

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ

УДК 577.213.3

О.В. Харченко

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка
вул. Остроградського, 2, Полтава, 36003, Україна
harchenko1957@rambler.ru

НЕСТАБІЛЬНІСТЬ МІКРОСАТЕЛІТІВ – МАТЕРІАЛ ДЛЯ ФОРМУВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ МАРКЕРІВ

Насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії факторів, які визначають їх композиційні, структурні та термодинамічні особливості. Мікросателіти можуть знаходитись у геномі скрізь, як у некодуючих, так і в кодуючих послідовностях, впливаючи на транскрипційну активність. Поліморфізм мікросателітів може бути виявлений через їх морфологічні характеристики.

Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії. Здатність повторів до експансії залежить від довжини мікросателітної послідовності. Співвідношення між мутаційними подіями, що призводять до збільшення мікросателітних послідовностей за рахунок додавання повтору, співвідносяться із кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів у мікросателітах людини, як 10:4.

Поліморфізм мікросателітів може визначатись їх локалізацією та орієнтацією в геномі. Вторинна структура ДНК розглядається сьогодні як причина експансії мікросателітних послідовностей. Сама вторинна структура ДНК є похідною термодинамічних характеристик її послідовності. Розрахунки термодинамічних характеристик повторюваних послідовностей дозволили розробити ряд модельних систем, оцінюючих здатність мікросателітних послідовностей впливати на модифікації ДНК, формуючи різні вторинні структури, пов'язані з нестабільністю мікросателітів.

*Маркери, що отримують у результаті полімеразної ланцюгової реакції (PCR), поділяють на дві групи: перша – відома як STSs (sequence-tagged sites) із праймерами, сконструйованими з відомих послідовностей, і друга – що базується на довільних праймерах. Найінформативніший або поліморфний STS-маркер з'являється тоді, коли ампліфікується ділянка ДНК, що вміщує послідовності мікросателітних повторів. Такий маркер базується на STS і позначений як *simpl-sequence length polymorphism (SSLP)*, або *sequence-tagged microsatellit site (STMS)*. Кожний STMS-маркер детектує успадковані кодомінантні алелі в одиночному локусі геному.*

Ключові слова: мікросателітні послідовності, мікросателітні експансії, помилки реплікації, нестабільність мікросателітів, маркери на основі PCR.

Робота є фрагментом НДР «Формування сучасних методів лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини» (№ держреєстрації 0110U002649).

В останні десятиліття класичні підходи швидко витісняються молекулярно-біологічними маркерами, які найбільш адекватно відповідають комплексу вимог щодо маркерів: високополіморфна природа, кодомінантний тип успадкування, широка представленість у геномі, доступні методики їх отримання, високий рівень відтворюваності, можливість обміну даними між лабораторіями [1].

Літературні дані свідчать, що нестабільність геному робить можливим накопичення у клітині мутацій, які призводять до появи гетерогенності клітинної популяції. Високий проліферативний потенціал таких клітин призводить до генералізації злоякісного процесу [10].

Злоякісна трансформація клітин, згідно сучасних уявлень, виникає при накопиченні незалежних мутацій і епігеномних змін, наслідком яких є порушення регуляції клітинного циклу, генетична нестабільність, зміни морфології і диференціювання клітин. Наслідком цього може бути поява нового фенотипу злоякісної клітини [2–5, 7–9].

Насиченість геномів тими чи іншими мікросателітними послідовностями є результатом дії багатьох факторів, серед яких одним із основних є рівень стабільності мікросателітної ДНК [9, 12].

Існує три класичних типи мікросателітних повторів:

1. Досконалий, без включень, наприклад: (CA)*n*.
2. Недосконалий, з одним або більшою кількістю включень, наприклад {(CA)*n*-ССА-(CA)*m*}.
3. Складовий, з прилеглими повторами іншої послідовності, наприклад {(CA)*n*(GT)*m*} [13].

Утворення мікросателітів може відбуватися двома шляхами. Одним із ресурсів еволюції простих повторів у еукаріот є poly(A)-треки [11].

Серед мікросателітних ДНК геномів ссавців poly(A)/(T) треки підвищують всі мікросателітні повтори за розповсюдженням. Характерною для них у геномі еукаріот є кластеризація із ретротранспозонами, що не мають довгих кінцевих послідовностей (LTRs). Poly(A)-треки знаходяться у 3'-кінцях таких мобільних елементів [14].

Друга потенційна можливість утворення мікросателітних послідовностей складається із реплікаційного подовження або скорочення протомікросателітів, які можуть утворюватися в геномі за рахунок мутаційних подій. Мікросателіти повинні мати мінімальну кількість повторів (3-5) для того, щоб було можливим змінити їх довжину за рахунок утворення петель при транскрипції. Такі події в геномі еукаріот мають високий рівень ймовірності. Процес подовження мікросателітів контролюється репараційною системою. В цілому кількість довгих мікросателітних повторів невелика і їх розповсюдженість широко варіює. Лише 12% всіх мікросателітів у геномі людини, наприклад, мають більше 40 нуклеотидів [15].

Крім цих двох шляхів утворення мікросателітних послідовностей, існує ще можливість трансформації однієї мікросателітної послідовності у складову, що містить дві послідовності з різними повторюваними мотивами. Мікросателіти можуть знаходитись у геномі скрізь, як у некодуючих, так і в кодуючих послідовностях, впливаючи на транскрипційну активність, викликаючи взаємодії типу білок-білок з утягуванням транскрипційних факторів [12].

Пошуки зручних та швидких можливостей візуалізації поліморфізму послідовностей ДНК в останні роки обумовили виникнення широкого спектру технік їх дослідження. Останні використовуються як поодиночі, так і в різних поєднаннях [12, 13].

З метою оцінки поліморфізму ДНК використовують різні типи ДНК-маркерів, які умовно можна розділити на 3 групи: рестрикційні маркери, гібридизаційні маркери та маркери, отримані на базі полімеразної ланцюгової реакції. В першому випадку візуалізуються фрагменти ДНК, отримані внаслідок рестрикції геномної ДНК різними ендонуклеазами, наприклад, метод RFLP та його модифікації. Для отримання гібридизаційних маркерів використовується метод гібридизації з міченими зондами, якими є ділянки ДНК з відомою послідовністю та походженням, наприклад, FISH-гібридизація або гібридизація на мембранах. Але рівень поліморфізму таких маркерів не завжди достатньо високий [11].

Маркери, отримання яких базується на проведенні полімеразної ланцюгової реакції (PCR), є продуктами ампліфікації *in vitro*. При цьому праймери можуть бути як сайт-специфічними, так і випадково підібраними. Ампліфікаційні фрагменти розділяють електрофоретично, і спектр продуктів ампліфікації візуалізується різними способами, такими, наприклад, як забарвлення або авторадіографія [14, 15].

PCR є універсальною технікою, яку активно використовують з середини 80-х років XX ст. Після виділення термостабільної Taq-полімерази в 1988 р. області використання методу надзвичайно розширились. Серед численних технік, заснованих на використанні PCR, арсенал яких має сучасна молекулярна генетика, таких як STS (sequence tagged sites), ASAPs (Allele specific associated primers), EST (Expressed sequence tag markers), SSCP (Single strand conformation polymorphism), RABD (Randomly-amplified polymorphic DNA markers), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), особливе місце займають маркери, що є фрагментами ДНК, розташованими між локусами інвертних повторів ДНК: ISSR (Inter simple sequence repeats), IRAP (Inter retrotransposon amplification products). Останні два класи маркерів відрізняються високим рівнем поліморфізму і відтворюваності, що забезпечує можливість міжлабораторних порівнянь. Перші є фрагментами геномної ДНК, що знаходяться між інвертними мікросателітними повторами, до яких підібраний один відповідний мікросателітний праймер, другі – фрагментами геномної ДНК, що знаходяться між інвертними специфічними послідовностями ретротранспозонів, до яких відповідно підібрані пара сайт-специфічних праймерів [16].

Використанню цих маркерів передують відкриття того факту, що еукаріотні геноми в середньому на 30-90% представлені високополіморфними повторюваними послідовностями. Такі регіони геному включають багато алелей, що відрізняються одна від одної за довжиною, нуклеотидною послідовністю, за тандемним або рівномірним

типом локалізації у геномі. Повторювана ДНК виконує своєрідну функцію по абсорбції мутацій у геномі. Високий рівень мутацій у повторюваній ДНК, її нейтральність по відношенню до діючих факторів, а також широка представленість в еукаріотних геномах робить її незамінною для отримання високополіморфних маркерів [17].

Для інтерпретації даних, отриманих із використанням цих класів маркерів, важливо пам'ятати, які генетичні події та механізми забезпечують рівень їх поліморфізму, тобто, що може привести до втрати або появи нових ампліфікаційних фрагментів у спектрах ампліфікації. Для обох класів маркерів присутність амплікона розцінюється як домінантний стан алелі даного локусу, відсутність ампліфікаційного фрагменту враховується відповідно як рецесивний алель локусу. Високий рівень поліморфізму обох типів маркерів, очевидно, є відображенням якостей у послідовностях повторюваних ДНК на базі яких ці маркери були отримані. Клас повторюваних послідовностей дуже гетерогенний. Умовно, виходячи з функціональних особливостей повторюваної ДНК, її можна представити у вигляді двох класів [17, 18]:

1. Клас функціональних послідовностей, до яких належать сімейства диспергованих за геномом і тандемно розташованих генних сімейств.

2. Клас повторюваних послідовностей із нез'ясованими функціями, до яких належать: а) транспозуючі послідовності, які поділяють у свою чергу на дисперговані – SINE (короткі) і LINE (довгі) повтори, б) тандемні повтори, що повторюються з різною частотою. До останніх належать повтори в центромерних гетерохроматинових регіонах, тіломерні послідовності, мікросателіти і мінісателіти.

Молекулярно-біологічний метод, що базується на ампліфікації шляхом ISSR-PCR ділянок ДНК зразків слизової оболонки шлунка, дозволив встановити, що останні вміщують послідовності мікросателітних повторів. При використанні одного ISSR-праймеру S2, який має структуру (AGC)₆G, можливо відразу аналізувати 8-16 локусів [19, 20].

Характер і закономірності розподілення у геномі тринуклеотидних мікросателітів привертають особливий інтерес завдяки тій ролі, яку вони відіграють у розвитку онкологічної трансформації [21].

Мікросателітна експансія – інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок. Цей феномен використовується у діагностиці передпухлинних і пухлинних змін клітин [22]. Здатність повторів до експансії також залежить від довжини мікросателітної послідовності. Наприклад, у людини сиквенс-аналіз дозволив з'ясувати, що таким мутаційним подіям піддаються гомогенні мікросателітні алелі з кількістю повторів, рівною або більшою за одинадцять [6]. Співвідношення між мутаційними подіями, що призводять до збільшення мікросателітних послідовностей за рахунок додавання повтору, співвідносяться з кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів у мікросателітах людини, як 10:4 [22].

Результати молекулярно-генетичних досліджень онкологічного матеріалу свідчать, що рак є патологією зі зміною геному. Відмінність пухлинної клітини від нормальної розглядають із трьох взаємозалежних позицій: геномної нестабільності; активації мутації в онкогенах; інактивації мутації в антионкогенах. Геномна нестабільність,

напевно, є визначальною, тому що створює нагромадження мутацій та формує мутаційний фенотип, останній призводить до порушення контролю реплікації ДНК, репарації, проліферації та апоптозу [2, 7–9].

Відносна насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії багатьох факторів, серед яких одним із основних є рівень стабільності мікросателітної ДНК, що визначається реплікаційними та репараційними процесами, мутаційними подіями та модифікацією ДНК [19].

Висновок. При злякисних новоутвореннях різного гістогенезу техніки ДНК-маркерів дозволяють своєчасно встановити діагноз та визначитися із адекватним методом лікування.

Рекомендує до друку О.В. Катрушов

Отримано 10.06.2016

Список використаної літератури:

1. Абрамов Д.Д. Точность метода полимеразной цепной реакции «в реальном времени» / Д.Д. Абрамов, Д.Ю. Трофимов, Д.В. Ребриков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – С. 485–488.
2. Вінник Ю.О. Мікросателітна нестабільність при спорадичному раку шлунка / Ю.О. Вінник, Т.М. Поповська, О.В. Мовчан, О.С. Котенко, В.С. Кульшин // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія «Медицина». – 2013. – Вип. 2 (47). – С. 22–26.
3. Марковський В.Д. Виявлення дисемінованих пухлинних клітин у периферичній крові у хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка / В.Д. Марковський, О.В. Харченко // Вісник морфології. – 2012. – Т. 18, №1. – С. 135–139.
4. Марковський В.Д. Комплексна патоморфологічна диференційна діагностика передпухлинних процесів і раку шлунка / В.Д. Марковський, О.В. Харченко // Патологія. – 2012. – № 3. – С. 15–18.
5. Пат. 76768 Україна А61В 10/00. Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка / О.В. Харченко, В.Д. Марковський, В.М. Балацький. – u 2012 09011; заявл. 23.07.2012.; опубл. 10.01.2013; Бюл. №1.
6. ПЦР «в реальном времени» / [Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.
7. Харченко О.В. Висока інформативність молекулярно-біологічних маркерів / О.В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини – 2014. – Вип. 3, т. 3 (112). – С. 11–16.
8. Харченко О.В. Мікросателітні експансії – молекулярно-біологічний феномен діагностики передпухлинних і пухлинних процесів / О.В. Харченко // Світ медицини і біології. – 2015. – № 2 (49). – С. 196–200.
9. Шемедюк Н.П. Мікросателітна нестабільність / Н.П. Шемедюк // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2015. – Т. 17, №1 (61), ч. 3. – С. 277–281.
10. Baldi P. Sequence analysis by additive scales: DNA structure for sequences and repeats lengths / P. Baldi, P.F. Baisnee // Bioinformatics. – 2000. – Vol. 16. – P. 865–889.
11. Bordoni A.A microarray platform for parallel detection of five transgenic events in foods: a combined polymerase chain reaction-ligation detection reaction-universal array method / A. Bordoni, A. Germini, A. Mezzelani, R. Marchelli, G. De Bellis // J Agric Food Chem. – 2005. – Vol. 53. – P. 912–918.

12. Brohede J. Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows / J. Brohede, A.P. Moller, H. Ellegren // *Mutat Res.* – 2004. – № 12. – P. 73–80.
13. Bull L. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features / L. Bull, C.R Pabon-Pena., N.B. Freimer // *Genome Res.* – 2000. – № 9. – P. 830–838.
14. Cleary J.D. Replication fork dynamics and dynamic mutations: the fork-shift model of repeat instability / J.D. Cleary, C.E. Pearson // *Trends Genet.* – 2005. – № 21. – P. 272–280.
15. Cowan C.A. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells / C.A. Cowan // *Science.* – 2005. – Vol. 309. – P. 1369–1373.
16. Hartenstine M.J. Base stacking and even/odd behavior of hairpin loops in DNA triplet repeat slippage and expansion with DNA polymerase / M.J. Hartenstine, M.F. Goodman, J. Petruska // *J Biol Chem.* – 2000. – № 24. – P. 18382–18390.
17. Hernandez M. Interlaboratory transfer of a PCR multiplex method for simultaneous detection of four genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25, and GA21 / M. Hernandez, D. Rodriguez-Lazaro, D. Zhang, T. Esteve, M. Pla, S. Plat // *Jagric Food Chem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 3333–3337.
18. Leontis N.B. The non-Watson–Crick base pairs and their associated isostericity matrices / N.B. Leontis, N. Stombaugh, J. Westhof // *Nucl. Acid. Res.* – 2002. – № 3. – P. 3497–3591.
19. Makova K.D. Evolution of microsatellite alleles in four species of mice Genus apodemus / K.D. Makova, A. Nekrutenko, R.J. Baker // *J Mol Evol.* – 2000. – № 51. – P. 166–172.
20. Scotti I. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences / I. Scotti, F. Magni, R. Fink, W. Powell, G. Binelli, P.E. Hedley // *Genome.* – 2000. – № 4. – P. 41–46.
21. Wren D.J. Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implication / D.J. Wren, E. Forgacs, J.W. Fondon, A. Pertsemelidis, S.Y. Cheng, T. Gallardo, R.S. Williams, R. Shohet, J.D. Minna, H.R. Garner // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – № 67. – P. 345–356.
22. Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length / X. Xu, M. Peng, Z. Fang // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 4, №4. – P. 396–399.

А.В. Харченко

Полтавский национальный педагогический университет имени В.Г. Короленко

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ – МАТЕРИАЛ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Насыщенность геномов микросателлитными последовательностями является результатом действия факторов, которые определяют их композиционные, структурные и термодинамические особенности. Микросателлиты могут находиться в геноме везде, как в некодирующих, так и в кодирующих последовательностях, влияя на транскрипционную активность. Полиморфизм микросателлитов может выявляться через их морфологические характеристики.

Интенсивное удлинение микросателлитных последовательностей за счёт репликационных ошибок называется микросателлитными экспансиями. Способность повторов к экспансии зависит от длины микросателлитной последовательности. Соотношение между мутационным влиянием, которое ведёт к увеличению микросателлитных последовательностей за счёт прибавления повтора, соотносится с количеством мутаций, которые приводят к уменьшению количества повторов в микросателлитах человека, как 10:4.

Полиморфизм микросателлитов может определяться их локализацией и ориентацией в геноме. Вторичная структура ДНК рассматривается сегодня как причина экспансии микросателлитных последовательностей. Сама вторичная структура ДНК является производной термодинамических характеристик её последовательности. Расчёты термодинамических

характеристик повторяющихся последовательностей позволили разработать ряд модельных систем, оценивающих способность микросателлитных последовательностей влиять на модификации ДНК, формируя различные вторичные структуры, связанные с нестабильностью микросателлитов.

Маркеры, которые получают в результате полимеразной цепной реакции (PCR), подразделяют на две группы: первая – известна как STSs (sequence-tagged sites) с праймерами, сконструированными из известных последовательностей, и другая – которая базируется на свободных праймерах. Наиболее информативный или полиморфный STS-маркер появляется тогда, когда амплифицируется участок ДНК, который содержит последовательности микросателлитных повторов. Такой маркер базируется на STS и отмечен как simple-sequence length polymorphism (SSLP) или sequence-tagged microsatellite site (STMS). Каждый STMS-маркер детектирует наследуемые кодоминантные аллели в единичном локусе генома.

Ключевые слова: микросателлитные последовательности, микросателлитные экспансии, ошибки репликации, нестабильность микросателлитов, маркеры на основе PCR.

O.V. Kharchenko

Poltava V.G. Korolenko National Pedagogical University

INSTABILITY OF MICROSATELLITES IS A MATERIAL FOR FORMING MOLECULAR-BIOLOGICAL DIAGNOSTIC MARKERS

Relative saturation of genomes with any microsatellite sequences is the result of influence of many factors, which all in all determine composite, structural and thermodynamic features of genomic microsatellite sequences. Polymorphism of microsatellites can be identified by their morphological characteristics.

Intensive extension of microsatellite sequences due to replication errors is called microsatellite expansion. The ability of repeats to expansion depends on the length of microsatellite sequence. The relations between mutative events, leading to expansion of microsatellite sequences due to addition of a repeat, correlates with number of mutations, which lead to reduction of repeats in human microsatellites, as 10:4.

Polymorphism of microsatellites can be identified by their localization and orientation in genome. The secondary structure of DNA is currently viewed as the cause of expansion of microsatellite sequences. The secondary structure of DNA itself is the derivative of thermodynamic characteristics of its sequence.

The secondary bulge-type structures in microsatellite sequences, identified by their thermodynamic characteristics, can initiate the phenomenon of expansion of microsatellite repeats. Calculations of thermodynamic characteristics of replicable sequences allow developing number of model systems, evaluating the ability of microsatellite sequences to influence the DNA modifications, forming various secondary structures, related to phenomenon of expansion of microsatellite repeats.

Types of markers, obtained as a result of PCR, are divided into two groups on the basis of primers' design: the first group is known as STSs (sequence-tagged sites) with primers, constructed from known sequences, and the second one is based on the random primers. The most informative or polymorphic STS-marker emerges during amplification of DNA-area, containing sequences of microsatellite repeats. This marker is based on STS, and is marked as simple-sequence length polymorphism (SSLP) or sequence-tagged microsatellite site (STMS). Each STMS-marker detects inherited codominant alleles in single locus of genome.

Key words: microsatellite sequences, microsatellite expansions, replication errors, microsatellite instability, PCR-based markers.