

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ИЗМЕРЕНИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР

Новикова П.Ю., Смирнова Н.В., Михельсон В.М.

Санкт-Петербург, Институт Цитологии РАН, polina_novik@mail.ru

Теломеры – это концевые участки хромосом, состоящие из повторяющейся последовательности ДНК и комплекса белков, которые формируют петлевую структуру хроматина в данной области. В связи с проблемой недорепликации хромосом, теломеры укорачиваются при каждом делении клетки. В клетках, способных делиться неограниченно – эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), герминативных клетках и в большинстве раковых клеток - активно экспрессируется фермент, который достраивает теломеры при репликации – теломеразы. В процессе дифференцировки ЭСК активность теломеразы утрачивается, поэтому уже даже зрелые стволовые клетки, например, мезенхимные, делятся ограниченное число раз. Длина теломер и её динамика косвенно отражают пролиферативный потенциал клеток, то есть количество делений, которые ещё способна претерпеть клетка.

Существует несколько методик измерения длины теломер. Наиболее ранним из них является метод Southern blot, при котором выделенная ДНК из клеток обрабатывается мелко щепящими рестриктазами HinfI и RsaI. Так как в теломерной области отсутствуют сайты рестрикции данных ферментов, то длина наиболее крупных участков ДНК после обработки - terminal restriction fragments (TRFs) - считается длиной теломер. Однако известно, что в состав TRF входят не только теломерная, но и субтеломерная область. В связи с этим, описанная в литературе разница в средней длине теломер, измеренных методом Southern blot и методами, в которых используются зонды, комплементарные теломерной последовательности (TTAGGG)_n, например, Q-FISH и flow-FISH, составляет примерно 3-5 т.п.н. для клеток из сходных источников.

Целью данного исследования было выяснить, чем обусловлена такая разница между описанными методами: отсутствием сайтов рестрикции в области находящейся ближе, чем 3-5 т.п.н к теломерной последовательности или невозможностью расщепить ДНК в данной области.

Для проверки данного предположения из базы NCBI были взяты концевые последовательности длиной примерно 15 т.п.н. первой хромосомы человека. Оказалось, что минимальное расстояние от конца теломерной последовательности до первого сайта рестрикции HinfI (G[^]ANTC\CTNA[^]G) или RsaI (GT[^]AC\CA[^]TG) составляет: 15 пар оснований на p-плече хромосомы и 25 на q-плече, что существенно меньше описанной экспериментально разницы между методами измерения 3-5 т.п.н.

Таким образом, предполагается, что разница в значении средней длины теломер между методами Southern blot и flow-FISH обусловлена не отсутствием сайтов рестрикции в области, прилегающей к теломерной последовательности, а невозможностью проведения рестрикции, что может быть связано со сложной эпигенетической структурой теломерной и субтеломерной области.