

А. Ю. Губський

# СТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ СИГНАЛЬНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ РЕКОМБІНАЦІЇ ТРЬОХ ТИПІВ V-, D-, J-СЕГМЕНТІВ ГЕНІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ І Т-КЛІТИННИХ РЕЦЕПТОРІВ ЛЮДИНИ

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Одеса

## Вступ

У структурі нативних генів імуноглобулінів (IG) і Т-клітинних рецепторів (TCR) клітин зародкової лінії виділяють три типи V-, D-, J-сегментів: функціональні (F), псевдогени (P) і утримуючі мінорні дефекти (ORF) [1]. Сигнальні послідовності рекомбінації (RSS) функціональних сегментів ефективно розпізнаються білками V(D)J-рекомбінантного комплексу. Тому в перебудованих IG і TCR генах зрілих B- і Т-лімфоцитів сегменти такого типу входять до складу району, що кодує ділянку антигензв'язувального центру білкового ланцюга антитіл і мембранних рецепторів. У псевдогенів і ORF-сегментів послідовності RSS можуть бути дефекти на рівні поодиноких або комплексних нуклеотидних замін, які здатні зменшити або виключити можливість ефективного ендонуклеазного розщеплення ДНК під час рекомбінації. Поліморфізм нуклеотидного складу гептамерів і наномерів RSS є властивим також і для функціональних сегментів [2]. Проте відомо, що їх рекомбінаційний потенціал є значно вищим, ніж у двох інших типів сегментів. Це твердження є постулатом, проте нині не базується на точних кількісних даних, одержаних при порівнянні всіх існуючих в IG і TCR генах канонічних і поліморфних гептамер-наномерних пар. Описаний у літературі аналіз послідовностей ДНК-мішеней системи V(D)J-

рекомбінації IG і TCR генів миші зводився переважно до загальної кількісної оцінки рівня консервативності окремих нуклеотидних позицій гептамерів, спейсерів і наномерів і не порівнював RSS трьох різних типів сегментів [3]. Тому існуюча точка зору все ж залишається без точного кількісного виразу. До того ж особливості нуклеотидного складу гептамерів і наномерів RSS людини освітлені не повністю.

Дослідження особливостей структурної організації ДНК-мішеней системи V(D)J-рекомбінації є важливим етапом у розумінні природи ефективних перебудов V-, D-, J-сегментів IG і TCR генів клітин-попередників B- і Т-лімфоцитів.

**Мета** роботи: порівняти нуклеотидний склад усіх існуючих гептамер-наномерних пар у відомих V-, D-, J-сегментах IG і TCR генів людини, кількісно оцінити та доповнити існуючі уявлення про особливості поліморфізму RSS.

## Матеріали та методи дослідження

У роботі використано первинну структуру ДНК генів важкого,  $\kappa$ -,  $\lambda$ - ланцюгів імуноглобулінів (IGH, IGK, IGL) і  $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ - ланцюгів Т-клітинних рецепторів (TCRA, TCRD, TCRG, TCRB) людини. Анотовані послідовності ДНК зазначених генів узяті з сайту електронної біологічної бази даних Entrez. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). У використаному джерелі нуклеотидні послідовності

позначені такими номерами: NG\_001019, NG\_000834, NG\_000833, NG\_000002, NG\_001332, NG\_001336 і NG\_001333.

Пошук сигнальних послідовностей рекомбінації в зазначених генах проведено відповідно до відомих критеріїв гептамерів, спейсерів і наномерів [2–5]. Нуклеотидні позиції, за якими найчастіше відбуваються заміни основ у поліморфних структурах, визначено на підставі зміни частот зустрічальності канонічних нуклеотидів послідовностей CACAGTG і ACAAAAACC.

## Результати дослідження та їх обговорення

Виявлено, що в літературі й електронних біологічних базах даних не для всіх V-, D- і J-сегментів IG і TCR генів людини описана структура сигнальних послідовностей рекомбінації. До того ж, у деяких з них невірно ідентифіковані послідовності гептамерів, спейсерів і наномерів. Тому, аналізуючи таке джерело даних, неможливо вірогідно й повно оцінити особливості нуклеотидного складу структурних елементів RSS. Тому нами використано анотовану первинну структуру ДНК усіх трьох із чотирьох відомих IG і TCR генів людини, щоб самостійно встановити послідовності ДНК-мішеней системи V(D)J-рекомбінації.

Внаслідок проведеного дослідження у 325 функціональних V-, D-, J-сегментів, а також у 151 псевдогена й 39 сегментів,



**Кількісна оцінка структурного поліморфізму гептамерів і наномерів RSS трьох типів V-, D-, J-сегментів IG і TCR генів людини**

Елементи RSS	Загальна кількість	Канонічні	Поліморфні	Кількість нуклеотидних замін у поліморфних гептамерах і наномерах				
				1	2	3	4	5
Гептамери (F)	353	202 (57 %)	151 (43 %)	93 (62 %)	45 (30 %)	8 (5 %)	5 (3 %)	0
Наномери (F)	353	44 (12 %)	309 (88 %)	126 (41 %)	99 (32 %)	57 (18 %)	26 (8 %)	1 (<1 %)
Гептамери (ORF)	43	12 (28 %)	31 (72 %)	14 (45 %)	13 (42 %)	4 (13 %)	0	0
Наномери (ORF)	43	8 (19 %)	35 (81 %)	17 (49 %)	10 (29 %)	5 (14 %)	3 (8 %)	0
Гептамери (P)	151	59 (39 %)	92 (61 %)	41 (44 %)	32 (35 %)	18 (20 %)	1 (1 %)	0
Наномери (P)	151	8 (5 %)	143 (95 %)	49 (34 %)	46 (32 %)	34 (24 %)	8 (6 %)	6 (4 %)

*Примітка.* У табл. 1 і 2: гептамери й наномери RSS функціональних сегментів, псевдогенів і сегментів із меншими дефектами позначені як F, P і ORF відповідно.

які мають мінорні дефекти, нами виявлено відповідно 353, 151 і 43 сигнальні послідовності рекомбінацій. Детально вивчивши кожну групу послідовностей, зроблено такі висновки про характер поліморфізму їхніх структурних елементів.

Із 353 гептамерів функціональних сегментів тільки 202 (57 %) відповідають канонічним послідовностям САСАГТГ. Решта є поліморфними структурами, серед яких домінують послідовності з заміною будь-якої однієї основи (із семи можливих) у нуклеотидному ланцюгу. У цілому кількість нуклеотидних замін у гептамерах функціональних сегментів може досягати чотирьох (табл. 1). Найчастіше трапляються такі поліморфні послідовності: СACTGTG, САСАГСС, САСАГСГ і САСААТГ — відповідно 19, 18, 16 і 13 разів. Гептамери інших 45 типів виявляються у структурі RSS із меншою частотою. Із них 28 послідовностей — лише одноразово.

Нами виявлено, що більшість усіх спостережуваних нуклеотидних замін у поліморфних гептамерах сегментів F-типу відбувається в останніх чотирьох позиціях консенсусу САСАГТГ. На вказаних ділянках канонічні основи трапляються лише із частотою 69, 69, 56 і 61 % відповідно (табл. 2). Такі заміни, як правило, не виключають ефек-

**Частота зустрічальності канонічних нуклеотидів у поліморфних послідовностях гептамерів і наномерів RSS трьох типів V-, D-, J-сегментів IG і TCR генів людини, %**

Гептамери	Канонічні нуклеотиди							Наномери	Канонічні нуклеотиди								
	С	А	С	А	Г	Т	Г		А	С	А	А	А	А	А	С	С
F	98	99	99	69	69	56	61	F	66	92	78	39	90	98	91	81	70
ORF	90	90	87	52	90	58	65	ORF	71	89	89	43	89	100	91	83	63
P	89	79	75	75	78	60	66	P	80	86	80	48	87	89	85	78	72

тивного розщеплення ДНК білками V(D) J-рекомбінантного комплексу. Як відомо, ефективність стрімко знижується (або повністю зникає) за будь-яких нуклеотидних замін у перших трьох позиціях гептамеру [4]. Проте в 6 (1,5 %) унікальних V-, D-, J-сегментах, які, як правило, виявляються на перебудованих VJ- або VDJ-ділянках IG і TCR генів зрілих B- і T-лімфоцитів, гептамери RSS несуть саме такі дефекти.

Відомо, що структура наномерів RSS, на відміну від гептамерів, менш консервативна. Нами встановлено, що тільки 44 (12 %) наномери функціональних сегментів відповідають канонічній послідовності АСAAAAАСС. У їхніх поліморфних аналогах кількість нуклеотидних замін може досягати п'яти (див. табл. 1). Загальна ж кількість знайдених нами унікальних типів поліморфних структур дорівнює 117. Із них найбільш поширені послідовності АСАСААСС,

АСАТААСС, АСАГААСС і ТСАГААСС, які трапляються 32, 18, 16 і 11 разів.

Заміни основ можуть відбуватися в усіх позиціях наномера. Проте найменшою мірою в канонічній послідовності АСAAAAАСС вони зачіпають п'ятий, шостий і сьомий аденін (AAA), а також другий цитозин (див. табл. 2). Відомо, що будь-які заміни в полі-А ділянці дуже знижують спорідненість між ДНК-субстратом і ферментним комплексом, впливаючи на ефективність рекомбінації [4; 5]. У 58 (16 %) RSS функціональних V-, D-, J-сегментів у структурі наномерів знайдено саме такі заміни, тому їх рекомбінаційна активність ймовірно знижена. Тільки у 30 RSS гептамер-наномерні пари подано канонічними послідовностями САСАГТГ і АСAAAAАСС.

Якісна і кількісна оцінка характеру нуклеотидних замін, які наявні в гептамерах і наномерах RSS псевдогенів і сегментів, що містять мінорні де-



Таблиця 3

Кількість різних типів спейсерів, виявлених у структурі RSS трьох типів V-, D-, J-сегментів IG і TCR генів людини

Типи сегментів	Довжини спейсерів, н. о.														Загальна кількість спейсерів
	11	12	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24	25	
F	2	158	1	1	0	0	1	0	0	1	22	164	2	1	353
ORF	0	26	0	0	0	0	0	1	0	1	0	14	1	0	43
P	4	26	2	0	2	1	1	2	4	4	18	73	9	5	151

Примітка. Функціональні сегменти, псевдогени і сегменти з мінорними дефектами позначені як F, P і ORF відповідно.

фекти, наведена в табл. 1 і 2. У структурі RSS таких типів сегментів зростає кількість поліморфних послідовностей гептамерів і наномерів. У псевдогенів значно частіше (у чотири рази), ніж у RSS функціональних сегментів виявляються гептамери, що містять заміни відразу трьох канонічних основ. Виявлено, що заміни в перших трьох позиціях гептамерів і полі-А ділянки наномерів псевдогенів спостерігаються набагато частіше. Проте близько 50 % RSS псевдогенів позбавлені таких дефектів, а 6 є канонічними гептамерами і наномерами.

Спейсерна ділянка RSS відокремлює гептамер від наномера і дорівнює 12 ( $\pm 1$ ) або 23 ( $\pm 1$ ) нуклеотидам [6]. Ми виявили, що поліморфізм довжини такої ділянки може перевищувати  $\pm 1$  нуклеотид. У V-, D-, J-сегментів різних типів можуть траплятися 14-, 15-, 16-, 17-, 19-, 20-, 21- і 25-спейсерні RSS (табл. 3). Найчастіше вони виявляються у RSS псевдогенів.

### Висновки

Проведене дослідження засвідчує, що сигнальні послідовності рекомбінації функціональних V-, D-, J-сегментів, а також псевдогенів і ORF-сегментів — вельми поліморфні структури. Тільки невелика частина RSS є парюю канонічних гептамерів і наномерів.

Оскільки всі функціональні V-, D-, J-сегменти IG і TCR

генів людини успішно перебудовуються під час V(D) J-рекомбінації, це дозволяє стверджувати, що значний структурний поліморфізм RSS не перешкоджає ефективному ендонуклеазному розщепленню ДНК. В умовах *in vivo* рекомбінація можлива навіть тоді, коли нуклеотидні заміни спостерігаються у функціонально важливих позиціях гептамерів і наномерів RSS. Отже, система V(D)J-рекомбінації не виявляє високої специфічності до ДНК-субстрату.

Не дивлячись на те, що в цілому встановлені у результаті дослідження профіль і характер нуклеотидних заміні у RSS псевдогенів і ORF-сегментів свідчать про знижений рекомбінаційний потенціал, вважаємо, що в клітинах-попередниках B- і T-лімфоцитів деяка їх частина здатна ефективно перебудовуватися, утворюючи VJ- або VDJ-ділянки, що кодують антигензв'язувальну ділянку білкового ланцюга антитіл і T-клітинних рецепторів, оскільки їх поліморфні гептамери і наномери RSS позбавлені істотних дефектів і є аналогами відомих гептамерів і наномерів RSS сегментів F-типу. Оскільки у первинній структурі ДНК таких сегментів наявні різноманітні дефекти (стоп-кодони, дефекти сайтів сплайсингу тощо), трансляція мРНК не приводить до синтезу функціонального білкового продукту, тому в результаті подальшої позитив-

ної селекції клітини з такими перебудовами гинуть унаслідок апоптозу.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *The human immunoglobulin heavy variable genes* / N. Pallaresa, S. Lefebvre, V. Conteta, et al. // *Exp. Clin. Immunogenet.* — 1999 — Vol. 16. — P. 36-60.
2. Swanson P. C. The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes // *Immunological Reviews.* — 2004. — Vol. 200. — P. 90-114.
3. *Identification and utilization of arbitrary correlations in models of recombination signal sequences* / L. G. Cowell, M. Davila, T. B. Kepler et al. // *Genome Biology.* — 2002. — Vol. 3. — P. 25-45.
4. *Essential residues in V(D)J recombination signals* / Y. Akamatsu, N. Tsurushita, F. Nagawa et al. // *The Journal of Immunology.* — 1994. — Vol. 153. — P. 4520-4529.
5. Yu K., Taghva A., Lieber M. R. The cleavage efficiency of the human immunoglobulin heavy chain Vh elements by the RAG complex // *The J. of Biol. Chemistry.* — 2002. — Vol. 277. — P. 5040-5046.
6. Ramsden D. A., Baetz K., Wu G. E. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers // *Nucleic Acids Research.* — 1994. — Vol. 22. — P. 1785-1796.

