

## К СТРУКТУРЕ ХРОМАТИНА ПРОТООНКОГЕНА РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

А.Р. ДЖЕРБАШЬЯНИ, Р.А. ЗАХАРЯНИ, К.Г. АРУТЮНЯНИ,  
К.Л. МАНУКЯНИ, П.П. КАЗАРЯНИ

*Институт молекулярной биологии ИАН Армении, 375014, Ереван*

Очищенные ядра клеток *HeLa* переваривали микрококковой нуклеазой. Полученные фрагменты ДНК хроматина разделяли электрофоретически, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и последовательно гибридизовали с промотором и кодирующим участком протоонкогена рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R). Проводили также параллельную контрольную гибридизацию. Показано отсутствие нуклеосомной десенки. Высокий уровень транскрипции гена EGF-R сопровождается разрушением структурной упаковки нуклеосомных частиц.

*HeLa* բջիջների մաքրված կորիզները մշակվել են միկրոկոկային նուկլեազով։ Ստացված ԴՆԹ-ի քրոմատինի հատվածները բաժանվել են էլեկտրոֆորեզով, տեղափոխվել նիտրոցելյուլոզային թաղանթի վրա և հաջորդաբար հիբրիդիզացվել էպիդերմալ աճի գործոնի ընդունիչի (EGF-R) պրոտոօնկոգենի իմաստային և առաջաշարժ հատվածների հետ։ Չուղահեռաբար դրվել է նաև հիբրիդիզացիայի ստուգման վործ։ Հիբրիդիզացիայի արդյունքները բացահայտել են նուկլեոսոմային սանդղակի բացակայությունը EGF-R պրոտոօնկոգենի տառադարձման արագության մակարդակը *HeLa* բջիջներում բարձր է։ EGF-R պրոտոօնկոգենի քրոմատինի նուկլեոսոմները քանդվում են տառադարձման բարձր արագության ժամանակ։

*HeLa* cells purified nuclei were digested by micrococcal nuclease. DNA chromatin fragments were fractionated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane and subsequently were hybridized with epidermal growth factor receptor (EGF-R) protooncogene promoter and coding regions. The parallel control hybridization was also carried out. The results of hybridization reveal the absence of nucleosomal pattern. The level of EGF-R protooncogene transcription is high in *HeLa* cells. Nucleosomes of the EGF-R protooncogene chromatin are disrupted during the high level of transcription.

### *Протоонкоген – хроматин – нуклеосома*

В активно-транскрибируемых генах хроматин, нуклеосомы претерпевают структурные изменения.

К настоящему времени описаны следующие структурные

изменения нуклеосом в разных активных генах: полное разрушение нуклеосом или их отсутствие [9,24]; образование необычных по размеру нуклеосом [23,26]; деление нуклеосом на две половинки [7,20,21,23]; перераспределение нуклеосом [4]; структурные изменения хроматина высокого порядка [1,2,8]. В некоторых активных генах не было обнаружено структурных изменений нуклеосом [10,13]. Эти результаты, полученные методом микрококково-нуклеазного анализа, не исключают структурных изменений нуклеосом.

Ранее мы впервые обнаружили ослабление ДНК-гистоновых взаимодействий в регуляторных и активно-транскрибируемых участках рибосомных генов *Drosophila melanogaster* без разрушения нуклеосом [1,2,17]. Эти результаты были получены с использованием метода *in situ* ковалентной прививки ядерных белков к ДНК диметилсульфатом, предложенного в работе [18] и разработанного нами [17] и в дальнейшем развитого [1]. Метод микрококково-нуклеазного анализа такие структурные изменения не улавливает. Кроме того, было показано, что регуляция транскрипции рибосомного гена *D.melanogaster* происходит также за счет структурных изменений хроматина рибосомного гена более высокого порядка [1,2]. Применением метода *in situ* ковалентной прививки ядерных белков к ДНК диметилсульфатом была изучена структура хроматина гена теплового шока дрозофилы [12,19].

В данной работе представлены результаты изучения структуры хроматина, нуклеосом кодирующей области и промотора человеческого протоонкогена рецептора эпидермального фактора роста (Р-ЭФР) при высокой скорости транскрипции с использованием метода микрококково-нуклеазного анализа структуры хроматина и блот-гибридизации.

**Материал и методика.** В работе использовали триэкоксиметилэтанолметан, ипарозу, фенолметилсульфонилфторид (PMSF) фирмы Sigma, стафилококковую нуклеазу фирмы Serva.

Клетки *HeLa* выращивали во флаконах Карреля в среде Игла с добавлением 10%-ной телячьей сыворотки в логарифмической фазе роста, далее клетки отбирали и гомогенизировали.

Использовали плазмиду PE7 - кодирующую область ДНК протоонкогена Р-ЭФР, прокловированного в РВР 322 [27], и плазмиду PERCAT 1 - ДНК-промотор протоонкогена Р-ЭФР, прокловированную в РВР 322 [11].

При выделении ядер все процедуры проводили при 4°C и в присутствии ингибитора сериновых протеаз PMSF в концентрации 1мМ, клетки гомогенизировали в буфере А (1М сахаразы, 20мМ HEPES (pH 7.5), 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2мМ ЭГТА). В гомогенат добавляли трипон-Х-100 до концентрации 0,4% и инкубировали 10-15мин при 0°C, центрифугировали 10мин, 900хg. Оседок ресуспандировали в буфере А и центрифугировали через 1,8 и 1,5М сахаразы, забуференной буфером А с концентрацией MgCl<sub>2</sub> 3мМ (по 12мл каждая по

в буферных сахароз) 30 мин, 20000xg в центрифуге BEKMAN, rotor SW 28.

Обработку стафилококковой нуклеазой проводили следующим образом: очищенные ядра ресуспендировали в 20мМ HEPES, 3мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2мМ DTTA, добавляли CaCl<sub>2</sub> до концентрации 1мМ и стафилококковую нуклеазу, 100ед/мл ДНК. Реакцию останавливали добавлением Na<sup>+</sup>-EDTA до конечной концентрации 25мМ и SDS - до концентрации 1%. Фрагменты ДНК очищали обработкой пропаном (150мг/мл, 4ч при 37°C) и депротенизировали смесью фенол-хлороформ. Пробы обрабатывали также РНК-азой. Электрофорез проводили в 1,5%-ной агарозе в системе триборат (pH 8,0).

Введение метки Р<sup>32</sup> в плазмидную ДНК проводили методом ин-витро транскрипции [14]. Саутерн блот проводили по методу [22], гибридизацию - как описано в работе [3].

**Результаты и обсуждение.** Для изучения структуры хроматина промотора и кодирующей области человеческого гена Р-ЭФР при активной транскрипции очищенные ядра клеток *HeLa* обрабатывали микрококковой нуклеазой, фрагменты ДНК очищали и фракционировали электрофоретически в агарозном геле. На рис.1 приведена электрофореграмма фрагментов ДНК нуклеосом тотального хроматина, окрашенная бромистым этидием после переваривания ядер клеток *HeLa* микрококковой нуклеазой.

Далее фрагменты ДНК из агарозного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану и последовательно гибридизовали с промоторным и кодирующим участками гена Р-ЭФР. Известно, что уровень транскрипции гена Р-ЭФР в клетках *HeLa* очень высокий [6]. Для контрольной гибридизации параллельно с фрагментами ДНК нуклеосом электрофоретически разделяли также ДНК плазмиды PERCAT 1, состоящей из промотора гена Р-ЭФР и PBR 322 в количестве 0,0001мкг, и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. На рис.2 приведены автордиограммы гибридизации с кодирующей областью гена Р-ЭФР (плазмида PE7) вместе с контрольной гибридизацией (рис.2.1 - низкая экспозиция и рис.2.2 - без контрольной гибридизации, высокая экспозиция). Как видно, в кодирующей области гена Р-ЭФР не обнаруживаются нуклеосомы и при высокой экспозиции выявляется только размазанная картина гибридизации, тогда как контрольная гибридизация выявила четкие полосы, соответствующие участкам PBR 322 плазмиды PERCAT 1. Не выявляются нуклеосомы



Рис.1

Микрококковой нуклеазой переваривание очищенных ядер клеток *HeLa*. Фрагменты ДНК разделяли в 1,5%-ном агарозном геле и окрашивали бромистым этидием. 2 - инкубация ядер без фермента 60мин, 6, а, г - инкубация ядер с ферментом, 100ед/мг ДНК 10, 30, 60мин соответственно.

также при гибридизации с промоторной областью гена Р-ЭФР (результаты не приведены).

Наши результаты показали, что активация транскрипции человеческого протоонкогена Р-ЭФР сопровождается полным разрушением нуклеосом в промоторной и кодирующей областях гена. Можно сделать вывод, что выбор типа структурных изменений хроматина при активном уровне транскрипции зависит, по-видимому, от особенностей регуляции транскрипции данного гена. Это могут быть: полное разрушение нуклеосом; образование необычных по размерам нуклеосом; деление нуклеосом на две половинки; нераспределение нуклеосом; ослабевание ДНК-гистоновых взаимодействий; структурные изменения хроматина более высокого порядка. Структурные изменения хроматина при высокой транскрипции в некоторых случаях сопровождаются фосфорилированием [16], ацетилированием [5], рибозилированием [15] гистонов.

Открытая конформация хроматина при транскрипции образуется разными способами, обеспечивая доступ молекулы РНК-полимераз и регуляторных факторов.

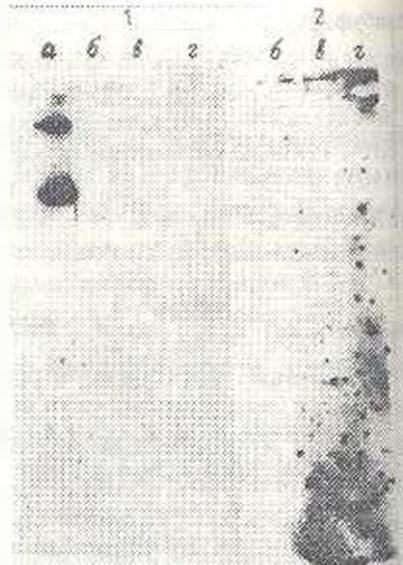


Рис. 2. Микроокково-нуклеазное переваривание очищенных ядер клеток *HeLa* и блот-гибридизация с кодирующей областью человеческого протоонкогена рецептора эпидермального фактора роста. 2.1 - короткая экспозиция, а - плазмида PERCAT 1, б, в, г - инкубация ядер с ферментом 10, 30, 60 мин соответственно. 2.2 - то же, что и 2.1, но без плазмиды PERCAT 1 и длительная экспозиция.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Джербашьян А.Р., Вашакидзе Р.П., Карпов В.Л., Колчинский А.М., Мирзабеков А.Д. Мол. биол., 22, 231-241, 1988.
2. Джербашьян А.Р. Канд. дисс., М., 1989.
3. Манниатис Т., Фрич Э., Селзбрук Д.Ж. Методы генетической инженерии, М., 1984.
4. Benaglia R., Cantor Ch.R., Axel R. Cell, 44, 697-704, 1986.
5. Bertrand E., Erard M., Gomez Lira M. and Bode J. Arch. Biochem. Biophys., 229, 395-398, 1984.
6. Berkens J.A.M., Henegoumen P.M.P.V.E., Boonstra J.A.J. Biol. Chem., 226, 922-927, 1991.
7. Dudet P., Spadafora C. and Chambon P. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 301-312, 1977.
8. Felsenfeld G. Nature, 355, 219-224, 1992.

9. Franke W.W., Scheer U., Trendelenburg M.F., Spring H. and Zentgraf. *Cytobiologie*, 13, 401-434, 1976.
10. Gottesfeld Y.M., Melton D.A. *Nature*, 273, 317-319, 1978.
11. Johnson A.C., Ishii S., Jinno J., Pastan I. and Mertino G.T. *J. Biol. Chem.*, 263, 5693-5699, 1988.
12. Karpov V.L., Preobrazhenskaya O.V., Mirzabekov A.D. *Cell*, 36, 423-431, 1984.
13. Kirou N., Tsaneva I. and Tsanev R. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 130, 364-371, 1985.
14. Maniatis J., Jeffrey A., Kleid O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1184-1189, 1985.
15. Mathis G. and Althous F.R. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 143, 1049-1054, 1987.
16. Mazen A., Hacques M.F., Marion C. *J. Mol. Biol.*, 194, 741-746, 1987.
17. Mirzabekov A.D., Karpov V.L., Preobrazhenskaya O.V., Dzherbashian A.R., Shik V.V., Belyavsky A.V. *Current Trends in Life Science*, 12, 1-7, 1983.
18. Mirzabekov A.D., Bavykin S.J., Karpov V.L., Preobrazhenskaya O.V., Ebralidze K.K., Tuneev V.M., Melnikova A.F., Bogudze E.J., Chenchik A.A. and Baebalashvili R.S. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, XXVII, 503-509, 1983.
19. Nacheva G.A., Guschin D.Y., Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Ebralidze K.K., Mirzabekov A.D. *Cell*, 58, 27-36, 1989.
20. Prior C.R., Cantor C.A., Johnson E.M., Littin V.C., Alfrey V.A. *Cell*, 34, 1033-1042, 1983.
21. Ryoji M. and Worcel A. *Cell*, 40, 923-932, 1985.
22. Southern E.M. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517, 1975.
23. Sun Y.L., Xu Y.Z., Bellard M., Chambon P. *EMBO J.*, 5, 293-301, 1986.
24. Wu C., Woup Y-Ch. and Elgin S.C.R. *Cell*, 16, 807-814, 1979.
25. Wintraub H., Worcel A., Albert B. *Cell*, 9, 409-417, 1976.
26. Xu M., Barnard M.B., Roso S.M., Cockerill P.N., Huang S. Y., Garrard W.T. *J. Biol. Chem.*, 261, 3838-3846, 1986.
27. Xu Y. H., Ishii S., Clark A.J.L., Sullivan M., Wilson R.K., Ma D.F., Rose B.A., Mertino G.T. and Pastan I. *Nature*, 309, 806-809, 1984.

Ноември 19 IX 1998