

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

**ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць

Видається з 2003 р.

ТОМ 15

Присвячено

100-річчю від дня народження Нормана Ернеста Борлоуга

Київ – 2014

10. Paramio J.M., Segrelles C., Ruiz S., Jorcano J.L. Inhibition of Protein Kinase B (PKB) and PKC ж Cycle Arrest Mediates Keratin K10-Induced Cell // *Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – 21. – P. 7449–7459.
11. Sudhakar A. et.al. Human 61 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by 61b1 integrin // *J. Clin. Invest.* – 2005. – 115. – P. 2801–2810.

GURIANOV D.S., LYSETSKA T.YU., ANTONENKO S.V., KRAVCHUK I.V., TELEGEEV G.D.

*Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: dmitriy.gurianov@gmail.com*

ROLE OF PH DOMAIN OF BCR PROTEIN IN CELLULAR PROCESSES THAT DETERMINE THE PHENOTYPE OF Ph⁺-POSITIVE MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

Aims. Three forms of fusion protein BCR/ABL differ by the presence or absence of PH and DH domains of BCR protein and cause different phenotypes of myeloproliferative disorders. To date, 23 proteins-candidates were identified as possible interaction partners of PH domain of BCR protein. Among them are different functional groups, such as cytoskeletal proteins, those involved in reorganization of cytoskeleton and clathrine-mediated endocytosis, matrix proteins and proteins involved in inhibition of proteolytic degradation. Therefore it is crucial to verify those interactions with more sensible and reliable methods as this will give clue to the functional differences, which lead to onset of different disorders. **Methods.** We used restriction enzyme-based ligation, coimmunoprecipitation and western-blot for creation of genetic constructs and verification of protein-protein interactions between PH domain of BCR and putative partners. **Results.** Different genetic constructs were created, that will be used for the expression of target sequences (USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1) in bacterial and mammalian expression systems. Also we demonstrate that FBP17 protein interacts with PH domain in mammalian cell line 293T. **Conclusions.** Demonstrated interaction of PH domain and FBP17 shows its' important role in endocytosis and related cytoskeleton organization. All derived genetic constructs will be used in future research to verify interaction of target sequences with PH domain of BCR by far-Western blot, coimmunoprecipitation and fluorescent microscopy. It will be important in the future to check whether full-length BCR/ABL p210 interacts with USP1, CTTN, TUBB, KRT10, COL4A1, and FBP17, to study how it affects their phosphorylation state, and to determine their localization in the cell.

Key words: chronic myelogenous leukemia, myeloproliferative disorders, BCR/ABL, endocytosis, cytoskeleton reorganization, proteasomal degradation.

УДК 577.352.3:616-006.04:57.02:661.859

ДИБКОВА С.М., ГРУЗІНА Т.Г., РЄЗНІЧЕНКО Л.С., УЛЬБЕРГ З.Р.

*Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України,
Україна, 03142, м. Київ, бульв. Академіка Вернадського, 42, e-mail: sdybkova@gmail.com*

ВЗАЄМОДІЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ТА СРІБЛА З ПЛАЗМІДНОЮ ДНК

Вивчення особливостей впливу наночастинок металів на генетичний апарат живої клітини є одним з актуальних завдань сучасної нанобіотехнології. Його вирішення відкриває нові перспективи у практичному застосуванні наночастинок металів [1, 2]. Відомо, що наночастинки золота є перспективними засобами діагностики та адресної доставки лікарських засобів у кардіології, онкології, а наночастинки срібла – ефективні антимікробні агенти. [3, 4].

Раніше нами було показано генотоксичну дію наночастинок золота розміром 20 нм та її відсутність для наночастинок золота розміром

30 нм, наночастинок срібла розмірами 30 та 50 нм. [5]. У зв'язку з цим виник ряд питань пов'язаних з впливом наночастинок металів на ДНК залежно від їх природи та розміру.

Відомо, що однією із важливих характеристик плазмід є їх здатність еліминуватися із бактеріальної клітини під дією певних хімічних речовин [6]. Перспективним підходом до вирішення проблеми подолання стійкості до антибіотиків у клінічних ізолятів збудників інфекційних захворювань є використання хімічних речовин, які забезпечують ефективну елімінацію плазмід антибіотикорезистентності (R-плазмід). Для R-

плазмідовмісних сальмонел, шигел і ешерихий такою ДНК-тропною речовиною є акридиноий жовтогарячий. Однак ця речовина є відомим мутагеном, тому її застосування в якості лікарського засобу є неможливим. Виходячи з отриманих нами даних щодо генотоксичної дії наночастинок металів, можна прогнозувати і їх здатність елімінувати плазмід, що відкриває значні перспективи в пошуку ефективних шляхів подолання антибіотикорезистентності.

З огляду на вище сказане, вивчення взаємодії наночастинок золота і срібла з плазмідною ДНК представляє значний теоретичний та практичний інтерес.

Матеріали і методи

Наночастинок золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом методом Девіса. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева кислота $H[AuCl_4] \cdot 4H_2O$, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію. Наночастинок срібла отримували конденсаційним методом шляхом відновлення солей срібла. [7]. Розмір отриманих наночастинок визначали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) за допомогою спектрометра Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія).

В роботі було використано стерильні водні препарати наночастинок металів: золота – розміром 20 та 30 нм у вихідних концентраціях: 20 нм – 11,6 мкг/мл, 30 нм – 19,2 мкг/мл; срібла розміром 30 нм у концентрації 86,0 мкг/мл за металом.

Для вивчення взаємодії ДНК з наночастинками золота та срібла було використано плазмід рUC19.

Плазмід рUC19 знаходилася в *E. coli* XL1-Blue (Stratagene).

Для отримання препаратів плазмідної ДНК використовували метод лужного лізису за Бірнбоймом і Долі [8], розчиняли в стерильній дистильованій воді та зберігали при $-20^{\circ}C$.

Інкубацію препаратів плазмідної ДНК з наночастинками золота і срібла проводили при $24^{\circ}C$ протягом 30–60 хвилин. Інкубаційна суміш складалася з препарату плазмід, розведеного очищеною стерильною дистильованою водою, та стерильного водного препарату наночастинок металів. Концентрація наночастинок золота в інкубаційних сумішах складала: 20 нм – 5,8 мкг/мл за металом, 30 нм – 9,6 мкг/мл за металом; а наночастинок срібла розміром 30 нм – 43,0 та 17,0 мкг/мл за металом.

Електронно-мікроскопічний аналіз

препаратів ДНК з наночастинками золота та срібла здійснювали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEOL JEM-1230 Electron Microscope («Tokyo Boeki Ltd», Японія).

Елімінацію плазмід рUC19 з клітин бактерій *E. coli* здійснювали: шляхом спонтанної елімінації та шляхом обробки плазмідовмісних бактерій наночастинками золота та срібла з подальшою контрелекцією.

Результати і обговорення

Популярність позакромосомних факторів спадковості – плазмід, як експериментальних моделей, пояснюється простотою методичних прийомів роботи з ними та наявною детальною характеристикою їх генетичної природи, молекулярної структури і регуляції функцій. Плазмід рUC19, добре відома як рекомбінантна плазмід, що використовується для клонування. Вона характеризується високою копієністю в бактеріальних клітинах та має гени антибіотикорезистентності до ампіциліну.

Для оцінки впливу наночастинок металів на структурний стан плазмідної ДНК здійснювали інкубацію плазмід рUC19 з наночастинками золота розміром 20 і 30 нм в концентраціях 5,8 і 9,6 мкг/мл за металом та наночастинками срібла розміром 30 нм в концентраціях 43,0 і 17,0 мкг/мл за металом. З інкубаційних сумішей готували препарати для електронної мікроскопії без додаткового контрастування.

Рисунок 1 відображає характер взаємодії наночастинок золота розміром 20 нм з плазмідною рUC19.

Так, на рисунку 1, А показано можливість розміщення наночастинок золота розміром 20 нм на плазміді рUC19. Спостерігалися структурні зміни рUC19 від глобул (рис. 1, С) до релаксованих форм (рис. 1, А). Характерною у даному випадку була агрегація наночастинок золота. Ми припускаємо, що це може бути наслідком присутності невеликої кількості білка, яка залишилася після виділення плазмідної ДНК та модифікувала поверхню досліджуваних наночастинок і спричинила їх агрегацію. Цікавим є те, що спочатку наночастинок золота викликали релаксацію плазмід, розміщувалися на її нитках і ставали точками їх агрегації.

На рисунку 2 наведені електронно-мікроскопічні зображення, отримані в результаті аналізу препаратів плазмід рUC19 після їх взаємодії з наночастинками золота розміром 30 нм.

Взаємодія наночастинок золота розміром 30 нм з плазмідною рUC19 теж призводить до переходу плазмиди в релаксовану форму. Наночастинки розміщуються на нитці плазмиди нерівномірно. Однак у цьому випадку наночастинки золота не мали тенденції до агрегації (рис. 2).

Таким чином, наночастинки золота розміром 20 нм та 30 нм викликають релаксацію плазмиди рUC19 та розміщуються не упорядковано на її нитках. Наночастинки золота

20 нм, на відміну від наночастинок 30 нм, агрегуються на релаксованій плазміді.

Особливості взаємодії препаратів плазмиди рUC19 з наночастинками срібла розміром 30 нм відображені на рисунку 3.

Видно, що наночастинки срібла 30 нм призводять до релаксації плазмиди рUC19, при цьому розміщуючись на ній з певною періодичністю. Характерним при цьому є, як і у випадку з наночастинками золота 20 нм, агрегація наночастинок.

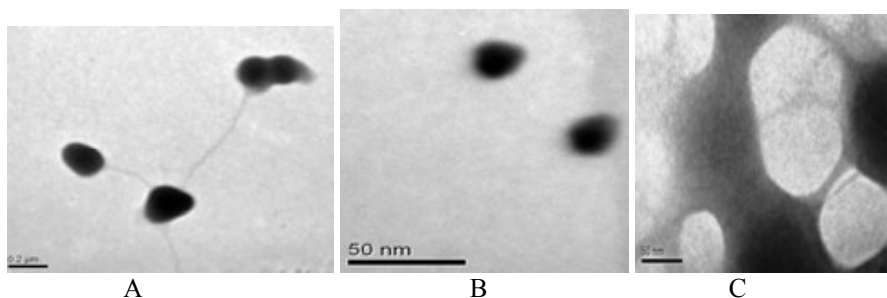


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 20 нм з плазмідною рUC19. А – препарат плазмиди рUC19 з наночастинками золота розміром 20 нм; В – контроль, препарат наночастинок золота розміром 20 нм; С – контроль, препарат плазмиди рUC19

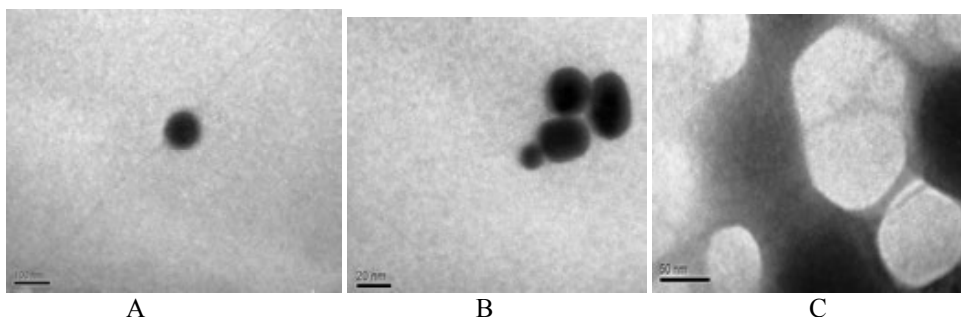


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок золота розміром 30 нм з плазмідною рUC19. А – препарат плазмиди рUC19 з наночастинками золота розміром 30 нм; В – контроль, препарат наночастинок золота розміром 30 нм; С – контроль, препарат плазмиди рUC19

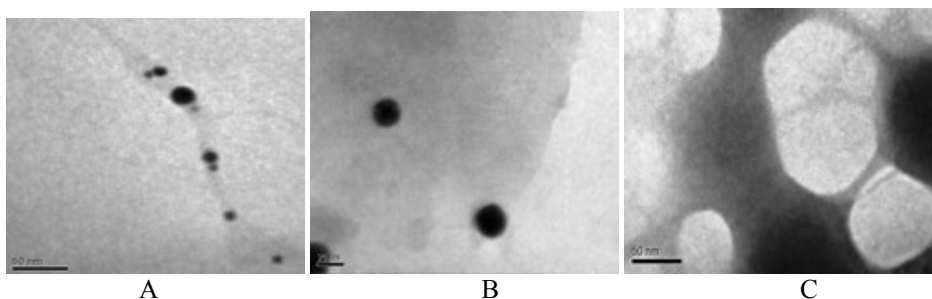


Рис.3. Електронно-мікроскопічні зображення взаємодії наночастинок срібла розміром 30 нм з плазмідною рUC19. А – препарат плазмиди рUC19 з наночастинками срібла розміром 30 нм; В – контроль, препарат наночастинок срібла розміром 30 нм; С – контроль, препарат плазмиди рUC19

Маючи ряд експериментальних доказів дії наночастинок золота і срібла на плазмиду pUC19, яка несе детермінанту антибіотикостійкості, було проведено дослідження щодо елімінуючої дії наночастинок металів. Елімінацію плазмиди pUC19 з клітин здійснювали: шляхом культивування плазмидовмісних бактерій *E. coli* на середовищі МПА без антибіотика (спонтанна елімінація) та при обробці плазмидовмісних бактерій наночастинами золота та срібла.

Так, шляхом культивування бактерій *E. coli* XL1-Blue (pUC19) в МПБ без антибіотика ампіциліну протягом 18 годин було встановлено частоту спонтанної елімінації у випадку плазмиди pUC19, яка становила 37 % (табл.).

При обробці плазмидовмісних бактерій *E. coli* XL1-Blue (pUC19) наночастинами золота розміром 20 нм в концентрації 5,8 мкг/мл по металу протягом 18 годин, частота елімінації становила 89 %. А у випадку використання в ролі елімінуючого агента наночастинок золота розміром 30 нм (9,6 мкг/мл по металу) частота елімінації складала 91 %.

Елімінація наночастинами срібла в концентрації 17 мкг/мл плазмиди pUC19 із бактерій штаму *E. coli* XL1-Blue (pUC19) показала високу частоту елімінації: pUC19 елімінувалася з частотою 98 %.

Таким чином, проведені дослідження продемонстрували високу ефективність наночастинок золота і срібла в якості елімінуючих агентів плазмид антибіотико-

резистентності. Однак, враховуючи частоту спонтанної елімінації дослідженої плазмиди pUC19, для остаточного висновку щодо елімінуючих властивостей досліджених наночастинок металів необхідно провести подальші дослідження із залученням плазмидовмісних резистентних клінічних ізолятів збудників захворювань.

Висновки

Наночастинки золота (20 і 30 нм) і наночастинки срібла (30 нм) змінюють структурний стан плазмиди pUC19, сприяючи її релаксацію.

Наночастинки золота (20 і 30 нм) і наночастинки срібла (30 нм) викликають високу частоту елімінації плазмиди pUC19 з бактерій штаму *E. coli* XL1-Blue (pUC19).

Виконані дослідження щодо елімінуючих властивостей досліджених наночастинок металів відкривають перспективи подальших досліджень щодо подолання антибіотико-резистентності у клінічних ізолятів збудників різних захворювань.

Робота підтримана проектом 0112U002927 «Розробка та створення високоефективних антимікробних агентів на основі наночастинок металів та їх кон'югатів з антибіотиками для лікування нозокоміальних інфекцій» цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва».

Таблиця. Частота елімінації плазмиди pUC19 з *E. coli* XL1-Blue (pUC19) при обробці бактерій наночастинами золота та срібла

Тип елімінації плазмид	Частота елімінації (%)
Спонтанна елімінація <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	37
Елімінація наночастинами золота 20нм плазмиди pUC19 з <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	89
Елімінація наночастинами золота 30нм плазмиди pUC19 з <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	91
Елімінація наночастинами срібла 30нм плазмиди pUC19 pUC19 з <i>E. coli</i> XL1-Blue (pUC19)	98

Література

1. West J.L., Halas N.J. Application of nanotechnology to biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – 11. – P. 215–217.
2. Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. The present and future of nanotechnology in human health care // *Nanomedicine.* – 2007. – N 3. – P. 20–31.
3. Чекман І.С. Нанофармакологія. – Київ: ПВП «Задруга», 2011. – 422 с.
4. Чекман І.С., Ульберг З.Р., Маланчук В.О., Горчакова Н.О., Зупанець І.А. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. – К.: Поліграф плюс, 2012. – 328 с.

5. Кундієв Ю.І., Ульберг З.Р., Трахтенберг М.І., Чекман І.С., Грузіна Т.Г., Дибкова С.М., Резніченко Л.С., Марченко М.Л. Проблема оцінки потенційних ризиків наноматеріалів та шляхи її вирішення // Доповіді НАН України. – 2013. – № 1. – С. 177–183.
6. Пехов А.П. Основы плазмидологии. – Москва, Издательство Российского Университета Дружбы Народов, 1996 – 230 с.
7. Перцов А.В. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 132с.
8. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – 7, N 6. – P. 1513–1523.

DYBKOVA S. M., GRUZINA T.G., RIEZNICHENKO L.S., ULBERG Z.R.

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03142, Kyiv, Vernadskogo av., 42, e-mail: sdybkova@gmail.com

INTERACTION OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES WITH PLASMIDS DNA

Aims. Unique properties of metal nanoparticles and their biological activity open wide perspectives for their using in medicine. Studies of the peculiarities of metal's nanoparticles interaction with nucleic acids of plasmids has fundamental importance in the investigation of metal's nanoparticles influence on genetic complex of cells. **Methods.** Interaction of gold and silver nanoparticles different size with plasmids has been performed on the plasmid *pUC19* by the method of electron microscopy. Elimination of the plasmid *pUC19* was performed by culturing the bacteria *E. coli* XL1-Blue (*pUC19*) with gold and silver nanoparticles within 18 hours. **Results.** Gold nanoparticles (20 and 30 nm) causing relaxation of plasmid placed not sorted on it's threads. Moreover, gold nanoparticles with size 20 nm, in contrast to the 30 nm nanoparticles, aggregated an untwisted plasmid. Silver nanoparticles with size 30 nm leads to destructive changes of plasmid DNA, while being located on it at regular intervals. Gold (20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles cause a high frequency of plasmid's *pUC19* elimination. **Conclusions.** Interaction of gold (20 and 30 nm) and silver nanoparticles (30 nm) with plasmid *pUC19* resulting in plasmid's relaxation. Effectively eliminates of plasmid's *pUC19* has been performed by gold (20 and 30 nm) and silver (30 nm) nanoparticles.

Key words: gold nanoparticles, silver nanoparticles, plasmid, DNA, elimination.

УДК 577.112.82;543.545.2

ДИКУН М.О., СІРАНТ Л.В., ПОЧИНОК В.М., ЗАВАЛЬНА Г.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bal.mascha@yandex.ua

ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ОЦІНКИ ПИВОВАРНИХ СОРТІВ ЯЧМЕНЮ ЗА СПЕКТРОМ ГОРДЕЇНІВ

Сучасна пивоварна і солодова промисловість ставить високі вимоги до сортової чистоти зерна ячменю. Одним із основних методів лабораторного сортового контролю зерна ячменю є електрофорез спирторозчинних запасних білків – гордеїнів. У зв'язку з цим, першочерговим є пошук методик електрофорезу, які мають високу розподільчу здатність, зручність, доступність та рентабельність. З метою вирішення проблеми була поставлена задача порівняти два широко застосовані методи електрофорезу за методикою Бжезинського та Поперелі [1, 2].

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були сорти ярого ячменю, отримані від солодових та пивоварних підприємств, сільськогосподарських господарств та приватних підприємців різних областей України. Дані сорти занесені до Державного реєстру.

Досліджували гордеїни 100 довільно вибраних зерен ячменю. Зернівки подрібнювали, заливали 70% етанолом. Отриманий екстракт центрифугували та висушували у сушильній шафі при 30–40⁰С. Сухий залишок розчиняли буфером, відповідно методу (табл. 1).

Різниця в умовах проведення процедур електрофорезу відмічена у табл. 2.