

Влияние «Ибупрофена» на ретротранспозицию LINE-1

Введение

Транспозоны - повторяющиеся последовательности ДНК, способные перемещаться внутри генома. Выделяют два типа мобильных генетических элементов: ДНК-транспозоны – для передвижения используют механизм «вырезать – вставить»; РНК-транспозоны - перемещаются за счет предварительного синтеза мРНК, которая используется в качестве матрицы для обратной транскрипции.

Большинство транспозонов были инактивированы в нашем геноме в процессе эволюции за исключением LINE-1 - активация которого продолжает менять геном человека.

Новые вставки играют важную роль в эволюционных процессах, но могут создавать мутации, вызывающие генетические заболевания. Чтобы предотвратить нежелательные мутации, мы попытались найти химические ингибиторы активности ретротранспозиции (РТ). Мы протестировали распространённые медицинские препараты (Ибупрофен и Цетиризин) на их способность влиять на степень РТ мобильного элемента LINE-1.

Для достижения этой цели мы трансфицировали клетки линии HeLa плазмидой, содержащей LINE-1, и проверили действие медицинских препаратов на клетках. В качестве контроля использовали котрансфекцию GFP.

Результаты показывают, что Ибупрофен является потенциальным ингибитором, в то время как Цетиризин не оказывает влияния на ретротранспозицию.

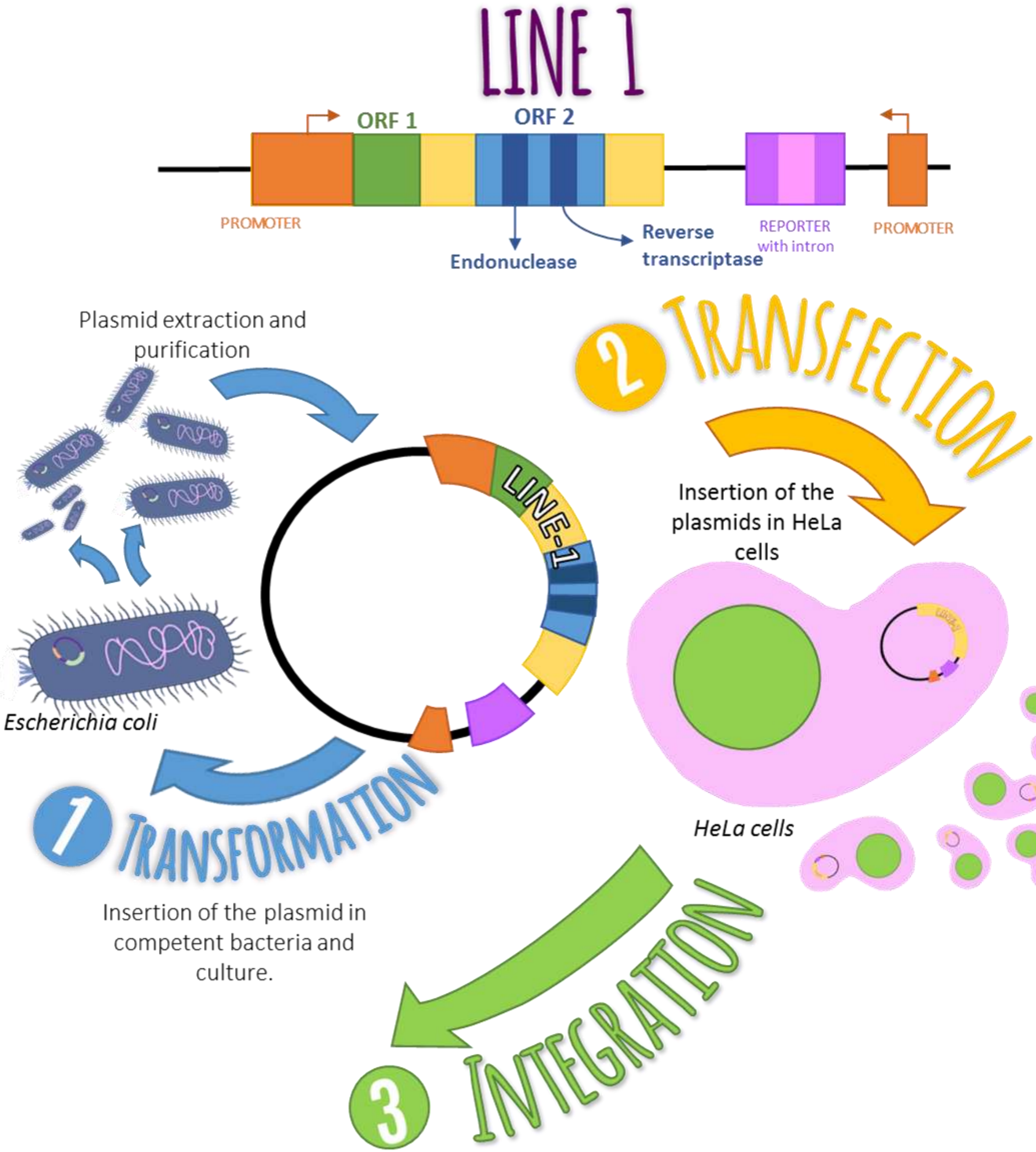
Marta Durante, Teodor Jové, Daria Kuzmina,

Artai Lage, Martina Serrat, Vsevolod Zvezdin

Yoana Arboleda, Jose Luis Garcia, Nataliia Sukharicheva, Thomas Widmann

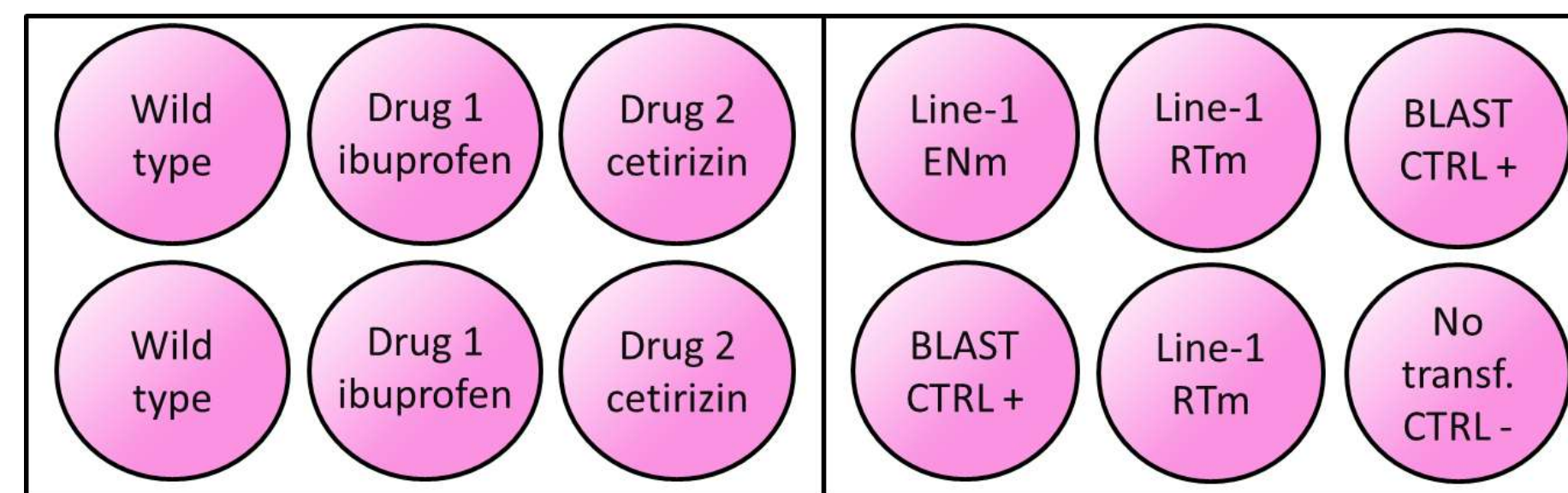


MATERIAL & METHODS

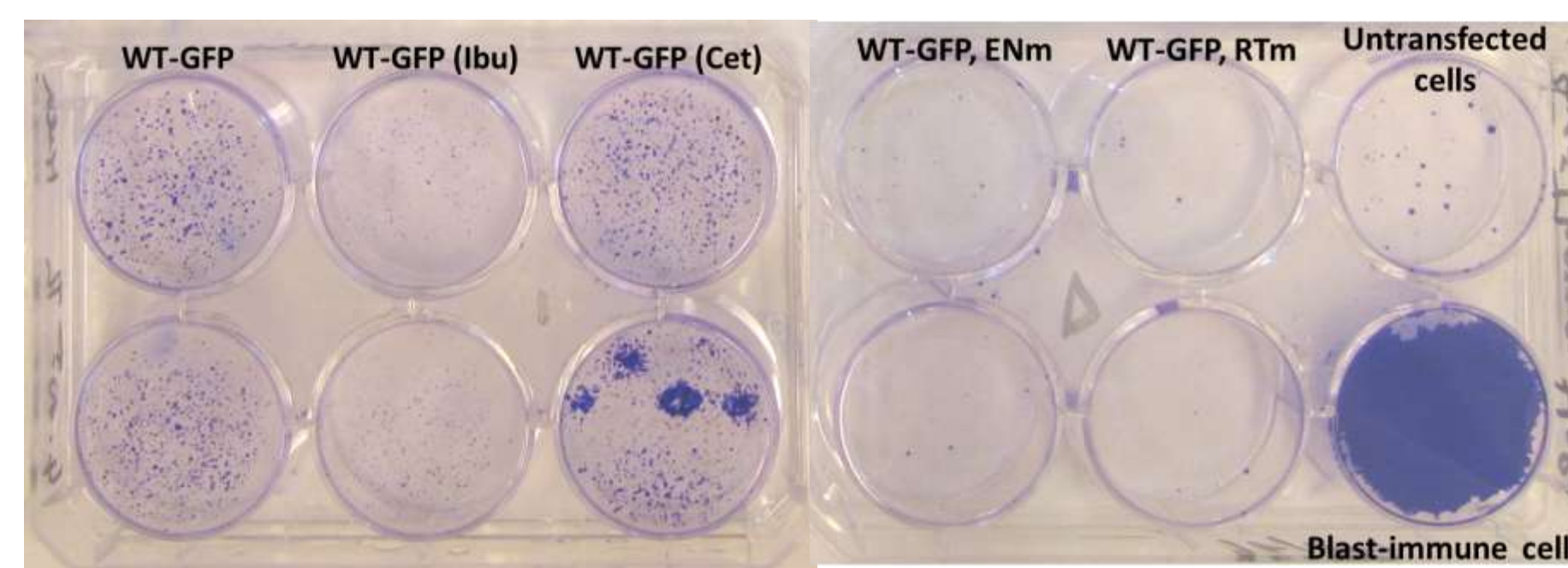


Исследование ретротранспозиции

Влияние медицинских препаратов и мутаций на ретротранспозицию Line-1

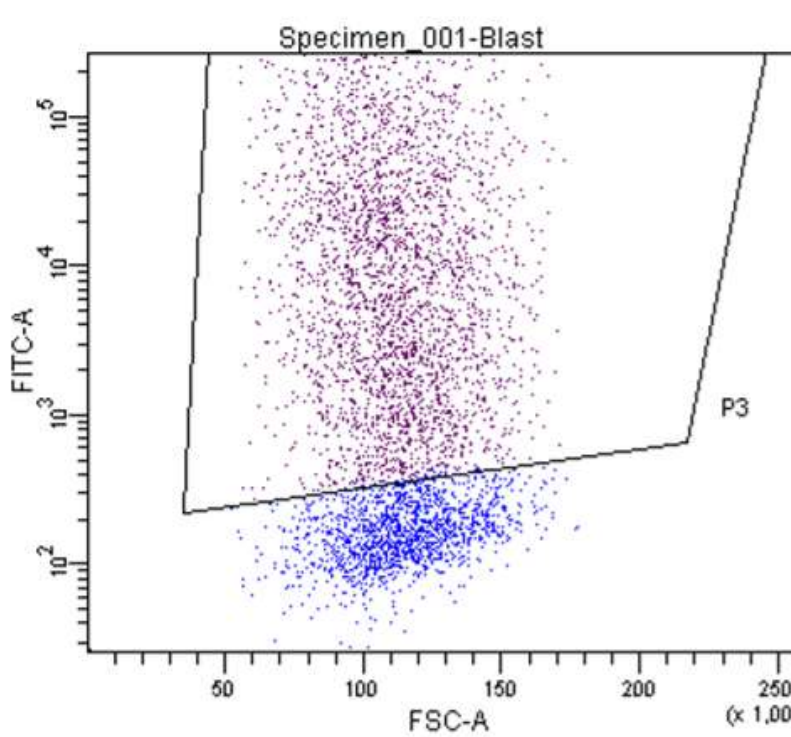


Клетки HeLa – трансфицированные плазмидами (лунки: n=2). L-1 WT - процент выживших клеток = 100%.



Колонии клеток HeLa, устойчивые к бластицидину, были фиксированы кристаллвиолетом. Ибупрофен и мутации в RT- и EN-сайтах ингибируют ретротранспозицию.

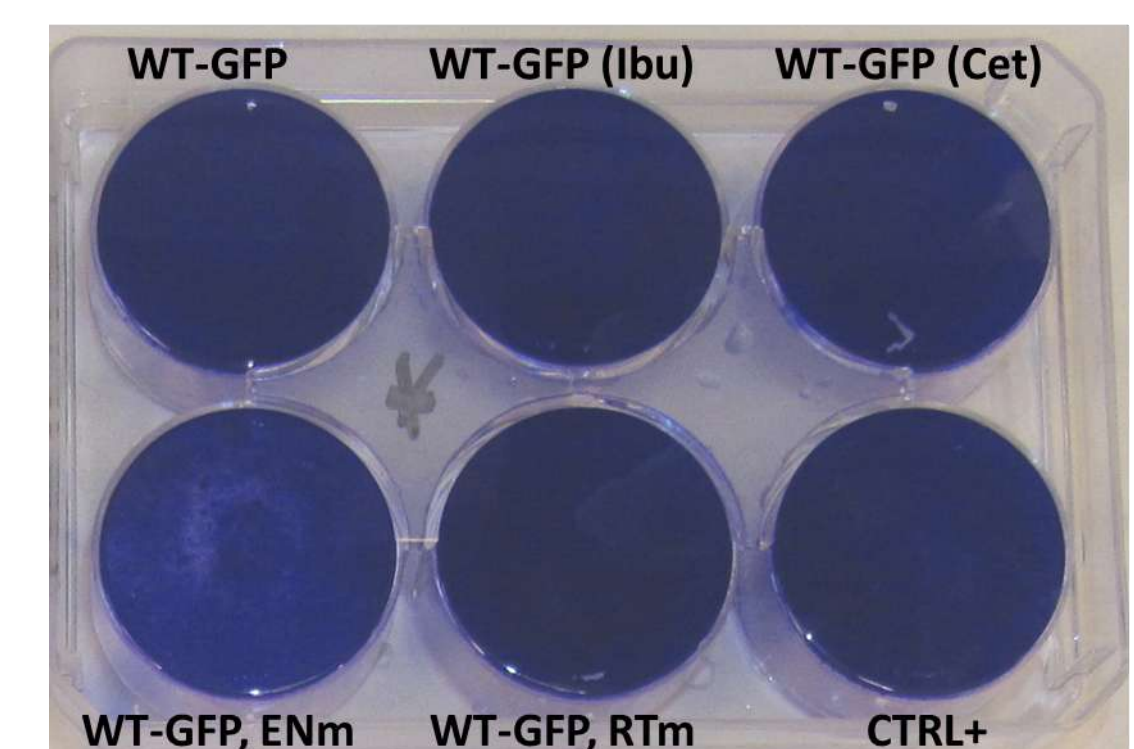
Тест эффективности трансфекции



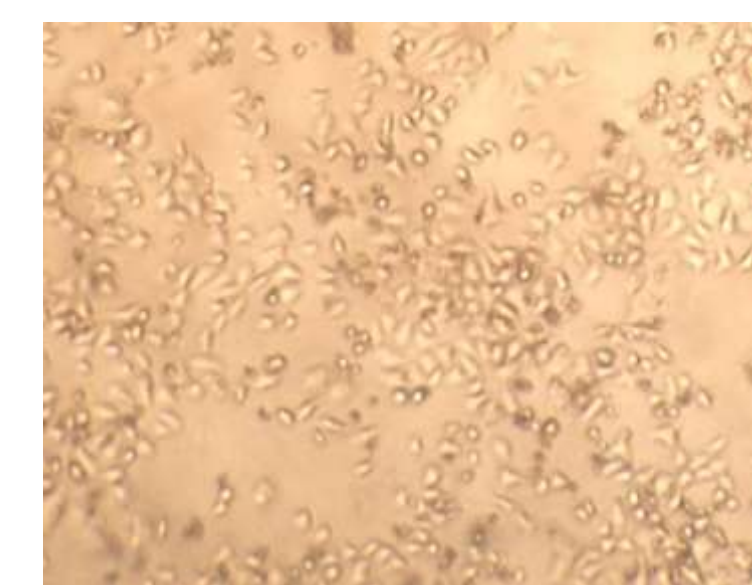
Клетки HeLa, котрансфицированные плазмидами L-1 и BLAST-кассетой, цитометрический анализ

Tube: Blast	Population	#Events	%Parent	%Total
	All Events	7,560	###	100.0
	P1	4,675	61.8	61.8
	P2	4,554	97.4	60.2
	P3	3,059	67.2	40.5

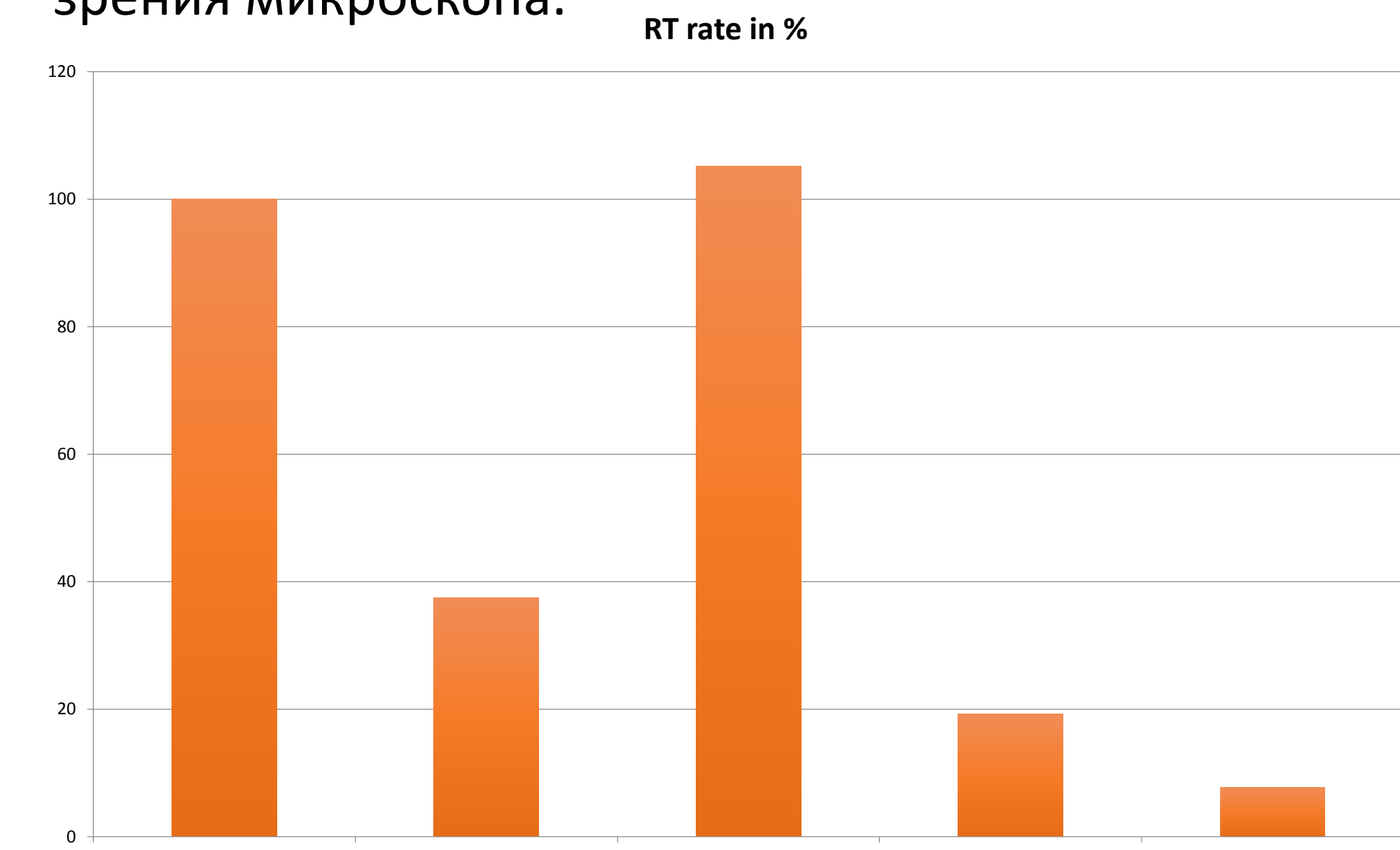
Тест на токсичность



Клетки HeLa, котрансфицированные плазмидами L-1 и BLAST-кассетой



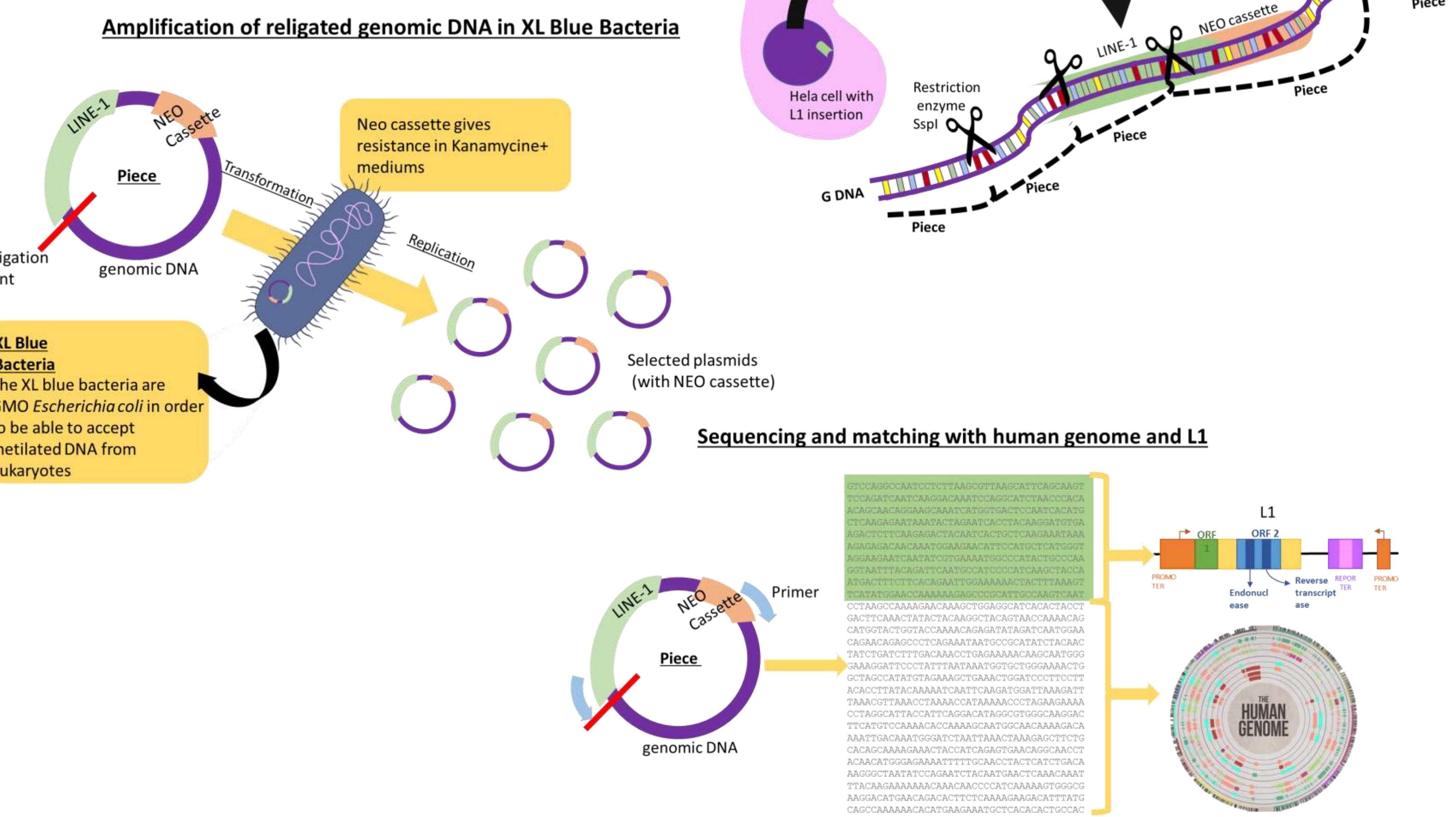
Клетки HeLa в поле зрения микроскопа.



Активность ретротранспозиции в различных клетках

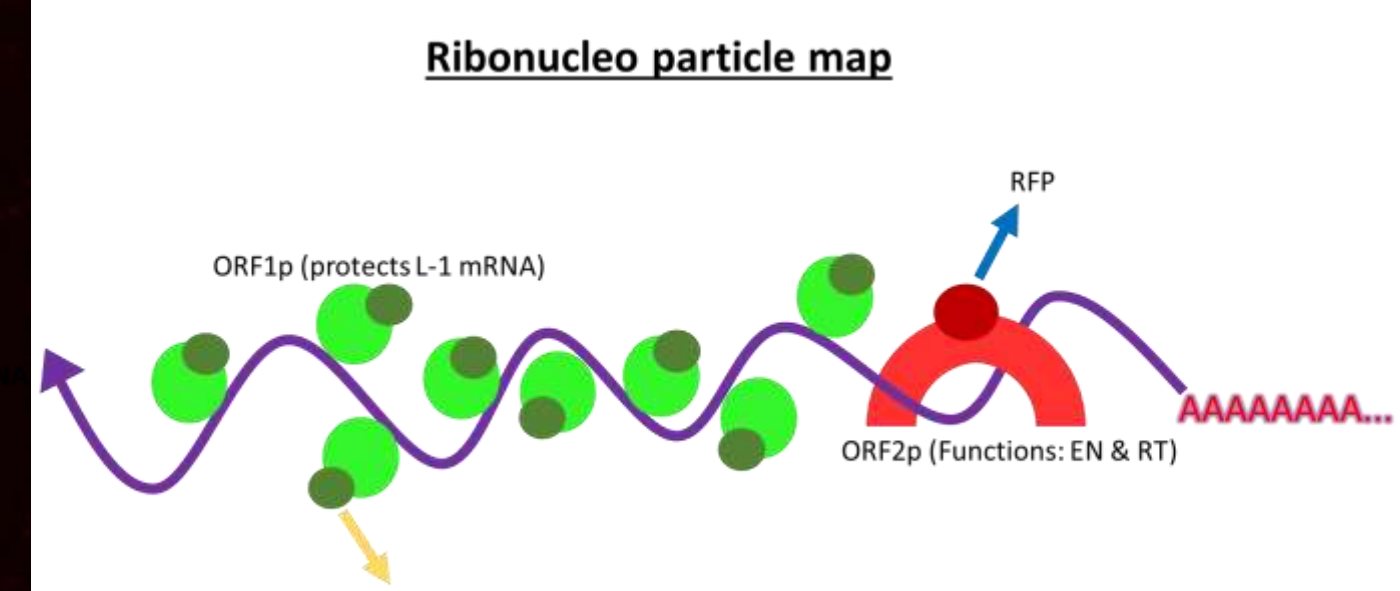
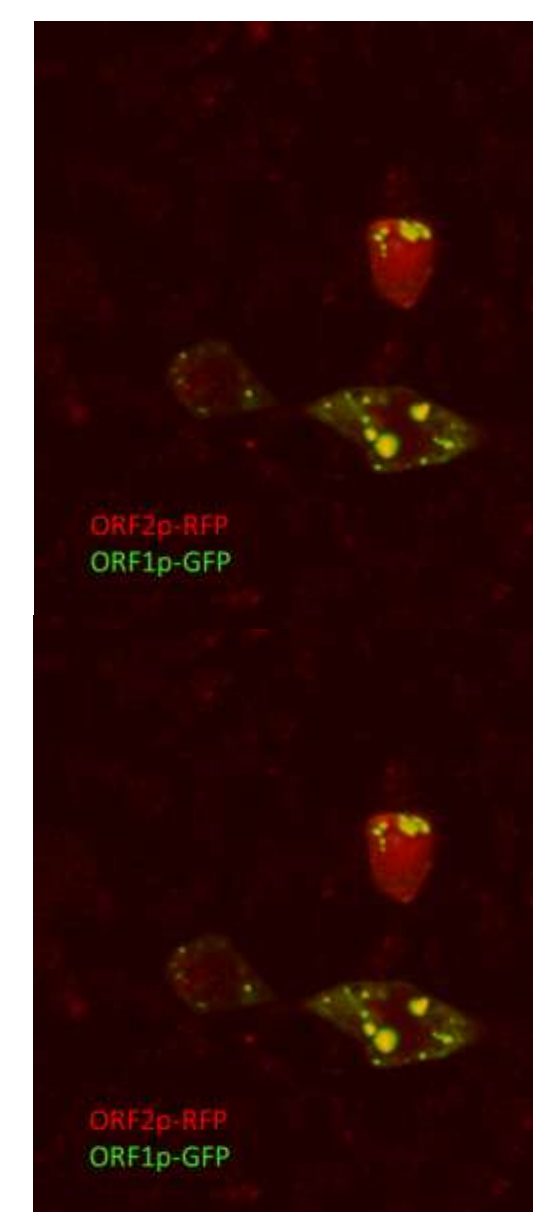
Анализ

ВОССТАНОВЛЕНИЯ



Colony	Chromosome locus
pRAM36	Chromosome 15
pRAM07	Chromosome 3 or 4 (inserted in another transposon)
pRAM41	Chromosome 4

Визуализация RNP



Дальнейшие перспективы...

Мы протестировали влияние Ибупрофена на ретротранспозицию LINE-1 в клетках HeLa, и нашим следующим шагом будет повторение этого эксперимента, но уже с другими концентрациями Ибупрофена.

Другое важное исследование – выяснение причин ингибирования Ибупрофеном LINE-1, что может быть достигнуто благодаря изучению действия на LINE-1 других лекарств, сходных по структуре с Ибупрофеном.

Также планируем провести эксперимент с другими линиями клеток: раковыми клетками U2S и 293T, стволовыми клетками IPSC, и клетками-предшественниками нейронов.