

На правах рукописи

ФИЛАТОВ

Леонид Васильевич

УДК 616.155.392-036.11-07:576.316:577.212.3

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ АИИ-СЕМЕЙСТВА
В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА**

03.00.25 — КЛЕТочная биология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ЛЕНИНГРАД
1990



Работа выполнена в лаборатории стабильности хромосом и клеточной инженерии Института цитологии АН СССР.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Н. В. ТОМИЛИН,
кандидат биологических наук С. Е. МАМАЕВА

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук В. С. БАРАНОВ,
доктор биологических наук С. Н. БОРХСЕНИУС

Ведущее учреждение: Институт экспериментальной медицины АМН СССР.

Защита диссертации состоится « 23 » *марта* 1990 г.
в *13* часов на заседании Специализированного совета Д.002.73.01 Института цитологии АН СССР по адресу: 194064, Ленинград, Тихорецкий проспект, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии АН СССР.

Автореферат разослан « 22 » *февраля* 1990 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета
кандидат биологических наук

Л. Н. ПИСАРЕВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Изучение структурно-функциональной организации эукариотического генома неразрывно связано с комплексным исследованием рассеянных повторяющихся элементов - последовательностей ДНК, обнаруженных в геномах многих представителей позвоночных.

Наиболее многочисленным семейством повторяющихся последовательностей генома человека является семейство Alu1, состоящее из нескольких сот тысяч коротких /300п.н./ рассеянных ДНК-повторов /Houck et al., 1979; Schmid, Jelinek, 1982/. Ряд структурных особенностей Alu-повторов, а также некоторые экспериментальные результаты позволяют предположить, что они являются мобильными элементами генома - ретропозонами /Rogers, 1985a; Daniels, Deininger, 1985; Lin et al., 1988/. С другой стороны, появились данные об участии Alu-повторов в формировании молекулярной структуры митотических хромосом /Manuelidis, Ward, 1984; Korenberg, Rykowski, 1988/. Исследования с использованием флуоресцентного варианта гибридизации *in situ* показали, что отдельные районы генома, соответствующие R-дискам метафазных хромосом, преимущественно обогащены Alu-повторами /Korenberg, Rykowski, 1988/. Многие практические наблюдения свидетельствуют, что в таких областях генома могут происходить локальные перестройки ДНК /Calabretta et al., 1982; Lehrman et al., 1985; Lehrman et al., 1986; Lehrman et al., 1987/. Все эти перестройки были выявлены у пациентов с различными заболеваниями: острым лейкозом, хроническим миелоидным лейкозом, семейной гиперхолестеринемией. В связи с этим представляет интерес тот факт, что участки хромосом, локально обогащенные Alu-повторами /R-диски/ часто совпадают по локализации с районами, претерпевающими неслучайные изменения при различных злокачественных заболеваниях крови /Mitelman, 1986/. Плотность Alu-повторов в таких районах генома значительно выше их обычной плотности при среднем расстоянии между ними в 5-10т.п.н. Поскольку оба мономера Alu-повтора

имеют значительную степень гомологии /до 70%/ , то в области кластеров Alu-повторов велика вероятность различных рекомбинационных событий /Heisterkamp^{et} al., 1985; Rogers , 1985b/. В 1985 году Роджерс предложил гипотезу, согласно которой Alu-повторы могут быть "горячими" точками незаконной рекомбинации, иными словами, генетическая стабильность в участках хромосом, обогащенных Alu-повторами значительно понижена.

Таким образом, становится очевидной актуальность цитогенетического картирования Alu-повторов на метафазных и прометафазных хромосомах человека, поскольку оно позволяет определить места повышенной концентрации Alu в норме и патологии и, тем самым, выявить потенциально нестабильные участки генома, а также изучить молекулярные механизмы образования кластеров Alu-повторов в новых районах генома.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение особенностей распределения кластеров Alu-повторов на метафазных хромосомах ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови здоровых людей /доноров/ и лейкозных клеток костного мозга больных острым лейкозом. Для осуществления поставленной цели последовательно решались следующие задачи:

1. Картирование на метафазных хромосомах ЭН-ДНК-зонда, содержащего сгруппированные повторы Alu-семейства методом гибридизации *in situ* в сочетании с дифференциальным G-окрашиванием хромосом.

2. Статистическая оценка вероятности случайного распределения гранул серебра над локусами хромосом, положительно отвечающими на гибридизацию.

3. Определение мест предпочтительной локализации Alu-повторов на хромосомах доноров и больных острым лейкозом.

4. Выявление сходства и различий в локализации кластеров Alu в геноме доноров и больных острым лейкозом.

5. Сопоставление участков преимущественной локализации Alu-повторов с положением "горячих" точек хромосомных перестроек, клеточных протонкогенов и фрагильных сайтов.

Научная новизна работы. Впервые проведено прямое картирование повторяющихся последовательностей Alu-семейства на метафазных хромосомах человека с полной идентификацией всех мест гибридизации. Доказан неслучайный характер распределения Alu-повторов в геноме человека. Выявлены различия в локализации кластеров Alu-повторов в геноме доноров и больных острым лейкозом. Разработан вариант совмещения гибридизации *in situ* с дифференциальным G-окрашиванием хромосом, пригодный для картирования кластеров повторяющихся элементов генома на цитологических препаратах метафазных хромосом.

Практическая ценность работы. Предложенный метод картирования Alu-повторов позволяет идентифицировать участки хромосом, содержащие кластеры Alu-повторов, что способствует выявлению потенциально нестабильных районов генома. Выделение и клонирование ДНК из этих районов дает возможность исследовать пути активации клеточных протоонкогенов и изучить механизм формирования кластеров Alu-повторов в новых районах генома. В дальнейшем возможно использование полученных результатов для ранней диагностики лейкозов человека.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на У Всесоюзном совещании "Структура и функции хромосом" /Пушино, 1985/, на Всесоюзной конференции "Молекулярная биология генов высших организмов" /Москва, 1987/, на VIII двухстороннем симпозиуме СССР - ФРГ "Структура генома и регуляция активности генов" /Иркутск, 1989/, на II Международном рабочем совещании по клеточному ядру /Суздаль, 1989/, а также на семинарах лаборатории стабильности хромосом и клеточной инженерии Института цитологии АН СССР.

Объем работы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и обсуждения, заключения и выводов. Иллюстративный материал содержит 34 рисунка и 11 таблиц. Список литературы включает 96 наименований, из них 92 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы три ДНК-зонда для гибридизации *in situ*: ДНК λ 42. Рекомбинантный фаг λ 42, содержащий сгруппированные повторы *Alu*-семейства был выделен Н.В.Томилиным из геномной клонотеки человека путем гибридизации с меченой ^{32}P быстроренатурирующей фракцией плацентарной ДНК человека $C_{0,t} < 0,001$ /. Библиотека генов человека, любезно предоставленная И.Фодором и Т.Н.Копыловой-Свиридовой /Институт биохимии и физиологии АН СССР, Пущино/, была получена частичным расщеплением ДНК, выделенной из лимфоцитов, рестриктазой *EcoRI* и клонированием в фаговом векторе λ Charon4A. Количество *Alu*-повторов в ДНК клона λ 42 было проверено гибридизацией по Саузерну с использованием в качестве зонда ^{32}P -ДНК плазмиды *Blur8*: при расщеплении рестриктазой *HinfI* ДНК λ 42 дает не менее 8 дискретных зон гибридизации. Поскольку каждая вставка *Alu* при расщеплении *HinfI* может дать только один фрагмент, гибридизующийся с *Alu*-пробой, клон λ 42 содержит, по крайней мере, 8 *Alu*-повторов. ДНК *Blur8*. Плазмидный клон *Blur8*, содержащий 1 *Alu*-повтор /Rubin et al., 1980/, был любезно предоставлен В.В.Носиковым /Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва/. ДНК λ G1857. ДНК нерекомбинантного фага λ . Была использована в качестве контроля гибридизации *in situ* зонда λ 42.

Размножение фага λ 42 в бактериальном штамме K802 и выделение фаговой ДНК проводили стандартными методами /Mantatis et al., 1982/. Все три ДНК-зонда метили ^3H -дезоксинуклеозидтрифосфатами методом ник-трансляции до удельной активности $0,5-2,0 / \times 10^7$ имп./мин. на 1 мкг.

Для приготовления препаратов метафазных хромосом были использованы ФГА-стимулированные Т-лимфоциты периферической крови 4 доноров и большого острым миелобластным лейкозом /ОМЛ/ МВ /46,XY,5q⁻/, а также лейкозные клетки костного мозга больных острым лейкозом - ОВ и МА /46,XX,СМЛ/, КВ и ДВ /46,XY, острый лимфобластный лейкоз - ОЛЛ/ и МВ. Культивирование лимфоцитов проводили на основе полумикрометода /Hungerford

et al., 1965/. Клетки костного мозга больных острым лейкозом культивировали во флаконах со средой RPMI-1640 без добавления ФГА в течение 24 или 48 часов.

Эксперименты по гибридизации *in situ* проводили по методу Герхард /Gerhard et al., 1981/. На каждый препарат наносили 2×10^5 имп./мин. Препараты, покрытые эмульсией /"Ilford" или "M", разведение 1:2/ экспонировали в течение 16-20 дней при температуре -4°C . Дифференциальное окрашивание хромосом на G-диски красителем Райта после гибридизации *in situ* /без предварительной обработки/ проводили по методу Юниса /Yunis et al., 1978; Chandler, Yunis, 1978/, а также с использованием трипсина /Seabright, 1971/.

Идентификацию хромосом, подсчет зерен серебра и определение их локализации над хромосомными сегментами осуществляли по микрофотографиям дифференциально окрашенных метафазных пластинок. Съемку производили на пленку "Микрат-300" с микроскопа "Amplival". В каждом варианте гибридизации *in situ* исследовали по 20 случайно выбранных метафазных пластинок, единственным требованием к которым было сохранение полного хромосомного набора. Результаты распределения зерен серебра над каждой из 20 метафазных пластинок суммировали и наносили на схемы дифференциально окрашенных хромосом соответственно тем G- и R-дискам, над которыми эти зерна серебра были обнаружены. Таким образом, было получено распределение зерен серебра над хромосомами для всех вариантов гибридизации *in situ*.

Определение мест предпочтительной локализации осуществляли по суммарной картине распределения зерен серебра. Статистическую обработку проводили методом χ^2 /Gerhard et al., 1981/.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Условия гибридизации *in situ* и постановка эксперимента.

ДНК-зонды, использованные для гибридизации *in situ*, имели удельную активность в пределах $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$

имп./мин. на I мкг. При такой удельной активности уникальные участки хромосом, гомологичные уникальным вставкам в клоне $\lambda 42$, не могут давать заметного ответа при гибридизации. Вместе с тем, общая длина Alu-вставок в ДНК $\lambda 42$ не превышает 10% фаговой ДНК, поэтому специфическая Alu-метка в пробах для гибридизации *in situ* составляет не более 10% всей метки. При таких условиях гибридизации наиболее интенсивный ответ должны давать участки хромосом, содержащие кластеры Alu-повторов, а не отдельные копии Alu. Важно, что результат гибридизации с $\lambda 42$ -пробой был качественно тем же самым, что и с плазмидой *Blur8*, содержащей I Alu-повтор. Поэтому картина гибридизации, наблюдаемая с ^3H -ДНК $\lambda 42$, по всей вероятности реально отражает распределение Alu-повторов, а не каких-либо других высококопийных повторов, возможно присутствующих в ДНК $\lambda 42$.

Таблица I

Варианты опытов гибридизации *in situ* с тремя различными ^3H -ДНК-зондами

Зонды для гибриди- зации	Нормальные клетки				Лейкозные клетки						
	Д о н о р ы				Больные острым лейкозом						
	СМ	ИЛ	ЛФ	ИК	МВ	ОВ	МА	КВ	ДВ	МВ, 5q ⁻	
ДНК $\lambda 42$	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	
ДНК <i>Blur8</i>	C1	-	-	-	-	-	-	C2	-	-	
ДНК $\lambda c1857$	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	C4	

В периферической крови больного МВ после стимуляции ФГА были выявлены две фенотипически различные популяции клеток: нормальные Т-лимфоциты /46,XY/ и лейкозные клетки, в кариотипе которых была обнаружена делеция дистальной части длинного плеча одного из гомологов хромосомы 5 - $\text{del}(5)(\text{qter}) \rightarrow \text{q21}$ /. Наличие специфического маркера в клоне лейкозных клеток больного МВ позволило исследовать распределение ДНК $\lambda 42$ как в лейкозных клетках, так и в нормальных Т-лимфоцитах. Суммарная картина распределения зерен серебра на хро-

мосомах I и 6 во всех вариантах гибридизации *in situ* показана на рисунках 1 и 2. Аналогично было построено распределение метки и для всех остальных хромосом.

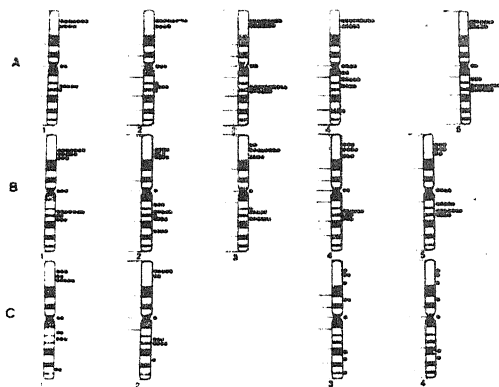


Рис.1. Локализация Alu в хромосоме I. Здесь и на рис.2: А,В - зонд ДНК λ 42; С, I-2 - зонд ДНК B1ur8; С, 3-4 - зонд ДНК λ С1857; А, I-4 - доноры, А5 - больной МВ /кровь с \overline{TA} /, В, I-5 - больной острым лейкозом, С1 и С3 - донор СМ, С2 и С4 - больные КВ и МВ /5q⁻/.



Рис.2. Локализация Alu в хромосоме 6.

2. Распределение ^3H -ДНК λ 42 в геноме исследованных людей. "Консервативные" и "вариабельные" локусы гибридизации в геноме доноров и больных острым лейкозом.

Анализ суммарной картины распределения гранул серебра на метафазных хромосомах во всех вариантах гибридизации *in situ* позволил выявить как общие для каждой группы /доноры и больные острым лейкозом/, так и индивидуальные /характерные для отдельных людей/ хромосомные локусы, положительно отвечающие на гибридизацию с ^3H -ДНК λ 42. Для определения хромосомных локусов, характерных для всех исследованных людей, а также локусов, специфичных для каждой группы, проведено сравнение характера распределения общих участков гибридизации, выявленных на метафазных хромосомах доноров и больных острым лейкозом /Табл.2/.

Таблица 2.

Распределение общих локусов гибридизации в геноме доноров и больных острым лейкозом. Кластеры Alu-повторов в хромосомах человека.

Хромосомный локус	Тип диска	Н О Р М А					?	ОСТРЫЙ ЛЕЙКОЗ					Тип клас-тера
		СМ	ИЛ	ЛФ	ИК	МВ		ОВ	МА	КВ	ДВ	МВ, 5q ⁻	
1p32-p35	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
1q21-q25	R/G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
2q22-q23	G/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
3q26.2	R	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	В
6p21	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
6q14-q15	G/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
6q22	G	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	В
7q21-q22	G/R	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	В
8p11-p12	R/G	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	В
10p13-p14	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
10q21-q22	G/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
11p14-p15	G/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
11q13-q14	R/G	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	К

Таблица 2 /продолжение/.

Хромосом- ный локус	Тип диска	Н О Р М А					ОСТРЫЙ ЛЕЙКОЗ					Тип клас- тера
		СМ	ИЛ	ЛФ	ИК	МВ	ОВ	МА	КВ	ДВ	МВ, 5q ⁻	
I3cen	cen	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	?
I3q2I-q22	G/R	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	?
I4cen	cen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
I4q24	R	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	В
I5q2I	G	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	В
I6pI3	R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
I6cen	cen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К
I7qI2-q2I	R/G	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	?
2Icen	cen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	К

Примечание: знаком + отмечены хромосомные локусы, гибридизирующиеся с ^3H -ДНК λ 42 / $P_0 < 0,05$ /, знак - означает отсутствие гибридизации / $P_0 > 0,05$ /. К - "консервативные", В - "вариабельные" кластеры.

Анализ данных, представленных в таблице 2, показал, что все участки хромосом, гибридизирующиеся с ^3H - λ 42-пробой, можно разделить на две основные группы:

1. Хромосомные локусы, выявленные во всех вариантах гибридизации *in situ* /варианты АI-A5 и ВI-B5/, всего 12 локусов;

2. Хромосомные локусы, обнаруженные только в геноме доноров /варианты АI-A4/ - 1 локус, или только в геноме больных острым лейкозом /варианты ВI-B5/ - 5 локусов.

Хромосомные локусы первой группы были названы "консервативными", поскольку присутствуют в геноме всех исследованных людей; хромосомные локусы второй группы - "вариабельными". Кроме "консервативных" и "вариабельных" участков гибридизации, выявляются еще "неопределенные" локусы, то есть те участки хромосом, которые гибридизуются с ^3H -ДНК λ 42 в большинстве, но не во всех вариантах опыта. Таких локусов /в табл.2 они обозначены знаком "?"/ обнаружено че-

тире: IIqI3-qI4 /отсутствует у больной МА, обозначен К/, I3cen /отсутствует у больных СВ и МА/, I3q2I-q22 /отсутствует у больных СВ, МА и ДВ/ и I7qI2-q2I /отсутствует у больных СВ, ДВ и МВ, 5q⁻/.

В связи с наличием "вариабельных" участков гибридизации, обращает на себя внимание "промежуточный" характер распределения этих локусов в хромосомах клеток крови больного МВ. Наряду с "вариабельным" локусом 6q22, характерным для нормальных Т-лимфоцитов, в геноме больного МВ /вариант гибридизации А5/ выявлены также два "вариабельных" участка гибридизации, характерных для клеток костного мозга больных острым лейкозом: 3q26 и 7q2I-q22. Такой "промежуточный" результат может быть связан с присутствием в плазме крови больного МВ клона лейкозных клеток, фенотипически неотличимых от нормальных ФГА-стимулированных Т-лимфоцитов. Если такой лейкозный клон с нормальным кариотипом действительно существует, то он мог быть учтен при анализе 20 случайно выбранных метафазных пластинок больного МВ, что привело к промежуточному характеру распределения зерен серебра в локусах 3q26 и 7q2I-q22.

3. Распределение ³H-ДНК *Blur8* в геноме донора СМ и больного острым лейкозом КВ.

Отличительной особенностью гибридизации с ³H-ДНК *Blur8* было уменьшение количества выявленных гранул серебра по сравнению с ³H-ДНК λ 42 /что вполне согласуется с меньшей "мощностью" *Blur8* по сравнению с λ 42/, однако число участков гибридизации осталось на прежнем уровне. Характер распределения ³H-ДНК *Blur8* на метафазных хромосомах донора СМ и больного КВ /варианты гибридизации С1 и С2/ в целом повторяет картину гибридизации с ³H-ДНК λ 42 в вариантах А1 и В3.

4. Контроль гибридизации *in situ*.

Донор СМ и больной ОМЛ МВ/5q⁻/ были исследованы с использованием нерекомбинантной ДНК флага λ c1857, не содержащей вставок *Alu*. При анализе суммарной картины распределения немногочисленных гранул серебра ни в одной из хро-

мосом не было выявлено участка, достоверно гибридизирующегося с ^3H -ДНК λ C1857. Некоторый фон гибридизации с ^3H -ДНК λ C1857 / $P_0 > 0,05$ / тем не менее был обнаружен, однако регулярного расположения гранул серебра над хромосомами не наблюдалось.

5. Неслучайность распределения Alu-повторов в геноме человека.

Хорошая воспроизводимость картины гибридизации ДНК λ 42 с метафазными хромосомами разных людей свидетельствует о том, что некоторые районы хромосом человека сильно обогащены Alu-повторами и что наблюдаемые кластеры Alu не являются случайными. Маловероятно, что кластеры, выявляемые при гибридизации с ^3H -ДНК λ 42, являются следствием дифференциальной денатурации ДНК в различных участках хромосом, так как в некоторых хромосомах /например в хромосомах I4, I6 и 2I/ кластеры зерен серебра наблюдались над центромерами, где локализована высокоповторяющаяся ДНК и трудно ожидать избыточной денатурации. В то же время в отдельных хромосомах /4, I9, 20, X и Y/ кластеры Alu вообще не наблюдались ни в одном из исследованных случаев. По всей видимости эти хромосомы, а также большинство других хромосомных локусов, не обнаруживающих избыточной гибридизации с ^3H -ДНК λ 42, имеют более или менее равномерное распределение Alu-повторов. Если допустить, что среднее расстояние между Alu-повторами в этих областях генома соответствует 10 т.п.н., то в области кластеров должно наблюдаться примерно десятикратное увеличение плотности Alu-повторов в пределах одного или нескольких хромосомных локусов /около 1000 Alu-повторов на диск в 1000 т.п.н./ . Из этого следует, что дифференциальная гибридизация Alu-пробы с человеческими метафазными хромосомами по-видимому отражает реальное распределение Alu-повторов в геноме человека, которое явно не случайно.

6. Возможные пути формирования "консервативных" и "вариабельных" кластеров Alu-повторов.

Высокая плотность Alu-повторов может быть связана с локальной геномной нестабильностью /Calabretta et al., 1982/ и даже присутствие немногочисленных копий Alu-повторов приво-

дит, в ряде случаев, к различным рекомбинационным событиям /Lehrman et al., 1985; 1986; 1987/. Однако, наши результаты свидетельствуют о крупномасштабных перестройках Alu-повторов, имеющих однотипный характер у пяти независимых больных острым лейкозом и охватывающих районы хромосом длиной порядка миллионов пар нуклеотидов. Появление новых кластеров Alu в хромосомах 3, 7, 8, 14 и 15 клеток костного мозга больных острым лейкозом может быть связано с процессом массовой направленной транспозиции Alu-повторов /недавно было экспериментально продемонстрировано, что под влиянием УФ-облучения частота транспозиций Alu может увеличиваться в десятки и сотни раз - Lin et al., 1988/.

"Вариабельные" кластеры Alu могут появляться также в результате автономной амплификации, если существуют условия для активирования области начала репликации Alu-повтора /Johnson, Jelinek, 1986/. Другая возможность заключается в умеренной амплификации Alu в составе генов, локализованных в "вариабельных" локусах хромосом.

Не исключено, что изменение копиности Alu в некоторых районах хромосом имеет адаптивное значение и может стимулировать синтез поверхностного лейкозного антигена, подобно тому, как это происходит при введении NSAG-элементов в нормальные, нелейкозные клетки /Stanners et al., 1981; Beitel et al., 1986; Chamberlein et al., 1986/.

Ограниченность участков транспозиции или амплификации Alu /3q26, 7q21-q22, 8p11-p12, 14q24, 15q21, а также 7q32 в трех случаях острого лейкоза/ может и не иметь адаптивного значения и лишь отражать предпочтительную интеграцию или предпочтительную амплификацию Alu в определенных областях генома длиной более миллиона пар нуклеотидов /изохорах/, которые имеют то же высокое содержание GC-пар, что и сами Alu-повторы. Однако, участки хромосом, где локализованы "консервативные" и "вариабельные" кластеры Alu, могут быть как позитивными, так и негативными при дифференциальном G-окрашивании /см. табл.2/. Внутри GC-богатых или GC-бедных изохор тем не менее могут быть короткие AT-богатые вставки,

куда могут встраиваться Alu-повторы /Rogers, 1985a; Daniels , Deininger, 1985/.

Если "вариабельные" кластеры, выявленные в геноме больных различными формами острого лейкоза, вероятнее всего связаны со злокачественной трансформацией, то "вариабельный" кластер Alu, выявленный в геноме доноров /6q22/ и не обнаруженный ни в одном из случаев острого лейкоза, отражает, по-видимому, тканеспецифические различия. Дело в том, что у доноров были исследованы Т-лимфоциты, а среди больных не было ни одного случая Т-клеточного лейкоза /три случая ОМЛ и два случая В-клеточного ОМЛ/. В связи с этим представляет интерес тот факт, что при Т-клеточных лейкозах часто обнаруживаются делеции дистальной части длинного плеча хромосомы 6, в том числе и района 6q22 → qter/Mitelman, 1986/. В то же время при В-клеточных лейкозах и лимфомах такие делеции выявляются очень редко. Таким образом, наши результаты могут свидетельствовать о потенциальной нестабильности "вариабельного" кластера Alu, выявленного в локусе 6q22 в геноме доноров, что подтверждается цитогенетическими наблюдениями различных Т-клеточных неоплазий.

7. Биологическое значение "консервативных" и "вариабельных" кластеров Alu-повторов.

Одной из задач нашей работы было сопоставление выявленных кластеров Alu с наиболее нестабильными областями генома человека /табл.3/.

Таблица 3.

Соответствие "вариабельных" и "консервативных" кластеров Alu-повторов "горячим" точкам хромосомных перестроек, клеточным протоонкогенам и фрагильным сайтам.

Хромосомный локус	Точки разрывов хромосом	Клеточные протоонкогены	Фрагильные сайты
В 3q26	+	-	-
В 7q21-q22	+	-	+
В 8p11-p12	+	-	-
В 14q24	+	C-FOS	+

Таблица 3 /продолжение/.

Хромосомный локус	Точки разрывов хромосом	Клеточные протоонкогены	Фрагильные сайты
B 15q21	+	-	-
B 6q22	+	ROS, C-MYB	+
K 1p32-p35	-	FGR, LCK, C-SRC	+
		L-MYC, B-LYM, JUN	+
K 1q21-q25	+	C-SKI	+
K 2q22-q23	-	-	+
K 6p21	-	PIM	-
K 6q14-q15	+	-	-
K 10p13-p14	-	-	-
K 10q21-q22	-	-	-
K 11p14-p15	+	C-H-RAS1	-
K 11q13-q14	+	INT2, SEA, BCL1	+
K 14cen	+	TCRA	-
K 16p13	+	-	-
K 16cen	-	-	-
K 21cen	-	-	-

Сопоставление локализации кластеров Alu-повторов с точками разрывов хромосом, выявленными при гематологических злокачественных заболеваниях, показало, что все "вариабельные" кластеры находятся в области разрывов хромосом. В то же время локализация "консервативных" кластеров лишь в 6 случаях из 13 совпадает с локализацией точек разрывов хромосом. Локализация клеточных протоонкогенов совпадает с положением 2 "вариабельных" и 6 "консервативных" кластеров. При этом некоторые кластеры Alu-повторов совпадают с локализацией сразу нескольких онкогенов, а локус 1p32-p35 содержит 6 /!/ онкогенов. Фрагильные сайты выявлены в области 3 "вариабельных" и 3 "консервативных" кластеров.

Хотя в нашем исследовании не было выявлено ни одного случая хромосомных перестроек, затрагивающих "вариабельные" участки, все они могут вовлекаться в перестройки хромосом

при различных лейкозах и лимфомах /Mitelman, 1986/. Наиболее "горячими" из "вариабельных" кластеров оказались I4q24 и 6q22. Локус I4q24 совпадает по локализации с протоонкогеном C-FOS /Barker et al., 1984/ и фрагильным участком. Единственный "вариабельный" локус, выявленный в геноме доноров, содержит два онкогена: ROS и C-MYB, а также фрагильный сайт. Не исключено, что потенциальная нестабильность локуса 6q22, проявляющаяся при T-клеточных лейкозах, связана с активацией этих протоонкогенов.

Среди "консервативных" кластеров наибольший интерес вызывает локус 1p32-p35, в котором локализовано сразу 6 онкогенов и 2 фрагильных сайта. При такой значительной "нагруженности" отсутствуют какие-либо данные о вовлечении этого района в специфические хромосомные перестройки *in vivo*. Анализ суммарного распределения гранул серебра в этом участке показал, что у всех доноров метка локализована в локусе 1p34-p35, а у больных острым лейкозом характер распределения метки более "размытый" - охватывает район 1p32-p35 /рис.1/. В локусе 1p32 локализовано два протоонкогена: B-LYM1 /Morton et al., 1984/ и L-MYC /Nau et al., 1985/, а также один фрагильный сайт /Berger et al., 1985/. Активация онкогена B-LYM первоначально была обнаружена при лимфоме Беркитта, позднее появились данные об экспрессии этого онкогена и при других злокачественных трансформациях /Billings et al., 1987/. Однако, механизм активации B-LYM пока неизвестен. Могут ли играть какую-либо роль в активации B-LYM кластеры Alu-повторов неясно, но следует отметить, что во всех случаях острого лейкоза метка Alu-пробы была обнаружена в одном локусе с B-LYM /1p32/, а во всех вариантах гибридизации с нормальными лимфоцитами специфическая метка в этом локусе отсутствовала.

Кластер Alu в локусе 11q13-q14 не был выявлен в одном случае острого лейкоза. Этот почти "консервативный" кластер находится в локусе, который часто вовлекается в хромосомные перестройки при лейкозах и лимфомах /Mitelman, 1986/. В этом участке локализованы три протоонкогена. Экспрессия одного из них /BC11/ специфична для B-клеточных лимфом и лейкозов /Croce, Nowell, 1985/.

Из данных, представленных в таблице 3 видно, что точки разрывов хромосом при неоплазиях, протоонкогены и фрагильные сайты могут быть локализованы как в "консервативных", так и в "вариабельных" кластерах, однако ни одного случая хромосомных перестроек в этих участках нами обнаружено не было. Активация протоонкогенов /как в случае с В- μ M/ не всегда является следствием видимых хромосомных перестроек, хотя в последнее время появились интересные наблюдения, свидетельствующие, что в опухолевых клетках, культивируемых *in vitro* происходят локальные перестройки в области $\text{Iр}32\text{-p}36$. Возможно, что кластер Alu в исследованных случаях острого лейкоза смещаясь из локуса $\text{Iр}34\text{-p}35$ /в норме/ в участок $\text{Iр}32$, и образуя при этом зону $\text{Iр}32\text{-p}35$, индуцирует специфические молекулярные процессы, приводящие к активации В- μ M.

В связи с генетической нестабильностью областей генома, обогащенных Alu -повторами, обращает на себя внимание пример обратного свойства: "консервативные" кластеры, обнаруженные в локусах $\text{IОp}13\text{-p}14$ и $\text{IОq}21\text{-q}22$. Дело в том, что хромосома IО очень стабильна при различных злокачественных заболеваниях крови. В сводке Мителмана /Mitelman, 1986/ приводятся данные о вовлечении хромосомы IО в специфические перестройки лишь в 4 случаях острого нелимфоцитарного лейкоза из рассмотренных 5345 случаев различных неоплазий. При этом данные перестройки являлись реципрокными транслокациями IО и II хромосом. Точки разрывов в хромосоме IО были идентифицированы в локусах $\text{p}14$, $\text{p}15$ и $\text{p}11$. В одном случае обнаружена транслокация с точкой разрыва в локусе $\text{IОp}14$ и $\text{IIq}13$, то есть в тех участках, где локализованы "консервативные" кластеры Alu -повторов. Подобные стабильные при неоплазиях "консервативные" кластеры присутствуют и в некоторых других хромосомах. Одна из возможных причин такой стабильности может быть связана с топографией интерфазного ядра. Известно, что хромосомы занимают в ядре определенные области на протяжении всего клеточного цикла. Исходя из этого положения и основываясь на анализе 5345 случаев различных видов неоплазий, Мителман предложил ги-

потезу, согласно которой в транслокации вовлекаются районы хромосом, которые пространственно близко расположены друг от друга, поэтому лишь ограниченное число разрывов приводит к возникновению хромосомных перестроек, выявляемых в опухолевых клетках /Mitelman, 1986/. Из этого следует, что нестабильность локусов 10p13-p14 и 10q21-q22 может проявиться лишь при определенных условиях и имеет вероятностный характер. Другая возможная причина повышенной стабильности некоторых участков хромосом, содержащих кластеры Alu-повторов, заключается в существовании некоего эндогенного фактора /например, белковой природы/, стабилизирующего структуру хромосом в этих районах. Возможно, что присутствие такого фактора обеспечивает повышенную стабильность G-дисков хромосом по сравнению с R-дисками.

ВЫВОДЫ

1. Распределение повторяющихся последовательностей Alu-семейства в геноме человека имеет неслучайный характер и связано с наличием кластеров Alu-повторов в некоторых областях генома, которые характеризуются повышенной плотностью распределения Alu-последовательностей по сравнению с участками хромосом, не дающими заметного ответа при гибридизации *in situ* со специфической Alu-пробой.

2. Все кластеры Alu-повторов, выявленные в геноме доноров и больных острым лейкозом, можно условно разделить на три группы:

А. "Консервативные" кластеры. Обнаружены в геноме всех исследованных людей /как доноров, так и больных острым лейкозом/, выявлены в 13 хромосомных локусах.

Б. "Вариабельные" кластеры. Обнаружены как в геноме доноров /6q22/, так и в геноме больных острым лейкозом /3q26, 7q21-q22, 8p11-p12, 14q24, 15q21/, являются характерными для каждой из исследованных групп.

В. "Индивидуальные" кластеры. Обнаружены в геноме клеток крови и костного мозга некоторых доноров и больных острым лейкозом. Отражают индивидуальные особенности, т.е. поли-

морфизм распределения Alu-повторов в геноме человека.

3. Локализация всех "вариабельных", а также некоторых "консервативных" и "индивидуальных" кластеров совпадает с положением точек разрывов хромосом, выявленных при различных злокачественных заболеваниях крови и спонтанных хромосомных перестройках, что согласуется с гипотезой о роли Alu-повторов в перестройках генома.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Томилин Н.В., Филатов Л.В., Мамаева С.Е., Светлова М.П. Клонирование и локализация некоторых повторяющихся последовательностей генома человека//Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.-1984.-№3.-С.16-20.

2. Филатов Л.В., Мамаева С.Е., Томилин Н.В. Различия в локализации повторов Alu-семейства в некоторых хромосомах клеток периферической крови нормальных доноров и клеток костного мозга больных острым лейкозом//Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.-1988.-№II.-С.41-44.

3. Filatov L.V., Mamayeva S.E., Tomilin N.V. Non-random distribution of Alu-family repeats in human chromosomes// Molecular Biology Reports.-1987.-V.12.-P.117-121.

4. Filatov L.V., Mamayeva S.E., Tomilin N.V. "Conservative" and "variable" clusters of Alu-family DNA repeats in human chromosomes//Molecular Biology Reports.-1988.-V.13.-P.79-84.

5. Tomilin N.V., Filatov L.V. Non-random distribution of Alu-family DNA repeats in human chromosomes//In: 11th Nuclear workshop, Suzdal, 1989, P.181.

М-23006 Подписано к печати 05 ок. 90 Заказ № 35
Тираж 110 экз.. Формат бумаги 60x84 1/16. 1 печ.лист Бесплатно

191104, Ленинград, Литейный пр.,55

Бесплатно