

## МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИЗМЕНЧИВОСТИ МИНИСАТЕЛЛИТНЫХ ДНК НА ПРИМЕРЕ UPS29 ЧЕЛОВЕКА

Молекулярные механизмы изменчивости некодирующих минисателлитных ДНК, а также их влияния на такие генетические процессы, как регуляция активности генов, альтернативный сплайсинг, рекомбинация, геномный импринтинг, в норме и при различных патологиях далеки от ясности. Существует ряд сложностей в работе с повторяющимися последовательностями: проскальзывание ДНК-полимеразы при амплифицировании, формирование различных вторичных структур ДНК, особенно в ГЦ-богатых районах. Разработка и совершенствование подходов и методов анализа структуры и функций некодирующих tandemно повторяющихся последовательностей ДНК, в частности минисателлитных локусов, является крайне актуальными. В настоящее время для изучения структуры и особенностей изменчивости повторяющихся последовательностей используются такие методы как: полимеразная цепная реакция (ПЦР) (в частности MVR-PCR), секвенирование, рестрикционный анализ, блоттинг по Саузерну, SSCP и гетеродуплексный анализ.

Целью данной работы являлось выявление и молекулярно-генетическая характеристика новых аллельных вариантов минисателлита UPS29 человека, расположенного во внутриинтронной области гена центаурин  $\beta 5$  (CENTB5), который экспрессируется в клетках нервной системы. Функция белка CENTB5 (NP\_085152.1) пока не известна, но есть данные, указывающие на возможное вовлечение центауринов в развитие нейродегенеративных процессов. В работе использовались такие методы как ПЦР, рестрикционный анализ и секвенирование.

Исследования минисателлита UPS29 человека проводились на образцах ДНК 171 человека, не состоящих в родстве и не страдающих какими-либо общими заболеваниями. Аллельные варианты UPS29 были определены с помощью ПЦР с использованием праймеров, непосредственно фланкирующих минисателлит. Продукты ПЦР амплификации разделяли с помощью нейтрального электрофореза в 6% полиакриламидном геле и окрашивали в 0.1%  $\text{AgNO}_3$ . Полученные ПЦР-фрагменты были секвенированы и проанализированы с помощью BLAST и Tandem repeats finder program. Определение размеров ПЦР амплифицированных фрагментов ДНК осуществляли по внешним стандартам ДНК. Кроме того, был проведен рестрикционный анализ ПЦР-продуктов 86 человек с помощью эндонуклеазы рестрикции MspI, в результате которого были выявлены однонуклеотидные замены и вставки в повторах.

В исследованной выборке были обнаружены семь аллелей UPS29, различающихся по числу повторяющихся единиц. Мажорными оказались аллели, содержащие по 17 повторов ( $91.52 \pm 1.51$  %), тогда как частота остальных (преимущественно коротких) варьировала от 0,3% до 4,4%. В ходе дополнительного анализа образцов ДНК 66 волонтеров из 27 семей было обнаружено, что короткие аллели наследуются. Результаты секвенирования и рестрикционного анализа дали основание сделать вывод о том, что короткие аллели UPS29 образуются из-за делеций нескольких повторов внутри исследуемой минисателлитной ДНК или одновременной делеции и перестроек повторяющихся единиц, приводящих к появлению «гибридных» повторов. Несколько аллелей с эквивалентным числом повторов отличались по комбинации повторяющихся мотивов и нуклеотидному составу ДНК, фланкирующей UPS29. Изменения ДНК, фланкирующей минисателлит, заключались в делециях различной длины или однонуклеотидных заменах и/или вставках, которые преимущественно затрагивали 3'-фланкирующую ДНК.

Несмотря на наличие сайтов образования вторичных структур и горячих точек рекомбинации, данный минисателлит можно считать стабильным. Возможно, существуют некоторые факторы, в норме ингибирующие его потенциальную нестабильность. Изменение длины и/или внутренней структуры минисателлита UPS29 может негативно сказываться на функционировании гена CENTB5, и, следовательно, коррелировать с возникновением или прогрессированием патологических процессов.

Таким образом, благодаря современным методам молекулярно-генетического анализа последовательностей ДНК, таким как ПЦР, рестрикционный анализ и секвенирование в сочетании с компьютерным анализом, были выявлены выше перечисленные особенности нуклеотидной последовательности и изменчивости минисателлита UPS29, его генотипическое и аллельное разнообразие в выборке жителей Санкт-Петербурга.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК – 2840.2007.7