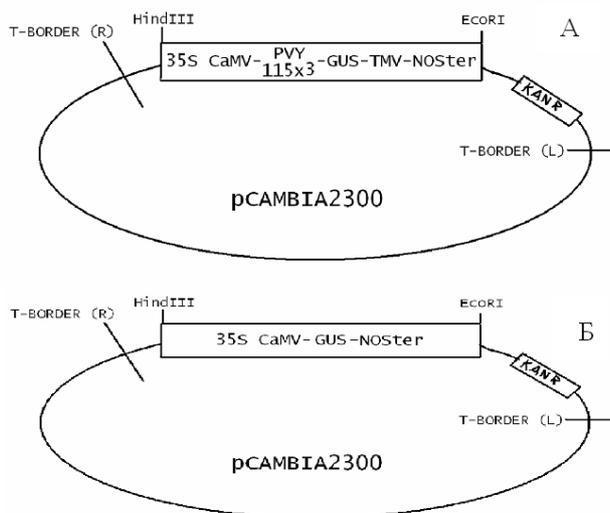


Конструкции были клонированы в бинарную плазмиду pCAMBIA 2300, содержащую 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты, обеспечивающий высокую экспрессию гена во всех органах растения и терминатор нопалин синтазы (*NOS terminator*), ответственный за сигнал полиаденилирования (рисунок 1).



А - содержащие 35S CaMV-промотор, энхансерные последовательности (115x3 или PVY), репортерный ген GUS и терминатор нопалин синтазы.

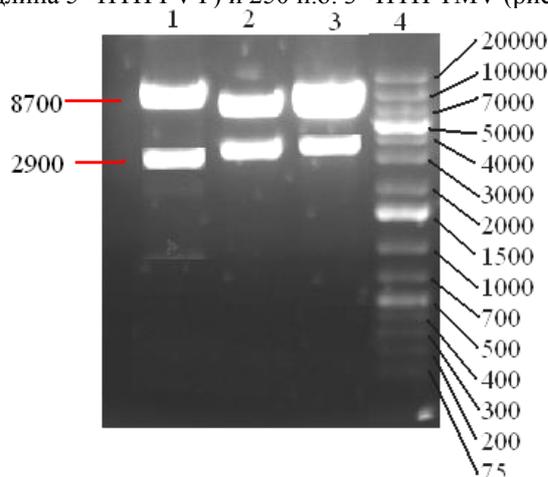
Б – контроль, не имеющий энхансерных последовательностей

Рисунок 1 - Бинарные плазмиды pCAMBIA2300

Тем самым нами были созданы следующие конструкции: 35S-GUS-NOS-pC (контроль), 35S-115x3-GUS-TMV-NOS-pC (в 5'-лидере 3xARC-1, в 3'-нетранслируемой области 3'-НТП вируса табачной мозаики) и 35S-PVY-GUS-TMV-NOS-pC (в 3'-нетранслируемой области (НТО) 3'-НТП вируса табачной мозаики и 5'-НТП Y-вируса картофеля в 5'-НТО)

Полученные конструкции были проверены методом рестрикционного анализа. Данные конструкции были обработаны рестриктазами *HindIII* и *EcoRI*, для вырезания фрагмента, который мы клонировали в плазмиду pCAMBIA2300.

В случае контроля размер вырезанного фрагмента должен быть примерно 2900 пар оснований (п.о.): 35S-промотор – 750 п.о., репортерный ген GUS – 1850 п.о. и NOS-терминатор 275 п.о. При рестрикции конструкции 35S-115x3-GUS-TMV-NOS-pC длина фрагмента должна быть примерно 3200 п.о.: к данным контроля добавляется длина последовательности 115x3 – 80 п.о. и 250 п.о. 3'-НТП TMV. Длина вырезаемого фрагмента при обработке рестриктазами конструкции 35S-PVY-GUS-TMV-NOS-pC должна быть порядка 3300 п.о.: к длине контрольного фрагмента добавляется 184 п.о. (длина 5'-НТП PVY) и 250 п.о. 3'-НТП TMV (рисунок 2).

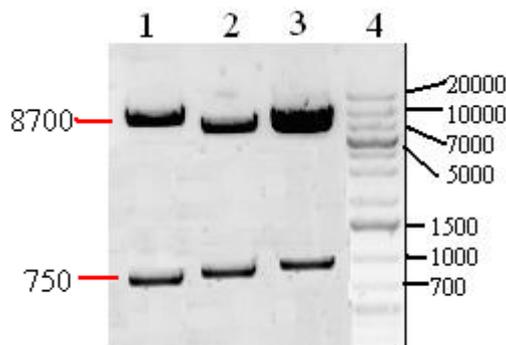


– рестрикция 35S-GUS-NOS-pC (контроль, не содержит энхансеров), 2 - 35S-115x3-GUS-TMV-NOS-pC (в 5'-лидере 3xARC-1, в 3'-нетранслируемой области 3'-НТП вируса табачной мозаики), 3 - 35S-PVY-GUS-TMV-NOS-pC (в 3'-нетранслируемой области 3'-НТП вируса табачной мозаики, в 5'-лидере последовательность 5'-НТП Y-вируса картофеля), 4 – стандартные молекулярные маркеры.

Рисунок 2 - Рестрикционный анализ конструкций (*HindIII* и *EcoRI*).

Для обнаружения комплекса энхансерных последовательностей и 35S-промотора была осуществлена рестрикция ферментами *Hind*III и *Nco*I. При данном анализе размер фрагмента в контроле должен быть сам 35S-промотор (длина ~750 п.о.), а в двух других случаях 35S-промотор должен быть сцеплен с ЭП (в случае с 35S+115x3 длина ~850 п.о., в случае 35S+PVY длина 950 п.о.) (рисунок 3).

1 - рестрикция 35S-GUS-NOS-pC (контроль), 2 - 35S-115x3-GUS-TMV-NOS-pC,



3 - 35S-PVY-GUS-TMV-NOS-pC, 4 – стандартные молекулярные маркеры.

Рисунок 3 - Рестрикционный анализ конструкций (*Hind*III и *Nco*I).

В дополнение к рестрикционному анализу все плазмиды были секвенированы.

Конструкции, клонированные в бинарную плазмиду были трансформированы в агробактерии с помощью метода электропорации. Селекцию проводили на агаризованной LB-среде с селективными маркерами (антибиотиками канамицин 50мкг/мл и карбенициллин 50мкг/мл). Для трансформации в растения, агробактерии росли в жидкой LB-среде до достижения оптической плотности $O.D_{600}=0.5-1.0$ (1.5×10^9 кл на мл). Клетки осаждались центрифугированием 10 минут при 4000 об/мин при 4°C. Осадок промывали стерильной водой (50 мл) 2 раза. Затем осадок промывали 5% раствором сахарозы (10 мл). Осадок растворяли в 5% растворе сахарозы (300 мл). На 300 мл 5% сахарозного раствора агробактерий добавлялось 75 мкл Silwet L-77 (в концентрации 0,025%, большая концентрация может быть токсична). Silwet L-77 – это неионный увлажняющий органосиликон, который добавляется непосредственно перед трансформацией.

Трансформация в растения производилась методом погружения цветковой части растения в 5% сахарозный раствор агробактерий. Данная процедура повторялась дважды с периодом в 7 дней. Для повышенной эффективности данная процедура может быть повторена несколько раз.

В результате экспериментов, были созданы конструкции, обеспечивающие высокую экспрессию гена в растениях и проведена их трансформация в растения *Arabidopsis thaliana*. В дальнейшем планируется скрининг семян на стандартной среде Мурасиге-Скуга с селективным маркером и количественный анализ продукта репортерного гена.

Литература

1. Kozak, M. *The scanning model for translation: an update* // *Cell Biol.* 1989, V. 108, P.229-241.
2. Gallie, D.R. *Translational control of cellular and viral mRNAs*//, *Plant Mol. Biol.* 1996, V.32, P.145-158.
3. Fuetterer, J. and Hohn, T. *Translation in plants-rules and exceptions.*// *Plant Mol. Biol.*, 1996, V. 32, P.159-189.
4. Акберенов Р.Ж. *Исследование молекулярных механизмов инициации трансляции мРНК у растений (автореферат)*. – А: Домино, 2002, 26с.
5. R. Zh. Akbergenov, S. Sh. Zhanybekova, R. V. Kryldakov, A. Zhigailov, N. S. Polimbetova, T. Hohn and B. K. Iskakov. *ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs* // *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, N. 1, P. 239-247.
6. Gallie, D.R., Sleat, D.E., Watts, J.W., Turner, P.C. and Wilson, T. M. A. *The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo*// *Nucleic Acids Res.* 1987, V. 15, P. 3257-3273.
7. Maniatis T. et al. *Molecular cloning, book I*, 1989.
8. Bent A. *Arabidopsis thaliana floral dip transformation method* // *Methods Mol Biol.* 2006, V. 343, P. 87-103.

Тұжырым

Жұмыс барысында трансляцияның жоғары деңгейін қамтамасыз ететін ДНҚ-конструкциялары алынды және олардың *Arabidopsis thaliana* өсімдігіне трансформациясы жүзеге асырылды.

Summary

As the result of the experiment the translational enhancing elements containing DNA constructs were created and were transformed into *Arabidopsis thaliana* by “Floral Dip” protocol.

Карпенюк Т.А., Бейсембаева Р.У., Гончарова А.В.

ГАПТОГЛОБИН И ЕГО КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Плазма крови человека содержит белки-маркеры (белки острой фазы), концентрация которых быстро реагирует на процессы, происходящие при воспалительном, опухолевом, бактериальном и прочих повреждениях. В статье приведен обзор данных по биологическому и клиническому значению одного из белков острой фазы – гаптоглобина.

Гаптоглобин (Hr) содержится в крови всех млекопитающих и представляет собой гликопротеид α_2 -глобулиновой фракции белков плазмы. Синтез гаптоглобина происходит в печени /1,2/ и его индукторами являются интерлейкин-6, интерлейкин-1 и опухолевый некротический фактор- α . Hr может синтезироваться в специфических непеченочных клетках, таких как адипоциты и клетки легких, и его уровень в них возрастает при воспалении подобно тому, как он возрастает в гепатоцитах /3/. Кроме того, при стрессе наблюдается высокий уровень экспрессии Hr в артериях, где он участвует в клеточной миграции и артериальной реструктуризации /4/. Hr встречается и у низших позвоночных. Костистые рыбы, но не более примитивные организмы имеют ген, кодирующий белок, гомологичный гаптоглобину млекопитающих /5/.

Гаптоглобин входит в группу острофазных белков, концентрация которых в крови при развитии патологии в организме изменяется /6,7/. В нормальных условиях концентрация гаптоглобина может достигать 30-300 мг/дл /8/ и увеличиваться в 3 - 8 раз во время течения болезни /9/.

Характерным свойством гаптоглобина является способность быстро образовывать с гемоглобином (Hb) стабильный комплекс ввиду экстремально высокого сродства ($K_d \approx 10^{-15} M$) /1, 2, 10/. Функция гаптоглобина в организме обусловлена прежде всего этим его свойством. Свободный гемоглобин может участвовать в различных токсических процессах, поскольку обладает свойством про-оксидантного агента и может катализировать различные пероксидные и окислительные реакции /11/. Hr играет существенную роль в связывании свободного гемоглобина и нейтрализации его токсических свойств /12,13,14/, что обеспечивает его антиоксидантную функцию. Кроме того, связываясь с гемоглобином, гаптоглобин участвует в промежуточном обмене железа, входящего в состав гемоглобина, и способен задерживать его в организме /15-20/. При разрушении эритроцитов гемоглобин, который растворяется в крови, связывается с гаптоглобином, образованный Hr - Hb комплекс из-за большой молекулярной массы не проходит через фильтры почечных клубочков. Hr - Hb-комплекс является одним из природных субстратов гемальфаметенилоксигеназы - фермента катаболизма гемоглобина. В физиологических условиях комплекс Hr-Hb поступает в ткани системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов и макрофагов), где разрушается /21-23/. При этом молекулярное железо, которое освобождается из гемоглобина, в кровяном русле связывается с трансферрином, транспортируется к костному мозгу и используется для образования эритроцитов. Об этом свидетельствуют данные о возрастании значений комплексного показателя метаболизма железа (общее содержания железа, степень насыщения трансферрина, концентрация ферритина) у носителей фенотипа Hr2-2, обладающего меньшей гемоглобин - связывающей способностью по сравнению с другими фенотипами /24/. Таким образом, гаптоглобин обеспечивает сохранение железа гемоглобина в организме.

Комплекс Hr - Hb стимулирует биосинтез коллагена - основного белка соединительной ткани, обладает высокой пероксидазной активностью, оказывая тормозящий эффект на процессы перекисного окисления липидов.

Гаптоглобин определяет межорганное распределение гемоглобина. Так, свободный гемоглобин обнаруживается в почках, а комплекс Hr - Hb - в печени, ингибирует реакцию гемагглютинации вируса гриппа, является эндогенным ингибитором - ингибирует рост и размножение патогенных бактерий, использующих для этого железо гема простагландинсинтетазного ферментативного комплекса /25-29/.

Hr и его варианты являются иммуносупрессорами лимфоцитарной функции /30-35/. Более того, Hr является сывороточным ангиогенным фактором и играет роль в пролиферации и дифференциации васкулярного эндотелия /36/. При высоких концентрация, приближенных к наблюдаемых при раковых заболеваниях, Hr ингибирует фитогемагглютинин (РНА)-индуцируемый бластогенезис лимфоцитов /37/. Это существенно для протекции опухоли против иммунной атаки.

Хотя Hr имеется у всех млекопитающих, его полиморфизм хорошо изучен только у человека, в геноме которого он кодируется кодоминантными аллелями Hr1 и Hr2 /38,39/. Молекула гаптоглобина состоит из двух типов полипептидов - α и β . Лocus гена Hr на хромосоме 16 состоит из 5 экзонов, кодирующих аллель 1, и 7 экзонов, кодирующих аллель 2. Второй аллель появился в результате межгенной дупликации 3-го и 4-го экзонов двух аллельных вариантов Hr¹ /40/. У человека установлено три основных (гомодимер Hr1-1, линейный полимер Hr 2-1, большой циклический полимер Hr 2-2) /38/ и около 20 редких вариантов гаптоглобина. Основные три варианта различаются структурой α -цепи, в редких вариантах встречаются измененные как α - так и β -цепи, например молекула Hr «Марбурга» содержит модифицированную β -цепь. Известны два типа α -цепи, - α^1 (9кДа) и

α^2 (18 кДа), которая возникла в результате частичной дупликации гена, в Нр 1-1 найдена только α^1 в Нр2-1- α^1 - и α^2 -цепи, в Нр2-2 - лишь α^2 -полипептид. Нр1-1 представляет собой тетрамер, $\alpha_2\beta_2$; Нр2-1 и Нр2-2 - смеси полимеров, различающиеся по числу $\alpha\beta$ димеров. На электрофореграмме Нр 1-1 проявляется в виде одного компонента, а Нр2-1 и Нр2-2 - как серия полос /1,2, 41/. α -цепь содержит ССР домен (control protein domain), который найден во многих белках, вовлеченных в регуляцию комплемента, например, в факторе комплемента Н и С1г, маннозо-связывающей лектин-ассоциированной сериновой протеиназе и С1 рецепторе /42/. Молекулярная масса β -цепи составляет около 35 кДа. Она идентична химотрипсин-подобной сериновой протеиназе, но не обладающей существенными для катализа аминокислотными остатками /43/.

Идентифицирован Нр⁰ аллель гаптоглобина, который является делецией аллеля в кластере гаптоглобинового гена /44,45/.

Частота распределения Нр аллелей является маркером уникального географического распределения людей: индивидуумы с Нр α^1 аллелем преобладают в Африке и Южной Америке, но относительно редко встречаются в юго-восточной Азии /38/. Нр α^2 аллель предположительно возник в Индии около 2 миллионов лет назад и впоследствии заместил Нр α^1 аллель.

Между фенотипами существуют функциональные различия, включая различия в модуляции окислительного стресса, реутилизации гемового железа и иммунной функции.

Нр2-2 полимер сильно отличается по биохимическим и биофизическим свойствам по сравнению с Нр1-1 и Нр1-2. Он присутствует в незначительной концентрации /47/ и менее эффективно связывает свободный гемоглобин; Нр1-1 и Нр1-2 имеют большее сродство к гемоглобину. Концентрация витамина С значительно ниже у людей с Нр2-2 фенотипом гаптоглобина (49.9 $\mu\text{mol/l}$), но не отличается у индивидов с Нр1-1 и Нр1-2 фенотипами (61.5 $\mu\text{mol/l}$ and 63.7 $\mu\text{mol/l}$ соответственно) /47/. Более того, у людей с Нр2-2 фенотипом железо локализуется внутри слабо пригодных для обмена запасных компартментах мононуклеарной фагоцитной системы; избыток моноцитарного железа обнаруживается у людей с Нр2-2 фенотипом (687 $\mu\text{g/g}$ L-ферритина) в сравнении с Нр1-1 и Нр1-2 фенотипами (326 $\mu\text{g/g}$ and 366 $\mu\text{g/g}$ L-ферритина, соответственно) /48, 49/.

В норме уровень гаптоглобина в сыворотке крови постоянен, хотя и существуют большие индивидуальные колебания его уровня. Встречаются также случаи агаптоглобинемии, которая не является результатом принципиальной неспособности организма к биосинтезу гаптоглобина. Предполагается, что этот признак отражает определенное физическое состояние организма. При различных патологических состояниях концентрация гаптоглобина в крови изменяется.

Содержания гаптоглобина в крови при воспалительных процессах, травмах, инфекционных заболеваниях, лейкемии, ревматизме, ишемической болезни сердца, лимфогранулематозе, системной склеродермии, различных опухолях, лучевой болезни увеличивается /50-56/. Наиболее вероятной причиной повышения уровня гаптоглобина при патологических состояниях является стимуляция его синтеза различными гуморальными веществами, освобождаемыми при этом. Например, серомукоидные белки, выделяемые из поврежденных тканей при инфекциях и воспалениях, интерлейкины стимулируют биосинтез гликопротеида /6,25,26,57/.

Снижение уровня гаптоглобина наблюдается при гемолитической анемии, всех видах гемолиза, заболеваниях печени, атеросклерозе. При гепатоцеллюлярных расстройствах количество его в крови уменьшается вплоть до нерегистрируемых величин, например при циррозе печени снижается в 35 раз. Низкий уровень гаптоглобина при гемолитических процессах обусловлен ускорением его утилизации из-за высокой концентрации гемоглобина, выделяемого в плазму и связывающего гаптоглобин. Комплекс Нр - НЬ утилизируется намного быстрее, полупериод его жизни равен 9-30 мин, а гаптоглобина - 2,4 дня. У человека в норме гаптоглобин способен связывать от 50 до 150 мг гемоглобина на 100 мл сыворотки. В гемолитическом же состоянии фракционный катаболизм гаптоглобина увеличивается, а скорость синтеза ограничена. Это и приводит к уменьшению его концентрации вплоть до нерегистрируемых величин /5, 27/. Снижение уровня гаптоглобина при гепатоцеллюлярной патологии, может быть обусловлено: во-первых, повреждениями клеток печени, так как этот орган является местом синтеза гаптоглобина и выявлена прямая корреляция между степенью повреждения клеток печени и уровнем гаптоглобина; во-вторых, гемолитическим процессом, часто сопровождающим заболевания печени.

Уровень биохимического показателя гаптоглобина оказывается чувствительным ранним признаком активности патологического процесса; поэтому он может быть использован в качестве клинико-биохимического показателя /26, 27, 39, 58/.

Применение гаптоглобина в качестве теста гемолитических процессов позволяет:

1) определить длительность и степень гемолиза, так как с их увеличением в сыворотке крови понижается уровень гаптоглобина и увеличивается содержание комплекса Нр - НЬ;

2) количественно охарактеризовать процесс разрушения эритроцитов, поскольку существует корреляция между продолжительностью их жизни и концентрацией гаптоглобина. Например, у индивидов со средней продолжительностью жизни эритроцитов 45 дней (в норме 120 дней) отмечается агаптоглобинемия;

3) следить за процессами, протекающими при переливании крови, так как снижение уровня гаптоглобина до 50-70 мг на 100 мл сыворотки служит явным признаком гемолитического криза;

4) поставить точный диагноз внутрисосудистого гемолиза, о наличии которого свидетельствует триада признаков - отсутствие в плазме гаптоглобина, присутствие свободного гемоглобина и метгемальбумина /27/.

Гаптоглобин присутствует в основном в сыворотке крови; у людей с Нр1-1 он обнаруживается и в моче.

Частично или полностью насыщенный гемоглобином гаптоглобин найден и в желчи, туда переносится часть H_р - H_б-комплекса, поглощенного гепатоцитами. При гемолитической анемии у человека общее содержание железа в желчи увеличивается в 4-10 раз видимо, из-за увеличения количества поступающего в нее H_р - H_б-комплекса /59/.

При болезнях печени этот тест позволяет судить о функциональном состоянии органа, причем наиболее динамично его отражает концентрация гаптоглобина, так как период полураспада данного гликопротеида значительно короче, чем других белков печеночного происхождения.

По содержанию гаптоглобина можно судить и о природе патологического состояния. Например, оно значительно увеличивается при любом воспалительном процессе, не сопровождающемся гемолизом. Следовательно, рост концентрации гаптоглобина укажет прежде всего на воспалительный характер заболевания. Так, W. Palmer и R. Costlow /60/ считают, что повышенный уровень гаптоглобина при наличии опухолевидного образования в организме отражает воспалительную природу последнего. При ишемической болезни сердца отмечается корреляция уровня гаптоглобина со степенью тяжести поражения сердца /6/.

Гаптоглобин может быть использован как один из элементов системы биохимической диагностики наследственной предрасположенности к различным заболеваниям /61-64/. Установлено, что индивиды с разными типами гаптоглобина различаются по иммунитету. Например, у людей с геном H_{р2} после стандартной иммунизации против тифа иммунитет выше, чем у индивидов с H_{р1-1} /65/. Обнаружена также связь между устойчивостью организма к различным заболеваниям и типами гаптоглобина. Так, у людей с H_{р1-1} в 3-4 раза чаще встречается лейкемия, чем при H_{р2-2} /66/. В семьях больных артериальной гипертонией увеличена доля H_{р2-1} /67/. У больных хроническим гепатитом и циррозом печени H_{р1-1} встречается на 10 % чаще, чем в здоровой популяции. Риск заболеть циррозом печени для индивидов с H_{р2-2} в 5-9 раз ниже, чем у лиц с H_{р1-1}. Безалкогольный цирроз печени чаще встречается у жителей Африки и Средней Азии (основной тип гаптоглобина в этих регионах H_{р1-1}), чем у народностей Европы и Америки, где распространен H_{р2-2} /65/. Установлена взаимосвязь между определенными типами гаптоглобина и степенью развития ишемической болезни сердца. Предполагается, что фенотип H_{р2-2} может служить генетическим маркером более высокого риска сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных атеросклерозом, а также менее благоприятного течения заболеваний /6, 26/. Вариант гаптоглобина H_{р2-2} относят к неблагоприятному типу, повышающему вероятность предрасположенности к различным заболеваниям и понижающим устойчивость организма к различным вредным воздействиям /68/, в частности воздействию пестицидов /41/.

Предполагается что гаптоглобин можно использовать в качестве терапевтического препарата. Гаптоглобинотерапия может быть с успехом применена прежде всего при гемолитической анемии. Так, после терапии гаптоглобином в 80,4 % случаев у человека и в 100 % случаев у кроликов предотвращается гемоглинурия /70/. Введение в кровяное русло гаптоглобина препятствует выделению через почки части гемоглобина, поступившего в плазму при гемолизе. Терапия гаптоглобином может быть эффективной, видимо, лишь в случаях с редко повторяющимися гемолитическими проявлениями: при многократном их возникновении происходит накопление железа в органах (гемосидероз) вследствие разрушения эритроцитов, что может привести даже к летальному исходу. Хорошие результаты получены и при применении гаптоглобина, иммобилизованного на фибрине, для лечения ожогов, после операции на сердце и т.д. /25/.

Таким образом, концентрация гаптоглобина в крови может быть использована в качестве биохимического показателя для диагностики развития в организме гемолитических и воспалительных процессов, функционального состояния печени, а по фенотипу гаптоглобина можно судить о предрасположенности его к различным заболеваниям.

Литература

1. Успенская В.Д. - Успехи совр. Биол. - 1971. т. 71. с. 43-66.
2. Бейсембаева Р.У. - Успехи совр. Биол. -1984. т. 98. с. 409-425
3. Kalmovarin N, Friedrichs WE, O'Brien HV, et al. Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation // *Inflammation*. -1991. -15:369-79.
4. Smeets MB, Pasterkamp G, Lim SK, et al. Nitric oxide synthesis is involved in arterial haptoglobin expression after sustained flow changes // *FEBS Lett*. - 2002. -529:221-4.
5. Krzysztof B. Wicher and Erik Fries. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2006. -103(11): 4168-4173.
6. Чукаева И.И., Богова О.Т., Корочкин И.М., Алешкин В.А., Литвинова С.Н. Инфаркт миокарда и воспаление // *Медицина неотложных состояний*. -2007. -№4 (11) с.19-23.
7. Алёшкин В.А., Новикова Л.И., Мотов А.Г., Алёшкина Т.Н. Белки острой фазы и их клиническое значение. // *Клиническая медицина*. - 1988. - № 8 (66). - С. 39 - 48.
8. Katnik I, Jadach J. Haptoglobin concentration in serum and other body fluids measured by comparison of its reactivity with hemoglobin and concanavalin // *A. Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. -1996. -44:45-50.
9. Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin – new pieces to an old puzzle // *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. -1997. -35:647-54.
10. McCormick DJ, Atassi MZ. Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human hemoglobin // *J Protein Chem*. -1990. -9:735-42.
11. Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins // *Free Radic Biol Med*. -1997. -22:1075-99.