

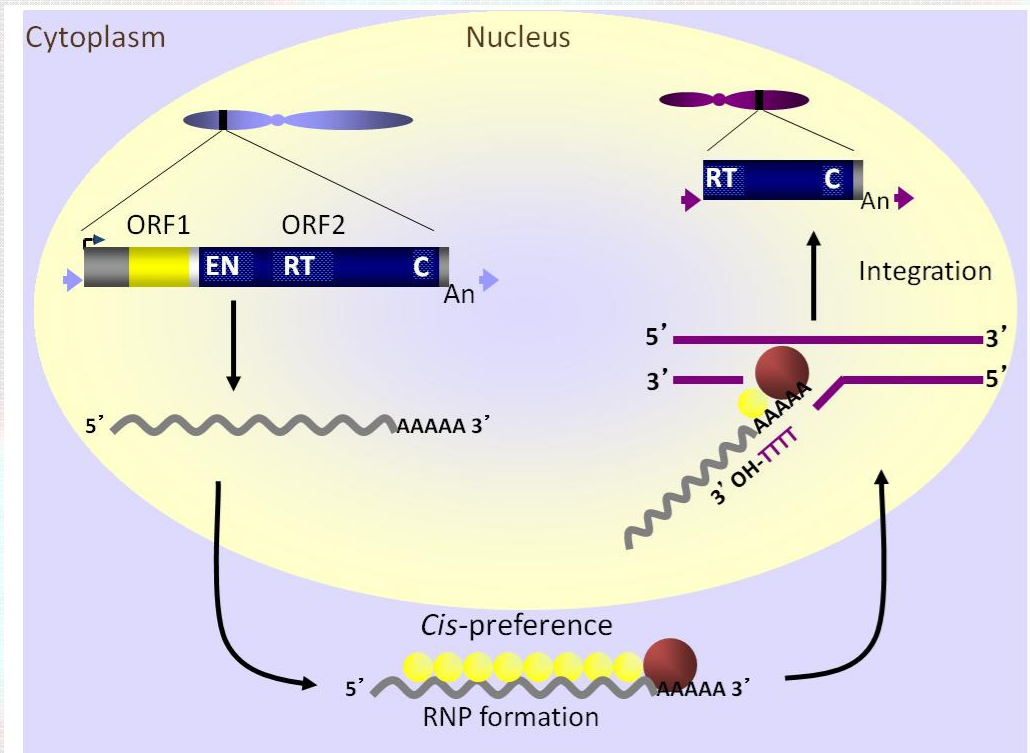


Влияние мутаций и медицинских препаратов на эффективность ретротранспозиции элемента L1

Амир Закиров, София Ласкина, Елизавета Драпкина, Анастасия Калинина, Сергей Стариков, Guillem Rosselló, Григорий Елхов, Carles Albàs Voix, Анна Ганичева, Мария Федосеева, Анна Потапова, Наталья Сухаричева, Thomas Widmann, José Luis García Pérez

Введение

Лишь 5% человеческого генома составляют белок-кодирующие последовательности. К удивлению, почти половина нашего генома состоит из повторяющихся последовательностей ДНК. Среди них несколько ДНК последовательностей, которые могут перемещаться и встраиваться в геном – мобильные элементы (транспозоны). Большинство из них были инактивированы в нашем геноме в процессе эволюции: однако, активация LINE-1 продолжает изменять человеческий геном.



Поэтому изучение влияния транспозиции LINE-1 является крайне важным. Его активность различными способами может повлиять на геном и привести к развитию ряда заболеваний. Однако является очевидным, что активность LINE-1 может также способствовать формированию новых регуляторных последовательностей

Ретротранспозиция L1

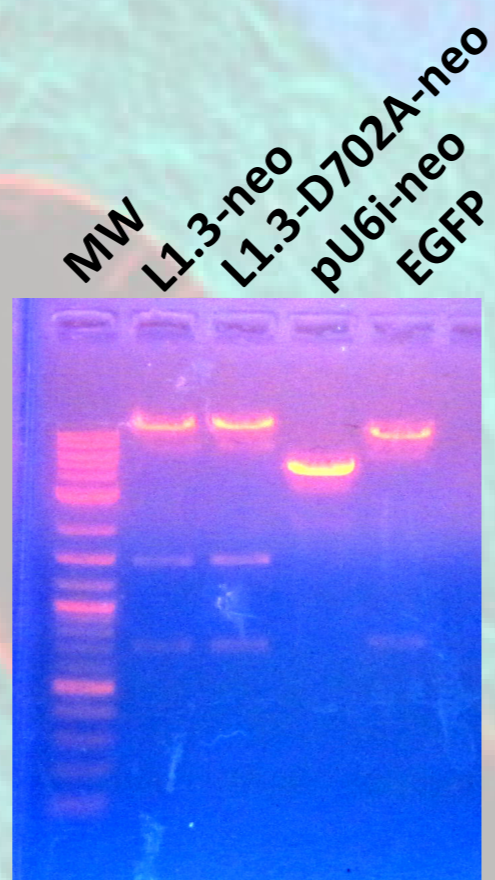
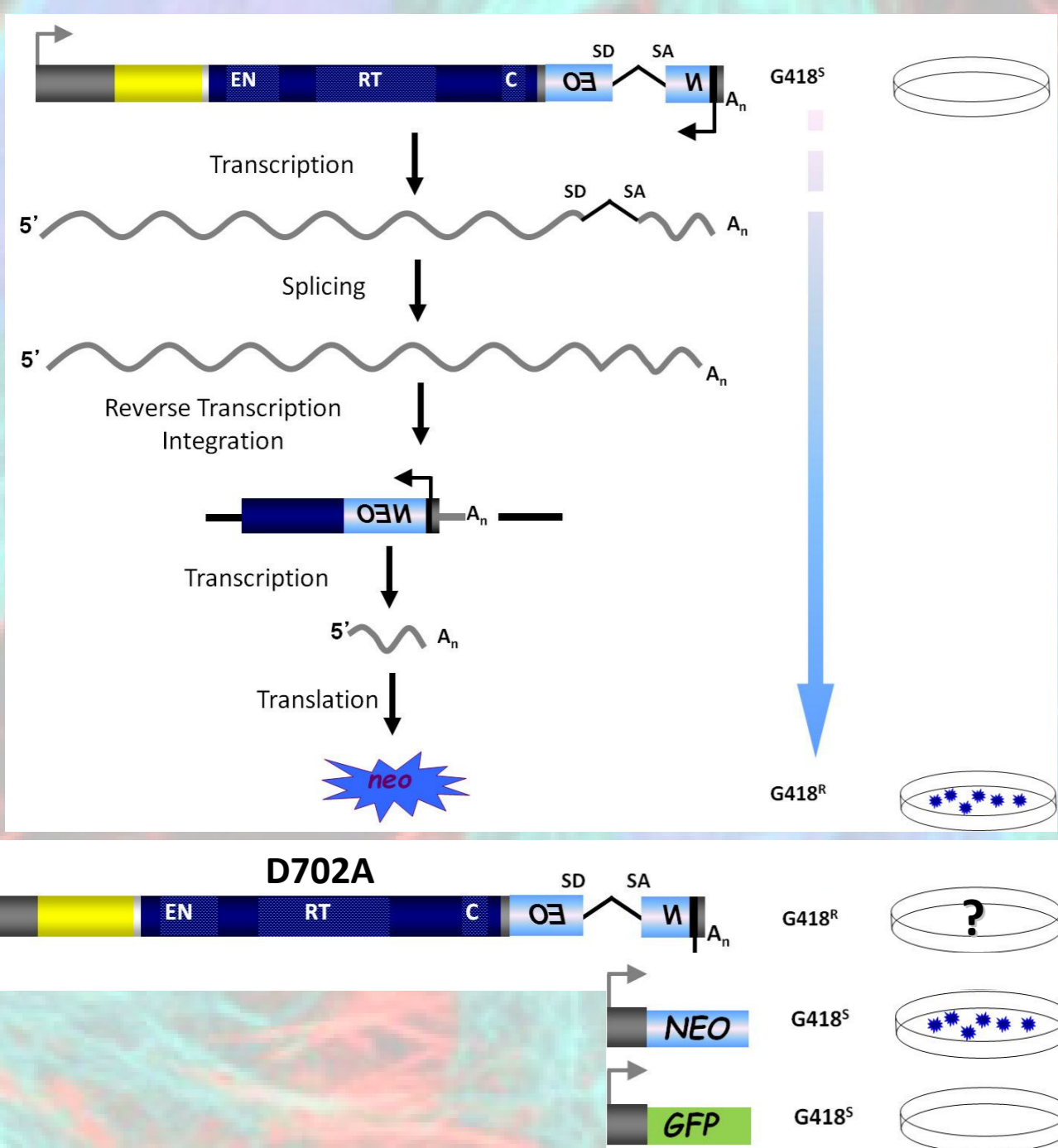
Таким образом, целью данного исследования стало изучение влияния мутаций и фармакологических препаратов на частоту ретротранспозиции активных элементов LINE-1 в геноме человека.

Методы

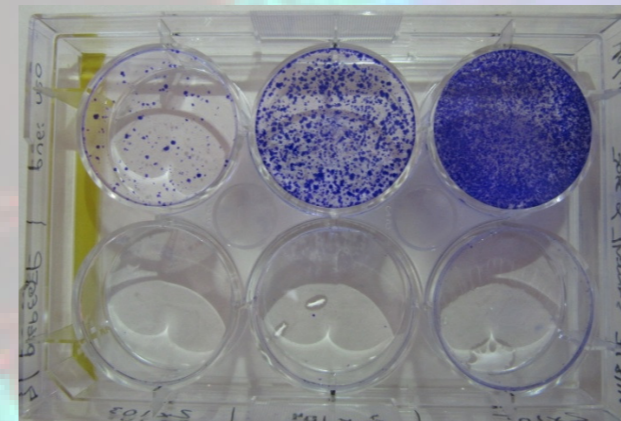
Выделение и чистка плазмидной ДНК с использованием MidiPrep kit (Thermo Scientific)
Транфекция линии клеток HeLa плазмидным вектором, содержащим LINE-1 и репортерный ген (неомицин)
Фиксация клеток PBS, содержащим 2% HCHO и окраска кристалл фиолетом

Описание исследования ретротранспозиции

Анализ ДНК

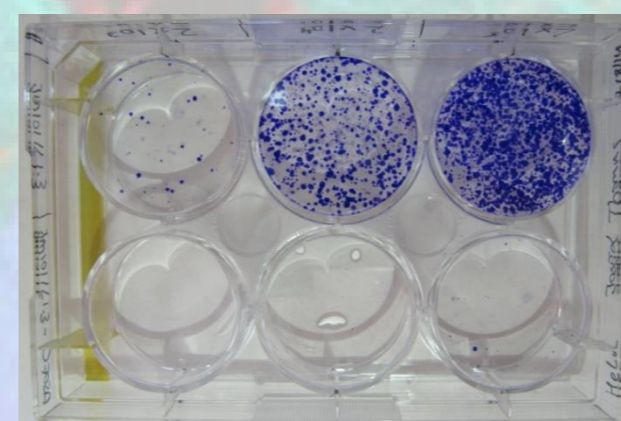


А) Исследование ретротранспозиции



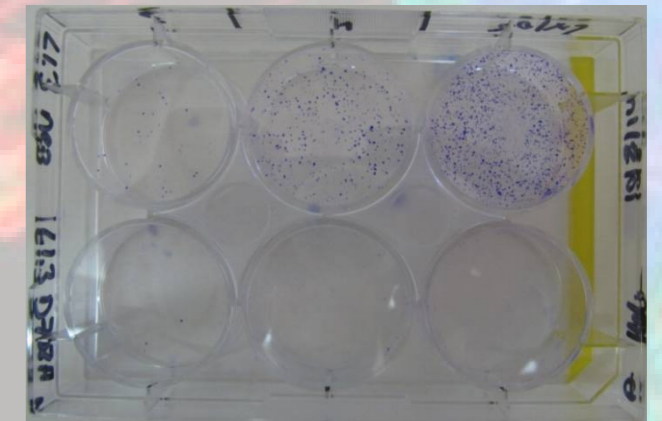
L1.3 wt

L1.3 mut D702A



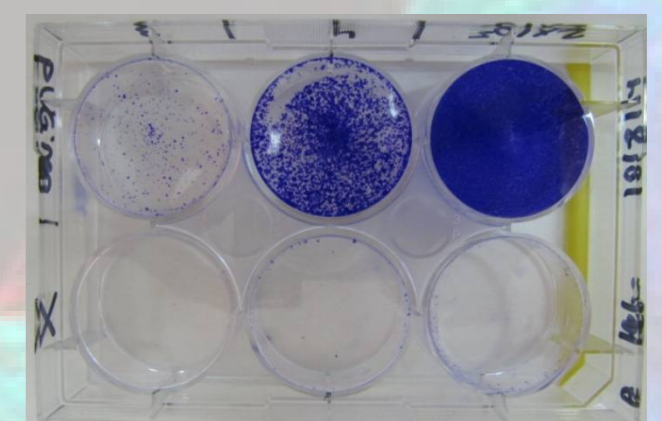
pu6i neo

GFP



L1.3 wt

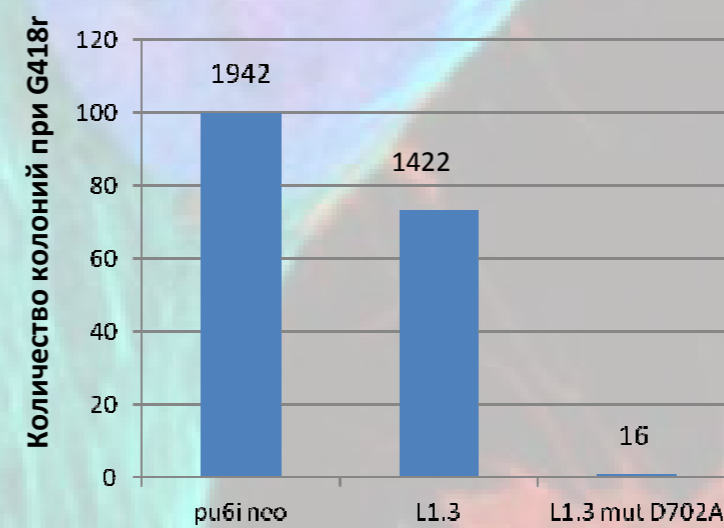
L1.3 mut D702A



pu6i neo

GFP

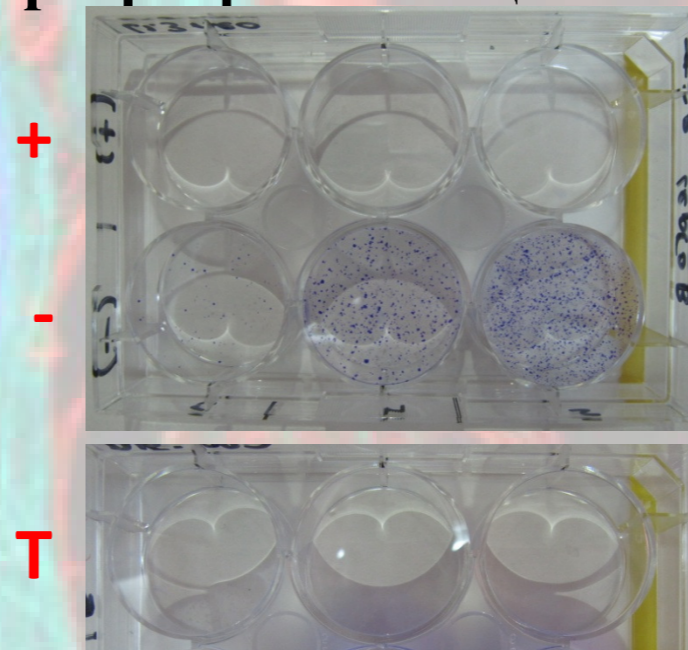
10-дневная селекция на G418



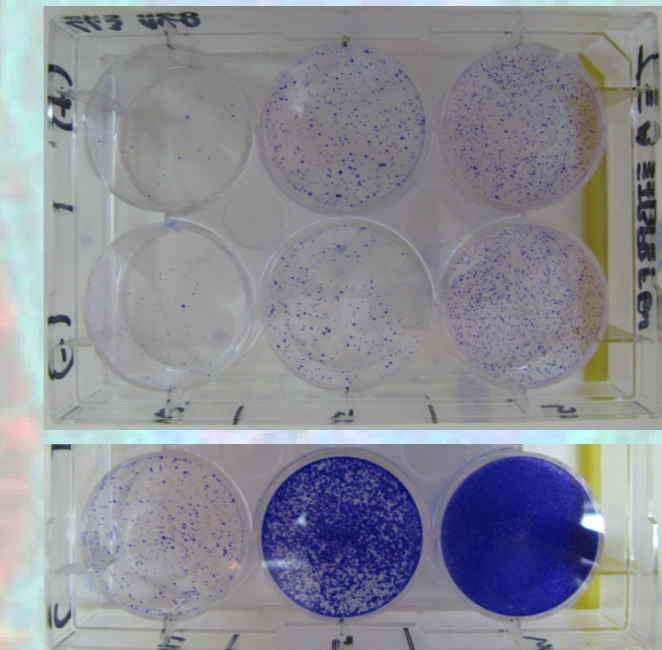
6-дневная селекция G418

Невозможно завершить исследование

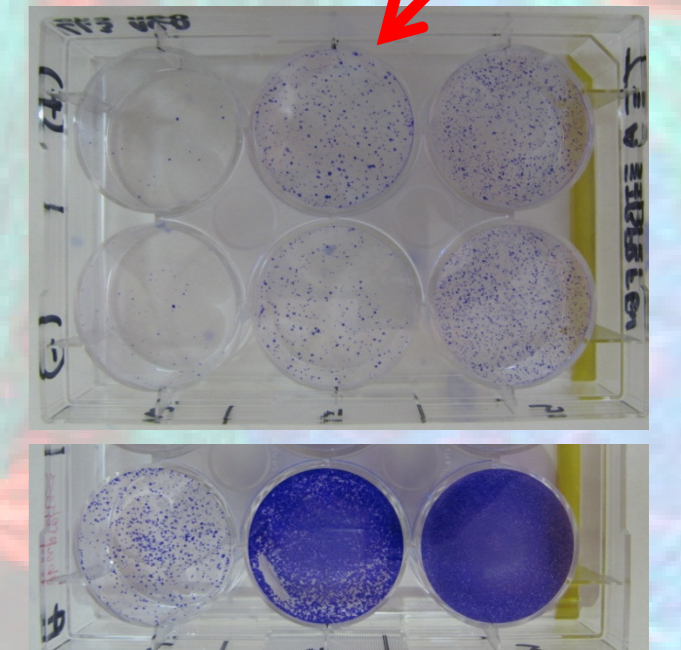
В) Эффект фармакологических препаратов на частоту ретротранспозиции



Лептомицин Б:
токсичен для клеток HeLa



Ацикловир: не токсичен, не оказывает эффект на ретротранспозицию



Ибупрофен: не токсичен, небольшое увеличение уровня ретротранспозиции

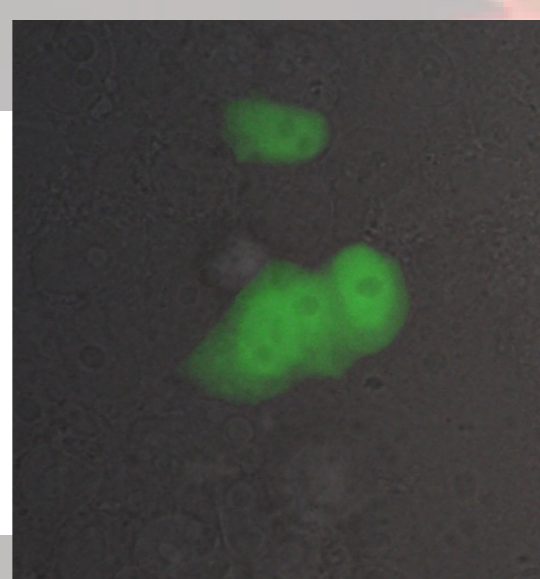
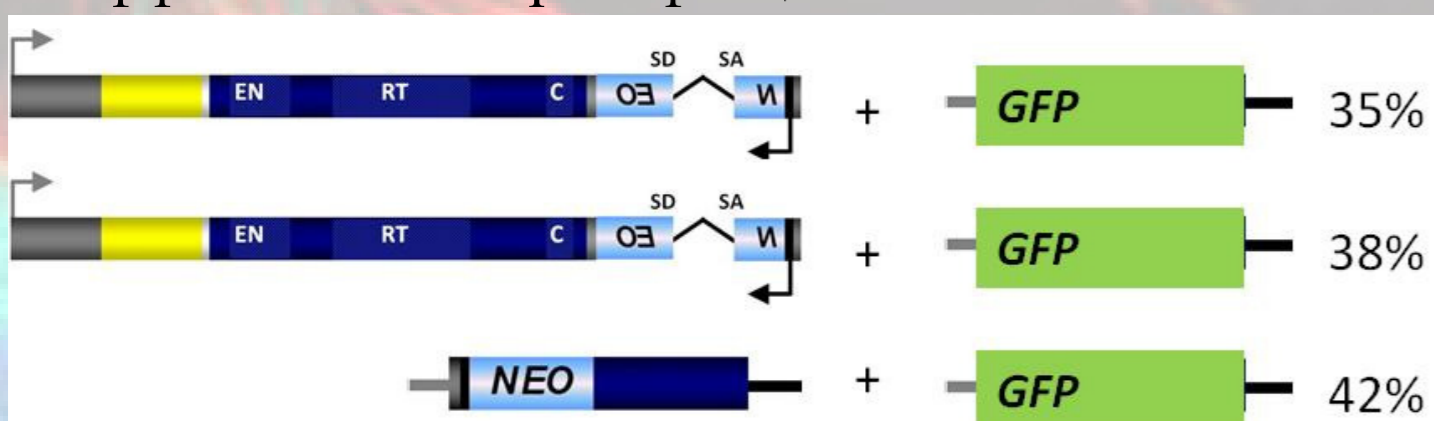
+ : L1.3 с препаратом; - : L1.3 чистый; Т: Проверка токсичности

Выводы

- Лептомицин Б оказался очень токсичен для клеток HeLa в концентрации 50 nM (24 часа). Поэтому, его влияние на ретротранспозицию не может быть достоверно оценено в условиях данного эксперимента.
- Ацикловир не оказал значительного влияния на эффективность ретротранспозиции.
- Ибупрофен вызвал лёгкое повышение уровня ретротранспозиции.

Результаты

Эффективность трансфекции:



Дальнейшие перспективы

- Вызвать мутации других консервативных доменов в LINE-1, кодирующих белки, и оценить их влияние на ретротранспозицию.
- Провести дальнейшие исследования с различными концентрациями ибупрофена и другими условиями эксперимента. Проверить другие распространённые препараты (ацетаминофен, болеутоляющие и т.д.).