

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Разработка метода детекции событий эктопической V(D)J рекомбинации.

Смирнова Виктория Владимировна

Студент

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*

E-mail: smivic@rambler.ru

Соматическая V(D)J рекомбинация – главный источник разнообразия генов рецепторов Т-клеток и иммуноглобулинов. Сигналами для иммунной V(D)J рекомбинации служат характерные последовательности – Recombination Signal Sequences (RSS), фланкирующие сегменты ДНК, которые будут соединены после рекомбинации. RSS – консервативные 9 и 7 нуклеотидов, разделенные неконсервативным спейсером в 12 или 23 нуклеотида; для перестройки необходимо наличие двух различных (12- и 23-) RSS. Биоинформатический анализ показывает, что последовательности, похожие на RSS, разбросаны по всему геному человека, не только в локусах иммунных генов. Возможно, в некоторых клетках эти криптические RSS (cRSS, последовательности, похожие на RSS, но расположенные вне иммунных локусов) могут участвовать в рекомбинации. В данной работе исследовалась возможность рекомбинации с участием таких сигналов. Существуют методы, основанные на поиске двухцепочечных разрывов в районе RSS или образующихся после рекомбинации кольцевых фрагментов ДНК, но такие методы не позволяют определить конечный результат рекомбинации – оказались ли соединены конкретные участки.

Предлагаемый нами подход, основанный на полимеразной цепной реакции (PCR), позволяет детектировать даже очень редкие перестройки в геноме (одна на много тысяч клеток). На первом этапе с помощью биоинформатического анализа были найдены все пары cRSS в геноме человека и выбраны лучшие кандидаты для рекомбинации. Затем подбирались праймеры для PCR, результатом использования которых будет амплифицированный продукт определенной длины, но только в случае рекомбинации, приводящей к делеции участка, фланкируемого выбранной парой cRSS. Анализ продуктов PCR позволяет выяснить, происходит ли такая рекомбинация в исследуемых клетках. Проводилась оптимизация метода: подбор оптимальной концентрации матрицы и количества циклов PCR (для контроля использовались праймеры на нерекombинированные участки). Мы протестировали предложенный метод на функциональных иммунных RSS. В качестве матрицы PCR использовалась геномная ДНК, выделенная из крови. Метод позволил зафиксировать рекомбинацию, приводящую к сочетанию конкретных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулинов. Результаты совпали с ожидаемыми: мы увидели все возможные при данном наборе праймеров 3 продукта рекомбинации, являющиеся статистически достаточно редкими (т. к. количество возможных сочетаний сегментов огромно). Таким образом, метод позволяет детектировать V(D)J рекомбинацию и может использоваться так же для изучения репертуара иммунных генов, возникающего вследствие рекомбинации.

Преимущества нашего метода – чувствительность (одно событие эктопической рекомбинации на тысячи клеток), высокая специфичность при использовании Nested PCR, получение амплифицированного продукта – копии рекомбинированного участка.

Конференция «Ломоносов 2011»

Сейчас мы проводим эксперименты, которые могут детектировать эктопическую V(D)J рекомбинацию по выбранным cRSS, проверено уже около 10 пар cRSS.

Слова благодарности

Автор выражает благодарность Ю.В. Панчину, В.П. Ромашенко, А.В. Алексеевскому за помощь в работе. Поддержано грантами МКБ и ФЦП госконтракт П810.