

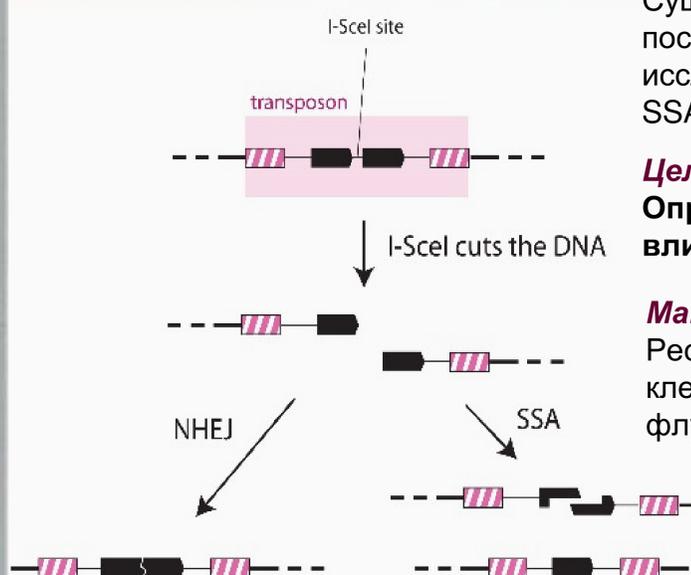


Муки выбора

Лаборатория генной конверсии

А. Журавлева, А. Гошина, М. Зотова, К. Метелева, Е. Баландова, М. Лаврова, А. Полинова,
В. Корженевский, В. Покусаева, О. Рогачевская, Г. Филион

Существует два основных способа репарации нативной структуры ДНК после хромосомных разрывов в клеточном ядре. В ходе проекта мы исследовали механизмы NHEJ (негомологичное соединение концов) и SSA (гибридизация одиночной цепи).



Цель проекта:

Определить, каким путем идет репарация ДНК и выяснить, что влияет на выбор пути репарации.

Материалы и методы:

Рестрикция ДНК; ПЦР; электрофорез в агарозном геле; работа с клеточными культурами; трансфекция клеток HEK293; флуоресцентная микроскопия

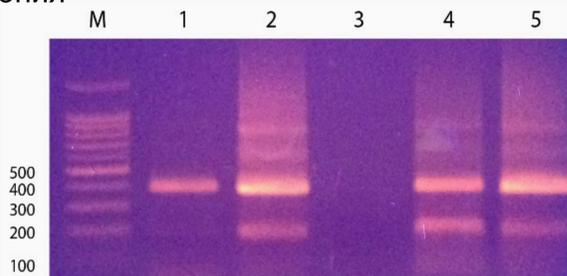


Рис. 1. Результаты электрофореза ДНК клеточных линий. М-маркер молекулярных весов; 1: негативный контроль; 2: результат амплификации транспозона, интегрированного в ДНК контрольной клеточной линии (без экспрессии гена I-SceI); 3-5: результат репарации в экспериментальных клеточных линиях.

Эксперимент №1: Исследование пути репарации в эмбриональных клетках мыши

1. Трансфекция эмбриональных клеток мыши плазмидами, содержащими ген эндонуклеазы рестрикции I-SceI и транспозон с сайтом узнавания данного фермента (сделано в Барселоне);
2. Инициация двухцепочечных разрывов ДНК и ее последующая репарация *in vivo* по SSA или NHEJ пути (сделано в Барселоне);
3. Экстракция ДНК из полученных на предыдущих стадиях клеточных линий;
4. Повторная рестрикция выделенной ДНК ферментом I-SceI *in vitro*;
5. Амплификация репарированных участков ДНК методом ПЦР;
6. Проведение электрофореза в агарозном геле с целью определения соотношения продуктов различных путей (NHEJ или SSA) ДНК-репарации (рис. 1).

Результаты

Репарация ДНК прошла с разным соотношением NHEJ (400 п.о.) и SSA (200 п.о.). Это объясняется тем, что транспозоны, которые содержат сайт рестрикции для I-SceI, встраиваются в клетки неселективно, т.е. в разные участки генома. Репарация разрыва ДНК, образовавшегося в результате действия фермента, зависит от локальной организации хроматина. Таким образом, способ, который клетка выбирает при репарации, определяется расположением разрыва на хромосоме.

Эксперимент №2: Визуализация гибридизации одиночной цепи (SSA) в клетках HEK293

Трансфекция клеток линии HEK293 разными плазмидами, содержащими последовательность генов:

- 1 - *gfp*; 2 - *gfp* (ген GFP с удвоенной нуклеотидной последовательностью, разделенной сайтом узнавания для I-SceI); 3 - *gfp*+I-SceI.

Результаты

Одновременная трансфекция клеток двумя плазмидами (рис. 2.1) приводит к рестрикции гена *gfp* эндонуклеазой I-SceI и последующей репарации ДНК, в результате которой восстанавливается нативная структура гена GFP и наблюдается флуоресценция белка.

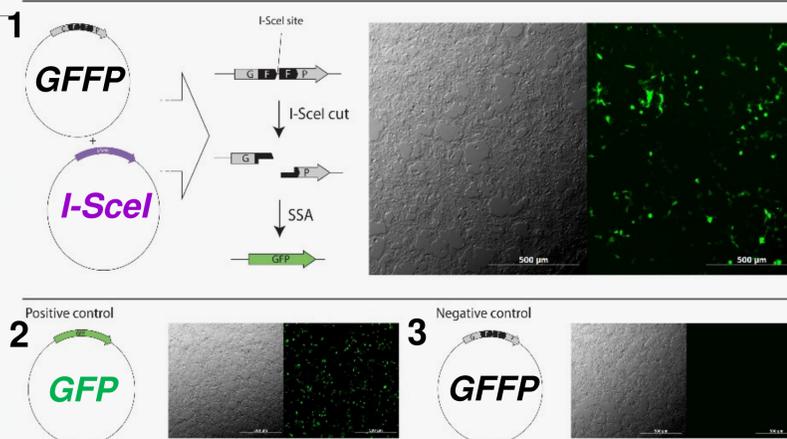


Рис. 2. Флуоресценция белка GFP в клетках HEK293. 1: совместная экспрессия генов GFP и I-SceI (SSA); 2: экспрессия гена GFP (положительный контроль); 3: экспрессия гена GFPFP (отрицательный контроль)