



УДК 577.215.037

КЛОНИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ВЫЧИТАЮЩЕЙ ГИБРИДИЗАЦИИ КДНК ГЕНА *ha-SDGF* ИЗ ЛИНИИ КЛЕТОК СИРИЙСКОГО ХОМЯЧКА С ПОВЫШЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

© 1996 г. Н. Г. Гурская, Д. А. Шагин, К. А. Лукьянов, Л. Л. Вагнер, М. С. Штутман*, Е. А. Мусаткина*, Е. В. Моисова*, А. Г. Татосян*, С. А. Лукьянов[#], Е. Д. Свердлов

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

* Онкологический научный центр РАМН, Институт канцерогенеза, Москва

Поступила в редакцию 20.12.95 г.

Путем вычитающей гибридизации кДНК из двух линий спонтанно трансформированных *in vitro* эмбриональных фибробластов хомячка, различающихся величиной потенциалов метастазирования, получена библиотека, содержащая более 50% клонов, специфических для линии с повышенным потенциалом метастазирования. Большая часть ДНК этих клонов (83%) содержит новые последовательности. Один клон содержит последовательность кДНК гена *ha-SDGF*, гомологичную кДНК гена *SDGF* (schwannoma derived growth factor) грызунов. Показано, что уровень экспрессии мРНК *ha-SDGF* существенно выше в линии клеток, обладающих повышенным потенциалом метастазирования.

Ключевые слова: вычитающая гибридизация, линия клеток, потенциал метастазирования, клонирование, полимеразная цепная реакция, хомячок, ростовой фактор.

Значительный прогресс достигнут в идентификации и изучении онкогенов, участвующих в процессе опухолевой трансформации нормальных клеток, однако молекулярные механизмы, лежащие в основе превращения опухолевых клеток в метастазирующие, исследованы существенно меньше [1, 2]. Метастазирование представляет собой сложный многокаскадный процесс, включающий отделение клеток от первичной опухоли, преодоление окружающего тканевого барьера, прорастание через эндотелий кровеносных сосудов, проникновение и распространение в кровяном русле, выход в органы паренхимы с последующим прикреплением и размножением в органе-мишени, что приводит к формированию вторичной опухоли (метастаза). Полагают, что приобретение клеткой метастазирующего фенотипа является следствием индукции множества различных регуляторных и структурных генов, влияющих на определенные стадии процесса [2, 3].

Вычитающая гибридизация кДНК – один из наиболее универсальных методов, позволяющих

идентифицировать гены, которые дифференциально экспрессируются в двух сравниваемых популяциях клеток. Применение вычитающей гибридизации позволило обнаружить ряд генов, экспрессия которых коррелирует с развитием процесса метастазирования. Так, были идентифицированы гены *WDM1* и *WDM2*, высокоэкспрессирующиеся в ряду неметастазирующих линий аденокарциномы молочной железы крысы, в то время как в близкородственных метастазирующих линиях экспрессия генов *WDM* оказалась понижена [4]. Был обнаружен также ген *nm23*, экспрессия которого снижена в клетках метастазирующих опухолей, показано, что *nm23* обладает свойствами “супрессировать” метастазирование ряда опухолей [5]. С помощью вычитающей гибридизации кДНК из линий клеток аденокарциномы молочной железы мыши был выделен ген *mts1* с высоким уровнем экспрессии в клетках, отличающихся высоким потенциалом метастазирования [6].

При использовании методов вычитающей гибридизации кДНК наибольшие трудности возникают при идентификации генов, транскрипты которых содержатся в клетке в небольшом количестве, т.е. относятся к фракции “минорных” мРНК (содержащихся в количестве от 1 до 10 копий на клетку) [7, 8]. Так как большая часть всех транскрибирующихся генов принадлежит именно этой фракции мРНК, потеря этой фракции приводит к

Сокращения: AR – амфигулин, EGF – эпидермальный ростовой фактор, EST – экспрессирующаяся последовательность, HEPES – N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N’-[2-этансульфоновая кислота], HETR – линия спонтанно трансформированных эмбриональных фибробластов хомячка, МНС – главный комплекс гистосовместимости, PCR – полимеразная цепная реакция, SDGF – schwannoma derived growth factor.

[#] Автор для переписки.

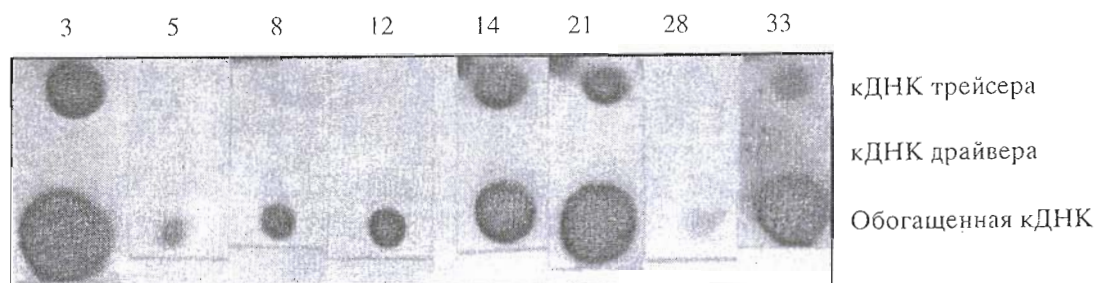


Рис. 1. Дифференциальный скрининг клонов из библиотеки, содержащей обогащенную кДНК, полученную после вычитающей гибридизации. кДНК-вставку каждого клона радиоактивно метили и гибридизовали с нанесенными на фильтр кДНК трейсера, драйвера и обогащенной кДНК, полученной после вычитающей гибридизации. Над радиоавтографом указаны номера восьми клонов из полученной библиотеки.

неполному анализу набора транскриптов, отличающих два образца кДНК. Для преодоления этой проблемы ранее нами был разработан метод высокоэффективной вычитающей гибридизации, адаптированный для выявления низкокопийных транскриптов [9]. В данной работе этот метод был использован для выделения транскриптов, отличающих линию HETR83/20 эмбриональных фибробластов хомячка с повышенным метастатическим потенциалом от линии клеток HETR с низким потенциалом метастазирования [10, 11]. HETR представляла собой линию спонтанно трансформированных *in vitro* эмбриональных фибробластов хомячка, линия HETR83/20 была получена после внутривенного введения клеток линии HETR и селекции *in vivo*.

Для вычитающей гибридизации были использованы образцы амплифицированной кДНК, полученные по методике, описанной нами ранее [12]. В качестве трейсера использовали образец кДНК линии HETR83/20, драйвером служил образец кДНК из исходной линии HETR. Вычитающая гибридизация проводилась по схеме, описанной в работе [9]. Ожидалось, что полученный после вычитающей гибридизации образец кДНК будет обогащен последовательностями, специфическими для линии клеток с более высоким потенциалом метастазирования.

Полученный после вычитающей гибридизации образец амплифицированной кДНК был клонирован в вектор pTZ18R. 40 независимых клонов были выбраны случайным образом и проанализированы путем дифференциального скрининга. Для этого на нейлоновые фильтры наносили образцы амплифицированной кДНК трейсера, драйвера и образец кДНК, амплифицированный после вычитающей гибридизации, а в качестве зондов для гибридизации использовали радиоактивно меченные кДНК-вставки плазмид анализируемых клонов. Результаты дифференциального скрининга для 8 клонов показаны на рис. 1. Из 40 проанализированных клонов 18 (45%) гибридизовались как с образцом трейсера, так и с образ-

цом обогащенной кДНК, полученной после вычитающей гибридизации (например, клоны № 3, 5, 14, 21, 33 на рис. 1), что свидетельствует о специфичности этих клонированных последовательностей кДНК для линии клеток HETR83/20. Пять клонов (более 10%) гибридизовались только с образцом кДНК, полученной после вычитающей гибридизации (например, клоны № 8, 12, 28 на рис. 1). Отсутствие гибридизационных сигналов в образце трейсера в этом случае может объясняться низким содержанием этих клонированных последовательностей в исходном препарате кДНК линии клеток HETR83/20. Остальные клоны, которые гибридизовались как с образцом трейсера, так и с образцом драйвера, исключались из дальнейшего анализа.

Данные дифференциального скрининга позволяют предположить, что библиотека, созданная после вычитающей гибридизации, содержит более чем 50% последовательностей, специфических для линии клеток HETR83/20. Различия в относительных величинах гибридизационных сигналов для разных клонов при одном времени экспозиции, по-видимому, указывают на то, что представленные клоны соответствуют как "минорным", так и более высококопийным компонентам тотальной амплифицированной кДНК.

Отобранные по результатам дифференциального скрининга 23 клона были подвергнуты частичному секвенированию. Концевые нуклеотидные последовательности всех клонов были различны. Этот факт свидетельствует о том, что полученная после вычитающей гибридизации библиотека кДНК действительно является нормализованной [9].

Все полученные нуклеотидные последовательности были проанализированы с помощью пакета программ "Fasta" EMBL Data Library. Результаты анализа показали, что 19 клонов содержат последовательности, которые не обнаружили каких-либо значимых гомологий с последовательностями, зарегистрированными в банке EMBL. Два клона (Sc3, Sc15) содержат фрагменты кДНК

хомячка, гомологичные EST человека [13] (93 и 69% совпадений соответственно). Один клон (Sc10) содержит последовательность, совпадающую на 67% с нуклеотидной последовательностью интегральной мембранной части белка МНС класса I мышцы, на 66% – с 5'-концевой частью последовательности гена рецептора интерлейкина-2 и на 63% – с последовательностью первого экзона гена рецептора гонадотропин-рилизинг-гормона. Эти данные позволяют предположить, что клон Sc10 содержит фрагмент кДНК гена, кодирующего некий трансмембранный белок. Клон Sc14 содержит последовательность, совпадающую на 82% с последовательностью кДНК гена *SDGF* крысы, на 79% – с последовательностью кДНК этого же гена мышцы, на 72% – с последовательностью кДНК гена *AR* человека. Аминокислотная последовательность, соответствующая нуклеотидной последовательности клона Sc14, содержит 74% совпадений с последовательностью белка крысы, 70% – с последовательностью белка мышцы и 66% – с последовательностью *AR* человека. Высокая степень гомологии как нуклеотидной, так и соответствующей аминокислотной последовательности позволила нам предположить, что клон Sc14 содержит последовательность гена *SDGF* хомячка. Этот ген получил название *ha-SDGF* (*hamster-SDGF*).

Клонированный фрагмент кДНК *ha-SDGF*, содержащий 900 п. о., был полностью секвенирован. Сравнение нуклеотидной и соответствующей ей аминокислотной последовательности с аналогичными последовательностями кДНК генов *SDGF* крысы, мышцы и *AR* человека показало, что полученный фрагмент кДНК содержит часть кодирующей последовательности без 5'-концевой области, стоп-кодон и полную 3'-некодирующую область, включающую последовательность сигнала полиаденилирования. Для получения полной кодирующей последовательности кДНК *ha-SDGF* была использована двухэтапная PCR со специфическими праймерами на матрице кДНК линии HETR83/20. Для амплификации были использованы три праймера. Первый праймер (N1) был предложен ранее [14] для получения полной кодирующей последовательности кДНК гена *SDGF* мышцы. Этот праймер соответствует консервативному участку 5'-некодирующей области гена *SDGF* крысы между нуклеотидами в положении –45 и –26 относительно иницирующего кодона. 3'-Конец праймера N1 направлен к иницирующему кодону. Два других праймера (N2 и N3) соответствуют соседним участкам последовательности кДНК-вставки клона Sc14, причем 3'-концевые части этих праймеров направлены в сторону 5'-области гена. Продукт первой амплификации с

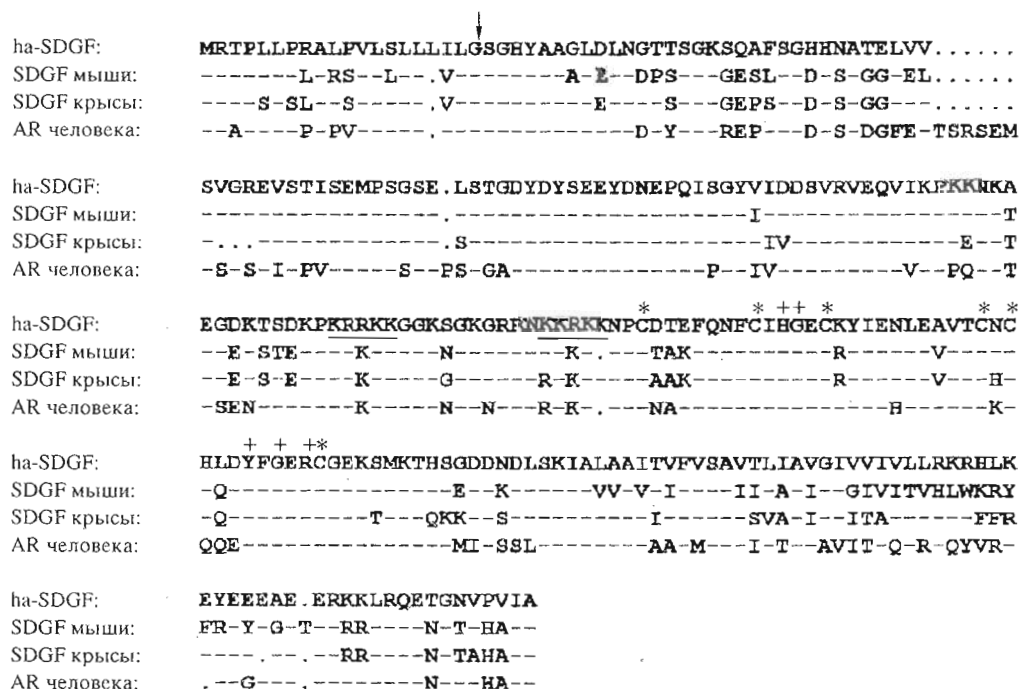


Рис. 2. Сравнение полных аминокислотных последовательностей ha-SDGF с соответствующими последовательностями SDGF мышцы, крысы и AR человека. Совпадающие аминокислотные остатки обозначены дефисом, подчеркнуты участки предполагаемых ДНК-связывающих доменов. Звездочками над последовательностью обозначены консервативные для семейства EGF аминокислотные остатки цистеина; крестиками – консервативные аминокислотные остатки SDGF и AR, участвующие в связывании EGF-рецептора; точками – отсутствующие аминокислотные остатки; стрелкой указано место отщепления сигнального пептида.

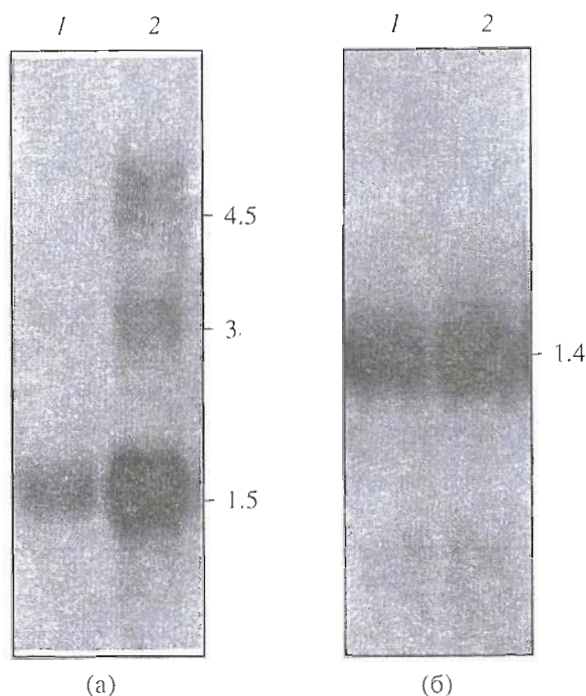


Рис. 3. Нозерн-блот-гибридизация тотальной РНК клеток линий HETR (1) и HETR83/20 (2) с радиоактивно меченными плазмидной ДНК клона Sc14 (а) и радиоактивно меченной кДНК гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы мыши (контроль) (б). Цифры справа указывают приблизительный размер транскриптов (в т. п. о.).

праймерами N1 и N2 для очистки от фоновой ДНК был амплифицирован с праймерами N1 и N3. В результате двухэтапной амплификации был получен фрагмент кДНК предсказанной длины (около 300 п. о.), который был клонирован в вектор pTZ18R и секвенирован. Полученный фрагмент содержит участок последовательности кДНК-вставки клона Sc14, а также недостающий участок последовательности, соответствующий 5'-региону кДНК *ha-SDGF*, т.е. была получена полная последовательность кодирующей части кДНК гена *ha-SDGF* (EMBL Data Library/accession number Z66535).

Для сравнения на рис. 2 приведены аминокислотные последовательности белков SDGF хомячка, крысы, мыши и AR человека. Найденный новый гомолог SDGF содержит 77% совпадений с аминокислотной последовательностью SDGF крысы, 73% – с последовательностью SDGF мыши и 69% – с аминокислотной последовательностью AR человека. Необходимо отметить наличие консервативных аминокислотных остатков, характерных для последовательностей всех белков, принадлежащих к семейству ростовых факторов группы EGF: консервативными являются шесть аминокислотных остатков цистеина, образующих характерные для этих белков три дисульфид-

ные связи, а также несколько аминокислотных остатков, которые образуют участок связывания с EGF-рецептором (рис. 2) [15, 16]. В последовательностях разных SDGF и AR были обнаружены два домена NTS (nucleic target sequences), отвечающие за способность связывать АТ-богатые участки ДНК [16, 17], в то время как в последовательности EGF таких ДНК-связывающих участков не обнаружено. Аминокислотные последовательности ДНК-связывающих доменов SDGF и AR содержат незначительное число замен (преимущественно консервативных) (рис. 2).

Экспрессия мРНК *ha-SDGF* была проанализирована в клеточных линиях HETR и HETR83/20. Для этого использовали нозерн-блот-гибридизацию образцов тотальной РНК с радиоактивно меченной плазмидой клона Sc14. В качестве контроля за количеством РНК в образце использовали гибридизацию с радиоактивно меченной кДНК гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы мыши. Было установлено, что уровень транскрипции гена *ha-SDGF* существенно выше в линии HETR83/20 по сравнению с исходно низким уровнем его транскрипции в родоначальной линии HETR (рис. 3). Нозерн-блот-гибридизация выявила три различных вида транскриптов гена *ha-SDGF*. Наиболее представлен из них транскрипт длиной около 1.5 т. п. о., два минорных транскрипта имеют длины около 3 и 4.5 т. п. о. В работе [15] при анализе экспрессии гена *SDGF* в различных тканях крысы было обнаружено наличие трех видов транскриптов приблизительно таких же длин. Повышенный уровень экспрессии гена *ha-SDGF* в линии HETR83/20 позволяет нам предположить возможность участия этого гена в процессах метастазирования, происходящих в данной группе спонтанно трансформированных клеточных линий.

SDGF был впервые описан как фактор, стимулирующий деление астроцитов, шванновских клеток и фибробластов крысы [15] и обладающий также стимулирующим действием на клетки эпителия опухоли молочной железы мыши [14]. SDGF относится к семейству ростовых факторов эпидермальной группы, к которому принадлежат также EGF, трансформирующий ростовой фактор α и AR человека. Последний получил свое название благодаря свойствам стимулировать или ингибировать рост злокачественных клеток эпителиального происхождения в зависимости от концентрации или присутствия других ростовых факторов [16, 18]. AR является аутокринным фактором, экспрессия мРНК которого возрастает в трансформированных клетках некоторых линий карциномы молочной железы человека после обработки их 12-О-тетрадеканилфорбол-13-ацетатом [16]. Для ряда аутокринных факторов показано их участие в метастазизирующих процессах, происходящих в определенных видах злокачественных опухолей (например,

в меланомах) [19–21]. Предполагается, что аутокринные факторы, секретируемые клетками, могут способствовать их движению и колонизации в местах образования вторичных опухолей (метастазов) [19]. Таким образом, способность продуцировать аутокринные ростовые факторы дает преимущество метастазирующим клеткам по сравнению с нормальными, чья способность к движению и колонизации во многом зависит от сигналов цитокинов других клеток [22].

Известно, что SDGF и AR обладают уникальной способностью передачи сигнала внутрь клетки по двойственному механизму [16, 17]. Первый механизм (характерный для других ростовых факторов семейства EGF) предполагает связывание с мембранным рецептором EGF с последующим фосфорилированием белков цитоплазмы и активацией вторичных посредников. Второй механизм основан на непосредственном связывании специфических участков белка SDGF с ДНК. ДНК-Связывающая способность белка SDGF необходима для индукции синтеза ДНК и последующего деления клетки [17].

Был показан повышенный уровень мРНК AR в 70% случаев первичных и метастазирующих опухолей прямой кишки, в то время как в нормальных тканях кишечника экспрессия этого гена либо совсем отсутствует, либо представлена на низ-

ком уровне [23]. Наблюдаемый повышенный уровень экспрессии гена AR в тканях больных с метастазирующими опухолями позволяет авторам предположить, что AR может быть использован совместно с другими факторами как потенциальный маркер процесса метастазирования [23].

Таким образом, обнаруженный нами повышенный уровень экспрессии мРНК *ha-SDGF* в линии с повышенным потенциалом метастазирования по сравнению с низким уровнем экспрессии в линии с низким потенциалом метастазирования может служить полезным дополнением к существующим данным о возможной роли этого гена в процессе метастазирования.

Полученные данные подтверждают эффективность предложенного метода вычитающей гибридной ДНК для поиска дифференциально экспрессирующихся последовательностей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии клеток. Получение линий HETR и HETR83/20 описано ранее [1, 2].

Выделение суммарной РНК описано в предыдущей работе [12].

В нашей работе были использованы следующие олигонуклеотидные праймеры (5'–3'):

1. T	CGCAGTCCGACCG(T) ₁₃
2. LT1	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCAGTCCGACCG(T) ₁₃
3. LT2	ACCGACGTGGACTATCCATGAACGCAGTCCGACCG(T) ₁₃
4. 24-1	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA
5. 24-2	ACCGACGTGGACTATCCATGAACG
6. N1	GGAAGCTTCTGTTCGTGTTGCCGCAGAGAC
7. N2	STTGTTTTCTTGGGCTTAAT
8. N3	AATCATCTATAACGTAGCCAG

Первую цепь кДНК синтезировали в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) в объеме 30 мкл в присутствии 20 пмоль Т-прайма в качестве затравки. На реакцию брали по 3 мкг тотальной РНК.

Присоединение oligo(dA)-последовательности к первой цепи кДНК. Образцы первой цепи кДНК дважды осаждали этанолом для удаления нуклеозидтрифосфатов. 0.3 мкг первой цепи кДНК инкубировали 15 мин при 37°C с 10 ед. акт. терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (Promega) в 20 мкл буфера для этого фермента (Promega) в присутствии 200 мкМ dATP.

Аmplификацию тотальной кДНК проводили с помощью PCR, как описано ранее [24]. Образцы амплифицированной кДНК очищали от избытка праймеров с помощью колонок Wizard PCR Prep DNA Purification System (Promega).

Приготовление образцов кДНК драйвера и трейсера в препаративном количестве осуществляли в 500 мкл смеси для PCR (состав см. [24]), содержащей 100 нг амплифицированной кДНК и 0.4 мкМ Т-прайма. Проводили PCR в течение 12 циклов в следующем режиме: 94°C – 10 с; 60°C – 10 с; 72°C – 2 мин. Образцы амплифицированной кДНК подвергали очистке на колонках.

Последовательности длинных Т-праймеров вводили в кДНК трейсера методом PCR в двух отдельных пробирках. При этом в каждую пробирку к 100 нг амплифицированной с Т-праймером и очищенной кДНК трейсера добавляли по 50 мкл смеси для PCR, содержащей 1 мкМ праймер LT1 или LT2 соответственно, и проводили сначала 3 цикла PCR в описанном выше режиме, затем условия PCR изменяли и осуществляли 7 циклов PCR в режиме: 94°C – 10 с; 72°C – 2 мин.

Обработка препарата кДНК трейсера экзонуклеазой III. По 1 мкг полученных на предыдущей стадии амплифицированных кДНК инкубировали 3 мин при 6°C отдельно в 50 мкл смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 7.5; 1 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреит и 200 ед. акт. экзонуклеазы III (Promega). Реакцию останавливали экстракцией смесью фенола с хлороформом (1 : 1). После интенсивного встряхивания обе смеси центрифугировали 10 мин при 12000g, переносили водные фазы в новые пробирки.

Гибридизация и последующая амплификация кДНК. По 150 нг каждого образца полученной на предыдущей стадии кДНК трейсера смешивали с 4.5 мкг амплифицированной кДНК драйвера, добавляли 2.5 объема этилового спирта и центрифугировали 15 мин при 12000g. Осадок растворяли в 1 мкл гибридизационного буфера (50 мМ HEPES, pH 7.5; 0.5 М NaCl; 0.1% SDS; 15 мкМ Т-праймер). Затем гибридизационную смесь закрывали минеральным маслом, прогревали 2 мин при 100°C и инкубировали 12 ч при 68°C. Затем содержимое обеих пробирок смешивали и продолжали инкубацию 20 ч при 68°C. К ДНК после гибридизации добавляли 100 мкл буфера: 50 мМ трис-HCl, pH 7.5; 50 мМ NaCl. Эту смесь инкубировали 5 мин при 72°C. 1 мкл этой смеси нагревали 2 мин при 72°C в 50 мкл буфера для PCR, не содержащего хлорид магния, после чего добавляли хлорид магния до концентрации 3 мМ и 1 ед. акт. Таq-полимеразы (Promega) и инкубировали еще 1 мин при 72°C. Затем при 80°C добавляли праймеры 24-1 и 24-2 до концентрации каждого 0.2 мкМ и проводили 30 циклов PCR (92°C – 15 с; 72°C – 2 мин).

Клонирование кДНК, обогащенной специфическими последовательностями. Полученный на предыдущей стадии образец амплифицированной кДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *SalI* (Promega) (сайт узнавания для этого фермента присутствует в Т-праймере) и клонировали в вектор pTZ18R (USB). Процедуры рестрикции, лигирования, трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 α и выделения плазмидной ДНК проводили в соответствии со стандартными методиками [25].

Дифференциальный скрининг обогащенной библиотеки. Дот-блот-гибридизацию проводили в соответствии со стандартной методикой [26]. Образцы амплифицированных кДНК наносили на нейлоновые фильтры Hybond N (Amersham) (по 200 нг в точку) и гибридизовали с радиоактивно меченными вставками плазмидных ДНК из выбранных клонов. Гибридизацию проводили при 68°C в стандартном буфере [26], фильтры отмывали при 68°C в 0.2 \times SSC (1 \times SSC – 150 мМ NaCl, 15 мМ цитрат натрия) с 0.1% SDS. Мечение ДНК осуществ-

ляли с помощью [α -³²P]dATP (5000 Ки/ммоль) в соответствии со стандартной методикой [26].

Клонирование 5'-региона кодирующей области кДНК гена *ha-SDGF*. Первую стадию PCR проводили в 50 мкл смеси, содержащей 10 нг амплифицированной тотальной кДНК. При 80°C добавляли праймеры N1 и N2 до концентрации каждого 0.2 мкМ и проводили 20 циклов PCR (92°C – 15 с; 56°C – 15 с; 72°C – 1 мин). Затем продукт амплификации разводили в 20 раз и 1 мкл этого раствора амплифицировали в 50 мкл смеси для PCR, содержащей праймеры N1 и N2 с концентрацией каждого 0.2 мкМ, в течение 20 циклов в следующем режиме: 92°C – 15 с; 63°C – 15 с; 72°C – 1 мин.

Продукт PCR обрабатывали ДНК-полимеразой фага T4 (Promega), добавляя 10 ед. акт. фермента в амплификационную смесь, инкубировали 10 мин при 37°C, затем после переосаждения этанолом смесь обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *HindIII* (сайт узнавания для этого фермента присутствует в праймере N1) и клонировали в вектор pTZ18R по сайтам *HindIII* и *SmaI*.

Нозерн-блот-гибридизацию проводили как описано в методике [26]. Тотальную РНК в количестве 20 мкг на дорожку подвергали фракционированию в 1% агарозном геле в присутствии 6% формамида и 50 мМ фосфатного буфера. После электрофореза РНК из геля переносили на нейлоновые фильтры (Hybond N, Amersham), как описано в методике [25], и гибридизовали с радиоактивно меченной плазмидной ДНК. Гибридизацию проводили в стандартных условиях в буфере, описанном в методике [25]. Гибридизацию с радиоактивно меченной кДНК гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы мыши (Clontech) проводили в тех же условиях. Мечение ДНК осуществляли "ник-трансляцией" с помощью [α -³²P]dATP 5000 Ки/ммоль в соответствии со стандартной методикой [25].

Авторы выражают глубокую благодарность Е.А. Богдановой и М.В. Матцу (ИБХ РАН) за помощь в подготовке и оформлении статьи, а также В.К. Потапову (ИБХ РАН) за синтез олигонуклеотидных праймеров. Работа поддержана Международным научным фондом (грант № MOJ300).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macdonald N.J., Steeg P.S. // Cancer Surveys. 1993. V. 16. P. 175–199.
2. Nicolson G.L. // BioEssays. 1991. V. 13. P. 337–342.
3. Liotta L.A., Steeg P.S., Stetler-Stevenson W.G. // Cell. 1991. V. 64. P. 327–336.
4. Dear T.N., Ramshaw I.A., Kefford R.F. // Cancer Res. 1988. V. 48. P. 5203–5209.
5. Leone A., Flatov U., King C., Sandeen M., Margulies L., Liotta L., Steeg P. // Cell. 1991. V. 65. P. 25–35.

6. Ebralidze A., Tulchinsky E., Grigorian M., Afanasyeva A., Senin V., Revazova E., Lukanidin E. // *Genes Dev.* 1989. V. 3. P. 1086–1093.
7. Galau G.A., Klein W.H., Britten R.J., Davidson E.H. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1977. V. 179. P. 584–599.
8. Свердлов Е.Д., Ермолаева О.В. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. С. 1081–1088.
9. Лукьянов С.А., Гурская Н.Г., Лукьянов К.А., Тарабыкин В.С., Свердлов Е.Д. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 701–704.
10. Deichman G.I., Vendrov E.L. // *Int. J. Cancer.* 1986. V. 37. P. 401–409.
11. Deichman G.I., Cluchareva T.E., Matveeva V.A., Kushlinsky N.E., Bassalyk L.S., Vendrov E.L. // *Int. J. Cancer.* 1989. V. 44. P. 904–907.
12. Lukyanov K.A., Launer G.A., Tarabykin V.S., Zarsky A.G., Lukyanov S.A. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 229. P. 198–202.
13. Hillier L., Clark N., Dubuque T., Elliston K., Hawkins M., Holman M., Hultman M., Kucaba T., Le M., Lennon G., Marra M., Parsons J., Rifkin L., Rohlfing T., Soares M., Tan F., Trevaskis E., Waterston R., Williamson A., Wohldmann P., Wilson R. // *EMBL Data Library accession numbers R25581, R85633.*
14. Soneda H., Yamaguchi T., Watanabe S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 185. P. 103–109.
15. Kimura H., Fischer W.H., Schubert D. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 257–260.
16. Plowman G., Green J.M., McDonald V.L., Neubauer M.G., Distech C.M., Tobar G., Shoyab M. // *Mol. Cell. Biol.* 1990. V. 10. P. 1969–1981.
17. Kimura H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 2165–2169.
18. Normanno N., Selvam M.P., Chen-Feng Qi, Saeki T., Johnson G., Kim N., Ciardiello F., Shoyab M., Plowman G., Brandt R., Todaro G., Salomon D.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 2790–2794.
19. Sing R., Gutman M., Radinsky R., Bucana C., Fidler I. // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 3242–3247.
20. Lu C., Vickers M., Kerbel R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 9215–9219.
21. Swartz L., Gingras M., Goldberg G., Greenberg A., Wright J. // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 6999–7003.
22. Herlyn M., Kath R., Williams N., Valyi-Nagy I., Rodbeck M. // *Adv. Cancer Res.* 1990. V. 54. P. 213–234.
23. Ciardiello F., Kim N., Saeki T., Dono R., Persico M.G., Plowman G.D., Garrigues J., Radke S., Todaro G.J., Salomon D.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 7792–7796.
24. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Копанцев Е.П., Лукьянов С.А. // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 49–54.
25. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989.
26. *Short Protocols in Molecular Biology* / Eds F.M. Ausubel et al. N.Y.: Harvard Medical School, 1992.

Cloning of the *ha-SDGF* Gene cDNA from a Highly Metastatic Golden Hamster Cell Line by Subtractive Hybridization

N. G. Gurskaya*, D. A. Shagin*, K. A. Luk'yanov*, L. L. Vagner*,
M. S. Shtutman**, E. A. Musatkina**, E. V. Moinova**, A. G. Tatosyan**,
S. A. Luk'yanov*,¹ and E. D. Sverdlov*

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

** Blokhin Cancer Research Center, Institute of Cancerogenesis, Russian Academy of Medical Sciences,
Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

Abstract—Using subtractive hybridization, a cDNA library containing over 50% of clones specific for a highly metastatic cell line was obtained from two hamster embryo fibroblast lines with different metastatic potentials. Most of the clones (83%) contained new sequences. One clone contained the *ha-SDGF* gene cDNA homologous to SDGF cDNA from rodents. The level of *ha-SDGF* mRNA expression was considerably higher in the highly metastatic cell line.

Key words: subtractive hybridization, cell line, metastatic potential, cloning, polymerase chain reaction, hamster, growth factor.

¹ To whom correspondence should be addressed.