

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

© Харченко О. В.

УДК 616 – 006. 6 : 577. 2

Харченко О. В.

## ВИСОКА ІНФОРМАТИВНІСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ

Полтавський національний педагогічний університет

ім. В. Г. Короленка (м. Полтава)

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини» (№ держреєстрації 0110U002649).

Відносна насиченість геномів тими чи іншими мікросателітними послідовностями є результатом дії багатьох факторів, серед яких одним з основних є рівень стабільності мікросателітної ДНК, що визначається реплікаційними та репараційними процесами, мутаційними подіями, модифікацією ДНК, одиничними нуклеотидними замінами, що змінюють конфірмаційні тенденції, які в сумі визначають композиційні, структурні та термодинамічні особливості геномних мікросателітних послідовностей [2].

Існує три класичних типи мікросателітних повторів:

1. Досконалий, без включень, наприклад: (CA)<sub>n</sub>.
2. Недосконалий, з одним або більшою кількістю включень, наприклад{(CA)<sub>n</sub>-ССА-(CA)<sub>m</sub>}
3. Складовий, з прилеглими повторами іншої послідовності, наприклад {(CA)<sub>n</sub>(GT)<sub>m</sub>} [12].

Утворення мікросателітів може відбуватися двома шляхами. Одним з ресурсів еволюції простих повторів у еукаріот є poly (A)-треки [13].

Серед мікросателітних ДНК геномів ссавців poly(A)/(T) треки підвищують всі мікросателітні повтори за розповсюдженням [4]. Характерною для них в геномі еукаріот є кластеризація з ретротранспозонами, що не мають довгих кінцевих послідовностей (LTRs). Poly (A)-треки знаходяться в 3'кінцях таких мобільних елементів[18].

Друга потенційна можливість утворення мікросателітних послідовностей складається з реплікаційного подовження або скорочення протомікросателітів, які можуть утворюватися в геномі за рахунок мутаційних подій. Такі 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 в геномі людини, наприклад, мають більше 40 нуклеотидів[24].

Крім цих двох шляхів утворення мікросателітних послідовностей існує ще можливість трансформації однієї мікросателітної послідовності в складову, що складається з двох послідовностей з різними повторюваними мотивами. Це може відбутися за рахунок мутації в одному з повторів і його тиражування за рахунок реплікаційних помилок [7]. Мікросателіти можуть знаходитись в геномі скрізь, як в некодуючих [11], так і в кодуючих послідовностях, впливаючи на транскрипційну активність викликаючи взаємодії типу білок-білок з утягуванням транскрипційних факторів. Значна фракція мікросателітних послідовностей є частиною мобільних елементів [28].

Щільність розподілення мікросателітних повторів в еукаріотних геномах широко варіює. Відомо також, що на аутосомах щільність мікросателітів значно вище, ніж на X- хромосомі. Але в самій X-хромосомі відмічається висока гетерогенність по щільності мікросателітів в її різних регіонах. Рівень поліморфізму мікросателітних послідовностей в X-хромосомі в порівнянні з аутосомами також набагато нижче. Менша варіабельність мікросателітів на X-хромосомі пояснюється різницею в часі дозрівання статевих та соматичних клітин [13].

Щодо біологічного значення мікросателітної ДНК то її роль на сьогодні не зовсім вияснена. Без сумніву участь мікросателітних послідовностей в рекомбінаційних подіях. «Гарячі» сайти рекомбінації часто бувають локалізованими в областях міні- і мікросателітних повторів. Для мікросателітних послідовностей, в основному для дінуклеотидних, показана здатність утворювати зв'язки з рекомбінаційними білками, такими, наприклад, як RecA, який відіграє центральну роль в рекомбінаційних подіях. В присутності АТР, сRecA утворює однострону ДНК або пробіл в дуплексі, який і є місцем спарювання між гомологічними послідовностями. При деяких умовах дінуклеотидні повтори (AC/TG) здатні

утворювати лівозакручену спіраль ДНК, це сприяє утворенню пробілів, з послідуною рекомбінацією. Серед хромосом частота як довгих, так і коротких мікросателітних кластерів виявляє частоту кросоверів. А-багатим послідовностям, приписують вплив на високий рівень структурної організації хроматину [3].

Поліморфізм мікросателітів може бути виявлений їх морфологічними характеристиками. Різниця в ступені поліморфізму між різними мікросателітами може залежати в першу чергу від довжини самої мікросателітної послідовності, від кількості нуклеотидів в одиниці повтору і від гомогенності мікросателітної послідовності [30].

Більшість мікросателітних мутацій пов'язані з інсерціями або делеціями деяких повторів, що відбуваються під час реплікації. Таке порушення стабільності мікросателітів частіше всього відбувається завдяки утворенню петель на ДНК під час реплікації («slippage») [10].

Рівень частоти транскрипційного петлеутворення варіює. Залежність між кількістю таких мутацій та розмірами мікросателітної ДНК має прямо пропорційний характер, а для чотирихнуклеотидних повторів – експоненціальний [31].

Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії. Здатність повторів до експансії також залежить від довжини мікросателітної послідовності. Наприклад, у людини сиквенс-аналіз дозволив вияснити, що таким мутаційним подіям придатні гомогенні мікросателітні алелі з кількістю повторів рівним або більшим одинадцяти. Співвідношення між мутаційними подіями, що призводять до збільшення мікросателітних послідовностей за рахунок додавання повтору, співвідносяться з кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів в мікросателітах людини як 10:4 [5].

В деяких мікросателітних повторах помилки реплікації переважно пов'язані з 3'-кінцем: (GA) $n$  і (CA) $n$ , у інших з 5'-кінцем – (CG) $n$  і (CT) $n$  [21], що свідчить про вплив на процес виникнення реплікативних помилок мотиву повторюваних послідовностей. В тринуклеотидних GC-багатих повторах проксимальний по відношенню до напрямку реплікації 3'-кінець має позитивний вплив на частоту реплікативних помилок, тому що кожного раунду реплікації на ньому утворюється петля. Не дивлячись на те, що петля на 3'-кінці виникає під час кожного реплікативного туру, в 99% ця помилка корегується системою репарації. Зміна довжини мікросателітної послідовності відбувається одного разу на 100 реплікацій. Не дивлячись на високий рівень мутабельності мікросателітної ДНК, більша частина виявлених в ній мутацій пов'язана з соматичними клітинами [19].

Серед тринуклеотидних повторів максимально ці властивості мають прояви також GC-багатими повторами, такими як (CAG) $n$ , (CTG) $n$ , (GGC) $n$  і (GCC) $n$ . Характер і закономірності розподілення в геномі цих трьохнуклеотидних мікросателітів має особливий

інтерес завдяки тій ролі, яку вони грають в розвитку онкологічних захворювань. На теперішній час це найбільш вивчені мікросателітні послідовності. Вони відносяться до числа найбільш представлених в кодуючих регіонах геному людини [6].

З розвитком деяких пухлинних захворювань пов'язана нестабільність також і дінуклеотидних мікросателітів [23, 27]. Реплікативні помилки в дінуклеотидних повторах частіше бувають пов'язаними з делеціями, які призводять до зсуву рамки зчитування [15].

Вивчення механізмів, що призводять до мутаційних подій в мікросателітних послідовностях, показали, що в основі цих подій, як в нормальних, так і в ракових клітинах лежать одні й ті самі механізми [25].

Кількість точкових мутацій підтверджується в мікросателітній ДНК на одному рівні, незалежно від її характеристик. Але в самих мікросателітах є зони, де такі мутації виникають частіше. Існує три механізми, що продукують в цих послідовностях мутації: інсерція, делеція, заміна і порушення повторюваного мотиву [17].

Поліморфізм мікросателітів може визначатись їх локалізацією та орієнтацією в геномі. Як вже було відмічено раніше, є суттєва різниця в частоті знайдення мікросателітів з різними повторними мотивами в кодуючих та не кодуючих послідовностях геному. При цьому поліморфізм тандемних повторів в генах зустрічається набагато частіше, ніж в цілому по геному. Поліморфізм приблизно 8% цих локусів в середині кодуючих регіонів, призводить до зсуву рамки зчитування. Значна частина транскрибованих послідовностей, що мають такі поліморфні повтори, пов'язана з фенотипічними проявами, а також з локусами, що відповідають за проявлення генетичних захворювань. Аналіз розподілення мікросателітних послідовностей свідчить про те, що їх орієнтація по відношенню до кодуючих регіонів є високо консервативною [22].

На поліморфізм мікросателітів впливають їх термодинамічні характеристики. Вторинна структура ДНК розглядається сьогодні як причина експансії мікросателітних послідовностей. Сама вторинна структура ДНК є похідною термодинамічних характеристик її послідовності [8].

Деякими роботами, було показано, що структура і властивості будь-якої послідовності ДНК, залежать не тільки від компліментарних взаємодій послідовності нуклеотидних основ, але і в значній мірі від взаємодії з ближніми парами сусідніх основ. Загальні зміни енергії в ДНК-дуплеках залежать від двох типів взаємодій основ нуклеїнових кислот: копланарних взаємодій або взаємодій в одній площині (водневий зв'язки) і купкових взаємодій або взаємодій в паралельних площинах (електростатичні, вандервальсові та конфірмаційні взаємодії). Цей принцип названий моделлю «найближчих сусідів». Значна кількість донорів і акцепторів водневого зв'язку атомів основ та рибози допускає велику кількість конфігурацій пар основ, що взаємодіють декількома водневими зв'язками. При цьому максимальна кількість

конфігурацій для всіх можливих пар основ (A,G,C,T) складає 216 [16].

Енергії утворення кожного з можливих дідуплексів були виявлені емпірично з використанням методів абсорбційної калориметрії і спектрофотометричних методів [26].

Як вже було сказано вище, вторинні структури типу петель в мікросателітних послідовностях, виявлені їх термодинамічними характеристиками, можуть ініціювати явище експансії мікросателітних повторів. Показано, що, чим стабільніші такі петлі, тим нижче ризик утворення нових мікросателітних повторів. Наприклад, послідовності тридуплексів CAG/CTG і GAC/GTC мають рівну кількість водневих зв'язків, але розрізняються силою купкових взаємодій. Цього є достатньо, щоб зробити перший з них більш вразливим для експансії мікросателітних повторів. Стабільність петлі збільшується в напрямку: GTC < CAG < GAC < CTG, навпаки частота утворення нових повторів зменшується в тому ж напрямку: GTC > CAG > GAC > CTG [12].

Розрахунки термодинамічних характеристик повторюваних послідовностей дозволили також зробити ряд модельних систем, оцінюючих здатність мікросателітних послідовностей впливати на модифікації ДНК, формуючи різні вторинні структури, пов'язані з явищем експансії мікросателітних повторів, а також з асоціацією мікросателітних послідовностей з протеїн-пов'язаними і регуляторними сайтами [2, 20].

У зв'язку з цим, кроком вперед в епігенетичних дослідженнях, був факт виявлення здібності тандемних повторів впливати на модифікації ДНК і

провокувати перетворення неактивних станів генів [29].

Є й інші фактори, що впливають на поліморфізм мікросателітних послідовностей. В чоловічих генеративних клітинах частота мутацій в мікросателітних послідовностях вдвічі вище, ніж в жіночих репродуктивних клітинах, що, ймовірно, пояснюється різницею в кількості клітинних поділів при дозріванні жіночих і чоловічих репродуктивних клітин. Це важливий етап на якому відбувається мутаційне змінена в мікросателітній послідовності [9].

На рівень мутацій мікросателітних послідовностей крім статі впливає і вік, між тим, з віком кількість мутацій в мікросателітних повторах збільшується [8].

Типи маркерів, що отримують в результаті PCR, поділені на дві групи на базі дизайну праймерів: перша група відома як STSs (sequence-tagged sites) з праймерами, сконструйованими з відомих послідовностей, і друга – що базується на довільних праймерах. Праймери для STS-підходу отримують із картированих малокопійних послідовностей (із ПДРФ-клонів). STS – це короткі, унікальні послідовності, ампліфіковані шляхом PCR для ідентифікації відомих регіонів на хромосомі. Найінформативніший або поліморфний STS-маркер з'являється тоді, коли ампліфікується дільниця ДНК, що вміщує послідовності мікросателітних повторів. Такий маркер, базується на STS, і позначений як simpl-sequence length polymorphism (SSLP) або sequence-tagged microsatellite site (STMS). Кожен STMS-маркер детектує успадковані по Менделю кододомінантні алелі в одиничному локусі в геномі [1].

### Література

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. 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.
3. Barros R. Pathophysiology of intestinal metaplasia of the stomach: emphasis on CDX2 regulation / R. Barros, V. Camilo, B. Pereira // Biochem. Soc. Trans. – 2010. – Vol. 38, № 2. – P. 358 – 363.
4. 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.
5. Bruford M. W. Microsatellites and the application to conservation genetics / M. W. Bruford, D. J. Cheesman, T. Coote, A. A. Green, A. Haines // in Molecular Genetic Approaches in Conservation. – edited by T. Smith and RK Wayne. – Oxford University Press. – New York. – 1996. – P. 278 – 297.
6. Buldyrev S. V. Expansion of tandem repeats and oligomer, clustering in coding and noncoding DNA, sequences / S. V. Buldyrev, N. V. Dokholyan, S. Havlin, H. E. Stanley, H. R. Stanley // Physica. – 1999. – № 273. – P. 19 – 32.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Freimer N. B. Microsatellites: evolution and mutational process / N. B. Freimer, M. Slatkin // Ciba Found Symp. – 1996. – № 197. – P. 51 – 67.
11. Hancock J. M. A role for selection in regulating the evolutionary emergence of disease-causing and other coding CAG repeats in humans and mice / J. M. Hancock, E. A. Worthey, M. F. Santibanez-Koref // Mol. Biol. Evol. – 2001. – Vol. 18, № 6. – P. 1014 – 1023.
12. 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.
13. Jarne P. Microsatellites, transposable elements and the X chromosomes / P. Jarne, P. David, F. Viard // Mol. Biol. Evol. – 1998. – № 15. – P. 28 – 34.

14. Karthikeyan G. Fold-back structures at the distal end influence DNA slippage at the proximal end during mononucleotide repeat expansions / G. Karthikeyan, K. V. Chary, B. J. Rao // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – № 19. – P. 3851 – 3858.
15. 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.
16. 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.
17. Nadir E. Microsatellite spreading in the human genome: Evolutionary mechanisms and structural implications / E. Nadir, H. Margalit, T. Gallily, V. Ben-Sasson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – № 93. – P. 6470 – 6475.
18. Pearson C. E. Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA / C. E. Pearson, R. R. Sinden // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – № 3. – P. 321-330. Review.
19. Ponomarenko M. H. Identification of sequence –dependent DNA sites interacting with proteins / M. H. Ponomarenko, J. V. Ponomarenko, A. S. Frolov [et al.] // *Bioinformatics.* – 1999. – № 15. – P. 687.
20. Primmer C. R. Directional evolution in germline microsatellite mutations / C. R. Primmer, H. Ellergen, N. Saino, A. P. Moler // *Nature Genet.* – 1996. – № 13. – P. 391 – 393.
21. Scotti I. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences / I. Scotti, F. Magni, R. Fink [et al.] // *Genome.* – 2000. – № 4. – P. 41 – 46.
22. Stallings R. L. Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: implication for human genetic diseases / R. L. Stallings // *Genomic.* – 1994. – № 21. – P. 116-21.
23. Stephan W. Possible role of natural selection in the formation of tandemrepetitive noncoding DNA / W. Stephan W., S. Cho // *Genetics.* – 1994. – № 136. – P. 333 – 341.
24. Sturzeneker R. Polarity of mutations in tumor-associated microsatellite instability / R. Sturzeneker, L. A. Haddad, R. A. Bevilacqua, A. J. Simpson, S. D. Pena // *Hum Genet.* – 1998. – № 102. – P. 231-235.
25. Sugimoto N. Application of the thermodynamic parameters of DNA stability prediction to double-helix formation of deoxyribonucleotides / N. Sugimoto, K. Honda, M. Sasaki // *Nucleosides & Nucleotides.* – 1999. – № 13. – P. 1311 – 1317.
26. Thibodeau S. N. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon / S. N. Thibodeau, G. Bren, D. Schaid // *Scienc.* – 1999. – № 260. – P/ 816 – 819.
27. van Lith H. A. Characterisation of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database / H. A. van Lith, L. F. van Zutphen // *Anim Genet.* – 1996. – № 27. – P. 387 – 395.
28. Wolffe A. P. Epigenetics: Regulation Through Repression / A. P. Wolffe, M. A. Matzke // *Science.* – 1999. – № 286. – P. 481 – 486.
29. Wren D. J. Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implication / D. J. Wren, E. Forgacs, J. W. Fondon [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – № 67. – P. 345 – 356.
30. 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.

УДК 616 – 006. 6 : 577. 2

### ВИСОКА ІНФОРМАТИВНІСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ

Харченко О. В.

**Резюме.** Насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії факторів, які визначають їх композиційні, структурні та термодинамічні особливості. Мікросателіти можуть знаходитись в геномі скрізь, як в некодуючих, так і в кодуючих послідовностях, впливаючи на транскрипційну активність. Поліморфізм мікросателітів може бути виявлений їх морфологічними характеристиками. 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 з кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів в 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.

Існує дві групи маркерів, що отримують в результаті PCR: перша – відома як STSs (sequence-tagged sites) з 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 по Менделю кодомінантні алелі в одиничному локусі в геномі.

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

УДК 616 – 006. 6 : 577. 2

### **ВЫСОКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ**

**Харченко А. В.**

**Резюме.** Насыщенность геномов микросателлитными последовательностями являются 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 их морфологическими характеристиками. 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 разные вторичные структуры, связанные с нестабильностью микросателлитов.

Существует две группы маркеров, которые получают в результате PCR: 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 simpl-sequence length polymorphism (SSLP) или sequence-tagged microsatellite site (STMS). Каждый STMS-маркер детектирует унаследованные по Менделю кодоминантные алели в единичном локусе в геноме.

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

UDC 616 – 006. 6 : 577. 2

### **High Informativeness of Molecular-Biological Markers**

**Kharchenko A. V.**

**Abstract.** Relative saturation of genomes with any mictosatellite sequences is the result of influence of many factors, which all in all determine composite, structural and thermodynamic features of genomic mictosatellite sequences.

Mictosatellites may be formed in two ways. One of the resources of evolution of simple repeats in eukaryotes is poly (A)-tracks. The latter are located at the 3' ends of such mobile elements.

The second potential possibility of formation of mictosatellite sequences consists in replicative extension or shortening of protomictosatellites, which can be formed in the genome due to mutative events. Such mictosatellites must have minimal number of repeats (3-5) to change its length due to formation of bulges during the transcription. Generally, the number of long mictosatellite repeats is not big. Only 12% of all mictosatellites in human genome, for example, have more than 40 nucleotides.

But there is a possibility of transformation of single mictosatellite repeat into composite one, consisting of two sequences with different replicable motives. This may occur due to mutations in one of the repeats and its duplication due to replication errors. Mictosatellites can be presented in the genome everywhere, both in noncoding and coding sequences, affecting transcriptional activity.

Polymorphism of mictosatellites can be identified by their morphological characteristics. The difference in the degree of polymorphism between various mictosatellites may depend first on the length of mictosatellite sequence itself.

The majority of mictosatellite mutations are associated with insertions or deletions of specific repeats, emerging during replication. Such disorder of stability of mictosatellites more often occurs due to formation of bulges on DNA during replication ("slippage").

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

In some of mictosatellite repeats the replication errors are mostly associated with 3'-end: (GA)<sub>n</sub> and (CA)<sub>n</sub>, and in another ones with 5'-end – (CG)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub>. In trinucleotide GC-multiple repeats the proximal 3'-end, relative to the direction of replication, has positive impact on the frequency of replicative error. Despite the fact that a bulge at the 3'-end originates during each replicative tour, this error 99% is corrected by the system of reparation. Change in length of mictosatellite sequence is occurred once per 100 replications.

Among trinucleotide repeats these properties are ultimately presented by GC-multiple repeats, too, such as (CAG)<sub>n</sub>, (CTG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> and (GCC)<sub>n</sub>. The pattern and regularities of distribution of these trinucleotide microsatellites in the genome is of special interest due to the role they play in the development of oncologic diseases. Currently, they are the most examined mictosatellite sequences. They are assigned to the number of most expressed in the coding regions of human genome.

Likewise, instability of dinucleotide mictosatellites is connected with development of certain oncologic disease. Replicative errors in dinucleotide repeats are more often related to deletions, which lead to reading frame shifting.

Study of the mechanisms, which lead to mutative events in mictosatellite sequences, showed that these events, both in normal and malignant cells, are based on the same mechanisms.

Number of point mutations is confirmed in the mictosatellite DNA at one level, regardless of its characteristics. But in mictosatellites themselves, there are zones where such mutations emerge more often. There are three mechanisms, producing mutations in these sequences: insertion, deletion, replacement and disorder of replicable motive.

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

The secondary bulge-type structures in mictosatellite sequences, identified by their thermodynamic characteristics, can initiate the phenomenon of expansion of mictosatellite repeats. The more stable these bulges, the lower is the risk of formation of new mictosatellite repeats. CAG/CTG and GAC/GTC- triduplex sequences have equal number of hydrogen couplings, but are distinguished by the strength of dense relationships. This is enough to make the first of them more vulnerable for expansion of mictosatellite repeats. Stability of bulge increases in the following direction: GTC < CAG < GAC < CTG, on the contrary, the frequency of formation of new repeats decreases in the similar direction: GTC > CAG > GAC > CTG.

Calculations of thermodynamic characteristics of replicable sequences allow developing number of model systems, evaluating the ability of mictosatellite sequences to influence the DNA modifications, forming various secondary structures, related to phenomenon of expansion of mictosatellite 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 mictosatellite 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 Mendelian codominant alleles in single locus in genome.

**Keywords:** mictosatellite sequences, mictosatellite expansions, replication errors, mictosatellite instability, PCR-based markers.

*Рецензент – проф. Цебржинський О. І.*

*Стаття надійшла 10. 05. 2014 р.*