

Разработка метода тестирования деметилирующей активности

Громенко Елена Владимировна

студент

Кубарева Елена Александровна

в.н.с., к.х.н.

Романова Елена Александровна

с.н.с., к.х.н.

Шпанченко Ольга Валерьевна

с.н.с., к.х.н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: lenagromenko@yandex.ru

Известно, что ДНК у высших эукариот и многих прокариот метилирована. Метилирование – это многостадийный процесс, в ходе которого в результате волн метилирования и деметилирования, протекающих в эмбриогенезе, достигается характерный для данного вида клеток паттерн метилирования ДНК, который затем поддерживается неизменным при делении клеток взрослого организма. У млекопитающих известно только одно метилированное азотистое основание – 5-метилцитозин.

Метилирование влияет на ДНК-белковые взаимодействия, благодаря чему принимает участие в структурной и функциональной организации генома. Оно вовлечено в такие фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки, как регуляция экспрессии генов (участие в процессе инактивации X-хромосомы у самок и поддержание моноаллельной экспрессии генов при импринтинге) и поддержание целостности генома (участие в регуляции рекомбинационного процесса и защита генома от инвазии и распространения чужеродной информации). Известно, что во всех неопластических клетках наблюдается дисбаланс метилирования. Он выражается в широко распространенном по геному деметилировании нормально метилированных участков и локальном метилировании неметилированных.

На сегодняшний день подробно изучены механизмы метилирования, а также выделены ферменты, участвующие в этом процессе. Однако о механизме и ферментах деметилирования достоверной информации нет вследствие трудности определения деметилирующей активности.

Целью нашей работы являлась разработка метода детекции деметилирующей активности. На первом этапе мы спроектировали и синтезировали два комплементарных друг другу олигодезоксирибонуклеотида, содержащих в определенных положениях остатки 5-метил-2'-дезоксцитидина. Для защиты от эндонуклеаз, содержащихся в лизатах клеток, дуплекс, сформированный данными олигодезоксирибонуклеотидами, имел выступающие 3'-концы. Кроме того, один из олигодезоксирибонуклеотидов имел участок, комплементарный праймеру, который использовали в дальнейшем анализе.

Для контрольных экспериментов были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды с такой же последовательностью, содержащие неметилированные остатки dC.

Сформированные метилированный и контрольный дуплексы обрабатывали бисульфитом натрия. При этом происходило превращение dC в dU, за которым следили при помощи метода удлинения праймера.

Изменение длины продукта реакции удлинения праймера в присутствии ddA и ddG позволяет судить о конверсии dC в dU.