



ПИСЬМА
РЕДАКТОРУ

УДК 576.313.3

**КАРТИРОВАНИЕ НА ХРОМОСОМЕ 19 ЧЕЛОВЕКА
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО
СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С ЯДЕРНЫМ МАТРИКСОМ**

© 1995 г. Л. Г. Николаев*, Ц. Цогтхишиг, С. Б. Акопов, Е. Д. Свердлов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 28.07.95 г.

Для хромосомы 19 человека получена и охарактеризована плазмидная библиотека последовательностей, избирательно связывающихся с ядерным матриксом, содержащая около 400 клонов. По результатам анализа, около 50% клонов библиотеки содержат последовательности ДНК, специфичные для хромосомы 19 человека. Более 90% из них являются матрикссвязывающими. Восемь MARs были локализованы на физической карте хромосомы 19.

Ключевые слова: хромосома 19 человека, ядерный матрикс, MAR (matrix attachment region), функциональное картирование.

Прогресс, наблюдающийся в генетическом и физическом картировании генома человека (см. недавние обзоры [1, 2]), создает основу для решения главной, хотя и более трудной, задачи – его функционального картирования. Основное внимание в настоящее время уделяется составлению карты транскрибирующихся последовательностей – как мРНК [3, 4], так и гетерогенной ядерной РНК [5]. Для получения более полной функциональной карты генома желательным было бы использовать также последовательности, выполняющие и другие важные функции в жизненном цикле клетки. Примером таких функциональных элементов генома могут служить последовательности, избирательно связывающиеся с ядерным матриксом (matrix attachment regions, или MARs) [6].

Участки ДНК, избирательно связывающиеся с ядерным матриксом, играют важную роль в процессах регуляции активности генов, а также при репликации ДНК, сплайсинге РНК и ее переносе из ядра в цитоплазму [7]. Локализация их на хромосомах позволила бы детально понять интегральные механизмы функционирования хромосом, роль MARs в экспрессии близлежащих генов. В настоящее время, однако, такая информация отсутствует. Для решения этой задачи нами была получена библиотека коротких последовательностей, специфичных для хромосомы 19 человека,

избирательно связывающихся с ядерным матриксом, проведен ее частичный анализ и определено положение ряда последовательностей клонов на физической карте хромосомы 19.

Исходным материалом для конструирования библиотеки MARs послужила геномная библиотека хромосомы 19 человека в λ -векторе Charon 40, любезно предоставленная Ливерморской национальной лабораторией (США). Тотальная ДНК этой библиотеки была исчерпывающе расщеплена рестриктазами *Sau3A* и *Csp6-1* и с полученными фрагментами по липким концам были лигированы адаптеры и праймер, содержащий участок расщепления *XhoI*, следующей структуры:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| (1) 5' GATCTGTTTCATGG | Адаптер
<i>Sau3A</i> |
| (3) 3' ACAAGTACCCATGAGCTCGAGTCA | Праймер |
| | <i>XhoI</i> |
| (2) 5' TATGTTTCATGG | Адаптер
<i>Csp6-1</i> |
| (3) 3' ACAAGTACCCATGAGCTCGAGTCA | Праймер |
| | <i>XhoI</i> |

После лигирования фрагменты длиной 200 - 600 п. о. были амплифицированы при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве праймера олигонуклеотида (3). Полученную ДНК инкубировали *in vitro* с ядерными матриксами, выделенными высокосолевым методом [8] в присутствии 10000-кратного избытка ДНК *E. coli*, не связывающуюся с матриксом ДНК трехкратно отмывали буфером связывания (20 mM трис-HCl (pH 7.5), 4 mM EDTA, 0.5 M

Использованные сокращения: MAR (matrix attachment region) – последовательности ДНК, связывающиеся с ядерным матриксом, X-Gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозид, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

* Автор для переписки.

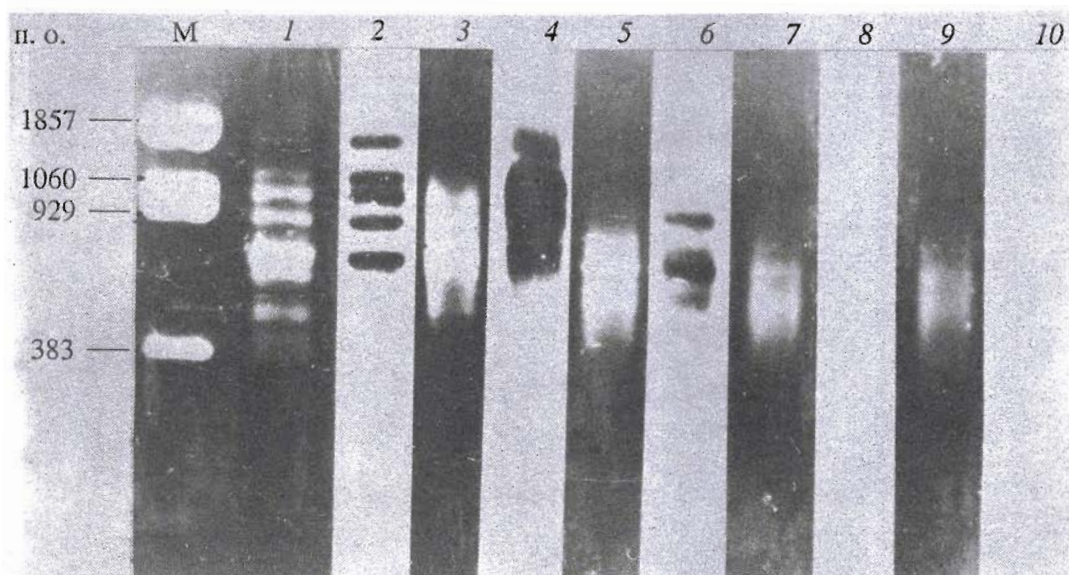


Рис. 1. Электрофорез в 2% агарозе ДНК, связавшейся с ядерным матриксом (1, 3, 5, 7, 9), и блот-гибридизация ДНК этих дорожек с меченой ДНК фага λ (2, 4, 6, 8, 10). 1, 2 – исходный материал, последующие пары дорожек соответствуют 1, 3, 4 и 5-му циклу связывания. М – маркер длин фрагментов (ДНК pBR322, расщепленная BstNI).

сахароза, 0.5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина), содержащим 2 М NaCl, и связанные с матриксом фрагменты выделяли как описано в работе [8]. Выделенные фрагменты амплифицировали при помощи ПЦР с тем же праймером и вновь подвергали связыванию с ядерным матриксом. Описанную процедуру повторяли пятькратно.

На рис. 1 приведены результаты электрофореза в агарозе ДНК после разного числа циклов связывания с ядерным матриксом. Практически все видимые фрагменты исходной ДНК (дорожка 1) соответствуют рестриктным фрагментам ДНК вектора (дорожка 2). После четвертого цикла связывания материал содержит только фрагменты хромосомы 19. Препараты ДНК после четвертого и пятого циклов связывания с ядерным матриксом (дорожки 7 и 9) уже не содержат векторной ДНК (результаты гибридизации с ДНК фага λ – дорожки 8 и 10). Отсутствие в препаратах ДНК фрагментов, соответствующих векторной ДНК, может служить свидетельством, хотя и косвенным, обогащения библиотеки последовательностями, имеющими повышенное сродство к ядерному матриксу.

Полученный после пятого цикла связывания набор фрагментов был расщеплен рестриктазой *Xho*I и лигирован по этому же сайту расщепления с вектором pGEM7zf(+). После трансформации и отбора рекомбинантных колоний по бело-голубой селекции была получена и ранжирована библиотека из 400 клонов. Вставки 20 из этих клонов были секвенированы. Полученные последовательности анализировали на гомологию с ДНК

базы данных EMBL при помощи программы BLAST [9]. Никаких существенных гомологий с известными последовательностями выявлено не было.

На основании первичной структуры ДНК секвенированных последовательностей при помощи программы Primer (ver. 0.5, Whitehead Institute for Biomedical Research) были подобраны и синтезированы пары праймеров для ПЦР с таким расчетом, чтобы длина продукта ПЦР составляла 80 - 300 п. о. Для доказательства принадлежности полученных клонов хромосоме 19 человека был проведен ПЦР-анализ как описано нами ранее [10]. Для анализа использовали синтезированные праймеры и геномную ДНК из плаценты человека, линии клеток CHO (Chinese Hamster Ovary) китайского хомячка и гибридной линии клеток человека и хомячка UV5HL9-5B, несущей индивидуальную хромосому 19 человека (последняя линия любезно предоставлена А. Каррано, Ливерморская национальная лаборатория). Пары внутренних праймеров, которые давали ПЦР-продукт ожидаемого размера при использовании в качестве матрицы ДНК человека и гибридных клеток, но не ДНК хомячка, соответствуют клонам, содержащим вставки с последовательностями хромосомы 19. Структуры праймеров и другие характеристики ДНК этих клонов приведены в таблице.

ДНК 8 отобранных клонов, принадлежащие хромосоме 19 человека, были радиоактивно мечены α - ^{32}P dATP с помощью ПЦР и проверены на избирательность взаимодействия с ядерным

Положение MAR-клонов на физической карте хромосомы 19 и структуры праймеров, позволяющих амплифицировать соответствующую область хромосомы

Клон			Праймеры	ПЦР-фрагмент	
№	Шифр	Атрибут*		Длина, п. о.	Позиция на физической карте**
1	M0a3	PCR3298	ACGTGTGCCACATTCCT ACACTGAGTCCAGATCTCTGCA	175	19q13.1, 36.4
2	M0a7	PCR3300	GATGTGATGTTGGAGAАСТАСАGG GGGCACAGGACAACAAGG	253	19q13.4, 51.7
3	M0a9	PCR3301	ATCCATAGGGAGATGGGGTC AAGTCACTGCACGTGCCTC	251	19q13.4, 56.3
4	M0a11	PCR3302	GAGGGTAAGGAAGTCTGGCC CAGCGGTTGACAAGTCTGAA	157	19q12, 30.9
5	M0b1	PCR3304	TCATCCTTAGTCATGGCAAGG GATTGGACTTAGCTGCCAGC	103	19p12, 17.8
6	M0b2	PCR3305	GAGGAGCGACACAGATAGACG CCTCGTGTAACAGATCTTCATCC	216	19p13.2, 7.0
7	M0b6	PCR3306	TTAACCAAATACAGCGTGATGG CAATATGTGCTTGGGTGTGG	326	19q12, 33.2
8	M0b7	PCR3307	GTGGGTAAATCAGGGAAGAGC GAAGGAAGAACGTAACCATTGC	264	19p13.2, нет данных

* Присвоен клону в базе данных BROWSER Ливерморской национальной лаборатории.

** Приведено расстояние данного клона в миллионах п. о. от теломерного конца р-плеча хромосомы.

матриком *in vitro* по методу [11, 12]. Из рис. 2 видно, что все 8 клонов связываются с матриком значительно лучше, чем контрольные, не содержащие MARs, фрагменты ДНК фагов λ и T7, хотя эффективность этого связывания варьирует в зависимости от клона.

Восемь полученных нами MARs были картированы на хромосоме 19 человека в соответствии с протоколом, подробно описанным ранее [13]. Кратко: фрагменты клонов из библиотеки амплифицировали при помощи ПЦР с использованием внутренних праймеров (см. таблицу) и радиоактивно метили ^{32}P также при помощи ПЦР. Полученный зонд гибридизовали с фильтрами высокой плотности космидных библиотек хромосомы 19 человека RR и DDH [14] (любезно предоставлены А. Каррано, Ливерморская национальная лаборатория). Давшие положительный сигнал космиды дополнительно проверяли на со-

держание нужной последовательности с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы космидную ДНК. После идентификации космиды или космид положение клона на физической карте хромосомы 19 определяли с использованием базы данных Геномного центра Ливерморской национальной лаборатории (BROWSER). Указания по доступу к базе данных доступны для пользователей X-mosaic по адресу <http://www-bio.llnl.gov/bbrp/bbrp.homepage.html>. Основные результаты картирования сведены в таблице.

Таким образом, нами была получена и охарактеризована библиотека последовательностей хромосомы 19 человека, избирательно связывающихся с ядерным матриком. По результатам анализа, около 50% клонов библиотеки содержат последовательности ДНК, специфичные для хромосомы 19 человека. Более 90% из них являются

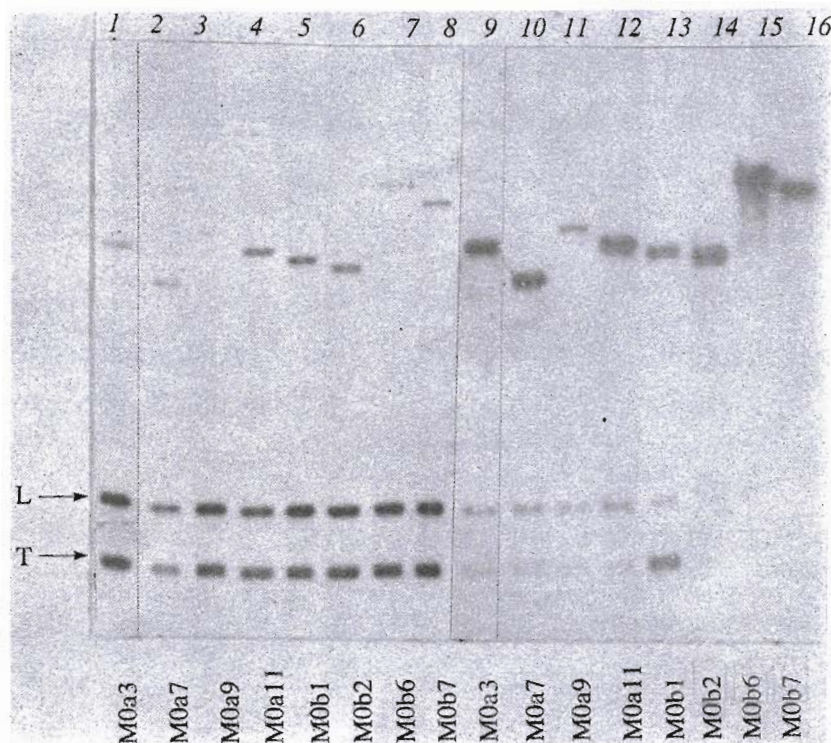


Рис. 2. Результаты связывания MAR-клонов хромосомы 19 с ядерным матриксом *in vitro*. Электрофорез в 6% денатурирующем ПААГ с мочевиной. Меченые вставки были смешаны с мечеными отрицательными контролями: L – фрагмент ДНК фага λ (916 - 1077, длина 161 п. о.) и T – фрагмент ДНК фага T7 (34257 - 34395, длина 138 п. о.). Дор. 1 - 8 соответствуют несвязавшемуся материалу (супернатант), дор. 9 - 16 – связавшейся с матриксом ДНК (осадок). Названия клонов приведены под соответствующими дорожками.

матрикссвязывающими. Восемь MARs были локализованы на физической карте хромосомы 19.

Авторы благодарны д-ру А. Каррано, д-ру Е. Брэнскомбу, Дж. Мазримасу и другим коллегам из Ливерморской национальной лаборатории (США) за неоценимую помощь в картировании последовательностей на хромосоме 19 и синтезе праймеров. Мы также приносим благодарность В. Потапову, Ю. Лебедеву, С. Волику, Ю. Шевченко и другим сотрудникам лаборатории структуры и функций генов человека за ценные замечания и помощь при проведении некоторых экспериментов.

Работа финансировалась грантом Российского проекта "Геном человека" и грантом Международного научного фонда (ISF) (MGT000). Работа в Ливерморской национальной лаборатории проводилась по соглашению с Министерством энергетики США в рамках контракта No W-7405-ENG-48.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McKusik V.A.* // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 12 - 20.
2. *Billings P.R., Smith C.L., Cantor C.R.* // *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 28 - 34.
3. *Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merril C.R., Wu A., Oltde B., Moreno R.F., Kerlavage A.R., McCombie W.R., Venter J.G.* // *Science.* 1991. V. 252. P. 1651 - 1656.
4. *Polymeropoulos M.H., Xiao H., Glodec A., Gorski W., Adams D., Moreno R.F., Fitzgerald M.G., Venter J.G., Merril C.R.* // *Genomics.* 1992. V. 12. P. 492 - 496.
5. *Borodin A., Kopantzev E., Wagner L., Volik S., Ermolaeva O., Lebedev Y., Monastyrskaya G., Kuntz J., Grzeschik K.-H., Sverdlov E.* // *Gen. Anal. Biomol. Eng.* 1995. V. 12. P. 23 - 31.
6. *Gasser S.M., Laemmli U.K.* // *Trends Genet.* 1987. V. 3. P. 16 - 22.
7. *Getzenberg R.H., Pienta K.J., Coffey D.S.* // *Endocrine Rev.* 1990. V. 11. P. 399 - 412.
8. *Cockerill D.N., Garrard W.T.* // *Cell.* 1986. V. 44. P. 273 - 282.
9. *Altshul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403 - 410.
10. *Обрадович Д., Бородин А.М., Копанцев Е.П., Вагнер Л.Л., Волик С.В., Ермолаева О.Д., Лебедев Ю.Б., Монастырская Г.С., Сverdlov E.D.* // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 919 - 931.
11. *Mirkovitch J., Mirault M.-E., Laemmli U.K.* // *Cell.* 1984. V. 39. P. 223 - 232.

12. Izaurralde E., Mirkovitch J., Laemli U.K. // J. Mol. Biol. 1988. V. 200. P. 111 - 125.
13. Volik S., Lebedev Y., Nikolaev L., Shevchenko Y., Vinogradova T., Kopantzev E., Kolesnik T., Monastyrskaya G., Kunz U., Grzeschik K.-H., Ashworth L.K., Len-
non G., Sverdlov E. // DNA Seq.-J. Seq. and Mapping. 1995. V. 5. In Press.
14. Carrano A.V., Ashworth L.K. // Biology and Biotechnology Research Program. Overview Report and Research Highlights. Livermore: LLNL, 1994. P. 74 - 75.

Mapping of Sequences Selectively Binding to Nuclear Matrix on Human Chromosome 19

L. G. Nikolaev,¹ Ts. Tsogtkhishig, S. B. Akopov, and E. D. Sverdlov

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

Abstract – A plasmid library (400 clones) of the human chromosome 19 sequences selectively binding to nuclear matrix was obtained and characterized. Approximately 50% clones contained DNA sequences specific for human chromosome 19. Over 90% of these sequences represented matrix attachment regions (MARs). Eight MARs were localized to the chromosome 19 physical map.

Key words: human chromosome 19, nuclear matrix, matrix attachment regions, functional mapping.

¹ To whom correspondence should be addressed.