

УДК 619:612.014.24:636.4

## **СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНА *p53* СВИНЕЙ И ЕГО ПОЛИМОРФИЗМ**

**А.В. Никулин, преподаватель**

тел. 8(8342) 351824, [nikylin\\_a@list.ru](mailto:nikylin_a@list.ru)

**В.А. Трофимов, доктор биологических наук, профессор,**

тел. 8(8342) 351824, [geneticLab@yandex.ru](mailto:geneticLab@yandex.ru)

**Л.П. Тельцов, доктор биологических наук, профессор**

тел. 8(8342) 254185, [agro-inst@adm.mrsu.ru](mailto:agro-inst@adm.mrsu.ru)

**ГОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»**

**Ключевые слова:** Структура гена *p53*, мутационная изменчивость, экзоны, клетка, ДНК, мРНК.

*Работа посвящена структурно-функциональной организации гена *p53* млекопитающих, степени гомологии гена *p53* человека, свиньи и мыши, мутационной изменчивости гена *p53* свиней в 5-ом и 7-ом экзонах.*

**Актуальность проблемы.** Эффективная реализация контролирующих программ клеточного управления зависит от гена *p53*, который находится на верхней ступени иерархии генов, поскольку его белковый продукт является транскрипционным фактором и участвует в контроле клеточного цикла, апоптоза, старения клеток и связанных с ними фенотипических проявлений. Актуальность проблемы *p53*-зависимой регуляции клеточных процессов несомненна как для ветеринарии, так и для животноводства. Нарушение регуляции ростовых процессов и злокачественная трансформация клеток более чем в половине случаев связаны с изменениями в структуре гена и, соответственно, белка *p53* (Копнин, 2008). Поэтому в медицине и ветеринарии решение данной проблемы приблизит к пониманию молекулярных механизмов онкологических заболеваний, их лечению, а в селекции будет расширен спектр генетических маркеров, используемых для улучшения фенотипов.

Для решения проблемы ростовых процессов и связанных с ними злокачественных трансформаций клеток, важно изучение регуляции экспрессии гена *p53* и изучение структурных особенностей мутантных или полиморфно-аллельных вариантов гена и их функциональной активности. К особенностям регуляции транскрипции гена *p53* относят его широкую мутабельную активность, наличие изоформ и полиморфизмов, характерных для *Dt p53*, а также зависимость от других регуляторных белков, в том числе, MDM2 (Чумаков, 2000). В настоящее время показано, что большинство мутаций в гене *p53* человека обнаруживаются в эволюционно-консервативном домене белка, причем в определенных, в так называемых, «горячих точках» (Копнин, 2000). При патологии нарушения могут происходить не только вследствие мутаций в самом гене, но и в регуляторных элементах, что может приводить к изменению экспрессии гена (Dobash 1993). Однако данных о структурной организации гена *p53* свиней недостаточно.

**Целью исследования являлось** изучение структурно-функциональных особенностей гена *p53* свиней и его полиморфных вариантов.

**В задачи исследования входило:** 1. Изучить структурно-функциональную организацию гена *p53* млекопитающих, построить филогенетическое древо и оценить степень гомологии гена *p53* человека, свиньи и мыши; 2. Исследовать мутационную изменчивость гена *p53* свиней в 5-ом и 7-ом экзонах.

**Материал и методики исследования.** В качестве объекта исследования использовали периферическую кровь и моноциты млекопитающих.

Моноциты получали путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл/гипак ( $\rho$  1,06 г/мл). Жизнеспособность клеток определяли по величине проникновения внутрь клеток красителя трипанового синего. Клетки культивировали в монослое в воздушном термостате при 37°C на предметных стеклах влажных камер и в пробирках Эппендорф при температуре 37°C в течение 3 часов. Рабочая концентрация суспензии составляла  $10^6$  клеток/мл. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

В работе использовали холестерол («Sigma», США) и ЛПС *E. coli* («Sigma», США).



Рис. 1. - Схема эксперимента

Морфологию клеток, погибающих апоптозом и некрозом выявляли методами флуоресцентной (микроскоп «Motic BA400», длина волны возбуждающего света 320-390 нм, барьерный фильтр 420-450 нм) и световой микроскопии (микроскоп «Nikon Eclipse E200»), используя, Hoechst 33258 (Sigma), краситель Мая-Грюнвальда и Гимза (Merk).

**Результаты исследования и их обсуждение.** В генетических базах (NCBI, The TP53 web site, GenBank и др., 2010) содержится информация о гене *p53*, которая нами обобщена и систематизирована с целью получения новых знаний о структуре и регуляции активности гена, его патогенетической роли, а также использования их для практических целей генетики и селекции сельскохозяйственных животных [1, 2].

Общее строение гена *p53* у различных видов млекопитающих сходно. Все они содержат 11-ать экзонов (исключение составляет крыса, у которой 9 и 10 экзоны слились), имеют протяженный первый интрон, у всех организмов первый экзон не несет информации о белке P53, а одиннадцатый экзон несет информацию частично (рис. 2).

В генетических базах данных не представлена последовательность гена *p53* свиньи, поэтому, основываясь на данных о сходном строении кодирующих последовательностей гена *p53* млекопитающих, нами произведена первичная оценка степени гомологии (с использованием программы BLAST) мРНК *p53* человека, мыши и свиньи. При сопоставлении мРНК человека и свиньи (GenBank № NM\_213824) выявлено, что их гомология составляет 83%. А при сопоставлении мРНК мыши и свиньи (GenBank № NM\_213824) выявлено, что их гомология составляет 84%. С помощью программного пакета BioEdit, было проведено более тщательное определение степени гомологии между последовательностями мРНК *p53* у свиньи, человека, мыши и крысы. На основании полученных данных можно заключить, что мРНК *Sus scrofa* наиболее гомологична *Rattus norvegicus* ( $t=0.611$ ), а наименее гомологична матричной РНК *Homo sapiens* ( $t=0.523$ ), но это не означает, что *Sus scrofa* и *Homo sapiens* эволюционно далеко отстоят друг от друга (таблица 1).

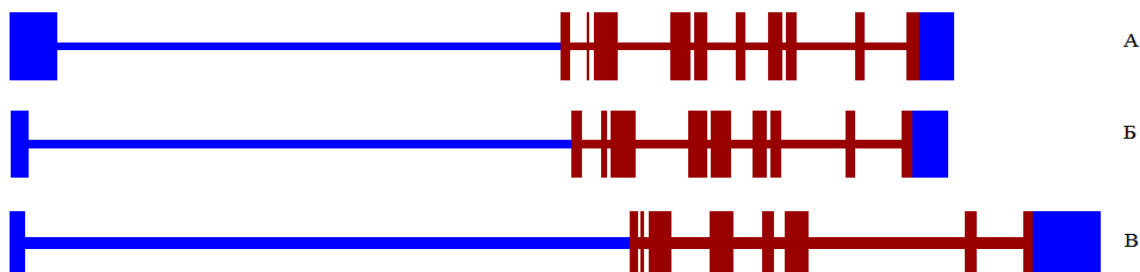


Рис. 2. - Строение гена *p53*: А – *Mus musculus*, Б – *Rattus norvegicus*, В – *Homo sapiens* (национальная база данных биотехнологов NCBI), прямоугольники – экзоны, линии – интроны

Таблица 1 – Матрица идентичности для исследуемых последовательностей (r)

Виды	<i>Sus scrofa</i> (свинья)	<i>Mus musculus</i> (мышь)	<i>Homo sapiens</i> (человек)	<i>Rattus norvegicus</i> (крыса)
<i>Sus scrofa</i>	1	0.599	0.523	0.611
<i>Mus musculus</i>	0.599	1	0.465	0.833
<i>Homo sapiens</i>	0.523	0.465	1	0.471
<i>Rattus norvegicus</i>	0.611	0.833	0.471	1

С помощью алгоритма Neighbor phylogenetic tree было построено филогенетическое древо (рис. 3), которое более наглядно отражает эволюционные отношения изучаемых организмов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гомология изученных мРНК очень высока. Исходя из этого, можно говорить о высокой гомологии кодирующих областей генов *p53* у человека, свиньи, а также мыши. Это позволяет с большой долей уверенности переносить известные мутации в геномах человека и мыши на возможные мутации в гене *p53* свиньи [3, 4].

Известно, что мутации обнаруживаются в разных участках гена *p53*, но с наибольшей частотой в кодонах 175, 245, 248, 249, 273, 282 – так называемых горячих точках (Копнин, 2000). Определено семь «горячих точек», причем все они локализованы в эволюционно консервативном ДНК-связывающем домене, кодируемом экзонами 5, 6, 7, 8 [4].

В этой связи проведено секвенирование предполагаемых экзонов гена *p53* свиньи. По сопоставлению последовательности мРНК свиньи (GenBank № NM\_213824) и последовательности клона хромосомы 12 (GenBank № CU914279), где расположен ген *p53*, выявлены предполагаемые участки расположения экзонов гена *p53* свиньи. Согласно данным о том, что наиболее значимыми с точки зрения выполняемых функций белка P53 являются экзоны 5, 6, 7, 8 для секвенирования были выбраны 5-й и 7-й экзоны как наиболее мутантные у человека.

Для секвенирования отобраны образцы ДНК свиной, характеризующихся разной скоростью роста и набора массы тела. В результате проведенных исследований выявлено, что экзон 5 гена *p53* свиньи консервативен у всех проанализированных животных и вероятно мало влияет на скорость роста [5, 6]. Секвенирование экзона 7 выявило наличие различий в нуклеотидной последовательности у всех животных (рис. 4).

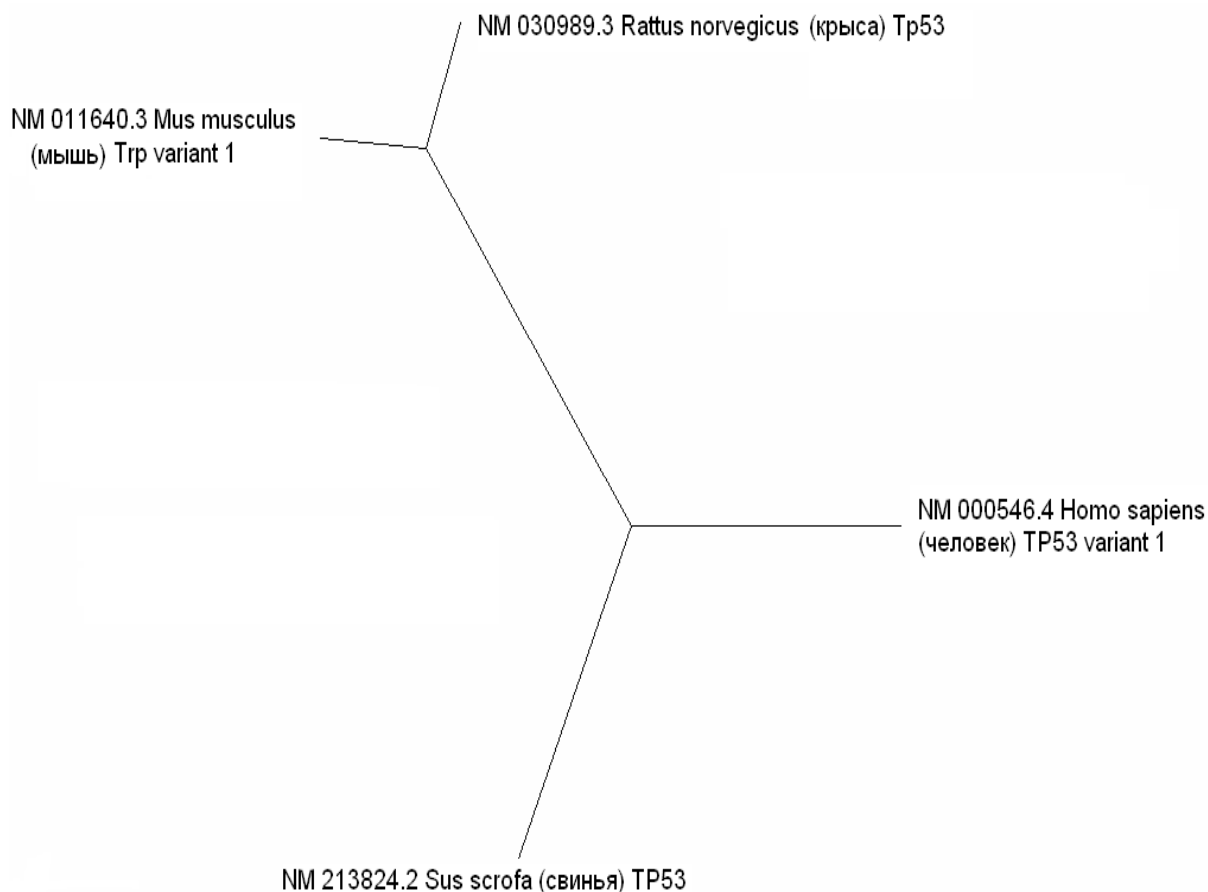
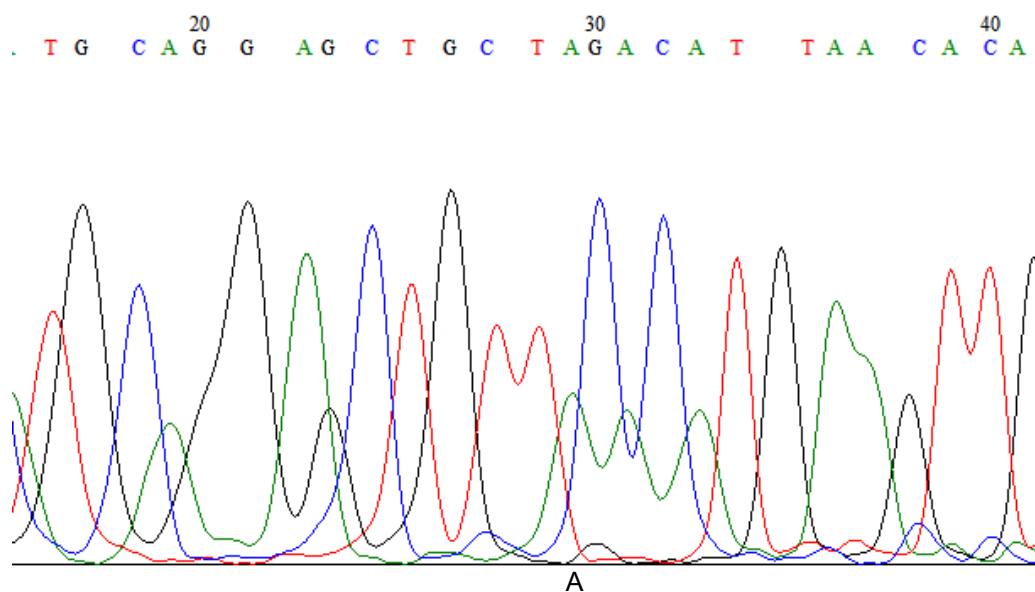


Рис. 3. - Филогенетическое древо мРНК р53 человека, свиньи, мыши и крысы

Таким образом, выявленные особенности изменчивости в 7-ом экзоне гена *p53* возможно могут использоваться в качестве маркерных для оценки особенностей процессов роста у свиней. Однако это предположение, требует последующих детальных исследований [6].



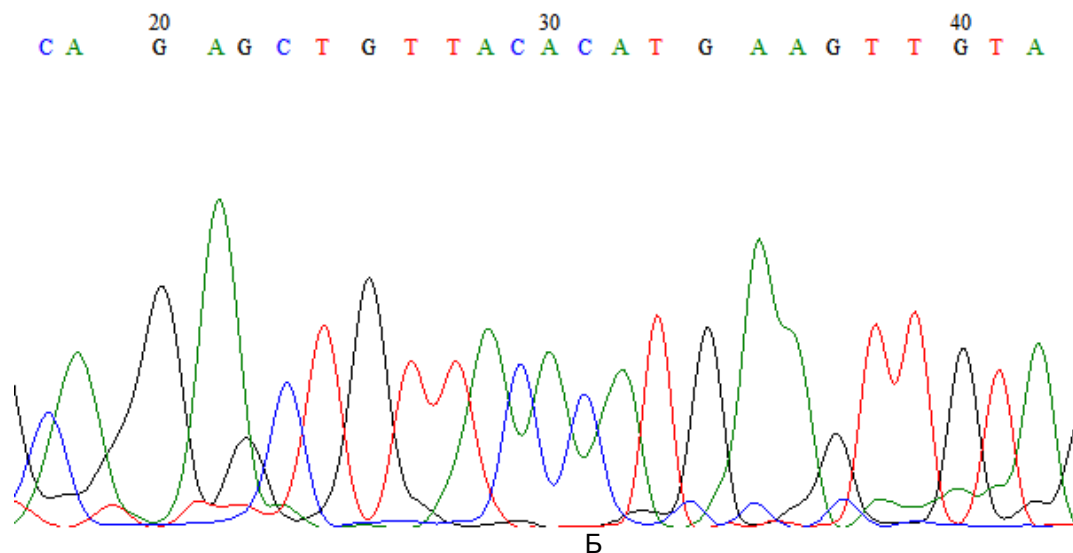


Рис. 4. - Секвенограмма фрагмента предполагаемого экзона 7 гена *p53* свиньи. А – свинья с высокой скоростью роста массы тела, Б – свинья с низкой скоростью роста массы тела

**Заключение.** С помощью компьютерных программ установлено, что кодирующие последовательности гена *p53* человека и свиньи гомологичны на 83%, свиньи и мыши – на 84% (программа BLAST). При сравнении степени гомологии более специфичной программой BioEdit выявлено, что степень гомологии у свиньи и человека составляет 52,3%, у свиньи и мыши – 59,9%, у свиньи и крысы – 61,1%.

Согласно данным секвенирования у свиней с различной скоростью роста 5-ый экзон является консервативным, а 7-ой экзон характеризуется высоким уровнем изменчивости.

Изменчивость 7-го экзона позволяет рассматривать ген *p53* как маркерный при проведении селекционных мероприятий направленных на увеличение скорости роста свиней.

#### **Библиографический список:**

1. Никулин А.В. Структурно-функциональная организация гена *p53* свиней и его полиморфных вариантов / А.В. Никулин// Автореф.... к.б.н. –Саранск, 2010. – 19 с.
2. Trofimov V.A. The bioinformatical analysis of promoter regions p53 and ob genes at mammals / V.A. Trofimov, A.V. Nikulin, S.N. Palaev, A.M. Oreshin, E.N. Lopukhova // Molecular phylogenetics: contributions to the 2<sup>nd</sup> Moscow International Conference “Molecular Phylogenetics”, Moscow, Russia, May18-21, 2010, Compiled by A. Troitsky, L. Rusin, and V. Aleoshin, Moscow: Torus press, 2010. – P. 171
3. Никулин А.В. Анализ распространённости мутаций гена *p53* / А.В. Никулин, В.А. Трофимов, Д.Б. Дукина, М.А. Рыжкова, Е.Н. Лопухова, Н.В. Воробьёв // XXXVII Огарёвские чтения: материалы науч. конф.: в 3 ч. Ч. 2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. - С. 24 – 25
4. Никулин А.В. Изучение экспрессивной активности гена *p53*: теоретические и практические аспекты / А.В. Никулин // Материалы Итоговой региональной научно-практической конференции «Научный потенциал молодежи – будущему Мордовии». – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. В 2 ч. Ч.2: Естественные и технические науки. – С. 51 – 52
5. Трофимов В.А. Полиморфизм гена *p53* / В.А. Трофимов, М.В. Ромашкина, А.В. Никулин, А.М. Орешин, Д.Б. Дукина, М.А. Рыжкова // V Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и Пятый съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – Москва, 2009. - С. 469
6. Шубин В.П. Экспрессия гена *p53* в печени белых мышей в норме и при патологии / В.П. Шубин, А.В. Никулин, О.В. Сазанова, В.А. Трофимов // XXXIV Огарёвские чтения. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2005. Ч. 2. - С. 78 – 81.