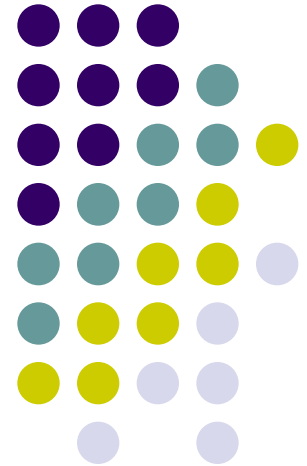
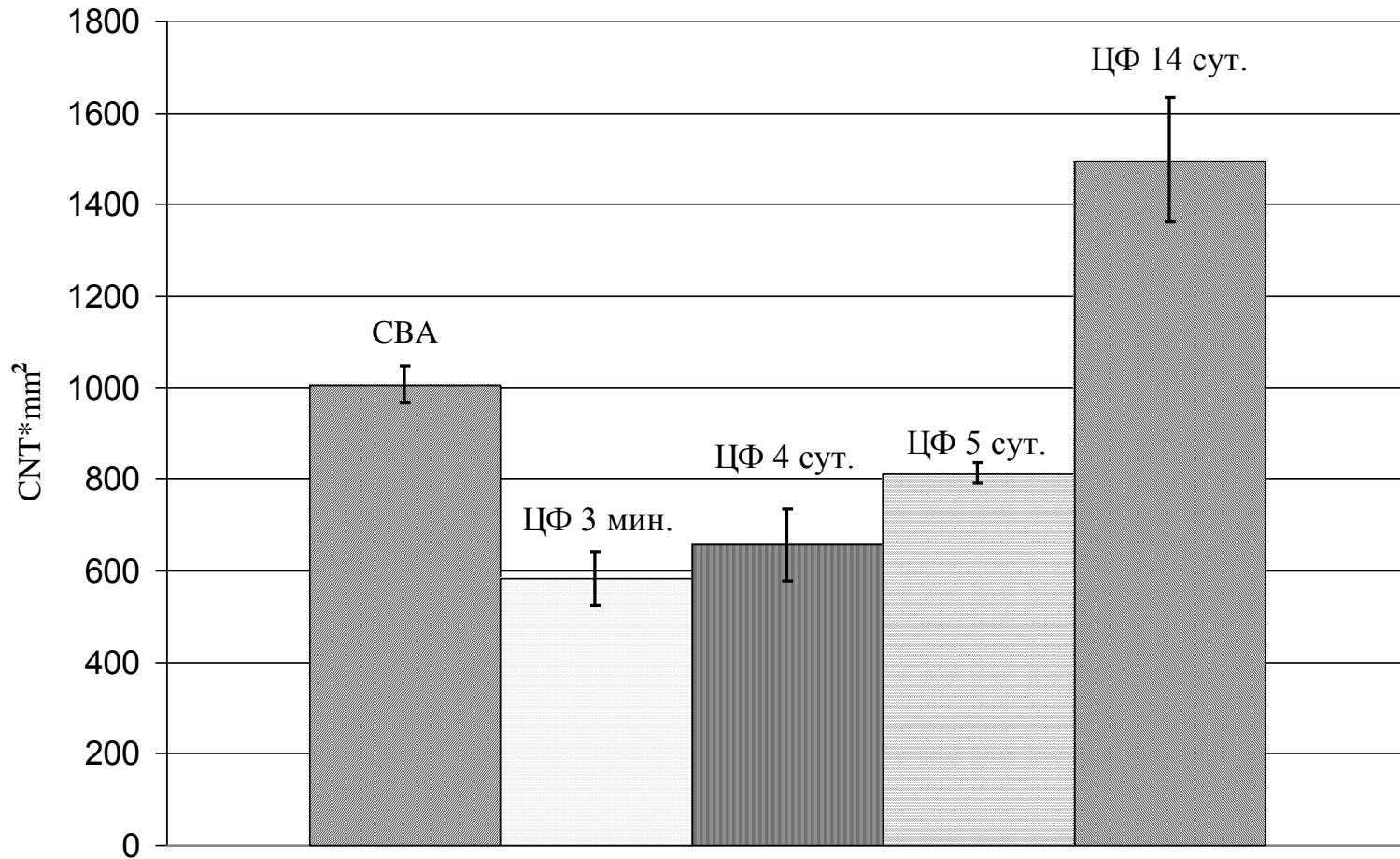
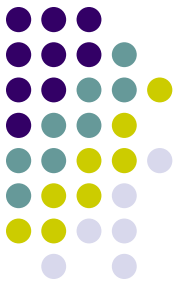


**ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА УМЕРЕННЫХ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ
МЫШЕЙ НА ФОНЕ ИНЪЕКЦИИ ЦИКЛОФОСФАНА В ВИДЕ
МОНОПРЕПАРАТА И В КОМБИНАЦИИ С ВВЕДЕНИЕМ
ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ
ДНК ЧЕЛОВЕКА**

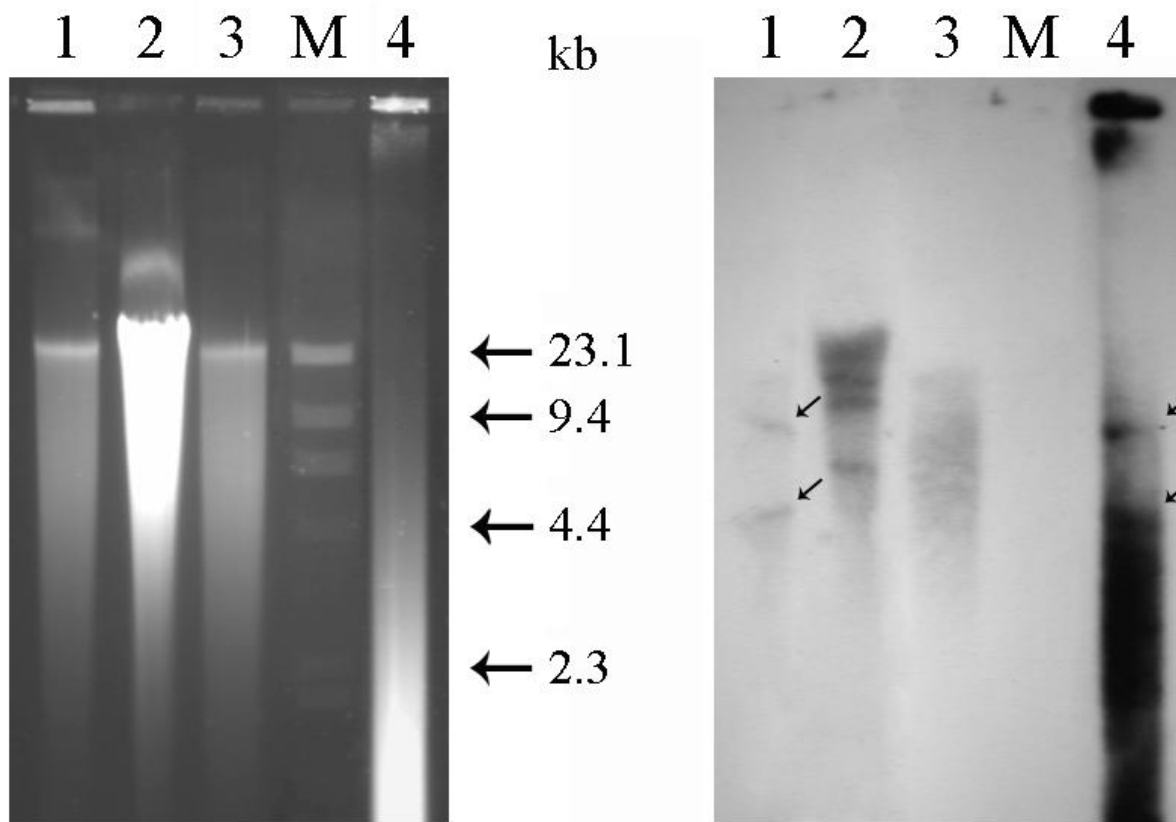
Работа выполнена студентом НГУ Прокопенко А.В.
в Институте Цитологии и Генетики СО РАН,
в лаборатории молекулярной биологии клетки.
Научный руководитель: д.б.н. Богачев С.С.



Гибридизация с Чел Alu-new повтором ДНК, выделенной из ККМ экспериментальных мышей в разное время после инъекции ЦФ.

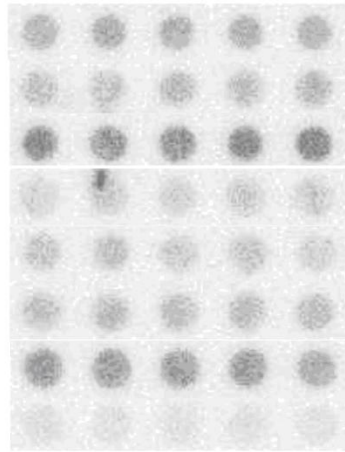


Гибридизация Alu-new повтора человека с ДНК, выделенной из ККМ экспериментальных мышей.

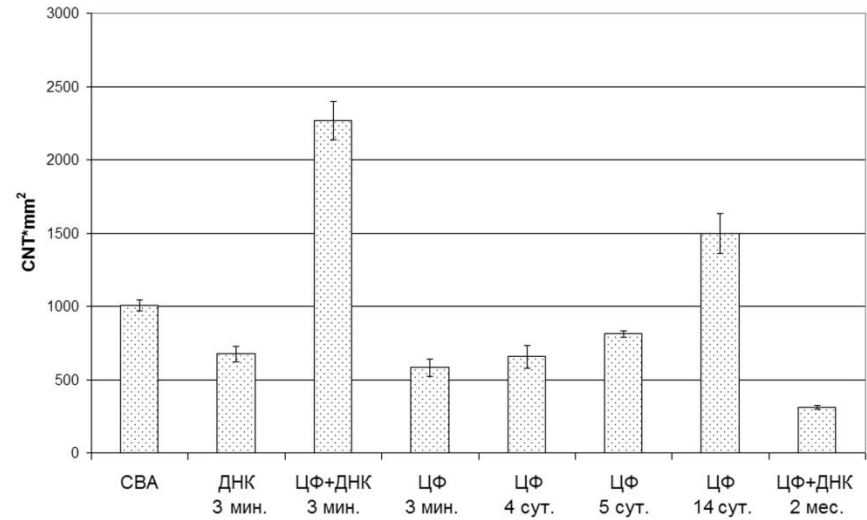


Электрофореграмма пульс электрофореза (слева) и рентгенограмма (справа) геномной ДНК из ядер клеток костного мозга мышей, которым кололи: 1 – ЦФ + ДНК человека, 2 – ДНК человека, 3 – ЦФ. В качестве зонда для гибридизации использовали Alu-new повтор, меченый в ПЦР ^{32}P dATP. 4 – препарат ДНК, используемый для инъекций.

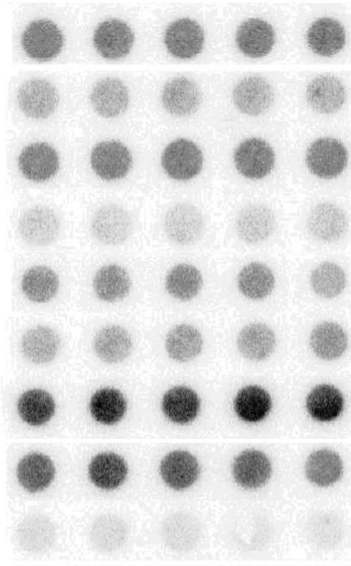
Гибридизация Дот-блота с ДНК ³²P меченного Alu-new повтора



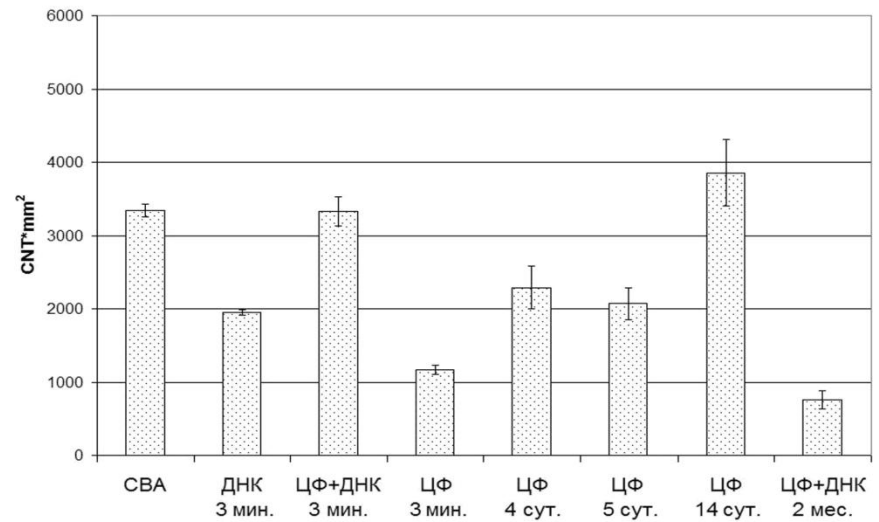
СВА
 ДНК 3 минуты
 ЦФ + ДНК 3 минуты
 ЦФ 3 минуты
 ЦФ 4 сутки
 ЦФ 5 сутки
 ЦФ 14 сутки
 ЦФ + ДНК 2 месяца

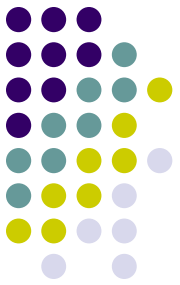


Гибридизация Дот-блота с ДНК ³²P меченного V1 повтора



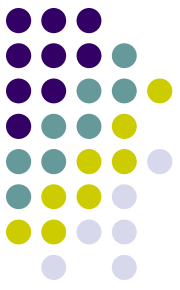
СВА
 ДНК 3 минуты
 ЦФ + ДНК 3 минуты
 ЦФ 3 минуты
 ЦФ 4 сутки
 ЦФ 5 сутки
 ЦФ 9 сутки
 ЦФ 14 сутки
 ЦФ + ДНК 2 месяца





Цель работы:

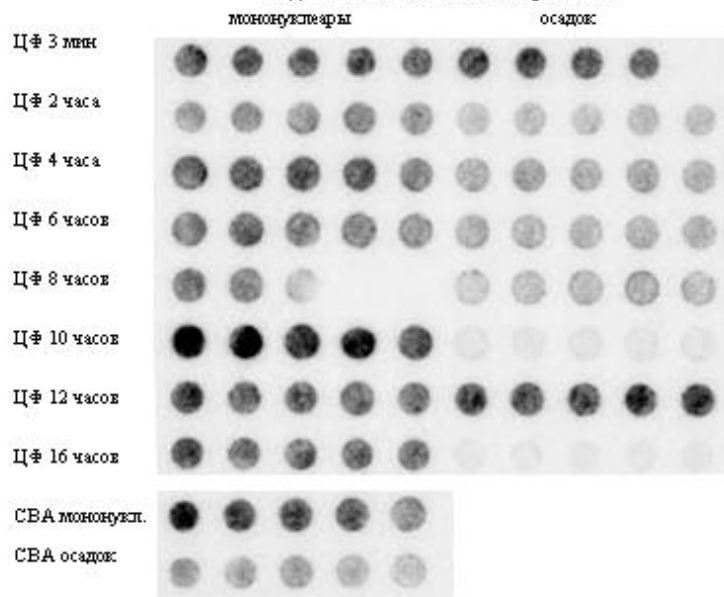
Характеристика изменений количества умеренных повторов в геноме мыши при инъекции кросслинкирующего цитостатика ЦФ в виде монопрепарата и в комбинации с введением фрагментированной ДНК человека.



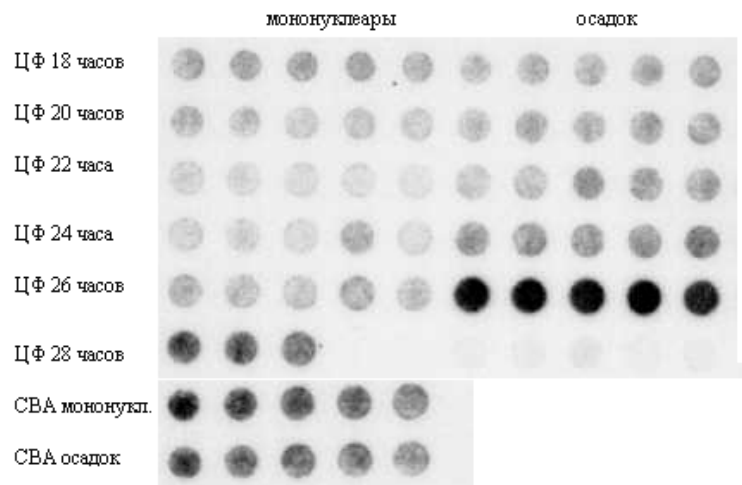
Задачи:

1. Методом дот-блот гибридизаций с ДНК ^{32}P меченных В1 и В2-повторов провести молекулярно-генетический анализ геномной ДНК, выделенной из ядер ККМ экспериментальных животных после введения им ЦФ в виде монопрепарата и в комбинации с инъекциями фрагментированной ДНК человека в различные промежутки времени после инъекции цитостатика.
2. Установить связано ли изменение количества умеренных повторов в геноме клеток костного мозга с процессами, происходящими при репарации МЦС, вызванных воздействием кросслинкирующего цитостатика ЦФ.
3. Установить, в какие промежутки времени наблюдается исследуемый феномен.

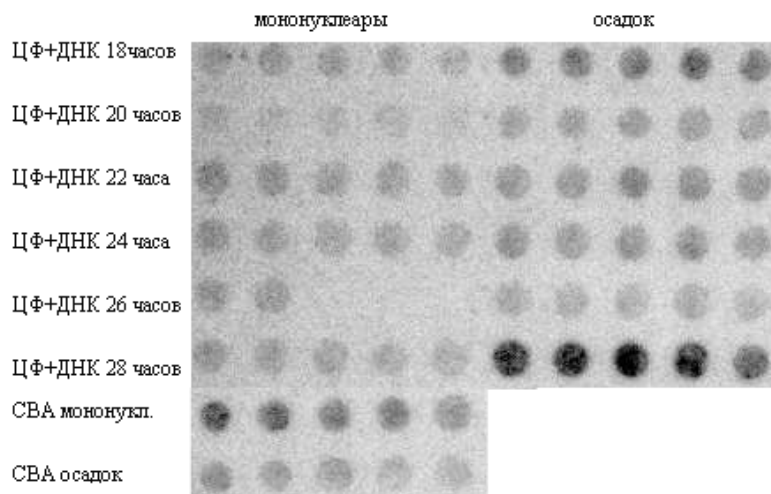
Дот блот с образцами ДНК (по 0,1 мкг) из ядер ККМ экспериментальных мышей, гибридизовали с ДНК ^{32}P меченного В1 повтора мыши.



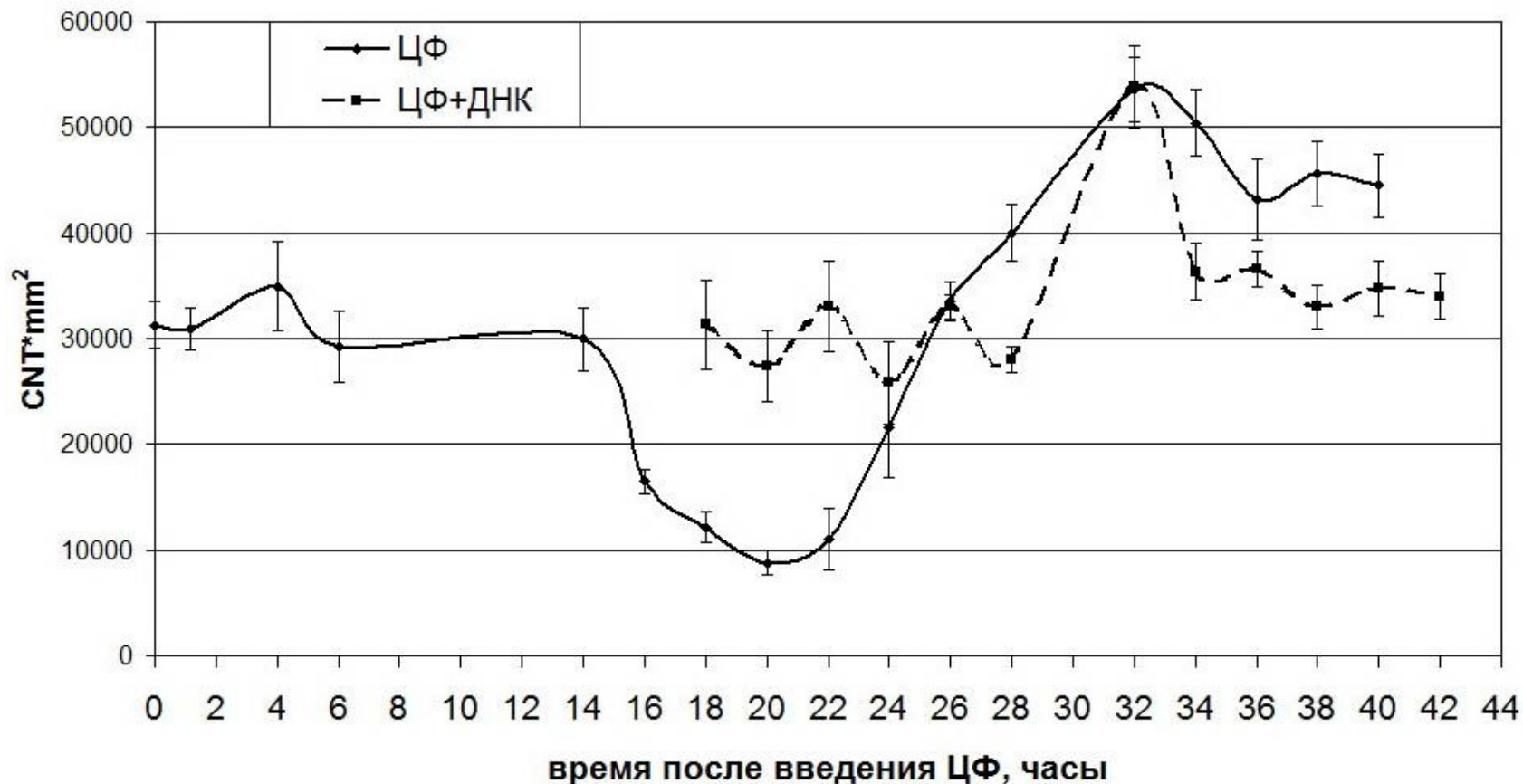
Дот блот с нанесенной ДНК (по 0,1 мкг), выделенной из ядер ККМ экспериментальных мышей, гибридизацию проводили с ДНК ^{32}P меченного В1 повтора мыши.



Дот блот с нанесенной ДНК (по 0,1 мкг), выделенной из ядер ККМ экспериментальных мышей, гибридизацию проводили с ДНК ^{32}P меченного В1 повтора мыши.

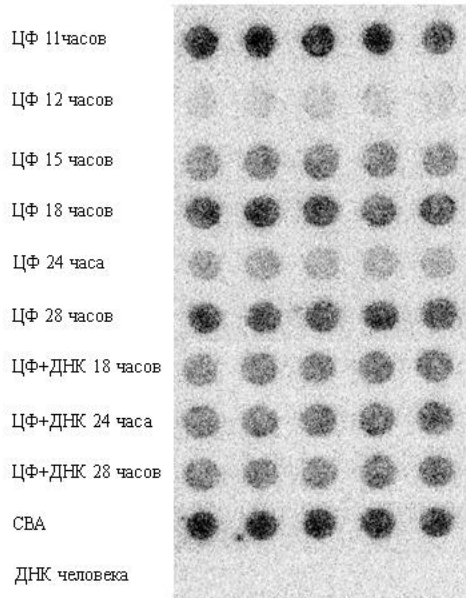
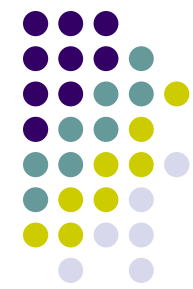


Количество В1 повторов в ККМ.

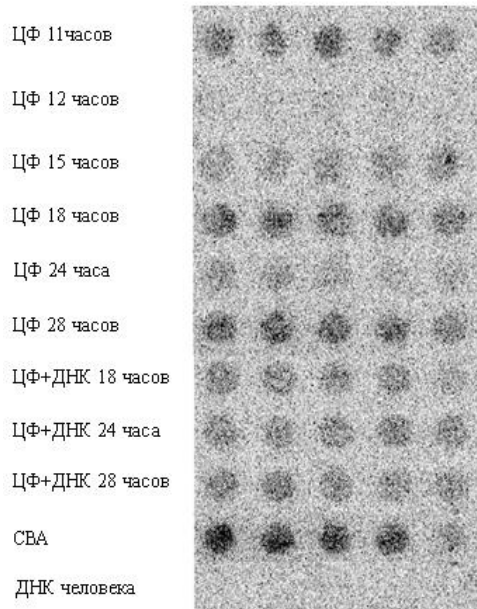
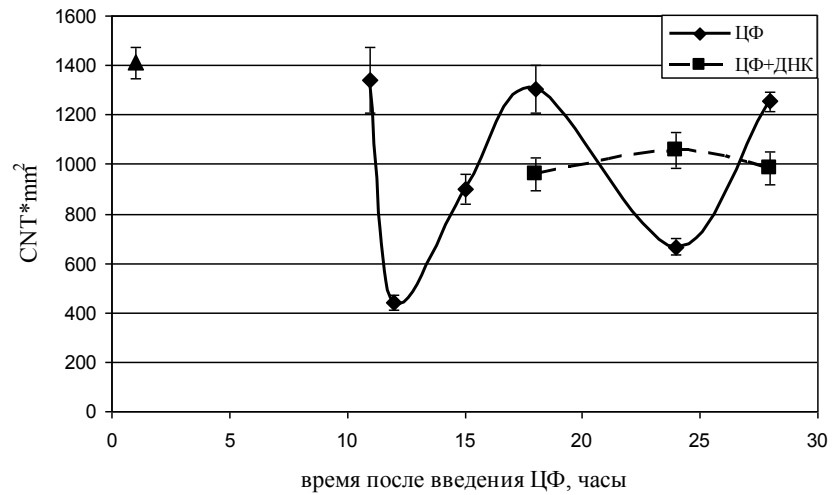


Относительное количество В1 повторов в геноме ККМ мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в виде монопрепарата (сплошная кривая) и ЦФ с последующими инъекциями экзогенной ДНК человека в промежуток времени 18-30 часов после инъекции цитостатика (пунктирная кривая). Нулевая точка – ДНК из ядер ККМ интактных мышей.

Количество умеренных повторов в ККМ.



Количество В1 повторов в ККМ



Количество В2 повторов в ККМ

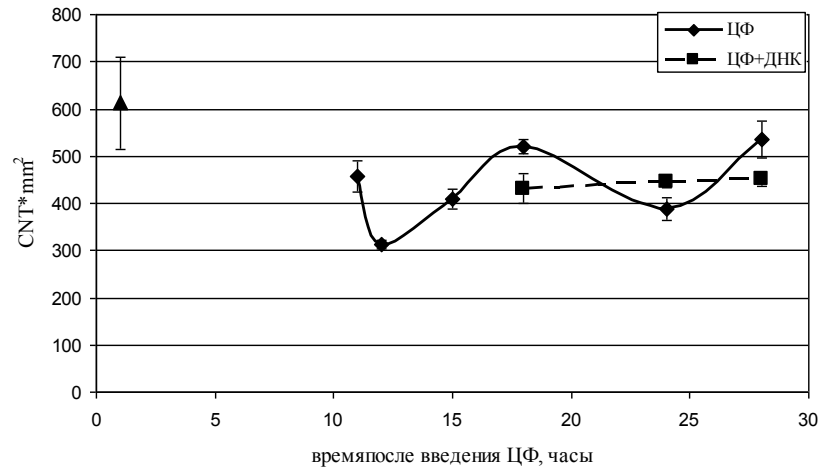
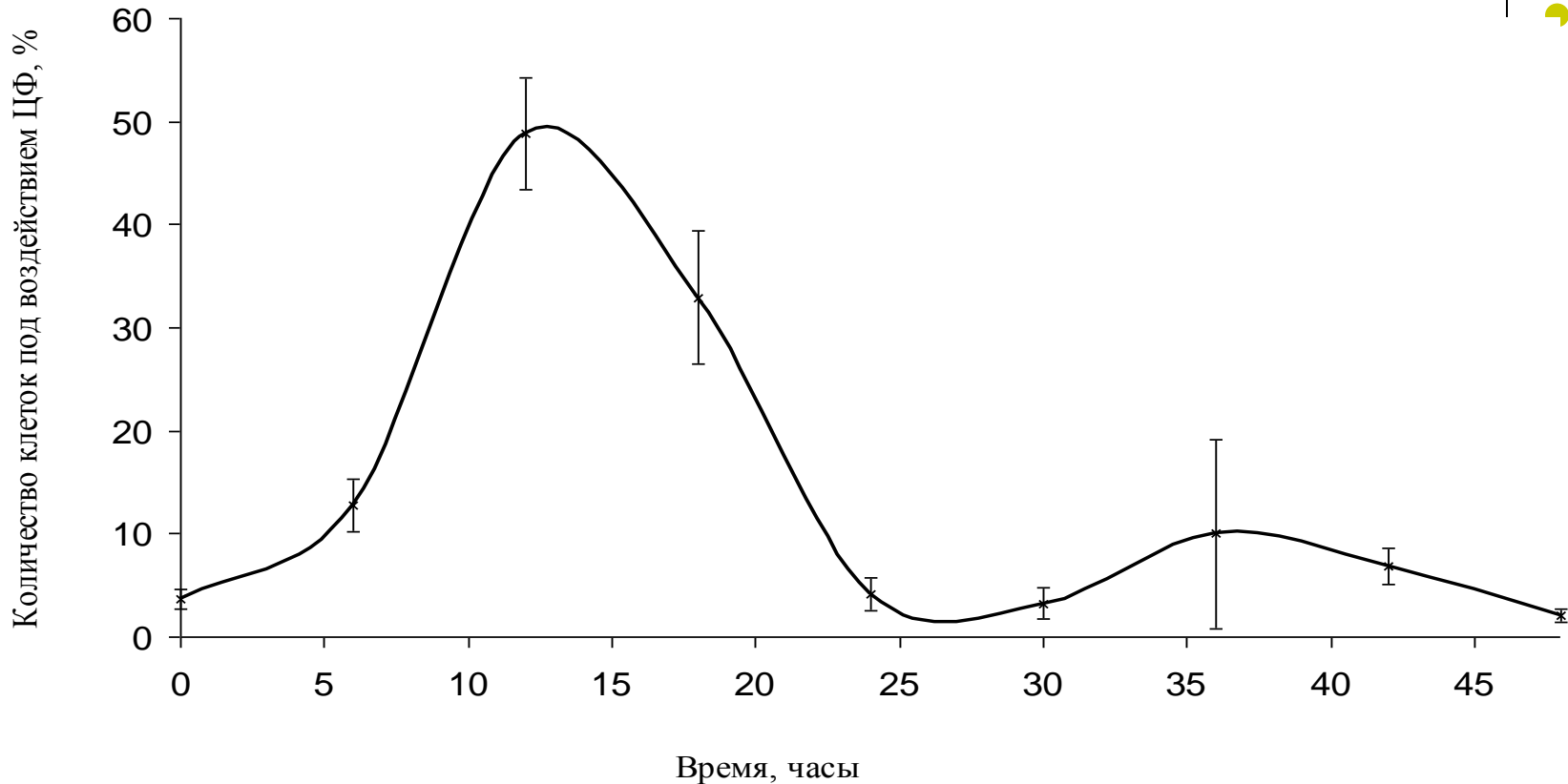


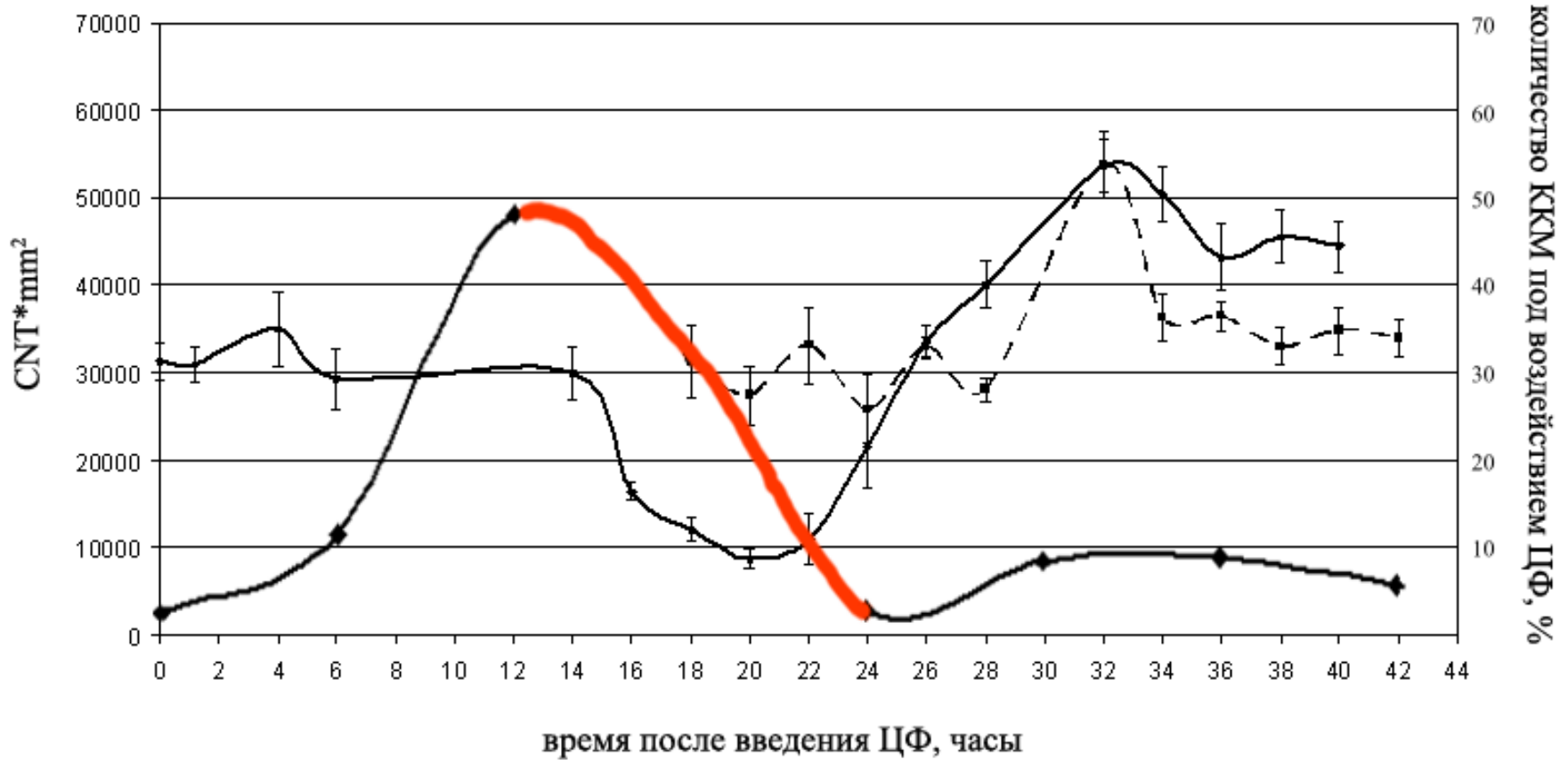
График формирования и репарации ДЦР.



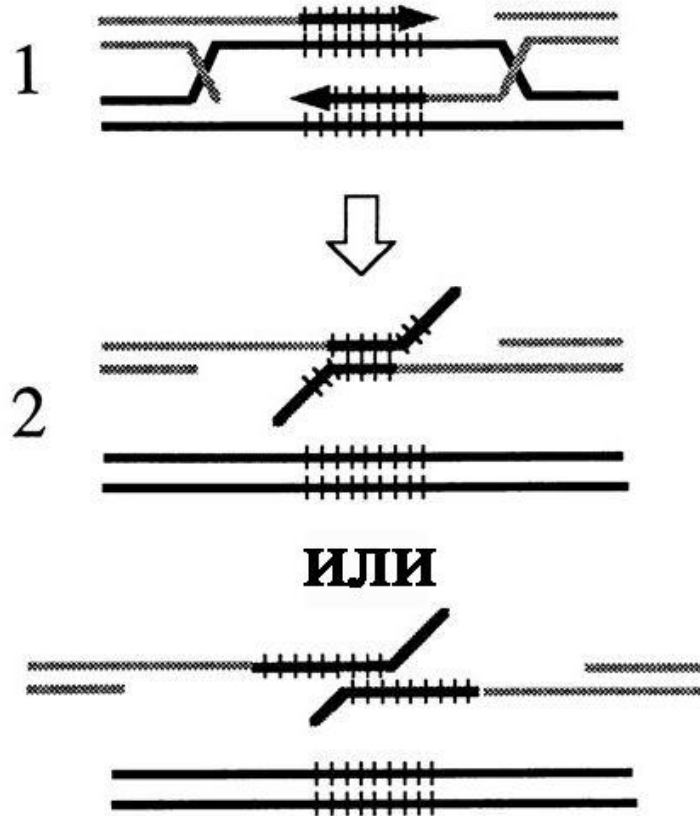
Кривая обозначает процент клеток, содержащих ДЦР, сформированных как промежуточный интермедиат репарации межцепочечных сшивок, индуцированных кросслинкующим цитостатиком ЦФ.



Наложение графиков формирования и репарации ДЦР с графиком изменения количества повторов.

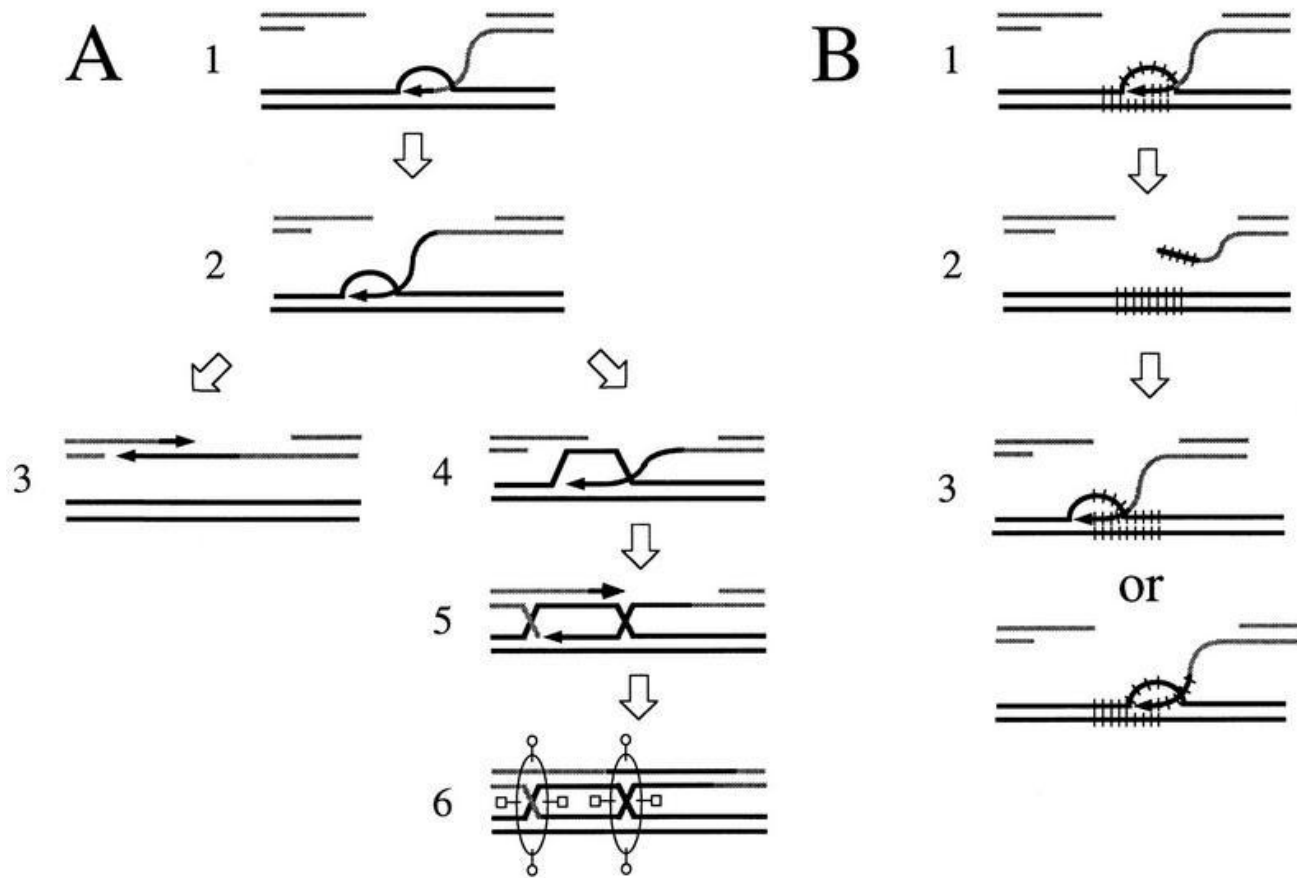


Уменьшение копийности tandemных повторов.



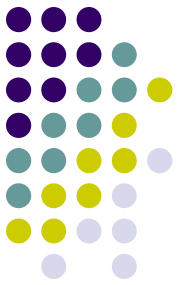
1 – синтез tandemных повторов с обоих 3'-концов ДЦР по матрице гомологичной цепи ДНК;
2 – возможные пути отжига концов ДЦР после отсоединения от гомологичной цепи ДНК
(Paques *et al.*, 1998).

Увеличение копииности тандемных повторов.

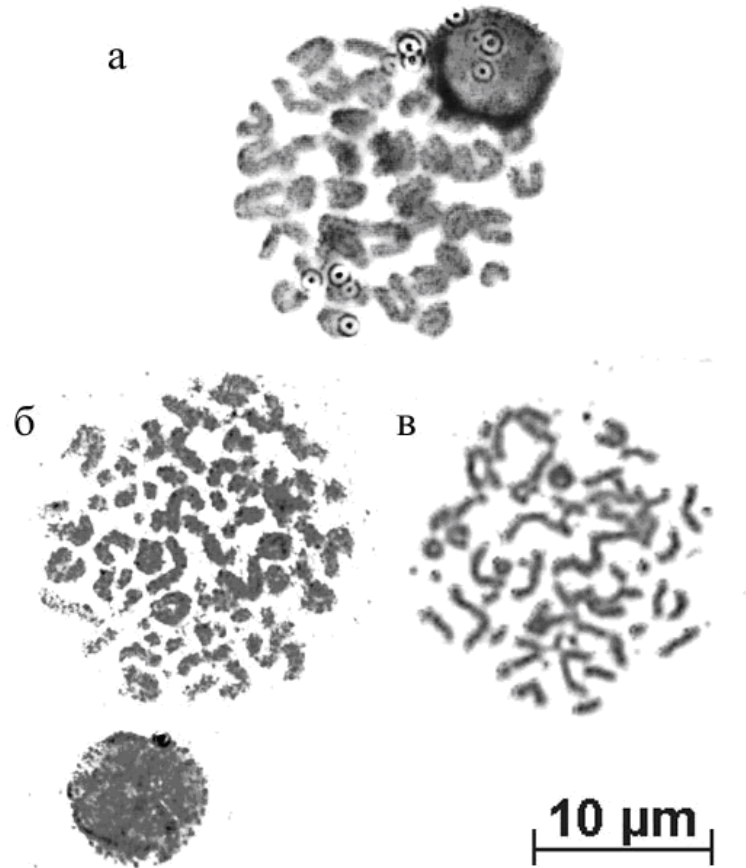


А - инвазия процессированного 3'-ОН конца ДЦР в гомологичный участок цепи ДНК и дальнейший синтез ДНК по гомологичной матрице (3), или образование структуры Холлидея с последующей генной конверсией или кроссинговером (4-6);

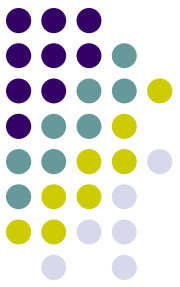
В - инвазия и синтез ДНК с процессированного 3'-ОН конца ДЦР (1,2); повторная инвазия (3) (Paques *et al.*, 1998).



Эффект pulverization хромосом.



Метафазные пластинки intactных мышей (а), мышей после инъекций ЦФ и ДНК человека (б) и мышей после инъекции ЦФ (в).



Выводы:

1. При репарации МЦС, вызванных действием цитостатика ЦФ, наблюдается изменение количества умеренных повторов в геноме ККМ экспериментальных мышей. В промежуток времени 14-22 часов происходит достоверное снижение количества повторов.
2. Инъекции экзогенной ДНК в промежуток времени 18-24 часа после инъекции ЦФ способствуют сохранению количества умеренных повторов в указанное время.
3. Уменьшение количества умеренных повторов при обработке мышей цитостатиком и сохранение количества повторов при инъекциях экзогенной ДНК в промежуток времени 18-24 часа связано с фазой репарации ДЦР как промежуточных интермедиатов репарации МЦС, индуцированных ЦФ.