

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_      \_\_\_\_\_  
подпись      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01.08 – Биология

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов rs4915154 (A138G) и  
rs17612648 (C77G) в гене RTPRC и полиморфизма rs2476601  
s2476601(C1858T) в гене RTPN22 и их ассоциации с угрозой развития  
миастении

Руководитель \_\_\_\_\_ д.б.н.  
подпись, дата

Л.А. Франк

Выпускник \_\_\_\_\_ К.А. Барина  
подпись, дата

Красноярск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	5
1 Обзор литературы .....	5
1.1 Миастения .....	5
1.1.1 Общее понятие о заболевании .....	5
1.1.2 Эпидемиологические и клинические особенности миастении на территории Красноярского края.....	7
1.2 Исследуемые полиморфизмы. Описание и их ассоциация с развитием заболевания .....	9
1.2.1 Полиморфизмы гена RTPRC (C77G и A138G) .....	9
1.2.2 Полиморфизм гена RTPN22 (C1858T) .....	10
1.3 Целентеразин-зависимые люциферазы и фотопротеины .....	11
1.4 Цветные варианты $Ca^{2+}$ - регулируемого фотопротеина обелина и двойной анализ на их основе .....	12
2 Материалы и методы .....	15
2.1 Вещества и реактивы .....	15
2.2 Буферные растворы и среды .....	15
2.3 Выделение и очистка фотопротеинов.....	16
2.3.1 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> BL21(DE3) CodonPlus (RIPL) и их трансформация плазмидной ДНК .....	16
2.3.2 Культивирование клеток <i>E. coli</i> .....	16
2.3.3 Выделение и очистка белков .....	17
2.4 Химический синтез конъюгатов фотопротеинов с другими белками или олигонуклеотидами.....	18
2.5 Выделение геномной ДНК .....	18
2.6 Одновременный билюминесцентный анализ двух аллелей в одной лунке для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов .....	18
2.6.1 ПЦР-амплификация фрагмента гена RTPN22 .....	18
2.6.2 Мультиплексная ПЦР для амплификации 2 разных участков гена RTPRC .....	19

2.7 Реакция удлинения аллель-специфического праймера (PEXT — реакция)	19
2.8 Билюминесцентный анализ продуктов PEXT реакции	20
2.9 Статистическая обработка результатов генотипирования полиморфизмов генов RTPN22 и RTPRC	21
3 Результаты и обсуждение	22
3.1 Получение мутантных вариантов Ca <sup>2+</sup> -регулируемого фотопротеина обелина для сайт-специфического конъюгирования	22
3.2 Одновременный билюминесцентный анализ по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов	24
3.3 Исследование однонуклеотидных полиморфизмов 3.3.1	
Характеристика исследуемой группы	25
3.3.1 Характеристика исследуемой группы	27
3.3.2 Билюминесцентный анализ полиморфизмов	28
3.3.3 Ассоциация вариантов генов RTPRC и RTPN22 с миастенией	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
ВЫВОДЫ	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	34

## ВВЕДЕНИЕ

Ранее в лаборатории фотобиологии ИФБ СО РАН был разработан способ одновременного выявления аллельных вариантов полиморфизма rs6025 гена пятого коагуляционного фактора (FV) с использованием твердофазного билюминесцентного анализа [1]. Метод основан на реакции ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера (Primer Extension Reaction, ПЕРТ-реакция) и последующем анализе продуктов реакции с использованием цветных вариантов фотопротеина обелина в качестве репортеров. Была показана конкурентоспособность данного метода с методом ПЦР в реальном времени по способности выявлять аллельные варианты и параметрам экономической эффективности. Простота и доступность метода обуславливают перспективность его применения в различных исследованиях: для масштабного скрининга при изучении распространенности тех или иных мутаций в определенном географическом регионе или для определения клинической значимости данной мутации и других [2].

В настоящей работе представлены результаты определения полиморфизмов A138G rs4915154 и C77G rs17612648 в гене RTPRC и полиморфизма C1858T rs2476601 в гене RTPN22, ассоциированных с риском развития миастении, билюминесцентным анализом.

**Целью** данной работы являлось генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов rs4915154(A138G), rs17612648 (C77G) в гене RTPRC и полиморфизма rs2476601(C1858T) в гене RTPN22 билюминесцентным методом и изучение их ассоциации с угрозой развития миастении.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить мутантные варианты цветных обелинови их конъюгаты с биоспецифическими молекулами.
2. Описать исследуемые группы: из пациентов с подтвержденным диагнозом миастении и контрольную группу здоровых доноров, не имеющих данного заболевания.
3. Провести билюминесцентный анализ по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов A138G rs4915154 и C77G rs17612648 в гене RTPRC и полиморфизма C1858T rs2476601 в гене RTPN22 в обеих группах.
4. Провести статистический анализ полученных результатов.

# ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Миастения

#### 1.1.1 Общее понятие о заболевании

Миастения – аутоиммунное заболевание со сложным патофизиологическим механизмом поражения структур нервно-мышечного аппарата. В основе развития болезни лежит выработка антител, преимущественно к ацетилхолиновым рецепторам постсинаптической мембраны, что сопровождается нарушением нервно-мышечной передачи. Главной клинической особенностью миастении является прогрессирующая слабость и патологическая утомляемость различных мышечных групп [3].

Обнаружены два механизма развития заболевания:

- изменение функции гипоталамуса с вторичным вовлечением в процесс вилочковой железы (тимуса) и, как следствие, биохимические сдвиги в области мионевральных синапсов;
- снижение синтеза ацетилхолина и повышение активности холинэстеразы из-за аутоиммунного поражения вилочковой железы с нарушением нервно-мышечной передачи.

Пусковыми факторами заболевания могут служить простудные заболевания, стресс, нарушение иммунных функций организма, что приводит к образованию антител к собственным клеткам, а именно против ацетилхолиновых рецепторов постсинаптической мембраны нервно – мышечных соединений (синапсов). В норме эти синапсы передают импульс от нерва к мышце путем биохимических реакций с участием медиатора ацетилхолина.

При возбуждении ацетилхолин через пресинаптическую мембрану поступает в синаптическую щель и взаимодействует с холинорецепторами постсинаптической мембраны (мышечной), вызывая ее возбуждение. Фермент ацетилхолинэстераза разрушает медиатор, тем самым ограничивая срок его действия. При миастении этот сложный механизм нарушается. На концах синапсов вырабатывается мало ацетилхолина или он усиленно разрушается холинэстеразой, а в результате проведение нервного импульса становится невозможным, так как синапс блокируется.

В нервно-мышечных синапсах ацетилхолинэстераза присутствует в виде тетрамера изоформы Т, присоединённого к коллагеноподобному белку, который кодируется отдельным геном COLQ. Мутация этого гена является одной из возможных причин наследственной миастении. Также особое

внимание уделяется изучению различных мутаций субъединиц никотинового рецептора ацетилхолина [4].

Неоспоримые фактические данные указывают на участие дисфункции вилочковой железы (ВЖ) в патогенезе миастении, при этом ее изменения неоднозначны и довольно гетерогенны. Патологию ВЖ обнаруживают у 70–90 % больных миастенией. В.П. Харченко с соавторами (1998) указывают, что из 2000 больных генерализованной миастенией патологические изменения ВЖ обнаружены у всех, из них неопухолевые – у 87,3 %, опухоли – у 12,7 %. Среди больных с тимомой 24–40 % страдают миастенией.

Основные симптомы миастении – слабость поперечно-полосатых мышц, часто непостоянная и повышенная утомляемость. Мышечная слабость варьиабельна как по степени, так и по ее локализации.

Выделяют три формы миастении: глазная; бульбарная; генерализованная.

Первыми чаще поражаются мышцы, иннервируемые черепно – мозговыми нервами. Развитие заболевания приводит к поражению мышц шеи, в меньшей степени мышц туловища и конечностей. Первыми признаками заболевания является опущение верхнего века и диплопия (раздвоение), которые возникают при поражении наружных мышц глазного яблока, мышцы, поднимающей верхнее веко, и круговой мышцы глаза, также может наблюдаться косоглазие, ограничение подвижности глазных яблок. После сна больной может открыть глаз полностью и свободно, но дальнейшее моргание приводит к ослаблению мышцы и веко просто «свисает». Такая форма называется глазной.

При бульбарной форме поражаются мышцы, иннервируемые бульбарной группой нервов. При этом наблюдается попадание пищи в нос и затруднение глотания. Изменяется речь – становится гнусавой, осипшей, тихой, хриплой, наблюдается истощение голоса вплоть до беззвучной речи.

При генерализованной форме (наиболее частой) процесс начинается с глазодвигательных мышц, далее в него вовлекаются все мышцы. Первыми страдают мимические мышцы и мышцы шеи. Больной с трудом удерживает голову. Возникает характерное выражение лица с поперечной улыбкой и глубокими морщинами на лбу. Появляется слюнотечение. В дальнейшем присоединяется слабость мышц конечностей. Больной плохо ходит и не может себя обслуживать. Со временем мышцы атрофируются. В большей степени поражаются проксимальные отделы – плечи и бедра. Сухожильные рефлексы быстро истощаются и восстанавливаются после отдыха.

Степень поражения варьирует даже у одного больного. Основными симптомами, угрожающими жизни больного, считаются слабость мышц гортани и дыхательных мышц. Осложнения миастении – миастенический криз. Миастенический криз – это внезапный приступ резкой слабости

дыхательных и глоточных мышц – нарушение дыхания (частое, свистящее), учащение пульса, слюнотечение. Предвестники криза – тахикардия, беспокойство, бессонница, быстро нарастающая слабость мышц туловища и конечностей, дыхательной и бульбарной мускулатуры либо тотально, либо по частям. Длительность кризов – от нескольких часов до 5 суток.

Диагноз миастении основывается на данных обследования больных по характерной клинической картине, данных электромиографического исследования, а также данных стандартного фармакологического теста с введением антихолинэстеразных препаратов (прозерин 0,05% 1 мл в/м) и иммунологического теста – определение титра антител к ацетилхолиновым рецепторам. Одним из важных методов диагностики является исследование состояния тимуса, как правило, рентгенологическими методами – компьютерная томография средостения, МРТ. Чувствительность КТ либо МРТ средостения при миастении составляет 95,7 %.

Средств и препаратов для лечения миастении много. Все они обладают недостатками и побочными эффектами. Результаты лечения во многом зависят от своевременности его начала. Основными лекарствами при заболевании являются антихолинэстеразные препараты. Для усиления их действия применяют соли калия, в тяжелых случаях используют гормонотерапию и цитостатики.

До введения в практику лечения миастении антихолинэстеразными препаратами (АХЭП), т.е. до 1934 г., от 80 до 90 % больных погибали в первые 2 года от начала заболевания. Общая смертность от миастении до применения АХЭП была порядка 40 %. Патогенез миастении тесно связан с дисфункцией вилочковой железы, в связи с этим тимэктомия занимает ведущее место и является основным патогенетически обоснованным методом в комплексном лечении больных миастенией независимо от характера морфологических изменений в вилочковой железе. Своевременно выполненная тимэктомия приводит к улучшению у 93,5 % детей и 82,4 % взрослых. Операцию выполняют не только при тяжелом осложненном течении, но и в начальных стадиях – до развития тяжелых осложнений и генерализации процесса. [5,6].

### **1.1.2 Эпидемиологические и клинические особенности миастении на территории Красноярского края**

Значительный интерес исследователей привлекает изучение эпидемиологических особенностей миастении. Большинство авторов отмечают рост числа пациентов с данной патологией в различных регионах. Так, за последние полвека заболеваемость миастенией возросла с 3,1 до 15–24 на 100 тыс. населения [7]. Наиболее изучены эпидемиологические особенности миастении в Беларуси, Италии, Сербии, Дании, Великобритании, Ирландии, Швеции, Китае, Японии, США, где

распространенность заболевания варьирует до 24 на 100 тыс. населения [8]. В России наиболее изучена эпидемиологическая ситуация в тех регионах, где созданы миастенические центры и ведутся регистры пациентов с данным заболеванием. Известно, что миастения носит преимущественно прогрессирующий характер течения: примерно в 85 % случаев в первые 3 года от дебюта глазной формы миастении присоединяются симптомы поражения бульбарных мышц и мышц конечностей [9]. Наиболее грозное осложнение заболевания – миастенический криз, частота развития которого может составлять до 20–30 %, чаще у пациентов с тимомой [10]. Красноярский край является одним из крупнейших регионов России. Согласно данным Росстата на 01.01.2016 численность населения Красноярского края в 2015 г. составила 2865908 человек. Большая площадь (до 2366797 км<sup>2</sup>) и протяженность (до 3000 км) региона, низкая плотность населения (1,2 чел/км<sup>2</sup>) создают проблемы по организации своевременного оказания медицинской помощи пациентам с различными заболеваниями, в том числе с миастенией.

По данным Красноярского краевого медицинского информационного аналитического центра за 2015 г., на территории Красноярского края зарегистрировано 314 пациентов с установленным диагнозом миастении, из них 284 пациента в возрасте старше 18 лет, у 26 заболевание дебютировало до 14 лет, у 4 – в возрасте 15–18 лет. В 2015 г. на территории края зарегистрирован 31 случай дебюта заболевания. На базе Краевой клинической больницы г. Красноярска за период с 2012 по 2015 г. с диагнозом аутоиммунной миастении под наблюдением находились 87 больных, что составляет 27,7% от общего числа пациентов с данной патологией в регионе. Средний возраст пациентов в обследуемой группе было 45,4 года (стандартное отклонение (СО) 4,5 года). Число женщин, находящихся на активном динамическом наблюдении, в 3 раза больше, чем мужчин (75,86 % против 24,14 %). Возраст пациентов на момент клинической манифестации миастении составил  $39,9 \pm 3,09$  года. Дебют клинических проявлений миастении у женщин регистрировался в среднем в  $38,8 \pm 2,96$  года, что было на 3 года раньше, чем у мужчин, –  $42,3 \pm 3,21$  года. Период с момента появления первых симптомов до установления диагноза миастении нередко составлял от нескольких месяцев до нескольких лет, в среднем около  $1,4 \pm 0,2$  года.

В клинической структуре болезни преобладала (75,80 %) генерализованная форма, выявленная у всех больных в возрасте до 20 лет, у 30 (88,20 %) из 34 пациентов в возрасте 20–40 лет, у 14 (60,90 %) из 23 больных в возрасте 40–60 лет и у 18 (66,67 %) из 27 пациентов старше 60 лет. Глазная форма отмечена у 10 (11,50 %) из 87 больных. Инвалидность по миастении имели 12 (13,84 %) пациентов. Тимомаассоциированная миастения наблюдалась у 5-й части ( $n = 18$  (20,69 %)) больных. Тимому чаще выявляли у пациентов молодого возраста с генерализованной формой заболевания.



Показатель распространенности миастении в Красноярском крае составляет 10,98 на 100 тыс. населения, что превышает аналогичные данные по Московской и Самарской областям, Республике Коми, в ряде стран ближнего и дальнего зарубежья. Более высокие, чем в Красноярском крае, показатели распространенности миастении опубликованы в работах американских и итальянских авторов. Миастения у пациентов Красноярского края наблюдается преимущественно у лиц активного, трудоспособного возраста, причем у женщин средний возраст дебюта в среднем на 3,5 года меньше, чем у мужчин [11].

## **1.2 Исследуемые полиморфизмы. Описание и их ассоциация с развитием заболевания**

В последние годы широкомасштабные исследования генома неоднократно выявляли кандидаты белковых тирозиновых фосфатаз, которые ассоциируются с аутоиммунными болезнями. К ним относятся RTPN2, RTPRC, UBASH3A, RTPN11, RTPRT и RTPN22, указывающие на дисрегуляцию белкового тирозин фосфорилирования, как важнейшего аспекта иммунопатологии.

### **1.2.1 Полиморфизмы гена RTPRC (C77G и A138G)**

Тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа — фермент, который кодируется у человека геном RTPRC. Альтернативными названиями данного фермента являются дифференцировочный антиген CD45 и LCA (общий лейкоцитарный антиген).

Данный белок является членом семейства тирозиновых протеинфосфатаз (РТР), являющихся компонентами сигнальных путей клетки, регулирующих рост, дифференцировку, митотический цикл и злокачественное перерождение клетки. Молекула состоит из внеклеточного домена, одиночного трансмембранного сегмента и двух цитоплазматических каталитических доменов. Рецепторная тирозиновая протеинфосфатаза, RTPRC связывает лиганд во внеклеточном пространстве и передаёт сигнал об этом внутрь клетки за счёт дефосфорилирования мишеней в цитоплазме. Данный ген специфически экспрессируется в гемопоэтических клетках.

Данная фосфатаза является важнейшим регулятором передачи сигнала от Т- и В-клеточных рецепторов антигена. Она может взаимодействовать с компонентами рецепторов антигена напрямую, а также активировать киназы Src-семейства, необходимые для передачи сигнала от данных рецепторов. CD45 также подавляет JAK-киназы, и, таким образом, выступает в качестве негативного регулятора передачи сигнала от рецепторов цитокинов. мРНК RTPRC подвергается альтернативному сплайсингу, в результате чего синтезируются несколько изоформ белка [12].

CD45 имеет решающее значение для передачи сигналов лимфоцитов. Два полиморфизма (C77G и A138G), которые изменяют экспрессию изоформы CD45, связаны с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями [13]. Полиморфизмы A138G и C77G локализованы на хромосоме 1q31.3-q32.1 (1:198702524 и 1:198696788 соответственно). Общий антиген CD45 лейкоцитов, кодируемый геном PTPRC, необходим для нормальной функции лимфоцитов, а его отсутствие является причиной тяжелого комбинированного иммунодефицита [14]. CD45 подвергается сложному альтернативному сплайсингу экзонов 4, 5 и 6. Полиморфизмы в PTPRC, которые влияют на альтернативный сплайсинг CD45, связаны с инфекционными и аутоиммунными заболеваниями [15]. Два наилучше описанных генетических варианта человека, в экзонах 4 и 6, влияют на сплайсинг и имеют противоположное географическое распределение, фенотипы и ассоциации болезней. Полиморфизм экзона 6 A138G (rs4915154 A191T) присутствует примерно у 20% восточноазиатских популяций, способствует сплайсингу низкомолекулярных изоформ (CD45R0) и связан с защитой от болезни Грейвса, диабета 1 типа и гепатита В и С [16]. Напротив, вариант экзона 4 C77G (rs17612648 P57P) приходится примерно на 2% популяций европейского происхождения и предотвращает сплайсинг изоформы CD45R0. Также известно корреляции 77G индивидуумов в отношении ВИЧ, рассеянного склероза, аутоиммунного гепатита и системного склероза. PTPRC является относительно большим геном (118,1 kb), более 10 лет назад он был исследован в рамках проекта Международной карты гаплотипа (HapMap) [17].

### **1.2.2 Полиморфизм гена PTPN22 (C1858T)**

Лимфоидная белковая тирозинфосфатаза (Lyp) кодируется локусом PTPN22 на хромосоме 1p13.3-13.1 (1:113834946), она экспрессируется исключительно в иммунных клетках.

Данная фосфатаза рецепторная и участвует в активации и дифференцировке Т-лимфоцитов. При этом она осуществляет отрицательную регуляцию передачи сигнала на Т-клеточный рецептор. То есть данная фосфатаза приводит к ингибированию активации Т-клеток. А мутация C1858T гена, кодирующего белок, приводит к тому, что фосфатаза становится еще активнее, и еще сильнее ингибирует активацию Т-лимфоцитов. По какому механизму развивается заболевание не ясно, есть предположение, что мутантная фосфатаза с улучшенной функциональностью вызывает изменения в регуляторных Т-клетках [18].

Однонуклеотидный полиморфизм в PTPN22 был зарегистрирован как локус аутоиммунной восприимчивости, который ассоциируется со многими аутоиммунными заболеваниями (диабет типа 1, ревматоидный артрит, системную красную волчанку и болезнь Грейвса), в том числе и миастенией Гравис [19]. Точечная мутация, меняющая цитозин на тимин в положении

1858 в кодирующей области гена RPN22, приводит к однократному изменению аминокислоты аргинина в триптофан на кодоне 620 в экзоне 14.[20].

Мутантный T аллель не одинаково распределен в разных европейских популяциях, его частота уменьшается с Северной до Южной Европы, достигая наиболее высокой частоты у финнов (15,5%) и украинского (14,1%) населения и более низкой (2-3%) у итальянцев и сардинцев. Частота T-аллеля у американских и австралийских белых людей с предками –выходцами из Европы составляет 6-9%. Кроме того, этот SNP не обнаружен в Африке и Азии.[21]

Исследования показали, что носители C1858T могут быть защищены от туберкулеза [22]. C1858T является фактором риска развития инвазивной пневмококковой болезни, что указывает на то, что RPN22 является геном восприимчивости к аутоиммунитету и некоторым инфекциям [23]. Другие исследования, изучающие участие C1858T в защите от инфекции Гепатита С [24], инфицировании *Trypanosoma Cruzi*[25] и бруцеллезе [26], не выявили различий между контрольными группами и носителями C1858T.

### **1.3 Целентеразин-зависимые люциферазы и фотопротейны**

Люциферазы - это ферменты, которые катализируют окисление субстрата (люциферина) молекулярным кислородом. Продукт реакции представляет собой окисленное или чащедекарбоксилированное производное субстрата в его возбужденном состоянии, которое переходит в основное состояние с испусканием энергии в виде видимого света. Комплекс люцифераза-люциферин является ключевой частью билюминесцентных систем, которые в зависимости от происхождения организма существенно различаются: светлячки, бактерии, кишечнорастворимые и т. д. В наши дни наиболее известными светящимися организмами являются обитатели океана: коралловые полипы, копеподы, гребневики, медузы, кальмары, гидроиды, креветки и др. [27]. Билюминесцентные системы многих из вышеупомянутых организмов содержат люциферазы разных типов, но одну и ту же молекулу люциферина - целентеразин (CTZ).

В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН на протяжении более 25 лет проводятся исследования целентеразин-зависимых билюминесцентных систем гидроидов *Obelia longissima*, медуз *Obelia geniculata* и *Clytia gregaria*, мягких кораллов *Renilla muelleri*, копепод *Metridia longa* и других светящихся организмов. Помимо фундаментальных исследований, были предприняты значительные усилия в отношении аналитических приложений *in vitro*. [28,29,30] Важным моментом здесь является то, что высокий квантовый выход реакций, катализируемых люциферазами, и высокое отношение сигнала к шуму обеспечивают высокую чувствительность анализов на основе этих ферментов в качестве репортеров.

Применение люциферазы в биоанализе требует термостабильности, определенных спектральных и кинетических характеристик биолюминесценции, устойчивости к химическим модификациям и так далее, то есть свойств, часто не присущих люциферазам дикого типа. С использованием методов генетической инженерии было получено несколько вариантов ферментов с уникальными полезными свойствами.

Целентеразин-зависимые люциферазы - относительно небольшие (16-36 кДа) одноцепочечные полипептиды. Существует два типа биолюминесцентных систем: 1) люциферазы, катализирующие декарбоксилирование CTZ в соответствии с классической фермент-субстратной кинетикой и 2) фотопротеины, с протекающей в два этапа биолюминесцентной реакцией.

Фотопротеины представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина (одноцепочечного полипептида с молекулярной массой около 20 кДа) и молекулы 2-гидропероксицелентеразина, которая прочно, но нековалентно иммобилизована в гидрофобной полости белка.

Полипептидная цепь фотопротеинов содержит три  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих сайты EF-типа. Биолюминесцентная реакция фотопротеинов происходит только при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$ , конечными продуктами реакции являются  $\text{CO}_2$  и целентерамид, иммобилизованный внутри апобелка с присоединенными ионами кальция и квант света.

Таким образом, в отличие от люцифераз, биолюминесценция фотопротеинов не зависит от кислорода и происходит как одна вспышка. Поскольку фотопротеин непосредственно участвует в реакции, количество свечения всегда пропорционально его содержанию (при насыщающей концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ ) [31].

#### **1.4 Цветные варианты $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротеина обелина и двойной анализ на их основе**

Обелин морских светящихся гидроидов *Obelia longissima* является типичным представителем  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков и содержит в своей структуре три EF-сайта. Обелин представляет собой удобную биолюминесцентную метку при разработке тестовых систем для иммуноферментного анализа и обладает стабильностью, доступностью, высокой чувствительностью регистрации, низким уровнем фонового шума.

В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН ген, кодирующий апообелин, клонировали и экспрессировали в клетках *E. coli*. Апообелин легко «заряжается» химически синтезированным целентеразином при восстановительных и  $\text{Ca}^{2+}$  - свободных условиях. Таким образом, имеется практически неограниченный источник высоко очищенного рекомбинантного обелина [32]. Показано, что обелин устойчив к химическим модификациям, а его конъюгаты с биоспецифическими молекулами -

иммуноглобулинами, гаптенами, олигонуклеотидами и т. д. - были получены и успешно применены в качестве меток в анализе определенных мишеней[33].

Пространственная структура белка была решена и опубликована в 2000 году [34]. Спектр биолюминесценции обелинов дикого типа (OL-WT) широк: с максимумом при 485 нм и плечом при 380 нм. Это означает, что продукт реакции - целентерамид в возбужденном состоянии образует несколько структур различной энергии[35].

Замена аминокислот в СТЗ-связывающей полости, влияющих на ее полярность и водородную связь, может привести к образованию преобладающей структуры, которая изменяет спектр биолюминесценции мутанта. Например, единственный обмен W92 → F привел к появлению новой полосы с  $\lambda_{\max} = 390$  нм с интенсивностью, подобной интенсивности полосы на 485 нм. Кроме того, OL-W92F имеет более быструю биолюминесцентную кинетику по сравнению с OL-WT. С помощью сайт-направленного мутагенеза была получена большая группа мутантных вариантов OL с измененными спектрами и кинетикой биолюминесценции. В поисках вариантов обелина, подходящих для аналитических приложений, обнаружили два стабильных и активных мутанта: OL-W92F, H22E, излучающий быстрый ( $k_d = 0,6 \text{ c}^{-1}$ ) сдвинутый в фиолетовую область сигнал ( $\lambda_{\max} = 387$  нм) и OL-Y138F с медленным ( $k_d = 6,1 \text{ c}^{-1}$ ) зеленым сигналом ( $\lambda_{\max} = 493$  нм).

Значительные различия в характеристиках сигналов биолюминесценции позволяют отделить их с помощью широкополосных оптических фильтров и временного разделения. Этот подход был успешно применен для одновременного обнаружения в клинических образцах сыворотки двух гонадотропных гормонов - лютеинизирующего (hLH) и фолликулостимулирующего (hFSH), а также для определения тотального и макромолекулярного пролактинов [36]. Этот подход оказался полезным для крупномасштабных исследований, обеспечивающих быстрый и чувствительный двухцелевой анализ, в котором отсутствуют недостатки отдельного определения, не говоря уже о затратах и экономии рабочей силы.

Особый интерес представляет метод, разработанный для идентификации однонуклеотидных полиморфизмов на основе реакции удлинения праймера (PEXT) со следующим двойным биолюминесцентным твердофазным микроанализом[37,38]. Он включает в себя четыре стадии:

- 1) Синтез фрагментов ДНК, фланкирующий полиморфный сайт (матрица) с помощью полимеразной цепной реакции.

- 2) Реакция PEXT с использованием двух праймеров, имеющих 3'-концевой нуклеотид, комплементарный нормальному (N), либо мутантному (M) аллелю. Один праймер (обычно N) помечен 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM), другой - олигоденилатом  $(dA)_{27}$ . В случае полной

комплементарности матрицы и праймера последний удлиняется ДНК-полимеразой. Реакционная смесь содержит биотинилированный дезоксиуридинтрифосфат (B-dUTP) вместо тимидинтрифосфата (TTP), обеспечивающий включение остатков биотина в полученные удлиненные продукты.

3) Биоломинесцентный твердофазный микроанализ продуктов РEXТ реакции. Биотинилированные ампликоны иммобилизуют на активированной стрептавидином поверхности непрозрачного микротитрационного планшета. Конъюгаты OL-Y138-анти-FAM IgG и OL-W92F, H22E- (dT)<sub>30</sub> связываются с аллель специфическими праймерами, имеющими на 5'-конце соответствующие метки, а их биоломинесцентные сигналы измеряются.

4) Генотип каждого образца определяется как отношение величины зеленого биоломинесцентного сигнала к фиолетовому (фактор дискриминации, D) [39].

## 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.

Образцы крови здоровых доноров были предоставлены Красноярским краевым центром крови № 1. Образцы крови пациентов с диагнозом миастения предоставлены Красноярским государственным медицинским университетом им. В.Ф. Войно - Ясенецкого, кафедра нервных болезней с курсом медицинской реабилитации ПО. 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), агар бактериологический (ДИАМ, Россия), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия), дитиотреитол (GERBU Biotechnik GmbH, Германия), агароза LE, Бис-Трис пропан, изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М, Россия), Трис, мочевиная, кальций хлорид (Sigma-Aldrich, США), ЭДТА-натриевая соль, диметилсульфоксид, синтетический целентеразин (Prolume Ltd. Pinetop, США), 2-иминотиолан (MP Biomedicals, США), SMCC (ThermoScientific, США). Стрептавидин, антитела к 6-карбоксихлорофлуоресцеину (Abcam, Великобритания), бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США).

Использованные в работе олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Биосан» (Новосибирск, Россия). Для электрофореза белков использовали акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), персульфат аммония (Bio-Rad, США), додецилсульфат натрия, ТЕМЕД (Helicon, Россия), стандартные смеси белков для электрофореза (ThermoFisherScientific, США). Остальные реактивы относились к категории ЧДА или ХЧ, если не указано иное.

### 2.2 Буферные растворы и среды

Состав используемых буферных растворов и сред представлен в таблице 1.

Таблица 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 мМКCl, 10 мМ MgSO <sub>4</sub> , 10 мМ MgCl <sub>2</sub> pH 7,0
SOC-среда	SOB + 20 мМ глюкозы
A буфер	M мочевины, 20 мМТрис-HCl, 5 мМ CaCl <sub>2</sub>
TFB буфер	0,1 М KCl, 10 мМ CaCl <sub>2</sub> , 45 мМ MnCl <sub>2</sub> , 10 мМ K MesрН 6,2, 3 мМCo(NH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub>
TE буфер	20 мМТрис-HClрН 7,0, 5 мМ ЭДТА
PBS	0,1 М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,15 МNaCl
Гибридизационный буфер	0,1 М малеиминовая кислота, 1% БСА, 5 мМ ЭДТА, рН 7,5
Буфер для разведения меток	20 мМТрис-HClрН 7,0, 5 мМ ЭДТА, 0,1% BSA, 0,1 М NaCl
Кальциевый буфер	0,1 М Трис-HClрН 8,8,0,1 М CaCl <sub>2</sub>
Промывочный буфер	5 мМ ЭДТА, PBS, 0,1% Tween20

## 2.3Выделение и очистка фотопротеинов

### 2.3.1 Приготовление компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus (RIPL) и их трансформация плазмидной ДНК

Компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus (RIPL) готовили стандартным методом, используя TFB буфер. 50μлсуспензии компетентных клеток и 1 μлраствора плазмидной ДНКинкубировали при 0°C в течение 30 мин. Затем провели процедуру «теплового шока»: смесь выдержали при 42°C в течение 25 сек. Затем клетки снова переносили в лёд, добавляли 450 μл питательной SOC-среды и инкубировали 1 час при 37°C. 250μл суспензии с полученными клетками высевалина LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл),растирали стерильной петлей и растили ночь при 37°C.

### 2.3.2Культивирование клеток *E. coli*

Индивидуальную колонию штамма *E. coli*BL21-CodonPlus (DE3) – RIPL, содержащую целевую плазмиду, инкубировали в LB среде с добавлением ампициллина (200 мг/мл),при постоянном перемешивании 37°C до плотности OD<sub>590</sub> = 0,6-0,8. Для индукции лактозного оперона добавлялиИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) в культуральную среду в концентрации 1 мМ, затем культивировали в течение 3-х часов и центрифугированием (5000 g, 20 мин) осаждали клетки. Полученную клеточную пасту использовали для выделения апофотопротеинов, супернатант отбрасывали.



### 2.3.3 Выделение и очистка белков

Выделение и очистку из телец включений белка проводили по методу, разработанному ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН для рекомбинантного апообелина дикого типа [40], используя небольшие модификации. Клеточный осадок ресуспендировали в пятикратном объеме буфера Т, далее разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 («Techpan», Польша) шестикратно (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, содержащем 0,9% NaCl, а затем с добавлением 0,1% Тритона X-100 и на завершающем этапе с добавлением 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, отделяя осадок, основным компонентом которого являются тельца включения, после каждой промывки центрифугированием (8000 g, 5 мин).

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

Хроматографическую очистку проводили на колонке HiTrap DEAE FF, заполненной DEAE Sepharose FastFlow (GE Healthcare), используя хроматографическую систему Bio-Rad. Элюцию белков с колонки проводили градиентом концентрации ацетата натрия (0-0,5 М) в буфере А со скоростью 1,8 мл/мин.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрическим методом при помощи набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США) по готовому протоколу производителя. В качестве калибровочного белка применяли бычий сывороточный альбумин.

Активацию апофотопротеинов проводили избытком целентеразина (1,2-кратным молярным) в буфере TE с добавлением 10 мМ ДТТ в течение ночи при 4°C. Активированные фотопротеины отделяли от незаряженного апобелка ионообменной хроматографией на колонке Mono Q 5/50 GL (хроматографическая система АКТА purifier, GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,35 М) в буфере TE 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 [41].

Биолюминесцентный сигнал фотопротеинов измеряли с помощью кюветного люминометра (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск). Одна люминесцентная единица равна 107 фотонов в секунду. С помощью самописца регистрировали сигнал (модель 2210, ЛКВ, Швеция). Измерения проводили в растворе, содержащем 0,1 М Трис-HCl pH 8,8, 10 мМ ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера. Используемые в работе значения представляют собой среднее от трех и более измерений.

## **2.4 Химический синтез конъюгатов фотопротеинов с другими белками или олигонуклеотидами**

Конъюгаты мутантных форм обелина с иммуноглобулином, получали по методу, разработанному для получения конъюгатов обелина дикого типа [42]. Конъюгаты обелина с олиготимидилатом, несущим аминоксаметильную группу 5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-p-T<sub>30</sub>, (NH<sub>2</sub>-dT<sub>30</sub>), получали, как описано в работе [43] с небольшими модификациями. Для конъюгирования использовали цветные варианты обелина с введенным остатком цистеина.

Иммуноглобулин модифицировали молярным избытком SMCC (70-кратным), растворенном в диметилсульфоксиде (2 ч при комнатной температуре в 50 mM VICINE pH 8,5, 5 mM ЭДТА). 5'-амино-олиготимидилат модифицировали избытком SMCC (100-кратным), растворенном в диметилсульфоксиде (в 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> при комнатной температуре 2 ч). Избытки всех реагентов отделяли гельфильтрацией на колонке HiTrapDesaltingColumns (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE.

Цистеиновые мутанты и SMCC-активированный иммуноглобулин смешивали в молярном соотношении 10:1 и инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученные конъюгаты выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE, содержащим 150 mM NaCl. SMCC-активированный олиготимидилат инкубировали с тионилированным обелином и цистеиновыми мутантами в молярном соотношении 10:1 при 4°C в течение ночи. Полученные конъюгаты выделяли, используя анион-обменную хроматографию на колонке Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,7 M) в буфере TE при скорости 1 мл/мин.

## **2.5 Выделение геномной ДНК**

ДНК выделяли набором «diaGene» (Россия) из лейкоцитов цельной крови, концентрацию выделенной ДНК определяли денситометрически по электрофореграмме в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, с использованием программного обеспечения AlphaEasy™ (AlphaInnotech Corporation, США). В качестве калибровочных маркеров использовали ДНК-маркер 1kb (СибЭнзим, Россия).

## **2.6 Одновременный биолюминесцентный анализ двух аллелей в одной лунке для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов**

### **2.6.1 ПЦР-амплификация фрагмента гена RTPN22**

Амплификацию участка гена RTPN22, содержащего полиморфный сайт C1858T(rs2476601) размером 399 п.о., проводили в смеси объемом 50 μл, содержащей 1-кратный Taq-буфер, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTP, по 0,4

μМпрямого и обратного праймеров (Таблица 2), 3 μл геномной ДНК, 2,5 ед. акт. ДНК полимеразы HotStartTaq (Евроген, Россия).

Условия ПЦР: 95°C в течение 5 мин; 30 циклов (95°C – 30 с, 68°C – 30 с, 72°C – 40 с); 72°C в течение 10 мин. ПЦР продукты анализировали по электрофореграмме в 1,7% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием, в качестве калибровочного маркера использовали ДНК-маркер 100+50 kb (СибЭнзим, Россия).

### 2.6.2 Мультиплексная ПЦР для амплификации 2 разных участков гена RTPRC

Участки ДНК гена RTPRC, содержащие полиморфные сайты A138G (rs4915154) и C77G (rs17612648) 219 п.о. и 166 п.о., соответственно амплифицировали в одной пробирке, с помощью мультиплексной ПЦР.

Амплификацию проводили в аналогичных условиях, как и для фрагмента гена RTPN22, используя две пары праймеров в конечной концентрации 0,2 μМ.

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.

ПЦР продукты анализировали по электрофореграммам в 1,7 % агарозном геле, окрашивали бромистым этидием, в качестве калибровочного маркера использовали ДНК маркер 100+50 kb (СибЭнзим, Россия).

Таблица 2 — Последовательность олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для ПЦР

Полиморфизм (Ген)	Последовательность (5'→3')
C1858T, rs2476601 (RTPN22)	Up - GCCACCGCGCCCAGCCCTAC
	Dn - CATGAGCCACCATGCCCATCCC
C77G, rs 17612648 (RTPRC)	Up - GACTACAGCAAAGATGCCCAG
	Dn - CAAAGAGTCCGGGGATACTTG
A138G, rs 4915154 (RTPRC)	Up - CCTACAGACCCAGTTTCCCC
	Dn - GGGAAACCTACAATAATATCTGG

### 2.7 Реакция удлинения аллель-специфического праймера (PEXT реакция)

Полученные после амплификации ПЦР продукты без дальнейшей дополнительной очистки использовали для проведения PEXT реакции в качестве матрицы. Для каждого полиморфизма PEXT реакция проводилась с одной парой соответствующих праймеров в отдельной пробирке. Реакцию проводили в смеси объемом 20 μл, содержащей однократный буфер SNPdetect, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5-[N-(N-биотинил-ε-аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат (Bio-dUTP) (2,5 μM каждого), AGC, 1



MultimodeReader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором. За первую секунду регистрировали быстрый фиолетовый сигнал через оптический фильтр ФС6 (ЛенЗОС, Россия), поле этого в течение 5 с – медленный зеленый сигнал через светофильтр ЖС16 (ЛенЗОС, Россия). Полученные усредненные сигналы контрольных лунок вычитали от сигналов исследуемых лунок. Генотип устанавливали по значению дискриминационного фактора Д (соотношение величин зеленого и фиолетового сигналов).

## **2.9 Статистическая обработка результатов**

Данные обрабатывали при помощи программного пакета MicrosoftExcel для Windows 8.1. Статистическая обработка данных в анализеисследуемых и контрольных групп проводилась с использованием программы «Ген Эксперт» ([http://www.gen-exp.ru/calculator\\_or.php](http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php)).

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

Ассоциация между вариантами полиморфизмов и заболеванием миастенией оценивалась по отношению шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI), значения  $p$  менее 0,05 считались значимыми.

### **3 Результаты и обсуждение**

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

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krasitskaya, V. V. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay / V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank // *Analytical Methods*. – 2013. – V. 5, № 3. – P. 636-640.
2. Красицкая, В. В. Определение мутации Лейдена методом ферментативного удлинения аллель-специфичногопрайма с двойной билюминесцентнойдетекцией (PED-Биолюм) / В.В. Красицкая, Т.Н. Субботина, И.А. Ольховский, Л.А.Франк // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2013. – № 12. — С. 26, 39–41.
3. Conti-Fine, B. M. Myasthenia gravis: past, present, and future / B.M. Conti-Fine, M. Milani, H.J. Kaminski // *The Journal of clinical investigation*. – 2006. – V. 116, № 11. – P. 2843-2854.
4. Donger, C. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency / C. Donger, E. Krejci, A. P. Serradell, B. Eymard, S. Bon, S. Nicole, D. Chateau // *Hum. Genet.* — 1998. — №63. – P. 967-975.
5. Скворцов, М. Б. Миастения. Хирургическое лечение и его эффективность / Скворцов М. Б., Смолин А. И. // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. – 2012. – № 4-1. — С. 86.
6. Миастения [Электронный ресурс]: *Медицинский журнал Медикал*. – Режим доступа: <http://www.medicalj.ru/diseases/neurology/648-miastenija-simptomu-lechenie>.
7. Mantegazza, R. Myasthenia gravis (MG): epidemiological data and prognostic factors / R. Mantegazza, F. Baggi, C. Antozzi et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2003. – V. 998, № 1. – P. 413-423.
8. Carr, A. S. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis / A. S. Carr et al. // *BMC neurology*. – 2010. – V. 10, № 1. – P. 2-9.
9. Juel, V.C. Myasthenia gravis / V.C. Juel, J.M. Massey // *Orphanet J Rare Dis*. — 2007. – №2. – P. 44.
10. Щербакова, Н.И. Клинический случай миастенического криза: возможные механизмы развития, особенности клинического течения и тактика ведения / Н.И. Щербакова, Е.М. Павлова, А.Г. Санадзе // *Неврологический журнал*. — 2010. – Т. 15, № 3. – С. 35–41.
11. Гасымлы, Э. Д. Эпидемиологические и клинические особенности миастении на территории Красноярского края / Э.Д. Гасымлы, Н.В. Исаева,

С.В. Прокопенко, Ю.Н. Андон // Нервно-мышечные болезни. – 2017. – Т. 7, № 4.

12. PTPRC protein tyrosine phosphatase, receptor type C [Электронный ресурс]: The National Center for Biotechnology Information. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5788>.

13. Hennig, B. J. PTPRC (CD45) variation and disease association studied using single nucleotide polymorphism tagging / B. J. Hennig, A. E. Fry, K. Hirai, H. Tahara, A. Tamori, M. Moller, J. Hopkin, A. V. Hill // HLA. – 2008. – V. 71, № 5. – P. 458-463.

14. Hermiston, M. L. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells / M.L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss // Annual review of immunology. – 2003. – V. 21, № 1. – P. 107-137.

15. Tchilian, E. Z. Altered CD45 expression and disease / E. Z. Tchilian, P. C. L. Beverley // Trends in immunology. – 2006. – V. 27, № 3. – P. 146-153.

16. Boxall, S. Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers / S. Boxall, T. Stanton, K. Hirai et al // Human molecular genetics. – 2004. – V. 13, № 20. – P. 2377-2384.

17. Hennig, B. J. PTPRC (CD45) variation and disease association studied using single nucleotide polymorphism tagging / B. J. Hennig, A. E. Fry, K. Hirai, H. Tahara, A. Tamori, M. Moller, J. Hopkin, A.V. Hill // HLA. – 2008. – V. 71, № 5. – P. 458-463.

18. Wu, D. J. Autoimmunity-associated LYP-W620 does not impair thymic negative selection of autoreactive T cells / D.J. Wu et al. // PLoS One. – 2014. – V. 9, № 2. – P. e86677.

19. PTPN22 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 [Электронный ресурс]: The National Center for Biotechnology Information. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26191>.

20. Burn, G. L. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? / G. L. Burn, L. Svensson, C. Sanchez-Blanco, M. Saini, A.P. Cope // FEBS letters. – 2011. – V. 585, № 23. – P. 3689-3698.

21. Giancchetti, E. The putative role of the C1858T polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 gene in autoimmunity / E. Giancchetti, M. Palombi, A. Fierabracci // Autoimmunity reviews. – 2013. – V. 12, № 7. – P. 717-725.

22. Lopez-Escamez, J. A. A variant of PTPN22 gene conferring risk to autoimmune diseases may protect against tuberculosis / J.A. Lopez-Escamez et al. // Journal of postgraduate medicine. – 2010. – V. 56, № 3. – P. 242.

23. Chapman, S. J. PTPN22 and invasive bacterial disease / S.J. Chapman et al. // Nature genetics. – 2006. – V. 38, № 5. – P. 499.



24. Montes-Cano, M. A. PTPN22 C1858T polymorphism and the outcome of hepatitis C virus infection / M.A. Montes-Cano et al. // *Viral immunology*. – 2008. – V. 21, № 4. – P. 491-494.
25. Robledo, G. Association study of PTPN22 C1858T polymorphism in *Trypanosoma cruzi* infection / G. Robledo et al. // *HLA*. – 2007. – V. 69, № 3. – P. 261-264.
26. Bravo, M. J. PTPN22 C1858T polymorphism and human brucellosis / M.J. Bravo et al. // *Scandinavian journal of infectious diseases*. – 2009. – V. 41, № 2. – P. 109-112.
27. Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. – World Scientific, 2006.
28. Frank, L. A. Bioluminescent immunoassay of alpha-fetoprotein with Ca<sup>2+</sup>-activated photoprotein obelin / L.A. Frank, E.S. Vysotski // *Bioluminescence and Chemiluminescence. Molecular Reporting with Photons*. – 1997. – P. 439-442.
29. Frank, L. A. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label / L.A. Frank, A.I. Petunin, E.S. Vysotski // *Analytical biochemistry*. – 2004. – V. 325, № 2. – P. 240-246.
30. Frank, L. A. Bioluminescent signal system: bioluminescence immunoassay of pathogenic organisms / L. Frank, S. Markova, N. Rimmel, E. Vysotski, I. Gitelson // *Luminescence*. – 2007. – V. 22, № 3. – P. 215-220.
31. Frank, L. A. Genetically Modified Coelenterazine-Dependent Luciferases as Reporters for In Vitro Assay / L.A. Frank, E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev // *SFU Journal. Biology*. — 2017. — V. 10, № 2. — P. 199-210.
32. 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 // *Method Enzym*. – 2000. – №305. – P. 223-249
33. Frank, L. A. Conjugates of the Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoprotein Obelin with Immunoglobulins: Synthesis and Use as Labels in Bioluminescent Immunoassay / L.A. Frank, A.I. Petunin, E.S. Vysotski // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2004. – V. 30, № 4. – P. 327-331.
34. Liu, Z. J. Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z.J. Liu et al. // *Protein Science*. – 2000. – V. 9, № 11. – P. 2085-2093.
35. Shimomura, O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. – World Scientific, 2006.
36. Kudryavtsev A. N. et al. 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 // Analytical chemistry. – 2012. – V. 84, № 7. – P. 3119-3124.

37. Krasitskaya, V. V. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay / V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank // Analytical Methods. – 2013. – V. 5, № 3. – P. 636-640.

38. Krasitskaia, V. V. The detection of Leiden mutation using technique of enzymatic extension of allele-specific primer with double bioluminescent detection (PED-Biolum) / V.V. Krasitskaia, T.N. Subbotina, I.A. Ol'khovskii, L.A. Frank // Klinicheskaialaboratornaiadiagnostika. – 2013. – № 12. – P. 26, 39-41.

39. Frank, L. A. Genetically modified coelenterazine-dependent luciferases as reporters for in vitro assay / L.A. Frank, E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev // SFU Journal. Biology. — 2017. — V. 10, № 2. — P. 199-210.

40. 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 // Method Enzym. – 2000. – №305. – P. 223-249

41. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680-685.

42. Франк, Л. А. Синтез конъюгатов  $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротейна 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, № 4. – С. 364-368.

43. 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. – № 5. – P. 636-640.

44. Франк, Л. А. Синтез конъюгатов  $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротейна 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, № 4. – С. 364-368

45. 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, № 2. – P. 240-246.

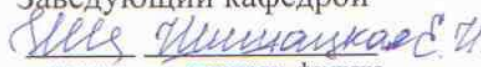
46. Франк, Л.А. Рекombинатный фотопротейнобелин гидроидного полипа *Obelia longissima*: выделение и использование в иммуноферментном анализе. Дисс... канд-та биол. наук: 03.00.02 – Красноярск, 1997. – 91 с.

47. Krasitskaya, V. V.  $\text{Ca}^{2+}$ -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, № 8. – P. 2573-2579.
48. 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
49. 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, № 21. – P. 5013-5015
50. Krasitskaia, V. V. Bioluminescent reporters to identify gene allelic variants / V.V. Krasitskaia, L.P. Burakova, I.A. Pysnaia, L.A. Frank // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2012. – V. 38, № 3. P. 298-305.
51. Vandiedonck, C. Association of the PTPN22\* R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis / C. Vandiedonck et al. // *Annals of neurology.* – 2006. – V. 59, № 2. – P. 404-407.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

  
подпись                      инициалы, фамилия

« 19 » июня 20 18 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01.08 – Биология

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов rs4915154 (A138G) и  
rs17612648 (C77G) в гене PTPRC и полиморфизма rs2476601  
s2476601(C1858T) в гене PTPN22 и их ассоциации с угрозой развития  
миастении

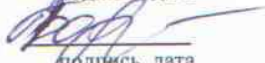
Руководитель

  
подпись, дата

д.б.н.

Л.А. Франк

Выпускник

  
подпись, дата

К.А. Барина

Красноярск 2018