



УДК 575.313

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ 14 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА, ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С ЯДЕРНЫМ МАТРИКСОМ

© 1997 г. С. Б. Акопов<sup>#</sup>, Л. Г. Николаев, О. Ю. Тырсин, А. С. Рузов, Е. Д. СвердловИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 30.01.97 г. После доработки 13.03.97 г.

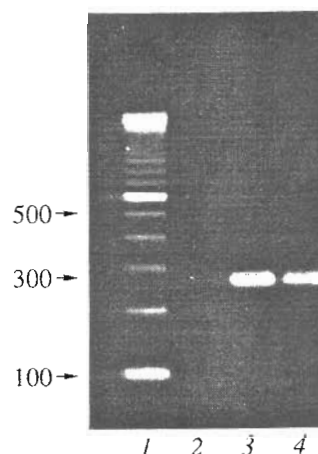
Из библиотеки последовательностей, предпочтительно связывающихся с ядерным матриксом (matrix attachment regions, или MARs), были выделены, секвенированы и охарактеризованы 15 клонов, принадлежащих геному китайского хомячка. 14 из 15 последовательностей (>90%) связывались с ядерным матриксом *in vitro* в 2.5–60 раз сильнее, чем не содержащие MARs контрольные фрагменты ДНК. Один из клонов обладал существенной гомологией с областью ORF1 LINE-повтора мыши. MARs, находящиеся в составе LINE-повтора, при распространении его по геному в процессе эволюции могут быть причиной крупномасштабных изменений активности отдельных генов и транскрипционного статуса целых доменов хроматина.

*Ключевые слова:* ядерный матрикс, MAR (matrix attachment region), LINE-повтор.

Ядерный матрикс является основным ультраструктурным компонентом клеточного ядра [1, 2]. Выполняя роль механического каркаса, ядерный матрикс обеспечивает также высший порядок организации хроматина, инициацию и регуляцию репликации, транскрипцию и транспорт РНК (см. недавние обзоры [2–4]). В геноме эукариот имеются последовательности, избирательно связывающиеся с ядерным матриксом с высоким сродством (matrix attachment regions, или MARs) (см. обзоры [5, 6]). Биологическое значение этих последовательностей весьма велико и включает как структурные (организация и перестройки хроматинных петель в интерфазном ядре), так и функциональные (участие в образовании репликативных комплексов и фиксации транскрипционно активных генов вблизи ядерной мембраны) аспекты [5, 6]. Исследование механизмов взаимодействия MARs с ядерным матриксом может помочь в выяснении их функциональной роли.

Ранее нами была сконструирована библиотека клонов, содержащих участки узнавания ядерного матрикса хромосомы 19 человека [7, 8]. Источником фрагментов ДНК для ее получения служила библиотека последовательностей хромосомы 19 человека в  $\lambda$ -векторе Charon 40, пре-

доставленная Ливерморской национальной лабораторией (США). Для конструирования библиотеки была использована гибридная линия клеток китайского хомячка, содержащая хромосому 19 человека (линия UV5HL9-5B) [9]. Вследствие несовершенства сортировки хромосом методом проточной цитофлуорометрии [9] часть клонов библиотеки содержала участки генома китайского



**Рис. 1.** Определение видовой специфичности последовательности при помощи ПЦП (на примере клона M0A10). Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов ПЦП, полученных на ДНК-матрице из плаценты человека (2), из гибридной линии человек – китайский хомячок UV5HL9-5B (3) и из линии клеток CHO китайского хомячка (4). 1 – 100 п. о.-маркер (GIBCO-BRL).

Сокращения: MAR (matrix attachment region) – последовательность ДНК, связывающаяся с ядерным матриксом; LINE (long interspersed element) – длинный рассеянный повторяющийся элемент; ORF (open reading frame) – открытая рамка считывания.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

**Таблица 1.** Праймеры для определения видовой специфичности MAR-содержащих клонов с помощью ПЦР

Название клона	Структура праймеров 5' → 3'	Длина ПЦР-фрагмента, п. о.
M0A2	ACGTGTGCCACATTCCT ACACTGAGTCCAGATCTCTGCA	175
M0A4	GGACACAGATTGGGGCTG TCTTATAGCACATGGTGG	175
M0A10	AGGCCTAGTGGGCGAGTAAT CACACCCCTTCTTTCTCTAA	255
M0B5	ACTGTTCTTGTGATTGCCCC ATTTGGCCCCATCTTTCTG	299
M0B8	ATTTGGCCCCATCTTTCTG TCCTCACATAACAGACTGGTGG	291
M0B9	CTGCGCTTAGAGGAATTTGG CTGTATGGAGGAGCAAAAGAGA	194
M1F1	TTTGGTGTTCCTAAAAGCAT CATTGTCCTCTGTCTCCTGT	144
M1G12	TCAAAGCTGAAACTCATCAA AGAAGAGAACGAGAGGGAAG	120
M1H8	GAAGTAATGGGAACCAGGA ATTTGGTCTTATCACCCAGC	189
M2C9	GGTAGAAGGAAAGAACAGGG TTGCGAGGAAAGAAGTAGAA	131
M2E1	TGCCTGAACTCCTTGTAAC TAAAGAATGATGGGGAGAGA	123
M2E4	TGTGCAACTGCTTTGGAG GTTTCATGGATTTGTGGTTT	199
M2F3	GATTACTGGAGGACACGAAG ATGCTCTCTCACATTTTGGT	131
M2G5	GTGAGTGTCTTCTTTGAGGG GCAGTTGGATCTCTGTGAGT	116
M3A1	TCCCAGTTAGCTTCATCTGT CCACACTCTACTCCAGCTTC	205

хомячка. Для определения видовой специфичности клонов нашей библиотеки все они были проанализированы методом ПЦР, как описано нами ранее [7, 8]. Для этого были использованы внутренние пары праймеров, синтезированные для каждого из клонов на основе их нуклеотидной последовательности (табл. 1), и геномная ДНК, выделенная из плаценты человека, линии клеток СНО (Chinese hamster ovary) китайского хомячка и гибридной линии клеток человек – китайский хомячок UV5HL9-5B. Последовательность считали принадлежащей геному китайского хомячка, если полоса ожидаемого на основании ее первичной структуры размера наблюдалась на ДНК-матрицах китайского хомячка и гибридных клеток, но не на геномной ДНК человека (рис. 1).

Проверка на видовую специфичность показала, что около 45% клонов библиотеки принадлежали геному китайского хомячка. Как было установлено нами ранее [7, 8], среди человеческих клонов полученной библиотеки встречаются, хотя и редко, не обладающие матрикссвязывающими свойствами последовательности. В связи с этим было необходимо проверить, все ли MARs китайского хомячка способны связываться с ядерным матриксом.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА СВЯЗЫВАНИЯ КЛОНОВ БИБЛИОТЕКИ С ЯДЕРНЫМ МАТРИКСОМ

15 отобранных нами клонов китайского хомячка были проверены на избирательность их

связывания с ядерным матриксом *in vitro* по методу [10, 11]. Для этого ДНК MAR-содержащих клонов и контрольных образцов радиоактивно метили при помощи ПЦР, используя в качестве предшественника  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ . Для контроля использовали фрагменты ДНК фагов  $\lambda$  и T7, не содержащие MARs [8]. Меченые препараты MARs вместе с контрольными образцами инкубировали с препаратами ядерного матрикса (см. "Экспериментальную часть") и образующийся при этом комплекс ДНК с ядерным матриксом отделяли центрифугированием. Фракции супернатанта (несвязавшейся ДНК) и осадка (связанной с матриксом ДНК) анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2). Как видно из рис. 2, матрикссвязывающие фрагменты ДНК китайского хомячка обнаруживали в основном в осадке, тогда как фрагменты ДНК фагов  $\lambda$  и T7 (указаны стрелками) предпочтительно выявляли во фракции супернатанта (на рис. 2 приведены данные для двух характерных клонов, M0B5 и M0B9). По данным электрофореза были рассчитаны коэффициенты связывания ( $B$ ) всех фрагментов с ядерным матриксом так, как описано нами ранее [8]. Из 15 проверенных фрагментов 3 являются "сильными" MARs ( $B > 20$ ), 6 – "средними" ( $20 > B > 5$ ), 5 – "слабыми" ( $5 > B > 2.5$ ), и лишь 1 фрагмент вовсе не проявлял матрикссвязывающих свойств (табл. 2). Таким образом, 14 из 15 проверенных нами фрагментов (>90%) были в той или иной степени способны предпочтительно связываться с ядерным матриксом.

#### АНАЛИЗ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ MARs

В литературе имеются данные о функциональной значимости MARs – они находятся вблизи регуляторных элементов (промоторов, энхансеров) различных генов, а также соседствуют либо входят в состав участков инициации репликации [4–6]. Во многих из них обнаруживаются А + Т-богатые районы различной протяженности [6], которые могут служить местами расплетания двойной спирали ДНК при торсионном напряжении в ней [10]. Предполагается, что именно в этих областях происходит взаимодействие MARs с ядерным матриксом. Для многих MARs также характерно присутствие инвертированных повторов, способных образовывать крестообразные структуры.

При помощи компьютерной обработки первичных структур MARs мы определили содержание в них пуринов (А + G), GC-состав, наличие инвертированных повторов, а также А + Т-богатых районов (табл. 2). Около 50% клонов содержали области, богатые А + Т, все клоны содержали инвертированные повторы (от 1 до 9). Для клонов M1G12 и M1H8 большое число инвертированных повторов коррелировало с высоким коэффициентом связывания с ядерным матриксом. Напротив,

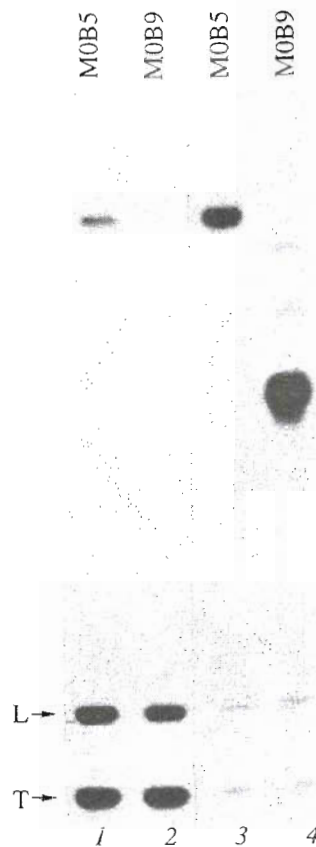


Рис. 2. Связывание MARs китайского хомячка с ядерным матриксом *in vitro*. Электрофорез в 6% ПААГ с 7 М мочевиной. Дорожки 1, 2 соответствуют несвязавшемуся материалу (супернатант), дорожки 3, 4 – связанной с матриксом ДНК (осадок). Названия клонов приведены над соответствующими дорожками. Стрелками показаны отрицательные контроли. L – фрагмент ДНК фага  $\lambda$  (161 п. о.), T – фрагмент ДНК фага T4 (138 п. о.).

клон M0A4 имел низкий коэффициент связывания, но в его последовательности было обнаружено 8 инвертированных повторов. Таким образом, наши данные не подтверждают распространенного мнения [6], что последовательности, имеющие высокое сродство к ядерному матриксу, обязательно обогащены АТ-парами оснований и содержат большое число инвертированных повторов, способных образовывать крестообразные структуры. Приведенные выше данные могут также отражать принадлежность различных клонов к различным классам MAR-элементов.

#### МАТРИКССВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Все определенные нами первичные структуры MARs сравнивались с нуклеотидными последовательностями, имеющимися в международной базе

Таблица 2. Характеристика MAR-клонов китайского хомячка

Название клона	Размер вставки, п. о.	Коэффициент связывания	G + C, %	A + G, %	A + T-богатые районы*	Обращенные повторы**
M0A2	410	18.1	39	63	42 + 50	2
M0A4	444	2.5	44	51	—	8
M0A10	278	3.6	35	40	117 + 25 + 33	3
M0B5	425	8.7	43	41	21	5
M0B8	436	9.7	45	48	—	9
M0B9	240	55.4	44	39	—	1
M1F1	402	42.8	44	60	22 + 21	6
M1G12	347	17.6	37	38	—	2
M1H8	427	56.3	45	51	—	8
M2C9	267	3.1	44	64	22	4
M2E1	349	3.4	40	36	49 + 69	4
M2E4	263	1.3	36	65	26 + 97	2
M2F3	346	6.6	41	61	22	2
M2G5	371	3.0	46	41	—	2
M3A1	302	7.2	43	44	—	3

\* Длина (A + T)-обогащенных (более 75% A + T) районов размером более 20 п. о.

\*\* Число обращенных повторов длиной более 6 п. о.

данных GenBank, при помощи программы BLAST [12] с использованием сервера Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), а также с базой данных повторяющихся последовательностей высших организмов [13]. Один из обнаруженных нами элементов с высоким сходством к ядерному матриксу, M0A2, оказался в значительной мере (на 65%) гомологичным по всей своей длине повторяющемуся элементу LINE (Long Interspersed Element) мыши (см. рис. 3). С учетом различной видовой принадлежности этих последовательностей M0A2 с уверенностью можно отнести к обширному семейству LINE (L1). Участок гомологии с MAR лежит в области открытой рамки считывания ORF1, расположенной вблизи 5'-конца LINE-повтора [14]. Интересно, что два человече-

ских MARs из нашей библиотеки также обладают высокой гомологией к LINE-повтору человека, и именно к его ORF1-области (данные направлены в печать). Хорошо известно, что LINE-повтор распространился в геноме животных при помощи ретротранспозиции (см. обзор [15]). Представители этого семейства, содержащие в своем составе MARs, при их перемещении и распространении по геному в процессе эволюции могут быть причиной крупномасштабных изменений как активности отдельных генов, так и транскрипционного статуса целых доменов хроматина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование и трансформация штаммов *E. coli*, выделение плазмидной ДНК и ДНК фага  $\lambda$ ,



Рис. 3. Гомология (отмечена вертикальными черточками) между MAR-элементом M0A2 и 5'-концевой областью LINE-повтора мыши MML1.

электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле и другие стандартные процедуры проводили по описанным методикам [16, 17].

Получение библиотеки матрикссвязывающих фрагментов в фагмидном векторе рGEM-7zf(+) было описано нами ранее [7, 8]. Однонитевые формы фагмид выделяли с использованием желперного бактериофага R-408 по методике фирмы Promega [18]. Первичную структуру вставок определяли по методу Сэнгера с использованием прямого 17-нуклеотидного праймера, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (Обнинск, Россия) и набора Sequenase ver. 2 фирмы USB (США) согласно рекомендациям изготовителя.

Клеточную линию Jurkat (трансформированные Т-лимфоциты человека) выращивали в суспензии на среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Препараты ядерного матрикса были получены методом низкосолевого экстракции с использованием 3,5-диодсалицилата лития (LIS) по методу [11]. Связывание радиоактивно меченых MARs с ядерным матриксом проводили так, как описано в работе [19], с предложенными нами [8] модификациями.

Радиоактивное мечение ДНК с использованием ПЦР осуществляли по описанной ранее методике [8].

Авторы благодарны В.К. Потапову и Н.В. Скапцовой за синтез олигонуклеотидных праймеров.

Работа финансировалась грантом Российской государственной программы "Геном человека" и грантом Российского фонда фундаментальных исследований 96-04-49033.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Збарский И.Б., Кузьмина С.Н. Скелетные структуры клеточного ядра. М.: Наука, 1991.
2. Berezney R., Mortillaro M.J., Ma H., Wei X., Samarabandu J. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 1–65.
3. Bode J., Schlake T., Rios-Ramirez M., Mielke C., Stengert M., Kay V., Klehr-Wirth D. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 389–454.
4. Dijkwel P.A., Hamlin J.L. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 455–484.
5. Razin S.V., Gromova I.I., Iarovaia O.V. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162B. P. 405–448.
6. Boulikas T. // *Int. Rev. Cytol.* 1995. V. 162A. P. 279–388.
7. Николаев Л.Г., Цогтхишиг Ц., Акопов С.Б., Сverdlov E.D. // *Биооргани. химия.* 1995. Т. 21. С. 954–958.
8. Nikolaev L.G., Tsevegijn T., Akopov S.B., Ashworth L.K., Sverdlov E.D. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1330–1336.
9. Carrano A.V., de Jong P.J., Branscomb E., Slezak T., Watkins B.W. // *Genome.* 1989. V. 31. P. 1059–1065.
10. Kay V., Bode J. // *Methods in Molecular and Cellular Biology.* V. 5 / Eds A.G. Papavassiliou, S.L. King. N.Y.: Wiley-Liss, 1995. P. 186–194.
11. Mirkovitch J., Mirault M.-E., Laemmli U.K. // *Cell.* 1984. V. 39. P. 223–232.
12. Altshul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
13. Jurka J., Walichiewicz J., Milosavljevic A. // *J. Mol. Evol.* 1992. V. 35. P. 286–291.
14. Skowronski J., Fanning T.G., Singer M.F. // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 1385–1397.
15. Eickbush T.H. // *New Biol.* 1992. V. 4. P. 430–440.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. CSHL Press, Cold Spring Harbour, 1989.
17. *Short Protocols in Molecular Biology* / Eds F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. N. Y.: John Wiley and Sons, 1992.
18. *Promega Protocols and Applications Guide.* Promega Corporation, 1991. P. 109–113.
19. Izaurralde E., Mirkovitch J., Laemmli U.K. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200. P. 111–125.

## Identification and Characterization of 14 Sequences from the Chinese Hamster Genome Preferentially Binding to the Nuclear Matrix

S. B. Akopov, L. G. Nikolaev, O. Yu. Tyrsin, A. S. Ruzov, and E. D. Sverdlov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

**Abstract**—Fifteen sequences belonging to the Chinese hamster genome were isolated from a library of sequences preferentially binding to the nuclear matrix (matrix attachment regions, MAR), sequenced, and characterized. Fourteen of the 15 sequences (>90%) bound to the nuclear matrix with affinities 2.5–60 times higher than those of control DNA fragments containing no MARs. One clone displayed a considerable homology to the ORF1 region of the mouse LINE repeat. Such MARs within LINE repeats may considerably alter the activities of some genes and the transcription status of chromatin domains upon the LINE repeat propagation in the genome over the course of evolution.

**Key words:** nuclear matrix, matrix attachment region (MAR), LINE repeat.