

дуктов в культуре увеличивается. В частности, сердечные гликозиды в культуре ткани наперстянки синтезировались только при образовании эмбриоидов.

В культурах ткани обычно формируются секреторные каналы, млечники, слизевые клетки, железки или специализированные клетки, где накапливаются конечные продукты, т.е. наблюдается процесс разобщения синтеза и накопления вторичных метаболитов. Например, в культуре ткани женьшеня возникают секреторные каналы, типичные для интактных растений сем. *Araliaceae*. Обнаружена четкая корреляция между ультраструктурной организацией пластид (этиопластов и хлоропластов) и биосинтетической способностью каллусных культур чайного растения, что подчеркивает важную роль хлоропластов в образовании фенольных соединений. Кроме того, в продуцирующих клетках можно было наблюдать многочисленные везикулы, содержащие в цитоплазме электронно-плотный осадок.

• **Селекция культур.** Известно, что культивирование клеток *in vitro* может сопровождаться значительным генетическим разнообразием. Соматональные варианты, возникающие при длительном культивировании каллуса, сохраняя основные свойства прототипа, часто значительно отличаются от него устойчивостью к вирусам, болезням, экологическим стрессам, а иногда несколько измененной биосинтетической способностью и более высокой продуктивностью – т. е. могут затрагивать хозяйственно ценные признаки. Для увеличения спектра изменчивости используют обработку мутагенными веществами, а также селективные условия культивирования клеток.

Спонтанно возникшие или индуцированные мутанты в популяции отбираются на устойчивость к созданным жестким условиям: высоким концентрациям солей, экстремальным температурам, гербицидам, токсинам и др. Цель: в результате экспериментов отобрать устойчивые линии и получить растения-регенеранты из стабильной клеточной линии, гарантирующей стандартность лекарственного сырья.

Клеточная селекция – одна из наиболее перспективных клеточных технологий для создания сортов не только важнейших сельскохозяйственных, но и лекарственных растений. В настоящее время с большим ускорением развиваются исследовательские работы по созданию высокопродуктивных штаммов и растений-регенерантов методами и гибридизации соматических (неполовых) клеток путем слияния протопластов и генной инженерии.

Хотя методы соматической гибридизации и генной инженерии пока еще не получили промышленного развития, однако несомненно, что они несут огромные возможности и станут широко востребованными в будущем: при создании новых нужных человеку лекарственных растений – продуцентов фармакологически ценных веществ, а также сортов хлопчатника и многих других сельскохозяйственных и древесных растений, представляющих источники сырья для промышленной переработки и использования в различных отраслях народного хозяйства.

ПОЛИМОРФИЗМ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО РОЛЬ В МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ БЕНЗ(а)ПИРЕНА

П.А. Киселев¹, Н.А. Бовдей¹, Д. Шварц²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь
kiselev@iboch.bas-net.by

²Центр молекулярной медицины им. М. Дельбрюка, г. Берлин, Германия
schunck@mdc-berlin.de

В настоящее время считается, что индивидуальная предрасположенность к химическому канцерогенезу, по крайней мере частично, может быть обусловлена генетической вариабельностью ферментов, участвующих в метаболических превращениях физиологически ак-

тивных веществ эндогенного и экзогенного происхождения. Так, не вызывает сомнений существенная роль в химическом канцерогенезе цитохрома P-4501A1 человека, что связывают с его уникальной метаболической активностью в отношении полициклических ароматических соединений, обладающих промутагенными и проканцерогенными свойствами. К широко известным представителям этого ряда относится бенз(а)пирен (Б(а)П). Между тем, в последние годы обнаружена полиморфность гена цитохрома P-4501A1. Наряду с основным типом гена, обозначаемым CYP1A1*1A (соответствующий белок – CYP1A1.1) идентифицированы 10 его вариантов, в некоторых из которых замена нуклеотидов приводит к точечной замене аминокислот (см. www.imm.ki.se/Cyp_alleles). В случае двух из них проведены эпидемиологические исследования. Речь идет о гене CYP1A1*2B, кодирующим белок CYP1A1.2, в котором изолейцин в положении 462 заменен на валин и гене CYP1A1*4, которому соответствует белок CYP1A1.4, имеющий вместо треонина в положении 461 аспарат. Распространенность мутантных генов CYP1A1*2B и CYP1A1*4 зависит от вида человеческой популяции, этнических и региональных особенностей и варьируется в пределах от 5 до 33 %. На основании эпидемиологических исследований сделан вывод о взаимосвязи между наличием генов CYP1A1*2B и CYP1A1*4 и повышенным риском раковых заболеваний легких и молочной железы. Обсуждается вопрос о генотипной склонности к раку груди. Однако, очевидно, что прямые доказательства фундаментальной значимости мутаций гена цитохрома P-4501A1 и установление молекулярных механизмов реализации патологических процессов не могут быть получены без выяснения особенностей поведения соответствующих белков. Поэтому целью настоящей работы стало выяснение каталитических особенностей полиморфных вариантов цитохрома P-4501A1 в метаболической активации Б(а)П. Для этого необходимо было решить следующие основные задачи:

а) сконструировать рекомбинантные бакуловирусы, включающие полиморфные гены CYP1A1*1A, CYP1A1*2B и CYP1A1*4, осуществить их клонирование и провести экспрессию соответствующих белков в клетках насекомых;

в) охарактеризовать монооксигеназную активность полиморфных вариантов цитохрома P-4501A1 человека в реакции окисления Б(а)П. Для получения рекомбинантных полиморфных вариантов цитохрома P-4501A1 человека была применена стратегия, основанная на бакуловирусной методике. Исходным материалом была к-ДНК дикого типа цитохрома P-4501A1 человека, встроенная в вектор pBluescript (Стратаген Ла Джолла, США), которая была любезно предоставлена доктором Ф. Дж. Гонсалесом (Национальный институт здоровья, Бетезда, США). Поскольку Ф.Дж. Гонсалес является международно признанным авторитетом в этой области исследований, применение полученной им к-ДНК снимала проблему доказательства идентичности рекомбинантного белка его нативному прототипу. Вставка в вектор p-Bluescript осуществлялась при помощи Xh01-линкером. Основной путь конструирования CYP 1A1.2- и CYP1.4 вариантов заключался в замещении участка дикого типа между рестрикционными сайтами Tag1 и EcoR1, соответствующими фрагментами полимеразной цепной реакции. Фрагменты были получены с использованием в качестве матрицы геномных ДНК, выделенных из лейкоцитов особей, несущих, как было найдено ранее, искомые мутации. Экспрессия проведена в клетках насекомых *spodoptera frugiperda (Sf9)*, не содержащих эндогенного цитохрома P-450. Вместе с тем, для проявления функциональной активности системы необходимо присутствие НАДФН-цитохром P-450-редуктазы. Поэтому для создания каталитически активной монооксигеназной системы одновременно с экспрессией цитохрома P-4501A1 проводилась экспрессия (коэкспрессия) его редуктазы. В работе были хроматографически разделены и количественно охарактеризованы все наиболее значимые метаболиты Б(а)П. Полученные скорости формирования метаболитов для исследованных вариантов цитохрома P-4501A1 в отсутствие и в присутствии эпоксидгидролазы представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Скорость формирования метаболитов бенз(а)пирена различными вариантами цитохрома P-4501A1 в отсутствие эпоксидгидролазы*

Продукты	P-4501A1 (дикий тип)	P-4501A1.2	P-4501A1.4
3-гидрокси-Б(а)П	1,14±0,05	0,6±0,05	0,65±0,10
9-гидрокси-Б(а)П	0,73±0,03	0,25±0,04	0,46±0,06
Б(а)П-7,8-дигидродиол	0,41±0,02	0,18±0,03	0,36±0,06
Б(а)П-9,10-дигидродиол	0,10±0,01	0,10±0,01	0,12±0,06
Б(а)П-4,5-дигидродиол	–	–	–
Б(а)П-1,6-дион	0,14±0,01	–	0,02±0,03
Б(а)П-3,6-дион	0,39±0,03	0,17±0,02	0,12±0,03
Б(а)П-6,12-дион	0,39±0,03	0,25±0,02	0,30±0,06
Суммарная скорость превращения Б(а)П	2,79±0,05	1,27±0,05	1,83±0,05

*Скорости выражены в пмоль·пмоль⁻¹·мин⁻¹

Таблица 2

Скорость формирования метаболитов бенз(а)пирена различными вариантами цитохрома P-4501A1 в присутствии эпоксидгидролазы

Продукты	P-4501A1 (дикий тип)	P-4501A1.2	P-4501A1.4
3-гидрокси-Б(а)П	0,99±0,07	0,65±0,05	0,75±0,07
9-гидрокси-Б(а)П	0,51±0,05	0,21±0,02	0,33±0,03
Б(а)П-7,8-дигидродиол	0,42±0,03	0,23±0,02	0,35±0,03
Б(а)П-9,10-дигидродиол	0,41±0,03	0,23±0,02	0,42±0,03
Б(а)П-4,5-дигидродиол	0,05±0,005	0,02±0,003	0,05±0,004
Б(а)П-1,6-дион	0,18±0,02	0,01±0,002	0,06±0,003
Б(а)П-3,6-дион	0,39±0,03	0,18±0,015	0,29±0,02
Б(а)П-6,12-дион	0,40±0,03	0,23±0,02	0,24±0,02
Суммарная скорость превращения Б(а)П	2,47±0,07	1,28±0,05	1,67±0,07

Как видно из таблицы 1 в отсутствие эпоксидгидролазы суммарная скорость образования моногидроксипроизводных Б(а)П была 1,87, 0,85 и 1,11 пмоль/мин/пмоль цитохрома P-450 для CYP1A1.1, CYP1A1.2 и CYP1A1.4 соответственно. Суммарная скорость образования дигидроксипроизводных составляла 0,51 (CYP1A1.1), 0,28 (CYP1A1.2) и 0,50 пмоль/мин/пмоль для CYP1A1.4. Причем в отсутствие эпоксидгидролазы практически не наблюдалось формирование 4,5-диола. В ходе реакции происходило накопление некоторого количества хинонов с общей скоростью равной 0,92, 0,42 и 0,72 пмоль/мин/пмоль для CYP1A1.1, CYP1A1.2 и CYP1A1.4, соответственно. В целом, наибольшая скорость метаболизма Б(а)П была характерна для дикого типа цитохрома P-4501A1 (100 %), в то время как для CYP1A1.2 и CYP1A1.4 она была меньше приблизительно на 50 и 70 %, соответственно.

Данные таблицы 2 показывают, что эпоксидгидролаза дифференцировано влияла на распределение моно- и дигидроксиметаболитов Б(а)П. Так, в ее присутствии наиболее резко возрастало количество 9,10- и 4,5-диолов и лишь незначительно увеличивалась скорость формирования 3-ОН- и 9-ОН-производных Б(а)П. Также, практически, не наблюдалось изменений в скоростях образования 7,8-дигидродиола. Однако, в целом, это приводило к значительному суммарному увеличению в исследуемых системах дигидроксипроизводных Б(а)П.

На базе полученных данных обсуждена роль полиморфизма гена цитохрома P-4501A1 и соответствующих белков в индивидуальной чувствительности к действию канцерогенных ксенобиотиков.