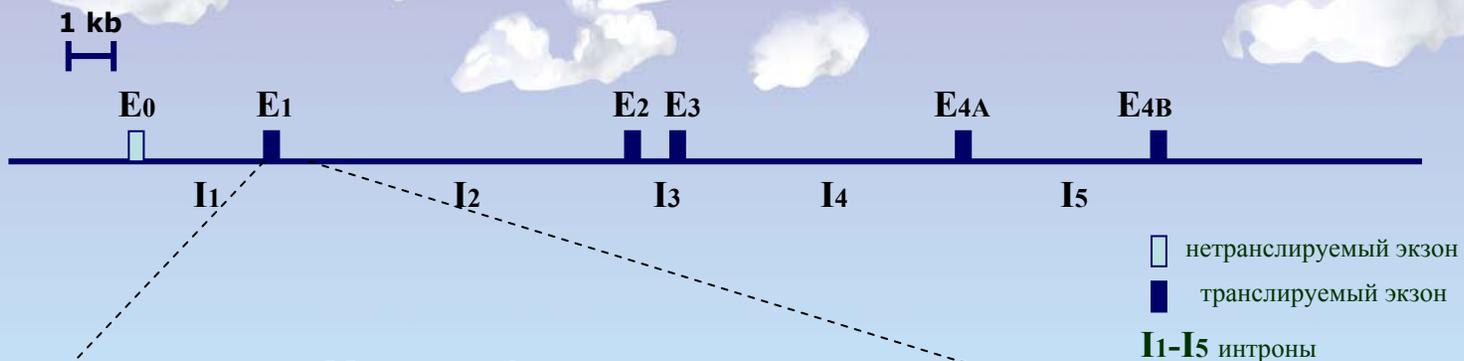


Функциональная интерпретация
единичных нуклеотидных замен в интроне
2 гена *K-Ras* мыши, связанных с
развитием рака легких

Горшкова Елена Вячеславовна

Схема гена K-Ras



Чувствительные линии *M.musculus*

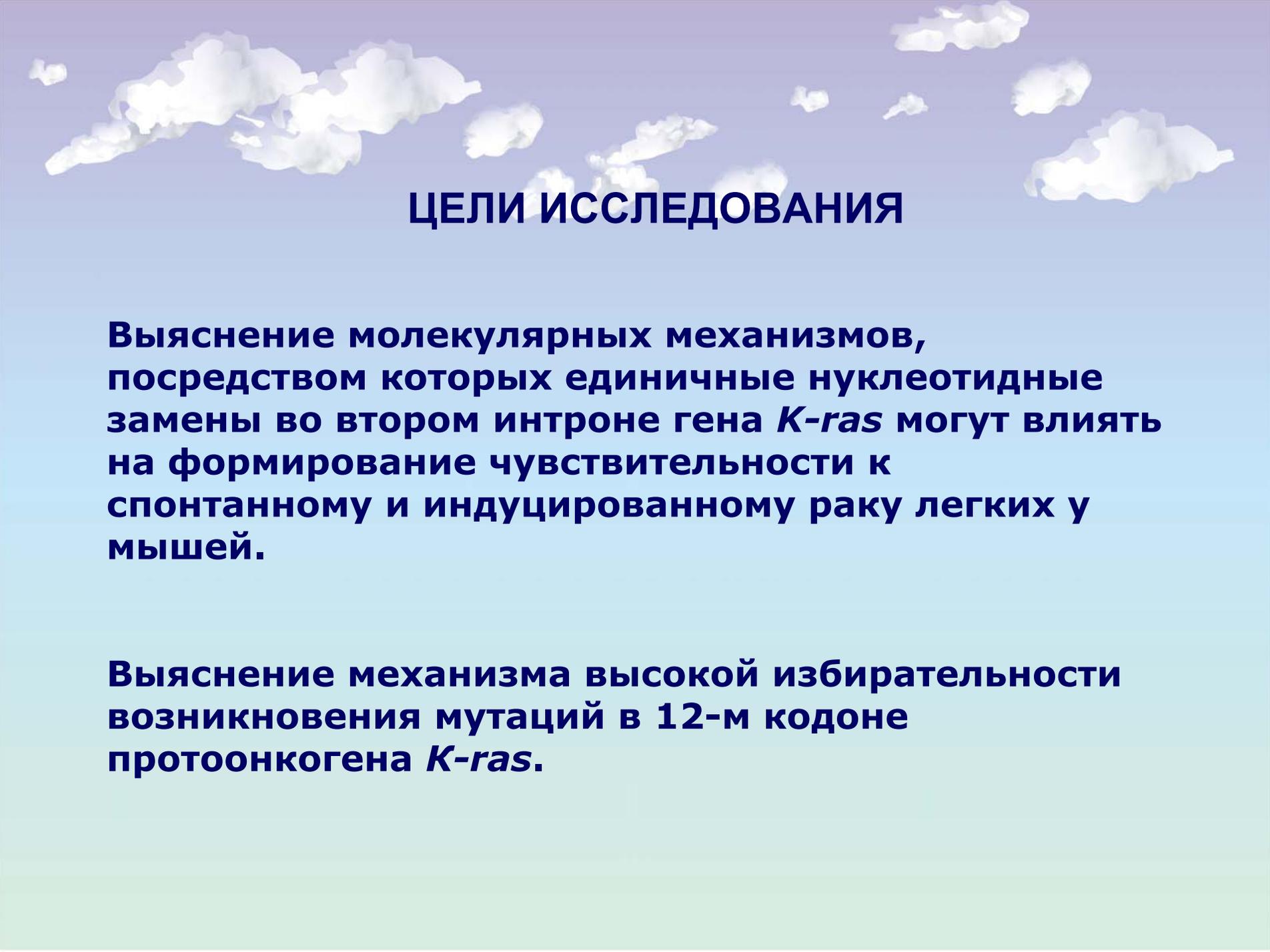


Устойчивые линии *M.musculus*



Промежуточные линии *M.musculus*





ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выяснение молекулярных механизмов, посредством которых единичные нуклеотидные замены во втором интроне гена *K-ras* могут влиять на формирование чувствительности к спонтанному и индуцированному раку легких у мышей.

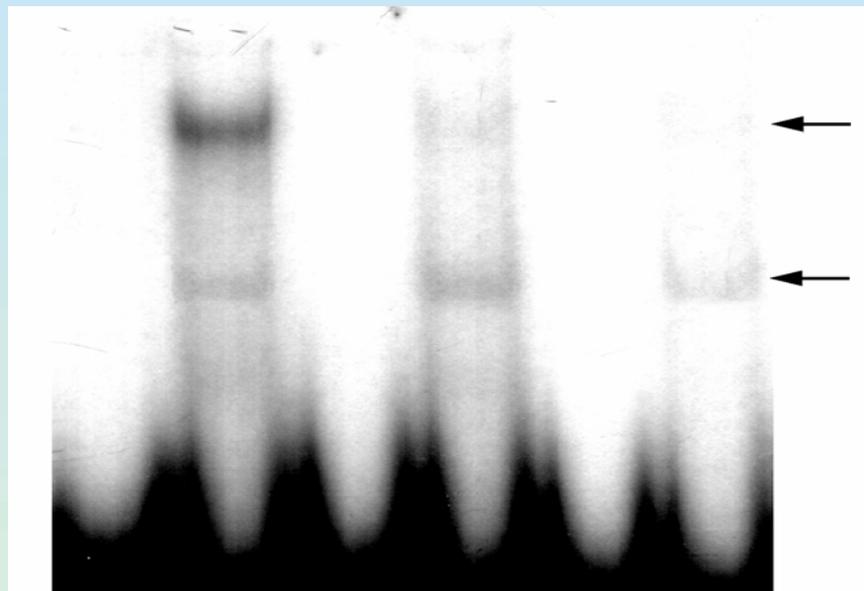
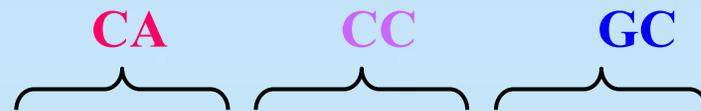
Выяснение механизма высокой избирательности возникновения мутаций в 12-м кодоне протоонкогена *K-ras*.

Связывание белков экстрактов ядер лёгких мышей с олигонуклеотидами, воспроизводящими "чувствительный", "промежуточный" и "устойчивый" варианты SNP

CA: 5'-cagtGTGCAAGAAACTCCACTTATCATGAGAGCT-3'

GC: 5'-cagtGTGCAAGAAAGTCCACTTCTCATGAGAGCT-3'

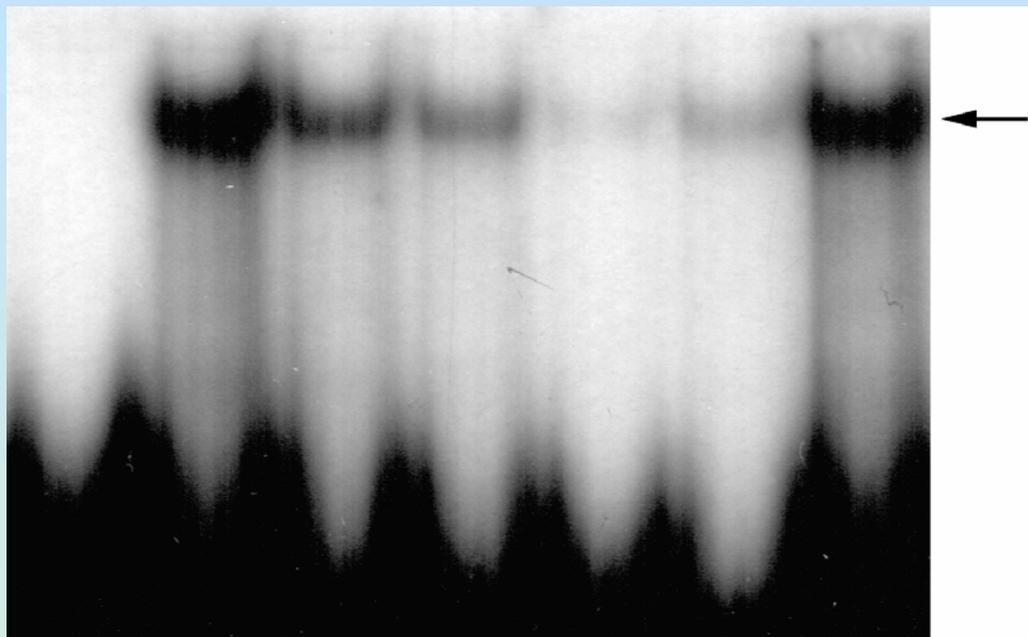
CC: 5'-cagtGTGCAAGAAACTCCACTTCTCATGAGAGCT-3'



Идентификация белка,
образующего основную полосу задержки

антитела к
GATA-6

конкуренты
GATA
NS



Чувствительные линии *M.musculus*



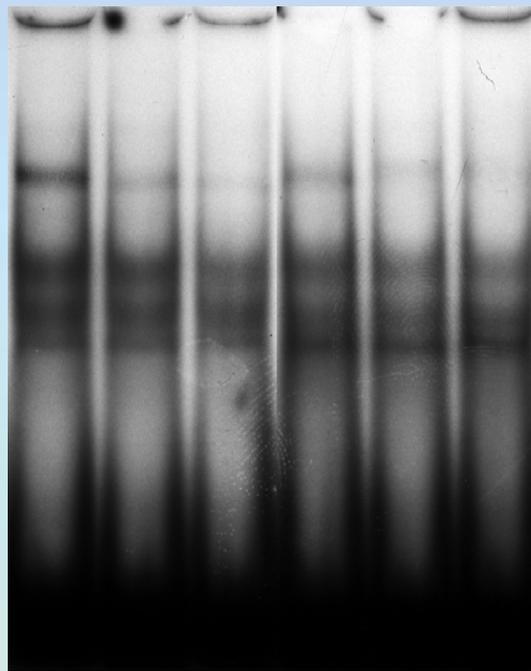
Устойчивые *M.spretus*



--- GATA-6

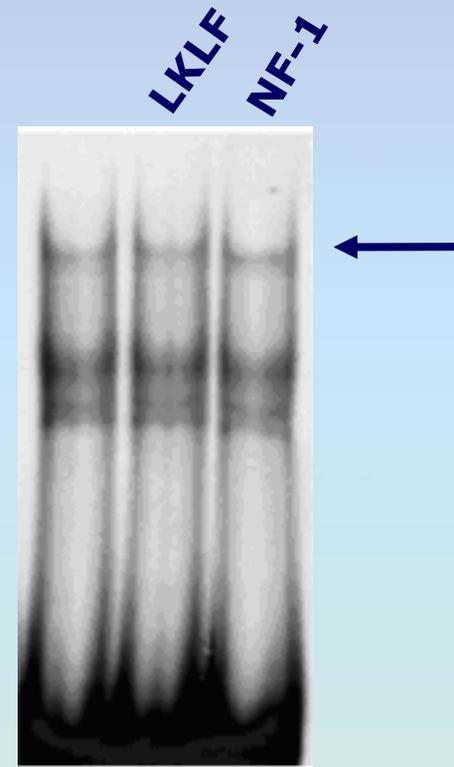
Идентификация белка связывающегося с олигонуклеотидами, воспроизводящими район полиморфизма у мышей *M.musculus* и *M.spretus*

Антитела к NF-Y - + - +
50x NF-Y + - + -



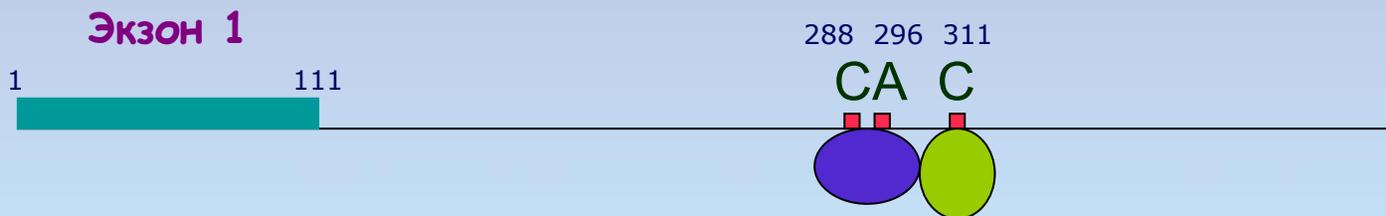
311-MUS

311-SPRET



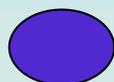
311-MUS

Чувствительные линии *M.musculus*



Устойчивые *M.spretus*

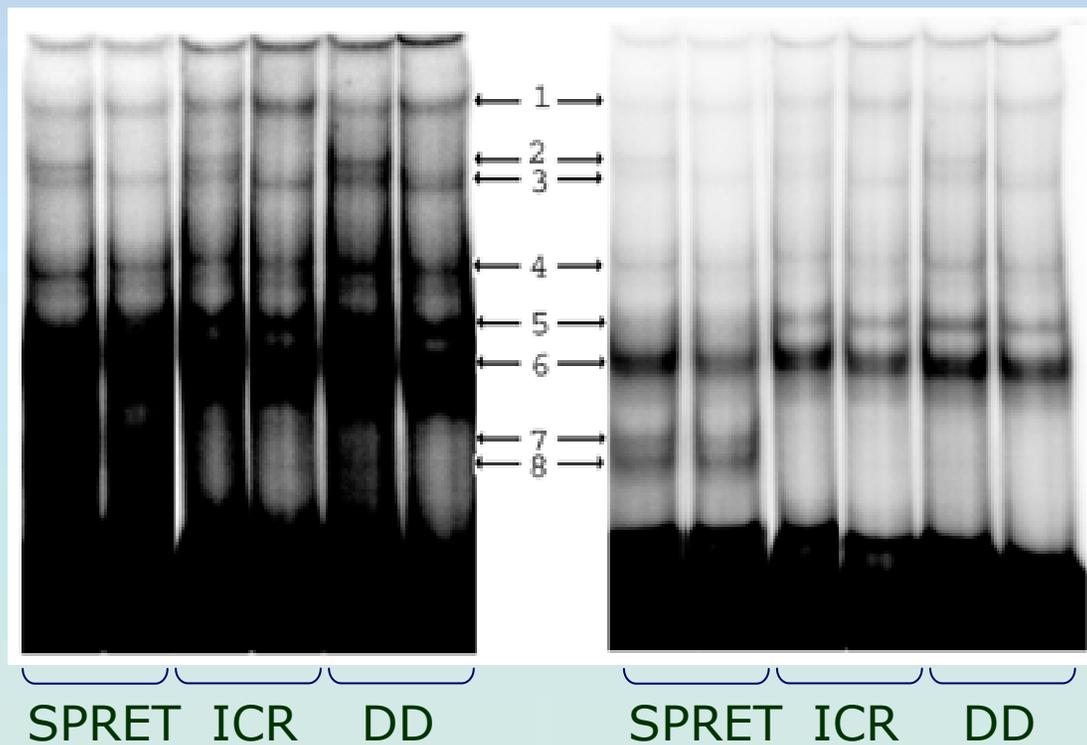


 --- GATA-6

 --- NF-Y

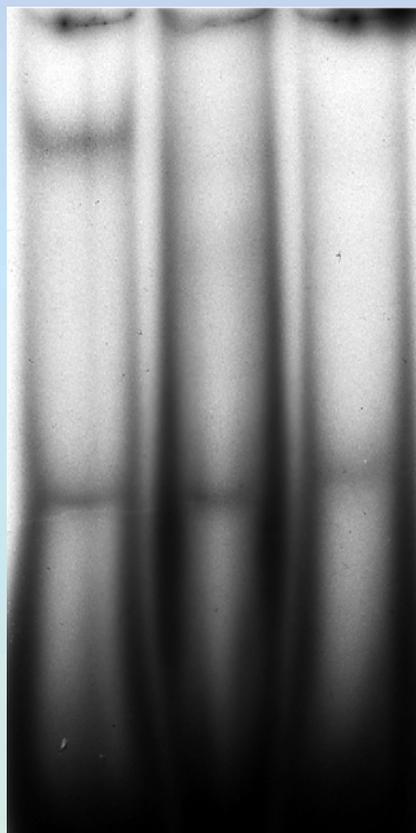
Связывание белков экстрактов ядер лёгких мышей с областью потенциального композиционного элемента

Антитела к NF-Y

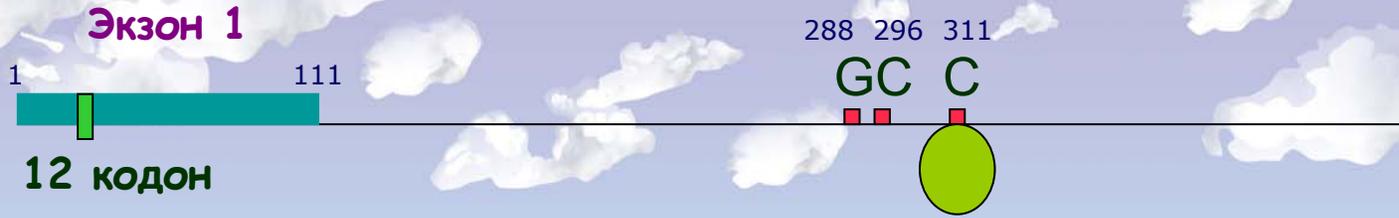


Идентификация сайта для фактора NF-Y в районе СА полиморфизма

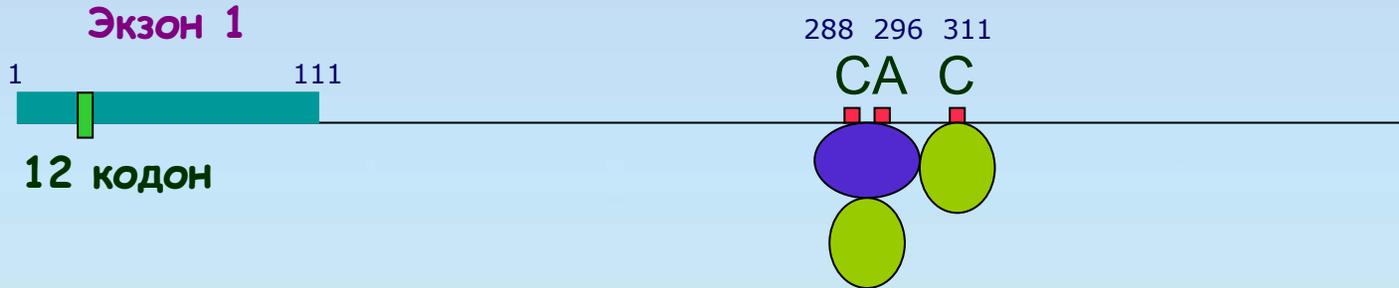
Антитела к NF-Y	-	+
50x NF-Y	+	-



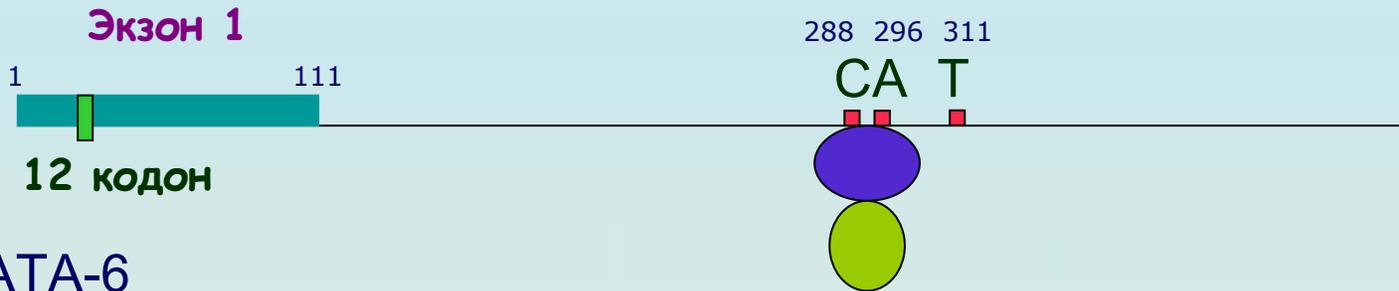
Устойчивые линии *M.musculus*



Чувствительные линии *M.musculus*



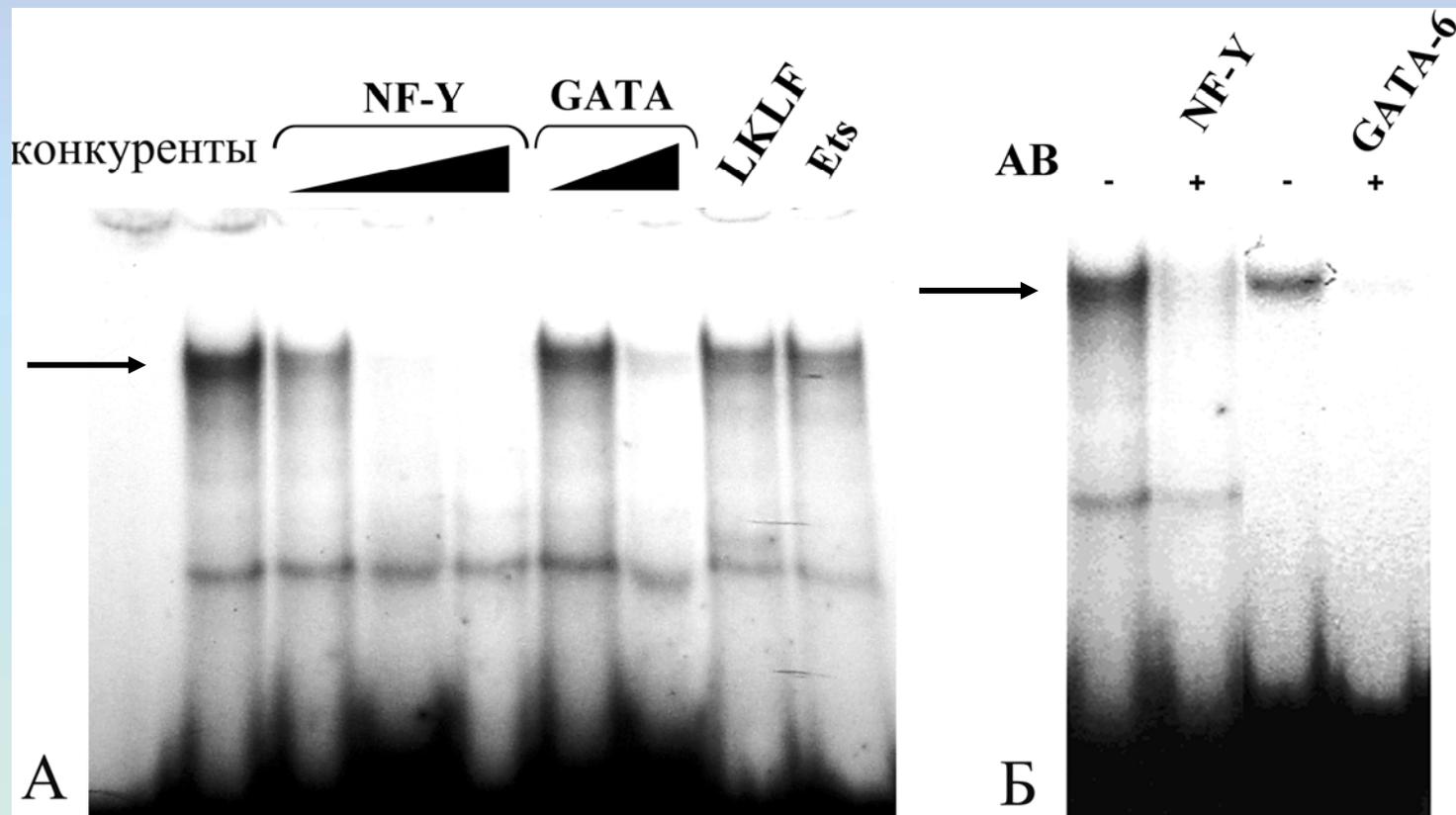
Устойчивые *M.spretus*



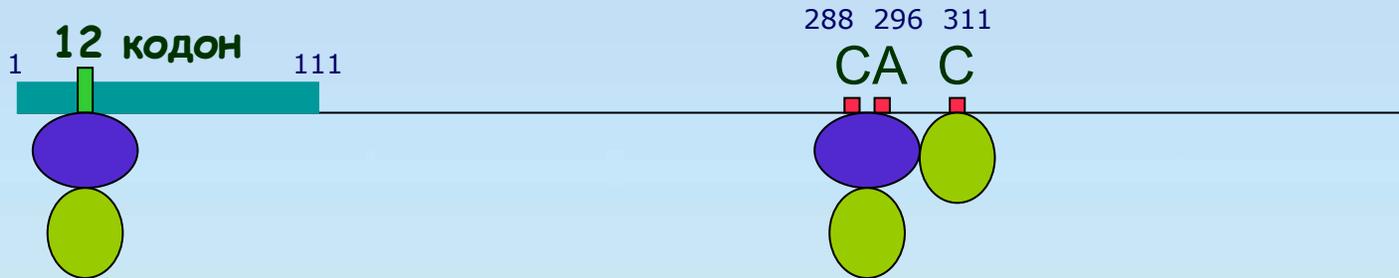
--- GATA-6

--- NF- Υ

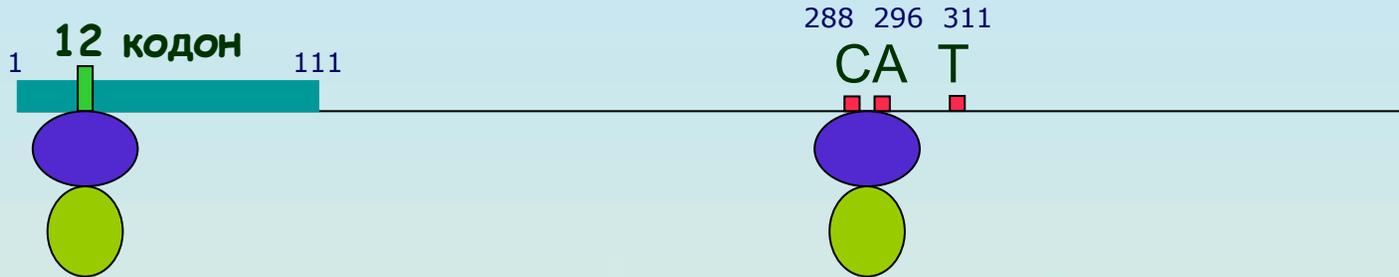
Идентификация белков связывающихся с областью 12 кодона гена *K-Ras* мыши



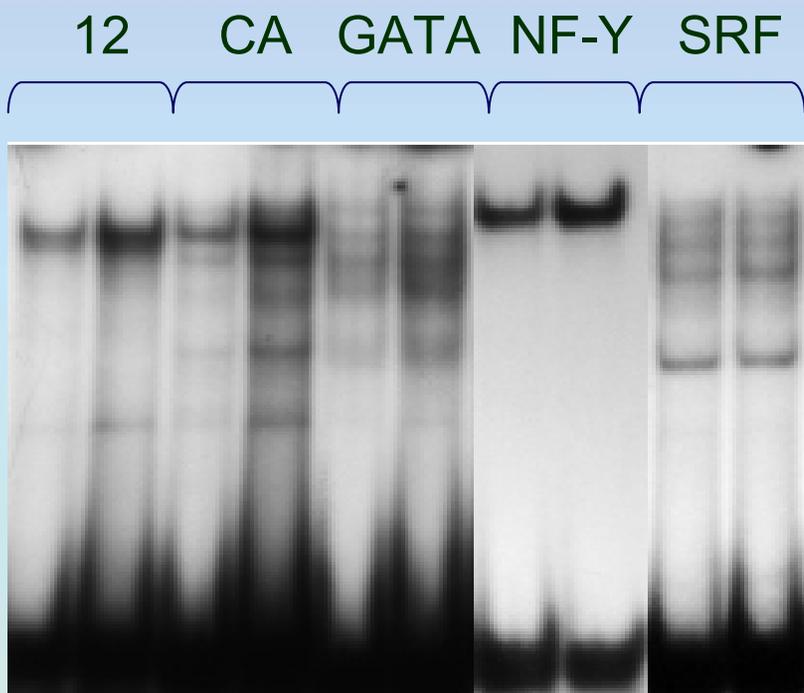
Устойчивые линии *M.musculus*



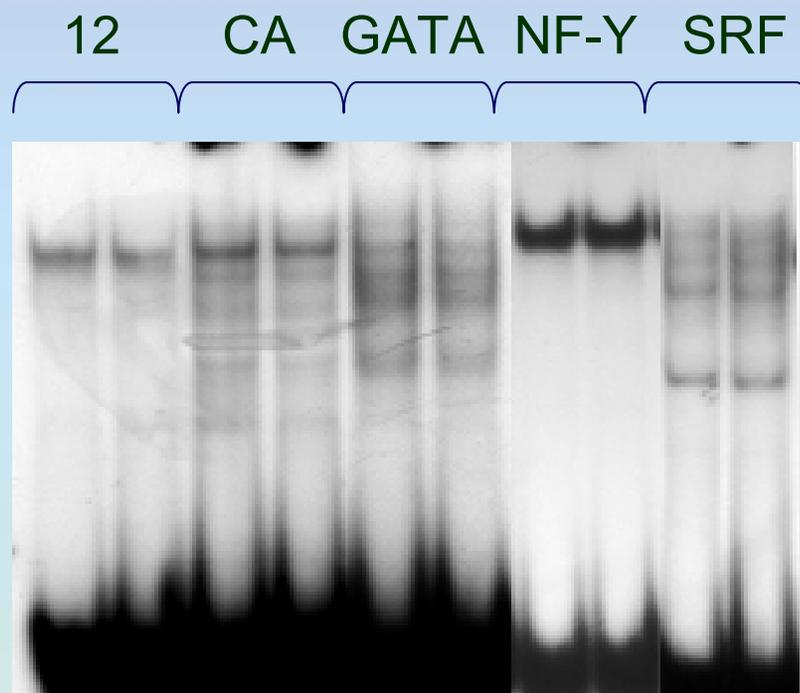
Устойчивые *M.spretus*



Влияние легочных канцерогенов на ДНК связывающую активность факторов GATA-6 и NF- Υ и их связывание с олигонуклеотидами воспроизводящими районы 12 кодона и CA полиморфизма

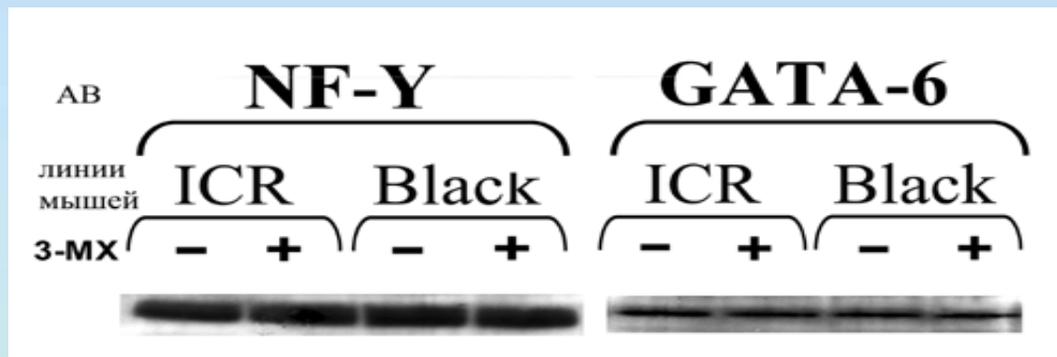


Чувствительные линии



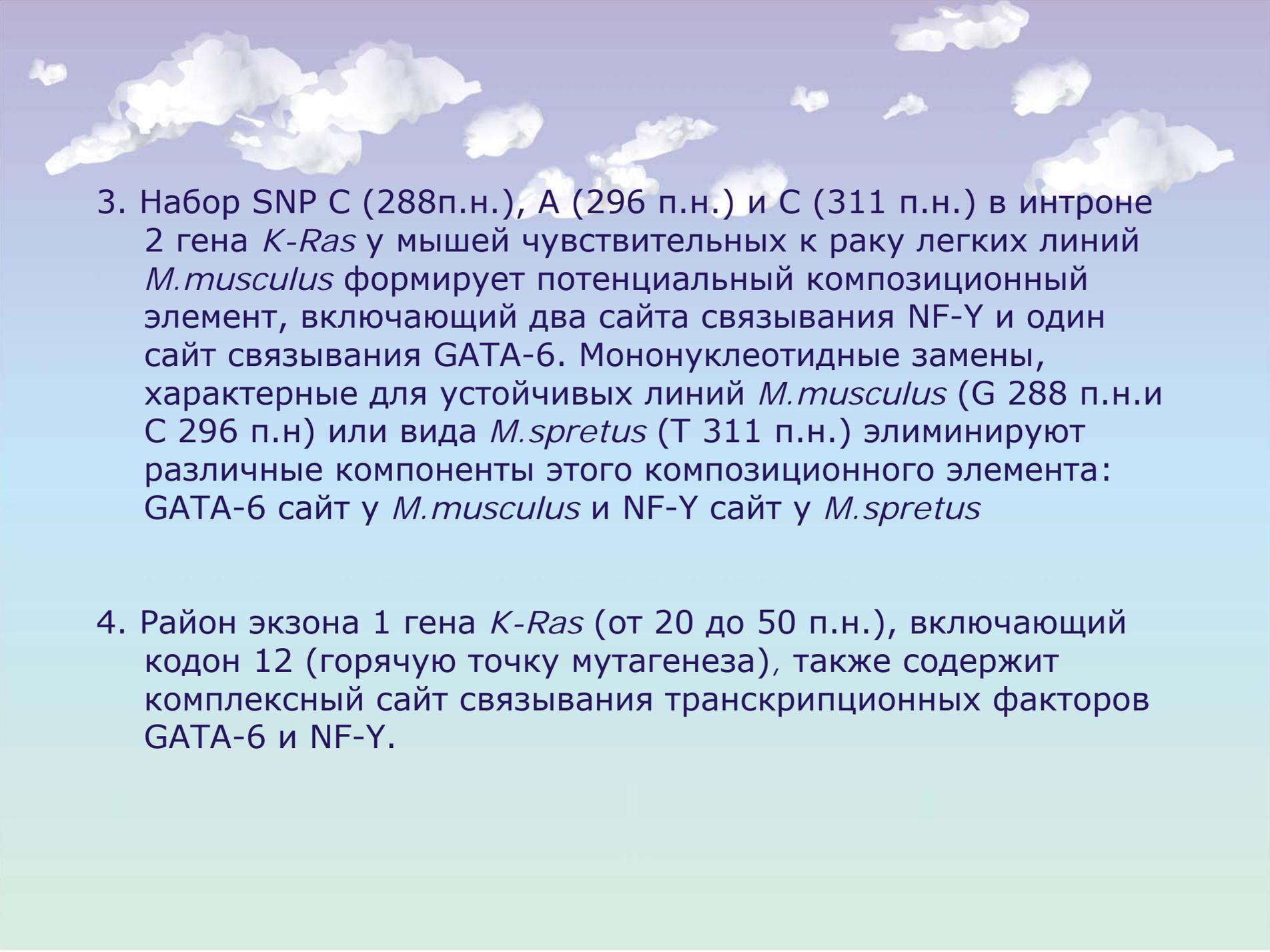
Устойчивые линии

Вестерн-блот гибридизация с антителами к NF-Y и GATA-6



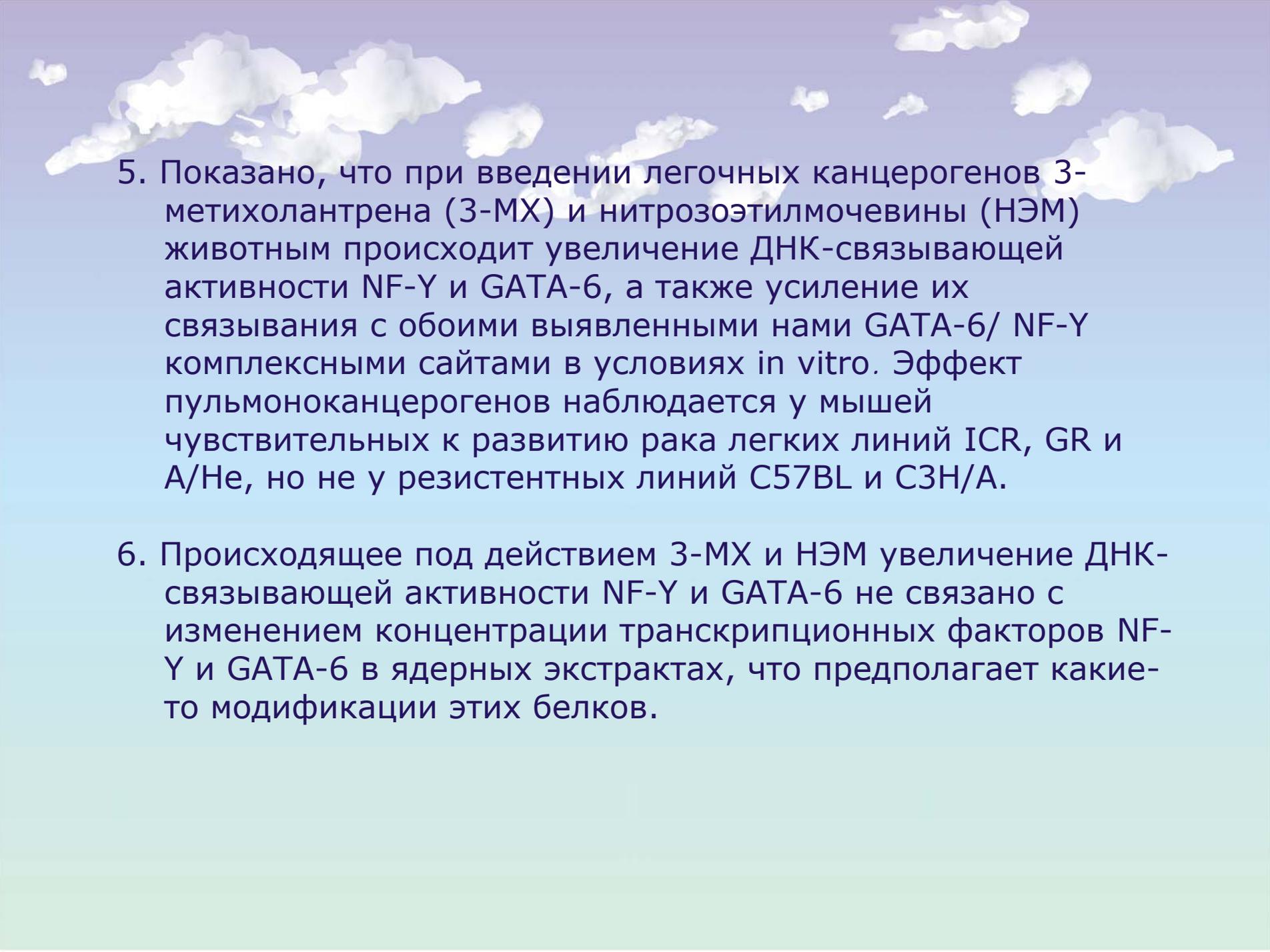
ВЫВОДЫ

1. Показано, что SNPs в интроне 2 гена *K-ras* в позициях 288 п.н. и 296 п.н., сопряженные с предрасположенностью мышей вида *M.musculus* к пульмоноканцерогенезу, формируют комплексный сайт связывания транскрипционных факторов GATA -6 и NF- Υ . Взаимодействие GATA-6 и NF- Υ с районом локализации SNPs (от 278 до 307 п.н.) носит взаимозависимый характер.
2. Мононуклеотидная замена в позиции 311 п.н. интрона 2 гена *K-ras*, отличающая чувствительные к развитию рака линии мышей вида *M.musculus* от мышей устойчивого вида *M.spretus*, приводит к ухудшению сайта транскрипционного фактора NF- Υ .



3. Набор SNP С (288 п.н.), А (296 п.н.) и С (311 п.н.) в интроне 2 гена *K-Ras* у мышей чувствительных к раку легких линий *M.musculus* формирует потенциальный композиционный элемент, включающий два сайта связывания NF-Υ и один сайт связывания GATA-6. Мононуклеотидные замены, характерные для устойчивых линий *M.musculus* (G 288 п.н. и С 296 п.н.) или вида *M.spretus* (Т 311 п.н.) элиминируют различные компоненты этого композиционного элемента: GATA-6 сайт у *M.musculus* и NF-Υ сайт у *M.spretus*

4. Район экзона 1 гена *K-Ras* (от 20 до 50 п.н.), включающий кодон 12 (горячую точку мутагенеза), также содержит комплексный сайт связывания транскрипционных факторов GATA-6 и NF-Υ.

- 
5. Показано, что при введении легочных канцерогенов 3-метихолантрена (3-МХ) и нитрозоэтилмочевины (НЭМ) животным происходит увеличение ДНК-связывающей активности NF- Υ и GATA-6, а также усиление их связывания с обоими выявленными нами GATA-6/ NF- Υ комплексными сайтами в условиях *in vitro*. Эффект пульмоноканцерогенов наблюдается у мышей чувствительных к развитию рака легких линий ICR, GR и A/He, но не у резистентных линий C57BL и C3H/A.
 6. Происходящее под действием 3-МХ и НЭМ увеличение ДНК-связывающей активности NF- Υ и GATA-6 не связано с изменением концентрации транскрипционных факторов NF- Υ и GATA-6 в ядерных экстрактах, что предполагает какие-то модификации этих белков.