

5. Schweinsburg BC, Alhassoon OM, Taylor MJ, et al. Effects of alcoholism and gender on brain metabolism /Am J Psychiatry. 2003 Jun;160(6):1180-3.

Резюме

Действие препарата Метовитан в организме направлено на активацию процессов транссульфирования и трансметилирования, что ведет к усилению биохимической системы антиоксидантной защиты и реакций детоксикации ксенобиотиков. Позитивный эффект препарата показан на крысах с моделями гипоксии и алкогольной интоксикации и подтвержден в производственных условиях на телятах в период эпидемии парагриппа.

Дія препарату Метовітан в організмі спрямована на активацію процесів транссульфування та трансметилування, що веде до посилення біохімічної системи антиоксидантного захисту та реакцій детоксикації ксенобіотиків. Позитивний ефект препарату продемонстровано на моделях гіпоксії та алкогольної інтоксикації на щурах і підтверджено в промислових умовах на телятах під час епідемії парагрипу.

The action of drug Metovitan is directed on activation of processes of transsulfurizing and transmethylation in cells that promotes increase of a biochemical system of antioxidation protection and reactions of xenobiotics detoxication. The positive effect of Metovitan on living organism had been shown on models of a hypoxia and alcoholic intoxication. The effect is confirmed on calfs during epidemic of a paraflu under production conditions.

ПОГОРЕЛКО Г.В., ФУРЦОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А.

Институт Общей Генетики РАН

ул. Губкина д.3, 119991, Москва, Россия, e-mail: gpogorelko@yandex.ru

НОВЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ СУПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МУТАНТОВ *A.thaliana*

Расшифровка полной нуклеотидной последовательности генома *Arabidopsis thaliana* в конце 2000г. позволила реально перейти к решению центральной проблемы молекулярной генетики высших растений – идентификации функции генов.

В последние 10-15 лет были разработаны методы для эффективного массового получения инсерционных мутантов *A. thaliana* (Feldmann et. al., 1987, Bechtold et. al., 1993). В результате были созданы представительные коллекции мутантных линий *A. thaliana*, семена которых собраны в коллекционных центрах ABRC, NASC, SALK и GABI.

Однако большинство созданных коллекций инсерционных мутантов содержат линии, несущие *loss-of-function* мутации – связанные с потерей функции генов, которые позволяют изучать функции только стабильно экспрессирующихся в ходе развития растений генов. Этим обусловлен интерес к индукции мутаций другого типа, например, мутаций, вызывающих суперэкспрессию генов. Индукция мутаций такого рода достигается с помощью векторов, Т-ДНК которых содержит около одного из бордеров сильный промотор (или энхансер) (Weigel et al., 2000).

Однако когда структура инсерции содержит энхансер, могут возникать мутации двух типов: *loss-of-function* мутации, связанные с инактивацией гена при встраивании в него инсерции, и мутации, обусловленные наличием энхансера в структуре инсерции. При массовом получении и анализе инсерционных мутаций, полученных с помощью такого рода векторов, необходимо иметь относительно простую и эффективную систему идентификации *loss-of-function* мутаций и мутаций, связанных с

суперэкспрессией генов – так называемых *gain-of-function* мутаций. Вектора для трансформации растений, несущие в составе Т-ДНК энхансеры, используются для получения суперэкспрессирующих мутантов *A.thaliana* уже более 10 лет (Koncz et al. 1994; Weigel et al., 2000). Однако, при использовании таких векторов, возникают технические и принципиальные сложности. Основная проблема, связанная с использованием этих векторов, заключается в необходимости решения вопроса – обусловлены ли наблюдаемые фенотипические изменения инактивацией гена за счет интеграции в него инсерции или суперэкспрессией близлежащих генов.

Материалы и методы

Растения *A.thaliana* Col-0 экотипа выращивались при 21-23°C с нормальным освещением (16 часов день, 8 часов ночь) лампами Phillips BioLux при 60% влажности.

Трансформация *A. tumefaciens* производилась методом «замораживания-оттаивания» (Höfgen R and Willmitzer L, 1988). Трансформация *Arabidopsis thaliana* производилась методом вакуумной инфльтрации (Bechtold and Pelletier, 1998).

Точную локализацию инсерций в геноме проводили при помощи модифицированного метода inverse PCR.

Результаты и обсуждения

Система векторов pEnLox/pCre.

Система двух векторов pEnLox (Рис.1) и pCre (Погорелко и др., 2007) используется следующим образом. Энхансер в составе Т-ДНК плазмидного вектора pEnLox окружен *loxP*-сайтами. Следующее поколение от скрещивания исследуемого инсерционного мутанта, полученного путем трансформации вектором pEnLox, с другой трансгенной линией *A. thaliana*, несущей ген *cre*, высевается *in vitro* на селективную среду с антибиотиком гигромицином и после отбора устойчивых растений обрабатывается экзогенно дексаметазоном, в результате чего происходит удаление энхансерной последовательности. После вырезания энхансера, в последовательности Т-ДНК, по-прежнему встроенной в геномную ДНК, остается ген гербицид устойчивости с промотором и один из *loxP*-сайтов. Таким образом этот оставшийся интегрированным в геном фрагмент Т-ДНК преобразуется в обычный тип инсерций, которые используются для получения *loss-of-function* мутантов, а сам мутант, после вырезания энхансера, преобразуется в обычного *loss-of-function* мутанта.



Рисунок 1. Физическая карта вектора pEnLox. На последовательности, ограниченной бордерами, показан ген устойчивости к селективному гербициду Баста, под контролем промотора и терминатора и энхансер окаймленный *loxP*-сайтами.

Получение коллекции инсерционных мутантов *Arabidopsis thaliana* при помощи вектора pEnLox.

Используя данную систему векторов, была получена начальная коллекция новых линий мутантов, несущих в геноме инсерцию Т-ДНК плазмиды pEnLox.

На первом этапе анализа семян T2 поколения было отобрано 156 устойчивых к гербициду Баста растений (Е-линий), и 8 устойчивых к антибиотику гигромицину растений (С-линии).

Для подтверждения наличия инсерции/инсерций Т-ДНК в геноме мутантов анализируемых линий растений, а также для определения их количества, было осуществлено два последовательных эксперимента.

Анализ Т3 поколения

Три четверти анализируемых линий показали в Т3-поколении наследование маркера устойчивости к гербициду по моногенному типу, что соответствовало расщеплению 3:1, и одна четверть мутантов содержала в геноме 2 независимо интегрированных инсерции.

Данные, полученные путем анализа расщеплений по признаку устойчивости к селективному маркеру в Т3-поколении отобранных линий, были проверены более точно с помощью блот-гибридизации по Саузерну рестрицированной геномной ДНК с фрагментом Т-ДНК плазмиды pEnLox.

Установление точной локализации инсерций в геноме.

На следующем этапе анализа геномную ДНК мутантов линий: E1, E4, E7, E10, E12, E13, E14, E15, E17, E18, E20, E21, E23, E30, E31, E35, E37 и E40 использовали для RC-PCR. В результате были амплифицированы 38 независимых «гибридных» фрагментов ДНК, состоящих из околорядерной последовательности Т-ДНК и примыкающей к ней неизвестной геномной.

Полученные FSFs были секвенированы и результаты были проанализированы с помощью программы BLAST сервера NCBI, что позволило конкретно локализовать нахождение инсерций Т-ДНК в геномах исследуемых E-мутантов, а также определить возможные гены, на экспрессию которых возможно повлияла инсерция..

Проверка работоспособности системы векторов pEnLox/pCre.

Для доказательства работоспособности системы векторов pCre/pEnlox мы использовали 6 E-линий (E1, E4, E7, E9, E10, E12) и 8 гомозиготных C-линий (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8), не отличающихся от фенотипа растений дикого типа. В связи с тем, что для скрещивания необходимы зрелые растения, в работе использовались растения 4-х недельного возраста.

Скрещивание E-линий с C-линиями.

Не опыленные бутоны E-растений (акцепторы) были скрещены со зрелыми цветами C-линий (доноры) путем непосредственного тесного контакта таким образом, чтобы донорная пыльца максимально покрыла поверхность бутона. Известно, что для максимальной эффективности оплодотворения сторонней пыльцой у однодомных растений самоопылителей с обоеполыми цветками необходимо удалить андроцей до созревания гинецея и раскрыть бутон для увеличения вероятности попадания пыльцы на поверхность пестика. Такие кропотливые процедуры, требующие большого опыта, часто приводят к гибели цветков. Однако, в случае системы pCre/pEnLox, как упоминалось выше, скрещиваемые растения несут принципиально разные селективные маркеры и процесс получения мутантов, несущих Т-области обоих векторов, значительно упрощается.

Удаление энхансера из состава интегрированной в геном Т-ДНК.

Через 2-3 дня после пересадки в открытый грунт, устойчивые к гигромицину растения опрыскивались 0.1 μ M дексаметазоном один раз в день в течение 6 дней и гербицидом Баста (250мг/л) 6 раз через день в течение 12 дней. После обработки вторым селективным маркером и дексаметазоном – стимулятором изменения третичной структуры GR-домена белка фьюжена CreGR, в течение нескольких часов происходило проникновение в ядра клеток рекомбиназы Cre и удаление энхансера из геномной ДНК под ее воздействием.

Проверка эффективности удаления методом ПЦР

Через неделю после обработки, геномную ДНК растений мы проанализировали при помощи ПЦР, используя фланкирующие энхансер праймеры, и показали 100% эффективность вырезания внутреннего фрагмента между двумя *lox*-сайтами. Мы

использовали геномную ДНК - пул из 5-ти независимых «двойных» мутантов для каждой E-линии.

Идентификация генов, супер-экспрессия которых влияет на морфогенез *Arabidopsis thaliana*.

Среди отобранных нами трансформантов нам удалось выявить 3 линии: E9, E78 и E134, отличающихся от растений дикого типа по морфологическим признакам. Проверка точной локализации инсерций в морфологических мутантах показала, что во всех трех линиях Т-ДНК встроилась непосредственно перед старт-кодонами генов таким образом, что энхансер направлен на старт-кодоны и потенциально может вызывать супер-экспрессию этих генов (Табл. 1).

Таблица 1

Локализация инсерций в линиях с измененной морфологией

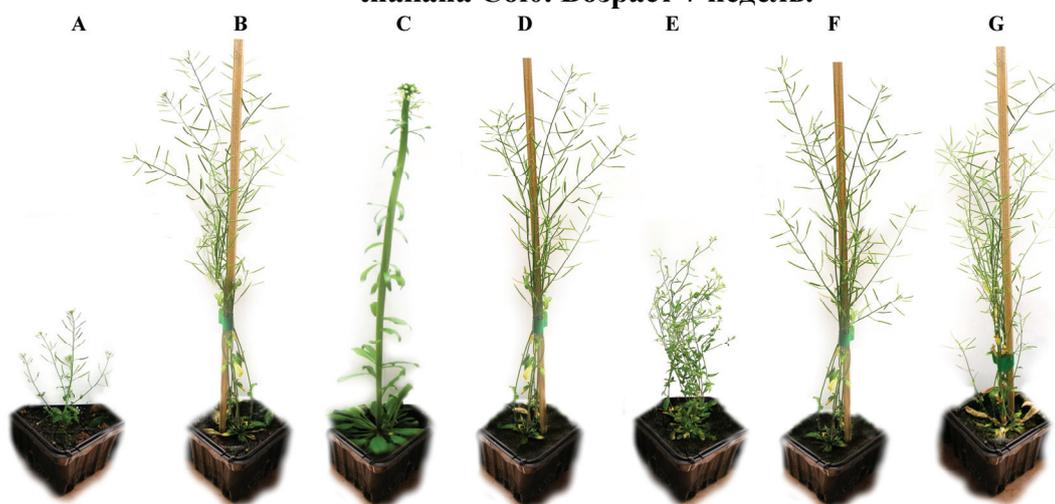
№ линии	Ген/Длина	Описание продукта	Стрра гена	Локализация/Ориентация инсерции	GenBank Acc.№
E9	<i>AT5G10080</i> 2538 п.н.	Белок семейства аспартил протеаз	9 экз.	Инсерция за 400 п.н. до старт-кодона. Энхансер направлен на старт-кодон.	DX575044
E78	<i>AT1G33390</i> 4371 п.н.	DEAH-бокс АТФ-зависимая хеликаза	8 экз.	Инсерция за 530 п.н. до старт-кодона. Энхансер направлен на старт-кодон.	EI183464
E134	<i>AT5G13760</i> 2922 п.н.	Неизвестный белок содержащий пролин богатый домен	5 экз.	энхансер за 270 п.н. до старт кодона и смотрит на него	EI232171

Реверсия E-мутантов к фенотипу дикого типа.

После удаления энхансера из геномной ДНК E-мутантов экспрессия генов *At5g10080*, *At1g33390* и *At5g13760* была остановлена тогда как остаток Т-ДНК присутствовал в геноме. Растения мутантной линии с удаленным энхансером обладали фенотипом растений дикого типа, т.е. являлись полными ревертантами (Рис.2).

Рисунок 2

Сравнение фенотипов растений E9, E9/C4 E78, E78/C4, E134, E134/C4 и A. thaliana Col0. Возраст 7 недель.



- (A) Исходный мутант E9
- (B) «Двойной мутант» E9/C4 после скрещивания обработанный дексаметазоном
- (C) Исходный мутант E78
- (D) «Двойной мутант» E78/C4 после скрещивания обработанный дексаметазоном
- (E) Исходный мутант E134
- (F) «Двойной мутант» E134/C4 после скрещивания обработанный дексаметазоном
- (G) Растение дикого типа *A. thaliana Col0*

Основываясь на полученных данных можно утверждать, что супер-экспрессия гена *At5g10080*, кодирующего белок класса аспартиловых протеаз А1 локализирующегося в клеточных мембранах приводит к нарушениям нормального морфогенеза растений – замедляет рост, изменяет окраску и приводит к уменьшенному габитусу взрослых растений. Супер-экспрессия гена *At1g33390*, кодирующего белок класса АТФ-зависимых хеликаз вызывает нарушения нормального развития стеблей растений, а именно вызывает развитие фасцированного стебля. Изменение экспрессии гена *At5g13760*, кодирующего белок содержащий пролин-богатый домен приводит к нарушениям нормального развития растений, а именно вызывает замедление роста и уменьшение фертильности.

Литература.

1. *Feldmann, K., Marks, M.*, Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 1987. 208, 1-9
2. *Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.*, In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Paris: C. R. Acad. Sci. Sciences de la vie / Life sciences. 1993-316, 1194-1199.
3. *Bechtold, N., Pelletier G.*, In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol.* 1998. 82, 259-266
4. *Höfgen, R., Willmitzer, L.*, Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucl. Acids Res.* 1988. 16, 9877
5. *Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hrouda, M., Bachmair, A., Schell, J.*, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1994- B1-22
6. *Pogorelko, G., Fursova, O., Ogarkova, O., Tarasov, V.*, New vector system for induction of gene expression in dicotyledonous plants. *Genetika (Rus)* 2007. 43-2, 194-201
7. *Weigel, D. et al.*, Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 2000. 122-4, 1003-13

РАХМЕТОВ Д.Б.², БАЄР Г.Я.¹, СТАДНІЧУК Н.О.², ЄМЕЦЬ А.І.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,*

Україна, 03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 148,

E-mail: galinabayer@univ.kiev.ua

²*Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України,*

Україна, 01014, Київ, вул. Тимірязєвська, 1

ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СОМАКЛОНАЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ПАЛЬЧАСТОГО ПРОСА

Традиційний селекційний процес, що базується на використанні статевої гібридизації як засобу передачі генетичної інформації, дозволив досягти значних успіхів у підвищенні урожайності і якості багатьох культур, однак інтенсифікація сільського господарства ставить перед селекціонерами складні задачі по створенню нових сортів, що відрізняються високою врожайністю, стійкістю до хвороб, шкідників, стресових факторів навколишнього середовища, високою пластичністю. Для створення більш досконалих сортів необхідно розробляти нові прискорені методи підвищення результативності селекційного процесу. Одним з важливих шляхів у цьому напрямі на сьогоднішній день є використання біотехнологічних прийомів, одним з яких є отримання соматоклональних варіантів в культурі *in vitro*, які набули нових ознак. Перевагою даного методу є поява нових форм з високим рівнем адаптації і неспецифічної стійкості до шкідливих факторів навколишнього середовища з покращеними господарсько цінними характеристиками (Arun et al., 2003; Bulk, 1991;