



УДК 577.112.083

## Суперпродукция архитектурного фактора бактериального нуклеоида H-NS и оценка его функциональной активности

Тутукина М.Н., Швырёва У.С., Озолинь О.Н.

*ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пущино*

Поступила в редакцию 8.05.2015 г.

С помощью методов молекулярного клонирования был получен вектор для эффективной суперпродукции рекомбинантного белка H-NS – одного из основных структурных белков бактериального нуклеоида, который также принимает участие в регуляции транскрипции. Разработанный метод позволяет оценивать эффективность связывания белка H-NS с ДНК-мишенями в нативных условиях и детектировать комплексы с помощью специфической сорбции антител на 6 остатков гистидина, введённых в С-конец белка. Кроме того, он делает возможной одностадийную очистку функционально активного белка H-NS с помощью аффинной хроматографии.

**Ключевые слова:** специфическая сорбция антител, электрофорез, молекулярное клонирование, нуклеоид, H-NS, *E. coli*, аффинная хроматография.

## Architectural factor of bacterial nucleoid, H-NS: overproduction and verification of its functional activity

Tutukina M.N., Shvyreva U.S., Ozoline O.N.

*Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino*

The vector for overproduction of the H-NS protein has been constructed by means of molecular cloning. Being one of the major structural proteins of bacterial nucleoid, it also regulates expression of some genes. Resulting vector was transferred into *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ hns strain and conditions optimal for overproduction of the recombinant H-NS possessing six histidine residues on its C-terminal end were estimated. Effective H-NS production was confirmed by electrophoretic fractionating of the proteins from cell lysates. The correctness of his-tag positioning was testified by specific sorption of anti-his polyclonal antibodies produced in rabbit. Functional activity of the protein was estimated by its ability to form specific complexes with the DNA fragments containing multiple potential promoters for short RNA synthesis ("promoter islands"). The method developed here enables one-step purification of H-NS protein using affinity chromatography and allows investigating efficiency of H-NS binding to the DNA targets by detecting complexes after specific sorption of anti-his antibodies to the his-tagged protein.

**Keywords:** specific sorption of antibodies, electrophoresis, molecular cloning, nucleoid, RNA, H-NS, *E. coli*, affinity chromatography

### Введение

В последние годы появилось огромное количество новых данных, расширяющих наше представление о регуляции экспрессии генов. Помимо белков,

способных модулировать экспрессию своих генов-мишеней путем взаимодействия с их промоторной областью, был обнаружен новый класс регуляторов – малые нетранслируемые РНК [1, 2]. Ранее считалось, что их размер варьирует от 30 до 300 нуклеотидов, однако не так давно были обнаружены еще более короткие РНК, похожие на микроРНК эукариот [3].

У высших организмов РНК длиной 13-26 нуклеотидов часто синтезируются рядом с промоторами обычных генов. Их называют tiRNAs (tiny, transcription initiation) или tssRNA (transcription start site associated). От абортивных РНК длиной 2-17 нуклеотидов, синтез которых возможен на последней стадии инициации бактериальной транскрипции, их отличает только размер. Похожие на tssRNA РНК могут синтезироваться с особых структурно-функциональных областей бактериального генома, названных *промоторными островками* [4, 5]. Эти участки имеют исключительно высокую плотность потенциальных промоторов, которые расположены на обеих нитях генома и могут иницировать дивергентную и конвергентную транскрипцию. Все они взаимодействуют с РНК-полимеразой *in vivo* [6], но при этом продуктивный синтез РНК регистрировался гораздо реже, чем этого можно было бы ожидать. Поиск промоторов, распознаваемых основным  $\sigma$ -фактором РНК-полимеразы ( $\sigma^{70}$ ) выявил в геноме кишечной палочки 78 промоторных островков, часть из которых находится внутри кодирующих последовательностей или между конвергентными генами, где целесообразность встречной и дивергентной транскрипции, по меньшей мере, непонятна. Наиболее логичным объяснением кажется возможное функционирование «островков» в качестве депо РНК-полимеразы или же архитектурных элементов генома. Тем более, что синтезирующиеся с них РНК-продукты по длине похожи на tssRNA высших организмов, для которых есть данные о возможном участии в ремоделировании хроматина при взаимодействии с архитектурным фактором CTCF и РНК-полимеразой II [7]. Последовательность «островков» обогащена АТ-парами и в обычных условиях роста до 90% их общей поверхности занято белком H-NS [8], который является одним из пяти основных архитектурных факторов бактериального генома (Dps, Fis, IHF, H-NS и его паралог StpA). На экспоненциальной фазе роста мажорными являются Fis и H-NS/StpA. H-NS - это гистоноподобный белок, играющий важную роль в структурной организации бактериальной хромосомы. Он взаимодействует с АТ-богатыми участками двуцепочечной ДНК, а также с одноцепочечными ДНК и РНК [9]. Связываясь с термодинамически нестабильными участками ДНК в промоторных областях генов, H-NS обычно ингибирует их транскрипцию, но для некоторых генов он является активатором. Кроме того, H-NS селективно подавляет экспрессию чужеродных генов [10] и специфически ингибирует промоторы cas-генов в CRISPR-cas системе иммунной защиты кишечной палочки, приводя к ее выключению [11].

Так как конечными продуктами кластеров CRISPR тоже являются короткие интерферирующие РНК, можно предположить ключевую роль H-NS в регуляции синтеза или стабильности таких молекул. Для того, чтобы оценить способность H-NS влиять на сохранность коротких РНК, необходимо было получить рекомбинантный белок, имеющий эпитоп для взаимодействия с антителом. Самой большой проблемой иммунопреципитации является возможная неспецифическая сорбция используемых антител не только на исследуемый белок, но и на ряд других белков, похожих на него по последовательности. Поэтому в настоящее время часто используются антитела, узнающие искусственно синтезированные последовательности, введенные в исследуемые белки. Целью данной работы было

создание вектора, позволяющего получить функционально активный Н-NS с последовательностью из 6 гистидинов на С-конце.

## Эксперимент

Существует несколько работ, в которых уже было описано получение белка Н-NS для изучения его физико-химических характеристик [12, 13]. В работе [12] экспрессия *hns* была поставлена под контроль промотора лактозного оперона, но в большинстве случаев используется промотор фага Т7, активируемый в присутствии Т7-РНК-полимеразы. Ее синтез с гена, специально введённого в хромосому клеток *Escherichia coli* BL21(DE3), индуцируется изопропил-β-D-тиогалактозидом (IPTG). Чтобы повысить специфичность иммунопреципитации, в работе [14] к С-концу гена *hns*, клонированного в вектор pET3-His по сайту рестрикции NdeI, была присоединена последовательность из шести гистидинов (his-tag). Полученный вектор был назван pRD18 [14] и был использован нами на первом этапе подбора условий суперпродукции белка Н-NS (рис. 1 А).

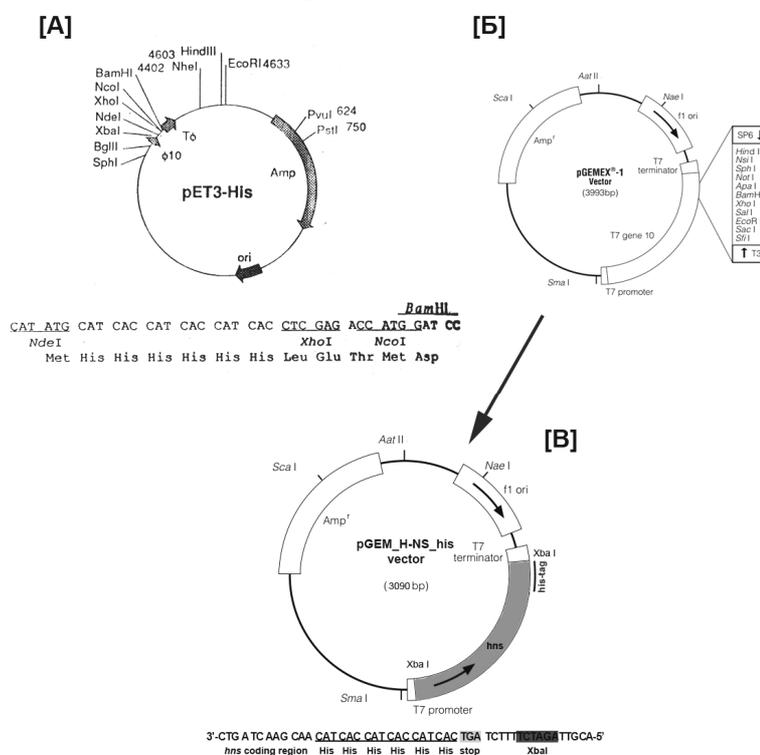


Рис.1 [А] Вектор, использованный для получения белка Н-NS в [13]. [Б] Коммерчески доступный вектор (Promega), использованный в качестве основы для создания вектора pGEM\_H-NS\_his [B]

Для этого, вектор был введён в клетки BL21(DE3)Δ*hns* с удалённым геном *hns*, что обеспечило синтез только рекомбинантного белка. Клетки растили до ранней экспоненциальной фазы ( $OD_{600}=0.4$ ) на среде LB и затем индуцировали транскрипцию *hns* добавлением IPTG в концентрации 20мкМ, 50мкМ, 100мкМ и 500мкМ. Эффективность индукции проверяли с помощью денатурирующего электрофореза белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Клетки осаждали центрифугированием, отмывали от среды буфером TE (10мМ Tris-HCl pH8.0, 1мМ

EDTA), ресуспендировали в буфере для нанесения (0.063M Tris-HCl pH6.8, 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 2% додецилсульфат натрия (SDS), 0.004% бромфеноловый синий, 10% глицерин) и наносили на 15% SDS-PAG. Электрофорез проводили при силе тока 10-20мА в буфере, содержащем 3мМ Tris-HCl pH8.45, 0.192M глицин и 0.1% SDS [15]. Как видно из рисунка 2А, добавление IPTG не привело к синтезу белка на уровне, достаточном для последующей очистки и функциональных тестов. Поэтому целью следующего этапа работы было создание новой конструкции.

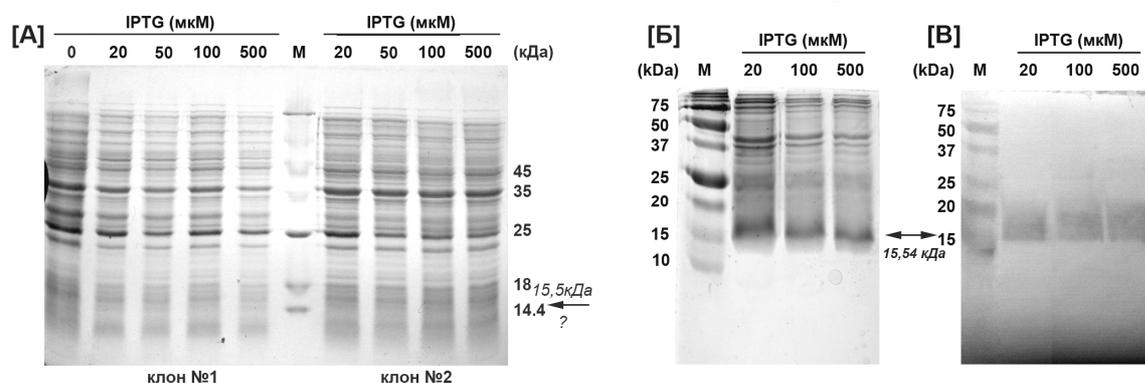


Рис. 2. [А] Проверка индукции гена *hns* в векторе pRD18. Стрелкой показано ожидаемое положение рекомбинантного Н-NS ( $M_w=15.54$  кДа).

Показаны результаты индукции двух независимых клонов. [Б] Проверка индукции рекомбинантного гена *hns* в векторе pGEM\_H-NS\_his [В] Оценка правильности позиционирования *his*-tag с помощью специфической сорбции поликлональных anti-*his* антител (иммуноблот). Стрелкой показано положение рекомбинантного Н-NS ( $M_w=15.54$  кДа). Концентрация индуктора указана над дорожками.

В качестве основы был использован вектор pGEMΔXba, сконструированный путем удаления гена 10 фага T7 из pGEMEX-1 (рис. 1Б) [16]. Ген *hns* был амплифицирован с геномной ДНК *E.coli* K12 MG1655 с праймерами Н-NS\_forw – 5'-AGGCTCTAGAATTACCTCAACAAACC-3' и Н-NS\_his – 5'-TGCAATCTAGAAAAGATCAGTGATGGTGATGGTGATGTTGCTTGATCAG-3', содержащих сайты XbaI, и поставлен под контроль T7 промотора. Праймеры были подобраны таким образом, чтобы на 5'-конце мРНК сохранить собственный сайт связывания рибосомы, а к 3'-концу добавить последовательность нуклеотидов, кодирующую *his*-tag (подчеркнута на рис. 1В). Способность Н-NS связывать ДНК обусловлена аминокислотными остатками, находящимися в середине последовательности (A80-K96 и T110-A117) [17], поэтому наличие *his*-tag на С-конце белка не должно было повлиять на его ДНК-связывающие свойства.

Полученный вектор был назван pGEM\_H-NS\_his (рис. 1В). Он был проверен на отсутствие мутаций прямым секвенированием и использован для трансформации клеток BL21(DE3)Δ*hns*. Содержащие pGEM\_H-NS\_his клетки выращивали на агаризованной среде LB в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C, затем одиночные колонии пересевали на новые чашки с ампициллином для исключения контаминации и использовали для ночной культуры. На следующий день 100 мкл ночной культуры бактерий переносили в 10 мл жидкой среды LB с ампициллином (100 мкг/мл, pH 7.4) растили до ранней экспоненциальной фазы ( $OD_{600}=0.4$ ), после чего индуцировали синтез рекомбинантного Н-NS добавлением IPTG в концентрации 20мкМ, 100мкМ и 500мкМ и растили еще 2 часа для наработки белка. Эффективность суперпродукции была проверена с помощью электрофоретического фракционирования белков клеточного лизата (SDS-PAGE, Рис. 2Б).

Чтобы убедиться в правильности вставки гена относительно his-tag, был проведен иммуноблоттинг – оценка способности коммерческих anti-his антител кролика (Cell Signalling, США) связываться с введенным в молекулу Н-NS треком из 6 гистидинов. Для этого, белки клеточного лизата были фракционированы на SDS-PAGE и перенесены на поливинилденфторидную (PVDF) мембрану в буфере, содержащем 47.9мМ Tris-HCl (pH8.0), 38.6мМ глицина, 0.0385% SDS и 20% этанола (100В, 60 минут). Затем для предотвращения неспецифической сорбции мембрана была обработана 0.5% раствором сухого молока, растворенного в 10мМ Tris-HCl буфере (pH 8.0), и последовательно проинкубирована с anti-his антителами кролика и антителами к кроличьему иммуноглобулину конъюгированному щелочной фосфатазой. Такое слияние двух белков позволяет специфически окрашивать комплексы, формируемые Н-NS с антителом, используя для этого способность щелочной фосфатазы превращать 5-бromo-4-хлоро-3-индолил-фосфат (Western blue, Promega, США) в присутствии нитросинего тетразолия в окрашенное нерастворимое производное. Результат иммуноблоттинга показан на рисунке 2В. Видно, что с вектора pGEM\_H-NS\_his эффективно синтезируется рекомбинантный Н-NS с доступным для антител his-tag.

На следующем этапе было необходимо оценить способность рекомбинантного Н-NS взаимодействовать с ДНК. Для этого был использован метод EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) [18]. Фрагменты ДНК двух «промоторных островков», расположенных внутри генов *yhaC* и *yeal*, были амплифицированы и использованы в качестве мишеней для связывания с белком. Клетки, суперпродуцирующие Н-NS\_his (100мкМ IPTG), были остановлены после двух часов индукции, отмыты от остатков среды и разрушены с помощью ультразвукового дезинтегратора. Полученный лизат был очищен от остатков клеточных стенок с помощью центрифугирования (10000 об/мин, 20 минут, +4°C) и без дополнительного фракционирования использован для формирования комплексов с ДНК. Концентрация белка в лизате была измерена спектрофотометрически на NanoDrop 1000. Для эксперимента было взято 0.03-0.12 мкг суммарного белка на пробу, содержащую 1 пмоль ДНК (приблизительно 0.4-1.6 пмоль Н-NS, исходя из его доли в экстрактах, рис. 2Б). Комплексы формировали в транскрипционном буфере (5 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.01 мМ EDTA, 25 мкг/мл BSA, 5 мМ NaCl) в течение 30 минут при 37°C. Далее в пробы добавляли глицерин до конечной концентрации 10% и наносили на предварительно прогретый до 37°C 5% PAGE. Электрофорез проводили при 140мА/280В в течение 20 минут. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем УФ-свете (рис. 3А). Видно, что в присутствии 0.06 мкг белка почти все фрагменты ДНК оказались связанными. А при увеличении концентрации белка еще в 2 раза, по-видимому, происходит его олигомеризация, что приводит к еще большему уменьшению электрофоретической подвижности комплексов. Специфичность образовавшихся комплексов была подтверждена с помощью иммуноблоттинга с anti-his антителами, которые специфически сорбировались на связанный с ДНК модифицированный Н-NS (рис. 3Б). Это значит, что подобранные условия суперпродукции с вектора pGEM\_H-NS\_his могут быть использованы не только для очистки рекомбинантного белка с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA смолах, но и для характеристики его взаимодействия с разными ДНК-мишенями в условиях, максимально соответствующих природным.

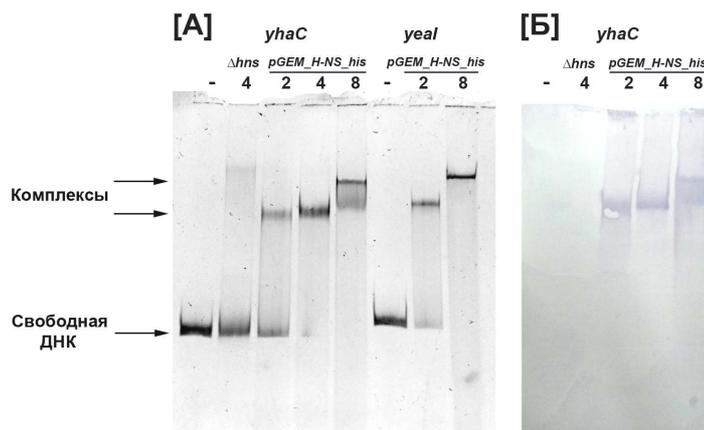


Рис. 3. Оценка способности рекомбинантного Н-NS формировать комплексы с промоторными островками *yhaC* и *yeal*.

Соотношение белка к ДНК показано над дорожками. Места миграции свободной ДНК и образовавшихся комплексов идентифицированы прокрашиванием бромистым этидием [А]. Специфичность комплексов подтверждена специфической сорбцией anti-his антител к находящемуся на С-конце белка his-tag [Б].

### Обсуждение результатов

Основными мишенями архитектурного фактора бактериального нуклеоида Н-NS являются обогащённые А/Т-парами участки генома [5, 9], к которым, в частности, относятся «промоторные островки» [8, 19]. Но Н-NS может взаимодействовать с ДНК двумя разными способами. Он может специфически подавлять (например, *proU*, *gadA*, *fimD*, *ompF*, *proV*) или активировать (*hisJ*, *flhD*, *fliA*) транскрипцию отдельных генов, связываясь с высокоаффинными сайтами в виде индивидуального регуляторного белка. Взаимодействуя с менее обогащёнными АТ-парами сайтами совместно с другими регуляторами, он может способствовать образованию петель конденсированной ДНК с подавленной транскрипцией [20]. По такому механизму, например, комплексом Н-NS и сAMP-CRP ингибируется экспрессия оперона *bglGFB* [14], а комплексом Н-NS с IHF и Fis - оперона *nirBDC-cysG* [20]. Такие АТ-богатые участки зачастую чередуются с более специфическими сайтами с высоким сродством к Н-NS, которые представляют собой своего рода затравку для образования репрессорных комплексов более высокого порядка, которые отвечают за глобальное подавление транскрипции.

По-видимому, именно это происходит с промоторными островками, которые на 90% закрыты белком Н-NS [8]. Очень похожая ситуация наблюдается для АТ-богатых островков патогенности уропатогенной кишечной палочки *Escherichia coli* 536, а также их горизонтально перенесенных гомологов у лабораторного штамма K12 MG1655 [20, 21]. Поскольку большая часть «промоторных островков» тоже находится рядом с горизонтально перенесёнными генами, эта общность вряд ли является случайной, а механизм формирования мультимолекулярных комплексов заслуживает детального исследования в условиях максимально приближенных к внутриклеточным.

Сконструированный в данной работе вектор идеально подходит для решения целого ряда задач. Наличие his-tag позволяет получить чистый препарат функционально-активного белка с помощью одноступенчатой аффинной

хроматографии. Важно, что наличие искусственной последовательности из шести гистидинов на С-конце белка H-NS, не нарушило способность H-NS связываться с модельными фрагментами ДНК и открыло возможность не только детектировать, но и собирать образующиеся комплексы с использованием коммерчески-доступных антител. Это позволяет использовать рекомбинантный H-NS для поиска других его мишеней и оценки способности связываться с короткими РНК – основными продуктами «островков». Возможность быстрого получения гистон-подобного белка из лизатов позволяет изучить характер его пост-трансляционных модификаций. Такие модификации очень важны для поддержания адекватного структурного состояния и ремоделирования эукариотических геномов («гистоновый код»), но практически совсем не исследованы у бактерий. Тем не менее, известно, что в H-NS фосфорилированию подвергаются Y61 и Y99, которые находятся в гидрофобном ядре олигомеризационного и ДНК-связывающего доменов [22], причем фосфорилирование H-NS влияет на его способность связываться с ДНК [23].

*Исследования поддержаны грантом РФФИ 14-14-00985.*

### Список литературы

1. Blattner F.R. et al. // *Science*. 1997. Vol. 277. pp. 1453-1462.
2. Озолин О.Н., Шавкунов К.С., Тутукина М.Н. // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии*. 2005. № 1. С. 56-65.
3. Lee H.J., Hong S.H. // *FEMS Microbiol Lett*. 2012. Vol. 326(2). pp. 131-136.
4. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N. et al. // *Nucleic Acids Res*. 2009. Vol. 37. pp. 4919-4931
5. Глазунова О.А., Киселев С.С., Шавкунов К.С. и др. // *Матем. Биол. Биоинф.* 2014. Т. 9. № 2. С. 563-574.
6. Reppas N., Wade J., Church G., Struhl K. // *Mol. Cell*. 2006. Vol. 24. pp. 747-757.
7. Taft R.J., Hawkins P.G., Mattick J.S. et al. // *Epigenetics and chromatin*. 2011. Vol. 4. pp.13.
8. Panyukov V.V., Ozoline O.N. // *PLoS One*. 2013. Vol. 8(5):e62601.
9. Dorman C.J. // *Nat Rev Microbiol*. 2004. Vol. 2(5). pp. 391-400.
10. Falconi M., Higgins P.N., Spurio R. et al. // *Mol. Microbiol*. 1992. Vol. 10. pp. 273-282.
11. Westra E.R. et al. // *Mol. Microbiol*. 2009. Vol. 77. pp. 1380-1393.
12. Dole S., Nagarajavel V., Schnetz K. // *Mol. Microbiol*. 2004. Vol. 52 (2). pp. 589-600.
13. Dersch P., Schmidt K., Bremer E. // *Mol. Microbiol*. 1993. Vol. 8(5), pp. 875-889.
14. Schnetz K., Wang J.C. // *Nucleic Acids Res*. 1996. Vol. 24 (12). pp. 2422-2428.
15. Davis B.J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1994. Vol. 121. pp. 404-427.
16. Igarashi K., Ishihama A. // *Cell*. 1991. Vol.65. pp. 1015-1022.
17. Shindo H., Ohnuki A., Ginba H. et al. // *FEBS Lett*. 1999. Vol. 455. pp. 63-69.
18. Потапова А.В., Озолин О.Н., Тутукина М.Н. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014. Т. 14. № 3. С. 537-543.
19. Панюков В.В., Киселев С.С., Шавкунов К.С. и др. // *Матем. Биол. Биоинф.* 2013. Т. 8. № 2. С. 432-448.
20. Lang B. et al. // *Nucleic Acids Res*. 2007. Vol. 35. pp. 6330-6337.
21. Landick R., Wade J.T., Grainger D.C. // *Curr. Op. Microbiol*. 2015. Vol. 24. pp. 53-59.
22. Arold S.T., Leonard P.G., Parkinson G.N., Ladbury J.E. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107. pp. 15728-15732.
23. Hansen A-M., Chaerkady R., Sharma J. et al. // *PLoS Pathog*. 2013. Vol. 9: e1003403.

## References

1. Blattner F.R. et al., *Science*, 1997, Vol. 277, pp. 1453-1462.
2. Ozoline O.N., Shavkunov K.S., Tutukina M.N., *Bulletin of Biotechnology*, 2005, No 1, pp. 56-65.
3. Lee H.J., Hong S.H., *FEMS Microbiol Lett*, 2012, Vol. 326(2), pp. 131-136. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02441.x.
4. Shavkunov K.S., Masulis I.S., Tutukina M.N. et al., *Nucleic Acids Res*, 2009, Vol. 37, pp. 4919-4931. doi: 10.1093/nar/gkp490.
5. Glazunova O.A., Kiselev S.S., Shavkunov K.S. et al., *Math. Biol. Bioinf.*, 2014, Vol. 9 (2), pp. 563-574. doi: 10.17537/2014.9.563.
6. Reppas N., Wade J., Church G., Struhl K., *Mol. Cell*, 2006, Vol. 24, pp. 747-757.
7. Taft RJ, Hawkins PG, Mattick JS et al., *Epigenetics and chromatin*, 2011, Vol. 4, pp. 13.
8. Panyukov V.V., Ozoline O.N., *PLoS One*, 2013, Vol. 8(5):e62601. doi: 10.1371/journal.pone.0062601
9. Dorman C.J., *Nat Rev Microbiol*, 2004, Vol. 2(5), pp. 391-400.
10. Falconi M., Higgins P.N. et al., *Mol. Microbiol*, 1992, Vol. 10, pp. 273-282.
11. Westra E.R. et al, *Mol. Microbiol*, 2009, Vol. 77, pp. 1380-1393. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.018.
12. Dole S., Nagarajavel V., Schnetz K., *Mol. Microbiol*, 2004, Vol. 52 (2), pp. 589-600.
13. Dersch P., Schmidt K., Bremer E., *Mol. Microbiol*, 1993, Vol. 8(5), pp. 875-889.
14. Schnetz K., Wang J.C., *Nucleic Acids Res*, 1996, Vol. 24 (12), pp. 2422-2428.
15. Davis B.J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1994, Vol. 121, pp. 404-427.
16. Igarashi K., Ishihama A., *Cell*, 1991, Vol. 65, pp. 1015-1022.
17. Shindo H., Ohnuki A., Ginba H. et al., *FEBS Lett.*, 1999, Vol. 455, pp. 63-69.
18. Potapova A.V., Ozoline O.N., Tutukina M.N. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2014, Vol.14(3), pp. 537-543.
19. Panyukov V.V., Kiselev S.S., Shavkunov K.S. et al., *Math. Biol. Bioinf.*, 2013, Vol. 8:t12-t26. doi: 10.17537/2013.8.t12
20. Lang B., et al., *Nucleic Acids Res*, 2007, Vol. 35, pp. 6330-6337.
21. Landick R., Wade J.T., Grainger D.C., *Curr. Op. Microbiol*, 2015, Vol. 24, pp. 53-59.
22. Arold S.T., Leonard P.G., Parkinson G.N., Ladbury J.E., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, Vol. 107, pp. 15728-15732. doi: 10.1073/pnas.1006966107
23. Hansen A-M., Chaerkady R., Sharma J., et al., *PLoS Pathog*, 2013, Vol. 9(6), e1003403. doi:10.1371/journal.ppat.1003403

**Тутукина Мария Николаевна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино; тел.: (4967) 739-140

**Швырёва Ульяна Сергеевна** – аспирант лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино

**Озолин Ольга Николаевна** – д. б. н., профессор, заведующая лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Московская область, Пушкино

**Tutukina Maria N.** – PhD in Molecular biology, senior research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [maria@icb.psn.ru](mailto:maria@icb.psn.ru)

**Shvyreva Uliana S.** – PhD student in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region, e-mail: [uliana.shvyreva@gmail.com](mailto:uliana.shvyreva@gmail.com)

**Ozoline Olga N.** – Dr.Sci., professor, Head of the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region