**Введение**

Часто новейшие гены, кодирующие белки одного метаболического пути или определяющие близкородственные функции, регулируются согласованно. Экспрессия таких генов начинается и заканчивается или согласованно продолжается в ответ на один и тот же регуляторный сигнал. Гены, объединенные в опероны, транскрибируются с промотора, находящегося на 5’-конце такой группы генов, в виде единственной молекулы РНК, которая в дальнейшем подвергается процессу «созревания». Часть генов в хлоропластном геноме входит в состав оперонов. Это свойство они унаследовали от своих предшественников - сине-зеленых водорослей. Хлоропласты имеют также прокариотического типа трансляционную систему и характерные для бактерий регуляторные транскрипционные элементы. Однако в процессе эволюции хлоропласты приобрели и некоторые эукариотические признаки - наличие интронов в генах, процесс редактирования РНК и др.

**Особенности транскрипции генов оперонов**

С помощью метода run on транскрипции была изучена интенсивность транскрипции нескольких оперонов пластома ячменя. Основой транскрипционной системы служили лизированные хлоропласты, которые были выделены из первых листьев ячменя разного возраста (4-х, 9-ти и 18-ти дневные).

В ходе реакции транскрипции (длительность 10 мин) во вновь синтезированные молекулы РНК включался радиоактивно-меченный УТФ (α32P-УТФ), что позволяло в дальнейшем детектировать только вновь синтезированные транскрипты. Ограниченное время реакции практически исключает влияние процессов деградации РНК на количество синтезированных транскриптов.

Установлено, что у большинства изученных оперонов гены транскрибируются с различной интенсивностью. Наиболее равномерная транскрипция наблюдалась для rpo-оперона, содержащего rpoB-rpoC1-rpoC2 гены. Необходимо отметить, что это, вероятно, единственный оперон пластома ячменя, состоящий только из генов, кодирующих субъединицы одного белкового комплекса (субъединицы РНК-полимеразы бактериального типа). Другие опероны, также несущие большинство генов одной функциональной группы, характеризовались различиями в интенсивности транскрипции генов.

Так, у оперона rps2-atpI-atpH-atpF-atpA считывание РНК значительно повышалось (в 7-10 раз) для atpF гена по сравнению с предыдущими и последующим геном. Транскрипция гена psaB в опероне psaA-psaB-rps14 так же была интенсивнее как минимум вдвое, чем транскрипция первого и последнего генов оперона. Отмечены и значительные изменения в оперонах, содержащих гены, кодирующие компоненты различных функциональных групп хлоропластов. Так оперон atpB-atpE-trnV-ndhС-ndhK-ndhJ характеризуется значительно большей интенсивностью транскрипции генов atpB и trnV, в сравнении с другими генами (превышение в среднем не менее чем в 3 раза).

**Структурно-термодинамические исследования генов**

Проблема самоорганизации белков, то есть самопроизвольного сворачивания полипептидной цепи в уникальную пространственную структуру, остается одной из центральных в современной молекулярной биологии и имеет три основных аспекта: структурный, термодинамический и кинетический.

Наиболее подходящими для исследования самоорганизации являются маленькие глобулярные белки, способные поддерживать нативную структуру без дополнительных факторов, таких как прочно связанные лиганды или дисульфидные мостики.

Одними из наиболее популярных объектов исследований являются изолированные SH3 домены, полученные в виде рекомбинантных белков. Ранее путем удлинения центральной β - шпильки на восемь остатков было сконструировано несколько химерных вариантов спектринового SH3-домена. Предполагалось, что такая вставка придаст β - шпильке дополнительную стабильность, и она будет выступать за пределы глобулы в виде «носа», в связи с чем эти химерные белки были названы «Бержераками». Они уже были использованы для уточнения ряда кинетических аспектов процесса самоорганизации, а в настоящее время изучаются нами в качестве удобной модели для определения термодинамических параметров образования изолированной β-структуры.

Калориметрические данные были получены нами для нескольких вариантов Бержераков в широком диапазоне pH при различных концентрациях белка. Согласно этим данным тепловое разворачивание белков происходит равновесно, обратимо и с хорошей точностью описывается моделью двух состояний при низких концентрациях белка и pH ниже 3,5. То есть выступающий нос образует с телом домена единую кооперативную систему, тепловой эффект разворачивания которой выше теплоты денатурации исходного белка в среднем на 14 кДж/моль.

С целью структурной интерпретации полученных данных методом рентгеноструктурного анализа была определена трехмерная структура одного из белков (так называемого SHH варианта), которая показала, что вставленный фрагмент действительно образует жесткую β-шпильку. В случае SHH взаимодействие этих шпилек приводит к образованию тетрамеров в процессе кристаллизации химер.

**Поиск и картирование элементов геномных последовательностей**

Нами разработан экспериментальный метод селекции, идентификации и картирования потенциальных энхансерных элементов внутри длинных геномных последовательностей. Предложенный метод позволяет проводить одновременный поиск всех элементов, проявляющих энхансерную активность, среди множества коротких фрагментов ДНК, перекрывающих исследуемую область генома.

Используемый в работе подход основан на способности энхансеров активировать промотор репортерного гена. Набор коротких фрагментов ДНК, полученных расщеплением участка длинной 1 млн. п.н. хромосомы 19 человека, был клонирован в специально сконструированный нами самоинактивирующийся ретровирусный вектор, содержащий репортерный ген неомицин-фосфотрансферазы II под контролем минимального промотора цитомегаловируса.

В дальнейшем был получен пул ретровирусных частиц, которыми инфицировали клетки линии HeLa, после чего, были отобраны неомицин-устойчивые клоны, содержащие интегрированные в геном конструкции с фрагментами ДНК, обладающими активностью энхансеров. ДНК неомицин-устойчивых клонов использовали для амплификации соответствующих фрагментов, которые затем клонировали в плазмидный вектор. Таким образом, была получена библиотека потенциальных энхансеров. Клоны библиотеки секвенировали и была построена карта расположения энхансеров в интересующем нас локусе хромосомы 19 человека. Анализ библиотеки выявил 15 энхансер-подобных последовательностей в полигенном локусе хромосомы 19 человека длинной 1 млн. п.н., энхансерная активность 13 из них была подтверждена в экспериментах по транзиентным трансфекциям с помощью системы двойной люциферазной детекции. Найденные последовательности преимущественно расположены в 5′ прилегающих к генам областях либо внутри интронов.

**Анализ гена растительных изопероксидаз**

Пероксидаза - один из распространенных ферментов, интерес к изучению которого с годами не ослабевает. Среди кодирующих растительных пероксидаз, образующих большое мультигенное семейство, особое место занимают патоген-индуцируемые пероксидазы, активность которых коррелирует с развитием устойчивости растений к фитопатогенам. Ранее в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УНЦ РАН было показано, что некоторые изопероксидазы у многих видов растений характеризуются свойством связывания с хитином.

К сожалению, на фоне активного изучения физиологических функций пероксидаз роль структуры хитин-связывающего сайта в последующем проявлении растениями устойчивости к фитопатогенам остается слабо изученной. Можно предположить, что свойство сорбции пероксидаз на хитин связано с наличием общего полисахарид-связывающего мотива в их аминокислотной последовательности, что предполагает и определенную гомологию в структуре генов, их кодирующих.

Изучение молекулярных механизмов регуляции отдельных изопероксидаз внесет вклад в понимание физиологических основ устойчивости растений к фитопатогенам. Ранее, к нуклеотидной последовательности хитин-связывающего сайта гена анионной пероксидазы пшеницы были подобраны и сконструированы праймеры. С использованием данной пары праймеров нами была проведена ПЦР на ДНК разных видов пшеницы, эгилопса, арабидопсиса и табака.

Обнаружено, что у испытанных видов пшеницы и эгилопса проявляется целевой ампликон размером 190-200 п. н., что совпадает с теоретически рассчитанными размерами, отжигающимися полученными праймерами с гена анионной пероксидазы этих злаков. Данный факт подтверждает предположение о сходной организации этого участка гена. Интересно, что у Arabidopsis thaliana ампликон, полученный после ПЦР, был размером около 150 п. н. Анализ генов, кодирующих пероксидазы, по известным из международного генбанка нуклеиновым последовательностям Arabidopsis thaliana, показал, что из большого количества генов пероксидазы арабидопсиса (70 генов) только у одного имелся подобный мотив размером 175 нуклеотидов и близкий к полученному после ПЦР. При использовании ДНК Nicotiana tabacum, к сожалению, не происходило формирования искомого ампликона. Поскольку анализ известных генов пероксидазы Nicotiana tabacum также не выявил подобных последовательностей, можно предположить, что структура этого ампликона у табака отличается от полученной для пшеницы и требует подбора другой пары праймеров. Таким образом, нами проведен анализ размера ампликона хитин-специфичного сайта пероксидаз из разных видов растений. Более точные результаты предполагается получить после секвенирования ампликонов этих видов и сравнение их последовательностей.

**Органная специфичность метилирования и экспрессии промотора гена пататина**

Промотор гена пататина класса I – это тканеспецифичный промотор, обеспечивающий экспрессию гена главным образом в клубнях. Ранее было показано, что невысокий уровень экспрессии обнаруживается и в других органах картофеля. Проведенный нами количественный флюориметрический анализ функционирования пататинового промотора в трансгенных линиях картофеля сорта Дезире B33::GUS, где репортерный ген GUS поставлен под контроль пататинового (В33) промотора показал, что уровень экспрессии уменьшался в ряду клубень>>стебель>лист>корень. Органная специфичность функционирования пататиновых генов может зависеть от эпигенетических механизмов, в том числе метилирования ДНК. В данной работе определяли уровень метилирования остатков цитозина консервативного проксимального участка В33-промотора. В исследуемом участке (477 н.о.) промотора выявлены два тетрануклеотида GCGG, остаток цитозина которых является потенциальным субстратом ДНК-метилазы.

Степень метилирования этих тетрануклеотидов определяли с помощью метилчувствительной рестриктазы AciI, которая способна расщеплять узнаваемый сайт только в том случае, если он не содержит метилированный цитозин. Обработанные AciI препараты ДНК, выделенные из разных органов/линий картофеля, использовали в качестве матриц для ПЦР с праймерами на исследуемый участок В33-промотора или на участок промотора и начало гена GUS. ПЦР на матрицах необработанных рестриктазой препаратов ДНК из разных органов приводила к наработке примерно равных количеств амплифицируемой ДНК В33-промотора. Это указывало на сходство набора матриц и их доступности в препаратах ДНК, выделенных из разных органов растения. Однако после рестрикции AciI количества получаемых ампликонов сильно различались в зависимости от источника ДНК. Наиболее бледными были полосы ампликонов, полученные с использованием рестрицированных ДНК из клубней и листьев анализируемых растений. Это свидетельствует о значительной степени расщепления пататинового промотора рестриктазой AciI, т.е. о низком уровне его метилирования в данных органах. Максимальный уровень метилирования промотора был выявлен в корнях и стеблях растений картофеля.

Существенных различий между трансгенными и нетрансгенными растениями картофеля по уровню метилирования GCGG-сайтов промотора не обнаружено. Органная специфичность метилирования встроенного В33-промотора в B33::GUS-трансформантах была сходной со специфичностью метилирования эндогенного пататинового промотора. Обнаружена существенная обратная корреляция между уровнем метилирования GCGG-сайтов В33-промотора и уровнем его активности в органах растений. Вместе с тем, неполная обратная корреляция метилирования и экспрессии В33-промотора в разных органах предполагает участие, помимо метилирования, и других регуляторных факторов, определяющих органную специфику промоторной активности.

**Изменение расположения хромосомных генов**

Согласно современным представлениям, как интерфазные хромосомы, так и гены занимают в ядре достаточно жестко определенные радиальные положения. Считается общепринятым тот факт, что близкое расстояние между локусами может являться причиной незаконной рекомбинации между ними, часто приводящей к развитию лейкозов. Возникающие в результате транслокаций лейкозы, могут носить как первичный, так и вторичный характер. Возникновение вторичных лейкозов связывают с терапией рака ингибиторами ДНК топоизомеразы II. ДНК топоизомераза II является жизненно необходимым ферментом, так как катализирует топологические изменения в ДНК в ходе сегрегации дочерних хромосом после завершения процесса репликации ДНК, транскрипции, рекомбинации и реорганизации хроматина. Именно поэтому при терапии раковых заболеваний применяются препараты, ингибирующие активность топоизомеразы II и вызывающие гибель активно делящихся клеток.

В настоящей работе исследовалось взаимное пространственное расположение генов, являющихся частыми партнерами при транслокациях, ведущих к возникновению первичных и вторичных лейкозов (AML/ETO, MLL/AF4, AF6, AF9, BCR/ABL).

Методом флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) было показано, что радиальное распределение флуоресцентных сигналов, соответствующих гену ETO и хромосомной территории 8-ой хромосомы во внутриядерном пространстве делящихся клеток является случайным. Также было показано, что при обработке клеток этопозидом (VP16) - ингибитором ДНК топоизомеразы II - характер распределения сигналов резко меняется и сигналы, в значительной степени, группируются на внутриядерной орбите, соответствующей 45% радиуса ядра.

Для частого партнера гена ETO по транслокациям, гена AML, было показано, что основная масса сигналов, соответствующих гену AML и хромосомной территории 21-ой хромосомы в интактных клетках, сосредоточена на той же орбите (45% радиуса ядра), и что такое распределение сигналов не изменяется после обработки клеток этопозидом. Анализ размера геномной ДНК с применением метода электрофоретического разделения ДНК в пульсирующем поле показал возникновение большого числа разрывов в ДНК вследствие обработки клеток этопозидом.

Таким образом, продемонстрировано, что в условиях, имитирующих противораковую терапию, происходит сближение генов ETO и AML. Это сближение, сопровождающееся расщеплением ДНК ингибитором топоизомеразы II, может вести к хромосомным транслокациям и развитию вторичных лейкозов.

Предполагается, что анализ изменений радиального распределения возможных генов-партнеров по транслокациям во внутриядерном пространстве делящихся клеток при терапии онкологических заболеваний с применением различных типов химиотерапевтических агентов, может лечь в основу тест-системы, направленной на прогнозирование и предотвращение случаев возникновения вторичных лейкозов.

**Модифицированные гены**

Интеграция ДНК вируса иммунодефицита человека в геном клетки является ключевой стадией жизненного цикла вируса, поэтому представляет интерес разработка препаратов, подавляющих активность вирусного фермента интегразы. К настоящему моменту найден ряд эффективных ингибиторов интегразы, действующих на активный центр фермента, однако быстро развивающаяся устойчивость вируса к этим препаратам делает актуальной разработку новых ингибиторов интегразы.

Ранее нами было показано, что конъюгаты 11-звенных одноцепочечных олигонуклеотидов с гидрофобными молекулами, такими как эозин, флуоресцеин и олеиновая кислота, эффективно подавляют активность интегразы in vitro, связываясь с комплексом интеграза-вирусная ДНК и разрушая его. Для определения участка связывания конъюгата было проведено ковалентное присоединение конъюгата олигонуклеотида с флуоресцином к ферменту и протеолитическое расщепление продукта присоединения. Масс-спектрометрический анализ образовавшихся нуклеотидопептидов позволил установить, что ингибитор взаимодействует с интегразой вблизи Lys236 в C-концевом домене фермента. Для подтверждения сайта связывания конъюгата мы провели замену Lys236 в составе интегразы на Ala. Такая аминокислотная замена резко снижала как способность фермента связывать вирусную ДНК, так и его каталитическую активность.

Основываясь на полученных данных, мы высказали предположение о механизме действия конъюгатов. Согласно нашим представлениям, отрицательно заряженная олигонуклеотидная часть конъюгата связывается с С-концевым доменом интегразы, содержащим большое количество положительно заряженных аминокислот, за счет электростатических взаимодействий, в то время как гидрофобная часть проникает в гидрофобный кор домена.

**Заключение**

Таким образом для нескольких оперонов обнаружен эффект значительного различия интенсивности транскрипции индивидуальных генов. Такие взаимодействия между олигонуклеотидным конъюгатом и комплексом интегразы с вирусной ДНК вызывают конформационные изменения в ферменте, приводящие к диссоциации комплекса. Мы полагаем, что при замене Lys236 на гидрофобный остаток Ala структура С-концевого домена аналогичным образом меняется, что приводит к снижению каталитической активности фермента и его способности связывать вирусную ДНК. Таким образом, мы показали, что олигонуклеотидные конъюгаты являются высокоэффективными ингибиторами интегразы ВИЧ-1, которые, в отличие от большинства существующих ингибиторов, связываются вне активного центра фермента и подавляют активность интегразы по новому механизму.

**Список литературы**

1. Концепция перехода Российской Федерации к устойчивому развитию. М., 2006.
2. Lande R. Statistic and partitioning of species diversity and similarity among multiple communities // Oikos. 2006. V. 76.
3. Summerville K. S., Boulware M. J., Veech J. A., Crist T. O. Spatial variation in species diversity and composition of forest lepidoptera in eastern deciduous forests of North America // Cons. Biol. 2008. V. 17.
4. Wagner H. H., Wlidi O., Ewald C. W. Additive partitioning of plant species diversity in an agricultural mosaic landscape // Landscape Ecology. 2009.
5. Гиляров М.С., Стриганова Б.Р. Количественные методы в почвенной зоологии. М. Наука. 2007.
6. Flegg J.J.M. Extraction of Xiphinema and Longidorus species from soil by a modification of Cobb's decanting sieving technique // Ann. Biol. 2007.
7. Seinchorst J.W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin // Nematologica. 2007. Vol. 4.
8. Шестаков Л.С., 2008. «К изучению вибрационных сигналов клопов-щитников (Heteroptera, Asopinae) европейской части России.//Зоол. Журнал Т. 87. №1. с.36-41.
9. Gogala M., 2007. Vibration producing structures and songs of terrestrial Heteroptera as systematic character. / Biol. Vestn. 32. T. 1. P. 19-36.
10. Ванюшин Б. Ф. (2007) Энзиматическое метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия, №70, 598-611.
11. Rocha-Sosa M., et al. (2009) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene // The EMBO Journal, № 8, р. 23-29.
12. Юнусова А.К., Рогулин Е.А., Артюх Р.И., Железная Л.А., Матвиенко И.Н. (2007) Никаза N.Вsp6I – большая субъединица гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции R.BspD6I // Биохимия, т. 71, № 7.
13. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Альжанова Д.В., Матвиенко Н.И. (2008) Сайт-специфическая никаза из штамма Bacillus species D6 // Биохимия, т. 66, №9.
14. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I. and Bartunik H.D. (2008) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the site-specific DNA nickase Nb.BspD6I. Acta Crystallographica F61.
15. Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, Haupt S, Brown JW, Taliansky M. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection.EMBO J. 2008 Apr 18;26(8):2169-79. Epub 2007 Apr5.
16. Kim SH, Macfarlane S, Kalinina NO, Rakitina DV, Ryabov EV, Gillespie T, Haupt S, Brown JW, Taliansky M. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 26;104(26):11115-20. Epub 2008.
17. Чертопруд М.В., 2008. Родниковые сообщества макробентоса Московской области // Журнал Общей Биологии. 67. 5.