий сывороточный альбумин

ATP – аденозинтрифосфат

AMP – аденозинмонофосфат

cAMP – циклический аденозинмонофосфат

Bio-dUTP – 5-[N-(N-биотинил-ε-аминокапроил)-3-аминоаллил]-2’-дезоксиуредин-5’-трифосфат

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

TEMED – тетраметилэтилендиамин

SDS – додецилсульфат натрия

ПСА – персульфат аммония

ДТТ – дитиотреитол

DMSO – диметилсульфоксид

кДа – килодальтон

k_d – константа спада биолюминесцентного сигнала

н.о. – нуклеотидное основание

п.о. – пара нуклеотидных оснований

FAM – 6-карбоксифлуоресцеин

OR – отношение шансов

CI – доверительный интервал

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1 Целентеразин-зависимые люциферазы: модифицированные варианты для биоаналитического применения

Люциферазы представляют собой ферменты, катализирующие окисление субстрата (люциферина) молекулярным кислородом. Продукт реакции представляет собой окисленное (часто декарбоксилированное) производное субстрата в возбужденном состоянии, которое релаксирует до основного состояния с выделением энергии в виде видимого света. Пара люцифераза-люциферин является ключевой частью биолюминесцентных систем, которые существенно различаются в зависимости от происхождения организма: бактерии, светляки, кишечнополостные и т. д. Большинство из известных в настоящее время светящихся организмов являются обитателями океана: медузы, гидроиды, гребневики, копеподы, кальмары, креветки и др. [6]. Биолюминесцентные системы вышеупомянутых организмов содержат люциферазы разных типов, но одну и ту же молекулу люциферина – целентеразин (Ctz), либо его производные. Все обнаруженные на сегодняшний момент целентеразин-зависимые люциферазы представляют собой относительно небольшие (16-36 кДа) одноцепочечные полипептиды, кДНК многих из них клонированы, получены рекомбинантные аналоги, в том числе коммерчески доступные. Химически синтезирован и коммерчески доступен целентеразин и различные его производные.

Существует два вида целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем (Рисунок 1.1): люциферазы классического типа, катализирующие окисление субстрата молекулярным кислородом (люциферазы *Renilla muelleri, Metridia longa* и др.) с образованием целентерамида, CO_2 и кванта света (Рисунок 1.1а), и люциферазы «особого типа» – Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины, выделенные, например, из *Aequorea victoria* и *Obelia longissima*. Они представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина

(одноцепочечного полипептида с молекулярной массой около 20 кДа) и молекулы 2-гидропероксицелентеразина, который прочно, но нековалентно иммобилизован в гидрофобной полости белка [6, 7, 8].

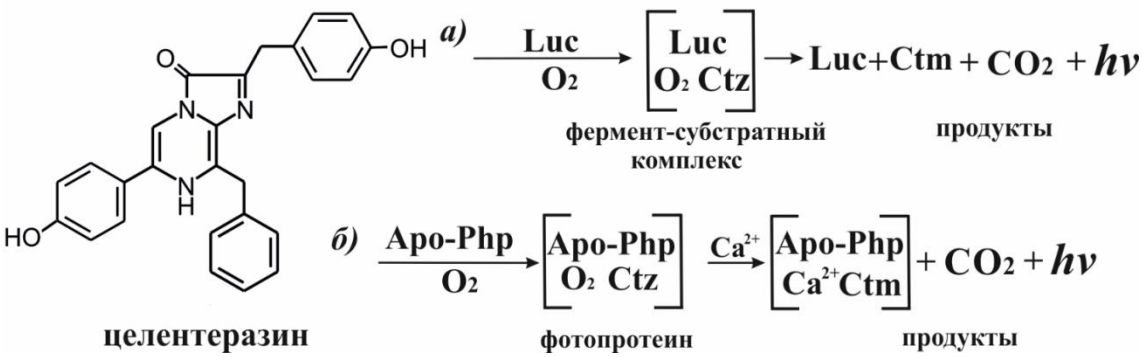

Рисунок – 1.1 Схема биолюминесцентной реакции целентеразин-зависимых люцифераз: *а)* реакция люциферазы классического типа; *б)* биолюминесцентная реакция фотопротеинов. Luc – люцифераза, Ctz – целентеразин, Ctm – целентерамид, Apo-Php – апофотопротеин.

Для первичной структуры фотопротеинов из разных видов характерна высокая гомология и все они имеют три Ca^{2+}-связывающих сайта так называемого EF-hand типа, характерного для всех кальций-связывающих белков. Присоединение Ca^{2+} вызывает небольшие конформационные изменения белка, приводящие к декарбоксилированию субстрата. Конечными продуктами реакции являются CO_2, целентерамид, иммобилизованный внутри апобелка с присоединенными ионами кальция, и квант света в диапазоне 460-495 нм, в зависимости от происхождения фотопротеина (Рисунок 1.1б).

1.1 Создание целентеразин-зависимых люцифераз с улучшенными физико-химическими свойствами

Помимо фундаментального аспекта явление биолюминесценции привлекает интерес исследователей как многообещающий аналитический инструмент:

высокий квантовый выход реакций, катализируемых люциферазами, и практически полное отсутствие шума обеспечивают высокую чувствительность анализа, использующего эти ферменты в качестве репортеров. Пригодность люцифераз к использованию в биоанализе определяется рядом условий: белки должны быть стабильными при хранении, в условиях проведения анализа и при химических модификациях, а также обладать определенными спектральными и кинетическими характеристиками биолюминесцентного сигнала. Несмотря на многообразие природных люцифераз, их физико-химические свойства часто не отвечают этим требованиям, что и понятно: критериями эволюционного отбора являются выживаемость и процветание вида в данных природных условиях. Создание люцифераз с улучшенными потребительскими свойствами сегодня проводится в лаборатории с использованием методов генетической инженерии и биоорганической химии.

Люцифераза мягкого коралла *Renilla reniformis* (36 кДа, RLuc, λ_{max} = 480 нм) была клонирована одной из первых [9] и наиболее полно охарактеризована к настоящему времени. Она широко используется в качестве репортера для биоимиджинга, поскольку может экспрессироваться практически во всех типах клеток. С целью улучшения термостабильности RLuc (период полураспада природного белка в сыворотке мыши короток и при 37°C составляет всего 0,5-1 ч) Loening с соавторами использовали так называемую полурациональную стратегию мутагенеза [10]. Основная идея данного исследования заключается в том, что эволюция имеет тенденцию к замене неблагоприятных аминокислот, которые дестабилизируют белок [11]. Таким образом, после анализа аминокислотных последовательностей группы аналогичных белков для замены в люциферазе выбирают те аминокислоты, которые уже заменены в результате природного отбора в консенсусных последовательностях. Используя этот подход, Loening с соавторами провели сравнительный анализ первичной структуры люциферазы *R. reniformis* и близких по сиквенсу белков из 14 других видов, в основном бактериальных. Мутации были выбраны в позициях, где RLuc существенно отличалась от консенсусной последовательности. В результате был создан вариант

RLuc8 с восемью аминокислотными заменами (A55T, C124A, S130A, K136R, A143M, M185V, M253L и S287L), которые существенно изменили характеристики фермента. Люцифераза RLuc8 продемонстрировала 200-кратное повышение устойчивости к инактивации в сыворотке мыши при 37°C, 4-кратное повышение квантового выхода реакции и смещение излучения на 5 нм в красную область спектра по сравнению с природной люциферазой RLuc. Далее, на основе RLuc8 было получено несколько вариантов белков со сдвигом в красную область спектра, но все они при этом существенно теряли квантовый выход биолюминесценции [12]. С помощью случайного мутагенеза из этих вариантов авторы получили несколько мутантов с максимумами в желтой и желто-оранжевой области с аналогом субстрата v-целентеразином (Рисунок 1.5в), а также мутант с максимумом в зеленой области спектра (λ_{max} = 521 нм), который обладал стабильностью исходной RLuc8 и почти двукратно увеличенным биолюминесцентным сигналом [13].

На основе люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* Hall с сотрудниками создал в 2012 г. новую целентеразин-зависимую люциферазу. Природная люцифераза представляет собой гетеродимерный белок, одна субъединица которого отвечает за биолюминесцентную активность (19 кДа, λ_{max} = 454 нм, OLuc-19), но не стабильна в отсутствие второй субъединицы с молекулярной массой 35 кДа. После 3-х раундов случайного мутагенеза субъединицы OLuc-19 была создана искусственная люцифераза, названная NanoLuc, как самая маленькая из известных на тот момент люцифераз [14]. Интенсивность люминесцентного сигнала NanoLuc (λ_{max} = 454 нм) увеличилась в 2,5 миллиона раз по сравнению с исходной люциферазой при полном отсутствии фоновой автофлуоресценции. Люцифераза продуцирует длительный сигнал, и в равных условиях ее удельная активность в 150 раз выше, чем у светляка *Photinus pyralis* или люциферазы *Renilla*. Фермент проявлял высокую стабильность и сохранял активность при инкубации вплоть до 55°C, а также в культуральной среде более 15 ч при 37°C. Наличие сигнальной последовательности обеспечивает секрецию NanoLuc в культуральную среду, и потому она подходит для биоимиджинга в реальном времени и без разрушения клеток [15, 16]. Показана

пригодность этой люциферазы также в качестве компонента гибридных белков для различных аналитических применений [17, 18]. В настоящее время данная люцифераза коммерчески доступна под названием NanoLuc® (Promega Co, США).

Inoue с соавторами создали альтернативный вариант NanoLuc на основе той же субъединицы OLuc-19 люциферазы *Oplophorus gracilirostris*, названной KAZ. Авторы синтезировали кодон-оптимизированный ген, на 72% идентичный NanoLuc, и назвали его NanoKAZ. Данный ген содержал в себе последовательность сигнального пептида люциферазы *Gaussia* для секреции белка в клетках CHO-K1 [19]. Спектральные характеристики и субстратная специфичность NanoKAZ были протестированы с разными аналогами целентеразина, и характеристики излучения сильно зависели от используемого субстрата. Мутантный вариант белка KAZ с тремя аминокислотными заменами – V44I, A54I и Y138I, был назван eKAZ, а его биолюминесцентная активность была в 66 раз выше, чем у исходного типа KAZ и в 7 раз выше, чем у NanoKAZ (во всех этих случаях в качестве субстрата использовали целентеразин). Субстратная специфичность eKAZ для C2- и/или C6-модифицированных аналогов целентеразина отличалась от таковой NanoKAZ. Таким образом, можно полагать, что эти три аминокислоты люциферазы eKAZ ответственны за узнавание субстрата целентеразина.

Для создания улучшенных вариантов люциферазы морского рачка *Gaussia princeps* (GLuc) (19,9 кДа), клонированной в 2002 г. [20], несколько аминокислот предполагаемого активного центра были модифицированы с помощью сайт-направленного мутагенеза [21]. Некоторые из новых мутантных вариантов продемонстрировали увеличение биолюминесцентного сигнала почти на порядок, с одновременным смещением излучения в красную область на 33 нм (λ_{max} = 503 нм) по сравнению с природной GLuc, что сделало их перспективными оптическими индикаторами для биоимиджинга. Улучшенные спектральные свойства были продемонстрированы на модели *in vivo* с использованием клеток метастаз меланомы B16 линии голых мышей BALB/c.

Создание искусственных люцифераз (ALucs), пригодных для использования в анализе, было описано в двух работах Kim с соавторами [22, 23]. Авторами были

проанализированы первичные последовательности 13-ти люцифераз веслоногих ракообразных (копепод). Из первичных последовательностей были выделены консенсусные аминокислоты и создан ряд искусственных люцифераз, отличающихся от любых существующих люцифераз копепод и обладающих уникальными оптическими свойствами. Для некоторых из них наблюдалась улучшенная термостабильность, а также изменение спектра, интенсивности и кинетики биолюминесцентного сигнала. Одновременно были исследованы субстрат-специфические свойства ALucs с использованием десяти коммерчески доступных синтетических производных целентеразина. Практическая пригодность некоторых вариантов ALucs как биолюминесцентных репортеров была продемонстрирована в анализе.

В 2000 г. была установлена пространственная структура фотопротеина обелина [7] и определены аминокислотные остатки целентеразин-связывающей полости этого белка. Далее было показано, что сайт-направленный мутагенез этих аминокислот может приводить к образованию мутантных вариантов обелина с существенно измененными спектрально-кинетическими характеристиками биолюминесценции. Например, единичная замена W92 → F привела к добавлению в спектре излучения мутанта OL-W92F новой полосы с λ_{max} = 390 нм с интенсивностью, равной интенсивности основной полосы свечения обелина дикого типа (OL-WT) при 485 нм. Кроме того, OL-W92F имел более быструю кинетику биолюминесценции по сравнению с OL-WT [24]. Это указывало на появление в системе продукта с иным строением молекулы.

При изучении химии биолюминесцентной реакции было показано, что продукт декарбоксилирования, целентерамид, в возбужденном состоянии может находиться в трех энергетически различных формах – нейтральной, фенолят-аниона и пиразин-N(4) анионной, в зависимости от окружения (Рисунок 1.2) [25].

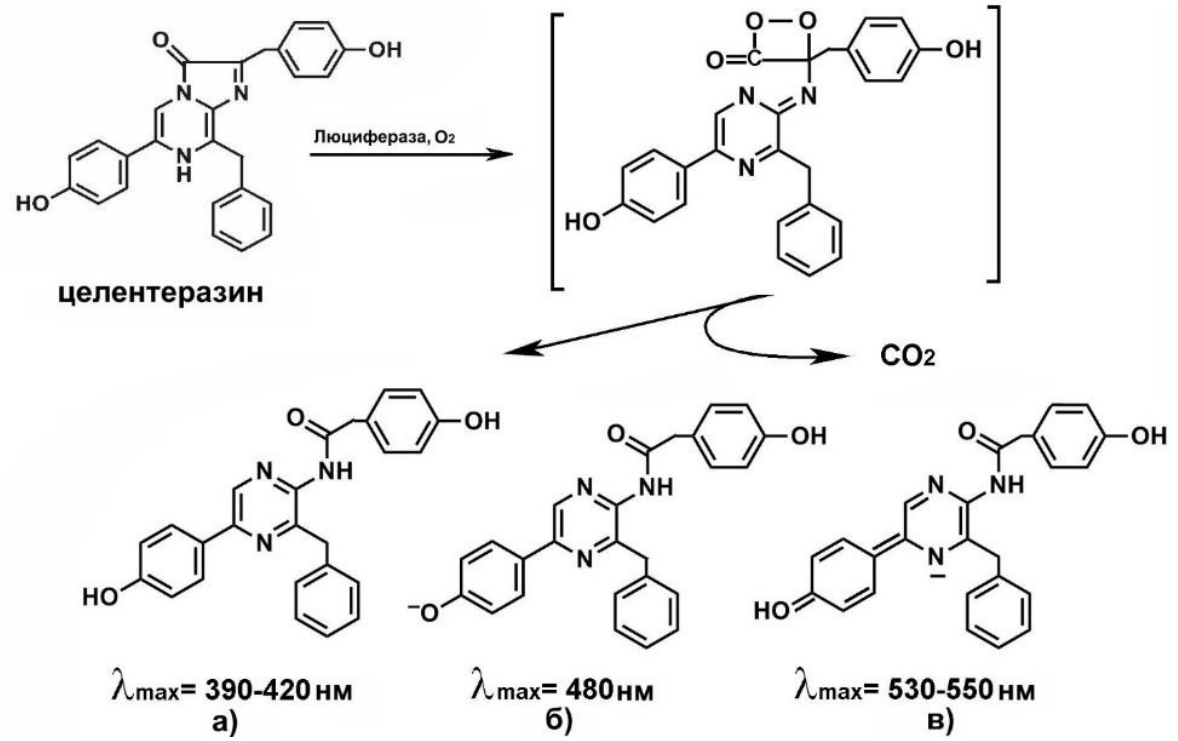

Рисунок 1.2 – Различные формы целентерамида: а) нейтральная, б) фенолят-анион, в) пиразин-N(4) анион имеют разные спектры излучения.

Таким образом, сайт-направленная замена аминокислот в целентеразин-связывающем сайте, вызывающая изменение его полярности и сети водородных связей, может привести к преимущественному образованию того или иного излучателя и соответствующему сдвигу спектра биолюминесценции. Именно этим, очевидно, можно объяснить изменение спектра биолюминесценции подобных мутантаных вариантов обелина.

С использованием сайт-направленного мутагенеза была получена большая группа мутантных вариантов обелина с измененными спектрами и кинетикой биолюминесценции, некоторые из которых приведены на рисунке 1.3.

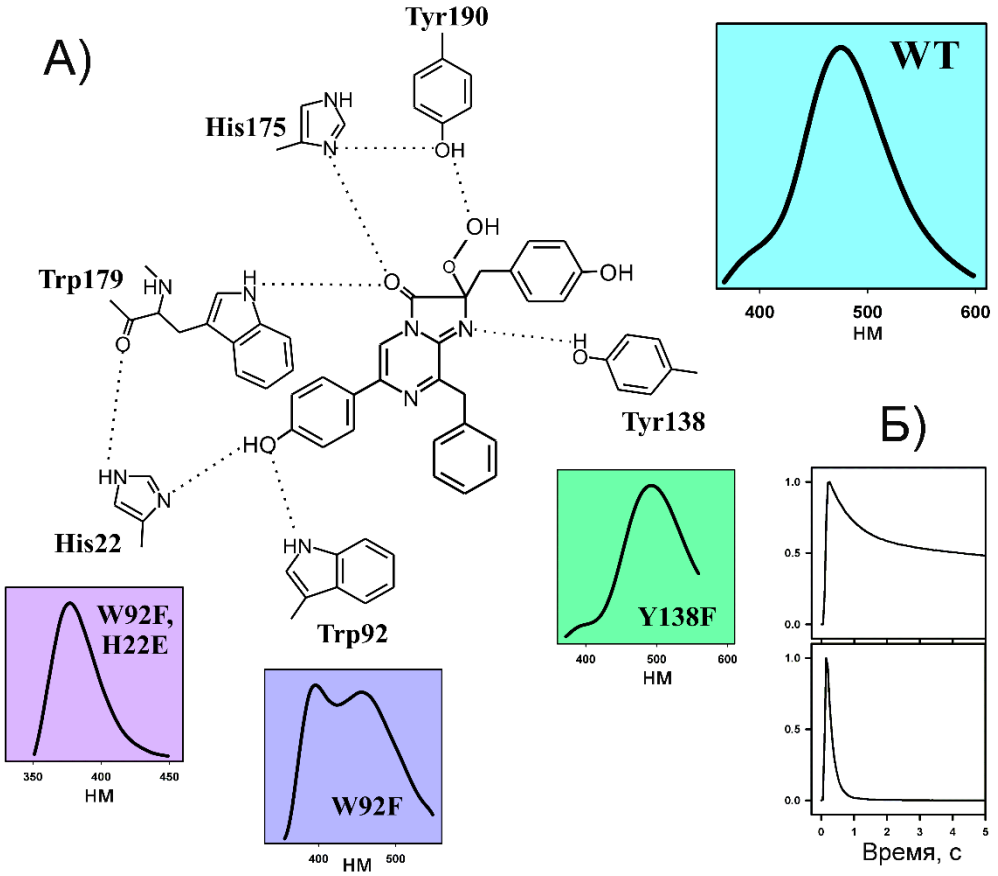

Рисунок 1.3 – А) Аминокислоты и сеть водородных связей, с помощью которых пероксицелентеразин иммобилизован в молекуле обелина. На вставках приведены спектры биолюминесценции обелина дикого типа (WT) и мутантных вариантов обелина. Б) Кинетика биолюминесценции OL-Y138F (верхний график) и OL-W92F,H22E (нижний график).

Среди этой группы были обнаружены два стабильных и активных мутанта обелина: с заменой W92F,H22E, испускающий быстрый (k_d = 0,6 c^{-1}) сигнал, сдвинутый в коротковолновую область (λ_{max} = 387 нм), и Y138F с медленным (k_d = 6,1 c^{-1}) сигналом, сдвинутым в длинноволновую область (λ_{max} = 493 нм) [4]. При этом перекрытие спектров излучения было незначительным (Рисунок 1.4А). Столь значительные различия в характеристиках биолюминесцентных сигналов позволили разделить их с помощью широкополосных оптических фильтров и временно́го разрешения (Рисунок 1.4Б).

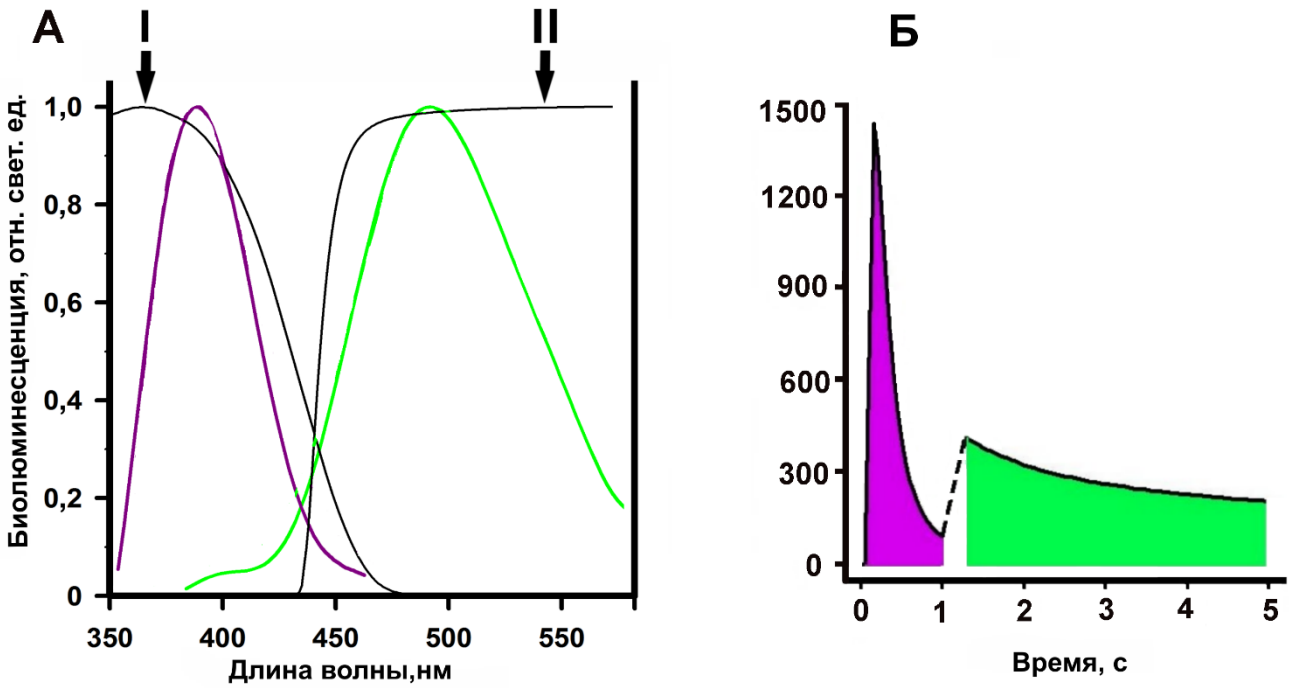

Рисунок 1.4 – А. Спектры биолюминесценции вариантов обелина с заменами W92F,H22E и Y138F (фиолетовая и зеленая линии, соответственно), черными линиями показаны спектры пропускания оптических фильтров ФС6 (I) и ЖС16 (II). В. Биолюминесцентный сигнал смеси обелиновых мутантов, записанный через фильтр I (быстрый сигнал фиолетового мутанта) и фильтр II (медленный сигнал зеленого мутанта). Пунктирной линией обозначено время смены фильтра; отн. свет. ед. – относительные световые единицы.

При использовании данных вариантов в качестве репортеров был разработан одновременный анализ двух мишеней в одном образце на основе спектрального и временно́го разрешения сигналов [5, 26]. Такой подход полезен с точки зрения уменьшения времени и стоимости анализа, а также исключает ошибки раздельного определения.

С помощью случайного и рационального мутагенеза было получено несколько мутантов другого фотопротеина – акворина с высокой термостабильностью [27]. Два двойных мутанта S32T,E156V и Q168R,L170I и мутант с заменами S32T,E156V,Q168R,L170I после 72-часовой инкубации при 37°C сохраняли 32, 61, и 75% биолюминесцентной активности, соответственно, по

сравнению с начальной. Следует отметить, что акворин дикого типа сохранил 8% своей активности при тех же условиях – результат, который указывает на стабильность фотопротеина в принципе.

1.2 Изменение характеристик биолюминесцентного сигнала при использовании химически синтезированных производных целентеразина

Структура целентеразина была установлена Shimomura и Johnson в 1972 г. [28], (Рисунок 1.5). В настоящее время синтезированы и исследованы в биолюминесцентных реакциях люцифераз и фотопротеинов несколько десятков аналогов данного субстрата [6], и постоянно появляется информация о синтезе и свойствах его новых производных [29, 30].

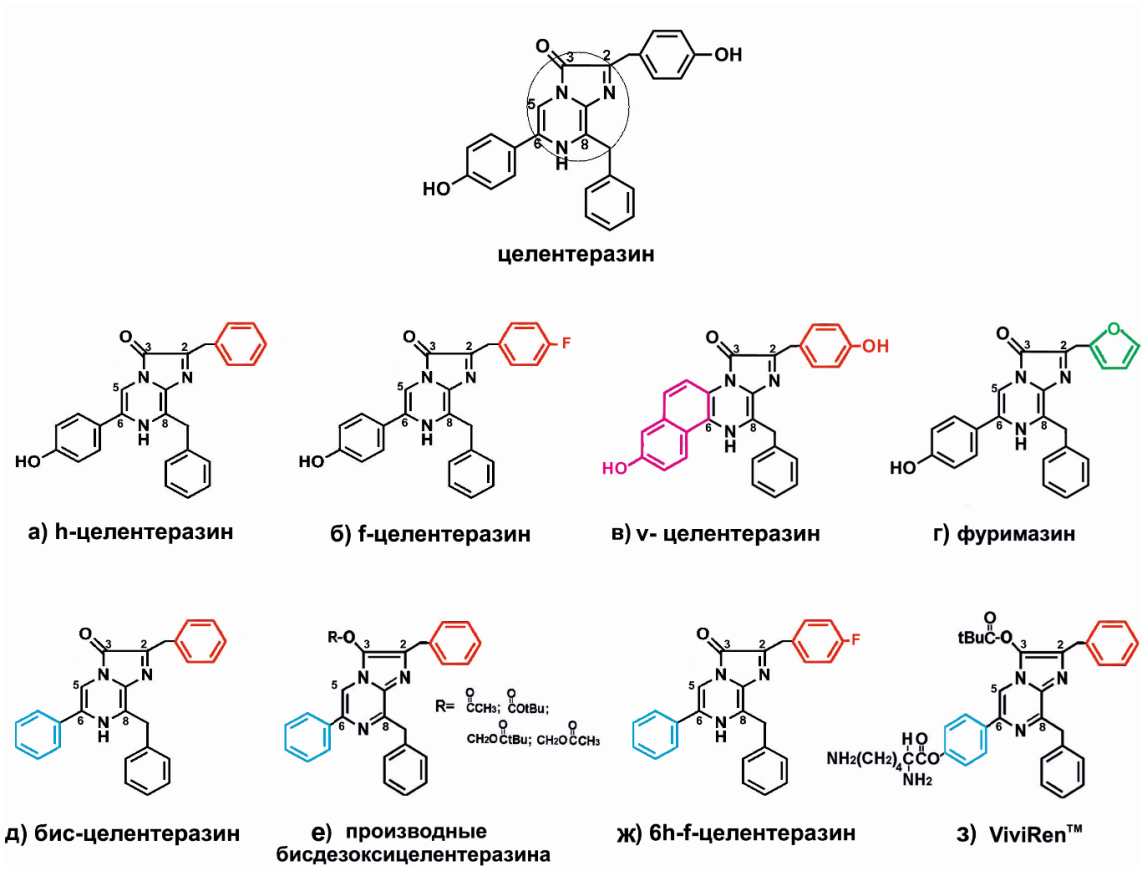

Рисунок 1.5 – Химические структуры целентеразина некоторых его аналогов. Кружком обведено имидазолпиразиновое кольцо.

Константным фрагментом во всех производных целентеразина является имидазолпиразиновое кольцо, а вариабельными – радикалы в положениях 2, 5, 6 и 8 (см. примеры на рисунке 1.5).

Было обнаружено, что ферменты могут использовать в качестве субстрата широкий спектр аналогов целентеразина, и излучаемый при этом биолюминесцентный сигнал может отличаться по спектру и кинетике. Выше несколько раз упомянуто использование неприродных производных целентеразина в качестве субстрата люцифераз и эффектах, которые при этом наблюдались.

На рисунке 1.5 представлены структурные формулы некоторых вариантов целентеразина. Использование фуримазина (Рисунок 1.5г) в качестве субстрата сдвигает спектр излучения в коротковолновую область с пиком при 460 нм в реакции с люциферазой NanoLuc [14]. Это коммерчески доступный продукт фирмы Promega Co, (США).

Спектр биолюминесценции v-целентеразина (Рисунок 1.5в) в реакции с желтым мутантом люциферазы *Renilla muelleri* имеет длинноволновый пик при 573 нм [31]. Следует отметить, что v-целентеразин нестабилен при хранении в растворе и полностью окисляется через 3 ч при 4°C. Для обеспечения стабильности авторами было предложено использовать его комплекс с Ca^{2+}-зависимым целентеразин-связывающим белком (CBP) из биолюминесцентной системы мягкого коралла *Renilla* [32]. В этом случае запуск биолюминесцентной реакции происходит при добавлении в раствор ионов Ca^{2+}.

Бисдезоксицелентеразин (BDC) (Рисунок 1.5е) в реакции с люциферазой *Renilla* [33] имеет существенно более медленную кинетику биолюминесцентной реакции, что делает его удобным субстратом для имиджинговых исследований. В этих производных карбонильная группа имидазолпиразинового кольца защищена различными радикалами, которые блокируют сайт присоединения кислорода в молекуле целентеразина. Защитные группы медленно отщепляются действием клеточных эстераз с образованием свободного BDC, который далее окисляется люциферазой. Таким образом, генерируется более длительный световой сигнал. Коммерческое название этого соединения «ViviRen™ Live Cell Substrate», и оно

также поставляется фирмой Promega Co, (США) (Рисунок 1.5з). Наряду с изменениями кинетики, данные производные имеют существенно более низкий уровень автолюминесценции, которая возникает при окислении природного целентеразина кислородом среды.

Таким образом, с помощью методов генетической инженерии и химического синтеза в настоящее время создано широкое разнообразие целентеразин-зависимых люцифераз, обладающих различными свойствами: повышенной стабильностью, измененными спектрами свечения (сдвинутыми как в коротко, так и в длинноволновую области), увеличенным квантовым выходом, а также ускоренной или замедленной кинетикой сигнала. Это создает условия для широкого использования люцифераз с измененными свойствами в качестве репортеров в разнообразных аналитических системах *in vitro* и *in vivo*.

2 Современные методы выявления однонуклеотидных полиморфизмов известной локализации

Однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) относительно равномерно распределены по всему геному человека как в кодирующих, так и в регуляторных областях генов и являются наиболее распространенным типом генетической изменчивости [1, 2]. SNP в кодирующей области могут привести к изменению структуры и функций белков, в то время как SNP в регуляторной области могут влиять на экспрессию затронутого гена. В настоящее время существует множество исследований по SNP картированию и выявлению ассоциации SNP с различными заболеваниями с использованием высокотехнологичных подходов с высокой пропускной способностью. Однако, для рутинного скрининга SNP с известной локализацией и установленной значимостью требуются простые, недорогие и надежные подходы. В рамках данного исследования мы проанализируем литературные данные, описывающие именно такие методы, созданные для определения SNP с известной локализацией.

Поскольку при генотипировании анализируется участок ДНК размером в несколько сотен пар оснований, большинство методов начинаются с целевой амплификации ДНК, чаще всего с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако для наработки целевого участка ДНК используют и другие способы, например, L-RCA реакцию (ligation-rolling circle amplification). В данном подходе зонд (padlock probe) при лигировании формирует кольцевую молекулу ДНК, и дальнейший синтез происходит на зонде по механизму катящегося кольца [34]. Примером генотипирования без амплификации является и технология структурно-специфического расщепления – Invader анализ, о котором более подробно будет сказано ниже.

Остальные этапы методов генотипирования включают: а) формирование аллель-специфических продуктов в реакции дискриминации (распознавания) аллеля и б) их идентификацию. В большинстве подходов эти два процесса разделены, хотя есть варианты, когда они выполняются параллельно.

2.1 Способы дискриминации аллеля

Дискриминация аллеля является основой генотипирования, поэтому подходы, используемые для этого, должны быть высокоспецифичными. Существуют способы определения аллельных вариантов с использованием ферментов, таких как ДНК полимеразы и ДНК лигазы, а также различные неферментативные методы. Наиболее популярными для дискриминации аллеля являются подходы, основанные на реакциях удлинения праймера, лигирования, ферментативного расщепления и гибридизации.

2.1.1 Удлинение праймера

К подходам дискриминации аллеля с использованием ДНК полимераз относятся надежные методы, основанные на удлинении аллель-специфического

праймера. В настоящее время существуют многочисленные вариации данного подхода, однако, можно выделить три основные группы: аллель-специфическое удлинение праймера (primer extension reaction PEXT, или allele specific extension ASE), аллель-специфическая ПЦР (AS-PCR) и аллель-специфическое включение нуклеотида или минисеквенирование (SBE single-base extension) (Рисунок 1.6).

Для PEXT и AS-PCR необходимы два аллель-специфических праймера, 3’-концевой нуклеотид которых комплементарен нормальному, либо мутантному варианту полиморфного сайта ДНК-матрицы. В случае полной комплементарности матрицы и аллель-специфического праймера происходит его удлинение ДНК-полимеразой, в противном случае синтез не происходит. Для AS-PCR, в отличие от PEXT реакции, помимо аллель-специфических праймеров используют общий обратный праймер для амплификации мишени. В случае с PEXT реакцией при полной комплементарности праймера и матрицы аплифицируется только одна цепь ДНК, а для AS-PCR за счет использования общего обратного праймера будет происходить накопление целевого продукта, как для классического варианта ПЦР с амплификацией обеих цепей.

Аллель-специфические праймеры могут иметь различные маркировки для дальнейшей идентификации полученных продуктов, например, флуоресцентные метки [35]. В технологиях с использованием чипов аллель-специфические праймеры с 5’-конца ковалентно иммобилизованы на поверхности, к ним присоединяется матрица и затем проводят PEXT реакции [36, 37].

В данных способах определения аллеля стремятся к полному подавлению амплификации неспецифичного фрагмента. В связи с этим, все методы базируются на использовании очень чувствительной к неспаренным нуклеотидам полимеразы, не имеющей 5’→3’ экзонуклеазной активности. Для контроля ложноположительного срабатывания полимеразы, приводящего к ошибочному генотипированию, эти методы требуют использования стандартных образцов с известным генотипом.

В настоящее время имеются коммерчески доступные отечественные наборы для определения клинически значимых SNP на основе аллель-специфического

удлинения (фирмы Литех, Синтол, ДНК-технология, Генотехнология и другие). К ним относятся комплексные наборы для молекулярно-генетического тестирования ряда патологий, связанных с метаболическими процессами (метаболизм фолатов, лактозы, кальция), риском сердечно-сосудистых заболеваний, в частности тромбофилии, а также исследование полиморфизмов онкогенов, таких как ген *BRCA* и многие другие.

При минисеквенировании или аллель-специфическом включении нуклеотида используют праймер без концевого комплементарного нуклеотида. Его отжиг осуществляется непосредственно перед целевым полиморфным сайтом, а далее праймер удлиняется на одно основание с использованием дидезоксинуклеотидов, не имеющих свободной 3’OH-группы, после включения которых рост цепи останавливается [38].

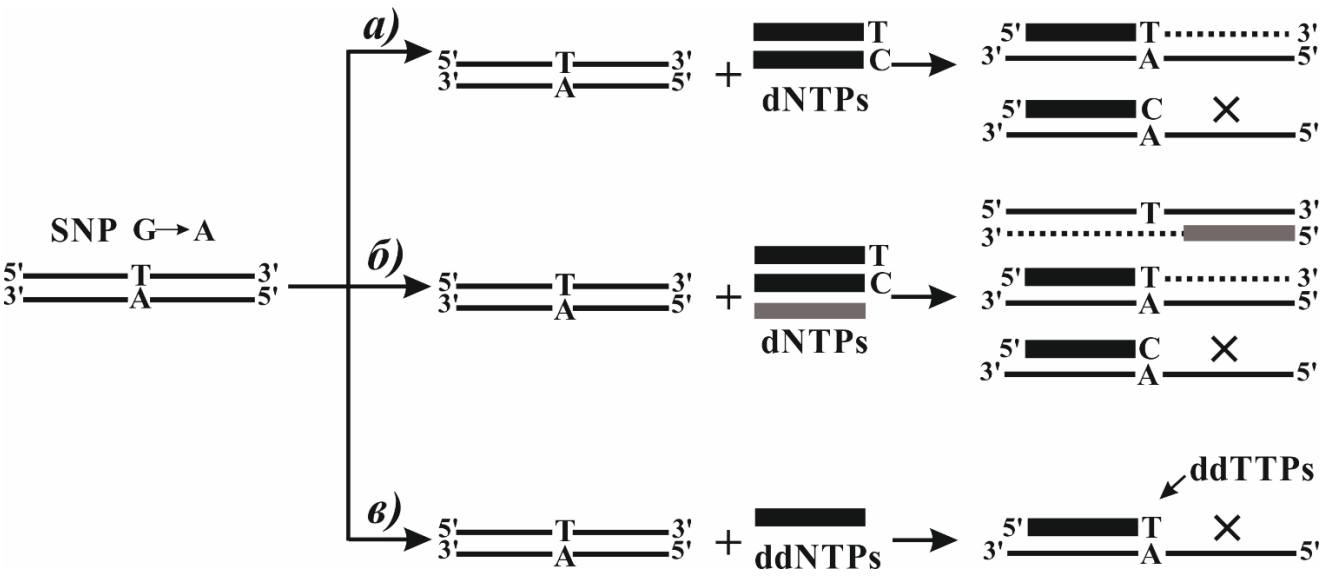

Рисунок 1.6 – Реакция дискриминации аллеля на основе удлинении алелль-специфического праймера. а) PEXT реакция, б) аллель-специфическая ПЦР, в) аллель-специфическое включение нуклеотида.

Для обнаружения полученных продуктов терминирующие нуклеотиды несут специфические метки, чаще всего флуоресцентные [39, 40]. В настоящее время доступны коммерческие системы для генотипирования на основе

минисеквенирования с детекцией продуктов различными методами, например, SNaPshot® Multiplex System (Applied Biosystems, США) с флуоресцентной детекцией, система MassARRAY iPLEX (Sequenom, США) с масс-спектрометрической детекцией [41]. У данных подходов высокая пропускная способность, которая, однако, увеличивает их стоимость. Для обслуживания таких систем требуется высококвалифицированный персонал.

2.1.2 Лигирование

Для дискриминации аллелей на основе реакции лигирования в так называемой лигазной цепной реакции (LCR) используют олигонуклеотиды, которые при отжиге на ДНК-матрице располагаются друг за другом, и лигирование которых происходит только в случае их полной комплементарности ДНК-матрице (Рисунок 1.7а). Для определения двух аллельных вариантов используют три олигонуклеотида, два из которых на 3’-конце несут нуклеотид, комплементарный нормальному, либо мутантному варианту и один общий олигонуклеотид, комплементарный последовательности сразу после полиморфного сайта.

Метод состоит из нескольких последовательных циклов: гибридизации, лигирования и денатурации и может осуществляться без предварительной амплификации целевого участка с помощь ПЦР. В таком случае с помощью LCR сразу при дискриминации аллеля амплифицируется нужный участок, аналогично аллель-специфической ПЦР.

В другом подходе на основе RCA реакции (rolling circle amplification), используют специфические зонды (padlock probe) (Рисунок 1.7б), формирующие при лигировании кольцевую молекулу ДНК, и дальнейший синтез на зонде приводит к накоплению кольцевых молекул [34].

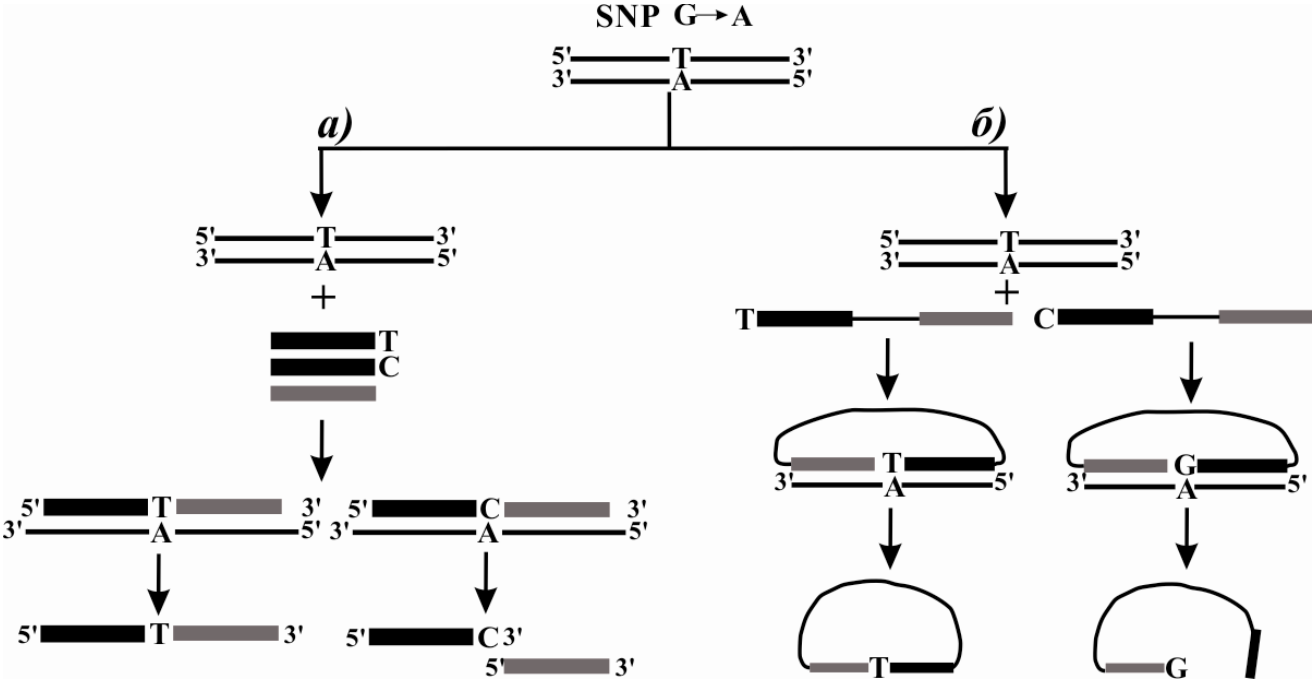

Рисунок 1.7 – Дискриминация аллеля на основе лигирования. а) лигазная цепная реакция, б) метод с использованием padlock зондов.

В методе на основе зондов типа padlock были разработаны улучшенные зонды, названные MIP (molecular inversion probes). MIP представляет собой зонд, состоящий из 110-120 нуклеотидов, 5’ и 3’-концы зонда отжигаются по обеим сторонам от полиморфного сайта с искомой SNP, при этом образуется кольцевая структура с зазором в один (полиморфный) нуклеотид. Следующий этап – это заполнение зазора одним из четырех нуклеотидов с последующим лигированием. Таким образом, после четырех отдельных реакций кольцевые структуры образуются только при встраивании комплементарного нуклеотида. Далее происходит амплификация образовавшейся кольцевой структуры [42, 43].

На основе реакции лигирования существуют коммерчески доступные наборы SNPlex™ Genotyping System (Applied Biosystems, США), позволяющие определять одновременно от 12 до 48 SNP.

2.1.3 Ферментативное расщепление

Инвазивное расщепление или Invader анализ – метод, в котором дискриминация аллелей происходит за счет активности структурно-специфических flap-эндонуклеаз, узнающих заходящие друг на друга участки ДНК со свободным 5’-концом во время репликации и репарации ДНК (Рисунок 1.8) [44].

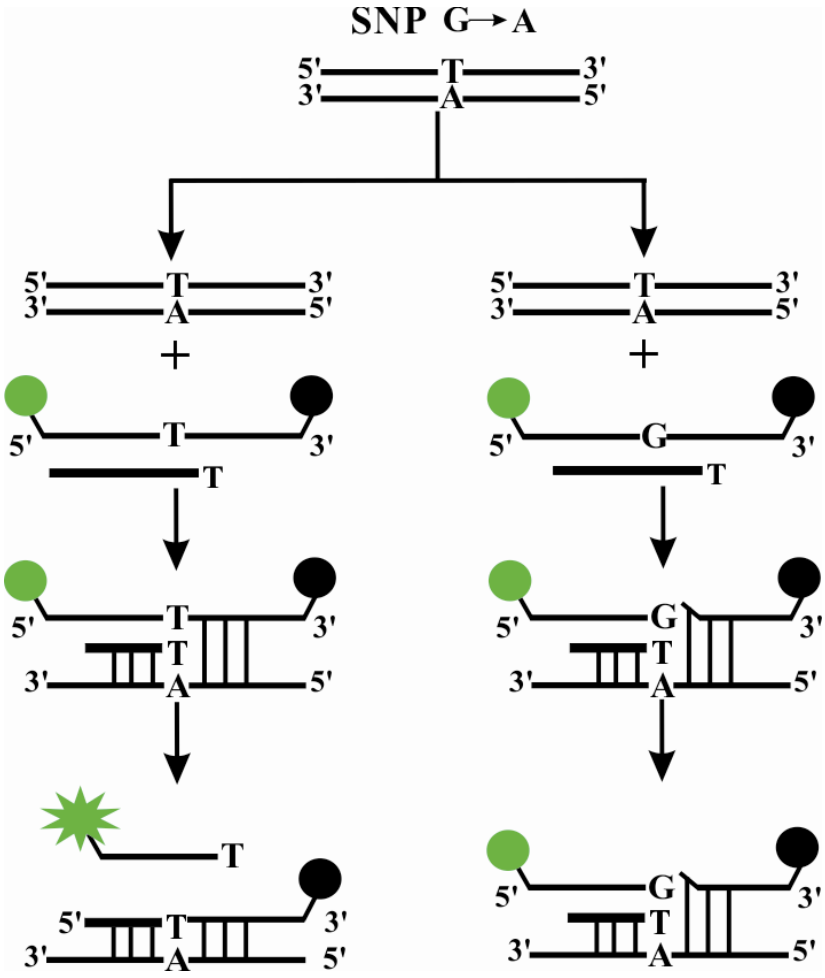

Рисунок – 1.8 Схема Invader анализа. Зеленым обозначен флуорофор, черный кружок – тушитель флуоресценции.

Принцип Invader анализа заключается в использовании трех олигонуклеотидных зондов – двух аллель-специфических и одного общего Invader зонда, которые перекрываются во время гибридизации на одноцепочечной ДНК матрице.

В этом подходе для детекции используют аллель-специфичный зонд с флуорофором на одном конце и тушителем на другом, эндонуклеаза расщепляет 3’-концевую часть аллель-специфичного зонда, происходит отделение флуорофора от тушителя, и генерируется флуоресцентный сигнал. В случае если олигонуклеотидный зонд на 5’-конце не комплементарен SNP сайту ДНК-матрицы, а комплементарен альтернативному варианту аллеля, то не образуется перекрывающейся структуры с сайтом узнавания эндонуклеазы, и зонд не расщепляется [45]. Для анализа Invader решающее значение имеет качество Invader зонда. Для успешного генотипирования 3’-концевой нуклеотид должен быть строго над полиморфным сайтом, смещение 3’-конца на одно основание может привести к ложноположительным или ложноотрицательным сигналам.

В настоящее время имеются коммерчески доступные наборы для определения полиморфизмов генов, кодирующих факторы свертывания крови II и V, а также гена уридин-дифосфат-глюкуронидазы 1 (UGT1A1): Invader Factor II assay, Invader Factor V assay, Invader UGT1A1 Molecular Assay (Hologic, США).

Метод генотипирования с использованием эндонуклеаз рестрикции – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP-restriction fragment length polymorphism) является одним из первых методов генотипирования и включает в себя стадию амплификации целевого участка и его дальнейшее расщепление соответствующей рестриктазой. В случае если мутация приводит к возникновению или исчезновению сайта рестрикции, генотипирование осуществляют «естественным» методом RFLP [46, 47], в противном случае вводят искусственные сайты с использованием мутагенных праймеров [48, 49] с дальнейшей детекцией полученных продуктов гель-электрофорезом [50].

Полученные продукты детектируют с помощью гель-электрофореза и по комбинации полос разных длин определяют соответствующие генотипы. Преимуществом данного подхода является небольшая стоимость, которая зависит только от цены используемого для рестрикции фермента, однако к недостаткам можно отнести низкую производительность и недостаточную чувствительность детектирования.

2.1.4 Гибридизация

Основным преимуществом ферментативных методов является высокая точность распознавания однонуклеотидных замен в последовательности ДНК. Помимо использования ферментов для генотипирования SNP применяют неферментативные методы, точность которых должна быть сопоставима с ферментативными подходами. Аллель-специфическая гибридизация – распространённый метод определения SNP, в котором используются аллель-специфические олигонуклеотиды, гибридизующиеся с целевой последовательностью ДНК, содержащей полиморфный сайт. Каждый олигонуклеотид образует идеальный дуплекс с одним аллелем и «неправильно» спаренный дуплекс с другим аллелем, различающиеся по своей температуре плавления. Правильно спаренный дуплекс алель-специфического олигонуклеотида с ДНК-матрицей, имеет бóльшую температуру плавления по сравнению с дуплексом, содержащим одно некомплементарное основание.

Способы выявления наличия двух видов дуплексов составляют основу обнаружения SNP. Например, при определенных условиях ошибочно спаренный дуплекс денатурирует, в то время как правильно спаренный аллель остается связанным с аллель-специфическом олигонуклеотидом. Существует ряд методов повышения чувствительности гибридизационного анализа [51].

Анализ TaqMan, в котором реакция дискриминации аллеля оуществляется за счет 5’-нуклеазной активности ДНК-полимеразы, представляет собой аллель-специфическую гибридизацию совместно с ПЦР амплификацией. Данный подход был впервые описан Holland с соавторами [52].

В анализе TaqMan в дополнение к паре праймеров для амплификации используют аллель-специфические зонды (TaqMan-зонды), помеченные различными флуоресцентными красителями на 5’-конце и тушителями флуоресценции на 3’-конце. TaqMan-зонд гибридизуется с последовательностью ДНК-матрицы, содержащей полиморфный сайт и, в случае полной

комплементарности, при ПЦР амплификации зонд расщепляется под действием 5’-нуклеазной активности полимеразы, флуорофор отщепляется и флуоресцентный сигнал, соответствующий данному аллелю, растет (Рисунок 1.9).

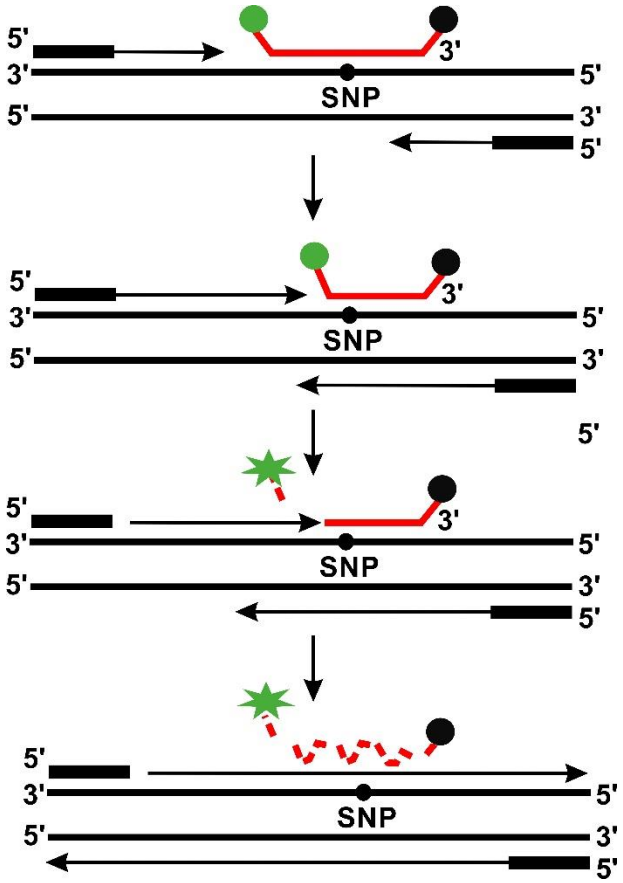

Рисунок 1.9 – Принцип метода TaqMan. Красным обозначен TaqMan-зонд, зеленый и черный кружки – флуорофор и тушитель флуоресценции, соответсвенно.

При неполной комплементарности аллель-специфического зонда и матрицы полученный дуплекс с неспаренным нуклеотидом имеет меньшую температуру плавления и отщепляется полимеразой целиком. Поскольку флуорофор и тушитель находятся в непосредственной близости, флуоресцентный сигнал не наблюдается.

В данной схеме экзонуклеазная активность зависит от разницы в температурах плавления зондов, в случае с парой А-Т возникает необходимость увеличения длины зонда, что может привести к снижению эффективности

резонансного переноса энергии флуоресценции. Эта проблема была решена в анализе с использованием TaqMan-зондов MGB-типа. MGB (minor groove binders) – небольшие молекулы, связывающиеся с малой бороздкой двуспиральной ДНК. MGB-группы присоединены к 3’-концу зонда рядом с тушителем и, сворачиваясь в малой бороздке ДНК дуплекса, стабилизируют процесс отжига. Таким образом, TaqMan-зонды MGB-типа могут быть очень короткими по сравнению со стандартными TaqMan-зондами [53], однако использование MGB-зондов существенно увеличивает стоимость анализа. В настоящее время данный подход широко используется в лабораторной практике для определения однонуклеотидных полиморфизмов. Коммерчески доступны TaqMan™ Master Mixes от Thermo Fisher Scientific (США), набор Applied Biosystems® TaqMan® Sample-to-SNP, а также отечественные наборы ФЛЭШ и АмплиФЛЭШ от ГенЭксперт.

2.2 Методы идентификации аллель-специфических продуктов

Выявление аллельного состава продуктов реакций дискриминации является заключительным этапом SNP-генотипирования. Полученные в результате реакции дискриминации аллеля продукты идентифицируют различными способами: по изменению массы (масс-спектрометрия), длины (электрофоретическая детекция) [46-50, 54, 55], регистрации светового сигнала (флуоресцентная, хеми- и биолюминесцентная детекция).

Широко применяется идентификация на основе масс-спектрометрической детекции: анализ PinPoint [56, 57], MassEXTEND [58, 59] SPC-SBE [60] – методы на основе удлинения праймера, которые используют MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) для обнаружения распознаваемых аллелей. В качестве матрицы используют полученные на этапе амплификации ПЦР-продукты, содержащие искомый полиморфный сайт. Каждый

удлиненный праймер соответствует одному из аллелей исследуемого SNP и с помощью последующего анализа массы продуктов определяют генотип.

В анализе PinPoint дискриминация аллеля осуществляется за счет реакции минисеквенирования (SBE), как это описано выше. Таким образом, праймер удлиняется только на одно основание, соответствующее полиморфному сайту, и генотип определяют по массе включенного ddNTP [56]. Данный способ не предусматривает какой-либо химической модификации нуклеотидов или праймеров. Однако основным ограничением такого подхода являлось снижение точности из-за низкого спектрального разрешения пика, особенно при обнаружении гетерозиготных вариантов A-T. Это ограничение было устранено с применением праймеров, имеющих несколько некомплементарных матрице оснований с 5’-конца. Количество таких свешивающихся «хвостов» различалось для используемых аллель-специфических праймеров и приводило к увеличению разницы масс между аллелями. Использование таких праймеров упростило применение данного метода для мультиплексного генотипирования, и Ross с соавторами впервые продемонстрировал его потенциал в 1998 году [57].

В методе MassEXTEND (Sequenom, США) для удлинения праймера используют смесь dNTPs и ddNTPs. Содержимое смеси выбирают таким образом, чтобы для одного аллеля удлинение праймера останавливалось при добавлении одного основания, а для другого аллеля – после добавления двух и более оснований. Это увеличивает разницу в массах между удлиненными продуктами, соответствующими обоим аллелям и улучшает точность генотипирования. Система MassEXTEND была автоматизирована на платформе MassARRAY (Sequenom, США) для высокопроизводительного генотипирования [61].

В подходе SPC-SBE используют ddNTPs, к которым присоединен остаток биотина. Таким образом, удлиненные продукты содержат биотин и их легко выделяют из реакционной смеси с использованием частиц, покрытых стрептавидином [60, 62]. При этом из смеси удаляют не удлиненные праймеры, которые могут перекрываться с удлиненными продуктами при масс-спектрометрическом анализе.

Для алелль-специфической гибридизации совместно с MALDI-TOF MS-детекцией для SNP-генотипирования применяют пептидо-нуклеиновые кислоты PNA (Peptide nucleic acid) – зонды [63, 64]. В PNA-зондах нуклеотиды связаны между собой не фосфодиэфирной, а пептидной связью (Рисунок 1.10) и более устойчивы к фрагментации в ходе анализа MALDI-TOF.

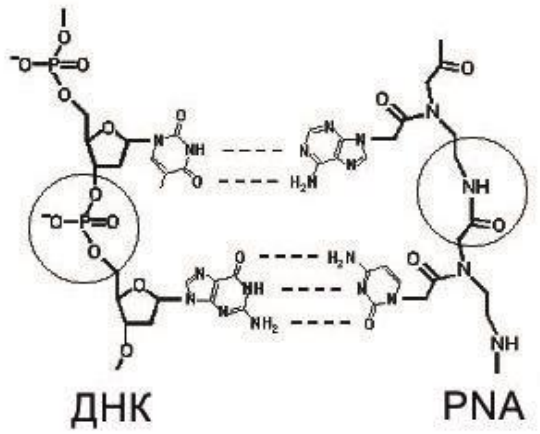

Рисунок 1.10 – Структура пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA). Кружками обозначены фосфодиэфирная и пептидная связи.

Кроме того, комплексы PNA-ДНК более стабильны, чем комплексы ДНК-ДНК с той же последовательностью, и одно некомплементарное основание, расположенное в центре дуплекса зонд-матрица, снижает температуру плавления на 8-20°C. Thomas с соавторами применяли метод удлинения праймера для высокопроизводительного генотипирования с масс-спектрометрической детекцией при анализе онкогенной мутации человека [65].

Jaremko с соавторами описывают генотипирование SNP образцов ДНК, выделенных из фиксированных формалином тканей, иммобилизованных в парафиновые блоки (FFPET) [66]. Работа с данным материалом усложняется тем, что ДНК сильно разрушается при хранении FFPET, но использование тканей, иммобилизованных в парафиновые блоки отлично удовлетворяют потребность в долгосрочных клинических исследованиях. Используя подходы MALDI-TOF MS и TaqMan, авторы генотипировали ДНК из FFPET в формате с относительно высокой

пропускной способностью. Horn с соавторами подтвердили надежность данного подхода. Пять образцов ДНК были выделены из образцов опухолей FFPE и проанализированы на наличие 31 SNP разных генов с использованием подхода на основе удлинения праймера с масс-спектрометрической детекцией [67].

2.2.1 Флуоресцентная детекция

Регистрация светового сигнала при флуоресцентной или хемилюминесцентной детекции аллельных вариантов в настоящее время является наиболее широко используемым методом, позволяющим выявлять однонуклеотидные полиморфизмы с достаточно высокой чувствительностью.

Одним из широко известных подходов такого генотипирования SNP является аллель-специфическая ПЦР с детекцией в режиме реального времени. При этом используют интеркалирующие флуоресцентные красители, связывающиеся с двухцепочечной ДНК [68], либо модифицированные флуоресцентными красителями dNTPs и ddNTPs, которые встраиваются в амплифицируемую последовательность в ходе ПЦР (большинство технологий с применением минисеквенирования и удлинения праймера используют именно этот подход) [36, 39, 42, 43, 69]. Преимуществами данного способа являются: детекция ПЦР-продуктов в процессе реакции («в реальном времени»), автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов, а также возможность количественной оценки специфической последовательности ДНК.

Динамическая аллель-специфическая гибридизация (DASH) является еще одной методом, на основе флуоресцентной детекции [70]. В этом случае аллель-специфический зонд, комплементарный SNP-содержащему участку мишени, гибридизуется с ним в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя. Далее постепенно повышают температуру и следят за флуоресцентной кривой плавления. Флуоресцентный сигнал наблюдается только для двухцепочечной ДНК, а при денатурации дуплекса зонд-целевая матрица резко

снижается. DASH был реализован в чиповом формате, что позволяет быстро генерировать кривые плавления на миниатюрной платформе [71].

Помимо интрекалирующих красителей в методах с флуоресцентной детекцией, в том числе с детекцией в режиме реального времени, используют такие подходы, как флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) и флуоресцентная поляризация (FP).

2.2.1.1 Флуоресцентный резонансный перенос энергии

Одним из наиболее популярных подходов генотипирования SNP с применением флуоресценции является анализ на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). Данное физическое явление возникает при сближении двух флуоресцентных групп, в случае, когда спектр излучения флуорофора-донора перекрывается со спектром возбуждения флуорофора-акцептора, при этом энергия донора переносится на акцептор и наблюдается его излучение.

Для генотипирования SNP применяют различные стратегии анализа с использованием FRET, основанные на разделении двух близко расположенных флуоресцентных групп, при котором значительно снижается эффективность или полностью прекращается передача энергии. Одним из подходов на основе FRET является метод молекулярных маяков (molecular beacons), которые представляют собой одноцепочечные олигонуклеотиды, имеющие на противоположных концах флуорофор и тушитель (Рисунок 1.11). Центральная последовательность олигонуклеотида (петля) комплементарна целевому участку с полиморфным сайтом. На каждом конце нуклеотида имеются 5-6 комплементарных оснований, которые гибридизуются друг с другом с образованием шпилечной структуры, и флуорофор с тушителем находятся в непосредственной близости.

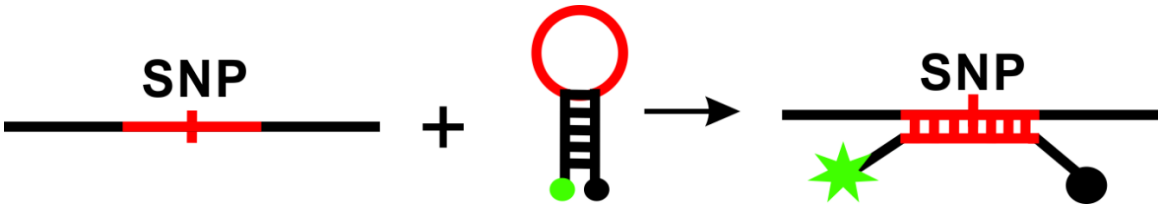

Рисунок – 1.11 Принцип работы молекулярных маяков. Зеленым кружком обозначен флуорофор, черным – тушитель.

После гибридизации зонда с мишенью флуорофор и тушитель пространственно разделяются, и наблюдается флуоресцентный сигнал при фотовозбуждении флуорофора. Данный подход успешно применяли совместно с padlock зондами для определения однонуклеотидных полиморфизмов [72, 73].

Принцип FRET широко используется в анализах TaqMan, Invader, детекция на основе FRET также была успешно применена для генотипирования совместно с реакциями дискриминации на основе лигирования [74, 75], аллель-специфического удлинения праймера [76] и аллель-специфической ПЦР [77].

2.2.1.2 Флуоресцентная поляризация

Детекция SNP с использованием флуоресцентной поляризации основана на изменении степени поляризации в зависимости от размера молекулы, к которой присоединен флуоресцентный краситель. Данный подход в сочетании с реакцией аллель-специфического включения нуклеотида (SBE) с использованием флуоресцентно-меченных дидезоксинуклеотидов продемонстрировали На и Kwok [78].

Метод флуоресцентной поляризации (анизотропии) (FP) основан на явлении, при котором при возбуждении флуоресцентной молекулы плоскополяризованным светом она излучает поляризованный флуоресцентный свет в той же плоскости при условии, что молекулы остаются неподвижными между возбуждением и излучением.

Продукты удлиняются на один терминирующий нуклеотид, несущий специфический флуоресцентный краситель, при этом краситель связан не с одним нуклеотидом, а с более крупной молекулой олигонуклеотида.

При постоянной вязкости и температуре FP прямо пропорциональна объему молекулы, который прямо пропорционален молекулярному весу. Если флуоресцентная молекула большая (с высокой молекулярной массой), она вращается и медленно перемещается в пространстве, при этом FP сохраняется. Если молекула мала (с низкой молекулярной массой), она вращается и падает быстрее, а FP в значительной степени теряется (деполяризуется) [79].

Преимуществом метода является использование меньшего количества флуоресцентных красителей по сравнению с FRET и использование более дешевых зондов. Недостатком такого подхода является, главным образом, то, что многие факторы могут влиять на измерение флуоресцентной поляризации (неспецифические взаимодействия между флуоресцентными красителями и компонентами реакционной смеси, вязкость раствора и температура), приводя к увеличению шума в полученном сигнале. Тем не менее, данный способ был успешно применен для визуализации продуктов таких реакций дискриминации аллелей, как SBE [79], гибридизация [80], Invader [81], и TaqMan [82].

2.2.2 Хемилюминесцентная и биолюминесцентная детекция

Хеми- и биолюминесцентные способы детекции аллельных вариантов по сравнению с флуоресцентными характеризуются высоким отношением сигнал-шум, поскольку практически отсутствует фоновое свечение, а также отсутствием необходимости отсечения сигнала фотовозбуждения.

Одним из наиболее известных методов генотипирования с биолюминесцентной детекцией является пиросеквенирование – метод секвенирования ДНК в режиме реального времени. В данном подходе используется 4 фермента: ДНК-полимераза, АТР-сульфурилаза, АТР-зависимая люцифераза и апираза, работающие по следующей схеме:

$$(ДНК)_N + dNTPs \rightarrow (ДНК)_{N+1} + PPi \text{ (ДНК-полимераза)}$$

$$PPi \rightarrow ATP \text{ (АТР-сульфурилаза)}$$

$$ATP + \text{люциферин} \rightarrow \text{оксилюциферин} + \text{свет (люцифераза)}$$

$$ATP \rightarrow AMP + 2Pi \text{ (апираза)}$$

$$dNTPs \rightarrow dNMPs + 2Pi \text{ (апираза)}$$

В первой реакции при удлинении цепи ДНК высвобождается пирофосфат, который под действием сульфурилазы превращается в АТР. Далее АТР вступает в реакцию, катализируемую АТР-зависимой люциферазой, сопровождаемую испусканием света. Апираза удаляет неиспользованные нуклеотиды и АТР в каждом цикле удлинения ДНК. Для работы данной схемы нуклеотиды добавляются по одному, и световой реакции не произойдет, если добавляемый нуклеотид некомплементарен исходной матрице. Пиросеквенирование широко применяют для генотипирования SNP с известной локализацией [83-85], а также для определения небольших инсерций и делеций [86]. Недостатком данного подхода является использование трех дополнительных ферментов, что увеличивает стоимость анализа. Коммерчески доступны наборы для определения ряда клинически значимых SNP на основе пиросеквенирования «АмплиСенс Пироскрин» (Интер Лаб Сервис, Россия).

Использование биолюминесцентного фотопротеина акворина для детекции SNP было предложено Zerefos с соавторами в 2006 г. на примере генотипирования 6-ти SNPs в гене, кодирующем лектин, связывающий маннозу (Mannose Binding Lectin – MBL2), который является ключевым компонентом врожденной иммунной системы [87]. В данном подходе для дискриминации аллеля применяли PEXT реакцию на заранее аплифицированном ПЦР фрагменте гена, содержащем все шесть исследуемых полиморфных сайтов.

При этом аллель-специфические праймеры на 5’-конце несли полиаденилатный хвост. При удлинении аллель специфического праймера в полученный продукт включались остатки биотина за счет использования

биотинилированного производного дезоксиуридинтрифосфата (Bio-dUTP). Полученные продукты связывались в планшете через полиаденилатный хвост с политимидилатом, иммобилизованным на поверхности лунок. За счет остатков биотина удлиненные продукты связывались с химическим конъюгатом акворин-стрептавидин, биолюминесцентный сигнал которого регистрировали после внесения Ca^{2+}. В данном способе удлиненные продукты как для мутантного, так и для нормального варианта имели одинаковые полиаденилатные последовательности и выявлялись одним и тем же конъюгатом. Поэтому реакцию для каждого аллеля необходимо было проводить в отдельной пробирке и наносить полученные продукты в отдельную лунку планшета.

Tannous с соавторами предложили двойной био/хемилюминесцентный метод для одновременного генотипирования аллельных вариантов локуса IVS-1-110 гена глобина человека в одной лунке микропланшета [88] (Рисунок 1.12).

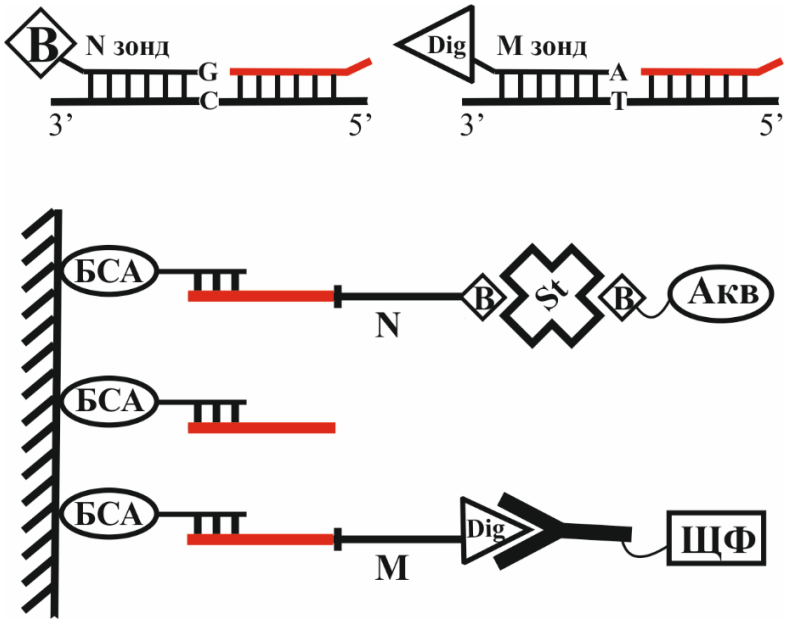

Рисунок 1.12 – Схема двойного анализа с био/хемилюминесцентной детекцией для генотипирования SNP на основе лигирования. БСА – бычий сывороточный альбумин, B – биотин, Dig – дигоксигенин, St – стрептавидин, ЩФ – щелочная фосфотаза, Акв – акворин. Красным обозначен общий зонд, N и M – нормальный и мутантный варианты, соответственно.

В качестве репортеров использовали фотопротеин акворин и щелочную фосфатазу. Участок геномной ДНК с искомым полиморфным сайтом получали путем ПЦР. Дискриминацию аллелей проводили путем одной реакции лигирования двух аллель-специфических зондов, помеченных либо биотином, либо дигоксигенином и одного общего олигонуклеотидного зонда, имеющего участок для иммобилизации на поверхности лунки. При полной комплементарности зондов и последовательности-мишени происходило ковалентное сшивание олигонуклеотидов лигазой, в противном случае никакой реакции не происходило. Продукты лигирования связывались в лунках микропланшета через общий зонд, имеющий последовательность, комплементарную олигонуклеотиду, иммобилизованному на поверхности. Выявление связавшихся продуктов лигирования в лунках планшета проводили с использованием смеси стрептавидин-акворинового коньюгата и химического конъюгата щелочной фосфатазы с антителами к дигоксигенину. Сначала после добавления Ca^{2+} измеряли биолюминесцентный сигнал от акворина, соответствующий нормальному аллелю. Затем лунки промывали, инкубировали щелочную фосфатазу с субстратом и измеряли хемилюминесценцентный сигнал, соответствующий мутантному аллелю. Генотип образца определяли по соотношению полученных люминесцентных сигналов.

Аналогичный двойной анализ с био- и хемилюминесцентной детекцией был предложен Konstantou с соавторами для генотипирования двух полиморфизмов гена MBL2 (-550 и -221) и полиморфизма гена цитохрома P450 CYP2D6 (CYP2D6*3). В данном подходе, по сравнению с вышеупомянутым способом, дискриминацию аллеля осуществляли в PEXT реакции, аллель-специфические праймеры на 5’-конце несли полиаденилат для связывания с поверхностью лунки. В данном подходе две PEXT реакции с использованием нормальных и мутантных праймеров осуществляли раздельно в присутствии дезоксиуридинтрифосфата, помеченного дигоксигенином (Dig-dUTP), и Bio-dUTP, соответственно. Полученные продукты затем смешивали и анализировали с помощью двойного био/хемилюминесцентного метода (Рисунок 1.13) [89].

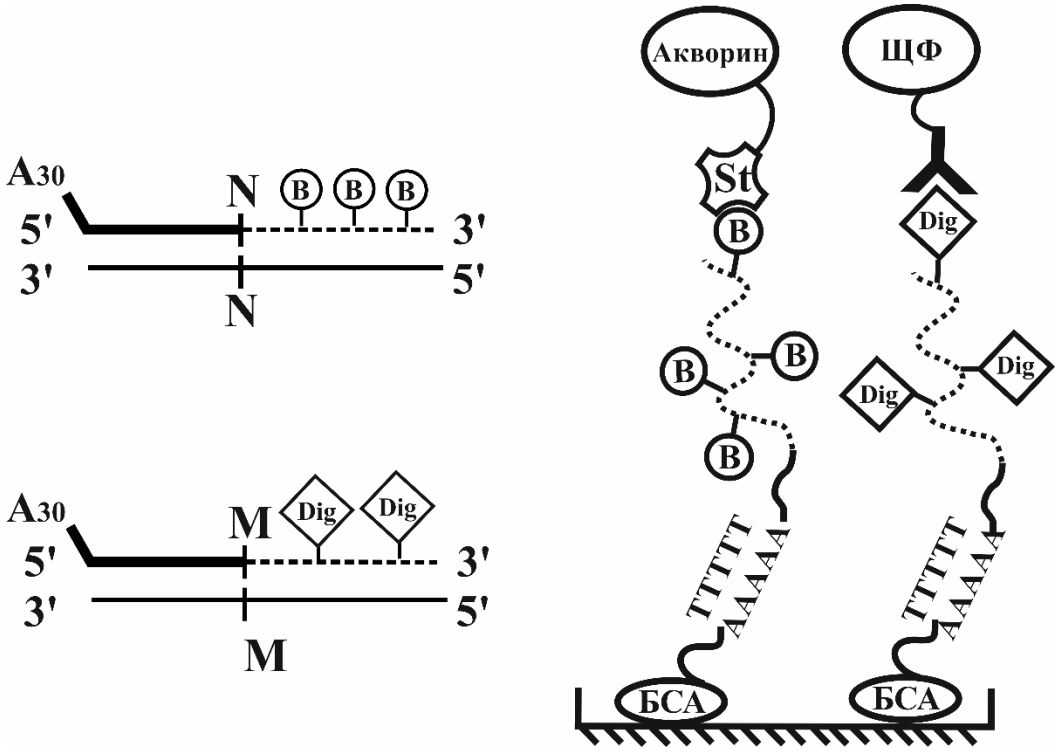

Рисунок 1.13 – Схема двойного анализа с био/хемилюминесцентной детекцией для генотипирования SNP на основе реакции удлинения праймера. БСА – бычий сывороточный альбумин, B – биотин, Dig – дигоксигенин, St – стрептавидин, ЩФ – щелочная фосфатаза.

Elenis с соавторами разработали метод одновременного генотипирования двух полиморфизмов (A896G и C1196T) в гене толл-подобного рецептора 4 (Toll-like receptor, TLR4). На первом этапе ПЦР-амплификацией получали участок гена с двумя полиморфными сайтами. Далее с полученной матрицей проводили четыре PEXT реакции в одной пробирке. При этом все удлиненные продукты содержали биотин благодаря присутствующему в реакционной смеси биотинилированному производному дезоксиуридинтрифосфата (Bio-dUTP) и связывались со стрептавидином, иммобилизованным в лунках планшета. Генотипирование аллелей проводили с использованием комбинации четырех репортеров: фотопротеина акворина, щелочной фосфатазы, β-галактозидазы и пероксидазы хрена. Био- и хемилюминесценцию каждого репортера измеряли последовательно

после промывки лунок и инкубации с соответствующим субстратом. Точность этого метода была подтверждена с помощью секвенирования [90].

Метод генотипирования с использованием стабильных и активных мутантных вариантов фотопротеина обелина с различными спектрами и кинетикой был предложен для генотипирования мутации Лейден (G1691A) гена FV. Амплифицированный фрагмент с полиморфным сайтом использовали в качестве матрицы для двух PEXT реакций, осуществляемых в одной пробирке, а измерение биолюминесценции проводили в одной лунке микропланшета на основе спектрального и временного разрешения сигналов [26].

Биолюминесцентная детекция была предложена для выявления не только герминальных, но и соматических мутаций. Для выявления точечных соматических мутаций требуются чувствительные и надежные методы для количественной оценки мутантного аллеля в то время, как присутствует большой избыток нормального аллеля. Данная количественная оценка важна для диагностики заболевания и мониторинга лечения. Tsiakalou с соавторами предложили первый биолюминесцентный метод определения точечной соматической мутации V617F в гене, кодирующем янус-киназу 2 (JAK2) [91]. Предложенный подход включает одну ПЦР для амплификации полиморфного участка обоих аллелей, а затем PEXT реакцию с аллель-специфическим праймером, комплементарным мутантному аллелю. Удлиненные продукты связывались в лунках планшета за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия, а затем выявлялись конъюгатом акворина с политимидилатом. В данном методе величина люминесцентного сигнала линейно зависела от процента мутантной аллельной нагрузки и предел обнаружения составил 0,85%.

Iliadi с коллегами предлагали два подхода для выявления соматических мутаций. Первый подход использует закрытые (замкнутые) нуклеиновые кислоты (LNA), которые эффективно ингибируют ПЦР-амплификацию нормального аллеля, в то время как скорость амплификации мутантного аллеля не изменяется. Второй подход использует аллель-специфическую ПЦР с праймерами только для амплификации мутантного аллеля [92]. В обоих тестах абсолютное количественное

определение мутантного аллеля достигалось с помощью ко-амплификации внутреннего стандарта из рекомбинантной ДНК (ДНК-конкурента). Амплифицированные продукты, полученные от ДНК-мишени и внутреннего стандарта, количественно определяли с помощью гибридизационного анализа в лунках микропланшета с использованием акворина в качестве репортера. Абсолютное количество копий мутантного аллеля оценивали по отношению величины биолюминесцентного сигнала от ДНК-мишени к сигналу от ДНК-конкурента. Авторам удалось выявить около 300 копий мутантного аллеля, причем в образцах, содержащих менее 1% мутантного аллеля.

Рассмотренные нами методы идентификации аллеля и соответствующие способы дискриминации представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Основные подходы генотипирования SNP

Методы идентификации аллель-специфических продуктов		Способ дискриминации аллеля
Масс-спектрометрия		SBE [41, 53-66]
Флуоресцентная детекция	Интрекалирующие красители	AS-PCR [68]
		DASH [70, 71]
		RCA, padlock probe [34]
	Флуоресцентно меченные нуклеотиды	SBE [39]
		PEXT [36, 69]
		RCA, MIP [42, 43]
	FRET	TaqMan [52, 53]
		Invader [45]
		Лигирование [74, 75]
		PEXT [76]
		AS-PCR [77]
		RCA padlock probe (молекулярные маяки) [72, 73]
	FP	SBE [78]
		Гибридизация (LNA зонды) [80]
		Invader [81]
		TaqMan [82]

Электрофоретическая детекция	RFLP [46-50]
	AS-PCR [54, 55]
Хемилюминесцентная и биолюминесцентная детекция	Пиросеквенирование [83-87]
	PEXT [26, 88-92]

Проведенный анализ литературных данных показал, что выявление однонуклеотидных полиморфизмов является актуальной задачей современной биомедицины, позволяющей осуществлять персональную диагностику и выбор оптимальной терапии. В распоряжении сегодняшней медицины имеются сложные и дорогие аналитические комплексы, осуществляющие такую диагностику. Их обслуживание и использование осуществляет высококвалифицированный персонал, и содержание такого оборудования могут позволить себе только крупные медицинские центры. Как правило, это закрытые системы, предназначенные для выявления конкретного перечня SNP, и все комплектующие детали и реактивы для этих систем поставляются исключительно фирмами-производителями. С одной стороны, это гарантирует точность диагностики, но с другой, ограничивает возможности врача-исследователя.

С другой стороны, имеется значительный потенциал аналитических систем на основе биолюминесцентных репортеров, пока далеко не исчерпанный. В литературе имеются единичные публикации по разработке способов выявления SNP с использованием хеми- и биолюминесценции, которые свидетельствуют о перспективности данного направления. Среди них многообещающе выглядят показанное успешное применение вариантов Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина с измененными характеристиками биолюминесцентного сигнала для одновременного определения двух мишеней в одном образце. В случае генотипирования эти две мишени являются двумя аллелями исследуемого гена.

В связи с этим целью настоящей работы было разработать способ генотипирования нескольких полиморфизмов одного или нескольких генов, связанных с диагностикой социально-значимых заболеваний, на основе этих

вариантов фотопротеина обелина и показать возможность проведения соответствующих медико-биологических исследований этим способом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм-суперпродуцент *E. coli*, экспрессирующий апообелин, был сконструирован старшим научным сотрудником лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН к.б.н. Марковой С.В. [93].

Образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов цельной крови, где мутации генов FV (G1691A, rs 6025), FII (G20210A, rs 1799963), MTHFR (C677T, rs1801133) и FVII (G10976A, rs 6046) определены методом ПЦР в реальном времени, были предоставлены Красноярским филиалом гематологического научного центра Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Образцы крови здоровых доноров были предоставлены Красноярским краевым центром крови № 1. Образцы крови пациентов с диагнозом меланома предоставлены Красноярским краевым клиническим онкологическим диспансером им. А.И. Крыжановского. Данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом, информированное согласие получено от всех пациентов, принявших участие в исследовании.

2.1 Вещества и реактивы

В работе использованы следующие реактивы: бактотриптон (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия), агар бактериологический (ДИА-М, Россия), агароза LE, дитиотреитол (GERBU Biotechnik GmbH, Германия), изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М, Россия), Трис, Бис-Трис пропан, мочевина, ЭДТА-натриевая соль, кальций хлорид (Sigma-Aldrich, США), синтетический целентеразин (Prolume Ltd. Pinetop, США), SMCC (Thermo Scientific, США), диметил сульфоксид, 2-иминотиолан (MP Biomedicals, США).

Стрептавидин, бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США), антитела к 6-карбоксифлуоресцеину (Abcam, Великобритания).

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе, синтезированы фирмой «Биосан» (Новосибирск, Россия).

Для электрофореза белков использовали акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), ТЕМЕД (Helicon, Россия), персульфат аммония, додецилсульфат натрия (Bio-Rad, США), стандартные смеси белков для электрофореза (Thermo Fisher Scientific, США). Остальные реактивы относились к категории ХЧ или ЧДА, если не указано иное.

2.2 Буферные растворы и среды

Состав используемых буферных растворов и сред представлен в таблице 2.1

Таблица 2.1 – Состав буферных растворов и сред

Название	Состав
LB-среда	20 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5-7 г/л NaCl, pH 7,4
SOB-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $MgSO_4$ pH 7,0
SOC-среда	SOB + дополнительно 20 мМ глюкозы
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
TFB буфер	0,1 М KCl, 10 мМ $CaCl_2$, 45 мМ $MnCl_2$, 10 мМ K Mes pH 6,2, 3 мМ $Co(NH_2)_6Cl_3$
Т буфер	20 мМ Трис-HCl pH 7,0
ТЕ буфер	20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 5 мМ ЭДТА
А буфер	6 М мочевина, 20 мМ Трис-HCl, 5 мМ $CaCl_2$
Кальциевый буфер	0,1 М $CaCl_2$, 0,1 М Трис-HCl pH 8,8
PBS	0,1 М NaH_2PO_4, 0,1 М K_2HPO_4, 0,15 М NaCl

Гибридизационный буфер	0,1 М малеиминовая кислота, 5 мМ ЭДТА, 1% БСА, pH 7,5)
Промывочный буфер	PBS, 0,1% Tween20, 5 мМ ЭДТА

2.3 Сайт-направленный мутагенез вариантов обелина

Сайт-направленный мутагенез выполняли на основе экспрессионных плазмид *E.coli* pET19-OL8 [94], pET19-W92F,H22E и pET19-Y138F [26], несущих ген апообелина дикого типа, выделенный из *Obelia longissima*, апообелин с аминокислотными заменами W92F,H22E и Y138F, соответственно. Мутации, приводящие к аминокислотным заменам: A6C, S44C и V66C, D12C, были выполнены с помощью набора QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene, США) в соответствии с протоколом изготовителя с использованием праймеров, представленных в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Последовательность олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для сайт-направленного мутагенеза обелина дикого типа и цветных вариантов обелина

Аминокслотная замена	Последовательность (5’→3’)
A6C	GGCTTCAAAATACTGCGTTAAACTCAAGACTG
	CAGTCTTGAGTTTAACGCAGTATTTTGAAGCC
D12C	CAGTTAAACTCAAGACTTGCTTTGATAATCCACGATG
	CATCGTGGATTATCAAAGCAAGTCTTGAGTTTAACTG
S44C	ATCACCCTCGATGAGATCGTGTGCAAGGCATCTGATGAC
	GTCATCAGATGCCTTGCACACGATCTCATCGAGGGTGAT
V66C	CGCCATCAATGTTGTGTTGAAGC
	GCTTCAACACAACATTGATGGCG

Наличие внесенных замен в нуклеотидной последовательности генов апофотопротеинов подтверждали секвенированием. ДНК секвенировали в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

2.4 Приготовление компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue и BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) и их трансформация плазмидной ДНК

Компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue и BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) готовили стандартным методом, используя TFB буфер [95]. Компетентные клетки для трансформации брали в объеме 45 мкл клеток на 1 мкл плазмидной ДНК и инкубировали при 0°C в течение 30 мин. Затем проводили «тепловой шок»: клетки нагревали до 42°C в течение 45 сек для клеток *E. coli* XL1-Blue и в течение 25 сек для штамма *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL), затем клетки снова переносили в лед на 2 мин. После этого в пробирку добавляли 450 мкл среды SOC, инкубировали 1 час при 37°C, высевали на LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

2.5 Выделение плазмидной ДНК

Индивидуальную колонию штамма *E. coli* XL1-Blue, содержащую целевую плазмиду, помещали в 10 мл LB среды с ампициллином (200 мг/л) и инкубировали при 37°C со встряхиванием до $OD_{600нм}$=1,8. Клетки центрифугировали 10 мин при 5000 g, среду сливали. ДНК выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле вместе с ДНК-маркером молекулярного веса ДНК-маркер 1 kb (СибЭнзим, Россия).

2.6 Культивирование клеток *E. coli*, выделение и очистка белков

Клетки штамма *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) – RIPL, содержащие целевую плазмиду, инкубировали в LB среде, содержащей ампициллин (200 мг/мл) с постоянным перемешиванием при 37°C до плотности $OD_{590нм}$ = 0,6-0,8. Индукцию лактозного оперона проводили добавлением в культуральную среду ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозида) в конечной концентрации 1 мМ, после культивировали еще в течение 3-х часов и осаждали клетки центрифугированием (5000 g, 20 мин). Супернатант отбрасывали, а полученную клеточную пасту использовали для выделения апофотопротеинов.

Выделение и очистку апообелина, а также его мутантов из телец включений проводили по методу, разработанному в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН для рекомбинантного апообелина дикого типа [96], с небольшими модификациями. Клеточный осадок ресуспендировали в пятикратном объеме буфера Т (Таблица 2.1) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 («Techpan», Польша) шестикратной обработкой по 20 сек с интервалами по 40 сек на льду. Затем образец центрифугировали (14000 об/мин, 10 мин), осадок промывали, последовательно ресуспендируя в буфере Т с 0,9% NaCl, а затем с добавлением 0,1% Тритона Х-100 и в третий раз с добавлением 5 мМ $CaCl_2$, отделяя осадок, основным компонентом которого являются тельца включения, после каждой промывки центрифугированием (8000 g, 5 мин).

Полученные тельца включений ресуспендировали в буфере А (Таблица 2.1) при 4°C в течение ночи. Затем образец центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин, осадок отбрасывали, а супернатант использовали для хроматографической очистки.

Хроматографическую очистку проводили на колонке HiTrap DEAE FF, заполненной DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), с помощью хроматографической системы Bio-Rad. Элюцию белков с колонки проводили

градиентом концентрации ацетата натрия (0-0,5 М) в буфере А, при скорости 2 мл/мин.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с использованием набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США) по протоколу производителя. В качестве калибровочного белка использовали бычий сывороточный альбумин. При необходимости для удаления мочевины аликвоты апобелков переводили в буфер Т с помощью гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting Columns, уравновешенной буфером Т на хроматографической системе AKTA purifier (GE Healthcare, Великобритания).

Активацию апофотопротеинов проводили 1,2-кратным молярным избытком целентеразина в буфере ТЕ (Таблица 2.1), содержащем 10 мМ ДТТ, при 4°С в течение суток. Активированные фотопротеины отделяли от незаряженного апобелка с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q 5/50 GL (хроматографическая система AKTA purifier, GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,35 М) в буфере ТЕ со скоростью 1 мл/мин.

Чистоту белковых препаратов, полученных после выделения, оценивали с помощью электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS по методу Лэммли [97].

2.7 Определение удельной биолюминесцентной активности и спектральные измерения

Биолюминесцентный сигнал фотопротеинов измеряли с помощью кюветного люминометра (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск), калиброванного по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера. Одна люминесцентная единица равна 10^7 фотонов в секунду. Сигнал регистрировали с помощью самописца (модель 2210, LKB, Швеция). Измерения проводили в 0,1 М Трис-HCl pH 8,8, содержащем 10 мМ ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера (Таблица

2.1). Приведенные в работе значения представляют собой среднее, как минимум, от трех измерений.

Удельную биолюминесцентную активность мутантов фотопротеинов определяли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия). В лунки непрозрачного планшета (Costar, США) вносили по 50 мкл раствора фотопротеина в буфере ТЕ. Реакцию инициировали впрыскиванием в каждую лунку планшета 50 мкл кальциевого буфера и интегрировали сигнал в течение 5 сек. Приведенные значения представляют собой среднее от 3-х независимых определений. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами [98].

Кальций-независимая люминесценция была измерена в белковых образцах (0,1 мг/мл, в буфере Т, содержащем 0,2 М NaCl), с помощью кюветного люминометра БЛМ 8802.

Спектры биолюминесценции были измерены на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Все спектры были корректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с помощью программного обеспечения прибора. Спектры биолюминесценции фотопротеинов измеряли в растворах, содержащих 50 мМ Бис-Трис пропан pH 7,0, 1 мМ ЭДТА. Биолюминесценцию инициировали впрыскиванием $CaCl_2$ в том же буфере. Концентрация свободного кальция составляла ~ 0,5 мкМ, (концентрация была рассчитана с помощью компьютерной программы Maxichelator) для обеспечения приблизительно постоянного уровня свечения при измерении спектра излучения. Все спектральные измерения проводились при комнатной температуре.

Константы спада биолюминесцентной реакции расчитывалась с помощью функции с одной экспоненты с использованием независимых кривых затухания. Ошибка определения не превышала 10%.

2.8 Химический синтез коньюгатов фотопротеинов с другими белками или олигонуклеотидами

Конъюгаты обелина и его мутантных форм с иммуноглобулином, получали по методу, разработанному для получения коньюгатов обелина дикого типа [99]. Конъюгаты обелина с олиготимидилатом, несущим аминогексаметильную группу 5’-NH_2-$(CH_2)_6$-p-T_{30}, (NH_2-dT_{30}), получали, как описано в работе [26] с небольшими модификациями.

Для введения SH-группы в исходные молекулы фотопротеина их обрабатывали 10-кратным молярным избытком 2-иминотиолана в 50 мМ BICINE pH 8,5, 5 мМ ЭДТА в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением глицина.

Иммуноглобулин модифицировали 70-кратным молярным избытком SMCC, растворенном в диметилсульфоксиде (2 ч при комнатной температуре в 50 мМ BICINE pH 8,5, 5 мМ ЭДТА). 5’-амино-олиготимидилат модифицировали 100-кратным избытком SMCC, растворенном в диметилсульфоксиде (2 ч при комнатной температуре в 0,1 М $NaHCO_3$). Избытки всех реагентов отделяли гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting Columns (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером ТЕ.

Тионилированный обелин, цистеиновые мутанты и SMCC-активированный иммуноглобулин смешивали в молярном соотношении 10:1 и инкубировали при 4°С в течение ночи. Полученные коньюгаты с выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером ТЕ с добавлением 150 мМ NaCl. SMCC-активированный олиготимидилат инкубировали с тионилированным обелином и цистеиновыми мутантами в молярном соотношении 10:1 в течение ночи при 4°С. Полученные коньюгаты выделяли с помощью анион-обменной хроматографии на колонке Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,7 М) в буфере ТЕ со скоростью 1 мл/мин.

2.9 Выделение геномной ДНК

ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови набором «БиоСилика» (Россия), концентрацию выделенной ДНК определяли денситометрически по картинке электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с помощью программного обеспечения AlphaEasyTM (Alpha Innotech Corporation, США). В качестве калибровочных маркеров использовали ДНК-маркер 1kb (СибЭнзим, Россия).

2.10 Получение контрольных образцов плазмидной ДНК для одновременного анализа полиморфизмов гена MC1R

Участок гена, кодирующий меланокортиновый рецептор первого типа длиной 954 п.о. (база данных NCBI: NG_012026.1), синтезировали ПЦР с использованием образца геномной ДНК человека, выделенной из лейкоцитов цельной крови. Использовали ДНК-полимеразу Hot Start Taq (Евроген, Россия) и следующие праймеры: прямой праймер, 5'-TGGACC*TCGAGATGGCTGTGCAGGGATCCCA-3', содержал сайт рестрикции XhoI; обратный праймер, 5'-TCGTGGC*GGCCGCTCACCAGGAGCATGTCAG-3', содержал сайт рестрикции NotI. Условия ПЦР: 95°C в течение 5 мин; 20 циклов (95°C – 30 с, 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин); 72°C в течение 10 мин.

Полученный фрагмент MC1R клонировали в вектор pBluescript SK+ (Stratagene, США). Лигирование вектора и ДНК-вставки проводили по сайтам рестрикции XhoI и NotI с использованием Т4-ДНК-лигазы (СибЭнзим, Россия) и лигазную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США) для анализа нуклеотидной последовательности. Клеточную суспензию высевали на 1,5% LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина. Анализ размера вставок проводили ПЦР-скринингом с прямым праймером 5’-

CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3’ и обратным праймером 5’-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3’.

Концентрацию продуктов ПЦР определяли денситометрически по картинке электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенным этидием бромидом, с помощью программного обеспечения Alpha EasyTM (Alpha Innotech Co, США), в качестве калибровочных маркеров использовали 1kb DNA Ladder (СибЭнзим, Россия).

Последовательность полученной ДНК-вставки гена MC1R без нуклеотидных полиморфизмов подтверждена секвенированием.

Контрольный образец ДНК, содержащий однонуклеотидные замены C451T (rs1805007), C478T (rs1805008) и G880C (rs1805009), получали путем последовательного сайт-направленного мутагенеза полученной плазмиды, используя набор QuikChange SiteDirected Mutagenesis Kit (Stratagene, США) и праймеры, представленные в таблице 2.3, по протоколу производителя.

Таблица 2.3 – Последовательность олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для сайт-направленного мутагенеза при создании контрольных образцов плазмидной ДНК

Полиморфизм	Последовательность (5’→3’)
C451T (rs1805007) R151C	CATCTTCTACGCACTGTGCTACCACAGC
	GCTGTGGTAGCACAGTGCGTAGAAGATG
C478T (rs1805008) R160W	CGTGACCCTGCCGTGGGCGCG
	CGCGCCCACGGCAGGGTCACG
G880C (rs1805009) D294H	CAATGCCATCATCCACCCCCTCATC
	GATGAGGGGGTGGATGATGGCATTG

Наличие нуклеотидных замен, соответствующих мутантному варианту в полученной в итоге ДНК-вставке, подтвердили методом секвенирования, как описано выше.

2.11 Одновременный биолюминесцентный анализ двух аллелей в одной лунке для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов

2.11.1 ПЦР-амплификация фрагмента гена MC1R

Амплификацию участка гена MC1R размером 558 п.о., содержащего полиморфные сайты C451T (rs1805007), C478T (rs1805008) и G880C (rs1805009), проводили в 50 мкл смеси, включающей 1-кратный Taq-буфер, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ каждого dNTP, по 0,4 мкМ праймеров: прямой праймер MC1RUp: 5’-CTCCATGCTGTCCAGCCTCTG-3’; обратный праймер MC1RDn: 5’-CCTCCTTGAGCGTCCTGCG-3’, 15–80 нг геномной ДНК, 2,5 ед. акт. ДНК полимеразы Hot Start Taq (Евроген, Россия).

Условия ПЦР: 95°C в течение 5 мин; 30 циклов (95°C – 30 с, 65°C – 30 с, 72°C – 40 с); 72°C в течение 10 мин. ПЦР продукты анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием, в качестве калибровочного маркера использовали ДНК-маркер 100+1,5 kb (СибЭнзим, Россия).

2.11.2 Мультиплексная ПЦР для амплификации участков 4 разных генов

Участки четырех генов, включающих полиморфизмы G20210A гена FII (138 п.о.), G1691A гена FV (142 п.о.), G10976A гена FVII (180 п.о.), C677T гена MTHFR (346 п.о.) амплифицировали в одной пробирке. Амплификацию проводили в 50 мкл смеси, содержащей 1-кратный Taq-буфер, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ каждого dNTP, по 0,2 мкМ праймеров (4 пары праймеров, представленных в таблице 2.3), 10 нг геномной ДНК, 2,5 ед. акт. ДНК полимеразы Hot Start Taq (Евроген, Россия). Условия ПЦР: 95°C в течение 5 мин; 30 циклов (95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 40 с); 72°C в течение 10 мин. Амплификацию 4 участков генов проводили по-отдельности аналогичным образом, добавляя в каждую пробирку только одну пару соответствующих праймеров (Таблица 2.4).

ПЦР продукты анализировали электрофоретически в 1,7 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием, в качестве калибровочного маркера использовали ДНК маркер 100+1,5 kb (СибЭнзим, Россия).

Таблица 2.4 – Последовательность олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для мультиплексной ПЦР

Полиморфизм (Ген)	Последовательность (5’→3’)
G1691A, rs6025 (FV)	CATCATGAGAGACATCGCCTC
	CATGTTCTAGCCAGAAGAAATTC
G20210A, rs1799963 (FII)	GGAACCAATCCCGTGAAAG
	GTAGTATTACTGGCTCTTCCTGAG
C677T, rs1801133 (MTHFR)	CAAAGGCCACCCCGAAG
	GGGGTGGCCAAGCAACGC
G10976A, rs6046 (FVII)	GAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACT
	GATGTACTGGGAGACCCTGGTGTAC

2.11.3 Реакция удлинения аллель-специфического праймера (PEXT реакция)

Полученные после амплификации ПЦР продукты без какой-либо дополнительной очистки использовали в качестве матрицы для проведения PEXT реакции. Для каждого полиморфизма PEXT реакция проводилась в отдельной пробирке с одной парой соответствующих праймеров. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей однократный буфер SNPdetect, 2,5 мМ $MgCl_2$, dATP, dCTP, dGTP, 5-[N-(N-биотинил-ε-аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат (Bio-dUTP) (2,5 мкМ каждого), 0,3 пмоль амплифицированной ДНК-матрицы, по 1 пмоль праймеров PEXT N и PEXT M и 2 ед. акт. полимеразы SNPdetect (Евроген, Россия). Условия реакции: 95°С в течение 5 мин; 3 цикла (95°С – 15 с, 60°С –15 с, 72°С – 15 с); 95°С в течение 5 мин. Последовательности праймеров для PEXT-реакции представлены в таблице 2.5.

Таблица 2.5 – Последовательность олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для PEXT-реакции

Полиморфизм (Ген)	Последовательность (5'→3')
C451T, rs1805007 (MC1R)	**PEXT N** FAM - CATCTCCATCTTCTACGCACTGC
	PEXT M $(A)_{27}$- CTACATCTCCATCTTCTACGCACTGT
C478T, rs1805008 (MC1R)	**PEXT N** FAM - GCATCGTGACCCTGCCGC
	PEXT M $(A)_{27}$ - CAGCATCGTGACCCTGCCGT
G880C, rs1805009 (MC1R)	**PEXT N** FAM - CATCTGCAATGCCATCATCG
	PEXT M $(A)_{27}$ - CATCTGCAATGCCATCATCC
G1691A, rs6025 (FV)	**PEXT N** FAM - AGCAGATCCCTGGACAGGCG
	PEXT M $(A)_{27}$ - AGCAGATCCCTGGACAGGCA
G20210A, rs1799963 (FII)	**PEXT N** FAM-GGTTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCG
	PEXTM $(A)_{27}$- GGTTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCA
C677T, rs1801133 (MTHFR)	**PEXT N** FAM-GAGAAGGTGTCTGCGGGAGC
	PEXT M $(A)_{27}$-GAGAAGGTGTCTGCGGGAGT
G10976A, rs6046 (FVII)	**PEXT N** FAM-CCACATGCCACCCACTACCG
	PEXT M $(A)_{27}$-CCACATGCCACCCACTACCA

2.11.4 Биолюминесцентный анализ продуктов PEXT реакции

Для активации поверхности в лунки планшета (Costar, США) вносили по 50 мкл раствора стрептавидина (10 мкг/мл в PBS буфере), инкубировали, встряхивая, 1 ч при 37°С и промывали 4 раза промывочным буфером (Таблица 2.1). Далее в лунки вносили по 3 мкл продуктов PEXT реакции в 47 мкл гибридизационного буфера (Таблица 2.1), в контрольные лунки – по 50 мкл этого же буфера и инкубировали при комнатной температуре 30 мин.

Планшет промывали, в лунки вносили по 50 мкл смеси коньюгатов W92F,H22E-dT_{30} и Y138F-антитело к флуоресцеину или W92F,H22E,D12C-dT_{30} и Y138F,A6C - антитело к флуоресцеину (по 0,1 мкг/мл, в буфере ТЕ с добавлением 0,1 М NaCl, 0,1% БСА), инкубировали при комнатной температуре 30 мин и снова промывали.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором, сразу после впрыскивания 50 мкл кальциевого буфера. Первую секунду регистрировали фиолетовый сигнал через оптический фильтр ФС6 (ЛенЗОС, Россия), а затем в течение 3 с – зеленый сигнал через светофильтр ЖС16 (ЛенЗОС, Россия). Полученные от контрольных лунок усредненные сигналы вычитали из сигналов от рабочих лунок. Генотип определяли по значению дискриминационного фактора Д, т.е. по соотношению величин зеленого и фиолетового сигналов.

2.12 Статистическая обработка результатов генотипирования полиморфизмов гена MC1R

Данные обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 8.1, статистического программного обеспечения STATISTICA 12 (Statsoft, Россия) и Comprehensive Meta-Analysis (Biostat Inc, США). Статистическая обработка данных в исследовании случай-контроль проводилась с использованием программы «Ген Эксперт» (http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php). U-тест Манна-Уитни использовали для сравнения количественных данных.

Исследуемая выборка находилась в равновесии Харди-Вайнберга для случаев и для контролей ($p > 0,5$). Качественные характеристики оценивались с использованием теста χ^2.

Критерий χ^2 Пирсона использовали для сравнения частот вариантов гена MC1R среди случаев меланомы и контрольных образцов, а также для сравнения клинических и фенотипических характеристик в случаях меланомы с вариантами MC1R и без них, при расчетах учитывался уровень значимости $p < 0,05$. Тест Бонферрони использовался для коррекции множественных сравнений. Было исследовано влияние одного и нескольких вариантов MC1R на риск развития меланомы. Ассоциация между вариантами MC1R и меланомой оценивалась по отношению шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI), значения p менее 0,05 считались значимыми.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение мутантных вариантов Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина для сайт-специфического конъюгирования

Использование обелина в качестве репортера для выявления конкретной мишени в образце предполагает наличие фрагмента, обладающего соответствующей биоспецифической аффинностью (антитела, гаптена, олигонуклеотида и т.п.). Получение таких бифункциональных соединений осуществляют с помощью химического синтеза или генетическим фьюзингом (если биоспецифическая часть является полипептидом). Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН был разработан способ химического синтеза конъюгатов обелина с биоспецифическими молекулами с использованием гетеробифункционального реагента сукцинимидил-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) [99, 100] (Рисунок 3.1а).

Процесс получения химических конъюгатов включал в себя три этапа: 1) введение дополнительных SH-групп в молекулу обелина с использованием реагента Траута (2-иминотиолан); 2) активация биоспецифической молекулы (антитело, антиген, олигонуклеотид и т.д.) реакцией с SMCC; 3) взаимодействие SH-обелина и SMCC- активированной биоспецифической молекулы.

Каждый этап сопровождался частичной инактивацией обелина (падение биолюминесцентной активности иногда достигало 40%) и потерями при хроматографической очистке продуктов реакции. Для получаемых при этом конъюгатов характерна непредсказуемая гетерогенность, неизбежная при химическом синтезе. Выход целевых соединений был низок и составлял от 10 до 35%.

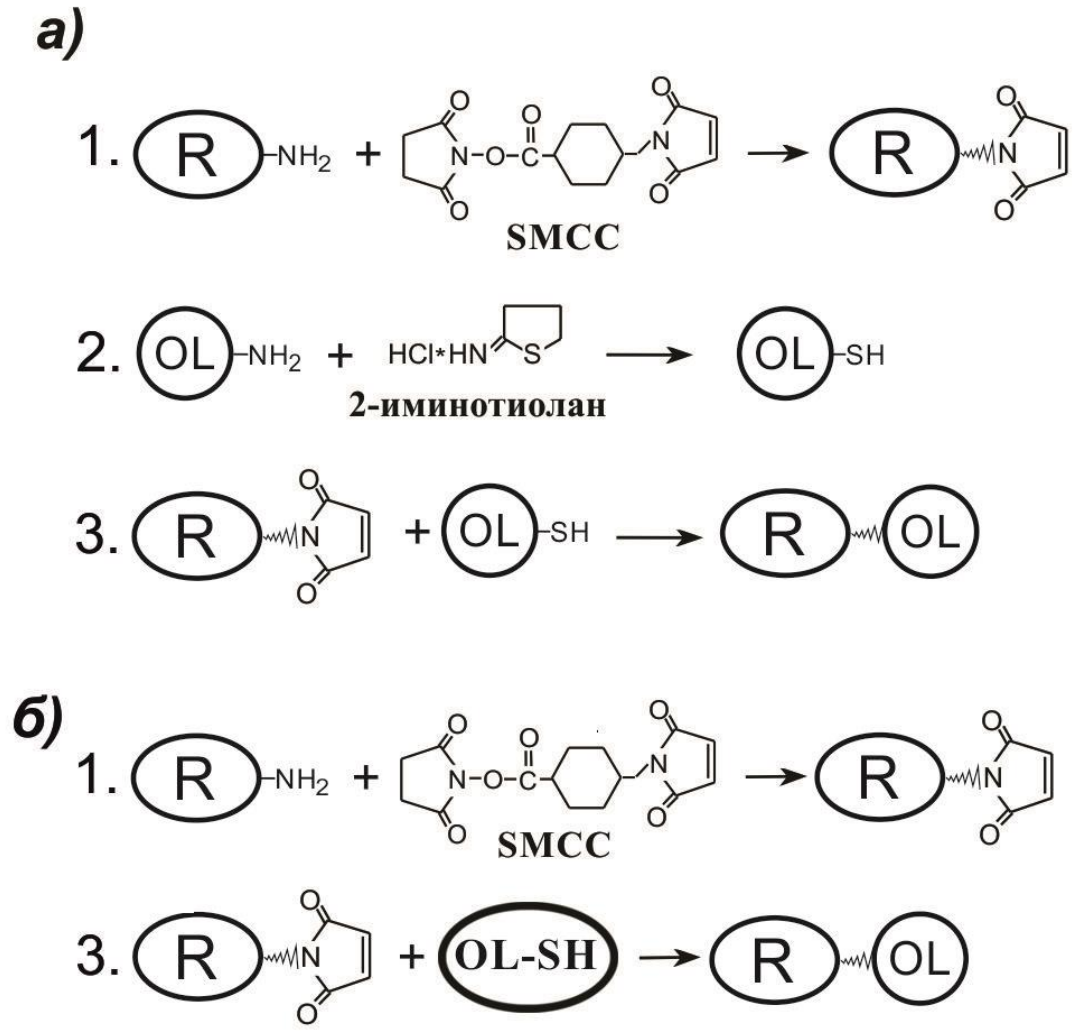

Рисунок 3.1 – Химический синтез конъюгатов обелина с биоспецифическими молекулами: а) трехэтапный синтез; б) двухэтапный синтез, предложенный в данной работе. OL – обелин, R – биоспецифическая молекула, OL-SH – вариант обелина с уникальным остатком цистеина.

Чтобы избежать этих недостатков, было предложено проводить синтез, используя варианты обелина с искусственно введенными (уникальными) остатками цистеина, тиольные группы которых доступны для химической модификации.

Несмотря на то, что молекула обелина включает 5 остатков цистеина, не образующих цистеиновые мосты, все они оказались недоступными для модификации [101]. Наличие такого остатка существенно упрощает синтез конъюгатов, делает его сайт-направленным, позволяет сохранить

биолюминесцентную активность обелина и повысить выход конъюгатов (Рисунок 3.1б). Ранее это было показано для рекомбинантного обелина дикого типа с аминокислотной заменой D12C [102].

Задачей нашего исследования было получить варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками, пригодными для сайт-направленного коньюгирования с биоспецифическими молекулами по схеме на рисунке 3.1б).

Цветными обелинами здесь и далее мы называем фиолетовый вариант с заменой W92F,H22E, испускающий быстрый (k_d = 0,6 c^{-1}), сдвинутый в коротковолновую область, сигнал (λ_{max} = 387 нм) и зеленый вариант с заменой Y138F с медленным (k_d = 6,1 c^{-1}), смещенным в длинноволновую область, сигналом λ_{max} = 493 нм). Данные варианты были успешно использованы в качестве репортеров для определения двух аналитов в одной лунке на примере иммуноферментного анализа [4, 5]. Разделение сигналов осуществляли благодаря спектральным и кинетическим различиям биолюминесцентных сигналов данных вариантов.

Получение цветных обелинов с уникальным доступным для синтеза остатком цистеина проводили сайт-направленным мутагенезом следующих аминокислот Ala-6, Asp-12, расположенных на свободном NH_2-конце молекулы, и Ser-44, Val-66, экспонированных в окружающую среду (Рисунок 3.2).

Для контроля те же мутации были проведены в молекуле обелина дикого типа (WT).

Все белки были получены путем экспрессии в рекомбинантных клетках *E. coli* и выделены в высокоочищенном виде (по данным SDS гель-электрофореза) с помощью технологии, разработанной для рекомбинантного обелина WT. Далее были изучены их основные свойства.

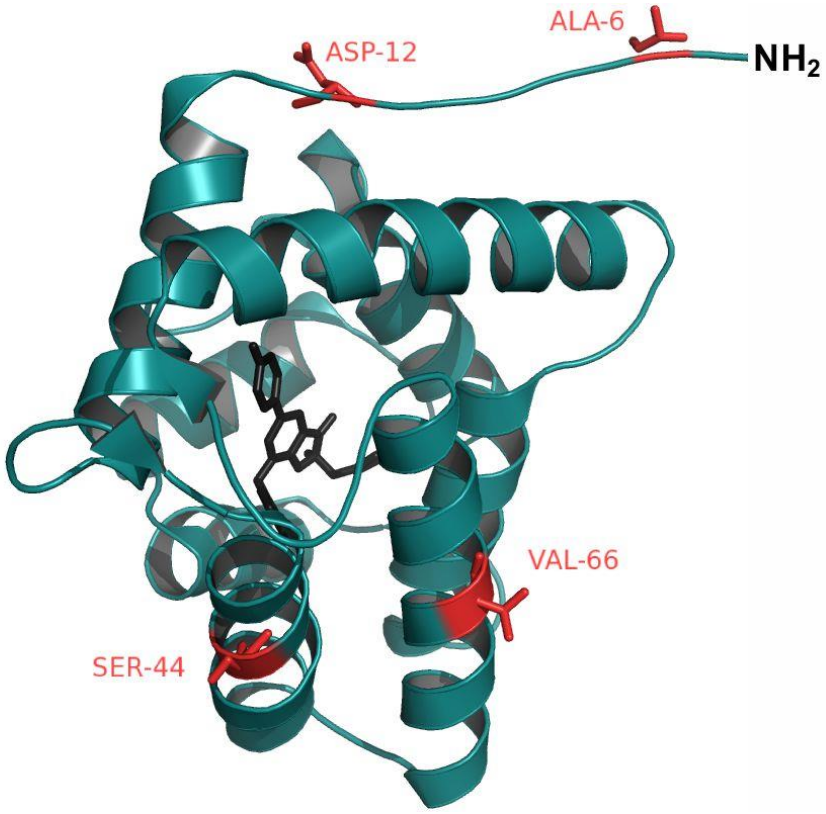

Рисунок 3.2 – Молекула обелина [7], с указанием аминокислот, замененных на цистеин.

В таблице 3.1 представлены биолюминесцентные характеристики белков: активность относительно WT обелина, спектры биолюминесценции, константа спада биолюминесцентного сигнала, а также стабильность фотопротеинов, которую оценивали по соотношению между Ca^{2+}-независимой биолюминесценцией и Ca^{2+}-индуцированной биолюминесценцией ($I_{Ca\text{-}free}/I_{Ca}$).

Из таблицы 3.1 и рисунка 3.3 видно, что мутантные варианты обелина дикого типа, кроме варианта с заменой S44C, продемонстрировали биолюминесцентные свойства, близкие к исходному белку. Это означает, что выбор аминокислот для замены сделан корректно: произведенные мутации не повлияли на основные свойства фотопротеина.

Таблица 3.1 – Физико-химические свойства мутантных форм обелина

Вариант обелина	Активность, % от WT	Биолюминесценция, λ_{max}/плечо (нм)	Константа спада, $с^{-1}$	$I_{Ca\text{-}free}/I_{Ca}$ x 10^{-6} (0,1 мг $мл^{-1}$)
WT	100	482/400	9,6	0,9
A6C	100	482/400	9,8	0,38
D12C	96	482/400	9,8	0,67
S44C	63	482/400	10,9	0,94
V66C	98	482/400	9,1	1,7
W92F,H22E	10	387	6,1	0,46
W92F,H22E, A6C	1,2	387	6,9	4
W92F,H22E D12C	9,3	387	7,4	1,3
W92F,H22E S44C	3,9	387	6,8	4,8
W92F,H22E V66C	5	387	7	1,5
Y138F	68	493/400	0,6	16
Y138F, A6C	66,7	493/400	0,55	10,4
Y138F, D12C	15,5	493/400	0,59	15,4
Y138F, S44C	7	493/400	0,14	32
Y138F, V66C	27,6	493/400	0,5	33,5

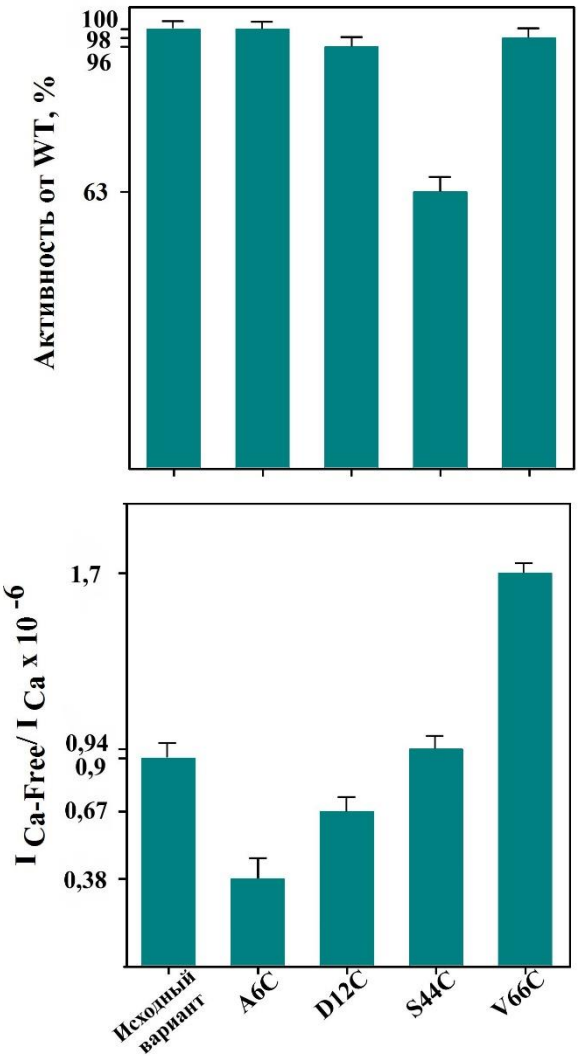

Рисунок 3.3 – Сравнение биолюминесцентной активности и стабильности мутантов обелина дикого типа с введенными цистеиновыми заменами.

К нашему удивлению точно такие же замены аминокислот в цветных обелинах оказали существенное негативное влияние на активность и стабильность этих белков. Замены аминокислот второй и третьей спирали (S44C или V66C) неожиданно вызвали падение биолюминесцентной активности всех вариантов обелина и стабильности в случае зеленого обелина Y138F. Мутация D12C вызвала снижение биолюминесцентной активности зеленого обелина Y138F почти в 5 раз, а мутация A6C вызвала уменьшение активности фиолетового обелина W92F,H22E в 10 раз. В случае фиолетового мутанта только вариант W92F,H22E,D12C продемонстрировал биолюминесцентные свойства, близкие к исходному

W92F,H22E обелину, а наиболее активный зеленый обелин был получен при замене A6C (Рисунок 3.4).

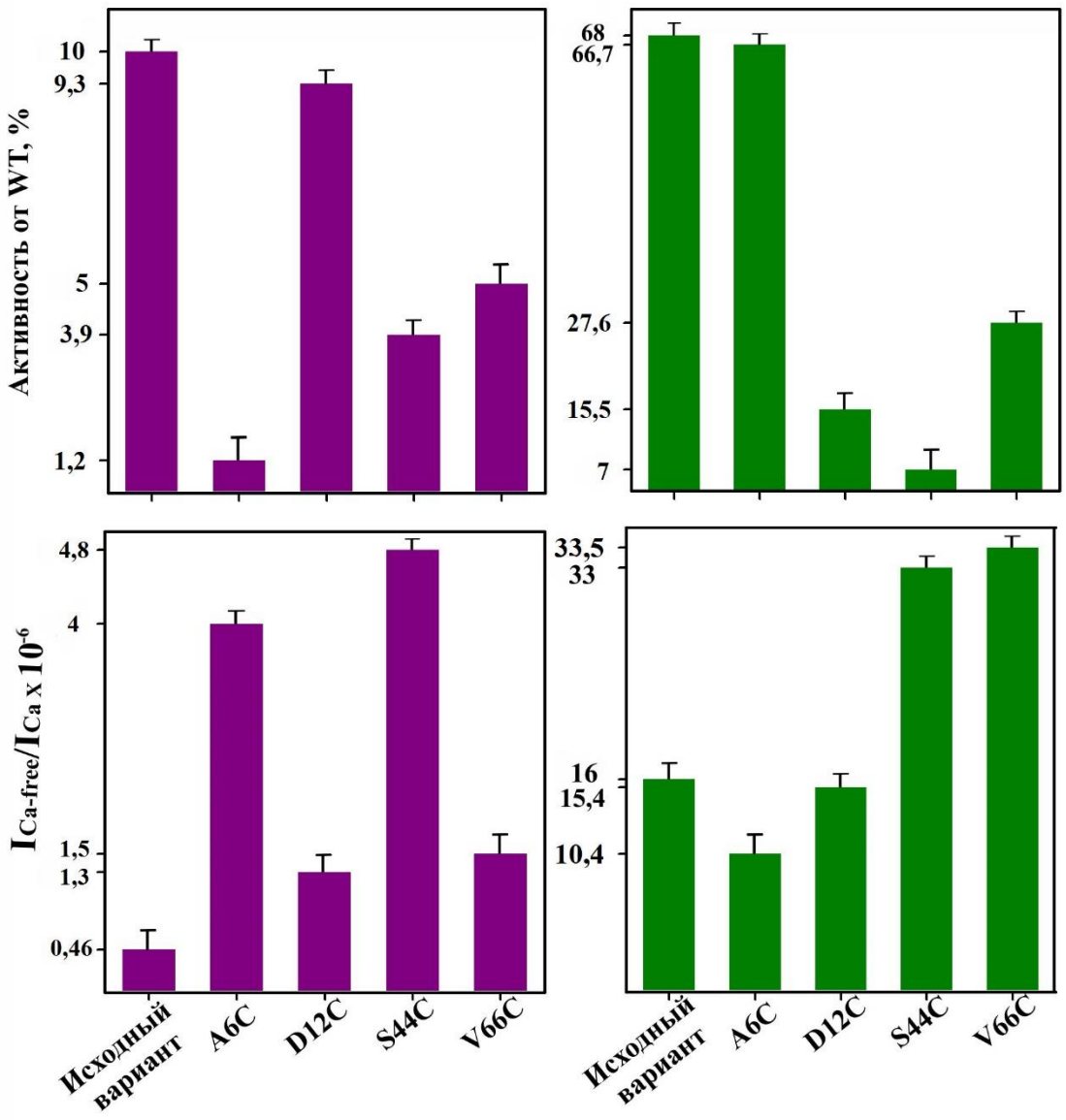

Рисунок 3.4 – Сравнение биолюминесцентной активности и стабильности цветных вариантов обелина с введенными цистеиновыми заменами: W92F,H22E (слева) и Y138F (справа).

Показателем стабильности фотопротеинов служило значение соотношения Ca^{2+}-независимой биолюминесценции (возникает в результате теплового движения молекулы) к Ca^{2+}-индуцированной биолюминесценции ($I_{Ca-free}/I_{Ca}$), зарегистрированных в одинаковых условиях (концентрация белка 0,1 мг/мл в 0,1 М Трис-HCl pH 8,8, 5 мМ ЭДТА, комн. температура).

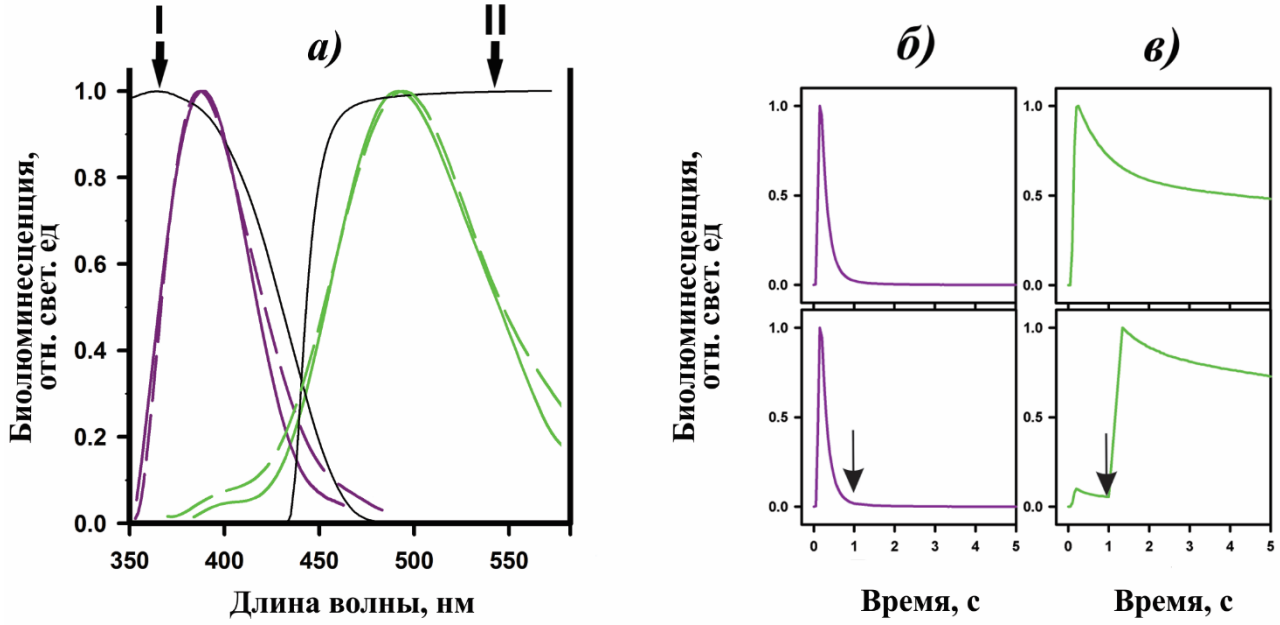

Рисунок 3.5 – ***а)*** Спектры биолюминесценции W92F,H22E,D12C и W92F,H22E (фиолетовая сплошная и пунктирная линии, соответственно), Y138F,A6C и Y138F (зеленые сплошная и пунктирные линии, соответственно). Черными линиями показаны спектры пропускания оптических фильтров ФС6 (I) и ЖС16 (II). ***б), в)*** Биолюминесцентные сигналы цветных вариантов обелина (сверху) и их пропускание последовательно через фильтр I и фильтр II (снизу). Стрелками обозначен момент смены фильтров.

Отметим, что обелин, как и другие Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины кишечнополостных, является стабильной молекулой и величина этого свечения в миллион раз меньше, чем свечение, инициируемое Ca^{2+}. Тем не менее, при сравнении, из полученных нами вариантов наиболее устойчивыми оказались фиолетовый W92F,H22E,D12C и зеленый вариант Y138F,A6C обелина, обладающие наименьшими значениями этого параметра (Рисунок 3.4).

Во всех случаях произведенных замен выбранных аминокислот на цистеин не наблюдалось значительных изменений в кинетике и спектрах биолюминесценции (см. Таблицу 3.1), очевидно потому что аминокислоты, подвергшиеся мутации, расположены далеко от активного сайта белка (Рисунок 3.5).

Таким образом, среди цветных вариантов обелина с введенными (уникальными) остатками цистеина, наиболее подходящей для применения в качестве репортеров в анализе оказалась пара W92F,H22E,D12C и Y138F,A6C.

Конъюгаты этих белков с биоспецифическими молекулами – олигонуклеотидами и антителами, были получены двухэтапным способом синтеза по схеме, показанной на рисунке 3.1б).

В таблице 3.2 представлены выходы различных конъюгатов обелина дикого типа и его цветных вариантов, имеющих уникальные цистеиновые остатки, с различными биоспецифическими молекулами. Выход определяли относительно специфических молекул, поскольку обелины в реакционных смесях использовали в 5-10-кратном молярном избытке. Средний выход конъюгатов обелина с олигонуклеотидами (разной длины, от 20 до 57 н.о.) составил 67%. В случае традиционного химического введения SH-группы с использованием реагента Траута средний выход этих конъюгатов был существенно ниже и составлял 10-15%. При синтезе конъюгатов обелина с иммуноглобулинами и стрептавидином средний выход составил 65%, в то время как при полностью химическом синтезе, применяемом ранее, выход не превышал 25%.

Таблица 3.2 – Выход конъюгатов цистеиновых мутантов обелина дикого типа и цветных вариантов с биоспецифическими молекулами

Вариант обелина	Биоспецифическая часть	Выход конъюгата, %
WT A6C	дезоксирибоолигонуклеотид (20 н.о.) [103]	77
WT D12C	рибоолигонуклеотид (57 н.о.) [104]	74
	антитела к дигоксигенину (ab 64509, Abcam)	97
	антитела к FAM (ab 19224, Abcam)	65,9
	антитела к лютеинизирующему гормону (XL1, Хема-медика)	68,4
	антитела к пролактину (XP85, Хема-медика)	68
	стрептавидин	98
W92F,H22E,D12C	олиготимидилат (dT_{30})	62
W92F,H22E,V66C	олиготимидилат (dT_{30})	94
Y138F,A6C	антитела к FAM (ab 19224, Abcam)	60

Таким образом, полученные нами варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками позволили упростить синтез их соединений с биоспецифическими молекулами сайт-направленным конъюгированием и существенно повысить выход реакции.

3.1.1 Одновременный биолюминесцентный анализ по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов

Анализ основан на реакции удлинения аллель-специфического праймера [105] с последующей одновременной биолюминесцентной детекцией двух аллелей в одной лунке.

На первом этапе с помощью ПЦР амплифицировали участок ДНК с использованием пары праймеров, фланкирующих соответствующий полиморфный сайт (Рисунок 3.6а).

Полученную ДНК-матрицу без какой-либо очистки использовали для PEXT реакции с парой праймеров, комплементарных мутантному или нормальному аллелю, помеченных олигоаденилатом $(dA)_{27}$ и 6-карбоксифлуоресцеином (FAM), соответственно (Рисунок 3.6б). Если ДНК-матрица и аллель-специфический праймер были полностью комплементарны друг другу, образовавшиеся дуплексы удлинялись ДНК-полимеразой, в противном случае никой реакции не происходило. Полученные в результате удлиненные продукты содержали остатки биотина из-за использования биотинилированного дезоксиуридин трифосфата вместо тимидин трифосфата. Биотин-содержащие олигонуклеотиды иммобилизовали на стрептавидин-активированной поверхности лунки. Затем в лунки планшета вносили смесь конъюгатов, инкубировали и промывали. Биолюминесцентный сигнал инициировали внесением Ca^{2+} и измеряли последовательно через соответствующие оптические фильтры – в первую секунду быстрый фиолетовый сигнал, а затем медленный зеленый сигнал в течение 3 секунд (Рисунок 3.5а).

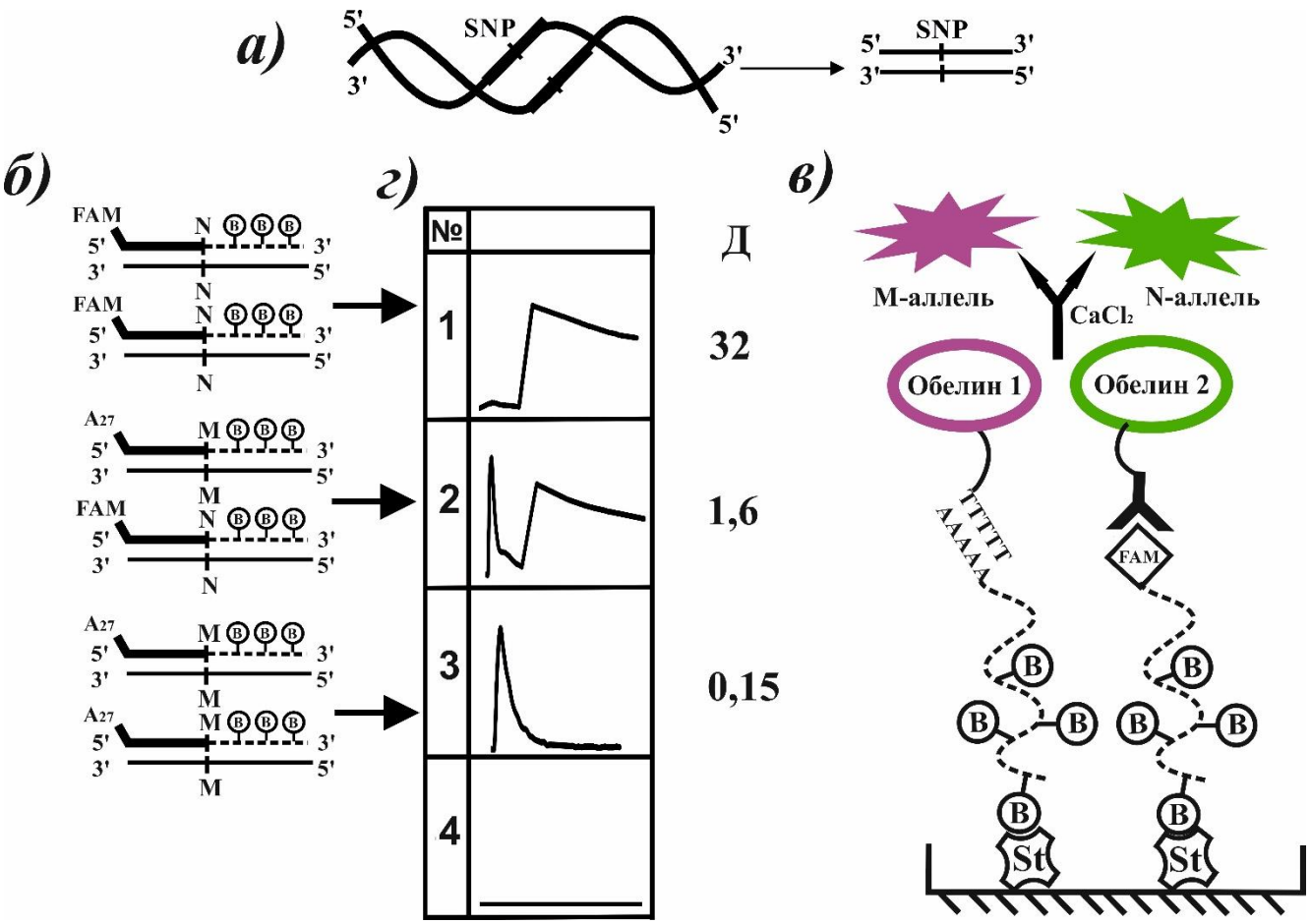

Рисунок 3.6 – Схема одновременного биолюминесцентного анализа по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов. FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, A_{27} – олигоаденилат, B – остаток биотина, St – стрептавидин, M – мутантный вариант аллеля, N – нормальный вариант аллеля, Д – дискриминационный фактор. Обелин 1 – конъюгат W92F,H22E- dT_{30} или W92F,H22E,D12C-dT_{30}; Обелин 2 – Y138F-antiFAM IgG или Y138F,A6C-anti FAM IgG, №4 – контрольная лунка, не содержащая PEXT продуктов.

Генотип для каждого образца оценивали по дискриминационному фактору Д, который рассчитывали, как отношение величины зеленого биолюминесцентного сигнала (нормальный аллель) к фиолетовому (мутантный аллель).

Для сравнения коньюгатов цветных обелинов, полученных полностью химическим способом: W92F,H22E-dT_{30} и Y138F-antiFAM IgG (пара коньюгатов № 1) и коньюгатов цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками

W92F,H22E,D12C-dT_{30} и Y138F,A6C-anti FAM IgG (пара коньюгатов № 2) как репортеров в анализе по выявлению SNP, мы провели специальный эксперимент. В качестве матрицы использовали модельные плазмиды со вставкой полиморфного фрагмента гена MC1R, имеющего полностью нормальный генотип и той же вставкой, содержащей мутацию. Анализ проводили по схеме, представленной на рисунке 3.7. Полученные при этом значения дискриминационных факторов Д приведены в таблице 3.3. Обе пары конъюгатов продемонстрировали близкие значения Д. Таким образом, нами показано, что коньюгаты, полученные предложенным укороченным способом синтеза с использованием цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками, пригодны для применения в качестве меток для анализа по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов.

Модельный анализ показал, что значения Д для разных генотипов отличаются на порядок и более, что свидетельствует о надежности генотипирования предложенным способом.

Таблица 3.3 – Дискриминационный фактор (Д) при SNP генотипировании с двумя парами конъюгатов (N = 3)

Генотип	Д, пара конъюгатов №1	Д, пара конъюгатов №2
Нормальная гомозигота	39 ± 3,06	27,34 ± 2,78
Гетерозигота[1]	2,31 ± 0,07	1,61 ± 0,15
Мутантная гомозигота	0,25 ± 0,02	0,15 ± 0,02

[1]Образец с генотипом «гетерозигота» был получен в виде эквивалентной смеси плазмид с нормальной и мутантной вставками.

3.2 Одновременное генотипирование четырех однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с факторами риска нарушений гемостаза

Тромбофилия является многофакторным заболеванием, являющимся результатом взаимодействия генетических и внешних факторов. К генетическим факторам относят SNP в генах, кодирующих факторы свертывания крови и метаболизм гомоцистеина [106], а к внешним – длительный постельный режим, обширные хирургические вмешательства, беременность, прием женщинами оральных контрацептивов и т.д. [107]. Накопленные знания о сочетании генетических и приобретенных факторов обеспечивают индивидуальную оценку риска и подбор рекомендаций для профилактики тромбозов.

Наиболее распространенными мутациями, связанными с тромбофилией, являются FV G1691A, FII G20210A и MTHFR C677T. Эти генетические нарушения повышают риск развития инфаркта миокарда, тромбоза глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии и т.д. [108, 109]. В то же время, G10976A мутация гена FVII приводит к снижению уровня фактора FVII в плазме крови и, как предполагается, имеет защитный эффект против инфаркта миокарда [110].

Существование ряда полиморфизмов, ассоциированных с риском схожих патологий, а также усиливающих риск заболевания при совместном присутствии, вызывает потребность в простых, быстрых, надежных и экономически эффективных методах генотипирования, направленных на одновременное определение целого набора мутаций. Аналитические системы, позволяющие одновременно обнаружить нескольких мишеней в одной пробирке, являются современным направлением молекулярной диагностики, особенно с точки зрения уменьшения времени анализа и его стоимости.

В последнее десятилетие был разработан ряд методов, позволяющих одновременно определять нескольких полиморфизмов, связанных с риском развития тромбофилии [111-117] и основанных на подходах, описанных в

Литературном обзоре. Два из них основаны на PEXT реакции с флуориметрической [115] или визуальной детекцией с использованием сенсора типа тест-полоска [116].

В работе [115] описан метод одновременного обнаружения шести полиморфизмов с помощью мультиплексной ПЦР и мультиплексной PEXT реакции с последующей универсальной сортировкой массива на основе гибридизации и детекцией на проточном цитометре Luminex XMap. Недостатком данного подхода является необходимость очистки ПЦР продуктов (обработка щелочной фосфатазой креветки и экзонуклеазой 1) и применение дорогостоящего оборудования. В случае использования технологии с ДНК биосенсором типа тест-полоска, описанной в работе [116], нет необходимости в использовании специализированного оборудования и высококвалифицированного технического персонала из-за визуального обнаружения продуктов PEXT реакции. В данном подходе каждая тест-полоска предназначена для определения одного полиморфизма. Однако проблемы, связанные с низкой интенсивностью окраски зоны на тест-полоске, препятствуют получению четких результатов генотипирования.

Нами разработан оптимизированный трехступенчатый способ одновременного генотипирования четырех полиморфизмов (Рисунок 3.7).

Были исследованы два полиморфизма генов, локализованных на разных хромосомах (FVII 13q34 и FII 11p11.2), и два полиморфизма генов, локализованных на разных плечах одной хромосомы (FV 1q24.2 и MTHFR 1p36.22). С использованием мультиплексной ПЦР в одной пробирке одновременно синтезировали 4 фрагмента, содержащих исследуемые полиморфные сайты.

Мультиплексную ПЦР проводили в оптимальных условиях, подобранных для раздельного генотипирования [118], за исключением концентрации праймеров, которая была уменьшена в два раза, чтобы избежать димеризации праймеров [116].

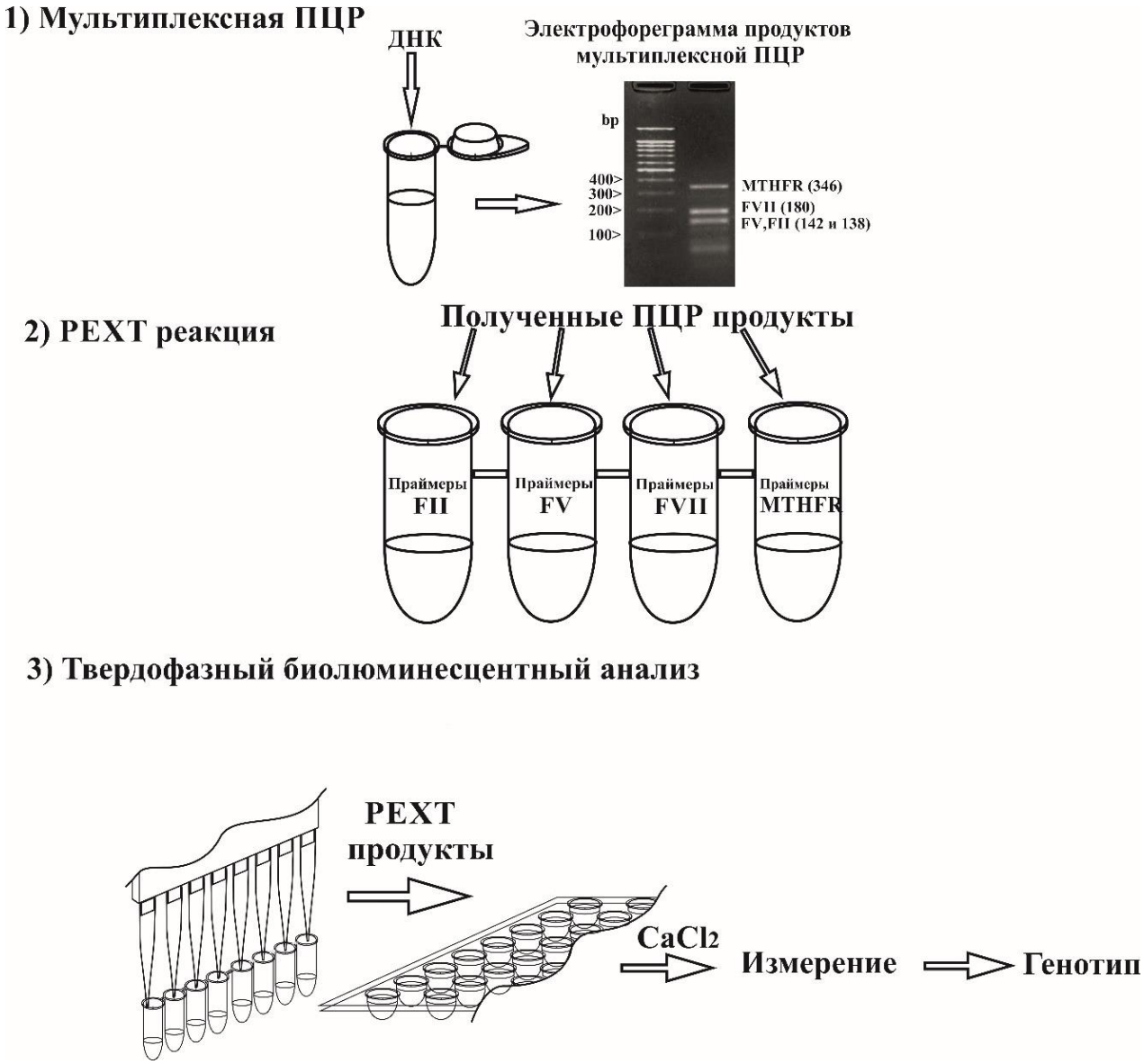

Рисунок 3.7 – Схема мультиплексного биолюминесцентного анализа четырех полиморфизмов, связанных с нарушениями системы гемостаза.

Для мультиплексной ПЦР нами были испытаны несколько полимераз: Hot Start Taq-ДНК-полимераза, Taq-ДНК-полимераза и Tersus ДНК-полимераза (Евроген, Россия) при одинаковых прочих условиях реакции. Во всех случаях по данным электрофореза нами было получено близкое количество четырех ДНК-матриц. Далее смесь из четырех фрагментов без какой-либо дополнительной очистки использовали в качестве матриц в 4-х отдельных PEXT реакциях с использованием соответствующих пар праймеров. На данном этапе мы

использовали SNP detect ДНК-полимеразу, однако ранее в нашей лаборатории для PEXT реакции было также показано успешное применение Vent (exo-) и Taq ДНК-полимераз [118].

Третий этап – биолюминесцентный твердофазный анализ продуктов PEXT реакции, проводили, как описано выше (Рисунок 3.6). На данном этапе основное время занимают две инкубации и две промывки, в то время как измерение биолюминесценции занимает 4,5 секунды для одного образца. В целом предложенный нами мультиплексный метод генотипирования четырех полиморфизмов занимает 3 часа, из них: 1-й этап – 1 час 40 мин, 2-й этап – 15 мин, 3-й этап – 1 час 7 мин (анализ всего 96-луночного планшета).

Исследуемые полиморфизмы генотипировали также в раздельном варианте, когда каждую матрицу амплифицировали в отдельной пробирке. Полученные значения дискриминационного фактора в раздельном и в мультиплексном анализе представлены в таблице 3.4 и на рисунке 3.8.

Таблица 3.4. – Значение дискриминационных факторов раздельного и мультиплексного определения 4-х полиморфизмов

Вариант генотипа	Д	
	Раздельный анализ	Мультиплексный анализ
FV, 1691 G>A		
Нормальная гомозигота (G/G)	18,7 ± 4,3 (n = 69)	21,8 ± 6,5 (n = 26)
Гетерозигота (G/A)	1,7 ± 0,5 (n = 30)	3,1 ± 0,7 (n = 4)
MTHFR, 677 C>T		
Нормальная гомозигота (C/C)	3 ± 1,4 (n = 51)	3,7 ± 1,3 (n = 15)
Гетерозигота (C/T)	0,41 ± 0,15 (n = 51)	0,6 ± 0,2 (n = 9)
Мутантная гомозигота (T/T)	0,04 ± 0,01 (n = 16)	0,06 ± 0,02 (n = 6)
FII, 20210 G>A		

Нормальная гомозигота (G/G)	31,4 ± 4,2 (n = 25)	29,1 ± 5,6 (n = 25)
Гетерозигота (G/A)	3,4 ± 0,6 (n = 5)	3,3 ± 0,6(n = 5)
FVII, 10976 G>A		
Нормальная гомозигота (G/G)	12,4 ± 3,8 (n = 20)	15,6 ± 5,4 (n = 18)
Гетерозигота (G/A)	0,9 ± 0,1 (n = 11)	1,6 ± 0,4 (n = 10)
Мутантная гомозигота (A/A)	0,06 ± 0,03 (n = 4)	0,3 (n = 2)

Видно, что для каждого полиморфизма значения Д для разных генотипов различаются на порядок. Однако абсолютные значения дискриминационного фактора для каждого из полиморфизмов при одном и том же генотипе существенно отличаются. Это можно объяснить различием последовательностей ДНК-матриц, в результате которого в продукты PEXT реакции включается разное количество остатков биотина. В соответствии с последовательностями, 300 п.о. продукта PEXT реакции содержали 51 биотинилированный остаток дезоксиуридинтрифосфата в случае фрагмента гена MTHFR и 64, 76 и 80 – в случаях FVII, FV и FII фрагментов, соответственно. Это соотносится со значениями их дискриминационного фактора: на примере генотипа «нормальная гомозигота» это 3 ± 1,4; 12,4 ± 3,8; 18,7 ± 4,3 и 31,4 ± 4,2, соответственно.

Все исследуемые образцы были ранее проанализированы с использованием метода ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР). Результаты, полученные нами, полностью совпали с результатами РТ-ПЦР.

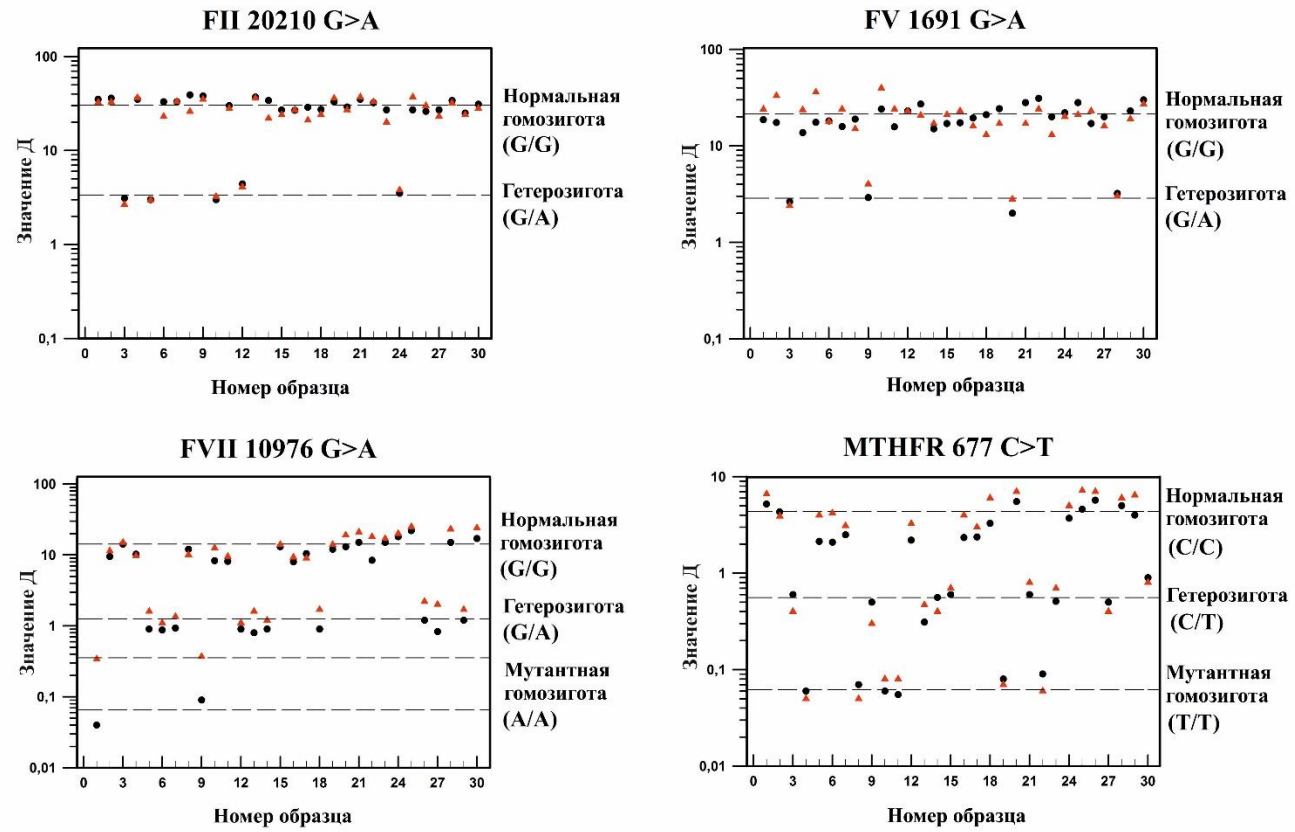

Рисунок 3.8 – Результаты генотипирования 30 образцов ДНК раздельным (кружки) и мультиплексным (треугольники) биолюминесцентным анализом.

Как видно из рисунка 3.8, мультиплексный вариант генотипирования ДНК дает те же результаты и близкие значения дискриминационного фактора (Таблица 3.4). На рисунке 3.8. номера образцов одни и те же для всех 4-х полиморфизмов. Таким образом, по данным графикам можно анализировать в образце наличие 4-х мутаций. Например, образец номер 3 имеет гетерозиготный генотип мутаций генов MTHFR, FV и FII, а также нормальный генотип для мутации в гене FVII.

Для оценки воспроизводимости мультиплексного метода два образца ДНК анализировали в трех повторностях, при этом каждый раз анализ проводили в разные дни начиная с этапа наработки матрицы. Для полученных значений дискриминационного фактора Д рассчитывали коэффициенты вариации

(отношение среднеквадратичного отклонения к среднему арифметическому значению величины, выраженное в процентах).

Считается, что при коэффициенте вариаций ≤ 10% полученные значения слабо вариабельны. В нашем эксперименте полученные коэффициенты вариаций находились в диапазоне 5,3-9,2% (Таблица 3.5), что подтверждает высокую воспроизводимость разработанного метода.

Таблица 3.5 – Коэффициент вариаций (CV) для значений дискриминационного фактора

Образец	Полиморфизм	Генотип	CV, %
1	FV (G1691A)	GA	8,3
	FII (G20210A)	GA	5,6
	MTHFR(C677T)	CT	6,7
	FVII (G10976A)	GG	5,3
2	FV (G1691A)	GG	9,2
	FII (G20210A)	GG	7,3
	MTHFR(C677T)	CC	7,2
	FVII (G10976A)	GA	5,3

Разработанный нами способ имеет вполне определенные перспективы развития: он может быть автоматизирован для повышения пропускной способности; высокая чувствительность анализа позволяет уменьшить объем образца и использовать 384-луночный микропланшет; для перехода на генотипирование других точечных мутаций необходимо просто использовать соответствующий набор праймеров.

3.3 Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов в гене MC1R одновременным биолюминесцентным анализом

Меланома является самым летальным типом злокачественных заболеваний кожи, которое характеризуется высоким риском метастазирования и устойчивостью к традиционной химиотерапии. В развитии меланомы участвуют генетические и внешние факторы, такие как ультрафиолетовое облучение. На данный момент известно, что генетический риск меланомы связан с рядом аллелей предрасположенности, среди них, в частности, однонуклеотидные полиморфизмы гена рецептора меланокортина 1 (MC1R).

Ген MC1R состоит из одного экзона (951 нуклеотидов) и локализован на хромосоме 16q24.3. Данный ген кодирует трансмембранный белок (317 аминокислотных остатков), относящийся к семейству GPCR рецепторов (G Protein Coupled Receptors). Рецептор состоит из семи α-спиральных доменов, пронизывающих липидный бислой, и экспрессируется преимущественно в меланоцитах волосяных фолликул и кожи. Белок обладает высокой аффинностью к α-меланоцит-стимулирующему гормону (α-МСГ) и адренокортикотропину [119]. Связывание данных гормонов с MC1R активирует аденилатциклазу и вызывает продукцию эумеланина (черного/коричневого пигмента) через cAMP-зависимый сигнальный путь [120, 121].

Данный ген высокополиморфен в европейской популяции, и описаны, по меньшей мере, 80 полиморфизмов гена MC1R [122]. Некоторые из них приводят к частичной потере функции рецептора, который не способен активировать синтез cAMP с эффективностью рецептора дикого типа [123]. В результате вырабатывается феомеланин (красный/желтый пигмент) вместо эумеланина, что приводит к УФ-чувствительности и характерному фенотипу (red hair color, RHC) [124]: рыжие волосы, светлая кожа, веснушки. Эумеланин обладает фотозащитными свойствами, в то время как феомеланин может генерировать в коже мутагенные фотопродукты в ответ на УФ-излучение [125, 126].

Полиморфизмы R151C (rs1805007), R160W (rs1805008), D294H (rs1805009) гена MC1R в европейской популяции в значительной степени связаны с RHC фенотипом и нефункциональным рецептором и обозначаются как R аллели [127, 128]. Для полиморфизма, приводящего к замене I155T, также была продемонстрирована значимая ассоциация с RHC фенотипом на основе семейных исследований [129, 130], но в ряде работ он все же обозначается как r аллель. Для R163Q аллеля (r аллель) в ряде исследований ассоциация с RHC фенотипом слабая или отсутствует, таким образом, предполагается, что при возникновении мутации рецептор частично сохраняет свою функцию [131, 132].

На основе генетических ассоциативных исследований было показано, что некоторые аллельные варианты гена MC1R повышают риск развития меланомы в разных популяциях [130, 133 - 137], в том числе независимо от цвета кожи и волос [138], а также ассоциированы с немеланомным раком кожи [139].

Три R варианта R151C, R160W, D294H и два r варианта I155T, R163Q по-разному ассоциированы с меланомой в различных популяциях.

Так, в исследовании Han с соавторами [140] было показано, что мутация R151C ассоциирована с повышенным риском 3-х типов рака кожи: плоскоклеточного, базальноклеточного и меланомы.

Данный полиморфизм ассоциирован с меланомой в популяциях Греции [135], Нидерландов [141], Латвии [142] и России [143].

Полиморфизмы R151C, I155T, R160W R163Q D294H были в значительной степени связаны с развитием меланомы в Италии [144]. Данная взаимосвязь с меланомой была показана для мутаций R160W и D294H в Испании [145] и США [140]; для R151C и R160W – в Германии [146], Франции [134]; для R151C, R163Q – в популяции Канарских островов [147]. Однако тип и частота вариантов MC1R сильно различаются между популяциями.

В представляемом исследовании мы оценивали частоту встречаемости и ассоциацию с меланомой вариантов R151C, I155T, R160W, D294H и R163Q среди пациентов с меланомой и здоровых доноров Красноярского края с использованием разработанного биолюминесцентного анализа.

3.3.1 Характеристика исследуемой группы

Полиморфизмы гена MC1R определяли в 174 образцах ДНК от пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом меланома кожи, зарегистрированных в период с 2013 по 2016 год в канцер-регистре Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского.

Пациенты прошли клиническое обследование и опрос у врача онколога-дерматолога. Оценивали такие характеристики как: локализация опухоли, гистологический тип меланомы, толщина опухоли по Бреслоу, стадия, прогрессирование и изъязвления меланомы, близлежащие и отдаленные метастазы, заболевания, приводящие к меланоме, профессиональные риски, а также размер и количество невусов, семейная история меланомы, случаи солнечного ожога, фототип кожи по классификации Фитцпатрика (I, II, III, IV) [148].

167 пациентов были охарактеризованы по клинико-морфологическим признакам, 125 – по фенотипическим. К фенотипическим характеристикам относили форму, количество и размер невусов и фототип кожи.

Среди пациентов было 117 женщин и 59 мужчин (средний возраст 59 ± 13.6, медиана: 61; C_{25} – C_{75}:51 – 67).

Контрольная группа включала 200 здоровых доноров и состояла из 115 женщин и 85 мужчин со средним возрастом 33,8 ±11 (медиана: 50; C_{25} – C_{75}:25 – 41).

3.3.2 Биолюминесцентный анализ полиморфизмов гена MC1R

При проведении исследования клинических образцов одновременно использовали специально созданный контрольный образец ДНК с генотипом «гетерозигота» по всем трем исследуемым полиморфизмам, который представлял собой эквивалентную смесь плазмидных ДНК со вставками исследуемого

полиморфного сайта с нормальной последовательностью и с тремя исследуемыми мутациями. Все полученные значения дискриминационного фактора отличались между собой более чем на порядок для каждого варианта генотипа (Таблица 3.6), и все полученные результаты были подтверждены секвенированием, при этом не наблюдалось ни одного случая расхождения.

Таблица 3.6 – Значения дискриминационного фактора для разных вариантов генотипа

Нормальна гомозигота	Гетерозигота	Мутантная гомозигота
R151C, 451 C>T		
22,89 ± 7,25 (n = 317)	2,56 ± 0,75 (n = 47)	0,19 (n = 2)
R160W, 478 C>T		
22,4 ± 8,2 (n = 301)	1,9 ± 0,6 (n = 62)	0,18 ± 0,11 (n=3)
D294H, 880 G>C		
20,2 ± 7,4 (n = 364)	1,98 (n = 2)	-
Контрольный образец (гетерозигота) (n = 25)		
R151C, 451 C>T	R160W, 478 C>T	D294H, 880 G>C
2,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,4

Различия в абсолютных значениях Д внутри каждого генотипа, достигающие иногда ± 30%, связаны в первую очередь с различным количеством исходной ДНК-матрицы, вносимой в PEXT реакцию. В данном методе мы осознанно ушли от этапа подготовки разведения ДНК до примерно одной концентрации, чтобы не усложнять метод и не добавлять дополнительный этап. В наших экспериментах максимальное количество ДНК, вносимое в реакцию амплификации, составило 150 нг – количество, которое не ингибирует ПЦР, а минимальное – 5 нг. Отметим, что для некоторых методов генотипирования, например, для ПЦР в реальном времени, количество вносимой ДНК является критическим показателем, несоблюдение которого может вызвать трудности в интерпретации результатов или привести к ложноположительным и ложноотрицательным результатам [149].

При генотипировании на первом этапе нами был амплифицирован фрагмент гена, включающий все 5 полиморфных сайтов. При этом биолюминесцентое генотипирование проводили в отношении 3-х представляющих наибольший интерес однонуклеотидных полиморфизмов, приводящих к заменам R151C, R160W, D294H, соответственно. Поскольку все полученные результаты были подтверждены секвенированием амплифицированного фрагмента целиком, мы использовали эти сиквенсы для оценки распространенности и двух дополнительных r полиморфизмов (I155T, R163Q), ассоциированных в некоторых популяциях с развитием меланомы.

3.3.3 Ассоциация вариантов гена MC1R с меланомой

374 образца ДНК были проанализированы на наличие вариантов гена MC1R (Таблица 3.6). Все исследуемые аллели и генотипы находились в равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0.05$).

Из таблицы 3.7 видно, что наиболее редкими были варианты I155T и D294H (< 2%) как среди пациентов, так и среди контрольной группы. В группе пациентов наиболее часто встречался минорный аллель T (R160W) – 12,4%, а в контрольной группе минорный аллель A (R163Q) – 14,3%. Носители вариантов R151C и R160W имели повышенный риск развития меланомы кожи OR:1,83; 95% CI: 1,03-3,23, p = 0,04 и OR:1,8; 95% CI: 1,1-2,96, p = 0,02, соответственно.

Значимая ассоциация вариантов R151C и R160W с меланомой была показана и в других популяциях (см. выше) и подтверждена в недавних мета-анализах [132, 144, 150].

Таблица 3.7 – Ассоциация вариантов гена MC1R с меланомой

MC1R вариант	Аллель	Пациенты (n=174), %	Контрольная группа (n=200), %	χ^2	p	OR, 95% CI
R151Q	C	90,8	94,8	4,4	0,04	0,55 (0,31-0,97)
C > T	T	9,2	5,3			1,83 (1,03-3,23)
I155T	T	98	99	1,31	0,25	0,55 (0,14-1,7)
T > C	C	2	1			2,03 (0,59-7)
R160W	C	87,6	92,8	5,58	0,02	0,55 (0,34-0,91)
C > T	T	12,4	7,3			1,8 (1,1-2,96)
R163Q	G	91,4	85,8	5,74	0,02	1,76 (1,1-2,81)
G > A	A	8,6	14,3			0,57 (0,36-0,91)
D294H	G	99,7	99,8	0,01	0,92	0,87 (0,05-13,96)
G > C	C	0,3	0,3			1,21 (0,07-18,45)

OR – отношение шансов, CI – доверительный интервал.

В отличие от результатов недавнего исследования Cordoba-Lanus с соавторами [147], мы обнаружили, что частота варианта R163Q среди пациентов и здоровых доноров различна (8,6 против 14,3% p = 0,02), а нормальный аллель статистически чаще встречается в случаях меланомы (OR: 1,76; 95%CI :1,1-2,81, p = 0,02).

Мы оценили ассоциацию с меланомой носительства одновременно нескольких из исследуемых вариантов гена MC1R. Поскольку наличие двух R аллелей в одном исследуемом образце наблюдались только в двух случаях среди пациентов и у одного здорового донора (R151C и R160W), мы оценивали комбинацию вариантов R (R151C, R160W, D294H) и r (I155T, R163Q) (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Ассоциация между количеством вариантов гена MC1R и меланомой кожи

Количество вариантов	Пациенты, (%) n=174	Здоровые доноры, (%) n=200	OR (95%CI)	p
2	21 (12,07)	9 (4,5)	2,913 (1,297-6,543)	0,01
3	–	1 (0,5)	–	–

Было обнаружено, что носители любых двух полиморфизмов среди пациентов встречаются чаще, чем среди контрольной группы и имеют повышенный риск развития меланомы (OR: 2,913; 95% CI:1,297-6,543, p = 0,01).

Полученный результат согласуется с результатами недавних исследований функции меланокортинового рецептора первого типа, в которых было показано, что сочетание нескольких полиморфных вариантов (в частности комбинации гомозиготных и гетерозиготных вариантов) гена MC1R приводит к снижению продукции cAMP по сравнению с единичными случаями только гетерозигот [151].

3.3.4 Ассоциация вариантов MC1R и фенотипических характеристик

Фенотипические характеристики сравнивали попарно в группе пациентов, имеющих мутацию и без нее (сравнение проводили для каждого полиморфизма в отдельности).

Мы не обнаружили статистически значимой взаимосвязи исследуемых вариантов MC1R с фототипом кожи, а также с наличием невусов > 5 мм, p > 0,05 (данные не представлены).

Ассоциация вариантов MC1R с большим количеством невусов была показана ранее [152; 153], но в нашем исследовании статистически значимых ассоциаций с числом невусов обнаружено не было. Однако, мутантный аллель T полиморфизма R160W статистически чаще встречался среди пациентов с меланомой, имеющих

врожденные невусы (OR: 3,15; 95% CI: 1,32-7,5, p = 0,01). Это согласуется с данными Kinsler с соавторами, которые в своем исследовании показали, что наличие полиморфизма V92M или R аллелей (D84E, R151C, R160W, D294H) ассоциировано с врожденными невусами, а также увеличением их размера [154].

3.3.5 Ассоциация вариантов MC1R и различных клинико-морфологических характеристик

Нами было обнаружено, что такие факторы как: наличие отдаленных метастазов, прогрессирование меланомы, средняя толщина опухоли, локализация меланомы, множественная меланома и семейная история меланомы не были связаны с отдельными вариантами гена MC1R p > 0,05 (данные не показаны).

В таблице 3.9 приведены найденные ассоциации между вариантами MC1R и клинико-морфологическими характеристиками пациентов с меланомой. Результаты представлены с коррекцией Бонферрони и без нее.

Таблица 3.9 – Ассоциация вариантов MC1R и клинико-морфологических характеристик

Полиморфизм		Присутствует (%)	Отсутствует (%)	$\chi 2$	p_c
		Изъязвление			
R151C C>T	CC	93 (55,69)	45 (26,95)	8.52 p = 0,014	< 0,017
	CT	12 (7,19)	15 (8,98)		
	TT	-	2 (1,2)		
Поверхностно-распространенная меланома					
R160W C>T	CC	32 (19,16)	97 (58,08)	7,1 p = 0,029	NS
	CT	16 (9,58)	19 (11,38)		
	TT	-	3 (1,8)		
R163Q	GG	34 (20,36)	104 (62,28)	7,89 p=0,019	NS
	GA	13 (7,78)	15 (8,98)		

G>A	AA	1 (0,6)	-		
Метастазы в близлежащих лимфоузлах					
R151C C>T	CC	104 (62,28)	34 (20,36)	6,68 p=0,035	NS
	CT	22 (13,17)	5 (2,99)		
	TT	-	2 (1,2)		
R160W C>T	CC	97 (58,08)	39 (23,35)	6,77 p=0,034	NS
	CT	27 (16,17)	2 (1,2)		
	TT	2 (1,2)	-		
Невусы> 5мм (>5)					
R151C C>T	CC	94 (75,2)	11 (8,8)	14,37 p=0,0008	< 0,017
	CT	15 (12)	3 (2,4)		
	TT	-	2 (1,6)		
I фототип кожи					
R163Q G>A	GG	94 (75,2)	9 (7,2)	9,26 p=0,009	< 0,017
	GA	18 (14,4)	3 (2,4)		
	AA	-	1 (0,8)		
Лентиго					
R163Q G>A	GG	134 (80,24)	4 (2,4)	14,3 p=0,0008	< 0.017
	GA	22 (13,17)	6 (3,59)		
	AA	1 (0,6)	-		
Случаи солнечных ожогов (> 3)					
R163Q G>A	GG	93 (74,4)	10 (8)	11,7 p=0,003	< 0,017
	GA	15 (12)	6 (4,8)		
	AA	-	1 (0,8)		
Профессиональные риски					
R163Q G>A	GG	94 (75,2)	9 (7,2)	6,64 p=0,036	NS
	GA	15 (12)	6 (4,8)		
	AA	1 (0,8)	-		

Предраковые заболевания					
R163Q G>A	GG	94 (75,2)	9 (7,2)	11,4 p=0,004	< 0,017
	GA	16 (12,8)	5 (4)		
	AA	-	1 (0,8)		

NS - не имеет статистической значимости, p_c – значение p после коррекции Бонферрони.

Из таблицы 3.9 видно, что некоторые клинико-морфологические характеристики носителей вариантов R163Q и R151C статистически отличались от характеристик неносителей. Однако мы не рассчитывали OR для этих случаев (лентиго, профессиональные риски и предраковые заболевания для R163Q и невусы > 5 мм для носителей R151C), поскольку таких случаев было не более 16 и группы сравнения существенно различались по количеству.

OR было рассчитано только для поверхностно-распространенной меланомы и вариантов R163Q, поскольку все полученные значения были статистически значимыми после коррекции Бонферрони. Мы обнаружили, что минорный аллель А данного полиморфизма статистически реже встречался среди этих случаев (OR: 0,35; 95% CI: 0,16-0,75, p = 0,006), несмотря на то, что этот гистологический тип меланомы был преобладающим (70,63%) в нашей выборке.

Для полиморфизма R151C была обнаружена статистически значимая ассоциация с изъязвлением (OR: 2,928; 95% CI:1,289-6,649, p = 0,01).

Для других вариантов гена MC1R в нашем исследовании статистически значимой связи с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками обнаружено не было.

3.3.5 Ассоциация комбинированных вариантов гена MC1R с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками

Для оценки взаимосвязи нескольких вариантов гена с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками мы сформировали три следующие группы: а) носители любого варианта R (R151C, R160W и D294H), включая варианты комбинаций R и r (I155C и R163Q); б) носители только r-вариантов; в) случаи без каких-либо изучаемых вариантов. Для каждой из этих групп мы оценили ассоциации с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками. Статистически значимые результаты с коррекцией Бонферрони и без нее представлены в таблице 3.10. Между исследуемыми группами не было обнаружено статистически значимой разницы ($p > 0,05$) относительно фенотипических характеристик (данные не показаны).

Таблица 3.10 – Ассоциация вариантов R или r с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками

Вариант MC1R	Присутствует (%)	Отсутствует (%)	$\chi 2$	p_c
Первичная локализация меланомы на голове				
R (n=66)	59 (35,33)	7 (4,19)	6,3	NS
Только r (n=17)	12 (7,19)	5 (2,99)	p = 0,043	
Без R или r (n=84)	77 (46,11)	7 (4,19)		
Изъязвление				
R (n=66)	29 (17,37)	37 (22,16)	18,23	p < 0,017
Только r (n=17)	15 (8,98)	2 (1,2)	p=0,00011	
Без R или r (n=84)	61 (36,53)	23 (13,77)		
Толщина опухоли по Бреслоу <1 мм				
R (n=66)	35 (20,96)	31 (18,56)	8,86	p < 0,017

Только r (n=17)	8 (4,79)	9 (5,39)	p=0,012	
Без R или r (n=84)	62 (37,13)	22 (13,17)		
Первичная локализация меланомы на нижних конечностях				
R (n=66)	58 (34,73)	8 (4,79)	8,7	NS
Только r (n=17)	14 (8,38)	3 (1,8)	p = 0,019	
Без R или r (n=84)	57 (34,13)	27 (16,17)		

Статистически значимые ассоциации были обнаружены между: R-вариантами и изъязвлением (OR: 3,38; 95% CI: 1,709-6,698, p < 0,001); R и средней толщиной опухоли < 1 мм (OR: 2,496; 95% CI: 1,257-4,955, p = 0,009). Толщина меланомы является одним из основных критериев прогрессирования опухоли и прогнозирования выживаемости. В литературе имеются сведения о том, что у носителей аллельных вариантов MC1R утолщение опухоли наблюдалось в три-четыре раза чаще, чем у неносителей [152, 155].

В нашем исследовании была обнаружена связь между тонкой меланомой (<1 мм) и носительством R-вариантов. Однако пациенты, имеющие тонкую меланому, были преобладающими в нашем исследовании (пациенты со стадиями I-II, которые характеризуются тонкой меланомой, а также пациенты с III стадией, но в то же время тонкой меланомой). Именно поэтому мы не принимали во внимание полученные нами ассоциации с толщиной меланомы.

Гораздо важнее, по нашему мнению, была обнаруженная ассоциация носительства R-вариантов с изъязвлением. Изъязвление является более значимым предиктором течения заболевания для ранних стадий (I и II), поскольку его наличие означает более агрессивное течение заболевания.

Необходимо отметить, что масштаб проведенного ассоциативного исследования был относительно небольшим и, возможно, поэтому для редких вариантов в нашей популяции (I155T и D294H) ассоциаций обнаружить не удалось.

Результаты нашей работы подтвердили перспективность разработанного биолюминесцентного анализа для выявления SNP и проведения локальных исследований по распространенности и ассоциациям известных мутаций в

популяции. Все исследование полиморфизмов гена MC1R было проведено в течение 2-х месяцев. При этом было проанализировано 374 образца, и полученные результаты полностью совпали с данными контрольного прямого секвенирования. Анализ полученных данных впервые выявил некоторые ассоциации вариантов гена MC1R с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками жителей Красноярского края. Было показано, что наличие вариантов R160W или R151C, а также одновременное носительство двух любых вариантов из пяти исследованных связано с увеличением риска меланомы кожи.

Важным является тот факт, что данный способ выявления можно легко адаптировать для исследования других однонуклеотидных полиморфизмов, представляющих интерес для медиков, простой заменой комплекта соответствующих праймеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время с развитием персонализированной медицины для оценки индивидуальных молекулярно-генетических особенностей больного, повышающих риск развития заболевания или влияющих на эффективность терапии, необходимы надежные и недорогие подходы для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов с установленной предрасположенностью к различным патологиям. Представленная работа посвящена разработке биолюминесцентного способа выявления однонуклеотидных полиморфизмов ДНК человека с использованием производных Ca^{2+}-активируемого фотопротеина обелина в качестве репортеров.

Наличие «цветных» мутантных форм обелина, обладающих разными характеристиками биолюминесцентного сигнала, высоким квантовым выходом и стабильностью, позволило разработать одновременный биолюминесцентный анализ двух аллелей в одной лунке. Сайт-направленным мутагенезом данных вариантов удалось получить варианты обелина с уникальным остатком цистеина, доступным для химических модификаций. Использование этих вариантов существенно упрощает синтез конъюгатов с биоспецифическими молекулами и повышает их выход, обеспечивая доступность цветных фотопротеиновых меток – ключевых элементов биолюминесцентного анализа.

Для одновременной детекции нескольких полиморфизмов, связанных с риском схожих патологий, был разработан способ анализа на основе мультиплексной ПЦР и показана его применимость для исследования точковых мутаций, локализованных как на разных хромосомах, так и на разных участках одной хромосомы.

Проведенное биомедицинское исследование по распространенности и ассоциациям ряда полиморфизмов гена MC1R у пациентов с диагнозом меланома и здоровых доноров демонстрирует перспективность и надежность разработанного

способа генотипирования и позволяет сделать заключение о возможности его практического использования в медицинской диагностике.

Выражаю благодарность сотрудникам Красноярского филиала ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ, КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского», КГКУЗ «Красноярский краевой центр крови №1» за предоставленные клинические образцы для исследования.

Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю доктору биологический наук Франк Людмиле Алексеевне, а также моим коллегам из лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН за помощь в постановке и проведении экспериментов, интерес к работе и обсуждение полученных результатов.

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы, получены в высоко очищенном виде и изучены варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками. Показано что пара вариантов W92F,H22E,D12C и Y138F,A6C обладают свойствами исходных цветных обелинов и могут быть использованы в качестве репортеров в биолюминесцентном анализе.
2. Разработан способ сайт-направленного синтеза коньюгатов цветных вариантов обелина с биоспецифическими молекулами, обеспечивающий высокий выход целевых продуктов (до 70%), в том числе универсальных биолюминесцентных меток для SNP-генотипирования.
3. Разработан способ одновременного выявления нескольких однонуклеотидных полиморфизмов на основе мультиплексной ПЦР и универсальных биолюминесцентных меток. Испытания способа на примере исследования полиморфизмов генов FV, FII MTHFR, FVII, связанных с риском нарушений системы гемостаза, показали достоверность и высокую воспроизводимость генотипирования.
4. Исследованы распространенность и значимость однонуклеотидных полиморфизмов R151C, R160W, D294H гена MC1R среди пациентов Красноярского края с диагнозом меланома (N = 174) и без него (N = 200). Корректность генотипирования контролировали с помощью специально созданного положительного контроля – образца плазмидной ДНК, обеспечивающего при корректном генотипировании результат «гетерозигота» по всем исследуемым полиморфизмам.
5. Установлено, что наиболее распространенным полиморфизмом среди пациентов был R160W, среди здоровых доноров – R163Q. Полиморфизмы I155T и D294H являются редкими (< 2%) и их дальнейшее тестирование нецелесообразно.

6. Установлена взаимосвязь полиморфизмов гена MC1R с риском развития меланомы: носители вариантов R151C и R160W имели повышенный риск развития меланомы кожи OR: 1,83; 95% CI:1,03-3,23, p = 0,04 и OR: 1,8; 95% CI: 1,1-2,96, p = 0,02, соответственно. Обнаружено, что носители одновременно любых двух полиморфизмов среди пациентов встречаются чаще, чем среди контрольной группы и имеют повышенный риск развития меланомы (OR: 2,913; 95% CI 1,297-6,543 p = 0,01).

7. Установлена взаимосвязь полиморфизмов гена MC1R с рядом клинико-морфологических характеристик. В группе пациентов-носителей R аллелей (R151C, R160W, D294H) чаще наблюдалось изъязвление опухоли (OR: 3,38 95% CI 1,709-6,698, p < 0,001).

   Полиморфизм R151C имеет статистически значимую ассоциацию с изъязвлением опухоли (OR: 2,928; 95% CI: 1,289-6,649, p = 0,01).

   Полиморфизм R163Q, статистически реже встречался среди образцов от пациентов с поверхностно-распространенной меланомой (OR: 0,35; 95% CI: 0,16-0,75, p = 0,006).

   Полиморфизм R160W статистически чаще встречался среди пациентов с меланомой, имеющих врожденные невусы (OR: 3,15; 95% CI: 1,32-7,5, p = 0,01).

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sachidanandam, R. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms / R. Sachidanandam, D. Weissman, S.C. Schmidt, J.M. Kakol, L. D. Stein, G. Marth, S. Sherry, J. C. Mullikin, B. J. Mortimore, D. L. Willey, S. E. Hunt, C. G. Cole, P. C. Coggill, C. M. Rice, Z. Ning, J. Rogers, D. R. Bentley, P.Y. Kwok, E. R. et al // Nature. – 2001. – V. 409, N. 6822. – P. 928-933.

2. Venter J. C. The Sequence of the Human Genome / J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. et al // Science. – 2001. – V. 291, N. 5507. – P. 1304-1351.

3. Ragoussis, J. Genotyping technologies for genetic research / J. Ragoussis // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2009. – V. 10. – P. 117-33.

4. Frank, L. A. Violet and greenish photoproteinobelin mutants for reporter applications in dual-color assay / L. A. Frank, V. V. Borisova, S. V. Markova, N. P. Malikova, G. A. Stepanyuk, E. S. Vysotski // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – V. 391, № 8. – P. 2891-2896.

5. Kudryavtsev, A. N. Simultaneous bioluminescent immunoassay of serum total and IgG-bound prolactins / A. N. Kudryavtsev, V. V. Krasitskaya, A. I. Petunin, A. Y. Burakov, L. A. Frank // Anal. Chem. – 2012. – V. 84, N. 7. – P. 3119-3124.

6. Shimomura, O. Bioluminescence: chemical principles and methods /O. Shimomura. – Singapore : World Scientific Publishing Co, 2006. – 470 p.

7. Liu, Z. J. Structure of the Ca^{2+}-regulated photoproteinobelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z. J. Liu, E. S. Vysotski, C. J. Chen, J. P. Rose, J. Lee, B. C. Wang // Protein. Sci. – 2000. – V. 9, N. 11. – P. 2085-2093.

8. Haddock, S. H. D. Bioluminescence in the sea / S. H. D. Haddock, M. A. Moline, J. F. Case // Annual Review of Marine Science. – 2010. – V. 2, N. 1. – P. 443-493.

9. Lorenz, W. W. Isolation and expression of a cDNA encoding Renillareniformis luciferase / W. W. Lorenz, R. O. McCann, M. Longiaru, M. J. Cormier // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88, N. 10. – P. 4438-4442.

10. Loening, A. M. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output / A. M. Loening, T. D. Fenn, A. M. Wu, S. S. Gambhir // Prot. Eng. Des. Sel. – 2006. – V. 19, N. 9. – P. 391-400.

11. Kimura, M. On some principles governing molecular evolution / M. Kimura, T. Ohta // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1974. – V. 71, N. 7. – P. 2848-2852.

12. Loening, A. M. Red-shifted Renillareniformis luciferase variants for imaging in living subjects / A. M.Loening, A. M. Wu, S. S.Gambhir // Nat. Methods. – 2007. – V. 4, N. 8. – P. 641-643.

13. Loening, A. M. A red-shifted Renilla luciferase for transient reporter-gene expression / A. M. Loening, A. Dragulescu-Andrasi, S. S. Gambhir // Nat. Methods. – 2010. – V. 7, N. 1. – P. 5-6.

14. Hall, M. P. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate / M. P. Hall, J. Unch, B. F. Binkowski, M. P. Valley, B. L. Butler, M. G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, T. Machleidt, M. B. Robers, H. A.Benink, C. T. Eggers, M. R. Slater, P. L.Meisenheimer, D. H. Klaubert, F. Fan, L. P. Encell, K. V. Wood // ACS Chem. Biol.– 2012.– V. 7, N. 11. – P. 1848-1857.

15. Chen, S. Ingestibility, digestibility, and engineered biological control potential of Flavobacterium hibernum, isolated from larval mosquito habitats / S. Chen, M. G. Kaufman, M. L. Korir, E. D. Walker // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – P. 1150-1158.

16. Karlsson, E. A. Visualizing real-time influenza virus infection, transmission and protection in ferrets / E. A. Karlsson, V. A. Meliopoulos, C. Savage, B. Livingston, A. Mehle, S. Schultz-Cherry // Nat. Commun. – 2015. – V. 6. – P. 6378.

17. Demont, E. H. 1,3-Dimethyl benzimidazolones are potent, selective inhibitors of the BRPF1 bromodomain / E. H. Demont, P. Bamborough, C. Chung, P. D. Craggs, D. Fallon, L. J. Gordon, P. Grandi, C. I. Hobbs, J. Hussain, E. J. Jones, A. Le Gall, A.-M.

Michon, D. J. Mitchell, R. K. Prinjha, A. D. Roberts, R. J. Sheppard, R. J. Watson // ACS Med. Chem. Lett. – 2014. – V. 5. – P. 1190-1195.

18. Picaud, S. 9H-purine scaffold reveals induced-fit pocket plasticity of the BRD9 bromodomain. / S. Picaud, M. Strocchia, S. Terracciano, G. Lauro, J. Mendez, D. L. Daniels, R. Riccio, G. Bifulco, I. Bruno, P. Filippakopoulos // J. Med. Chem. – 2015. – V. 58, N. 6. – P. 2718-2736.

19. Inouye, S. Luminescence enhancement of the catalytic 19 kDa protein (KAZ) of Oplophorus luciferase by three amino acid substitutions / S. Inouye, J. Sato, Y. Sahara-Miura, S. Yoshida, T. Hosoya // Biochem. Biophys. Res. Communs. – 2014. – V. 445, N. 1. – P. 157-162.

20. Verhaegent, M. Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization / M. Verhaegent, T. K. Christopoulos // Anal. Chem. – 2002. – V. 74, N. 17. – P. 4378-4385.

21. Kim, S. B. Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays / S. B. Kim, H. Suzuki, M. Sato, H. Tao //Anal. Chem. – 2011. – V. 83, N. 22. – P. 8732-8740.

22. Kim, S. B. Creation of artificial luciferases for bioassays / S. B. Kim, M. Torimura, H. Tao // Bioconjugate Chem. – 2013. – V. 24, № 12. – P. 2067-2075.

23. Kim, S. B. Functional artificial luciferases as an optical readout for bioassays / S. B. Kim, H. Izumi // Biochem. Biophys. Res. Communs. – 2014. – V. 448, N. 4. – P. 418-423.

24. Deng, L. Structural basis for the emission of violet bioluminescence from a W92F obelinmutant / L. Deng, E. S. Vysotski, Z. J. Liu, S. V. Markova, N. P. Malikova, J. Lee, J. Rose, B. C. Wang // FEBS Lett. – 2001. – V. 506, N. 3. – P. 281-285.

25. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // Luminescence. – 2000. – V. 15, N. 1. – P. 51-58.

26. Krasitskaya, V.V. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay / V. V. Krasitskaya, A. N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L. A. Frank // Anal. Methods. – 2013. – N. 5. – P. 636-640.

27. Qu, X. Aequorinmutants with increased thermostability / X. Qu, L. Rowe, E. Dikici, M. Ensor, S. Daunert // Anal. Bioanal. Chem. – 2014. – V. 406, N. 23. – P. 5639-5643.

28. Shimomura, O. Structure of the light-emitting moiety of aequorin / O. Shimomura, F. H. Johnson // Biochemistry. – 1972. – V. 11, N. 9. – P. 1602-1608.

29. Giuliani, G. New red-shifted coelenterazine analogues with an extended electronic conjugation / G. Giuliani, P. Molinari, G. Ferretti, A. Cappelli, M. Anzini, S. Vomero, T. Costa // Tetrahedron Lett. – 2012. – V. 53, N. 38. – P. 5114-5118.

30. Gealageas, R. Bioluminescent properties of obelin and aequorin with novel coelenterazine analogues / R. Gealageas, N. P. Malikova, S. Picaud, A. J. Borgdorff, L. P. Burakova, P. Brûlet, E. S. Vysotski, R. H. Dodd // Anal. Bioanal. Chem. – 2014. – V. 406, N. 11. – P. 2695-2707.

31. Stepanyuk, G. A. Coelenterazine-v ligated to Ca2+-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of Renillamuelleri luciferase / G. A. Stepanyuk, J. Unch, N. P. Malikova, S. V. Markova, J. Lee, E. S. Vysotski // Anal. Bioanal.Chem. – 2010. – V. 398, N. 4. – P. 1809-1817.

32. Titushin, M. S. Coelenterazine-binding protein of Renillamuelleri: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase / M. S. Titushin, S.V. Markova, L. A. Frank, N. P. Malikova, G. A. Stepanyuk, J. Lee, E. S. Vysotski // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V. 7, N. 2. – P. 189-196.

33. Levi, J. Bisdeoxycoelenterazine derivatives for improvement of bioluminescence resonance energy transfer assays / J. Levi, A. De, Z. Cheng, S. S. Gambhir // Am. Chem. Soc. – 2007. – V. 129, N. 39. – P. 11900-11901.

34. Qi, X. L-RCA (ligation-rolling circle amplification): a general method for genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) / X. Qi, S. Bakht, K. M. Devos, M. D. Gale, A. Osbourn // Nucleic. Acids. Res. – 2001. –V. 29, N. 22. – P. e116.

35. Myakishev, M. V. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers / M. V. Myakishev, Y. Khripin, S. Hu, D. H. Hamer // Genome Res. – 2001. – V. 11, N. 1. – P. 163-169.

36. Pastinen, T. A System for Specific, High-throughput Genotyping by Allele-specific Primer Extension on Microarray / T. Pastinen, M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen, A. C. Syvänen // Genome Res. – 2000. – V. 10, N. 7. – P. 1031-1042.

37. Ellis, M. C. “Spot-on” SNP genotyping / M. C. Ellis // Genome Res. – 2000. – V. 10, N. 7. – P. 895-897.

38. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // Proc Natl Acad Sci USA. – 1977. – V. 74, N. 12. – P. 5463-5467.

39. Tebbutt, S. J. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by arrayed primer extension / S. J. Tebbutt // Methods Mol Biol. – 2007. – V. 382. – P. 149-161.

40. Pullat, J. Arrayed primer extension reaction for genotyping on oligonucleotide microarray / J. Pullat, A. Metspalu // Methods Mol Biol. – 2008. – V. 444. – P. 161-167.

41. Gabriel, S. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform / S. Gabriel, L. Ziaugra, D. Tabbaa // Curr. Protoc. Hum. Genet. – 2009. – Ch. 2, N.2. – P. 12.

42. Hardenbol, P. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes / P. Hardenbol, J. Banér, M. Jain, M. Nilsson, E. A. Namsaraev, G. A. Karlin-Neumann, H. Fakhrai-Rad, M. Ronaghi, T. D. Willis, U. Landegren, R. W. Davis // Nat. Biotechnol. – 2003. – V. 21, N. 6. – P. 673-678.

43. Hardenbol, P. Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay / P. Hardenbol, F. Yu, J. Belmont, J. Mackenzie, C. Bruckner, T. Brundage, A. Boudreau, S. Chow, J. Eberle, A. Erbilgin, M. Falkowski, R. Fitzgerald, S. Ghose, O. Iartchouk, M. Jain, G. Karlin-Neumann, X. Lu, X. Miao, B. Moore, M. Moorhead, E. Namsaraev, S. Pasternak, E. Prakash, K. Tran, Z. Wang, H. B. Jones, R. W. Davis, T. D. Willis, R. A. Gibbs // Genome Res. – V. 15. – P. 269-275.

44. Dong, F. Secondary structure prediction and structure-specific sequence analysis of single-stranded DNA / F. Dong, H. T. Allawi, T. Anderson, B. P. Neri, V. I. Lyamichev // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29, N. 15. – P. 3248-3257.

45. Olivier, M. The Invader assay for SNP genotyping / M. Olivier // Mutat Res. – 2005. – V. 573, N. 1-2. – P. 103-110.

46. Haliassos, A. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations / A. Haliassos, J. C. Chomel, L. Tesson, M. Baudis, J. Kruh, J. C. Kaplan, A. Kitzis // Nucleic Acids Res. – 1989. – V. 17, N. 9. – P. 3606.

47. Chuang, L. Y. Restriction enzyme mining for SNPs in genomes / L. Y. Chuang, C. H. Yang, K. H. Tsui, Y. H. Cheng, P. L. Chang, C. H. Wen, H. W. Chang // Anticancer Res. – 2008. – V. 28, N. 4A. – P. 2001-2007.

48. Sharma, N. Mutagenic Primer Assay for Genotyping of the CRHR1 Gene Rare Variant rs1876828 (A/G) in Asians: A Cost-Effective SNP Typing / N. Sharma, S. Awasthi, S. R. Phadke // J. Clin Lab Anal. – 2016. – V. 30, N. 2. – P. 169-174.

49. Wang, S. Detection of the rs10250202 polymorphism in protection of telomeres 1 gene through introducing a new restriction enzyme site for PCR–RFLP assay / S. Wang, X. Duan, T. Wang, X. Feng, P. Wang, W. Yao, Y. Wu, Y. Wu, Z. Yan, F. Feng, S. Yu, W. Wang // Springerplus. – 2016. – V. 5. – P. 592.

50. Ota, M. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism / M. Ota, H. Fukushima, J. K. Kulski, H. Inoko // Nat. Protoc. – 2007. – V. 2, N. 11. – P. 2857-2864.

51. Knez, K. Emerging technologies for hybridization based single nucleotide polymorphism detection / K. Knez, D. Spasic, K. P. F. Janssenb, J. Lammertyn // Analyst. – 2014. – V. 139, N. 2. – P. 353-370.

52. Holland, P. M. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase / P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88, N. 16. – P. 7276-7280.

53. Kutyavin, I. V. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures / I. V. Kutyavin, I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, J. Hedgpeth // Nucleic Acids Res. – 2000. V. 28, N. 2. – P. 655-661.

54. Liu, E. P. Whole Blood PCR Amplification with Pfu DNAPolymerase and Its Application in Single-Nucleotide Polymorphism Analysis / E. P. Liu, Y. Wang, X. H. He, J. J. Guan, J. Wang, Z. H. Qin, W. P. Sun // Genet. Test. Mol. Biomarkers. – 2015. – V. 19, N. 11. – P. 610-616.

55. Wang, W. High-Throughput Genotyping by Coupling Adapter-Ligation Mediated Allele-Specific Amplification with Microplate Array Parallel Gel Electrophoresis / W. Wang, X. Zhang, G. Zhou // Mol. Biotechnol. – 2010. – V. 44, N. 1. – P. 1-7.

56. Haff, L. A. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry / L. A. Haff, I. P. Smirnov // Genome Res. – 1997. – V. 7, N. 4. – P. 378-388.

57. Ross, P. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry / P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. A. Haff // Nat. Biotechnol. – 1998. – V. 16, N. 13. – P. 1347-1351.

58. Braun, A. Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extension and mass spectrometry / A. Braun, D. P. Little, H. Köster // Clin. Chem. – 1997. – V. 43, N. 7. – P. 1151-1158.

59. Cashman, J. R. Population distribution of human flavin-containing monooxygenase form 3: gene polymorphisms / J. R. Cashman, J. Zhang, J. Leushner, A. Braun // Drug. Metab. Dispos. – 2001. – V. 29, N. 12. – P. 1629-1637.

60. Kim, S. Solid phase capturable dideoxynucleotides for multiplex genotyping using mass spectrometry / S. Kim, J. R. Edwards, L. Deng, W. Chung, J. Ju // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – P. 1-6.

61. Ellis, J. A. The MassARRAY (®) System for Targeted SNP Genotyping / J. A. Ellis, B. Ong // Methods Mol. Biol. – 2017. – V.1492. – P. 77-94.

62. Kim, S. Multiplex genotyping of the human β2-adrenergic receptor gene using solid-phase capturable dideoxynucleotides and mass spectrometry / S. Kim, S. Shi, T. Bonome, M. E. Ulz, J. R. Edwards, H. Fodstad, J. J. Russo, J. Ju // Anal. Biochemistry. – 2003. – V. 316, N. 2. – P. 251-258.

63. Griffin, T. J. Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry / T. J. Griffin, W. Tang, L. M. Smith // Nat. Biotechnol. – 1997. – V. 15, N. 13. – P. 1368-1372.

64. Ross, P. L. Analysis of short tandem repeat polymorphisms in human DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / P. L. Ross, P. Belgrader // Anal. Chem. – 1997. – V. 69. – P. 3966–3972.

65. Thomas, R. K. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer / R. K. Thomas, A. C. Baker, R. M. Debiasi, W. Winckler, T. LaFramboise, W. M. Lin, M. Wang, W. Feng, T. Zander, L. E. MacConnaill, J. C. Lee, R. Nicoletti, C. Hatton, M. Goyette, L. Girard, K. Majmudar, L. Ziaugra, K. K. Wong, S. Gabriel, R. Beroukhim, M. Peyton, J. Barretina, A. Dutt, C. Emery, H. Greulich, K. Shah, H. Sasaki, A. Gazdar, J. Minna, S. A. Armstrong, I. K. Mellinghoff, F. S. Hodi, G. Dranoff, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, S. F. Nelson, L. M. Liau, K. Mertz, M. A. Rubin, H. Moch, M. Loda, W. Catalona, J. Fletcher, S. Signoretti, F. Kaye, K. C. Anderson, G. D. Demetri, R. Dummer, S. Wagner, M. Herlyn, W. R. Sellers, M. Meyerson, L. A. Garraway // Nat. Genet. – 2007. – V. 39, N. 3. – P. 347-351.

66. Jaremko, M. MALDI-TOF MS and TaqMan assisted SNP genotyping of DNA isolated from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues (FFPET) / M. Jaremko, C. Justenhoven, B. K. Abraham, W. Schroth, P. Fritz, S. Brod, C. Vollmert, T. Illig, H. Brauch // Hum. Mutat. – 2005. – V. 25, N. 3. – P. 232-238.

67. Horn, H. H. A multiplex MALDI-TOF MS approach facilitates genotyping of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tumour specimens. Horn, C. Pott, J. Kalla, M. Dreyling, A. Rosenwald, G. Ott, M. Schwab, E. Schaeffeler // Pharmacogenet. Genomics. – 2010. – V. 20, N. 10. – P. 598-604.

68. Ahrberg, C. D. Doubling Throughput of a Real-Time PCR / C. D. Ahrberg, P. Neužil // Sci. Rep. –2015. – V. 5. – P. 12595.

69. Choi, S. Y. Construction of a DNA chip for screening of genetic hearing loss / S. Y. Choi, Y. E. Kim, D. B. Ahn, T. H. Kim, J. H. Choi, H. R. Lee, S. J. Hwang, U. K. Kim, S. H. Lee // Clin. Exp. Otorhinolaryngol. – 2009. – V. 2, N. 1. – P. 44-47.

70. Howell, W. M. Dynamic allele-specific hybridization / W. M. Howell, M. Jobs, U. Gyllensten, A. J. Brookes // Nature Biotechnology. – 1999. – V. 17. – P. 87-88.

71. Russom, A. Rapid melting curve analysis on monolayered beads for high-throughput genotyping of single-nucleotide polymorphisms / A. Russom, S. Haasl, A. J. Brookes, H. Andersson, G. Stemm // Anal. Chem. – 2006. – V. 78, N. 7. – P. 2220-2225.

72. Li, H. Increasingly branched rolling circle amplification for the cancer gene detection / H. Li, J. Xu, Z. Wang, Z. S. Wu, L. Jia // Biosens. Bioelectron. – 2016. – V. 15, N. 86. – P. 1067-1073.

73. Zou, Z. Ligation-rolling circle amplification combined with γ-cyclodextrin mediated stemless molecular beacon for sensitive and specific genotyping of single-nucleotide polymorphism / Z. Zou, Z. Qing, X. He, K. Wang, D. He, H. Shi, X. Yang, T. Qing, X. Yang // Talanta. – 2014. – V. 125. – P. 306-12.

74. Wabuyele, M. B. Approaching real-time molecular diagnostics: single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) detection for the analysis of low abundant point mutations in K-ras oncogenes / M. B. Wabuyele, H. Farquar, W. Stryjewski, R. P. Hammer, S. A. Soper, Y. W. Cheng, F. Barany // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – V. 125, N. 23. – P. 6937-6945.

75. Sun, Y. Real-time fluorescence ligase chain reaction for sensitive detection of single nucleotide polymorphism based on fluorescence resonance energy transfer / Y. Sun, X. Lu, F. Su, L. Wang, C. Liu, X. Duan, Z. Li // Biosens. Bioelectron. – 2015. – V. 15, N. 74. – P. 705-710.

76. Takatsu, K. A new approach to SNP genotyping with fluorescently labeled mononucleotides / K. Takatsu, T. Yokomaku, S. Kurata, T. Kanagawa // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32, N. 7. – P. e60.

77. Duan, X. Homogeneous and one-step fluorescent allele-specific PCR for SNP genotyping assays using conjugated polyelectrolytes / X. Duan, L. Liu, S. Wang // Biosen. Bioelectron. – 2009. – V. 24. – P. 2095-2099.

78. Ha, C. The Template-Directed Dye-Incorporation Assay with Fluorescence Polarization Detection (FP-TDI) / C. Ha, P. Y. Kwok // CSH Protoc. – 2007. - pdb.prot4844.

79. Chen, X. Fluorescence Polarization in Homogeneous Nucleic Acid Analysis / X. Chen, L. Levine, P.-Y. Kwok // Genome Res. – 1999. – V. 9, N. 5. – P. 492-498.

80. Simeonov, A. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection / A. Simeonov, T. T. Nikiforova // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30, N. 17. – P. e91.

81. Hsu, T. M. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection / T. M. Hsu, S. M. Law, S. Duan, B. P. Neri, P. Y. Kwok // Clin. Chem. – 2001. – V. 47. – P. 1373-1377.

82. Kwok, P. Y. SNP genotyping with fluorescence polarization detection / P. Y. Kwok // Hum. Mutat. – 2002. – V. 19, N. 4. – P. 315-323.

83. Ahmadian, A. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing / A. Ahmadian, B. Gharizadeh, A. C. Gustafsson, F. Sterky, P. Nyrén, M. Uhlén, J. Lundeberg // Anal. Biochem. – 2000. – V. 280, N. 1. – P. 103-110.

84. Royo, J. L. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping / J. L. Royo, M. Hidalgo, A. Ruiz // Nat. Protoc. – 2007. – V.2, N. 7. – P. 1734-1739.

85. Lavebratt, C. Single nucleotide polymorphism (SNP) allele frequency estimation in DNA pools using Pyrosequencing / C. Lavebratt, S. Sengul // Nat. Protoc. – 2006. – V. 1, N. 6. – P. 2573-2582.

86. Guo, D. C. High throughput detection of small genomic insertions or deletions by Pyrosequencing / D. C. Guo, Y. Qi, R. He, P. Gupta, D. M. Milewicz // Biotechnol. Lett. – 2003. – V. 25, N. 20. – P. 1703-1707.

87. Zerefos, P. G. Photoprotein aequorin as a novel reporter for SNP genotyping by primer extension-application to the variants of mannose-binding lectin gene / P. G. Zerefos, P. C. Ioannou, J. Traeger-Synodinos, G. Dimissianos, E. Kanavakis, T. K. Christopoulos // Hum. Mutat. – 2006. – V. 27, N. 3. – P. 279-285.

88. Tannous, B. A. Combined flash- and glow-tipe chrmiluminescent reactions for high-throughput genotyping of biallelic polymorphisms / B. A. Tannous, M. Verhaegen, T. K. Christopoulos, A. Kourakli // Anal. Biochemistry. – 2003. – V. 320. – P. 266-272.

89. Konstantou, J. Genotyping of singl nucleotide polymorphisms by primer extension reaction and dual-analyte bio/chemiluminometric assay / J. Konstantou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos // Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – V. 388. – P. 1747-1754.

90. Elenis, D. S. Quadruple-allele chemiluminometric assay for simultaneous genotyping of two single-nucleotide polymorphisms / D. S. Elenis, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos // Analyst. – 2009. – V. 134, N. 4. – P. 725-730.

91. Tsiakalou, V. Bioluminometric assay for relative quantification of mutant allele burden: application to the oncogenic somatic point mutation JAK2 V617F / V. Tsiakalou, M. Petropoulou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, E. Kanavakis, N. I. Anagnostopoulos, I. Savvidou, J. Traeger-Synodinos // Anal. Chem. – 2009. V. 81, N. 20. – P. 8596-8602.

92. Iliadi, A. Absolute quantification of the alleles in somatic point mutations by bioluminometric methods based on competitive polymerase chain reaction in the presence of a locked nucleic acid blocker or an allele-specific primer / A. Iliadi, M. Petropoulou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, N. Anagnostopoulos, E. Kanavakis, J. Traeger-Synodinos // Anal. Chem. – 2011. V. 83, N.17. – P. 6545-6551.

93. Markova, S. V. Obelin hyperexpression in Escherichia coli, purification and characterization / S. V. Markova, E. S. Vysotski, J. Lee // Bioluminescence and Chemiluminescence / ed. J. F. Case, P. J. Herring, B. H. Robison, S. H. D. Haddock, L. J. Kricka, P. E. Stanley. World Scientific, Singapore. – 2001. – P. 115-118.

94. Markova, S. V. Obelin from the bioluminescent marine hydroid Obelia geniculata: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca^{2+}-regulated photoproteins / S. V. Markova, E. S. Vysotski, J. R. Blinks, L. P. Burakova, B. C. Wang, J. Lee // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – P. 2227-2236.

95. Sambrook, J. Molecular Cloning. A laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – V. 2.

96. Illarionov, B. A. Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA, purification and characterization as a calcium indicator / B. A. Illarionov, L. A. Frank, V. A. Illarionova, V. S. Bondar, E. S. Vysotski, J. R. Blinks // Methods Enzymol. – 2000. – V. 227. – P. 223-249.

97. Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 / U. K. Laemli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.

98. Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г. Н. Зайцев. – М. : Наука, 1984. – 35 с.

99. Франк, Л. А. Синтез коньюгатов Ca2+-регулируемого фотопротеина обелина с иммуноглобулинами и их использование в качестве меток в иммуноанализе / Л. А. Франк, А. И. Петунин, Е. С. Высоцкий // Биоорганическая химия. – 2004. – Т. 30, N. 4. – С. 364-368.

100. Frank, L. A. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label / L. A. Frank, A. I. Petunin, E. S. Vysotski // Anal. Biochem. – 2004. – V. 305, N. 2. – P. 240-246.

101. Франк, Л.А. Рекомбинатный фотопротеин обелин гидроидного полипа Obelia longissima: выделение и использование в иммуноферментном анализе. Дисс… канд-та биол. наук: 03.00.02 – Красноярск, 1997. – 91 с.

102. Krasitskaya, V. V. Ca(2+)-Triggered Coelenterazine-Binding Protein From Renilla as an Enzyme-Dependent Label for Binding Assay / V. V. Krasitskaya, S. I. Korneeva, A. N. Kudryavtsev, S. V. Markova, G. A. Stepanyuk, L. A. Frank // Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – V. 401, N. 8. – P. 2573-2579.

103. Башмакова, Е. Е. Выявление мишеней, ассоциированных с раком легкого в плазме крови биолюминесцентным твердофазным анализом сэндвич-типа / Е. Е. Башмакова, Г. С. Замай, Л. А. Франк // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – в печати.

104. Vorobjeva, M. A. RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis / M. A. Vorobjeva, V. V. Krasitskaya, A. A. Fokina, V. V. Timoshenko, G. A. Nevinsky, A. G. Venyaminova, L. A. Frank // Anal. Chem. –2014. – V. 86, N. 5. – P. 2590-2594.

105. Hu, Y. W. Primer specific and mispair extension analysis (PSMEA) as a simple approach to fast genotyping / Y. W. Hu, E. Balaskas, G. Kessler, C. Issid, L. J. Scully, D.

G. Murphy, A. Rinfret, A. Giulivi, V. Scalia, P. Gill // Nucleic Acids Res. – 1998. – V. 26, N. 21. – P. 5013-5015.

106. Key, N. S. Hyperhomocyst(e)inemia and Thrombophilia / N. S. Key, R. C. McGlennen // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2002. – V. 126, N. 11. – P. 1367-1375.

107. Rosendaal, F. R. Venous thrombosis: a multicausal disease / F. R. Rosendaal // Lancet. – 1999. – V. 353, N. 9159. – P. 1167-1173.

108. Lane, D. A. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease / D. A. Lane, P. J. Grant // Blood. – 2000. – V. 95, N. 5. – P. 1517-1532.

109. Brezovska-Kavrakova, J. Hyperhomocysteinemia and of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) genetic polymorphism in patients with deep vein thrombosis / J. Brezovska-Kavrakova, M. Krstevska, G. Bosilkova, S. Alabakovska, S. Panov, N. Orovchanec // Mater. Sociomed. – 2013. – V. 25, N. 3. – P. 170-174.

110. Mrozikiewicz, P. M. Reduced procedural risk for coronary catheter interventions in carriers of the coagulation factor VII-Gln353 gene / P. M. Mrozikiewicz, I. Cascorbi, S. Ziemer, M. Laule, C. Meisel, V. Stangl, W. Rutsch, K. Wernecke, G. Baumann, I. Roots, K. Stangl // J. Am. Coll. Cardiol. – 2000. V. 36, N. 5. – P. 1520-1525.

111. Huber, S. Analytical evaluation of primer engineered multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A / S. Huber, K. J. McMaster, K. V. Voelkerding // J. Mol. Diagn. – 2000. – V. 2, N. 3. – P. 153-157.

112. DelRio-LaFreniere, S. A. Simultaneous allele - specific amplification: a strategy using modified primer-template mismatches for SNP detection-application to prothrombin 20210A (factor II) and factor V Leiden (1691A) gene mutations / S. A. DelRio-LaFreniere, R. C. McGlennen // Mol. Diagn. – 2001. – V. 6, N. 3. – P. 201-209.

113. Patnaik, M. Detection of genomic polymorphisms associated with venous thrombosis using the invader biplex assay / M. Patnaik, J. S. Dlott, R. N. Fontaine, M. T. Subbiah, M. J. Hessner, K. A. Joyner, M. R. Ledford, E. C. Lau, C. Moehlenkamp, J. Amos, B. Zhang, T. M. Williams // J. Mol. Diagn. – 2004. – V. 6, N. 2. – P. 137-144.

114. Seipp, M. T. Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting / M. T. Seipp, D. Pattison, J. D. Durtschi, M. Jama, K. V. Voelkerding, C. T. Wittwer // Clin. Chem. – 2008. – V. 54, N. 1. – P. 108-115.

115. Bortolin, S. Multiplex genotyping for thrombophilia-associated SNPs by universal bead arrays / S. Bortolin // Methods Mol. Biol. – 2009. – V. 496. – P. 59-72.

116. Vlachou, M.A. Development of a three-biosensor panel for the visual detection of thrombophilia-associated mutations / M. A. Vlachou, K. M. Glynou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, G. Vartholomatos // Biosens. Bioelectron. – 2010. – V. 26, N. 1. – P. 228-234.

117. Martinez-Serra, J. Fluorescence resonance energy transfer-based realtime polymerase chain reaction method without DNA extraction for the genotyping of F5, F2, F12, MTHFR, and HFE / J. Martinez-Serra, J. Robles, A. Nicolàs, A. Gutierrez, T. Ros, J. C. Amat, R. Alemany, O. Vögler, A. Abelló, A. Noguera, J. Besalduch // J. Blood Med. – 2014. V. 25, N. 5. – P. 99-106.

118. Krasitskaia, V. V. Bioluminescent reporters to identify gene allelic variants / V. V. Krasitskaia, L. P. Burakova, I. A. Pyshnaia, L. A. Frank // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2012. – V. 38, N. 3. P. 298-305.

119. Roberts, D.W. Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures / D. W. Roberts, R. A. Newton, K. A. Beaumont, J. Helen Leonard, R. A. Sturm // Pigment Cell Res. – 2006. – V. 19, N. 1. – P. 76-89.

120. Buscà, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation / R. Buscà, R. Ballotti // Pigment Cell Res. – 2000. – V. 13, N. 2. – P. 60-69.

121. Rees, J. L. Genetics of hair and skin color / J. L. Rees // Annu. Rev. Genet. – 2003. – V. 37. – P. 67-90.

122. Gerstenblith, M. R. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of MC1R variants across populations / M. R. Gerstenblith, A. M. Goldstein, M. C. Fargnoli, K. Peris, M. T. Landi // Hum. Mutat. – 2007. – V. 28, N. 5. – P. 495-505.

123. Beaumont, K. A. Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles / K. A. Beaumont, S. N. Shekar, R. A. Newton, M.

R. James, J. L. Stow, D. L. Duffy, R. A. Sturm // Hum. Mol. Genet. – 2007. – V. 16, N. 18. – P. 2249-2260.

124. Box, N. F. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair / N. F. Box, J. R. Wyeth, L. E. O'Gorman, N. Martin, R. A. Sturm // Hum. Molec. Genet. – 1997. – V. 6, N. 11. – P. 1891-1897.

125. Ranadive, N. S. Role of reactive oxygen species and free radicals from melanin in photoinduced cutaneous inflammations / N. S. Ranadive, I. A. Menon // Pathol. Immunopathol. Res. – 1989. – V. 5. – P. 118-139.

126. Kollias, N. Photoprotection by melanin / N. Kollias, R. M. Sayre, L. Zeise, M. R. Chedekel // J. Photochem. Photobiol. – 1991. – V. 9. – P. 135-160.

127. Valverde, P. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans / P. Valverde, E. Healy, I. Jackson, J. L. Rees, A. J. Thody // Nature Genet. – 1995. – V. 11, N. 3. – P. 328-330.

128. Sturm, R. A. Skin colour and skin cancer – MC1R, the genetic link / R. A. Sturm // Melanoma Res. – 2002. V. 12, N. 5. – P. 405-416.

129. Flanagan, N. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation / N. Flanagan, E. Healy, A. Ray, S. Philips, C. Todd, I. J. Jackson, M. A. Birch-Machin, J. L. Rees // Hum. Molec. Genet. – 2000. – V. 9, N. 17. – P. 2531-2537.

130. Duffy, D. L. Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes / D. L. Duffy, N. F. Box, W. Chen, J. S. Palmer, G. W. Montgomery, M. R. James, N. K. Hayward, N. G. Martin, R. A. Sturm // Hum. Mol. Genet. – 2004. – V. 13, N. 4. – P. 447-461.

131. Beaumont, K. A. The melanocortin-1 receptor gene polymorphism and association with human skin cancer / K. A. Beaumont, Y. Y. Liu, R. A. Sturm // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. – 2009. – V. 88. – P. 85-153.

132. Williams, P. F. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden / P. F. Williams, C. M. Olsen, N. K. Hayward, D. C. Whiteman // Int. J. Cancer. – 2011. – V. 129, N. 7. – P. 1730-1740.

133. Palmer, J. S. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? / J. S. Palmer, D. L. Duffy, N. F. Box, J. F. Aitken, L. E. O'Gorman, A. C. Green, N. K. Hayward, N. G. Martin, R. A. Sturm // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – V. 66, N. 1. – P. 176-186.

134. Matichard, E. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants may increase the risk of melanoma in France independently of clinical risk factors and UV exposure / E. Matichard, P. Verpillat, R. Meziani, B. Gérard, V. Descamps, E. Legroux, M. Burnouf, G. Bertrand, F. Bouscarat, A. Archimbaud, C. Picard, L. Ollivaud, N. Basset-Seguin, D. Kerob, G. Lanternier, C. Lebbe, B. Crickx, B. Grandchamp, N. Soufir // J. Med. Genet. – 2004. – V. 41, N. 2. – P. e13.

135. Stratigos, A. J. Melanocortin receptor-1 gene polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma in a low-risk southern European population / A. J. Stratigos, G. Dimisianos, V. Nikolaou, M. Poulou, V. Sypsa, I. Stefanaki, O. Papadopoulos, D. Polydorou, M. Plaka, E. Christofidou, H. Gogas, D. Tsoutsos, O. Kastana, C. Antoniou, A. Hatzakis, E. Kanavakis, A. D. Katsambas // J. Invest. Dermatol. – 2006. – V. 126, N. 8. – P. 1842-1849.

136. Kanetsky, P. A. Population-based study of natural variation in the melanocortin-1 receptor gene and melanoma / P. A. Kanetsky, T. R. Rebbeck, A. J. Hummer, S. Panossian, B. K. Armstrong, A. Kricker, L. D. Marrett, R. C. Millikan, S. B. Gruber, H. A. Culver, R. Zanetti, R. P. Gallagher, T. Dwyer, K. Busam, L. From, U. Mujumdar, H. Wilcox, C. B. Begg, M. Berwick // Cancer Res. – 2006. – V. 66, N. 18. – P. 9330-9337.

137. Fernandez, L. MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population / L. Fernandez, R. Milne, J. Bravo, J. Lopez, J. Avilés, M. Longo, J. Benítez, P. Lázaro, G. Ribas // Carcinogenesis. – 2007. – V. 28, N. 8. – P. 1659-1664.

138. Kennedy, C. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color / C. Kennedy, J. ter Huurne, M. Berkhout, N. Gruis, M. Bastiaens, W. Bergman, R. Willemze, J. N. Bavinck // J. Invest. Dermatol. – 2001. – V. 117, N. 2. – P. 294-300.

139. Tagliabue, E. MC1R gene variants and non-melanoma skin cancer: a pooled-analysis from the M-SKIP project / E. Tagliabue, M. C. Fargnoli, S. Gandini, P. Maisonneuve, F. Liu, M. Kayser, T. Nijsten, J. Han, R. Kumar, N. A. Gruis, L. Ferrucci, W. Branicki, T. Dwyer, L. Blizzard, P. Helsing, P. Autier, J. C. García-Borrón, P. A. Kanetsky, M. T. Landi, J. Little, J. Newton-Bishop, F. Sera, S. Raimondi // Br. J. Cancer. – 2015. – V. 113, N. 2. – P. 354-363.

140. Han, J. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk / J. Han, P. Kraft, G. A. Colditz, J. Wong, D. J. Hunter // Int. J. Cancer. – 2006. – V. 119, N. 8. – P. 1976-1984.

141. Van der Velden, P. A. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies melanoma risk in Dutch families with melanoma / P. A. Van der Velden, L. A. Sandkuijl, W. Bergman, S. Pavel, L. van Mourik, R. R. Frants, N. A. Gruis // Am. J. Hum. Genet. – 2001. – V. 69, N. 4. – P. 774-779.

142. Ozola, A. Melanoma risk associated with MC1R gene variants in Latvia and the functional analysis of rare variants / A. Ozola, K. Azarjana, S. Doniņa, G. Proboka, I. Mandrika, R. Petrovska, I. Cēma, O. Heisele, L. Eņģele, B. Streinerte, D. Pjanova // Cancer Genet. – 2013. – V. 206, N. 3. – P. 8-91.

143. Motorina, A.V. Genetic analysis of melanocortin 1 receptor red hair color variants in a Russian population of Eastern Siberia / A. V. Motorina, N. V. Palkina, A. V. Komina, T. G. Ruksha, I. P. Artyukhov, V. V. Kozlov // Eur. J. Cancer Prev. – 2016. – P. 1-5.

144. Raimondi, S. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis / S. Raimondi, F. Sera, S. Gandini, S. Iodice, S. Caini, P. Maisonneuve, M. C. Fargnoli // Int. J. Cancer. – 2008. – V. 122. – P. 2753-2760.

145. Avilés, J. A. Phenotypic and histologic characteristics of cutaneous melanoma in patients with melanocortin-1 receptor polymorphisms / J. A. Avilés, P. Lázaro, L. P. Fernández, J. Benítez, M. Ibarrola-Villava, G. Ribas // Actas Dermosifiliogr. – 2012. – V. 103, N. 1. – P. 44-50.

146. Scherer, D. Melanocortin receptor 1 variants and melanoma risk: a study of 2 European populations / D. Scherer, E. Nagore, J. L. Bermejo, A. Figl, R. Botella-Estrada, R. K. Thirumaran, S. Angelini, K. Hemminki, D. Schadendorf, R. Kumar // Int. J. Cancer. – 2009. – V. 125, N. 8. – P. 1868-1875.

147. Córdoba-Lanús, E. MC1R gene variants and sporadic malignant melanoma susceptibility in the Canary Islands population / E. Córdoba-Lanús, J. G. Hernández-Jiménez, C. Medina-Coello, A. Espinoza-Jiménez, A. González, M. D. Rodríguez-Pérez, G. Carretero-Hernández, P. Almeida, J. Suárez-Hernández, A. Perera-Molinero, R. Fernández-de-Misa // Arch. Dermatol. Res. – 2014. – V. 306, N. 1. – P. 51-58.

148. Fitzpatrick, T.B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI / T. B. Fitzpatrick // Arch. Dermatol. – 1988. – V. 124, N. 6. – P. 869-871.

149. Ануфриева, Е. Е. К вопросу о необходимости контроля уровня геномной ДНК в пробе перед проведением ПЦР-тестирования для выявления аллельных полиморфизмов / Е. Е. Ануфриева, Т. Н. Субботина // Клиническая лабораторная диагностика. –2012. – N. 9. – С. 64.

150. Song, Q. Association between MC1R polymorphisms and skin cancer susceptibility / Q. Song, J. Lu, X. Lai, W. Tong // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2017. – V. 10, N. 2. – P. 4014-4022.

151. Scott, M. C. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation / M. C. Scott, K. Wakamatsu, S. Ito, A. L. Kadekaro, N. Kobayashi, J. Groden, R. Kavanagh, T. Takakuwa, V. Virador, V. J. Hearing, Z. A. Abdel-Malek // J Cell Sci. – 2002. – V. 115. – P. 2349-2355.

152. Landi, M. T. MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population / M. T. Landi, P. A. Kanetsky, S. Tsang, B. Gold, D. Munroe, T. Rebbeck, J. Swoyer, M. Ter-Minassian, M. Hedayati, L. Grossman, A. M. Goldstein, D. Calista, R. M. Pfeiffer // J. Natl. Cancer Inst. – 2005. – V. 97, N. 13. – P. 998-1007.

153. Fargnoli, M. C. Contribution of melanocortin-1 receptor gene variants to sporadic cutaneous melanoma risk in a population in central Italy: a case-control study / M. C. Fargnoli, E. Altobelli, G. Keller, S. Chimenti, H. Höfler, K. Peris // Melanoma Res. – 2006. – V. 16, N. 2. – P. 175-182.

154. Kinsler, V. A. Germline melanocortin-1-receptor genotype is associated with severity of cutaneous phenotype in congenital melanocytic nevi: a role for MC1R in human fetal development / V. A. Kinsler, S. Abu-Amero, P. Budd, I. J. Jackson, S. M. Ring, K. Northstone, D. J. Atherton, N. W. Bulstrode, P. Stanier, R. C. Hennekam, N. J.

Sebire, G. E. Moore, E. Healy // J. Invest. Dermatol. – 2012. – V. 132, N. 8. – P. 2026-2032.

155. Eigentler, T. K. Impact of ulceration in stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: an analysis of the German Central Malignant Melanoma Registry / T. K. Eigentler, P. G. Buettner, U. Leiter, C. Garbe // J. Clin. Oncol. – 2004. – V. 22, N. 21. – P. 4376-4383.