

2. Hamilton W.D., Axelrod R., Tanese R. . Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1990.- V. 87.- № 9. -P. 3566-3573.
3. Crow J.F., An advantage of sexual reproduction in a rapidly changing environment // J. Hered.-1992.- V. 83.- № 3. -P. 169-173.
4. Robson A.J., Bergstrom C.T., Pritchard J.K., Risky business: Sexual and asexual reproduction in variable environments // J. Theor. Biol.-1999.- V. 197.- № 4.- P. 541-556.
5. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue//BRL Focus.-1990.- Vol.12.-P.13-15.
6. Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*)//TAG.-1996.-Vol.92.-P.40-45
7. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers//Nucleic Acid Research.-1990.-Vol.18.-P.6531-6535

Резюме

Исследован тип адаптивной стратегии у растений с разным типом репродукции: *Onagra biennis*, *Hypericum perforatum*, *Hieracium pilosella* в условиях хронического облучения. С помощью морфометрического и молекулярно-генетического анализа показано, что повышение адаптивных свойств у таких растений как энотера (растение с перекрестным опылением) и зверобой (факультативный апомикт) происходит за счет увеличения диапазона генетической варибельности.

Досліджено тип адаптивної стратегії у рослин з різним типом репродукції *Onagra biennis*, *Hypericum perforatum*, *Hieracium pilosella* в умовах хронічного опромінення: За допомогою морфометричного і молекулярно-генетичного аналізу показано, що підвищення адаптивних властивостей у таких рослин як енотера (рослина з перехресним запиленням) і звіробій (факультативний апомикт) відбувається за рахунок збільшення діапазону генетичної варіабельності.

The type of adaptive strategy has been investigated among plants with different type of reproduction: *Onagra biennis*, *Hypericum perforatum*, *Hieracium pilosella* under influence of chronic irradiation. It has been shown using morphometric and molecular-genetic analysis, that increasing of adaptive characteristics of such plants as enotera (plant with cross-pollination) and St.-John's wort (optional apomict) takes place due to the increasing of range of genetic variability.

ЛОГВИНЕНКО Н.С.

*Институт цитологии генетики СО РАН,
Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева
10, e-mail: ninlo@bionet.nsc.ru*

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АЛЬДОСТЕРОНОМ ЭКСПРЕССИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО НАТРИЕВОГО КАНАЛА (ENaC) И ГЛЮКОКОРТИКОИД-РЕГУЛИРУЕМОЙ КИНАЗЫ-1 (SGK-1) В КЛЕТКАХ ЭПИТЕЛИЯ НЕФРОНА КРЫСЫ.

Одним из важнейших аспектов созревания осморегулирующей функции почки является формирование молекулярных механизмов регуляции транспорта натрия альдостероном в клетках эпителия нефрона. Известно, что в раннем онтогенезе почки незрелорождающих животных, в том числе крыс, нечувствительны к альдостерону.

Тонкие механизмы развития гормональной чувствительности клеток-мишеней в этом периоде изучены недостаточно. Концентрация натрия в главных клетках кортикального сегмента собирательных трубок (CCD), в основном, определяется динамическим равновесием между поступлением натрия из просвета канальца через эпителиальный натриевый канал (ENaC) и выведением его из клетки в интерстиций против градиента с использованием энергии АТФ базолатерально локализованным натриевым насосом (Na,K-АТФаза) (Feraille, Douset 2001, Booth et al, 2002). Глюкокортикоид-регулируемая киназа 1 (SGK-1) принимает участие как в быстрой регуляции функциональной активности предсуществующих молекул эпителиального натриевого канала, так и в долговременной геномной регуляции экспрессии ENaC (Pearce and Kleyman, 2007). Ранее нами была обнаружена более низкая экспрессия ENaC и Na,K-АТФаза в почке 10-ти дневных животных, которая хорошо соответствует более низкому уровню внутриклеточной концентрации натрия в главных клетках CCD (Логвиненко 1991, 2004, 2007). Для того чтобы выяснить, участвует ли альдостерон в долгосрочной, геномной регуляции активности эпителиального натриевого канала в незрелой почке 10-дневной крысы, мы провели сравнительное исследование возрастных особенностей индукции альдостероном экспрессии генов альфа субъединицы ENaC и гена киназы SGK-1.

Материалы и методы

Возрастные особенности влияния альдостерона на экспрессию альфа субъединицы ENaC и SGK-1 исследовали в коре почек предварительно адреналэктомированных крыс. Через 1 сутки после адреналэктомии взрослым крысам и через 6 часов 10 дневным крысятам внутрибрюшинно вводили альдостерон (5 мкг/100 г веса) из расчета 100 мкл/100 г веса каждые 3 часа. Контрольным адреналэктомированным животным вводили 0.1% спирт в физиологическом растворе в таком же объеме по той же схеме. Животных забивали через 20 мин, 50 мин, 1 ч 20 мин и через 5 ч 30 мин после начала индукции. Количество мРНК альфа-субъединицы ENaC и SGK-1 изучали методом ОТ ПЦР. Выделение суммарной РНК из коркового вещества почки крысы проводили с использованием набора реактивов Rneasy Mini kit (QIAGEN, Germany) согласно прилагаемым протоколам. Использовали последовательность праймеров, опубликованную Muller et al., 2003. Число независимых повторов было 3-5, с тремя параллельными в каждой пробе. В качестве внутреннего стандарта использовали экспрессию гена белка «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) в той же пробе. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В первые пять с половиной часов после начала индукции альдостерон (10нМ) не вызывал повышения уровня мРНК альфа-субъединицы ENaC в коре почек 10-ти дневных крысят (Рис.1). В то же время у взрослых, 60-ти дневных животных, наблюдалось увеличение экспрессии этого гена к концу изучаемого периода ($p < 0.05$). Характер изменения уровня мРНК киназы SGK-1 в корковом веществе почки 10-дневных и взрослых, 60-ти дневных крыс отличался от поведения альфа-субъединицы ENaC.

По оси ординат: соотношение α -ENaC/GAPDH, по оси абсцисс - время в минутах после начала индукции альдостероном (5мкг/100г. веса тела) * - уровень достоверности ($p < 0.05$)

Оказалось, что индукция экспрессии гена SGK-1 имеет схожую временную динамику у животных обеих возрастных групп (Рис.2). Как у 10-ти, так и у 60-дневных животных наблюдалось повышение содержания мРНК киназы SGK-1 уже через 50 минут после введения гормона, которое сохранялось на протяжении всего последующего исследованного периода.

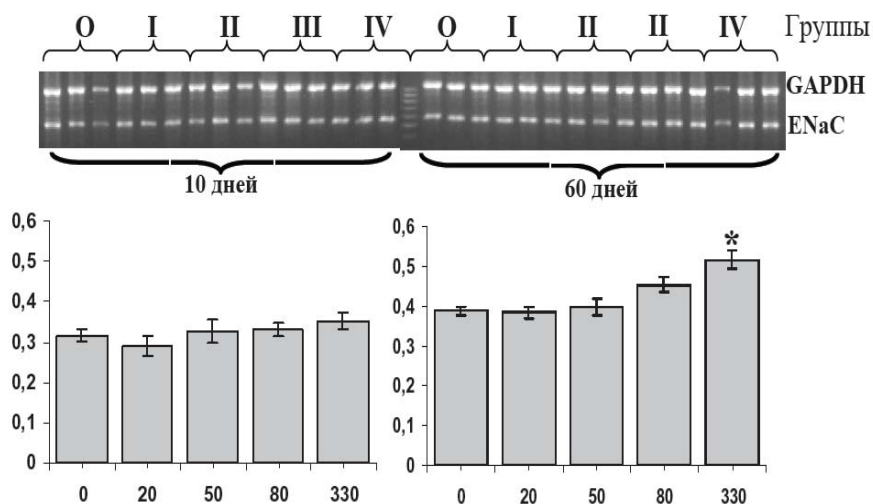
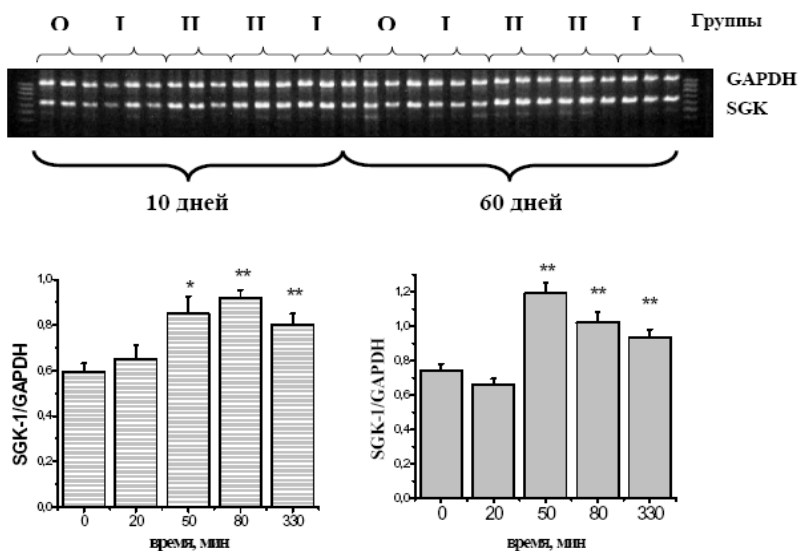


Рис.1. Влияние альдостерона на уровень мРНК α -ENaC в корковом веществе почки 10-дневных и 60-ти дневных крыс.

Известно, что киназа SGK-1 относится к группе ранних альдостерон индуцируемых генов, активация которых происходит в течение первого часа после начала действия гормона, тогда как ген альфа-субъединицы ENaC относится к группе поздних генов, экспрессия которых повышается через 3-4 часа (Booth et al., 2002). Более раннее созревание регуляции альдостероном активности гена SGK-1, по сравнению с геном альфа-субъединицы ENaC в постнатальном онтогенезе почки крысы может свидетельствовать о начале становления сложных механизмов, сопрягающих функциональную активность этих двух генов. Так, недавно было показано, что SGK-1 опосредует стероидную индукцию α -субъединицы ENaC (Boyd, Naray-Fejes-Toth, 2005; Zhang et al., 2007). Авторы обнаружили существование ядерного супрессорного комплекса, который гиперметирует гистоновый белок, связанный с промоторной зоной альфа-субъединицы ENaC. Альдостерон ингибирует экспрессию этого комплекса, что снимает блок и активирует транскрипцию альфа-субъединицы натриевого канала. Оказалось, что для того, чтобы реализовалась эта функция альдостерона, необходимо предварительное повышение экспрессии киназы SGK-1, которая фосфорилирует один из белков супрессорного комплекса и таким образом разваливает его, освобождая доступ к промоторной зоне гена альфа-субъединицы ENaC альдостерон-рецепторного комплекса с последующей активацией транскрипции альфа-субъединицы ENaC (Zhang et al., 2007).



Рс.2. Влияние альдостерона на уровень мРНК киназы SGK-1 в корковом веществе почки 10- дневных и 60-ти дневных крыс. По оси ординат: соотношение SGK-1 /GAPDH, по оси абсцисс - время в минутах после начала индукции альдостероном (5мкг/100г. веса тела) * - уровень достоверности ($p<0.05$) **- уровень достоверности ($p<0.001$)

Возможно, отсутствие повышения уровня экспрессии гена ENaC ответ на введение альдостерона в почке 10-дневных животных является следствием незрелости, или отсутствия неких молекулярных факторов, способствующих координации функциональной активности и экспрессии мРНК киназы SGK-1 и альфа-субъединицы ENaC (Pearce and Kleyman, 2007). Можно предположить, что обнаруженные нами возрастные особенности индукции альдостероном экспрессии мРНК альфа-субъединицы натриевого канала лежат в основе гормональной резистентности к альдостерону незрелой почки 10-ти дневных крыс. Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-00658-а и грантом «Ведущие научные школы» НШ-1515.2003.4.

Литература

1. Логвиненко Н.С., Хлебодарова Т.М., Соленов Е.И., Иванова Л.Н., Броуде Н.Е., Монастырская Г.С. Гормональная регуляция экспрессии мРНК Na⁺,K⁺-АТФазы в почках крыс в постнатальном онтогенезе// Цитология. 33: 18-25. 1991.
2. Логвиненко Н.С., Хлебодарова Т.М., Соленов Е.И., Иванова Л.Н. Возрастные особенности рецепции альдостерона в дистальных сегментах нефронов крыс и индукции экспрессии Na⁺,K⁺-АТФазы. //Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 90 (3): 375-384.- 2004.
3. Н.С. Логвиненко, Е.И. Соленов, Кабилова Н.О., Каткова Л.Е., Л.Н. Иванова. Возрастные особенности регуляции альдостероном экспрессии и функциональной активности эпителиального натриевого канала в почке крысы. Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 93(4): 420-428. 2007.
4. Booth R.E, Johnson J.P., Stockand J.D., Aldosterone. Adv. Physiol. Educ. 26: 8-20. 2002.
5. Boyd C, Nbray-Fejes-Tyth A. Gene regulation of ENaC subunits by serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. Am J Physiol Renal Physiol. 288(3):F505-12. 2005
6. Feraille E., Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. Physiol. Rev. 81(1): 345-418. 2001.
7. Muller O.G., Parnova R.G., Centeno G., Rossier B.C., Firsov D., Horisberger J.D. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. J. Am. Soc. Nephrol. 14(5):1107-1115. 2003.
8. Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D, Vallon V, Kone BC. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel alpha. J Clin Invest. Mar;1 17(3):773-83. 2007. [9] Pearce D, Kleyman TR. Salt, sodium channels, and SGK1. J Clin Invest. Mar;1 17(3):592-5. 2007.

Резюме

Методом ОТ ПЦР было показано, что уровень мРНК альфа субъединицы ENaC и киназы SGK-1 в почке 10-дневных крыс ниже, чем у взрослых животных ($p<0.05$). Нами выявлено отсутствие повышения уровня экспрессии гена альфа-субъединицы ENaC и увеличение уровня мРНК киназы SGK-1 в ответ на долговременную индукцию альдостероном (100 мкг/100 г веса) в почке 10-дневных животных, в отличие от взрослых.

Developmental changes of mRNA alpha -subunit ENaC and SGK1 abundance in 10 day and adult rat kidney were investigated by RT-PCR. The level of both genes expression was less in kidney cortex of 10 day rat compared with the adult one ($p < 0.05$). There was no long time genomic effect of the aldosterone induction (5mg/100g) on the mRNA of the alpha-subunit ENaC abundance within 5.5 hours and aldosterone raised mRNA SGK-1 abundance in young rat renal cortex, in contrast to adult rats.

ЛОГИНОВА Д.Б., ДЕЙНЕКО Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, проспект Лаврентьева 10, e-mail: loginova@bionet.nsc.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЗАИЧНОГО ХАРАКТЕРА ПРОЯВЛЕНИЯ МАРКЕРНОГО ГЕНА *nptII* У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

При случайном характере интеграции в растительный геном фрагментов экзогенной ДНК перенесенные гены могут попадать в различные районы ядерного генома растений. Характер их проявления в таких случаях будет определяться особенностями организации района интеграции, в связи с этим генетически модифицированные растения могут служить удобными моделями для изучения функционирования перенесенных генов.

В лаборатории биоинженерии растений созданы трансгенные растения табака с мозаичным проявлением маркерного гена *nptII*, определяющего устойчивость к антибиотику канамицину (линия Nu 21), что фенотипически проявлялось в чередовании белых и зеленых секторов на листовых пластинках растений, выращенных на селективной среде с канамицином. Маркерный ген был интегрирован в виде двух тесно сцепленных копий. Мозаичный характер сохранялся у потомков от самоопыления T₁-T₄. Отбор по стабильности проявления маркерного гена позволил выделить среди T₄ растений линии, характеризующиеся полной (Nu 21/5-4/1 – зеленый цвет листовых пластинок), либо частичной (Nu 21/6-4/1 - чередование зеленых и белых участков) устойчивостью к антибиотику.

Целью данной работы было изучение особенностей проявления маркерного гена *nptII* у потомков от самоопыления и у гибридов от скрещивания растений линии Nu 21, характеризующихся стабильным и мозаичным проявлением *nptII*-гена.

Материалы и методы

Исходным материалом для проведения исследований служили потомки 4 поколения (T₄) от самоопыления табака линии Nu 21 из коллекции лаборатории биоинженерии растений ИЦиГ СО РАН. Растения линии Nu 21/6-4/1 характеризуются высоким процентом появления растений с мозаичным характером проявления маркерного гена *nptII*; окраска листьев - мозаичная (чередование зеленых и белых участков). Растения линии Nu 21/5-4/1 характеризуются стабильной экспрессией маркерного гена *nptII*; окраска листьев - зеленая. В качестве контроля использовались растения нетрансгенной линии SR1.

Трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма XL10 проводили методом теплового шока [1]. Выделение плазмидной ДНК проводили при помощи QIAGEN Plasmid Midi Kit (N.12145) согласно методике производителя. Выделение геномной ДНК из листьев табака проводили по стандартной методике [2] с модификациями. Гибридизацию по Саузерну проводили по стандартной методике [3] с модификациями, радиоактивно меченый зонд получали методом ПЦР.

Результаты и обсуждение