

9-ти осіб з контрольної групи. Виявлено трьох індивідів, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора, що що можна вважати генетично детермінованою прихованою хромосомною нестабільністю.

Ключові слова: хромосомна нестабільність, блеомицин, лімфоцити людини.

Резюме

Дыбский С.С. *Использование дополнительной мутагенной нагрузки блеомицином in vitro для определения скрытой хромосомной нестабильности в лимфоцитах периферической крови человека.*

Разработана модельная система для исследования скрытой хромосомной нестабильности в соматических клетках человека с помощью дополнительной тестирующей мутагенной нагрузки блеомицином in vitro. Определены оптимальные сроки обработки культуры лимфоцитов блеомицином (поздняя постсинтетична G2 стадия митотичного цикла) и оптимальные концентрации препарата (0,05 и 5,00 мкг/мл), пригодные для оценки чувствительности хромосом соматических клеток человека in vitro к мутагенной нагрузке. Установлено, что основным критерием чувствительности хромосом к тестирующему мутагенному действию блеомицина целесообразно считать общую частоту аберраций хромосом, а не aberrant metaphases. На отработанной модели проведены исследования скрытой хромосомной нестабильности у 9-ти лиц из контрольной группы. Выявлено трех индивидов, гиперчувствительных к действию мутагена-провокатора, что можно считать генетически детерминированной скрытой хромосомной нестабильностью.

Ключевые слова: хромосомная нестабильность, блеомицин, лимфоциты человека.

Summary

Dibsky S.S. *Use of bleomycin testing mutagenic exposure in vitro for determination of hidden chromosome instability in human lymphocytes of blood.*

The model system for the investigation of hidden chromosome instability in somatic human cells by means of bleomycin testing mutagenic exposure in vitro had been elaborated. The optimal terms of treatment by bleomycin of human peripheral blood lymphocytes culture (late post-synthetic G2 phase of mitotic cycle) as well as optimal concentrations of bleomycin (0,05 and 5,00 mcg/ml) for the evaluation of human chromosomes sensitivity to mutagenic exposure in vitro had been suggested. It had been showed that the main criterion of chromosomes sensitivity to bleomycin exposure must be total frequency of chromosome aberrations (but not aberrant metaphases). With the help of modifying "G2-bleomycin sensitivity assay" the investigation of hidden chromosomes instability in 9 healthy donors had been fulfilled. Three hypersensitive persons had been identified that can be considered as genetically caused phenomenon.

Key words: chromosomes instability, bleomycin, human, lymphocytes.

Рецензент: д.біол.н., проф. О.М.Дуган

УДК 575.162: 575.113.2: 577.215.3

ПОШУК АЛЕЛЬНИХ ФОРМ ГЕНА SWS DROSOPHILA MELANOGASTER

Н.П.Матійців, Д.В.Максимів

Львівський національний університет імені Івана Франка

Вступ

Важливим є дослідження процесів нейродегенерації, їх молекулярної та генетичної природи. Зниження надійності механізмів регуляції і адаптивних можливостей організму під час старіння створюють умови для розвитку вікових патологій, таких як хвороба Альцгеймера, Паркінсона, Гентінгтона, аміотрофічний боковий склероз, атаксійні синдроми, пріонові захворювання та інші, які призводять до фізичних, розумових розладів та смерті [5]. Враховуючи значний рівень консервативності генетичних, молекулярних та клітинних процесів у дрозофіли та ссавців, що було встановлено протягом останнього десятиліття, *D. melanogaster* залишається надійною модельною системою, до якої можна skierувати новітні біологічні проблеми, в тому числі, пов'язані із захворюваннями людини. Роботи з використанням дрозофіли, спрямовані на виявлення генів залучених у формуванні спадкових форм нейродегенеративних захворювань, зробили значний внесок у їх розуміння [8; 9]. Більше того, ці дослідження дали початок пізнанню молекулярних складових, які задіяні у патогенезі, а отже, можуть створити основу нових стратегій лікування. Описано близько двадцяти мутантів дрозофіли з нейродегенеративним фенотипом [7]. Одною з найперших і найкраще вивченою є мутація в гені *swiss cheese (sws)*. Мозок мутантів *sws* характеризується гіперзакручуванням глії навколо нейронів і подальшою вакуолізацією та відмиранням нейронів шляхом апоптозу [6]. Однак до цього часу молекулярно-генетичний механізм розвитку нейродегенерації, спричиненої мутацією у цьому гені, залишається не цілком зрозумілим. Виявлення та вив-

чення нових алельних форм гена допоможе пролити світло на проблемні питання розвитку нейродегенерації.

Метою роботи був пошук алельних форм гена *sws* *Drosophila melanogaster*.

Матеріали і методи дослідження

У дослідженнях нами використано 6 ліній нейродегенеративних мутантів за X хромосою, 4 з яких отримані нами шляхом індукованого етилметансульфонатом мутагенезу [2] та лінія *sws*^{oIE} [6], одержана з Bloomington *Drosophila* Stock Center (університет штату Індіана, США). Як контроль використана лінія дикого типу Oregon. Дрозофіл утримували при температурі 25°C у цукрових стаканчиках на стандартному поживному середовищі [3].

Виділення сумарної РНК з тканини голів 23 денних особин *D. melanogaster* проводили за методом [4] з використанням реактиву TRIZOL LS ("Life Technologie", Швейцарія). Синтез першої комплементарної нитки ДНК (кДНК) проводили за стандартною методикою [4]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) вели з використанням ПЛР-робота Bio-Rad. Матрицею для ПЛР служила кДНК, реакція відбувалась за участю термостабільної полімерази Expand High Fidelity PCR System ("Roche Diagnostics", Німеччина). Щоб забезпечити можливість подальшого клонування одержаних ПЛР - продуктів у вектор pGEM-T-easy методом Т/А клонування, проводили їх інкубацію з Taq-полімеразою [10]. Електрофоретичний аналіз ДНК вели в горизонтальному 0,7-1,0% агарозному гелі в трис-ацетатному буфері (TAE). Фрагменти ДНК елюювали з гелю, використовуючи GFP PCR DNA and Gel Band Purification Kit ("Amersham biosciences", Великобританія).

Отримані результати та їх обговорення

Нами отримано колекцію X-зчеплених нейродегенеративних мутацій *D. melanogaster*, чотири з яких (2-14, 61-7, 72-7, 76-15) було картовано в 7D1 районі, в якому міститься ген *sws*. На підставі комплементарного аналізу з використанням мутанта *sws*^{oIE} нами було отримано позитивний тест на алелізм всіх вищезазначених мутацій [1]. Для підтвердження алелістності мутацій ми здійснили клонування великого транскрипта

гена *sws* (*SWS-A*) всіх досліджуваних ліній з використанням зворотної транскриптази (RT-PCR) та його наступне секвенування.

Великий транскрипт гена має розмір 5,4 т.п.н., відкрита рамка зчитування (ВРЗ) якого складає 4274 п.н. Використовуючи комп'ютерну програму Primer Select, було створено 8 пар праймерів до послідовності відкритої рамки зчитування таким чином, щоб закінчення попереднього та початок наступного фрагменту частково перекривались (рис. 1.).



Рис. 1. Схема транскрипту гена *sws* з зазначеними координатами праймерів та зображенням очікуваних ампліфікованих фрагментів *sws1-sws8*.

Матеріалом для виділення тотальної РНК служили голови 23-ти денних особин ліній *sws*^{oIE}, 2-14, 61-7, 72-7, 76-15 та лінії дикого типу OregonR. Першу нитку кДНК, синтезовану на основі сумарної РНК, використовували як матрицю для ПЛР. Було ампліфіковано по 8 фрагментів гена *sws* кожної з досліджуваних нейродегенеративних ліній та лінії дикого типу. Це дозволяло стверджувати, що жодна з мутацій не зумовлена делецією в гені *sws*. Всі одержані фрагменти було клоновано, секвеновано та одержано нуклеотидну послідовність високої точності. Секвенування зразків виконувалось фірмою Macrogen Inc (Корея).

Було здійснено порівняльний аналіз нуклеотидної послідовності кДНК гена *sws* дикого типу, що є в базі даних Gene Bank (національний центр біотехнологічної інформації, США), лінії дикого типу Oregon та мутантних ліній з допомогою комп'ютерної програми DNA Star. Аналіз показав значний поліморфізм у послідовності нуклеотидів. Як видно з таблиці 1,

найвищий ступінь поліморфізму виявлено у лінії 2-14, послідовність кДНК якої відрізняється нуклеотидами у десяти положеннях, як від послідовності дикого типу, так і від послідовностей мутантних ліній.

Таблиця 1
Поліморфізм нуклеотидної послідовності кДНК гена sws дикого типу та мутантних ліній

Нуклеотид	sws (GENE BANK)	Oregon	76-15	sws ^{offE}	2-14	61-7	72-7
945	T	T	T	T	C	T	T
1257	T	T	T	T	C	T	C
1413	G	C	G	G	C	G	G
1476	C	T	C	C	T	C	C
1495	T	C	T	T	C	T	T
1566	G	G	G	G	A	G	G
1572	G	A	G	G	G	G	G
3390	G	G	G	G	G	G	A
3501	G	G	A	A	A	A	G
3642	A	A	C	C	T	C	A
4130	C	C	A	A	A	A	C
4182	A	A	G	G	G	G	A

Інші досліджувані лінії також мають індивідуальні відмінності у нуклеотидній послідовності. Крім того, виявлено певний поліморфізм у нуклеотидному складі послідовностей дикого типу лінії Oregon, використаної нами у дослідженнях, та послідовності з бази даних Gene Bank. Однак, всі представлені варіанти нуклеотидного складу є синонімічними замінами та відповідають послідовності амінокислот, що характерна для білка SWS дикого типу (рис. 2). Виняток складає лише лінія 76-15, у якої було виявлено значущу заміну нуклеотиду, а саме, у положенні 4233 відкритої рамки зчитування гуанін, який присутній у послідовності дикого типу та послідовностях всіх інших досліджуваних ліній, замінений на цитозин. Ця заміна спричиняє заміну глутамінової кислоти на аспарагінову в положенні 1411 послідовності білка (рис. 2).

1	MDVLEMLRASASG SYNTIFSDAWCQYVSKQTATVYMYFALVMMSLIFLAWFLYFKRMAE	60
61	LRLRDEIARISITVINSNGDMRGLRFRKRDKMFCYRRMLRKMKNVSGQMYSSGKG YKRR	120
121	AVMRFARRILQLRRDNMPLEMRIVPEPAEYLEEETEGSDRVPDPALYMLQSRIFCFHEK	180
181	PVFLRLCKHTQLLELMACDYLFKIDPDDSVYIVQSGMINVYISNADGSLSLKTVRKCE	240
241	SVTSLLSPIDVLSGNFSYKTVTAKAEKSVVRLPMQAFEEVFDQNPVYMIWVIM	300
301	RLQRVLEFALRNYLGLNAELVQNHMRYSVSTMSGPINSQTSQSSRQAPNGPPMVISQMN	360
361	LMQSAVSGTGSSGVSVTVTRPPSSPSRHSREHHTLSDPNPNDG SFHG ITNL FTEVHGDA	420
421	PNADLFHQQQQHSVGNLSTRSSITLMAPDGS HSC LQTPGVITTSIDMRLVQSSAVDSL R	480
481	KELGLSEEDSHIEPFVLELEPNVITLITEGNADDVCVWFVMTGLAVYQSNQDTRAK	540
541	QDKSDMLHFVHPGEIVGGLAML TGEASAYTIRSRITRIAFIRRAIYQIMRQRPRIVL	600
601	DLGNGVVRRLSPLVRQCDYALDWIFLES GRAYRQDE3SDETYIVLSGRMRSVITHPGGK	660
661	KEIVGEYGGKDLVGIVEMITESTRITTVMAVPRDSELAKLPEGLFNAIKLRYPIVVKLIS	720
721	FLSHRFLGSMQIRSGSGAPGAPVEANPVITHKYSTVALVPHDEVPMTPFTYELYHSLCAI	780
781	GPVLRLLTSDVVRKQLGNSIFEAAENEYRLTSLWAQQEDENIILYQCDSSLSAWTQRCMRQ	840
841	ADVILIVGLGDRSHLVGKFEREIDRLAMRTQKELVLLYPEASNAPANTLSWLNARPVVT	900
901	KHHVLCVKRIFTRKSQYRINDLYSRVLLSEPNMHSDFSRLEARWITGNSIGLVGGGAR	960
961	GAALIEGMLKAIQEAGIPVDMVGGVSGALMGALWCSERNITTVTKAREWSKKMTKWTLQ	1020
1021	LDLTVPTSMFSGREFNKTHHDTFGDVSIEDLWIPYFTITDITASCHRHTNGSIWRVY	1080
1081	VRSSMSLSGYMPPLCDPKDGHLLLDGGYVNNLPADVMEHLGAHHLAIDVGSQDDTDLTN	1140
1141	YGDLSGWWLLYKKNWPFVSPVVPDLPDQSRLAYVSCVRQLEEVKNSDYCEYIRFPID	1200
1201	KYKILAFGSFDEIRDVGYVFGKNYFESMAKAGRLGRFNQWFNKEPKRVNHASLNEYTFI	1260
1261	DLAQVCELPEYAVNTAELEFSEDEDCDGYISEPTILNIDRRKIQVSRAGNSLSESETEM	1320
1321	DSVVELDKLERKTDKSTQSSPPNSRSDMRGKEELARHMSNWHVGVKHKDETGSGANEAT	1380
1381	KTOTGQEQLQEQEQDCGATAEQLVDEKKEIKENKRSFPNTEKN	1425

D76-15

Рис. 2. Імовірна амінокислотна послідовність білка SWS дикого типу та досліджуваних ліній Oregon, sws^{offE}, 2-14, 61-7, 72-7. Стрілкою відзначено глутамінову кислоту (E) у положенні 1411, яка у лінії 76-15 замінена на аспарагінову кислоту (D).

Відомо [11], що природні популяції більшості видів еукаріот, зокрема *D. melanogaster*, характеризуються значними відмінностями у нуклеотидній послідовності генів, які є поліморфними варіантами норми. Часто такий поліморфізм одного або декількох нуклеотидів не має прояву на рівні білкового продукту гена, однак може служити цінним матеріалом для вивчення генетичних закономірностей розвитку окремої популяції та еволюційних процесів даного виду в цілому. Так, при дослідженні поліморфізму, властивому деяким локусам, продукти яких задіяні у функціонуванні нервової системи дрозоф-

ли, дійшли висновку, що такий високий рівень поліморфності зумовлений значною функціональною важливістю генів [12]. Однак, заміна навіть однієї амінокислоти може стати причиною зміни активності білка та зумовити функціональні порушення на організменному рівні.

Співставляючи аналіз нуклеотидних послідовностей гена *sws* досліджуваних ліній та результати картування і комплементарного аналізу, можна припустити, що особини ліній *sws^{offE}*, 72-7 та 2-14 несуть мутацію, яка зумовлює дисфункцію лише малого транскрипту гена *sws* SWS-B. Подібне припущення щодо *sws^{offE}* було висловлене дослідниками раніше [6]. Таким чином, дані секвенування можуть служити непрямим доказом припущення висловленого нами за результатами комплементарного аналізу, а саме, одержана нами лінія 72-7 та лінія *sws^{offE}* несуть одну й ту ж саму мутацію, а лінія 2-14 представлена альтернативною мутацією, що ушкоджує транскрипт SWS-B гена *sws*. Мутант 61-7, для якого виявлені неоднозначні показники генетичного аналізу [1], швидше за все, не несе мутацію в гені *sws*. Мутація 61-7 або міститься у районі X-хромосоми близькому до 07D01, або в гені, якому властива певна взаємодія із геном *sws*. У той же час, нами одержано нову алельну форму гена *sws*, 76-15, яка представлена точковою мутацією, що спричиняє амінокислотну заміну у великому транскрипті гена SWS-A.

Висновки

1. Одержана лінія 72-7 та лінія *sws^{offE}* несуть одну й ту ж саму мутацію, а лінія 2-14 представлена альтернативною мутацією, що ушкоджує транскрипт SWS-B гена *sws*.
2. Мутант 61-7, для якого виявлені неоднозначні показники генетичного аналізу не несе мутацію в гені *sws*.
3. Мутація 61-7 або міститься у районі X-хромосоми *D.melanogaster* близькому до 07D01, або в гені, якому властива певна взаємодія із геном *sws*.
4. Отже, нами одержано нову алельну форму гена *sws*, 76-15, яка представлена точковою мутацією, що спричиняє амінокислотну заміну у великому транскрипті гена SWS-A.

Література

1. Матійців Н. Генетичний аналіз нейродегенеративних X-зчеплених мутантів *Drosophila melanogaster* групи *sws* / Н.Матійців, Д. Максимів // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. праць. - Київ: Логос, 2007. - Т.1. - С. 276 - 280.
2. Химически индуцированный мутагенез у *Drosophila melanogaster* с целью получения мутантов с изменениями в структуре мозга / Г.Р.Щербата, Н.П.Матийцев, Я.И.Черник, Д.В.Максимив // Генетика. - 2004. - Т. 40, № 9. - С. 1280-1285.
3. Ashburner M. *Drosophila : a laboratory manual* / M.Ashburner. - New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. - P.179-189.
4. Ausubel F.M. *Current Protocols in Molecular Biology* / F.M.Ausubel. - New York: Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, 1990. - Vol. 2. - 534 p.
5. Kanazawa I. How do neurons die in neurodegenerative disease? / I.Kanazawa // Trends in Molecular Medicine. - 2001. - Vol. 7, № 8. - P.339-344.
6. The swiss cheese mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* / D.Kretzschmar, G.Hasan, S.Sharma, M.Heisenberg [e.a.] // J. Neurosci. - 1997. - Vol.17, № 19. - P.7425-7432.
7. Kretzschmar D. Neurodegenerative mutants in *Drosophila* : a means to identify genes and mechanisms involved in human disease? / D.Kretzschmar // Invert.Neurosci. - 2005. - Vol.3. - P.97-109.
8. Loss of Swiss cheese / neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila* / M.Muhlig-Versen, A.B.da Cruz, J. Tschape [a. a.] // J. Neurosci. - 2005. - Vol. 25. - P. 2865 - 2873.
9. Mutsuddi M. Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause / M.Mutsuddi, J.Nambu // Curr. Biol. - 1998. - Vol. 8. - P. 809 - 811.
10. Sambrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual* /

J.Sambrook, D.Russell. - New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. - 450 p.

11. Singh N. Levels of X-linked and Autosomal Nucleotide Variation African and non-African populations of *Drosophila melanogaster* / N.Singh, J.M.Macpherson, D. Petrov // BMC Evolutionary Biology. - 2007. - Vol. 7. - P. 202 - 210.

12. Tatarenkov A.J. Nucleotide variation at the dopa decarboxylase (*Ddc*) gene in natural populations of *Drosophila melanogaster* / A.Tatarenkov, F.J.Ayala // J. Genet. - 2007. - Vol. 86. - P. 125 - 137.

Резюме

Матійців Н.П., Максимів Д.В. Пошук алельних форм гена *sws* *drosophila melanogaster*.

Мутанти *D.melanogaster* за геном *sws* характеризуються прогресуючою нейродегенерацією тканини мозку, гіперзакручуванням глії та вкороченою тривалістю життя. У роботі описано пошук алельних форм гена *sws* серед групи індукованих мутантів шляхом клонування та секвенування послідовності кДНК великого транс крипту. Нами виявлено нову точкову мутацію у гені, яка зумовлює амінокислотну заміну у продукті SWS-A.

Ключові слова: нейродегенерація, *D. melanogaster*, swiss cheese, алелізм.

Резюме

Матийцив Н.П., Максимив Д.В. Поиск алельных форм гена *sws* *drosophila melanogaster*.

Мутантам *D. melanogaster* по гену *sws* характерна прогрессирующая нейродегенерация ткани мозга, гиперзакручивание глии и меньшая продолжительность жизни. В работе описано поиск алельных форм гена *sws* среди группы индуцированных мутантов путем клонирования и секвенирования кДНК большого транскрипта гена. Нами выявлено новую точечную мутацию в гене, которая обуславливает замену аминокислоты в продукте SWS-A.

Ключевые слова: нейродегенерация, *D. melanogaster*, swiss cheese, аллелизм.

Summary

Matiytsiv N.P., Maksimiv D.V. Search of allelic form of *drosophila melanogaster sws* gene.

The *D. melanogaster sws* mutants is characterized by progressive neurodegeneration of brain tissue, glial hyperwrapping and short life span. In work we described searching of allelic form of *sws* gene among induced mutants group by cloning and sequencing of big transcript cDNA. We discovered new point mutation in the gene, which cause amino acid substitute in SWS-A product.

Key words: neurodegeneration, *D. melanogaster*, swiss cheese, allelic forms.

Рецензент: д.біол.н., проф. Б.П.Романюк

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

УДК576.312.32/38;612.014.482

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ДІТЕЙ, ЯКІ ПРОЖИВАЮТЬ В РІЗНИХ РЕГІОНАХ УКРАЇНИ

О.О. Талан

Науковий центр радіаційної медицини АМН України (Київ)

Вступ

Значна кількість населення нашої держави проживає в умовах збільшеного антропогенного навантаження на довкілля, зокрема, на територіях з підвищеними рівнями забруднення радіонуклідами. В зв'язку з цим невпинно зростає кількість досліджень, направлених на вивчення впливу факторів зовнішнього середовища на організм людини. Одним з таких напрямлень є дослідження спонтанного та радіаційно індукованого соматичного хромосомного мутагенезу у людей. Дані щодо рівня хромосомних аберацій в неекспонованих групах людей вважаються вихідними (базовими) під час оцінки цитогенетичного ефекту, індукованого екологічними мутагенами [1-4].

Протягом останніх 20-ти років спостерігається зростання популяційних частот спонтанних аберацій хромосом. Це викликає небезпеку збільшення захворюваності на патологію з генетичною компонентою. В деяких дослідженнях показана кореляція між розвитком онкологічної патології та рівнем спонтанних аберацій хромосом в соматичних клітинах людини [5-7].

Більшість досліджень спонтанного та радіаційно індукованого хромосомного мутагенезу в соматичних клітинах людини отримані за допомогою аналізу рівномірно забарвлених хромосом (в останні роки - з використанням методу FISH) [2,3,6-9].

Значно менша кількість робіт виконана за допомогою аналізу диференційно G-забарвлених метафазних хромосом. Це обумовлено трудомісткістю методу, хоча саме він вважається "золотим стандартом" для встановлення рівнів всіх типів хромосомних аберацій [10].

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики