

## 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.