

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

Р. А. Захарян, А. С. Сафарян, Н. Т. Гаспарян

К механизму стимуляции процесса ДНК-опосредованной трансформации клеток HeLa Na-бутиратом и дб-цАМФ

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР К. Г. Карагесяном 12/1 1989)

Трансформация клеток млекопитающих путем введения чужеродной ДНК, индивидуальных генов сопровождается интеграцией вводимого гена в геном клетки, его экспрессией, стабильно и наследуемо сохраняемым изменением в фенотипе реципиентных клеток (^{1, 2}). Вместе с тем частота стабильной трансформации, выявляемая в условиях селективного отбора, обычно низкая и механизмы, способствующие интеграции внеклеточной ДНК в геном реципиентной клетки, мало изучены.

Ранее нами было показано, что повышение эффективности трансформации клеток HeLa ДНК, рSV 2 гено Na-бутиратом, дибутирил-цАМФ (дб-цАМФ), диметилсульфоксидом (ДМСО), двуинтевой РНК коррелирует со структурными изменениями, индуцированными этими соединениями в хроматине: увеличение доли активного деконденсированного хроматина, относительно большая доступность хроматина к ДНКазе I, микрококковой нуклеазе, Са/Mg-зависимой эндонуклеазе. Было установлено, что индуцированные разрывы ДНК клеток HeLa локализованы в участках, обогащенных повторяющимися последовательностями, что и, по-видимому, предопределяет интеграцию трансформирующего гена в зоны ДНК, представленные повторами (³).

В данном сообщении приведены результаты изучения функционального состояния хроматина и интегрированного гена «neo» в клетках стабильных трансформантов клеток HeLa, полученных трансформацией ДНК рSV 2 neo в присутствии Na-бутирата, дибутирил цАМФ (8-бром-цАМФ) в условиях селективного отбора (антибиотик g—418) к 18—20 ч культивирования.

Учитывая, что активные гены проявляют предпочтительную чувствительность к нуклеолитическому воздействию ДНКазы I, равно как и к микрококковой нуклеазе (⁴), мы исследовали расщепление этими нуклеазами хроматина трансформантов HeLa neo⁺.

Ядра, выделенные из клеток HeLa, суспендировали в растворе 3мМ MgCl₂, 1мМ CaCl₂, 10мМ NaCl, 10мМ трис-HCl pH 7,4 из расчета 1мг ДНК/мл и обрабатывали ДНКазой 10ел/мл 5 мин 37°C.

Реакцию останавливали добавлением к инкубационной среде 10 мМ ЭДТА, 0,1%-ного додецилсульфата натрия и 0,5 М NaCl. Далее реакционную смесь инкубировали 3 ч при 37°C с протеазой «К» 100 мкг/мл; ДНК экстрагировали один раз 1,5 объема смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (50:24:1) и один раз 1,5 объема смеси хло-

роформизоамиловый спирт (24:1). Экстрагированную ДНК осаждали 2 объемами абсолютного спирта при 20°C. Осадок ДНК растворили в 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl pH 8.0 в концентрации 1 мг/мл. Электрофорез экстрагированной ДНК (30 мкг) проводили в 1%-ном агарозном геле. ДНК в геле окрашивали этидиум-бромидом, визуализацию ДНК проводили на UV-иллюминаторе (ФРГ).

Как Na-бутират, дб-цАМФ существенно увеличивали долю хроматина клеток HeLa, гидролизуемой ДНКазой I. У всех же полученных на 18-й день культивирования трансформантов HeLa-peo⁺ устойчивость хроматина к ДНКазе I восстанавливалась. Выявленные изменения в структуре хроматина указывают на то, что использованные стимуляторы процесса трансформации в период трансформации клеток HeLa существенно увеличивали долю деконденсированного хроматина, гиперчувствительной к ДНКазе I. Вместе с тем это состояние хроматина оказалось преходящим, и у трансформантов HeLa-peo⁺ устойчивость хроматина к ДНКазе I вновь восстанавливалась.

Для выяснения характера структурной организации интегрированного в хромосому гена «peo» в трансформантах HeLa-peo⁺ мы изучили доступность интегрированных копий гена «peo» к солюбилизации при расщеплении хроматина микрококковой нуклеазой.

Ядра в концентрации 75 A₂₆₀/мл гидролизовали микрококковой нуклеазой I ед на 50 мкг ДНК в течение 5 мин в буфере, содержащем 0,25 М сахарозы, 50 мМ KCl, 15 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 15 мМ морфолинсульфоновой кислоты, 0,1 мМ фенилсульфонилфлюорида, pH 6,6. Реакцию останавливали добавлением ЕГТА до конечной концентрации 10 мМ. Глубину гидролиза хроматина контролировали по степени освобождения кислоторастворимых олигонуклеотидов в пределах 1—1,5%. Одновременно гидролизованный хроматин фракционировали на растворимую и нерастворимую фракции (осадок), получаемые после центрифугирования обработанного хроматина при 9000 г 5 мин. Во всех используемых буферах присутствовал 5 мМ Na-бутират.

Экстрагированная ДНК была фракционирована электрофорезом в ПААГ и продукты гидролиза изучали методом гибридизации по Саутэрну (5).

Как видно из рис. 1, при расщеплении хроматина трансформантов HeLa-peo⁺ микрококковой нуклеазой ген «peo» выявлялся как в супернатанте (С-фракция), так и в нерастворимой фракции (О-фракция) хроматина, что указывает на частичную солюбилизацию гена «peo» из хроматина. Это позволяет заключить, что не все интегрированные копии гена «peo» функционально активны.

В следующей серии экспериментов мы культивировали трансформанты HeLa-peo⁺-бутират (полученные в присутствии бутирата) в течение 18 ч в питательной среде, содержащей Na-бутират, и соответственно трансформанты HeLa-peo⁺-цАМФ культивировали в питательной среде, содержащей дибутирил-цАМФ. Далее из клеток выделяли хроматин, обрабатывали микрококковой нуклеазой и продукты гидролиза изучали методом гибридизации по Саутэрну на содержание гена «peo». Как видно из рис. 2, для всех изученных трансформантов HeLa-

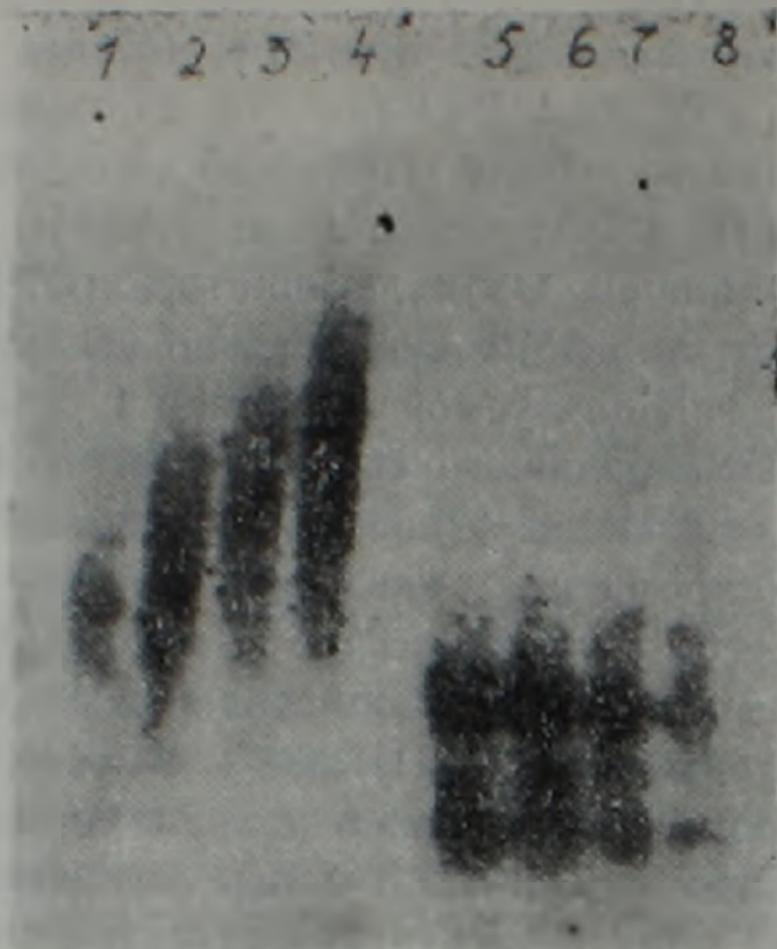


Рис. 1. Хроматин трансформантов *Neoa neo*⁺, расщепленный микрококковой нуклеазой и фракционированной центрифугированием на растворимую (С) и нерастворимую (О) фракции, которые были анализированы электрофорезом в ПААГ. с последующей гибридизацией с [³²P]-ДНК рSV 2 *neo*. 3, 4, 7, 8—хроматин *Neoa neo*⁺, трансформированных в присутствии Na-бутирата (обработка нуклеазой 5 мин); 1, 2, 5, 6—хроматин *Neoa neo*⁺, трансформированных в присутствии дб-цАМФ (обработка нуклеазой 10 мин);

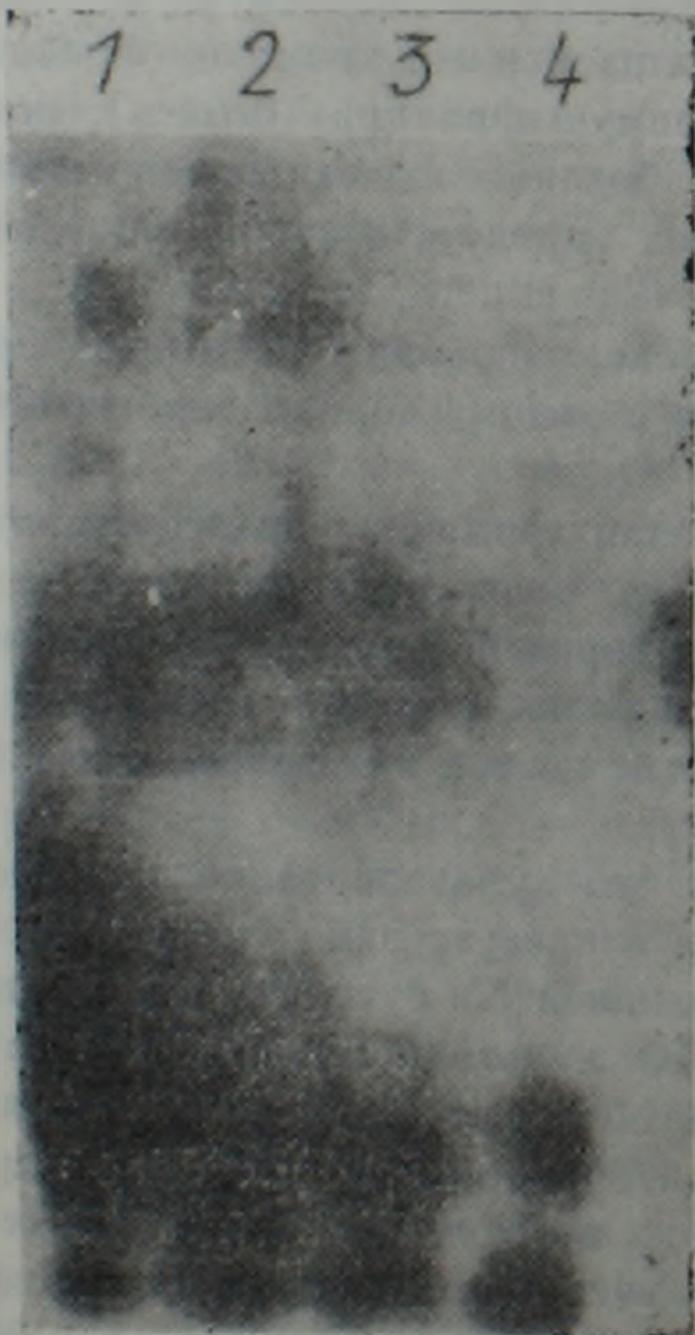


Рис. 2. Хроматин трансформантов *Neoa neo*⁺, расщепленный микрококковой нуклеазой, после предварительного культивирования клеток *Neoa neo*⁺ в присутствии Na-бутирата (1, 2) и дб-цАМФ (3, 4) (далее см. подпись к рис. 1)

neo⁺ ген «neo» обнаруживался исключительно в С-фракции, что указывает на активацию индукторами геной активности Na-бутиратом и цАМФ всех копий интегрированного гена «neo» в соответствующих последовательностях клонов HeLa-neo⁺.

Вместе с тем в перекрестном эксперименте, когда клетки HeLa-neo⁺-бутират, содержали в питательной среде с цАМФ, а клетки HeLa-neo⁺-цАМФ в среде с Na-бутиратом, полной солюбилизации для всех интегрированных копий гена «neo» не происходило.

Полученные результаты показывают, что в трансформантах HeLa-neo⁺ ген «neo» интегрирует в участки хроматина избирательно «активируемые» Na-бутиратом или цАМФ.

В изученных трансформантах HeLa-neo⁺ ген «neo» интегрирован в количестве нескольких копий как в функционально активные, так и в «молчащие» участки ДНК. Одновременно, «молчащие» участки ДНК с геном «neo» избирательно активируются Na-бутиратом или цАМФ. Эти данные позволяют заключить, что повышение частоты трансформации HeLa геном «neo» в присутствии Na-бутирата или цАМФ достигается индукцией в определенных локусах хроматина структурных изменений, характерных для активированного состояния хроматина, повышающих вероятность избирательной интеграции в геном экзогенно-вводимого гена «neo».

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Ա. Ո. ՍԱՅԱՐՅԱՆ, Ն. Տ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ

Na-բուտիրատով և դբ—ցԱՄՖ HeLa բջիջների ԴՆԹ միջնորդված տրանսֆորմացիայի պրոցեսի ստիմուլյացիայի մեխանիզմի մասին

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ HeLa բջիջների տրանսֆորմացիայի հաճախակտնությունը բարձրացումը «neo» գենի միջոցով Na-բուտիրատի կամ ցԱՄՖ ներկայությամբ տեղի է ունենում բրոմատինի ակտիվացած վիճակին բնորոշ որոշ լոկուսների կառուցվածքային փոփոխությունների ինդուկցիայի շնորհիվ, դա բարձրացնում է «neo» գենի ինտեգրացիայի հավանականությունը բրոմատինի այն հատվածներում, որոնք ընտրովի են ակտիվանում Na-բուտիրատով կամ ցԱՄՖ-ով:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ HeLa հետազոտված տրանսֆորմատներում «neo» գենը ինտեգրացված է մի քանի պատճեններով, ինչպես ԴՆԹ-ի ֆունկցիոնալ ակտիվ հատվածներում, այնպես նաև «լոռդ» հատվածներում:

ЛИТЕРАТУРА—ԻՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ A. Pellicer, M. Wigler, R. Axel, Cell, v. 24, № 1, p. 133–141 (1978). ² S. N. Sllaty, H. V. Aposhian, Science, v. 220, № 4508, p. 725–727 (1983). ³ S. Kato, R. A. Anderson, D. Camerini-Otero, Mol. Cell. Biology, v. 6 № 5, p. 1787, 1986. ⁴ R. S. Bloom, J. N. Anderson, Cell, v. 15, p. 141–150 (1978) ⁵ E. M. Southern, J. Mol. Biol. v. 98, № 3, p. 503–517 (1975).