

реженню чужинних хромосом у гібридних геномах завдяки відсутності беккросування з рекурентним генотипом Аврора, яке є

обов'язковим елементом методу при самостерильності гібридів.

Література

1. Panayotov I., Tsujimoto H., Fertility restoration and NOR suppression caused by *Aegilops mutica* chromosomes in alloplasmic hybrids and lines // *Euphytica*. – 1997. Vol. 94, №2. – P. 145–149.
2. Eser V. Characterisation of powdery mildew resistant lines derived from crosses between *Triticum aestivum* and *Aegilops speltoides* and *Ae. mutica* // *Euphytica*. – 1998. – Vol. 100. – P. 269–272.
3. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – №10. – С. 58–66.
4. Jones J.K., Majisu B.N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1968. – Vol. 10, №3. – P. 620–626.
5. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes // *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* – 1991. – №137. – P. 1–116.
6. Антонюк М.З., Терновська Т.К. Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом “змішування” хромосом у межах одного субгеному // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть*. Том 2. – Київ: Логос, 2001. – С. 368–375.

T.S. IEFIMENKO, M. Z. ANTONYUK, V.S. MARTYENKO

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

DEVELOPMENT OF ALIEN-SUBSTITUTION AND ALIEN-ADDITION *TRITICUM AESTIVUM* / *AEGILOPS MUTICA* LINES

Aims. Development of *T. aestivum* / *Ae. mutica* introgressive lines and their assessment for powdery mildew resistance and morphological characters. **Methods.** Artificial hybridization, determination of chromosome numbers at mitosis metaphase, PCR, dot-blot hybridization of genome DNA. **Results.** AABBDT hybrid was sufficiently self-fertile; therefore, progeny derived from its self-pollination were used for the development of introgressive lines, according to chromosome mixing method. Avoidance of backcrossing to recurrent parent provided maximal retention of *Aegilops* chromosomes in progeny used for introgressive lines development. **Conclusions.** Derived introgressive lines are appropriate for the following identification of quantity and amount of alien introgressions and determination of their homoeological identity.

Key words: wheat introgressive lines, *Ae. mutica*, powdery mildew, frost resistance.

КОВАЛЬЧУК М.В.¹, ГУЛЬКО Т.П.^{1,2}

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины*

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150, e-mail: kovtv@ukr.net

² *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»*

Украина, 04114, Киев, ул. Вишгородская, 67

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ICR, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОЙ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ

Онкозаболевания занимают одно из первых мест в структуре заболеваний во всем мире. Несмотря на успехи в изучении механизмов канцерогенеза и усилия по разработке методов ранней диагностики и лечения, онкопатологии остаются одними из важнейших проблем современной медицины. Разработка новейших технологий лечения требует предварительных тщательных экспериментальных исследований, не-

заменимую роль в которых выполняют лабораторные животные. Поэтому создание адекватных моделей карцерогенеза на животных является актуальным.

Тот факт, что клетки приобретают генетические и эпигенетические нарушения, способствующие опухолевой прогрессии, является доказанным [1]. Известно, что изменение ряда факторов окружающей среды приводит к дестаби-

лизации генома и генетическая нестабильность может иметь разные проявления. С одной стороны – это запрограммированные перестройки генома. С другой стороны – это спонтанные, дестабилизирующие геном, перестройки, которые выявляются при онкогенезе и других патологических состояниях [2]. Например, при сравнении нормальных клеток и клеток спорадического рака прямой кишки показано, что последние содержат до 10 тысяч изменений на клетку, указывая на масштабность изменений генома онкоклетки и причастность механизмов дестабилизации генома [3].

Геномная нестабильность может быть разделена на хромосомную и микросателлитную нестабильность (МН), которая является следствием нарушения репарации ошибок спаривания азотистых оснований во время репликации, в результате которой в дочернюю цепь ДНК встраиваются некомплементарные нуклеотиды матричной цепи нуклеотиды. Микросателлиты особенно предрасположены к репликативному смещению ДНК, вызванному неправильным взаимодействием между комплементарными цепями [4]. Несмотря на тенденцию к ошибкам, имеющим место во всех делящихся клетках, микросателлиты остаются стабильными по длине благодаря эффективности репарации ДНК. При повреждении пострепликативной репарационной системы микросателлиты аккумулируют ошибки и становятся длинее или короче на один или несколько повторов. Появление таких изменений в индивидуальных ДНК определяется как МН, которая предполагает дефекты в клеточных системах, поддерживающих стабильность генетической информации. Эти генетические изменения экспериментально детектируются при анализе ПЦР-продуктов, полученных к изучаемым микросателлитам.

Геномная нестабильность, как реакция клеток на изменение микроокружения, может

Материалы и методы

Исследования проводили на препаратах ДНК из лейкоцитов периферической крови отдельных особей онкогенной популяции мышей сублинии ICR, а также линий BALB/c, C57BL/6 вивария Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Изменения в микросателлитном локусе детектировались посредством ПЦР. Забор периферической крови производили из хвостовой вены. Тотальную ДНК из лейкоцитов периферической крови отдельных мышей выделяли путем высаливания с 6М NaCl после инкубации с про-

быть выявлена на самых ранних стадиях карцерогенеза, еще до приобретения клетками онкогенного фенотипа [5]. Удобным и высокоинформативным генетическим инструментом в выявлении таких измененных участков ДНК является монолокусный анализ микросателлитов, в котором анализируются ядерные маркеры, которые наследуются кодоминантно: каждый из двух аллелей локуса может быть идентифицирован и проанализирован. Это означает, что для каждого генного локуса возможно определить, является ли данная особь гетерозиготой или гомозиготой, в чем и заключается неоспоримое преимущество этих маркеров над RAPD, IS-PCR, AFLP и ISSRPCR. В монолокусном анализе праймеры подбираются на участки, фланкирующие микросателлит, следовательно, амплифицируется и анализируется сам микросателлит. Длина микросателлитов варьирует в популяции, но наследуется как стабильная аллель.

В число самых частых нарушений в эпителиальных опухолях входят как гомозиготные, так и гетерозиготные делеции, для обнаружения которых используют монолокусный анализ микросателлитов. На протяжении многих лет в ряде наших исследований использовались мыши сублинии ICR, склонные к злокачественным новообразованиям, в основном, аденокарциномам. Исходя из предположения о том, что МН может быть рассмотрена как полезный маркер генетической изменчивости, выявляющий дестабилизацию генома в заданных локусах, целью настоящего исследования было изучение МН в высокополиморфном микросателлите, включающем тандемные повторы из двух тетра-нуклеотидных единиц, TGGA и GGCA, локализованных на 3' конце второго интрона гена *Eb*, экспрессирующего антигены второго класса H2 локуса генома мыши (главный комплекс гистосовместимости) при длительных экспериментах в онкогенной популяции.

назой в течение ночи. Выявление полиморфизма микросателлита в локусе гена *Eb* проводили с использованием праймеров f(5'-CGACTGTAGAACCTTAGCCTG-3') и r(5'TGGAGCTGTCCTCCTTGAG-3') [6].

Реакционная смесь для ПЦР содержала 10x буфер, 1,8 мМ хлорид магния, 0,20мМ нуклеотидтрифосфаты, 0,25мкМ праймеры и Taq-полимеразу «Fermentas» (Литва). Реакцию проводили по следующей программе: денатурация при 95°C – 30с, отжиг при 60°C – 30с и элонгация при 72°C – 30с. Продукты ПЦР разделяли в

10% ПААГ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом освещении с использованием бромистого этидия. Потеря гетерозиготности (аллельная делеция) регистрировалась как полное или частичное (не менее 50%) отсутствие одного из аллелей в треке, соответствующем ДНК из лейкоцитов периферической крови особей из онкогенной популяции, по сравнению с треком ДНК, где сохраняются оба аллеля. Мик-

Результаты и обсуждение

На протяжении нескольких лет в ряде наших исследований, требующих генетической стандартности, обеспечивающих воспроизводимость результатов, нами использовались половозрелые мыши (2-2,5 мес.) сублинии ICR, которая является потомством аутбредной популяции, полученной в Институте онкологических исследований (США), и поддерживающейся путем скрещивания между sibсами. Эта линия выведена для изучения механизмов развития злокачественных новообразований. Особи поддержи-

росателлитная нестабильность определялась как смещение в электрофоретической подвижности одного или нескольких аллелей. В случае гомозиготных аллелей выявляется лишь одна полоса, соответствующая двум аллелям одного размера. Такие пробы признаются неинформативными, поскольку делецию одного из аллелей обнаружить невозможно.

ваемой популяции характеризуются высокой частотой обнаружения спонтанных новообразований, достигающей почти 80 % от эффективного числа животных в возрасте старше 1 года. У животных по результатам гистологического анализа диагностируются, в основном, аденокарциномы. У значительной части животных возникают множественные опухоли (рак молочной железы, новообразования лимфоидной системы), которые располагаются на разных частях тела (рис. 1 а, б).

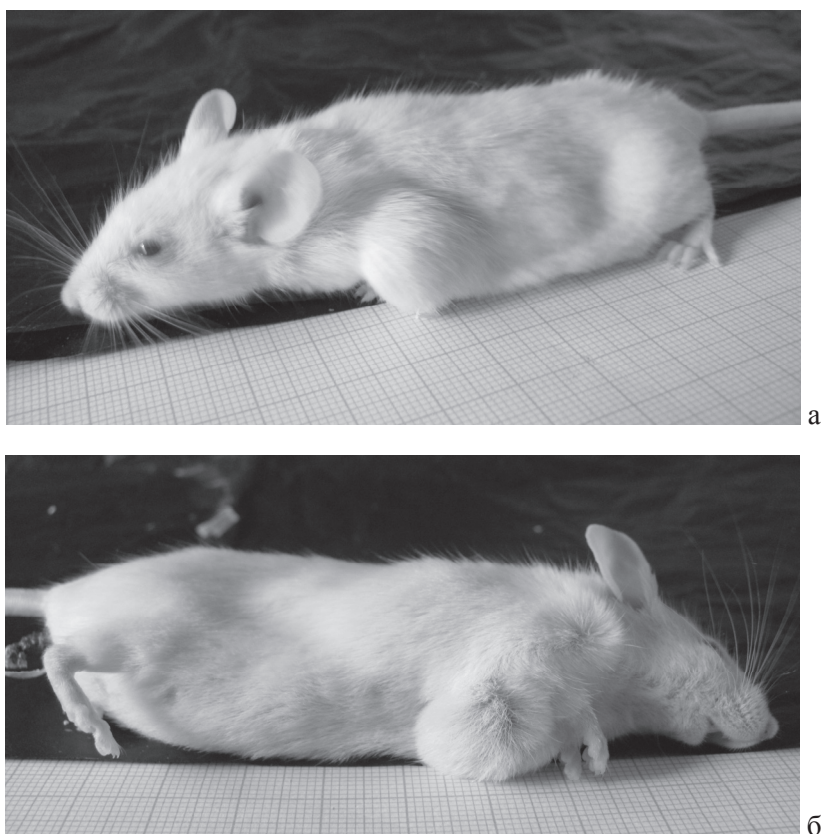


Рис. 1. Самки высокораковой сублинии ICR с опухолями

В литературе описана цитогенетическая нестабильность в клетках костного мозга животных сублинии ICR, которая проявлялась еще до реализации неопластических потенциалов (анеуплоидия, хромосомные aberrации). Отмечено

также увеличение пролиферативной активности клеток костного мозга при опухоленосительстве [7]. Нами также наблюдалось двукратное увеличение лейкоцитов периферической крови у животных онкогенной популяции, что могло

свидетельствовать об изменениях в иммунной системе. По литературным данным известна высокая стабильность аллелей микросателлита гена *Eb* у ряда линий. Тем не менее, индивидуальный анализ животных ICR показал генетические изменения в локусе. Микросателлитный локус был протестирован на 50-60 особях популяции. В качестве контроля в анализ были включены мыши лабораторных линий C57BL/6 и BALB/c, у которых на протяжении всего исследования изменения в микросателлите не обнаруживались. Стабильность микросателлита второго интрона гена *Eb* в контрольных линиях указывала

также на отсутствие артефактов при проведении ПЦР за счет эффекта "проскальзывания" в процессе амплификации. Также не было выявлено присутствия неамплифицирующихся «нулевых» аллелей, появляющихся при мутациях в участках, фланкирующих микросателлит.

Типичные варианты генетического изменения микросателлита представлены на электрофореграммах продуктов амплификации ДНК отдельных особей сублинии ICR, полученных с помощью праймеров к вариабельным последовательностям микросателлита гена *Eb* (рис. 2 а, б, в, г).

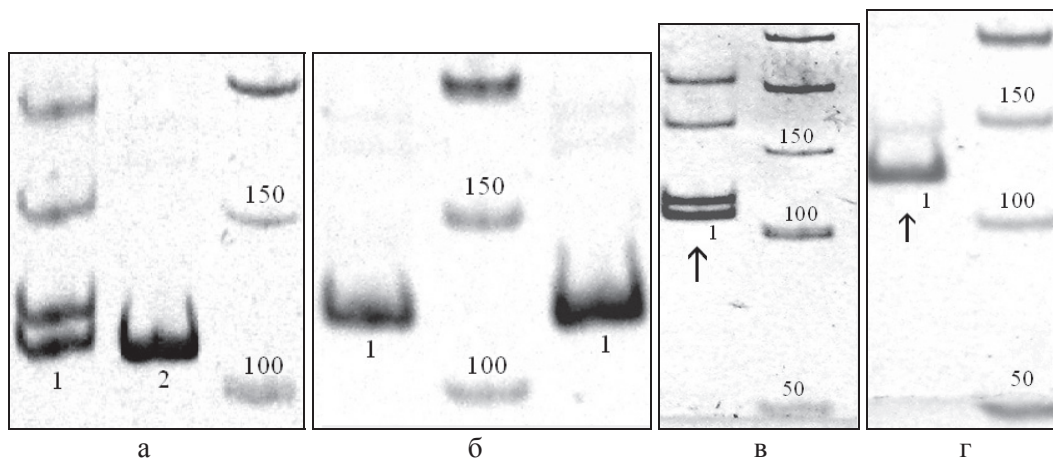


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК отдельных особей сублинии ICR, полученных с помощью праймеров к вариабельным последовательностям микросателлита гена *Eb* : 1 – линия ICR; 2 – линия C57BL/6; 3 – маркер 50 bp DNA Lаber (Fermentas). Стрелками обозначены случаи микросателлитных изменений

Выводы

Выявленные изменения длины микросателлита, а также делеция аллеля у мышей ICR при разделении продуктов ПЦР в 10% ПААГ могут свидетельствовать как о ранних изменениях в геноме, предшествующих развитию кар-

церогенеза, так и об генетических изменениях в популяции, предрасположенной к канцерогенезу и поддерживаемой путем скрещивания между сибсами.

Литература

1. Shah S.N., Hile S.E., Eckert K.A. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 431-435.
2. Charames G.S., Bapat B. Genomic instability and cancer // *Curr. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 3. – P. – 589-596.
3. Stoler D., Chen N., Basik M., Kahlenberg M., Rodriguez-Bigas M., Petrelli N., Anderson G. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 15121 – 15126.
4. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference // *Trends. Genet.* – 2000. – Vol. 16. – P. 551-558.
5. Gorgoulis V.G., Vassiliou L.V.F., Karakaidos P. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – P. 907-913.
6. Saha B.K., Shields J.J., Miller R.D., Hansen T.H., Shreffler D.C. A highly polymorphic microsatellite in the class II *Eb* gene allows tracing of major histocompatibility complex evolution in mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1993. – Vol. 90. – P. 312-316.
7. Ковалева О.А., Вагина И.Н., Морозова Л.М., Глазко Т.Т., Глазко В.И. Генетическая нестабильность и предрасположенность к развитию опухолей у лабораторных линий мышей // *Доп. Нац. акад. наук України.* – 2007. – №2. – С. 158 – 162.

KOVALCHUK M.V.¹, GYLKO T.P.^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² State Institute "Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine"
Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska, 67

MICROSATELLITE INSTABILITY IN ICR MOUSE STRAIN, PREDISPOSED MALIGNANT SWELLINGS

Aims. Microsatellite instability (MSI) is a form of genomic instability frequently detected in many types of tumors. However, the involvement of MSI in cancer development in the population ICR mouse strain has not been investigated. The aim of this work was to determine the reveal of loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) and to evaluate the possibility of using LOH and MSI as molecular markers for the detection of genomic alterations. **Methods.** Genomic DNA obtained from peripheral blood lymphocytes from each animals was subjected to PCR using specific primers. The PCR products were separated by 10% non-denaturing PAGE and analyzed for the presence of LOH and MSI. **Results.** The presence of these microsatellite alterations was related both to the carcercous phenotype and to the mouse strain. **Conclusion.** This study has demonstrated that microsatellite alterations occur in a part of ICR population but our data need further validation with a larger number of microsatellite loci and enhanced method for MSI identification.

Key words: microsatellite instability, loss of heterozygosity, tumorigenesis.

КОЗЕРЕЦЬКА Д.І., СЕРГА С.В., ДЕМИДОВА А.С., ШКЛЯР С.Є., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна,
01601, м. Київ, вул. Володимирська 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

НОВО ТРАНСПОЗОН В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) є поширеними в природних популяціях *Drosophila melanogaster* [1]. Сьогодні існує думка, що автономні генетичні елементи слід вважати драйверами еволюції геномів [2]. Виходячи з цього вкрай важливим є дослідження динаміки поширення МГЕ в природних популяціях плодових мух як у просторі, так і у часі. Відомо, що частина МГЕ, такі як *P* та *hobo* транспозони, є активними в даний період дослідження в природних популяціях дрозофіл [3, 4], тому вони становлять особливий інтерес, як МГЕ, які почали інвазію геномів представників природних популяцій [5, 6] в період початку дослідження популяційних процесів в природних популяціях *D. melanogaster* [7] і, таким чином, можуть обумовлювати, частково, чи повністю, процеси, які в них спостерігаються.

hobo транспозон був вперше клонований та охарактеризований McGinnis et al. [8]. Подальший аналіз даного елемента виявив варіанти у послідовностях нуклеотидів кодуючої частини гена транспозази, що веде до варіантів у білковій послідовності [9]. Аналіз даного елемента на геномному рівні у *D. melanogaster* показав, що

hobo елемент може зустрічатися у трьох формах: повнорозмірні автономні елементи (відповідають канонічному HFL1), делетовані (дефектні) копії та залишки реліктових *hobo* елементів (так звані *hobo*-related sequences), інвазія яких відбулася раніше [10]. Всі вказані форми відрізняються довжиною та нуклеотидною послідовністю – дефектні копії мають менші розміри за рахунок делецій у кодуючій частині, а залишки реліктових *hobo* демонструють наявність численних делецій та низького рівня ідентичності послідовності нуклеотидів до канонічного елемента. Наявність трьох форм елемента свідчить про декілька хвиль інвазії транспозону у геноми *D. melanogaster*, одна з яких відбулася нещодавно та можливо продовжується у даний час [10]. Проте особливості та напрям цього процесу у природі залишаються дослідженими недостатньо.

Для двох природних популяцій дрозофіл України (Gurzuf, 1961; Uman, 1970; Uman, 1983) було продемонстровано наявність *hobo* елемента [5]. Більш пізні дані щодо поширення та активності даного мобільного елемента на території України відсутні, що не дозволяє зробити ви-