УДК 575.113+577.2+599.89

А. Ю. Губський[1], В. Г. Зіньковський[2]

ПОШУК І ІДЕНТИФІКАЦІЯ ДІЛЯНОК ЛОКАЛІЗАЦІЇ В ГЕНОМІ МИШІ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ cRSS, СТРУКТУРА ЯКИХ ПРИПУСКАЄ ВИСОКИЙ РЕКОМБІНАЦІЙНИЙ ПОТЕНЦІАЛ

[1]Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
[2]Опольський університет, Ополе, Польща

Вступ

Система V(D)J-рекомбінації — це унікальний молекулярно-генетичний апарат, який забезпечує в клітинах-попередниках В- і Т-лімфоцитів перебудови генів імуноглобулінів (Ig) і Т-клітинних рецепторів (TCR). Як сайти-мішені цієї системи виступають сигнальні послідовності рекомбінації (RSS), розташовані на межах внутрішньогенних V, D, J сегментів. Взаємодіючи з RSS, комплекс білків RAG1 і RAG2 (продукти генів, які активують рекомбінацію, далі білки RAG1/2) здійснює гідролітичне розщеплювання ДНК, внаслідок чого утворюються направлені делеції, що приводять до формування усередині гена VJ або VDJ ділянки, яка кодує антигензв'язувальний центр білкової молекули [1].

У нормі механізм даного рекомбінаційного апарату реалізується виключно в Ig і TCR локусах, проте при порушенні контролю білки RAG1/2 можуть здійснювати розриви ДНК в інших ділянках геному. Транслокації та делеції, що утворюються при цьому, є причиною ушкодження деяких генів людини (SCL, MTS1, HPRT тощо) і миші (Notch1), які часто спостерігаються при В- і Т-клітинних неоплазіях. Аналіз ділянок розривів у таких випадках показує, що як сайти-мішені ферментів виступають послідовності cRSS, які не є повними структурними аналогами RSS Ig і TCR генів. Структура їх гептамерів і наномерів може значною мірою відрізнятися від послідовностей CACAGTG і ACAAAAACC, маючи іноді в сумі тільки 6-11 загальних основ [2; 3]. Ці дані, разом із варіабельністю структури самих RSS, свідчать про те, що білки RAG1/2 можуть взаємодіяти з широким спектром послідовностей.

Нині відсутні дані про кількість у геномі миші ділянок, що можуть виступати як cRSS, структура яких припускає високий рекомбінаційний потенціал. **Мета** нашого дослідження полягає в тому, щоб відповісти на це питання, а також ідентифікувати ділянки локалізації таких послідовностей і знайти гени, в яких вони гіпотетично можуть брати участь в утворенні делецій і/чи інверсій екзонів.

Матеріали та методи дослідження

Досліджувана в роботі анотована первинна структура ДНК 21-ї хромосоми миші (Build 35.1) була запозичена із сервера NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/M_musculus/ARCHIVE/BUILD.35.1) у вигляді 21 файла формату gbk.

Пошук сайтів-мішеней білків RAG1/2 в послідовності ДНК кожної хромосоми проводили, використовуючи власні програмні алгоритми. Так, 28- і 39-нуклеотидні ділянки, в яких структури CACNNNN (гептамер) і NNNNAAANN (наномер) розташовувалися одна від одної на відстані, що дорівнювала 12 або 23 нуклеотидам, розглядалися нами як шукані 12- і 23-спейсерні cRSS (12cRSS і 23cRSS). Перший нуклеотид гептамеру і останній наномеру виступали як координати початку і кінця cRSS. Алгоритми, що використовуються, також дозволяли знайти інвертовані cRSS, розташовані в комплементарному ланцюзі ДНК. Надалі гептамери і наномери порівнювалися з послідовностями CACAGTG і ACAAAAACC.

Загальну кількість основ, що збігалися (максимально 16, мінімально 6), вважали показником, що оцінює структуру гептамер-наномерної пари.

Розроблені програмні алгоритми, що порівнюють координати cRSS з координатами генів миші, поданих в описі контигів аналізованих хромосом, були використані для ідентифікації генів, у структурі яких локалізовані cRSS. Наші алгоритми дозволяли провести аналіз 30996 білоккодуючих генів, 728 псевдогенів і 2846 генів, що кодують тРНК. Координати екзонів, вказані у структурі мРНК білоккодуючих генів, були використані для визначення внутрішньогенної локалізації cRSS. Як кодуючу послідовність (CDS) ми розглядали частину гена, що безпосередньо визначає послідовність амінокислот у білковому продукті. Використані в роботі координати послідовностей, що повторюються в геномі миші, запозичені з сервера NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/M_musculus/ARCHIVE/BUILD.35.1/masking_coordinates.gz.

Як гіпотетично можливі внутрішньогенні делеції розглядалися ділянки, обмежені послідовностями 12cRSS і 23cRSS (правило «12/23»), одна з яких розташована в комплементарному ланцюзі ДНК в інвертованому вигляді. У разі інверсій обидва сайти-мішені мають однакову орієнтацію в нуклеотидній послідовності [4].

Результати дослідження та їх обговорення

Існуючі експериментальні дані показують, що найбільш ефективно білки RAG1/2 ініціюють розриви ДНК тоді, коли RSS представлені 28 або 39 нуклеотидними структурами, в яких гептамер і наномер розділені 12- або 23-нуклеотидним спейсером. Структура гептамерів і наномерів варіабельна і може відрізнятися від консенсусних послідовностей CACAGTG і ACAAAAACC на 1-5 основ [5]. Перші три нуклеотиди гептамерів (CAC), а також полі-А ділянка наномерів (п'ята, шоста і сьома позиції) є висококонсервативними. Сайти-мішені, в яких у цих позиціях присутні інші основи, як правило, зумовлюють дуже низьку частоту рекомбінацій, а іноді повну відсутність розривів ДНК [6].

Послідовність спейсерної ділянки RSS не проявляє високої консервативності. Експериментально показано, що в деяких випадках заміни основ у цій ділянці можуть у кілька разів знизити частоту розривів. Проте всі вони не є настільки критичними (на відміну від розміру цієї ділянки або нуклеотидних замін у гептамерах, наномерах), щоб виключити саму можливість ендонуклеазного розщеплювання ДНК [7]. Узагальнивши наявні дані, цілком незаперечно можна стверджувати, що високий рекомбінаційний потенціал можуть виявляти тільки 28 або 39 нуклеотидні RSS, у яких гептамери і наномери мають функціонально важливі основи і більшою мірою відповідають послідовностям CACAGTG, ACAAAAACC відповідно. У зв'язку з цим, для того щоб провести пошук cRSS у геномі миші, ми застосували програмні алгоритми, що враховують такі основні критерії сайтів-мішеней, з якими ефективно взаємодіють білки RAG1/2.

Дослідивши анотовану первинну структуру ДНК 21-ї хромосоми миші *in silico*, ми знайшли зовні локусів Ig і TCR генів 6724 послідовності cRSS (3034 12cRSS і 3690 23cRSS), які можуть мати високий рекомбінаційний потенціал. Твердження грунтується на тому, що у 17 із них (6 12cRSS і 11 23cRSS) гептамери і наномери повністю відповідають структурам CACAGTG і ACAAAAACC, а у 431 (169 12cRSS і 262 23cRSS) і 6276 (2859 12cRSS і 3417 23cRSS) є з ними в цілому 15 і 14 загальних основ відповідно. Знайдені cRSS гіпотетично можуть брати участь в утворенні тільки 6702 розривів ДНК, оскільки усередині 22 послідовностей 23cRSS розташовані 12cRSS, які мають з ними загальний гептамер. Встановлено, що такий же високий ступінь відповідності (14 загальних основ) із консенсусними послідовностями гептамерів і наномерів RSS Ig і TCR генів мають структурні елементи ще 44 cRSS (21 12cRSS і 23 23cRSS), проте вони характеризуються низьким рекомбінаційним потенціалом, оскільки дві останні позиції їх наномерів представлені динуклеотидом AA [6]. Такі cRSS не розглядалися нами в ході подальшого дослідження.

Порівнюючи координати знайдених cRSS з координатами 34570 генів миші, представлених в анотації аналізованих контигів хромосом (див. матеріали та методи), ми виявили, що 2887, 7 і 20 із них є відповідно структурними елементами 2373 білоккодуючих генів, 7 псевдогенів і 20 білоккодуючих генів, анотованих як такі, що містять сегменти, подібні Ig, TCR генам. Решта прихованих мотивів рекомбінації розташована в інших, не ідентифікованих нами ділянках геному миші (табл. 1). У досліджуваних 2846 генах, що кодують тРНК, не виявлено жодної послідовності cRSS.

Розглядаючи у подальшому тільки 2373 білоккодуючих гени, ми встановили, що 460 із них (Pcaf, Pbx1, Brca2 тощо) містять у своїй структурі від 2 до 4 послідовностей cRSS. У свою чергу, в таких генах, як Astn2, Il1rapl1, Ptprt і Camta1, Prkg1, виявлено 5 і 6 сайтів-мішеней білків RAG1/2. Аналіз внутрішньогенної локалізації показує, що в екзонах 87 (Tex13, Adamts19 тощо) і інтронах 2304 (Ksr, Lats2, Rasal2 тощо) даних генів розташовано 88 і 2799 послідовностей cRSS відповідно. У 46 генів (Hif1a,

Neb тощо) в екзонах, що безпосередньо кодують послідовність амінокислот у білковому продукті (CDS), виявлено по одному cRSS, а в CDS гена LOC627784 — два таких сайти-мішені. Варто відзначити, що в інтронах 11 генів знаходяться 11 (по одній на ген) з 22 згаданих вище 39 нуклеотидних ділянок, які одночасно можуть виступати як 23cRSS і 12cRSS. Використовуючи координати наведених у геномі миші різних повторів, ми встановили, що в таких генах, як AV340375, Usp29, Chd2, Mier1 і 2810039F03Rik, BC037674, вони є частиною послідовностей, що повторюються, — B1_Mus2 і B1_Mur4, B1_Mus1 відповідно.

Використовуючи правило «12/23» ми знайшли, що в 87 (Large, Mapk8ip3 тощо) і 100 (Trhde, Map3k5 тощо) білоккодуючих генах послідовності 12cRSS і 23cRSS, розташовані в суміжних інтронах, гіпотетично можуть брати участь в утворенні делецій та інверсій цілих екзонів (тип Del-1 і Inv-1). У 30 генах (Ptprn2, Ulk2 і т. д.) можливі обидва типи таких перебудов. Делеції та інверсії, опосередковані послідовностями 12cRSS і 23cRSS, одна з яких розташована в екзоні, а інша — в інтроні (тип Del-2 і Inv-2), можливі у таких генів миші, як D430038H04Rik, Rpl23, Iqgap3 і Suz12, Macf1, B230333C21Rik відповідно, причому в гені Bach2 можливі обидва таких ушкодження. Нами встановлено, що у миші немає генів, в яких пара cRSS, відповідно до правила «12/23», могла б опосередкувати розриви ДНК в одному або двох суміжних екзонах. У середньому розмір розглянутих нами можливих внутрішньогенних делецій Del-1, Del-2 і інверсій Inv-1, Inv-2 дорівнює 147, 65 і 144, 154 тис. п. н. відповідно (табл. 2).

Варто відзначити, що механізм реалізації V(D)J-рекомбінації в Ig, TCR локусах дуже складний і мало вивчений. Його функціонування на певних етапах розвитку B- і T-клітин багато в чому залежить від ступеня метилювання і/чи ацетилювання ДНК у цих ділянках геному, а також наявності внутрішньогенних енхансерів, трансрегуляторних елементів тощо. Тому багато в чому ефективній взаємодії білків RAG1/2 із внутрішньогенними сигнальними послі-

Таблиця 1

Кількість послідовностей 12cRSS і 23cRSS, виявлених у досліджених ділянках геному миші

Типи cRSS	Загальна кількість у геномі миші	У білоккодуючих генах			В Ig/TCR-подібних генах	У псевдогенах	У інших ділянках геному
		в екзонах	в інтронах	в CDS			
1cRSS	3034	48	1298	32	17	3	1668
23cRSS	3690	40	1501	16	3	4	2142

Таблиця 2

Приклади білоккодуючих генів, у яких послідовності cRSS гіпотетично можуть опосередковувати делеції і/чи інверсії екзонів

Типи перебудов	Гени	Послідовності 12cRSS і 23cRSS	Типи послідовностей, що повторюються	Внутрішньогенна локалізація cRSS		Розмір Del/Inv, т. п. н.
				№ екзону	№ інтрону	
Del-1	Large	CACAGTG-CTACAAGCTATA-ACTCAAACC*	MLT1A1	—	11	88
		CACAGTG-CTCCCTGGGTCTAAACCTCCAAT-AAAAAAACC	L1_Mus3	—	6	
Del-2	Rpl23	CACAGAG-AAACCCTTGTCT-CCAAAAACC*	B1_Mus2	5	—	2
		CACAGAG-AAATCCTGTCTAGAAAAACAAAC-AAAAAAACC	B1_Mus1	—	3	
Inv-1	Trhde	CACTGTG-GTAGAATTCTGT-ACAAAAACC	B1_Mus1	—	10	41
		CACAGAG-AAACCCTGTCTCGAAAAACAAAA-ACAAAAAAC	L1_Mur3	—	12	
Inv-2	Suz12	CACAGTG-CTTGGAGCTGGA-ATAAAAAGC*	B1_Mus2	16	—	28
		CACAGAG-AAACCCTGTCTCGAAAAACAAAA-ACAAAAACA*	—	—	4	
Del/Inv	Ptprn2	CACAGTG-TTTGTAGGAAGA-ATAAAAACC	L1M3e	—	3	416/446
		CACTGTG-GGTCAAACTTTA-ACCAAAACC*	MERVL_2A	—	3	
		CACAGTG-CTGTAAGACTTGGGCACATGGAG-ATAAAAACC*	—	—	13	
	Bach2	CACAGAG-AAACCCTGTCTC-AAAAAAACC	B1_Mur3	—	3	133/325
		CACAGCT-TCTTTCCACCTT-ACAAAAACC*	—	—	1	
		CACGGTG-CTCACCTGACACCGTTCGGCGGC-ACCAAAACC*	—	8	—	

Примітка. * — Інвертовані послідовності cRSS, розташовані в комплементарному ланцюзі ДНК.

довностями рекомбінації передує складна реорганізація хроматину [8; 9]. У зв'язку з цим, виявлені в результаті дослідження послідовності cRSS можуть відігравати роль сигналів, що «мовчать». Вони фактично можуть не бути доступними білкам RAG1/2, не дивлячись на те, що в цілому структура їх гептамерів і наномерів припускає (теоретично) значну спорідненість до них. Проте, оскільки сьогодні причини утворення розривів ДНК системою V(D)J-рекомбінації зовні локусів Ig, TCR генів не розкриті, цілком безумовно можна стверджувати, що виявлені нами в геномі миші cRSS можуть виступати як потенційні мішені цього молекулярно-генетичного апарату при порушенні його функціонування.

Висновки

Одержані під час дослідження результати показують, що в геномі миші зовні локусів Ig, TCR генів локалізована велика кількість ділянок, які можуть бути сайтами-мішенями білків RAG1/2, структура яких припускає високий рекомбінаційний потенціал. Вважаємо, що при порушенні регуляції системи V(D)J-рекомбінації, виявлені нами в білоккодуючих генах 12cRSS і 23cRSS, можуть опосередкувати їх ушкодження. Проведене нами ретельне дослідження геному миші дозволяє не тільки позначити ділянки можливих розривів ДНК, але і виділити групу генів, у яких існування конкретних делецій і/чи інверсій екзонів можна перевірити експериментально. Це дає можливість розширити існуючі уявлення про масштаб хромосомних аберацій, які пов'язані з порушенням функціонування розглянутого рекомбінаційного апарату.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Patrick C. Swanson.* The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes // Immunological Reviews. — 2004. — Vol. 200. — P. 90-114.

2. *Disruption* of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity / Peter D. Aplan, Donald P. Lombardi, Ann M. Ginsberg et al. // Science. — 1990. — Vol. 256. — P. 1426-1429.

3. *Involvement* of illegitimate V(D)J recombination or microhomology-mediated nonhomologouse end-joining in the formation of intragenic deletions of the Notch1 gene in mouse thymic lymphomas / Hideo Tsuji, Hiroko Ishii-ohba, Takanori Katsube et al. // Cancer Research. — 2004. — Vol. 15. — P. 8882-8890.

4. *Susanna M. Lewis, Joanne E. Hesse.* Cutting and closing without in V(D)J joining // The EMBO Journal. — 1991. — Vol. 10. — P. 3631-3639.

5. *Губський А. Ю.* Структурний аналіз сигнальних послідовностей рекомбінації трьох типів V-, D-, J-сегментів генів імуноглобулінів і Т-клітинних рецепторів людини // Одес. мед. журнал. — 2005. — Т. 5. — С. 10-12.

6. *Essential* residues in V(D)J recombination signals / Yoshiko Akamatsu, Naoyo Tsurushita, Fumikiyo Nagawa et al. // Journal of Immunology. — 1994. — Vol. 153. — P. 4520-4529.

7. *Mouse* RSS spacer sequences affect the rate of V(D)J recombination / Liam Fanning, Alison Connor, Kristen Baetz et al. // Immunogenetics. — 1996. — Vol. 40. — P. 146-150.

8. *Craig H. Bassing, Wojciech Swat, Frederick W. Alt.* The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J-recombination // Cell. — 2002. — Vol. 109. — P. 45-55.

9. *Hesslein D. G., Schatz D. G.* Factors and forces controlling V(D)J recombination // Adv. Immunol. — 2001. — Vol. 78. — P. 169-232.

УДК 616.61-092-07.08

Ю. Є. Роговий, Л. Г. Архіпова, М. В. Дікал, І. Л. Муравйова, Л. О. Філіпова, К. М. Міль, О. В. Бойко

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ТУБУЛОІНТЕРСТИЦІЙНОГО СИНДРОМУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ НЕФРИТІ МАЗУГІ ЗА ДОПОМОГОЮ ВЕГЕТАТИВНОГО РЕЗОНАНСНОГО ТЕСТУ «ІМЕДИС-ТЕСТ+»

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

Відомо, що розвиток хронічного нефриту Мазугі характеризується формуванням тубулоінтерстиційного синдрому, який є основою швидко прогресуючого хронічного патологічного процесу в нирках [1; 2]. Останнім часом все більше зростає інтерес до можливостей застосування вегетативного резонансного тесту «ІМЕДИС-ТЕСТ+» [3; 4]