

ПРОЦЕСС ОКИСЛЕНИЯ ГУАНИНА ПРОТЕКАЕТ С РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТЬЮ В ИНТРОНАХ ГЕНА ПРЕДШЕСТВЕННИКА БЕТА-АМИЛОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

Хрусталёв В. В.¹, Хрусталёва Т. А.², Попинако А. В.³

¹*Белорусский государственный медицинский университет*

²*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь*

³*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, Россия*

Актуальность. Мутагенез – это кислород-зависимый процесс, так как мишенью для окисления могут выступать азотистые основания ДНК. Окислительное «повреждение» гуанина, в частности, приводит к образованию 8-оксо-гуанина (8-оксо-G), который преимущественно образует комплементарные связи с аденином, а не с цитозином, как образует сам гуанин. Частота возникновения таких повреждений составляет примерно 10^3 на клетку в день, в раковых клетках увеличивается до 10^5 на клетку в день [1]. Окислительный стресс, таким образом, выступает одним из факторов, который может влиять на интенсивность мутагенеза. Система репарации в норме удаляет большую часть 8-оксо-G из ДНК. При этом работают как ДНК-гликозилазы, вырезающие 8-оксо-G из одноцепочечной ДНК, так и ДНК-гликозилазы, распознающие неправильные пары азотистых оснований, включающих 8-оксо-G. К последним относится фермент, распознающий неправильные пары 8-оксо-G:A и вырезающий из них аденин (ген MutYH у человека), а также фермент, вырезающий 8-оксо-G в его неправильных парах с цитозином (ген OGG1) [2]. Помимо гликозилаз в процесс успешной репарации 8-оксо-G вовлечены: ДНК-полимераза λ , обладающая высокой эффективностью по удалению аденина из пар с 8-оксо-G; эндонуклеаза Ape1, распознающая апуриновые-апиримидиновые сайты; все ферменты, так или иначе участвующие в процессе репликации. Активность каждого из этих ферментов регулируется, в том числе, на генетическом уровне. Эффективность репарации 8-оксо-G, а следовательно, конечная частота возникновения трансверсий G на T, зависит от экспрессии всех вовлечённых в неё ферментов. Герминативные (наследуемые) мутации происходят в процессе эмбриогенеза или гаметогенеза. Во время эмбриогенеза (на пути от зиготы до предшественников половых клеток) и во время гаметогенеза (на пути от предшественников половых клеток до, собственно, половых клеток) экспрессия генов, в том числе кодирующих ферменты из системы репарации, значительно изменяется. В наибольшей степени подвержены мутациям именно те гены, которые отличаются высоким уровнем экспрессии: в процессе транскрипции особенно часто повреждаются азотистые основания из нетранскрибируемой цепи ДНК, которая во время синтеза РНК на комплементарной ей цепи пребывает в одноцепочечном состоянии. Соответственно, по направлению герминативных мутаций можно судить о том, в каких условиях экспрессируется тот или иной ген в процессе эмбриогенеза и гаметогенеза. Ген эукариотического организма зачастую содержит автономно транскрибирующиеся элементы: гены коротких и длинных

некодирующих РНК. Эти гены могут перекрываться не только с интронами генов, кодирующих белок, но и с экзонами. При этом гены коротких и длинных РНК могут находиться как на той же цепи, что и экзоны кодирующего белок гена, так и на комплементарной. Кроме того, существует вероятность работы альтернативных сайтов начала транскрипции внутри гена, активность которых может приводить к экспрессии короткого варианта белка. Если трансверсии С на А являются последствием трансверсий G на Т на комплементарной цепи, анализ частот этих замен может быть полезным для изучения транскрипции с комплементарной цепи ДНК.

Цель – оценка интенсивности окисления гуанина в интронах гена, кодирующего белок предшественник бета-амилоидных пептидов (APP). Рабочая гипотеза заключается в том, что в интронах, имеющих автономно транскрибирующиеся элементы на комплементарной цепи, должна быть повышена частота трансверсий С на А относительно частоты трансверсий G на Т; а в интронах, автономно транскрибирующиеся элементы которых экспрессируются при особых условиях работы системы репарации, будут наблюдаться отклонения в соотношении частот возникновения трансверсий GC на AT и AT на GC.

Материалы и методы исследования. В качестве материала использованы сведения о герминативных мутациях в интронах гена APP человека из базы данных Ensembl (ENSG00000142192), нуклеотидные последовательности интронов. Частоты мутаций были рассчитаны как отношение количества сайтов с определенным типом замены к количеству нуклеотидов, способных к такой мутации, в консенсусной последовательности. Частоты сравнивали с помощью t-теста для относительных величин.

Результаты. Сравнение частот трансверсий G на Т с частотами трансверсий С на А показало (рисунок), что в 10 из 17 интронов гена APP первая достоверно превышает вторую: преобладает окисление гуанина на «плюс» цепи – экспрессия элементов с комплементарной цепи не столь интенсивна в период эмбриогенеза и гаметогенеза. Интронами, в которых частоты возникновения трансверсий G на Т и С на А одинаковы, являются: интроны 4-5 и 14-15 (длинные некодирующие РНК на комплементарных им цепях действительно найдены в гене APP мыши), а также интроны 7-8, 10-11, 12-13, 15-16 и 16-17.

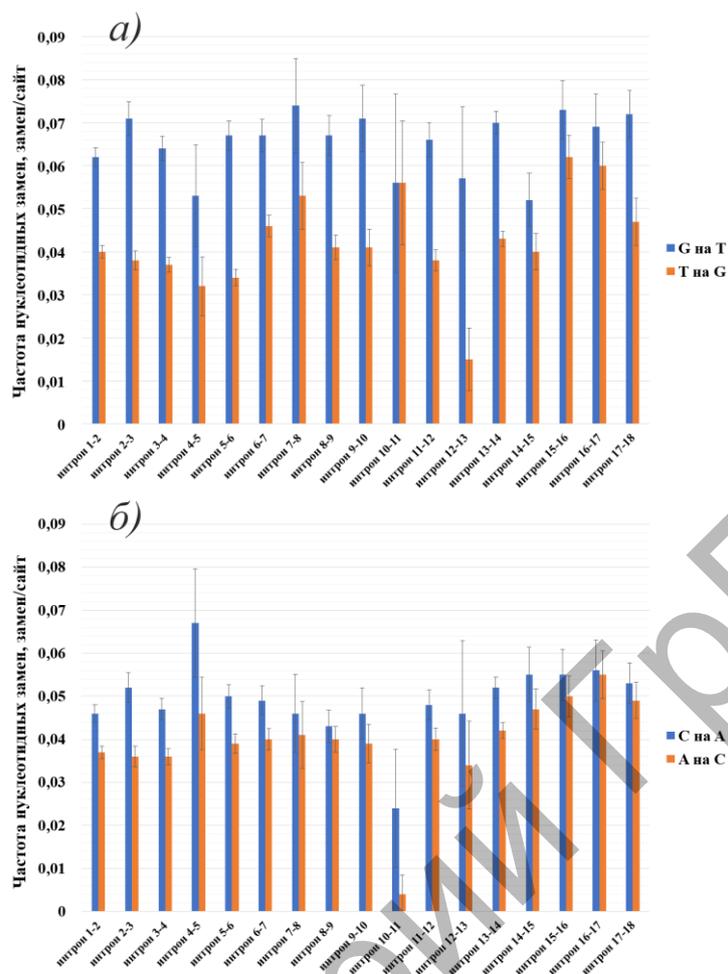


Рисунок. – Частоты герминативных нуклеотидных замен (а) G на T и T на G, (б) C на A и A на C в интронах гена APP человека

Частота трансверсий G на T достоверно превышает частоту обратных замен T на G в 11 из 17 интронов. Исключительными интронами, в которых частоты возникновения этих замен одинаковы, являются: интрон 4-5, 7-8, 10-11, 14-15, 15-16, 16-17. При этом частота трансверсий C на A достоверно превышает таковую для обратных трансверсий A на C только в интронах 1-2, 2-3, 3-4, 5-6, 6-7 и 13-14.

Отклонения в частотах возникновения замен в интроне 10-11 можно попытаться связать с малым числом мутаций (154), но в 3'-концевых интронах их значительно больше (2032 в интроне 15-16). На рисунке *а* заметно, что частота возникновения трансверсий T на G достоверно выше в интронах 15-16 и 16-17, чем в большинстве других интронов (за исключением интронов 7-8 и 10-11).

На рисунке *б* видна та же тенденция, но для замен A на C. Эти данные свидетельствуют о том, что 3'-концевой фрагмент гена APP может автономно экспрессироваться на определенных стадиях эмбриогенеза или гаметогенеза, накапливая трансверсии по направлению AT на GC. Последовательность, соответствующая бета-амилоидным пептидам, находится в экзонах 16 и 17.

Вывод. Полученные данные позволяют предположить возможность автономной экспрессии мРНК гена APP, включающей последовательность, кодирующую бета-амилоидные пептиды.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № Б21РМ-046: Хрусталёва Т. А.), РФФИ (грант 20-54-04-004) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Попинако А. В.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dianov G., Bischoff C., Piotrowski J., Bohr V.A. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, № 50. – P. 33811–33816.
2. van Loon B., Hübscher U. An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase lambda // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, № 43. – P. 18201–18206.

ИЗМЕНЕНИЕ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

**Челнокова И. А.¹, Ронишенко Б. В.², Никитина И. А.³,
Стародубцева М. Н.^{1,3}**

¹ГНУ Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси,
г. Гомель, Беларусь

²ГНУ Институт физико-органической химии Национальной
академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь

³Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

Актуальность. Основная роль липопротеинов заключается в транспортировке липидов, таких как холестерин и триглицериды. Активные формы кислорода, образующиеся при действии ионизирующего излучения, вызывают образование окисленных форм липопротеинов, что в свою очередь приводит к изменению структуры и функций липопротеинов и образованию атеросклеротических бляшек [1]. Ввиду значительного роста медицинских диагностических процедур, связанных с использованием рентгеновского излучения, возрастает необходимость более детального изучения роли окислительного стресса в развитие патологий сердечно-сосудистой системы.

Цель – изучить изменение дзета-потенциала липопротеинов низкой плотности после облучения *in vitro* цельной крови крыс рентгеновским излучением в дозах 1 и 100 Гр.

Материалы и методы исследования. До начала эксперимента было получено одобрение комитета по этике УО «Гомельский государственный медицинский университет» на проведение исследования.

Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г.

Животные содержались в стационарных условиях вивария Института радиобиологии НАН Беларуси на полноценном стандартном пищевом рационе и