

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

## **БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Выявление полиморфизмов в генах CAT, PON2, NCL, HSPA1L,  
PCDH15, и их ассоциаций с риском развития профессиональной  
нейросенсорной тугоухости

Руководитель \_\_\_\_\_ профессор, д.б.н. Л. А. Франк

Выпускник \_\_\_\_\_ А. Д. Юшкова

Красноярск 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Целентеразин-зависимые биолюминесцентные системы.....	7
1.2 Мутантные варианты обелина и их использование в одновременном биолюминесцентном анализе.....	9
1.2.1 Получение мутантных вариантов обелина, пригодных для сайт-направленного конъюгирования с биоспецифическими молекулами.....	11
1.4 Выявление однонуклеотидных полиморфизмов известной локализации..	11
1.4.1 Дискриминации аллеля: удлинение праймера.....	12
1.5 Профессиональная нейросенсорная тугоухость, вызванная шумом.....	13
1.5.1 Окислительный стресс как основная причина нейросенсорной тугоухости, вызванной шумом. Гены окислительного стресса.....	14
1.5.2 Ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов в генах окислительного стресса (CAT и PON2) с индуцируемой шумом нейросенсорной тугоухостью.....	15
1.5.3 Гены, участвующие в формировании межклеточных контактов и в поддержании калиевого гомеостаза (протокадгерин 15).....	16
1.5.4 Гены, кодирующие белки теплового шока (HSPA1L).....	17
1.5.5 Гены клеточного стресса (нуклеолин). Ассоциация SNP в гене нуклеолина с индуцируемой шумом нейросенсорной тугоухостью.....	17
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
2.1 Буферные растворы и среды.....	19
2.2 Получение рекомбинантных вариантов апообелина в высокоочищенном виде.....	19
2.2.1 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	19
2.2.2 Культивирование рекомбинантных клеток <i>E. coli</i> .....	20
2.2.3 Экстракция апообелина из рекомбинантных клеток <i>E.coli</i> .....	20
2.2.4 Очистка экстрактов апообелина ионообменной хроматографией. Измерение концентрации полученных белков.....	21

2.3 Активация апообелинов целентеразином. Определение биолюминесцентной активности.....	21
2.4 Химический синтез конъюгатов фотопротеина с антителом и олигонуклеотидами.....	22
2.5 Одновременный биолюминесцентный анализ для выявления SNPs.....	23
2.5.1 Выделение геномной ДНК из цельной крови.....	23
2.5.2 Мультиплексная ПЦР для амплификации участков 4 разных генов....	24
2.5.3 ПЦР-амплификация фрагмента гена PON2.....	25
2.5.4 PEXТ реакция.....	25
2.5.5 Биолюминесцентный анализ продуктов PEXТ.....	26
2.6 Статистическая обработка результатов.....	27
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	28
3.1 Получение рекомбинантных вариантов обелина.....	28
3.2 Получение биоспецифичных конъюгатов рекомбинантного обелина, пригодных для использования в качестве метки в анализе.....	29
3.3 Получение матриц.....	30
3.4 PEXТ реакция и одновременный биолюминесцентный анализ продуктов реакции.....	31
3.5 Результаты проведенного анализа.....	33
3.5.1 Характеристика контрольной и экспериментальной групп.....	34
3.5.2 Ассоциация профессиональной нейросенсорной тугоухости с наличием SNPs и другими характеристиками.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	41
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	44

## ВВЕДЕНИЕ

Профессиональная нейросенсорная тугоухость или частичная потеря слуха, вызванная шумом, представляет собой самую распространенную дисфункцию сенсорных органов во всем мире [1], проблема диагностики и профилактики которой является одной из актуальных для стран со значительным сектором тяжелой промышленности. Данное заболевание рассматривают как комплексное, связанное с взаимодействием факторов внешней среды и индивидуальных показателей, в том числе и фактора генетической предрасположенности [2]. По литературным данным, ассоциация с риском развития нейросенсорной тугоухости, вызванной шумом, обнаружена для разных полиморфизмов в разных генах [3].

Многочисленные исследования, проведенные в европейской, американской и азиатской популяциях, свидетельствуют о том, что однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), ассоциированные с развитием данной патологии, локализованы в генах антиоксидантных систем, калиевого гомеостаза и формирования межклеточных контактов, активации и регуляции фактора теплового шока, а также в генах клеточного стресса и наследственной тугоухости [3].

Однонуклеотидные полиморфизмы являются наиболее распространенным типом генетической изменчивости. Такие вариации ДНК относительно равномерно распределены по всему геному и могут приводить к изменению структуры и функции белков, а также влиять на экспрессию затронутого гена [4].

В настоящее время существует множество методов по поиску новых SNP и выявлению их ассоциаций с различными заболеваниями. Многие из этих методов основаны на регистрации светового сигнала с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных репортеров. В связи с этим особый

интерес представляют билюминесцентные белки особого типа –  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины.

Эти белки представляют собой стабильные нековалентные комплексы апобелкаи предокисленного субстрата – пероксицелентеразина. При присоединении ионов кальция происходит декарбоксилирование субстрата, которое сопровождается выделением кванта света. В настоящее время гены нескольких фотопротеинов клонированы, получены рекомбинантные белки, свойства которых практически не отличаются от свойств природных белков.

Для одного из таких фотопротеинов – обелина из гидроидного полипа *Obelia longissimas* помощью сайт-направленного мутагенеза была получена группа мутантных вариантов, с измененными билюминесцентными свойствами. Среди них были выбраны варианты, испускающие зелёный ( $\lambda_{\text{max}} = 493$  нм) и фиолетовый сигналы ( $\lambda_{\text{max}} = 387$  нм), обелин с заменами Y138F, A6C и W92F, H22E, D12C соответственно, названные «цветными».

На основе данных вариантов, обладающих не только разными спектрами, но и кинетикой сигналов, был разработан анализ двух мишеней в образце, где оба билюминесцентных репортера используют одновременно. При этом билюминесценция обоих репортеров инициируется единичным впрыском раствора  $\text{CaCl}_2$ , а разделение сигналов осуществляется с помощью спектрального и временного разрешения<sup>[5, 6]</sup>.

В настоящей работе мишенями для одновременного билюминесцентного анализа были выбраны одонуклеотидные полиморфизмы, для которых по литературным данным установлена достоверная ассоциация с профессиональной нейросенсорной тугоухостью в разных популяциях: rs 494024 в гене каталазы (CAT) и rs 7785846 в гене параоксоназы-2 (PON2), входящих в группу белков окислительного стресса; rs 7095441 в гене протокадгерина (PCDH15), одного из ключевых белков, вовлеченных в поддержание калиевого гомеостаза и формирование межклеточных контактов; rs 2227956 в гене белка теплового шока (HSPA1L) и rs 7598759 в гене

нуклеолина (NCL), фосфопротеина, являющегося посредником антиапоптозного эффекта белков теплового шока и клеток, подвергающихся окислительному стрессу.

Цель данной работы: выявить билюминесцентным способом наличие однонуклеотидных полиморфизмов: rs 494024 (C/T), rs 7598759 (C/T), rs 7095441 (C/T), rs 2227956 (A/G) и rs 7785846 (C/T), а также их ассоциации с риском развития профессиональной нейросенсорной тугоухости, вызванной шумом, у людей, работающих во вредных условиях (завод АО «Красмаш»).

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) Получить препараты цветных вариантов фотопротеина обелина с заменами Y138F, A6C и W92F, H22E, D12C;
- 2) Синтезировать конъюгаты цветных обелинов с антителом и олигонуклеотидом для использования в качестве репортерных молекул в билюминесцентном SNP-генотипировании;
- 3) Сформировать и описать исследуемые группы из работников цеха машиностроительного завода АО «Красмаш»;
- 4) Провести билюминесцентный анализ по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов rs 494024, rs 7598759, rs 7095441, rs 2227956 и rs 7785846 у работников машиностроительного завода АО «Красмаш», вошедших в сформированные группы, с использованием полученных конъюгатов в качестве меток;
- 5) Провести статистический анализ полученных результатов.
- 6)

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Целентеразин-зависимые биолюминесцентные системы

Биолюминесценция – это хемилюминесцентная реакция, в которой происходит окисление молекулярным кислородом субстрата – люциферина, катализируемое специфическим ферментом – люциферазой, а продукты реакции представляют собой молекулы в возбужденном состоянии, где при переходе в основное состояние избыток энергии высвобождается в виде кванта света.

Пара люцифераза-люциферин является ключевой частью всех биолюминесцентных систем, хотя светящиеся организмы встречаются среди бактерий, грибов, простейших, кишечнорастворимых, червей, насекомых и рыб<sup>[7]</sup>. Несмотря на одинаковый конечный результат биохимического процесса – излучение кванта света в видимом диапазоне спектра, механизмы, лежащие в его основе, значительно различаются у представителей разных таксонов. Различными являются не только субстраты, вовлеченные в реакции биолюминесценции, но и ферменты, катализирующие эти реакции. Поэтому «люцифераза» и «люциферин» – используемые в литературе термины для обозначения ферментов и субстратов биолюминесцентных реакций – скорее понятие собирательное и функциональное, чем структурно-химическое<sup>[8]</sup>.

Среди нескольких известных на сегодня субстратов светоизлучающих реакций, идентифицированных в морских светящихся организмах, наиболее часто встречаются люциферины имидазопиразинового типа – целентеразин, либо его производные<sup>[8]</sup>, которые на данный момент химически синтезированы и коммерчески доступны.

Существует два вида целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем (рис. 1.1): люциферазы классического типа, катализирующие окисление субстрата молекулярным кислородом (люциферазы *Renilla muelleri*, *Metridia longa* и др.) с образованием целентерамида, CO<sub>2</sub> и кванта света (рис. 1.1 а), и

люциферазы «особого типа» –  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины (рис. 1.1 б), к которым относятся люциферазы *Aequorea victoria* и *Obelia longissima*[7, 9].

Сам термин «фотопротеины» был введен Shimomura и Jonson в 1966 году в качестве общего определения предварительно заряженных белков, не требующих для своей работы наличия молекул кислорода и излучающих свет при взаимодействии с ионами металлов<sup>[10]</sup>. Энергия запасена в предварительно заряженном белке и излучается в ходе реакции. Поскольку в большинстве известных фотопротеиновых систем реакция запускается добавлением ионов кальция, Morin и Hastings предложили термин « $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины»<sup>[11]</sup>, которые представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина (одноцепочечного полипептида) и молекулы субстрата 2-гидропероксицелентеразина, а присоединение ионов кальция вызывает в свою очередь конформационные изменения белка, приводящие к декарбоксилированию субстрата. Конечными продуктами реакции являются  $\text{CO}_2$ , целентерамид, находящийся внутри апобелка, с присоединенными ионами кальция и квант света (рис. 1.1б).

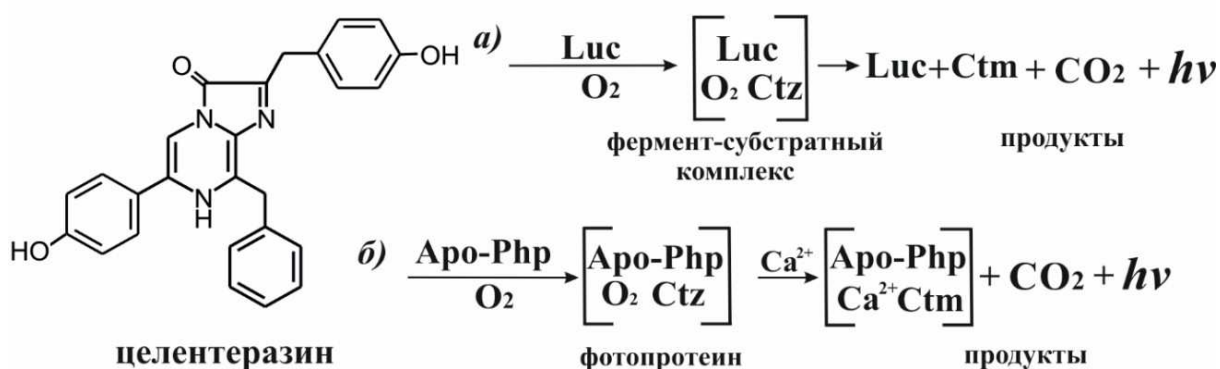


Рисунок 1.1 – Схема биOLUMиНесцентной реакции целентеразин-зависимых люцифераз: а) реакция люциферазы классического типа; б) биOLUMиНесцентная реакция фотопротеинов, где Luc – люцифераза, Ctz – целентеразин, Ctm – целентерамид, Apo-Php – апофотопротеин<sup>[12]</sup>



С помощью методов генной инженерии и химического синтеза в настоящее время создано широкое разнообразие целентеразин-зависимых люцифераз, обладающих различными полезными свойствами: повышенной стабильностью, измененными спектрами свечения, увеличенным квантовым выходом, а также ускоренной или замедленной кинетикой сигнала. Это создает условия для широкого использования люцифераз в качестве репортеров в разнообразных аналитических системах *in vitro* и *in vivo*[<sup>13</sup>].

## 1.2 Мутантные варианты обелина и их использование в одновременном билюминесцентном анализе

В 2000 году были определены пространственные структуры двух «заряженных» (связанных с 2-гидропероксицелентеразином) фотопротеинов: акворина[<sup>14</sup>]и обелина [<sup>15</sup>] (рис. 1.2), а также определены аминокислотные остатки целентеразин-связывающей полости этих белков.

Далее было показано, что сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков в целентеразин-связывающей полости обелина может приводить к образованию мутантных вариантов белка с существенно измененными спектрально-кинетическими характеристиками соответствующему сдвигу спектра билюминесценции.

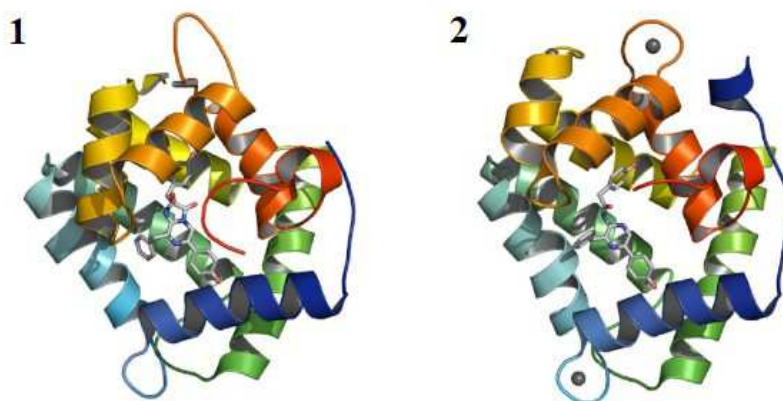


Рисунок 1.2 – Пространственные структуры: 1 – обелина, 2 –Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина. Серые шарики – ионы Ca<sup>2+</sup>[<sup>16</sup>]

С использованием сайт-направленного мутагенеза была получена большая группа мутантных вариантов обелина с измененными спектрами и кинетикой биолюминесценции.

Среди этой группы были обнаружены два стабильных и активных мутанта обелина: с заменами W92F,H22E, испускающий быстрый фиолетовый сигнал, сдвинутый в коротковолновую область ( $\lambda_{\text{max}} = 387$  нм), и Y138F, испускающий медленный зелёный сигнал, сдвинутый в длинноволновую область ( $\lambda_{\text{max}} = 493$  нм) [6]. Столь значительные различия в характеристиках биолюминесцентных сигналов позволили разделить их с помощью широкополосных оптических фильтров и временного разрешения (рис. 1.3).

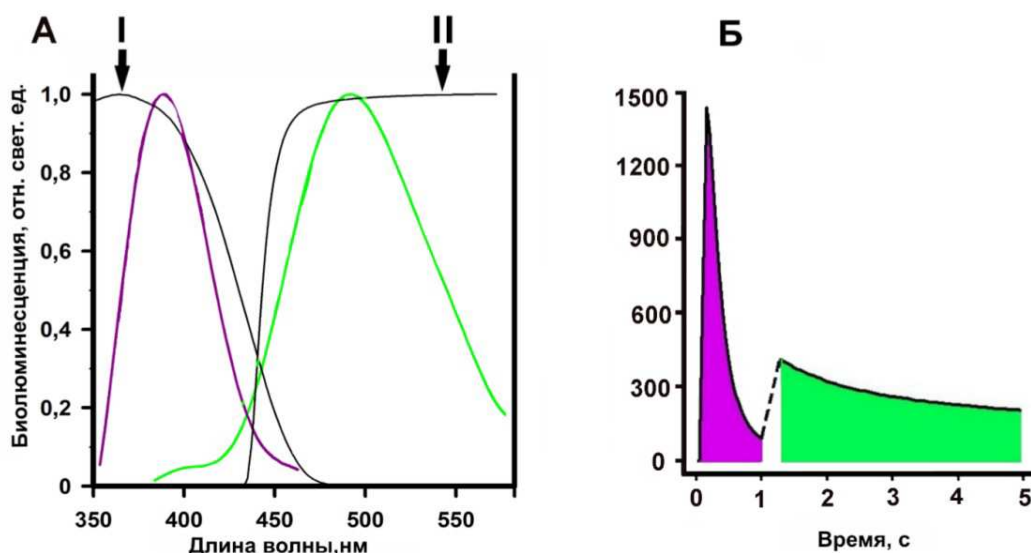


Рисунок 1.3 – А: Спектры биолюминесценции обелина с заменами W92F,H22E и Y138F (фиолетовая и зеленая линии), где I –спектр пропускания оптического фильтра ФС6, II–спектр пропускания оптического фильтраЖС16;  
 Б:биолюминесцентный сигнал смеси обелиновых мутантов, записанный последовательно через фильтр I –быстрый сигнал фиолетового мутанта и фильтр II –медленный сигнал зеленого мутанта.Не закрашенная область, ограниченная пунктиром – период переключения фильтров [12]

При использовании данных вариантов в качестве репортеров был разработан одновременный анализ двух мишеней в одном образце на основе спектрального и временного разрешений сигналов[5,9].

### **1.2.1Получение мутантных вариантов обелина, пригодных для сайт-направленного конъюгирования с биоспецифическими молекулами**

Использование обелина в качестве репортера для выявления конкретной мишени в образце предполагает наличие фрагмента, обладающего соответствующей биоспецифической аффинностью к этой мишени (антитела, олигонуклеотида и т.п.). Получение таких бифункциональных соединений осуществляют с помощью химического синтеза, используя варианты обелина с искусственно введенными 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 [17]. Наличие такого остатка существенно упрощает синтез конъюгатов, делает его сайт-направленным, позволяет сохранить биологическую активность белка и повысить выход конъюгатов.

В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН был разработан способ получения с помощью сайт-направленного мутагенеза вариантов «цветных» обелинов с уникальными цистеиновыми остатками, пригодными для сайт-направленного конъюгирования с биоспецифическими молекулами. Среди таких вариантов обелина наиболее подходящей для применения в качестве репортеров в анализе оказалась пара W92F,H22E,D12C и Y138F,A6C [12].

### **1.4Выявление однонуклеотидных полиморфизмов известной локализации**

При выявлении полиморфизмов анализируется участок ДНК размером в несколько сотен пар оснований, в котором находится интересующий полиморфный сайт. Многие подходы к генотипированию предусматривают на

первом этапе целевую амплификацию участка ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), в основе которой лежит многократное удвоение определённого фрагмента ДНК в искусственных условиях (*in vitro*) при помощи фермента ДНК-полимеразы и комплекта праймеров, фланкирующих полиморфный сайт. В результате ПЦР нарабатывается достаточное для визуальной детекции количество ДНК.

#### **1.4.1 Дискриминации аллеля: удлинение праймера**

К подходам дискриминации аллеля относятся надежные методы, основанные на удлинении аллель-специфического праймера. В настоящее время существуют многочисленные вариации данного подхода, однако, в данной работе мы рассмотрим аллель-специфическое удлинение праймера или так называемую PEХТ реакцию (primer extension reaction).

Для PEХТ реакции необходимы два аллель-специфических праймера, 3'-концевой нуклеотид которых комплементарен нормальному либо мутантному варианту полиморфного сайта исходной ДНК-матрицы. В случае полной комплементарности матрицы и аллель-специфического праймера происходит удлинение цепи ДНК-полимеразой, в противном случае синтез не происходит (рис. 1.4). В данном способе определения аллеля важно полностью подавить амплификацию неспецифичных фрагментов, в связи с этим все методы аллель-специфического удлинения праймера базируются на использовании очень чувствительной полимеразы, а также использования стандартных образцов с известным генотипом для контроля ложноположительного срабатывания полимеразы, приводящего к ошибочному генотипированию.

В свою очередь аллель-специфические праймеры могут иметь различные маркировки для дальнейшей идентификации полученных продуктов, например, флуоресцентные метки.

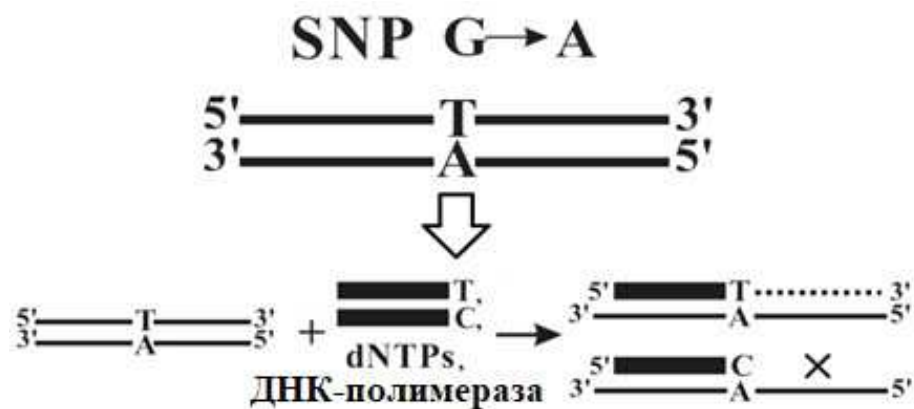


Рисунок 1.4 – Реакция дискриминации аллеля на основе удлинения аллель-специфического праймера (PEXТ реакция) [12]

### 1.5 Профессиональная нейросенсорная тугоухость, вызванная шумом

Индукцируемая шумом потеря слуха – это нейросенсорное повреждение, которое развивается при длительном (10-14 лет) [18, 19] воздействии шума с преимущественно высокой частотой – 4-6 kHz [20] и уровнем шума, превышающим предельно допустимый уровень. Данную дисфункцию сенсорных органов рассматривают как комплексное заболевание, связанное как с взаимодействием факторов внешней среды, так и индивидуальных показателей, в том числе фактора генетической предрасположенности.

Генетические основы развития нейросенсорной тугоухости шумовой этиологии изучены мало, тем не менее, исследования на небольших популяциях позволили определить гены, связанные с чувствительностью к шуму, которые можно условно разделить на 5 групп[3]:

- 1) гены окислительного стресса;
- 2) гены, участвующие в формировании межклеточных контактов и в поддержании калиевого гомеостаза;
- 3) гены, кодирующие белки теплового шока;
- 4) гены клеточного стресса;
- 5) гены, наследственной тугоухости.

### 1.5.1 Окислительный стресс как основная причина нейросенсорной тугоухости, вызванной шумом. Гены окислительного стресса

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что окислительный стресс в результате увеличения уровня активных форм кислорода, после воздействия шума, является преобладающим фактором, вызывающим потерю волосковых клеток кортиева органа улитки, что играет в свою очередь важную роль в патологическом механизме развития индуцируемой шумом нейросенсорной тугоухости<sup>[21-23]</sup>.

Условия окислительного стресса являются результатом нарушения внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, что приводит к повреждению митохондрий и высвобождению проапоптотических факторов, таких, как переокисление мембранных липидов, денатурация клеточных белков и повреждение ДНК, что вызывает гибель волосковых клеток (рис. 1.5)<sup>[24, 25]</sup>.



Рисунок 1.5– Эффект воздействия шума на волосковые клетки кортиева органа улитки при окислительном стрессе

Повреждение волосковых клеток происходит в том случае, если антиоксидантные системы неэффективно нейтрализуют активные формы кислорода и азота.

В улитке активны две группы антиоксидантных ферментов. Первая включает в себя ферменты, участвующие в метаболизме глутатиона, такие как глутатион S-трансфераза (GST), глутатионпероксидаза (GPX1) и глутатионредуктаза (GSR). Второй класс антиоксидантных ферментов включает в себя ферменты, участвующие в разрушении супероксид-анионов и перекиси водорода такие, как каталаза (CAT), супероксиддисмутаза-1 (Cu/Zn SOD1), супероксиддисмутаза-2 (митохондриальная SOD2) и параоксоназа-2 (PON2)[3, 26].

### **1.5.2 Ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов в генах окислительного стресса (CATи PON2) с индуцируемой шумом нейросенсорной тугоухостью**

Каталаза (CAT) является одним из основных ферментов нейтрализации активных форм кислорода, катализируя разложение токсичного пероксида водорода до кислорода и воды. Ген CAT расположен в 11 хромосоме (11p13) и состоит из 13 экзонов[26]. Известно несколько аллельных вариантов этого гена, ассоциированных со снижением каталитической активности фермента в волосяных клетках кортиева органа улитки. Так, например, для шведской и польской популяций была показана взаимосвязь полиморфизма rs494024 гена CAT с развитием тугоухости, вызванной шумом[27]. Также взаимосвязь нарушения слуха с наличием SNPsrs7943316 и rs769214 в этом гене была выявлена и для китайской популяции [28].

Фермент параоксоназа-2 (PON2) кодируется одним из генов семейства PON, которое состоит как минимум из 3-х генов (PON, PON1 и PON2), расположенных в длинном плече седьмой человеческой хромосомы (7q21.3-22.1). Семейство генов PON кодирует эстеразы, которые повсеместно экспрессируются по всему организму и оказывают антиоксидантное действие на клеточном уровне[29]. В исследованиях, проведенных в итальянской и китайской популяциях, было показано, что в гене PON2, кодирующем этот

фермент, однонуклеотидные замены связаны с развитием частичной потери слуха, индуцируемой шумом [24,<sup>30</sup>]. В итальянской популяции показано, что полиморфизм rs74931 в гене PON2 ассоциирован с предрасположенностью к тугоухости, однако, авторы отмечают, что интерпретировать данный результат следует с осторожностью, учитывая небольшой размер выборки [29]. Взаимосвязь мутаций rs12026 и rs7785846 гена PON2 с нарушениями слуха была выявлена и в китайской популяции, где показано, что полиморфизм rs7785846 ассоциирован с двукратным повышением риска развития нейросенсорной тугоухости [24].

### **1.5.3 Гены, участвующие в формировании межклеточных контактов и в поддержании калиевого гомеостаза (протокадгерин 15)**

Потеря волосковых клеток под воздействием шума может быть результатом нарушения регуляции внеклеточного калия при изменении межклеточных контактов между волосковыми клетками кортиева органа улитки [21,<sup>31</sup>].

Среди генов-кандидатов предрасположенности к нейросенсорной тугоухости, вызванной шумом, выделяют гены калиевых каналов [<sup>32</sup>]; гены, кодирующие белки семейства коннексинов, которые образуют щелевые контакты между волосковыми клетками [<sup>33</sup>, <sup>34</sup>], а также гены кадгерина 23 (Cdh23) и протокадгерина 15 (PCDH15).

Гены Cdh23 и PCDH15 относятся к классу молекул клеточной адгезии и участвуют в передаче сигналов за счет межклеточных контактов между сенсорными волосковыми клетками улитки [<sup>35</sup>]. Ассоциация наличия SNP rs7095441 в гене PCDH15 с развитием тугоухости при воздействии производственного шума обнаружена для польской и шведской популяций [<sup>36</sup>]. Однако в китайской популяции для носителей мутантного аллеля SNPrs11004085 в этом гене показано уменьшение риска развития данной патологии [<sup>37</sup>].



#### **1.5.4 Гены, кодирующие белки теплового шока (HSPA1L)**

Белки теплового шока представляют собой группу консервативных белков, участвующих в синтезе, сборке, формировании правильной пространственной структуры и внутриклеточном транспорте других белков. Они синтезируются во всех клетках при физиологических и патологических условиях. Показано, что их экспрессия увеличивается в условиях стресса, в том числе и при воздействии шума [38]: под влиянием среднего уровня шума они могут защитить органы слуха от его чрезмерного воздействия [39, 40].

Взаимосвязь SNPs в генах HSPA1L с развитием нейросенсорной тугоухости, индуцируемой шумом, выявлена независимо для шведской, польской и китайской популяций [41, 42].

#### **1.5.5 Гены клеточного стресса (нуклеолин). Ассоциация SNP в гене нуклеолина с индуцируемой шумом нейросенсорной тугоухостью**

В американской популяции было проведено исследование для оценки потенциальной роли нуклеолина (NCL) в потере слуха среди людей, работающих в условиях повышенного шума.

Нуклеолин представляет собой многофункциональный фосфопротеин, участвующий в защите от апоптоза клеток, подвергающихся окислительному стрессу, который является метаболическим последствием воздействия шума. Также нуклеолин опосредует антиапоптозный эффект белка теплового шока (HSPA1L), который в свою очередь защищает органы слуха от чрезмерного воздействия шума (SNPs в гене HSPA1L ассоциированы с восприимчивостью к тугоухости [40, 41]) и ототоксичного эффекта лекарственных препаратов [43]. Показано, что SNP rs7598759 в гене NCL значительно ассоциирован с предрасположенностью к тугоухости [42].

Анализ литературных данных показывает актуальность цели, сформулированной в данной работе.

Красноярский край является регионом со значительным сектором тяжелой промышленности. Защита здоровья людей, трудящихся во вредных условиях, приводящих к потере слуха, является важной социальной задачей. Информированность о наличии наследственной предрасположенности к этому заболеванию будет мотивировать работника не пренебрегать использованием соответствующих средств защиты на рабочем месте.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Буферные растворы и среды

Таблица 2.1 – Состав сред и буферных растворов, использованных в работе

Название	Состав
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl <sub>2</sub> , 10 мМ MgSO <sub>4</sub> pH 7,0, 20 мМ глюкоза
LB-среда	20 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5-7 г/л NaCl pH 7,4
LB-агар	1,5% агар в LB-среде
Буфер А	6 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl, 5 мМ CaCl <sub>2</sub>
БуферБ	0-0,5 М ацетат натрия в буфере А
Буфер Т	20 мМ Tris-HCl pH 7,0
Буфер ТЕ	Буфер Т + 5мМ ЭДТА
Буфер ТАЕ (50х)	2 М Tris, 50мМ ЭДТА, уксусная кислота pH=8,0
Кальциевый буфер	0,1 М CaCl <sub>2</sub> , 0,1 М Tris-HCl pH 8,8
Промывочный буфер	PBS, 0,1% Tween20, 5 мМ ЭДТА
Гибридизационный буфер	0,1 М МАВ, 5 мМ ЭДТА, 1% БСА
Буфер для меток	20 мМ Tris-HCl pH 7,0, 5 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, 0,1% БСА

### 2.2 Получение рекомбинантных вариантов апообелина в высокоочищенном виде

#### 2.2.1 Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) для трансформации брали в объеме 45 мкл клеток на 1 мкл раствора соответствующей плазмидной ДНК и инкубировали в течение 30 мин при 0°C. Затем проводили «тепловой шок»: клетки нагревали до 42°C на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) в течение 20 сек и затем переносили их на лед. После этого в пробирку добавляли 450 мкл среды SOC (таблица 2.1),

инкубировали 1 час при 37°C, высеивали на LB-агар(таблица 2.1), содержащий ампициллин с концентрацией 200 мкг/мл, и растили в течение ночи при 37°C.

### **2.2.2 Культивирование рекомбинантных клеток *E. coli***

Культивирование трансформированных клеток RIPL в LB среде(таблица 2.1), содержащей ампициллин (200 мг/л), проводили при 37°C до оптической плотности равной 0,6-0,8 при длине волны 590нм ( $OD_{590}$ ). Индукцию синтеза белков осуществляли добавлением ИПТГ (100 мг/л), культивировали еще раз в течение 3-х часов, а после осаждали клетки центрифугированием (7000 g, 20 мин, 4°C).

### **2.2.3 Экстракция апообелина из рекомбинантных клеток *E. coli***

Полученные клеточные массы после центрифугирования ресуспендировали в 5-кратном (г/мл) объеме буфера T(таблица 2.1) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т («АКАДЕМПРИБОР», Украина) 6 раз по 20 с на льду. Затем образцы снова центрифугировали (7000 g, 15 мин, 4°C), супернатант отбрасывали. Осадки промывали, ресуспендируя последовательно буфером T(таблица 2.1) с 0,9% NaCl, затем с добавлением 0,1% Тритонах100 и в третий раз с 5мМСаCl<sub>2</sub>. После каждого ресуспендирования осадки, основным компонентом которых являлись тельца включения, отделяли центрифугированием в том же режиме и при такой же температуре.

Полученные в результате тельца включения (около 200 мг с 1 г биомассы) ресуспендировали в 5-кратном объеме буфера A(таблица 2.1), инкубировали 1-2 часа при 4°C и центрифугировали (7000 g, 20 мин, 4°C).

### **2.2.4 Очистка экстрактов апообелина ионообменной хроматографией.**

#### **Измерение концентрации полученных белков**

Экстракты апообелина, которые были получены после центрифугирования наносили на колонку HiTrapDEAEFF, заполненную DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) и уравновешенную буфером А. Элюцию белков проводили с помощью хроматографической системы Bio-Rad градиентом ацетата натрия (буферБ, таблица 2.1) по программе: 0-25 мл – буферА (нанесение образца и элюирование примесей слабо ионного характера), 25-50 мл – градиент буфер Б от 0 до 50% (элюция апобелка), 50-65 мл – буферБот 55 до 100% (очистка колонки). Скорость элюции составляла 2 мл/мин.

Полученные апобелки концентрировали с помощью центрифугирования (5000g, 10 мин., 4°C) на ячейках AmiconUltra-4 10K Centrifugal Filter Devices (Merck, Германия).

Для определения концентрации белков из аликвоты, объем которой составлял 500 мкл, гель-фильтрацией удаляли мочевину на колонке HiTrap Desalting Columns, уравновешенной буфером Т (таблица 2.1), хроматографической системой АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания).

Концентрацию белков определяли по методу Лоури спектрофотометрически с использованием набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США). В качестве нулевого образца использовали буфер Т.

### **2.3 Активация апообелинов целентеразином. Определение билюминесцентной активности**

Активацию проводили 1,25-кратным молярным избытком целентеразина в 10-кратном объеме буфера ТЕ (таблица 2.1) с 10 мМ ДТТ в течение суток при 4°C.

Активированные фотопротеины отделяли от незаряженных апобелков с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки Mono Q 5/50 GL, на хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare,

Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,35 M) в буфере TE со скоростью 1 мл/мин по следующей программе: 0-55 мл – буфер TE (нанесение образца и элюирование примесей слабо ионного характера), 55-75 мл – градиент 1M NaCl в буфере TE от 0 до 35% (элюция заряженного белка), 75-80 мл – 1 M NaCl в буфере TE от 40 до 100% (очистка колонки).

Биолюминесцентный сигнал заряженных фотопротеинов измеряли кюветным люминометром (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск). Сигнал регистрировали с помощью самописца (модель 2210, ЛКВ, Швеция). Измерения проводили в 0,1 M Tris-HCl pH 8,8 с 10 mM ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера (таблица 2.1).

#### **2.4 Химический синтез конъюгатов фотопротеина с антителом и олигонуклеотидами**

Имуноглобулин модифицировали 70-кратным молярным избытком SMCC, растворенном в диметилсульфоксиде в течение 2 ч при комнатной температуре в 50 mM BICINE pH 8,5, содержащем 5 mM ЭДТА. 5'-амино-олиготимидилат модифицировали 100-кратным избытком SMCC, растворенном в диметилсульфоксиде в течение 2 ч при комнатной температуре в 0,1M NaHCO<sub>3</sub>. Избытки всех реагентов отделяли гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting Columns (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE.

Для синтеза конъюгата полученного белка с антителом SMCC-активированный иммуноглобулин и заряженный обелин смешивали в молярном соотношении 1:20 и инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученный конъюгат выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE с добавлением 150 mM NaCl.

Для получения конъюгата с олигонуклеотидом SMCC-активированный олиготимидилат ( $\text{NH}_2\text{-dT}_{30}$ ) инкубировали с заряженным обелином в молярном соотношении 1:20 в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ . Полученный конъюгат 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 M) в буфере TE по программе: 0-15 мл – буфер TE (нанесение образца и элюирование примесей слабо ионного характера), 10-50 мл – градиент 1M NaCl в буфере TE от 0 до 70% (элюция конъюгата), 70-75 мл – 1 M NaCl в буфере TE от 75 до 100% (очистка колонки). Скорость элюции – 1 мл/мин.

## **2.5 Одновременный биолюминесцентный анализ для выявления SNPs**

### **2.5.1 Выделение геномной ДНК из цельной крови**

Образцы венозной крови работников цеха АО «Красмаш», работающих в цеху во вредных условиях труда, были предоставлены ФГБУ Федеральным Сибирским научно-клиническим центром ФМБА России. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ ФСНКЦ ФМБА. При сборе материала получено информированное согласие от каждого участника.

ДНК выделяли колоночным методом набором «Диаэм» (Россия) из цельной крови. На первом этапе осмотическим шоком разрушали эритроциты, добавляя ледяную воду к аликвоте цельной крови. Далее лейкоцитарную фракцию отделяли центрифугированием и ресуспендировали в 10 мМ Tris-HCl pH=8,0, 1 мМ ЭДТА.

Лейкоциты разрушали денатурирующим буфером, центрифугировали (для связывания ДНК из раствора с мембраной используемых колонок). Далее делали серию промывок связавшейся на мембране ДНК и элюировали ее стерильной деионизованной водой.

## 2.5.2 Мультиплексная ПЦР для амплификации участков 4 разных генов

Участки четырех генов, включающих однонуклеотидные полиморфизмы rs 494024 гена CAT (144 п.о.), rs 7598759 гена NCL (187 п.о.), rs 7095441 гена PCDH15 (227 п.о.) и rs 2227956 гена HSPA1L (269 п.о.) амплифицировали в одной пробирке. Амплификацию проводили в 50 мкл смеси, содержащей 1-кратный Taq-буфер, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2 мкМ праймеров (таблица 2.2), 10 нг геномной ДНК, 2,5 ед. акт. ДНК полимеразы Hot Start Taq (Евроген, Россия). ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini («Bio-Rad», США) по следующей программе: 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.

### 2.2 – Последовательность праймеров для мультиплексной ПЦР

Ген, полиморфизм	Последовательность (5'→3')	
CAT, rs 494024 (C/T)	Up	СТААТАТГАТГТСТТССАСТТССС
	Dn	ГТТГАСТГТГТТТССААААТАГГ
NCL, rs 7598759 (C/T)	Up	ССТААГАСТСТГАААСAGTGGTTC
	Dn	САТСАГССАТГТААГААСААСС
PCDH15, rs 7095441 (C/T)	Up	СААТТСАААСAGGТТТАGAAАТТG
	Dn	САСТСТТТССAGТТТССТАAGTG
HSPA1L, rs 2227956 (A/G)	Up	GCAАТТТТСТСССТСТGGAC
	Dn	GCCАТGACAАAGGACAАСААС

Концентрацию продуктов ПЦР определяли по картинке электрофореза с источником тока Electrophoresis Power Supply – EPS 3501 XL («Amershampharmaciabiotec», Великобритания) в камере для горизонтального электрофореза («Bio-Rad», США) с 1-кратным TAE буфером (таблица 2.1) в 1,7% агарозном геле, окрашенном этидием бромидом, с помощью



программного обеспечения AlphaEasy™ («AlphaInnotechCo», США). В качестве калибровочного маркера использовали ДНК-маркер 100+50 kb DNA (СибЭнзим, Россия).

### **2.5.3 ПЦР-амплификация фрагмента гена PON2**

Участок гена PON2 с полиморфизмом rs 7785846 и длиной 264 п.о., синтезировали ПЦР с использованием образца геномной ДНК человека. 25 мкл реакционной смеси содержали 5 ед. акт. ДНК-полимеразы Hot Start Taq (Евроген, Россия), 1-кратный Taq-буфер (Евроген, Россия), 0,2 мМ dNTP (СибЭнзимб Россия), и по 0,4 мМ праймеров (Биосан, Россия): Up праймер – 5'-GAAAGTCTCTCTAGGGCTTATG-3'; Dn праймер – 5'-GAGGTTTCCATCAGCTCTCTTC-3'. Условия ПЦР: 95°C в течение 5 мин, 30 циклов (95°C – 30 сек, 62°C – 30 сек, 72°C – 40 сек), 72°C в течение 10 мин.

ПЦР продукты анализировали с помощью электрофореза. В качестве калибровочного маркера использовали ДНК маркер 100+50 kb (СибЭнзим, Россия).

### **2.5.4 PEХТ реакция**

ПЦР продукты без дополнительной очистки использовали в качестве матрицы для проведения PEХТ реакции. PEХТ реакция для каждого полиморфизма проводилась в отдельной пробирке с парой соответствующих праймеров, последовательность которых представлена в таблице 2.3. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1-кратный буфер SNPdetect (Евроген, Россия); 2,5 мМ AGC (dATP, dCTP, dGTP) (Биосан, Россия); 2,5 мМ Bio-dUTP (Биосан, Россия); 1 пМ праймеров, помеченных 6-карбокCIFлуоресцеином (FAM) и олигоаденилатом (dA)<sub>27</sub>, которые комплементарны нормальному и мутантному аллелю соответственно; 2 ед. акт. полимеразы SNPdetect (Евроген, Россия) и 1 мкл амплифицированной

ДНКматрицы. Условия PEХТ реакции: 95°C в течение 5 мин, 3 цикла (95°C – 15 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 15 сек), 95°C в течение 5 мин.

Таблица 2.3 – Последовательность праймеров для PEХТреакции

Ген, полиморфизм	Последовательность (5'→3')	
CAT, rs 4940241 (C/T)	PEХТ N FAM	GCTTTACTGATCTAGGAGAGCTTTAT
	PEХТ M (A) <sub>27</sub>	GCTTTACTGATCTAGGAGAGCTTTAC
NCL, rs 7598759 (C/T)	PEХТ N FAM	CTTGAGTTAATATACAAATACTCATGAC
	PEХТ M (A) <sub>27</sub>	CTTGAGTTAATATACAAATACTCATGAT
PCDH15, rs 7095441 (C/T)	PEХТ N FAM	CTACTATAGTCATAAACTTTTGCTGAT
	PEХТ M (A) <sub>27</sub>	CTACTATAGTCATAAACTTTTGCTGAC
HSPA1L, rs 2227956 (A/G)	PEХТ N FAM	CACCTTGCCGGTGCTCTTGTCGG
	PEХТ M (A) <sub>27</sub>	CACCTTGCCGGTGCTCTTGTCGA
PON2, rs 7785846 (C/ T)	PEХТ N FAM	CTTAACCATGTGGTCACGGAC
	PEХТ M (A) <sub>27</sub>	CTTAACCATGTGGTCACGGAT

### 2.5.5 Билюминесцентный анализ продуктов PEХТ

Для активации поверхности в лунки планшета (Costar, США) вносили по 50 мкл раствора стрептавидина в PBS буфере с концентрацией 10 мкг/мл, инкубировали 1 ч при 37°C, встряхивая, и промывали 4 раза промывочным буфером (таблица 2.1). Далее в лунки вносили 47 мкл гибридизационного буфера (таблица 2.1) и 3 мкл продуктов PEХТ реакции, в контрольные лунки – 50 мкл гибридизационного буфера, инкубировали при комнатной температуре 30 мин, встряхивая. Планшет промывали, в лунки вносили по 50 мкл смеси конъюгатов, растворенных в буфере для меток (таблица 2.1), инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и снова промывали.

Билюминесценцию измеряли сразу после впрыскивания 50 мкл кальциевого буфера с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940

Multimode Reader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором. Первую секунду регистрировали фиолетовый сигнал через оптический фильтр ФС6 (ЛенЗОС, Россия), а затем в течение 5 с – зеленый сигнал через светофильтр ЖС16 (ЛенЗОС, Россия). Полученные от контрольных лунок усредненные сигналы вычитали из сигналов от лунок с образцами. Генотип определяли по дискриминационному фактору Д, который равен соотношению величин зеленого и фиолетового сигналов.

Результаты анализа подтвердили методом секвенирования в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

## **2.6 Статистическая обработка результатов**

Данные обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 10 и статистического программного обеспечения STATISTICA 12 (Statsoft, Россия). Статистическая обработка данных в исследовании случай-контроль проводилась с помощью программы «Ген Эксперт» ([http://gen-exp.ru/calculator\\_or.php](http://gen-exp.ru/calculator_or.php)). U-тест Манна-Уитни использовали для сравнения количественных данных. Критерий  $\chi^2$  Пирсона использовали для сравнения частот вариантов генов среди экспериментальной и контрольной групп. При расчетах учитывался уровень значимости  $p < 0,05$ . Ассоциация между вариантами исследуемых генов и тугоухостью оценивалась по отношению шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ), значения  $p$  менее 0,05 считались значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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

CAT – каталаза

Ctz – целентеразин

DMSO – диметилсульфоксид

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин

HSPA1L – белок теплового шока

LB-среда – среда Лурия Бергана

kb – килобаз

MAB – малеиминовая кислота

NCL – нуклеолин

OL – обелин

OL-SH – вариант обелина с уникальным остатком цистеина

PEXT – реакция удлинения праймера

PCDH15 – протокадгерин

PON2 – параоксоназа-2

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

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

SOC-среда (Super Optimal broth with Catabolic repressor)

BSA – бычий сывороточный альбумин

ДТТ – дитиотреитол

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

п.о. – пара нуклеотидных оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Adelman, C. Effects of furosemide on the hearing loss induced by impulse noise / C. Adelman, J. M. Weinberger, L. Kriksunov // J. Occup. Med. Toxicol. – 2015. – V. 6, N. 14. – P. 1-7.
2. Konings, A. Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review / A. Konings, L.L. Van, C. G. Van // Ear. Hear. – 2009. – V. 30, N. 2. – P.151-159.
3. Красицкая, В. В. Генетические аспекты профессиональной нейросенсорной тугоухости / В. В. Красицкая, Е. Е. Башмакова, К. Г. Добрецов и др. // Вестник оториноларингологии. – 2017. – Т. 82, № 5. – С. 15-76.
4. Ragoussis, J. Genotyping technologies for genetic research / J. Ragoussis // An. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2009. – V. 10. – P. 117-33.
5. Kudryavtsev, A. N. Simultaneous bioluminescent immunoassay of serum total and IgG-bound prolactins / A. N. Kudryavtsev, V. V. Krasitskaya, A. I. Petunin [et al.]// Anal. Chem. – 2012. – V. 84, N. 7. – P. 3119-3124.
6. Frank, L. A. Violet and greenish photoproteinobelin mutants for reporter applications in dual-color assay / L. A. Frank, V. V. Borisova, S. V. Markova [et al.] // Anal. Bioanal.Chem. – 2008. – V. 391, N. 8. – P. 2891-2896.
7. Shimomura, O. Bioluminescence: chemical principles and methods /O. Shimomura. – Singapore : World Scientific Publishing Co, 2006. – P. 470.
8. Markova, S. V. Coelenterazine Dependent Luciferases / S.V. Markova, E.S. Vysotski // Biokhimiya – 2015. – V. 80, N. 6. – P. 845-866.
9. Liu, Z. J. Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteinobelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z. J. Liu, E. S. Vysotski, C. J. Chen [et al.] // Protein. Sci. – 2000. – V. 9, N. 11. – P. 2085-2093.
10. Shimomura, O. Partial purification and properties of the Chaetopterus luminescence system / O. Shimomura, F.H. Johnson // In: Bioluminescence in Progress. Princeton University Press NJ. – 1966. – P.495-521.
11. Morin, J.G. Biochemistry of the colonial hydroids and other coelenterates / J.G. Morin, J.W. Hastings // J. Cell. Physiol. – 1971. – V. 77, N. 3. – P. 305-311.
12. Башмакова, Е.Е. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов на основе производных Ca<sup>2+</sup>-регулируемого фотопротейна обелина. Дисс... канд-табиол.

наук: 03.01.06 – Красноярск, 2017. – 98 с.

<sup>13</sup>. Frank, L. A. Creation of artificial luciferases to expand their analytical potential / L.A. Frank // *Combinatorial Chemistry*. – 2015. – V. 18, N. 10. – P. 8.

<sup>14</sup>. Head, J.F. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution // J.F. Head, S. Inouye, K. Teranishi [et al.] // *Nature*. – 2000. – V. 405. – P. 372-376.

<sup>15</sup>. Vysotski, E.S. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: Structural insight into the bioluminescence mechanism / E.S. Vysotski, J. Lee // *Acc. Chem. Res.* – 2004. – V. 37. – P. 405-415.

<sup>16</sup>. Наташин, П.В. Роль отдельных аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca<sup>2+</sup>-регулируемых фотопротеинов. Дисс... канд-табиол. наук: 03.01.02 – Красноярск, 2014. – 19 с.

<sup>17</sup>. Krasitskaya, V.V. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay / V. V. Krasitskaya, A. N. Kudryavtsev, O. Shimomura [et al.] // *Anal. Methods*. – 2014. – N. 5. – P. 636-640.

<sup>18</sup>. Панкова, В.Б. Проблемы диагностики и экспертизы трудоспособности при профессиональной тугоухости / В. Б. Панкова, Е. Л. Синева, Е. А. Преображенская // *Вестник оториноларингологии*. – 2015. – Т. 6. – С. 30-33.

<sup>19</sup>. Синева, Е.Л. Актуальные проблемы профессиональной тугоухости / Е. Л. Синева, И. Н. Федина, Е. А. Преображенская // *Медицина труда и промышленная экология*. – 2007. – № 12. – С. 34-39.

<sup>20</sup>. Melnick, W. Industrial hearing conservation / W. Melnick, J. Katz // *Handbook of Clinical Audiology*. Baltimore: The Williams & Wilkins. – 1985. – P. 723-724.

<sup>21</sup>. Ohlemiller, K. K. Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury / K. K. Ohlemiller // *Hearing Research*. – 2008. – V. 245(1-2). – P. 5-17.

<sup>22</sup>. Böttger, E. C. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss / E. C. Böttger, J. Schacht // *Hearing Research*. – 2013. – V. 303. – P. 12-19.

<sup>23</sup>. Op de Beeck, K. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: The programmed death of the hair cell / K. Op de Beeck, J. Schacht, G. Van Camp // *Hearing Research*. – 2014. – V. 281 (1-2). – P. 18-27.



- <sup>24</sup>. Henderson, D. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss / D. Henderson, E. C. Bielefeld, K. C. Harris // *Ear and Hearing*. – 2006. – V. 27, N. 1. – P. 1-19.
- <sup>25</sup>. Carlsson, P. I. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility / P. I. Carlsson, E. Borg, M. L. Bonderson [et al.] // *Hearing Research*. – 2005. – V. 202 (1-2). – P. 87-96.
- <sup>26</sup>. Колесникова, Л. И. Гены ферментов антиоксидантной системы / Л. И. Колесникова, Т. А. Баирова, О. А. Первушина // *Вестник РАМН*. – 2014. – №12. – С. 83-88.
- <sup>27</sup>. Konings, A. Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations / A. Konings, M. Pawelczyk, P. I. Carlsson [et al.] // *Hum. Mol. Genetics*. – 2007. – V. 16, N. 15. – P. 1872-1883.
- <sup>28</sup>. Wang, S. L. Gene-gene interaction of GJB2, SOD2 and CAT on occupational noise-induced hearing loss in Chinese population / S. L. Wang, L. G. Yu, R. P. Liu [et al.] // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2015. – V. 27, N. 12. – P. 965-968.
- <sup>29</sup>. Primo-Parmo, S. L. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family / S. L. Primo-Parmo, R. C. Sorenson, J. Teiber [et al.] // *Genomics*. – 1996. – V. 1, N. 33. – P. 498-507.
- <sup>30</sup>. Fortunato, G. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss / G. Fortunato, E. Marciano, F. Zarrilli [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2004. – V. 50, N. 11. – P. 2012-2018.
- <sup>31</sup>. Zheng, G. Cell-cell junctions: a target of acoustic overstimulation in the sensory epithelium of the cochlea / G. Zheng, B. H. Hu // *BMC Neuroscience*. – 2014. – V. 13, N.1. – P. 71.
- <sup>32</sup>. Van Laer, L. The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss / L. Van Laer, P. I. Carlsson, N. Ottschytsch [et al.] // *Human Mutation*. – 2006. – V. 27, N. 8. – P.786-795.
- <sup>33</sup>. Pawelczyk, M. Analysis of gene polymorphisms associated with K<sup>+</sup> ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss / M.

Pawelczyk, L. Van Laer, E. Fransen [et al.] // *Annals of Human Genetics*. – 2009. – V. 73, N. 4. – P. 411-421.

<sup>34</sup>. Abreu-Silva, R. S. The search of genetic basis for noise-induced hearing loss (NIHL) / R. S. Abreu-Silva, D. Rincon, A. R. Horimoto [et al.] // *Annals of Human Biology*. – 2015. – V. 38, N. 2. – P. 210-218.

<sup>35</sup>. Sakaguchi, H. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss / H. Sakaguchi, J. Tokita, U. Müller [et al.] // *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery*. – 2015. – V. 17, N. 5. – P. 388-393.

<sup>36</sup>. Konings, A. Candidate gene association study for noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations / A. Konings, L. Van Laer, A. Wiktorrek-Smagur [et al.] // *Ann. Hum. Genet.* – 2009. – V. 73, N. 2. – P. 215-224.

<sup>37</sup>. Zhang, X. Genetic variations in protocadherin 15 and their interactions with noise exposure associated with noise-induced hearing loss in Chinese population / X. Zhang, Y. Liu, L. Zhang [et al.] // *Environmental Research*. – 2014. – V. 135. – P. 247-252.

<sup>38</sup>. Lim, H. H. Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat Cochlea / H. H. Lim, O. H. Jenkins, M. W. Myers [et al.] // *Hearing Research*. – 1993. – V. 69 (1-2), P. 146-150.

<sup>39</sup>. Yoshida, N. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice / N. Yoshida, A. Kristiansen, M. C. Liberman // *Journal of Neuroscience*. – 1999. – V. 19, N. 22. – P. 10116-10124.

<sup>40</sup>. Altschuler, R. A. Stress pathways in the rat cochlea and potential for protection from acquired deafness // R. A. Altschuler, D. Fairfield, Y. Cho [et al.] // *Audiology and Neuro-Otology*. – 2002. – V. 7, N. 3. – P. 152-156.


<sup>41</sup>. Konings, A. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations / A. Konings, L. Van Laer, S. Michel [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2009. – V. 17, N. 3. – P. 329–335.

<sup>42</sup>. Zhang, X. Associations of genetic variations in EYA4, GRHL2 and DFNA5 with noise-induced hearing loss in Chinese population: a case-control study / X. Zhang, Y. Liu, L. Zhang [et al.] // *Environm. Health*. – 2015. – V. 14, N. 1. – P. 77.

<sup>43</sup>. Grondin, Y. Genetic polymorphisms associated with hearing threshold shift in subjects during first encounter with occupational impulse noise / Y. Grondin, M. E. Bortoni, R. Sepulveda [et al.] // PLoS ONE. –2015. – V. 10, N. 6. –P. 22.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

 заведующий кафедрой  
Е. И. Шишацкая

« 6 » июня 2019 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Выявление полиморфизмов в генах CAT, PON2, NCL, HSPA1L,  
PCDH15, и их ассоциаций с риском развития профессиональной  
нейросенсорной тугоухости

Руководитель



профессор, д.б.н.

Л. А. Франк

Выпускник

А. Д. Юшкова