

промоторов. 9 ORF были инактивированы с помощью инсерционного мутагенеза; при инактивации 6-ти ORF способность p19 к конъюгационному переносу снижалась на 3-5 порядков. Вероятно, продукты этих ORF были необходимы для конъюгации. На основании данных по гомологии продуктов ORF с имеющимися в GenBank последовательностями, результатов инактивации генов, а также исходя из расположения промоторов на секвенированных фрагментах, мы отнесли участок размером в 19346 пн (20 ORF) к *tra*-району p19. Гипотетическим белковым продуктам 6-ти ORF *tra*-района можно приписать определенные функции, исходя из предполагаемых функций их гомологов. К этой группе относятся белки-гомологи VirB4, VirB11, VirD4-подобных белков рТi *A. tumefaciens*. Эти белки являются компонентами системы секреции IV типа. Они встречаются в подавляющем большинстве систем конъюгации как грам-отрицательных, так и грам-положительных микроорганизмов, обладают АТФ-азной активностью и обеспечивают процесс конъюгации энергией. Кроме того, к этой группе можно отнести белок-гомолог литической трансглюкозилазы (лизоцима); функциональный гомолог VirB6 рТi – белок с множественными трансмембранными районами, а также праймазу-хеликазу. К другой группе (8 ORF) можно отнести гипотетические белковые продукты, гомологи которых часто встречаются у конъюгативных плазмид грам-положительных микроорганизмов, однако их функции неизвестны. К третьей группе (6 ORF) относятся белковые продукты, не имеющие гомологов.

В базе данных GenBank мы обнаружили ряд плазмид (pFR55 *B. thuringiensis*, pCLL *C. botulinum*, pCP13 *C. perfringens*, pLM80 *L. monocytogenes*), у которых от 9 до 11 белков *tra*-района были гомологичны гипотетическим белкам *tra*-района p19. Таким образом, система конъюгации плазмиды p19 имеет сходство с конъюгативными системами плазмид из различных видов грам-положительных бактерий, однако не идентична им.

1. Itaya M., Sakaya N., Matsunaga S., Fujita K., Kaneko S. Conjugational transfer kinetics of pLS20 between *Bacillus subtilis* in liquid medium // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2006. – V.70. - №3. – P.740-742.
2. Лотарева О.В., Незаметдинова В.З., Федорина Е.А., Полуэктова Е.У., Туток М.А., Прозоров А.А. Конъюгативная мобилизация, осуществляемая с высокой частотой природным штаммом *Bacillus subtilis*, несущим крупную плазмиду // Генетика. – 2001. - Т.37. - №12. – С.1598-1603.
3. Лотарева О.В., Полуэктова Е.У., Федорина Е.А., Незаметдинова В.З., Прозоров А.А. Межвидовой и внутривидовой конъюгативный перенос различных плазмид у бацилл // Генетика. – 2003. - Т.39. - № 8. - С.1141-1144.
4. Poluektova E.U., Fedorina E.A., Lotareva O.V., Prozorov A.A. Plasmid transfer in bacilli by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain // Plasmid. – 2004. - V.52. - P.212-217.
5. Лотарева О.В., Прозоров А.А. Изучение конъюгативного переноса хромосомных и плазмидных генов у *Bacillus subtilis* // Доклады РАН. – 2006. - Т.408. - №3. - С.422-425.

СВЕТОВАЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ СВОБОДНОГО ОКИСЛЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ТОМАТА

В.Н. Попов, Е.А. Воронцова, В.Т. Попова, О.Ю. Фоменко

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

pvn@bio.vsu.ru

Как известно, одной из основных функций внешних ротенон-нечувствительных NAD(P)H-дегидрогеназ высших растений состоит в поддержании нормального переноса электронов в ЭТЦ хлоропластов при протекании фотосинтеза. Это достигается за счёт быстрого и эффективного реокисления NAD(P)H, экспортируемого из стромы хлоропластов в цитозоль при функционировании путей несопряжённого дыхания. Поэтому особый интерес вызывает изучение экспрессионной регуляции альтернативных NAD(P)H-дегидрогеназ таким важнейшим фактором, как светом.

Нами изучалось изменение уровня экспрессии гена *ndb1* томата в течение светового дня. Опытные растения культивировались в фитотроне «Флора» при двенадцатичасовом световом дне. Нами исследовалось пять точек: момент переноса растений из темноты на свет (точка «0 часов»), 1, 6 и 12 часов инкубации на свету с интенсивностью освещённости 25 Дж/м²с, и спустя 1 час с момента переноса растений со света в темноту. Из растений каждой группы выделялась РНК, а продукты, полученные в результате обратной транскрипции использовались для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени. Типичная картина кинетики флюоресценции в процессе амплификации участка гена *ndb1* с использованием соответствующих матриц кДНК приведена на рис. 1.

Нами было установлено, что при переносе растений из темноты на свет (смена «ночи» и «дня») наблюдается быстрое накопление транскрипта исследуемого гена в клетках, которое достигает своего максимума к 12 часу облучения. При этом количество транскрипта увеличивается более чем в 22 раза по сравнению с контрольной точкой – «0 часов» – моментом переноса растений из темноты на свет. При переходе растений в темноту наблюдается быстрое падение концентрации транскрипта *ndb1*. В течение первого часа инкубации в темноте содержание соответствующей мРНК падает в 4,2 раза (рис. 1).

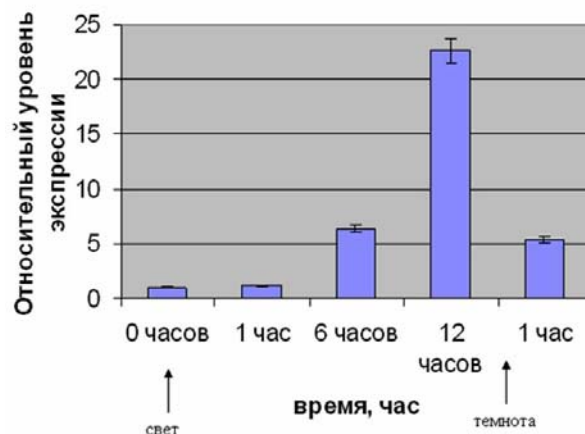


Рис. 1. Динамика экспрессии гена *ndb1* зелёных листьев томата в течение светового дня.

Биологический смысл показанной нами световой регуляции экспрессии гена *ndb1* заключается в интенсификации процессов несопряжённого окисления NAD(P)H во время интенсивного протекания фотосинтеза на свету. Одним из возможных механизмов, обеспечивающих подобного рода регуляцию, может быть функционирование фитохромной системы. В течение светового дня под действием преобладающего в спектральном составе света с длиной волны 660 нм происходит накопление физиологически активной формы фитохрома Ф₇₃₀, оказывающего стимулирующий эффект на экспрессию гена *ndb1* за счёт взаимодействия фитохрома с рядом факторов транскрипции, в частности PIF3 [8]. В темноте же происходит его переход в физиологически неактивную форму Ф₆₆₀ и угнетение экспрессии *ndb1*.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что внешняя ретенон-нечувствительная NAD(P)H-дегидрогеназа томата является светозависимым ферментом. В течение светового дня уровень транскрипта *ndb1* возрастает более чем в 22 раза, что связано с важной физиологической ролью изучаемого фермента в поддержании нормального протекания процессов фотосинтеза.

Кроме того, нами была изучена суточная динамика экспрессии альтернативной оксидазы Aox1a и растительного разобщающего белка PUMP.

В результате было обнаружено, что изменение уровня экспрессии гена *aox1a* имеет сходный характер с динамикой экспрессии гена *ndb1* томата (рис. 2).

С использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени было показано, что количество транскрипта увеличивается с момента переноса растений из темноты на свет и достигает своего максимума к 12 часу инкубации на свету с интенсивностью 25 Ватт/м², увеличиваясь более, чем 30 раз по сравнению с контролем. При переносе растений в темноту количество транскрипта начинает закономерно уменьшаться. Через час инкубации растений в темноте количество транскрипта *aox1a* превышает его уровень в контроле уже только в 7 раз.

В течении светового дня уровень экспрессии гена, кодирующего растительный разобщающий белок томата также меняется сходным образом. Однако в течении первого часа инкубации растений на свету статистически достоверных изменений в обилии соответствующего транскрипта обнаружено не было. В дальнейшем количество транскрипта начинает возрастать, к шестому часу увеличиваясь в 2,25 раза по сравнению с контролем. Своего максимума оно достигало на 12 двенадцатый час инкубации растений томата на свету, и в 12,3 раза превышало

уровень транскрипта в листьях контрольных растений. После переноса растений в темноту наблюдалось резкое падение количества транскрипта. После первого часа темновой инкубации оно составляло лишь 20 % от своего максимального значения, и превышало количество транскрипта *rimt* в листьях растений контрольной группы в 2,46 раза (рис. 3).

Несмотря на то, что количество белка и уровень его активности не могут быть напрямую выведены из обилия соответствующего транскрипта, в предыдущих работах, посвящённых изучению уровней зрелого белка альтернативной оксидазы, было показано, что увеличение количества транскрипта приводит к возрастанию уровня белка и наоборот [1]. Подобным же образом в работах по изучению уровней транскриптов и белков NAD(P)H-дегидрогеназ второго типа картофеля показано, что изменения в количестве мРНК и белка обнаруживают аналогичную тенденцию [2].

Из этих работ и на основании полученных нами данных можно сделать вывод о том, что *Aox1a* коэкспрессируется с *NDA1*, *NDB2* и, в случае митохондрий томата, с *NDB1*. Таким образом, любая предполагаемая роль подобного рода регуляции должна обсуждаться в терминах биохимического пути от окисления NAD(P)H (внешнего и внутреннего) до восстановления кислорода до воды. В данном контексте чётко вырисовывается роль экспрессионной регуляции ферментов несопряжённого дыхания в поддержании окислительно-восстановительного баланса, так как совместная индукция внешней и внутренней NAD(P)H-дегидрогеназ в паре с терминальной оксидазой обеспечивает окисление восстановительных эквивалентов матрикса и цитозоля. Всё это должно приводить к изменению метаболизма под воздействием макропитательного стресса или при ингибировании цитохромного пути в электрон-транспортной цепи. Это также может приводить к пониженной продукции активных форм кислорода путём «выжигания» любых избытков восстановительных эквивалентов, позволяя этим компонентам выступать в роли необходимого для выживания пути. Кроме того, нами показано, что в течение светового дня также наблюдается ко-экспрессия растительного разобщающего белка, что позволяет

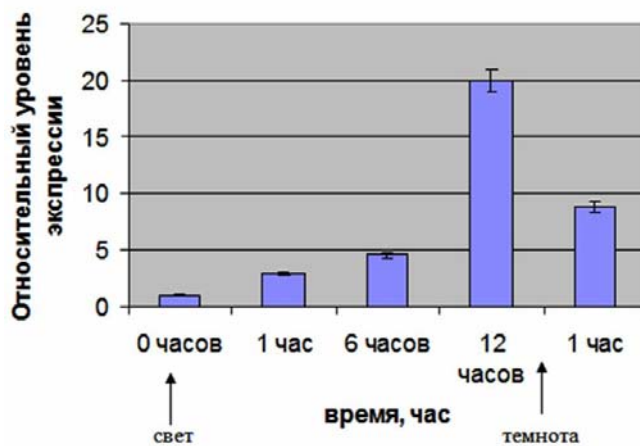


Рис. 2. Динамика экспрессии гена *aox1a* зелёных листьев томата в течение светового дня.

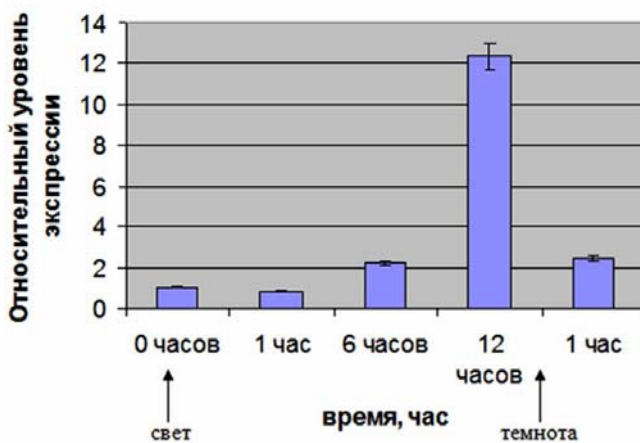


Рис. 3. Динамика экспрессии гена PUMP зелёных листьев томата в течение светового дня.

растению более гибко регулировать потоки электронов и восстановительных эквивалентов в электрон-транспортных цепях митохондрий, адаптируя их в соответствии с текущими потребностями энергетического и конструктивного метаболизма. Подобного рода регуляция экспрессии позволяет избежать ситуации *overflow*, поддерживает функционирование цикла Кребса на свету и благоприятствует нормальному протеканию фотосинтеза.

1. *Finnegan P.F., Soole K.L., Umbach A.L.* Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants // *In Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Edited by Day D.A., Millar H. and Whilan J. P. 163-230.
2. *Svensson A.S., Rasmussen A.G.* Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves // *Plant J.* - 2001. - Vol. 28. - P. 73-82.

МОДУЛИРОВАНИЕ ГЕНОПРОТЕКТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛОГА НАДН

Н.И. Рябоконт, Р.И. Гончарова

*ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
n.ryabokon@igc.bas-net.by*

Синтез и исследование синтетических аналогов НАДН и НАДФН приобретают особую актуальность в связи с открытием новых и многочисленных функций этих коферментов в клетке, а также с необходимостью фармакологического вмешательства при заболеваниях, связанных с нарушениями в метаболизме. В настоящей работе представлен краткий обзор данных, полученных при изучении на клетках человека механизмов генопротекторного действия одного из перспективных синтетических производных 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП), аналога активного центра НАДН и НАДФН [1,2]. Исследуемый препарат 3,5-бис-этоксикарбонил-2,6-диметил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксилат натрия (AV-153) синтезирован в Латвийском институте органического синтеза [2] и по аналогии с коферментами НАДН и НАДФН обладает электрон-водородными донорными свойствами [2,3]. Производные 1,4-ДГП из этой группы восстанавливают энергетический запас клеток [3] и выступают как биопротекторы, проявляя антиоксидантные, противовоспалительные и другие свойства [2]. На модельных объектах *in vivo* впервые установлено, что производные 1,4-ДГП обладают также антимуtagenными свойствами в строгой зависимости от их электронодонорного потенциала и по своему механизму антимуtagenного действия являются репарогенами, т.е. соединениями, влияющими на репарацию ДНК; предполагаются и другие множественные механизмы их защитного действия, включая влияние на апоптоз [4].

На различных клетках человека *in vitro* впервые показано, что препарат AV-153 проявляет генопротекторные свойства, защищая геном клеток от повреждений, вызванных различными факторами: эндогенными метаболитами и ошибками репликации, а также ионизирующим облучением, окислительным стрессом и алкилированием. При этом наиболее эффективными являются низкие концентрации препарата, снижающие до 70% повреждения ДНК и увеличивающие скорость их репарации по пути эксцизионной репарации оснований (BER) [1]. Обнаружено также, что исследуемый препарат наиболее эффективен в течение первых и наиболее важных минут процесса BER и что он в строгой зависимости от своей концентрации (рис. 1А) стимулирует дополнительный синтез поли(ADP-рибозы), являющейся продуктом активности полимеразы PARP-1, одного из компонентов комплекса ферментов BER [5]. Сверхпродукция до 130% полимера (ADP-рибозы) в присутствии AV-153 коррелирует с эффективностью (рис. 1Б) и скоростью BER [5], тем самым, демонстрируя один из механизмов генопротекторной активности AV-153.