



УДК 575:576.315.42

А. П. Сидоренко, Г. А. Худолий, Н. Г. Шуппе

НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО СВЯЗАННЫЕ С УЧАСТКАМИ ИНИЦИАЦИИ РЕПЛИКАЦИИ ДНК У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

*Фракция ДНК, обогащенная участками инициации репликации, выделена из культивируемых эмбриональных клеток *D. melanogaster* с использованием метода вытеснения новосинтезированной ДНК из репликационной петли. Посредством гибридизационных экспериментов показано, что, по крайней мере, часть участков инициации репликации относится к повторяющимся последовательностям и обладает высокой эволюционной консервативностью.*

Введение. Изучение молекулярной структуры участков инициации репликации (УИР) ДНК в клетках эукариот пока не привело к обнаружению универсальных последовательностей, подобных локусу *ori* у прокариотических организмов. Между тем знание структурно-функциональной организации УИР необходимо как для понимания регуляции репликативного синтеза ДНК в онтогенезе, так и для разработки новых принципов конструирования векторов в генетической инженерии высших растений и животных. Существуют данные о том, что УИР входят во фракцию ДНК, прилегающую к ядерному матриксу (ямДНК) [1]. Возможно, что у отдельных видов ДНК эти участки имеют неодинаковую структуру, но не исключено, что между ними имеется определенная гомология.

В настоящей работе проведено сравнение ДНК разных видов по их способности гибридизоваться с фракционированной ДНК *D. melanogaster*. В качестве зондов мы использовали ДНК ядерного матрикса *D. melanogaster*, фракцию генома, обогащенную УИР по методу вытеснения новосинтезированных нитей [5]; клонированную фракцию УИР. В результате проделанной работы было показано наличие последовательностей, гомологичных ямДНК и УИР генома *D. melanogaster* в геномах *D. virilis*, крысы, мыши и человека.

Материалы и методы. Культуру эмбриональных клеток *D. melanogaster* 67j25D [2] инкубировали с [¹⁴C]тимидином (3,7 кБк/мл, удельная активность 1,5 ГБк/ммоль) в течение 18 ч. Импульсную метку, содержащую 25 мкг/мл бромдезоксисуридина и 185 кБк/мл ³H-дезокситидина (удельная активность 185 ГБк/ммоль), вводили на 10 мин.

Фракцию генома, обогащенную УИР, выделяли методом [3, 4], основанном на вытеснении новосинтезированных цепей ДНК в виде двухспиральных молекул в результате миграции ветвей репликационной петли. Затем импульсно меченную низкомолекулярную фракцию ДНК, выделенную с помощью градиента концентрации сахарозы (5–20%), обогащали молекулами ДНК, содержащими тяжелую метку в обеих цепях, используя двукратное центрифугирование в градиенте плотности CsCl [5].

ямДНК получали методом [6], описанным для клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Фракцию УИР клонировали, применяя в качестве вектора плазмиду *pUC18*. В процессе выделения фракцию генома, обогащенную УИР, интенсивно обрабатывали нуклеазой S1 для уничтожения одностратых «хвостов». Встраивание в плазмиду про-

водили в сайт рестрикции *SmaI* после дополнительной инкубации ДНК этой фракции с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Лигированным материалом трансформировали бактерии *E. coli* штамма *TG1* [7]. Рекombинантные плазмиды отбирали по изменению цвета колоний на среде с изопропилтиогалактозидом и хромогенным субстратом X-gal. Размеры вставок в плаزمидах определяли по электрофоретической подвижности в агарозном геле.

Ник-трансляцию ДНК-зондов осуществляли с помощью стандартного набора реактивов («Amersham», США) [8]; гибридизацию (65 °С, 48 ч) на нейлоновых мембранных фильтрах «Биодайн А» («Pall», США) — согласно рекомендациям фирмы. Гибридизационные сигналы регистрировали на пленке РМ-1 («Свема», СССР).

Результаты и обсуждение. Для выделения фракции генома, обогащенной УИР, асинхронную популяцию клеток дрозофилы метили в течение 10 мин бромдезоксисуридином и ³H-дезоксцитидином, что позволило использовать фракционирование ДНК в градиенте плотности CsCl для дополнительной очистки УИР, содержащих тяжелую метку в обеих комплементарных нитях [5]. Этот метод выделения фракции УИР считается наиболее адекватным, так как в модельной системе с фаговой ДНК дает возможность получать препараты с высокой степенью обогащения последовательностями, несущими *ori* фагового генома [5]. Полученная таким образом фракция УИР имела электрофоретическую подвижность, соответствующую таковой фрагментов маркерной ДНК размером около 600 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 1, а).

Выделение ямДНК в условиях жесткой обработки ядер клеток дрозофилы микрококковой нуклеазой после экстракции солевым раствором с высокой ионной силой (2 М NaCl) [6] позволяло получить фракцию ямДНК со средним размером около 200 п. н. (рис. 1, б). Это согласуется с данными других исследователей [6, 9].

По нашим данным, препараты ямДНК и УИР составляют соответственно десятые и сотые доли процента геномной ДНК дрозофилы.

Фракцию УИР клонировали в плазмиде *pUC18*. После трансформации штамма *TG1*

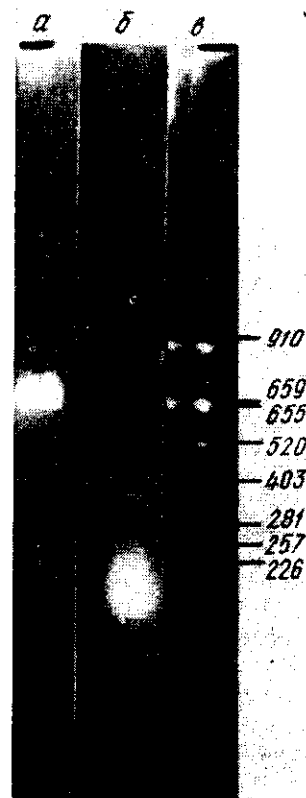


Рис. 1. Электрофореграмма фракций ДНК: а — обогащенной УИР; б — ямДНК; в — *pBR322*, обработанная рестриктазой *AluI*. Цифры — стандарты молекулярной массы

Fig. 1. Electrophoregram of DNA fractions enriched in replication initiation sites (SIR) and DNA of the nuclear matrix (nmDNA): а — SIR DNA; б — nmDNA; в — DNA *pBR322* digested by the restriction endonuclease *AluI*

E. coli были отобраны 110 бесцветных клонов, из которых 9 содержали инсерции. По электрофоретической подвижности размеры инсерций составляли от 100 до 600 п. н. По современным представлениям, *ori* эукариот должны входить в состав последовательностей, связанных с ядерным матриксом [1]. Поэтому из клонированных УИР мы выбрали те последовательности, которые были представлены и в ямДНК. Рекombинантные плазмиды при гибридизации с ямДНК давали сигналы различной интенсивности. Для дальнейших исследований использовали рекombинантный клон 408, несущий фрагмент УИР длиной около 600 п. н., дающий наиболее интенсивный сигнал гибридизации с ямДНК.

По-видимому, связь ДНК с ядерным матриксом имеет существенное значение в регуляции репликативного синтеза в клетках высших организмов [1]. Поэтому представляет интерес исследование, насколько универсальны процессы, регулирующие структурную и функциональную организацию геномов различных эукариот, и в первую очередь, выяснение вопроса, какова степень консервативности в эволюции последовательностей ДНК, участвующих в этих процессах.

В этой связи мы провели гибридизацию фракций УИР, ямДНК и клона 408, происходящих из ядер клеток *D. melanogaster*, с геномной

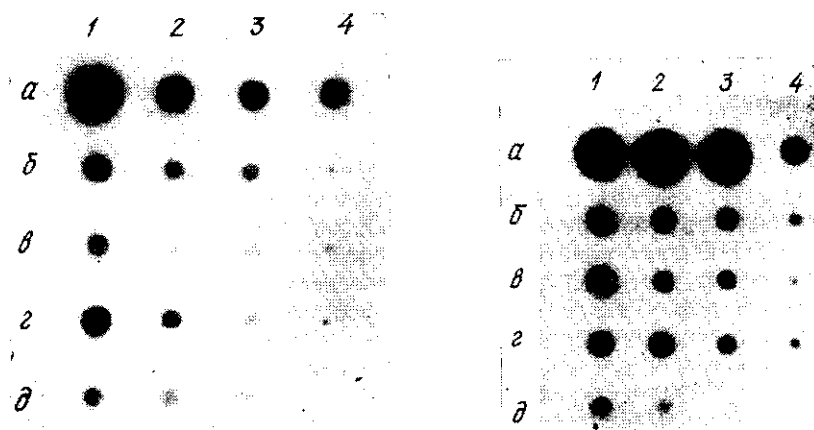


Рис. 2. Дот-гибридизация геномной ^{32}P -ДНК *D. melanogaster* с геномными ДНК эукариот: а — *D. melanogaster*; б — *D. virilis*; в — крысы; г — мыши; д — человека (1—4—2; 1; 0,5; 0,1 мкг ДНК соответственно)

Fig. 2. Dot-hybridization of genomic DNA of eukaryotes with genomic ^{32}P -DNA of *Drosophila melanogaster*: а — DNA of *Drosophila melanogaster*; б — DNA of *Drosophila virilis*; в — DNA of a rat; г — DNA of a mouse; д — human DNA (1—4—2; 1; 0.5; 0.1 μg of DNA, respectively)

Рис. 3. Дот-гибридизация ^{32}P -ямДНК с геномными ДНК эукариот: а — *D. melanogaster*; б — *D. virilis*; в — крысы; г — мыши; д — человека (1—4 аналогично рис. 2)

Fig. 3. Dot-hybridization of genomic DNA of eukaryotes with ^{32}P -nmDNA: а — DNA of *Drosophila melanogaster*; б — DNA of *Drosophila virilis*; в — DNA of a rat; г — DNA of a mouse; д — human DNA (1—4 — the same as in Fig. 2)

ДНК других видов, нанесенной на нейлоновые фильтры в виде пятен с уменьшающимся количеством ДНК.

В экспериментах по дот-гибридизации геномных ДНК *D. virilis*, крысы, мыши и человека с нефракционированной ^{32}P -ДНК *D. melanogaster* было обнаружено, что в них присутствуют гомологичные последовательности (рис. 2). Учитывая, что в подобных экспериментах дуплексы образуются в основном повторами, полученная гибридизация свидетельствует о наличии в геномах этих видов гомологичных повторяющихся последовательностей. В контрольных опытах по дот-гибридизации ДНК *D. melanogaster* с ДНК плазмиды *pUC18* как в прямом, так и в обратном вариантах гибридизация не была обнаружена.

Эксперименты, где в качестве меченых проб были использованы ямДНК (рис. 3) и фракция УИР (рис. 4) показывают, что в состав этих фракций входят повторяющиеся последовательности, гибридизующиеся с геномными ДНК других видов. Сравнение интенсивности сигналов гибридизации с калибровочным рядом геномной ДНК *D. melanogaster* свидетельствует о том, что во фракции УИР в меньшей степени, чем в ямДНК, представлены повторы, гибридизующиеся с геномными ДНК других видов. Действительно, в случае ямДНК (рис. 3) 2 мкг ДНК *D. virilis*, крысы и мыши дают примерно такой же сигнал гибридизации, как и 0,1 мкг ДНК *D. melanogaster*, а в случае фракции УИР (рис. 4) сигналы от 2 мкг геномной ДНК этих видов имеют значительно более слабую интенсивность, чем 0,1 мкг ДНК *D. melanogaster*.

Для экспериментов по гибридизации мы использовали также одну из клонированных последовательностей фракции УИР (клон 408), которая была представлена в ямДНК *D. melanogaster* (рис. 5). Оказалось, что во всех тестируемых геномах присутствуют семейства повторов, гибридизующиеся с клонированной последовательностью ДНК, причем геном мыши (рис. 5, *г*) содержит даже больше членов этого семейства, чем собственный геном *D. melanogaster*.

В соответствии с принципами метода выделения УИР клон 408 должен нести в качестве вставки УИР ДНК дрозофилы. Однако доказать

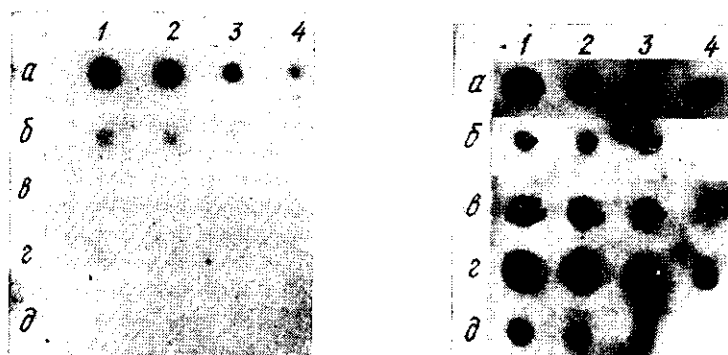


Рис. 4. Дот-гибридизация ^{32}P -УИР ДНК с геномными ДНК эукариот: *a* — *D. melanogaster*; *б* — *D. virilis*; *в* — крысы; *г* — мыши; *д* — человека (1—4 аналогично рис. 2)

Fig. 4. Dot-hybridization of genomic DNA of eukaryotes with ^{32}P -SIR DNA; *a* — DNA of *Drosophila melanogaster*; *б* — DNA of *Drosophila virilis*; *в* — DNA of a rat; *г* — DNA of a mouse; *д* — human DNA (1—4 — the same as in Fig. 2).

Рис. 5. Дот-гибридизация ^{32}P -фрагмента УИР ДНК с геномными ДНК эукариот: *a* — *D. melanogaster*; *б* — *D. virilis*; *в* — крысы; *г* — мыши; *д* — человека (1—4 аналогично рис. 2)

Fig. 5. Dot-hybridization of genomic DNA of eukaryotes with cloning ^{32}P -fragment of SIR; *a* — DNA of *Drosophila melanogaster*; *б* — DNA of *Drosophila virilis*; *в* — DNA of a rat; *г* — DNA of a mouse; *д* — human DNA (1—4 — the same as in Fig. 2)

это прямыми экспериментами пока невозможно. Поэтому мы не можем полностью исключить возможности того, что клонированный участок генома *D. melanogaster* не имеет отношения к инициации репликации. Наши предварительные исследования клона 408 свидетельствуют о том, что он не гибридизуется с гетерогенной ядерной РНК дрозофилы и, по-видимому, несет отрезок генома, расположенный в нетранскрибируемой области. В дальнейшем планируется провести секвенирование вставки, содержащейся в клоне 408, и охарактеризовать полученную последовательность.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что, по крайней мере, часть последовательностей, участвующих в инициации репликативного синтеза и в прикреплении ДНК к ядерному матриксу у *D. melanogaster*, относится к повторяющимся последовательностям, обладающим высокой эволюционной консервативностью. Это, возможно, указывает на универсальность механизмов, регулирующих структурную организацию ядра и репликацию генома в клетках эукариот.

Авторы выражают благодарность А. П. Акифьеву за конструктивные замечания при обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA* / W. G. Nelson, K. J. Pienta, E. R. Barrack, D. S. Coffey // *Ann. Rev. Biophys. Chem.* — 1986. — 15. — P. 457—475.
2. *Линии эмбриональных клеток Drosophila melanogaster, пересаживаемые in vitro* / В. Т. Какпаков, В. А. Гвоздев, Т. П. Платова, Л. Г. Полукарлова // *Генетика.* — 1969. — 5. № 12. — С. 67—75.

3. Zannis-Hadjopoulos M., Persico M., Martin R. G. The remarkable instability of replication loops provides a general method for the isolation of origins of DNA replication // *Cell*.—1981.—27, N 1(2).—P. 155—163.
4. Zannis-Hadjopoulos M., Chepelinsky A. B., Martin R. G. Mapping of the 3'-end positions of SV40 nascent strands // *J. Mol. Biol.*—1983.—165, N 3.—P. 599—607.
5. Разин С. В., Кекелидзе М. Г., Луканидин Е. М. Пространственная организация репликационных в эукариотическом ядре: прикрепление участков начала репликации к ядерному скелету // *Молекуляр. биология*.—1986.—20, № 2.—С. 387—395.
6. Яровая О. В., Разин С. В. Два типа участков прикрепления ДНК к ядерному скелету в клетках асцитной карциномы Эрлиха // *Там же*.—1983.—17, № 2.—С. 303—313.
7. Gibson T. J. Structure of the Epstein-Barr virus genome: Dissertation.—Cambridge, 1984.—153 p.
8. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
9. Aelen J. M. A., Opstelten R. J. G., Wanka F. Organization of DNA replication in *Physarum polycephalum*. Attachment of origins of replicons and replication forks to the nuclear matrix // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 4.—P. 1181—1195.

Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова
АН СССР, Москва
Ин-т хим. физики АН СССР, Москва

Получено 29.03.88

THE NUCLEOTIDE SEQUENCES PROBABLY CONNECTED
WITH THE INITIATION SITES OF DNA REPLICATION
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A. P. Sidorenko, G. A. Khudoly, N. G. Schuppe

N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

S u m m a r y

The DNA fraction enriched in replication initiation sites was isolated from cultured embryonic cells of *Drosophila melanogaster* using a method of nascent DNA strands extrusion. Hybridization experiments have shown that at least a part of replication initiation sites are repetitive sequences and are highly conservative in evolution.