

Модификация структуры ДНК плазмиды *pATV-8* у трансгенных мышей. 3. Анализ нуклеотидной последовательности экстрахромосомного трансгена и его репликация в клетках насекомых

К. В. Крисан, И. М. Кихно, Л. И. Строковская, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, 252143, Киев, Украина

*Определена нуклеотидная последовательность экстрахромосомного трансгена мыши. Анализ новообразованных в результате перестроек исходной плазмиды последовательностей ДНК показал высокую гомологию некоторых из них с консенсусом *ori* репликации эукариот. Возможно, эти последовательности обеспечивали стабильную репликацию трансгена в клетках мыши. Показано, что данный трансген также способен реплицироваться в клетках насекомых.*

Введение. Известны две основные формы существования трансгенов — интегрированная в геном реципиента и экстрахромосомная. Наиболее многочисленную группу экстрахромосомных трансгенов составляют конструкции, содержащие нуклеотидные последовательности вирусов, в жизненном цикле которых имеются кольцевые репликативные формы. Берг и др. одними из первых показали формирование моно- и олигомерных кольцевых молекул, содержащих ДНК вируса полиомы, поражающего грызунов, в инфицированных перmissивных клетках [1]. Позже этот вирус широко использовался для создания векторов, способных реплицироваться экстрахромосомно [2]. Попытки вводить конструкции, содержащие нуклеотидные последовательности вируса полиомы, в клетки неперmissивных хозяев окончились неудачей — вирус не реплицировался [3, 4]. Плазмиды, содержащие *ori* репликации вируса SV40, также способны существовать и реплицироваться автономно [5, 6]. Среди других вирусов достаточно широко используется вирус папилломы быка. Интересен тот факт, что конструкции на основе этого вируса могут существовать как эписомы и реплицироваться также в

клетках неперmissивных хозяев [7, 8]. В экспериментах, проведенных в работах [9, 10], в грену тутового шелкопряда вводили плазмиды, состоящие из бактериального вектора *pBR322* и длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса. Несмотря на то, что ретровирусы являются интегративными вирусами, эта плазида не интегрировалась, а существовала в экстрахромосомном состоянии. При этом в ее составе были обнаружены встроенные повторяющиеся последовательности ДНК тутового шелкопряда, которые эволюционно консервативны. Возможно, они обеспечивали сегрегацию и репликацию плазмиды. В этом случае в результате взаимодействия трансгена и генома реципиента образовался так называемый ARS (autonomously replicating sequence)-элемент. Множество таких элементов было получено искусственно клонированием в бактериальных векторах фрагментов геномных ДНК различных эукариот и последующей трансфекцией созданных конструкций в клетки соответствующих эукариот для проверки способности к экстрахромосомной репликации. Такие элементы известны для дрожжей [11, 12], дрозофилы [13] и высших эукариот, включая человека [14, 15]. Некоторые ARS созданы с использованием *ori* репликации генов, способных к амплификации

[16]. Анализ нуклеотидных последовательностей, отвечающих за ARS-функцию, показал, что они высококонсервативны у всех эукариот, и каноническая последовательность состоит из короткого АТ-богатого участка [17]. О степени консервативности указанной последовательности (а также всего механизма репликации) свидетельствует то, что ARS-элементы дрожжей способны реплицироваться в клетках высших эукариот [18].

Поскольку исследуемый нами трансген мыши реплицируется экстрахромосомно, мы предположили, что в процессе перестройки в трансген встроился фрагмент геномной ДНК мыши, содержащий соответствующие нуклеотидные последовательности. Цель настоящей работы состояла в анализе полной нуклеотидной последовательности трансгена для выявления участков, потенциально способных поддерживать его репликацию в клетках мыши. Была также исследована способность данного трансгена реплицироваться в клетках других эукариот.

Материалы и методы. *Определение нуклеотидной последовательности* осуществляли по методу дидезокситерминации. Секвенировали двухцепочечную ДНК с последующим разделением фрагментов в 6 %-м полиакриламидном геле.

Трансфекция клеток насекомых. Трансфекцию монослойной культуры клевок *Spodoptera frugiperda* линии SF 21 препаратами плазмидной ДНК (5 мкг ДНК на 3 млн клеток) проводили с использованием липофектина фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ) в условиях, рекомендованных производителем.

Выделение суммарной ДНК из клеток насекомых. Клетки осаждали, 3 раза промывали буфером PBS (по 500 мкл), ресуспендировали в 300 мкл лизирующего буфера (1 % SDS, 10 мМ трис-НСl, рН 7,6, 5 мМ EDTA) и обрабатывали протеиназой К (100 мкг/мл) в течение ночи при 37 °С, а затем РНКазой (10 мкг/мл) в течение 1 ч при 37 °С. После этого добавляли NaCl до концентрации 0,1 М, ДНК осаждали центрифугированием, депротенизировали смесью фенол/хлороформ и пересаждали этанолом.

Получение радиоактивного зонда. ДНК pBR322 в количестве 0,1 мкг денатурировали и метили ³²P-dATP с помощью рассеянной затравки и фрагмента Кленова.

Приготовление фильтров для дот-гибридизации. Аликвоты по 3·10⁵ трансфицированных клеток наносили на нейлоновый фильтр («Hybond-N», «Amersham», Великобритания), лизировали в растворе 1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH в течение 1,5 мин, нейтрализовали в 1,5 М NaCl, 0,5 М трис-НСl рН 7,6, 1 мМ EDTA и фиксировали ультрафиолетом.

Приготовление фильтров для блот-гибридизации. По 5 мкг нерасщепленных суммарных препаратов ДНК трансфицированных клеток наносили на 0,6 %-й агарозный гель и разгоняли при 3 В/см в течение 5 ч. Затем ДНК переносили на нейлоновый фильтр в буфере 10 × SSC (1,5 М NaCl, 0,15 М цитрат натрия) и фиксировали ультрафиолетом.

Гибридизация. Полученные фильтры прегибридизовали в растворе 6 × SSC, 0,5 % SDS, 5 × раствор Денхардта, 50 мкг/мл гетерологичной ДНК в течение 2 ч при 65 °С, после чего добавляли зонд до 20 нг/мл и гибридизовали при той же температуре в течение ночи. Затем фильтры отмывали 10 мин в растворе 2 × SSC; 30 мин — 2 × SSC, 0,1 % SDS; 15 мин — 0,1 × SSC, 0,1 % SDS при 65 °С.

Результаты и обсуждение. Исследовали поведение рекомбинантной плазмиды pATV-8 [19] при микроинъекции ее в зиготы мышей [20]. Из трансгенных мышей и их потомков выделен трансген, существующий в экстрахромосомном состоянии и получивший название pB.6.5. С помощью гибридизации и картирования удалось установить, что произошла делеция большей части вирусных и части бактериальных нуклеотидных последовательностей. Поскольку полученная плазмида была способна к репликации и сегрегации в клетках мыши, мы предположили, что помимо делеции произошло встраивание в нее участка геномной ДНК, содержащего соответствующие нуклеотидные последовательности. Для проверки этой гипотезы были локализованы модифицированные участки и часть из них секвенирована. Первичный анализ полученных результатов позволил сделать вывод о наличии в трансгене новой нуклеотидной последовательности [21], однако впоследствии оказалось, что этот вывод был ошибочным. Вначале были секвенированы небольшие фрагменты, удобные для клонирования, но это не позволило определить границ делетированных участков и сайтов рекомбинации. Поэтому была определена полная нуклеотидная последовательность трансгена. Его фрагменты клонировали в вектор pSK⁺, для секвенирования больших фрагментов применяли ступенчатое укорачивание с помощью нуклеаз *EcoIII* и *S1*. Оказалось, что от провирусной ДНК остался лишь фрагмент размером около 1850 п. о., содержащий почти полную нуклеотидную последовательность гена *env* и межгенную область генов *env* и *src*, который к тому же был транспозирован из сайта клонирования провирусной ДНК (*HindIII*) pATV-8 в другой, близлежащий участок вектора, при этом указанный сайт восстановился. Один конец рестроенного участка находится на расстоянии примерно 110 п. о. до

начала стартовой точки транскрипции гена *env*, а второй — в межгенной области генов *env* и *src* (170 п. о. после окончания кодирующей последовательности гена *env* и перед началом некодирующей последовательности гена *src*). С обеих сторон фрагмент фланкирован короткими AT-богатыми участками. Встраивание произошло в 5'-конец гена устойчивости к тетрациклину *pBR322*, при этом делегировался короткий участок указанного гена длиной около 100 п. о. На границах делегированного участка также имеются AT-богатые последовательности. Вторая делеция бактериальной части *pATV-8* имела размер 560 п. о. и затронула ген-репрессор, ограничивающий копийность плазмиды в клетках *Escherichia coli*. Делегированный фрагмент был ограничен участками, богатыми А и Т. Границы делеций и транспозиций, а также новообразованные участки приведены на рис. 1.

Представляется вероятным, что перестройки трансгена произошли на самых ранних стадиях эмбриогенеза трансгенных мышей (так как мыши не были мозаиками). Известно, что именно на этих этапах развития наблюдаются активные перестройки генома, такие как эксцизия участков иммуноглобулиновых генов при формировании иммунной системы [22] и нестабильность повторяющихся последовательностей в процессе развития [23, 24]. Отмечена высокая гомология некоторых нестабиль-

Делеция фрагмента *pBR322* в области гена - регулятора копийности

5' - AAACAGGAAAAAaccgcccttaa - 3'
5' - gcaaaaggccagcAAAAGGCCAG - 3'

Делеция фрагмента *pBR322* в месте транслокации участка провирусной ДНК:

5' - TCTTCTTTATcatgcaactc - 3'
5' - cggatttcggAATCTTGAC - 3'

Границы эксцизии фрагмента провирусной ДНК

5' - ccaacgagagTTAATTATATT - 3'
5' - TCTTAATATTgtctgtgtgct - 3'

Рис. 1. Границы модифицированных участков трансгена. Строчными буквами обозначены делегированные участки, прописными — недегированные

В 5'-конец провирусного фрагмента

TTTAATTATA
|||| | ||
TTTAtaTtTA

В 3'-конец провирусного фрагмента

TTAATATTTAA
|| |||| |
TTtATATTTtA

Рис. 2. Гомология между канонической последовательностью *ori* репликации дрожжей (внизу) и последовательностями, образовавшимися в результате транслокации фрагмента провирусной ДНК (вверху)

ных локусов с длинными концевыми повторами транспозоноподобного элемента мыши [25]. Поскольку мы предполагаем, что делеция провирусных последовательностей могла произойти в результате интеграции трансгена в геном реципиента посредством рекомбинации с участками ограниченной гомологии и последующей неточной эксцизии, отмеченное наблюдение является весьма важным. Общая нестабильность области интеграции могла стать причиной перестроек трансгена. В связи с тем, что границы перестроек содержат AT-богатые нуклеотидные последовательности, возможно, что они (или образованные ими вторичные структуры ДНК) стали сигналами для специфических нуклеаз и других ферментов, участвующих в рекомбинации. Согласно другой гипотезе, перестройки трансгена произошли в результате рекомбинации с экстрахромосомными ДНК мыши [26] по описанному выше механизму. Что касается экстрахромосомной репликации и сегрегации трансгена, то, вероятно, их обеспечивали бактериальные последовательности или образовавшиеся *de novo* комбинации вирусного и бактериального геномов. Как указывалось выше, стартовые точки репликации (как и центромерные области хромосом) являются AT-богатыми последовательностями. Возможно, новообразованные последовательности трансгена сформировали участки, способные выполнять такие функции. О том, что инициировать репликацию могут помимо *ori* и другие участки ДНК, известно давно. Так, клонированные повторы семейства *Alu* обеспечивают репликацию содержащих их плазмид в эукариотических клетках [27]. Кроме того, отмечено, что *ori* репликации *pBR322* узнается эукариотическими факторами репликации [28]. Гомология между канонической последовательностью эукариотического *ori* и AT-богатыми участками *pB.6.5* показана на рис. 2. Следует отметить, что

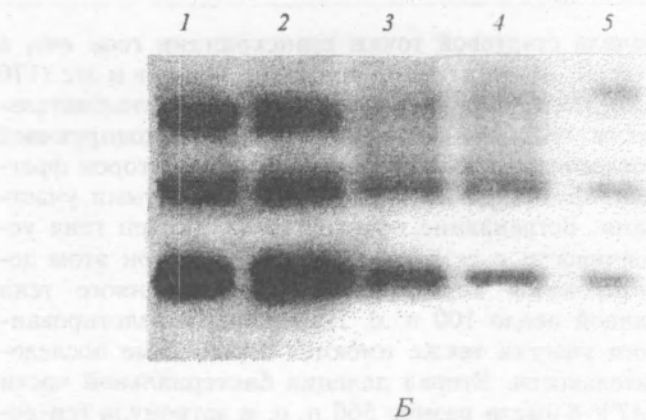
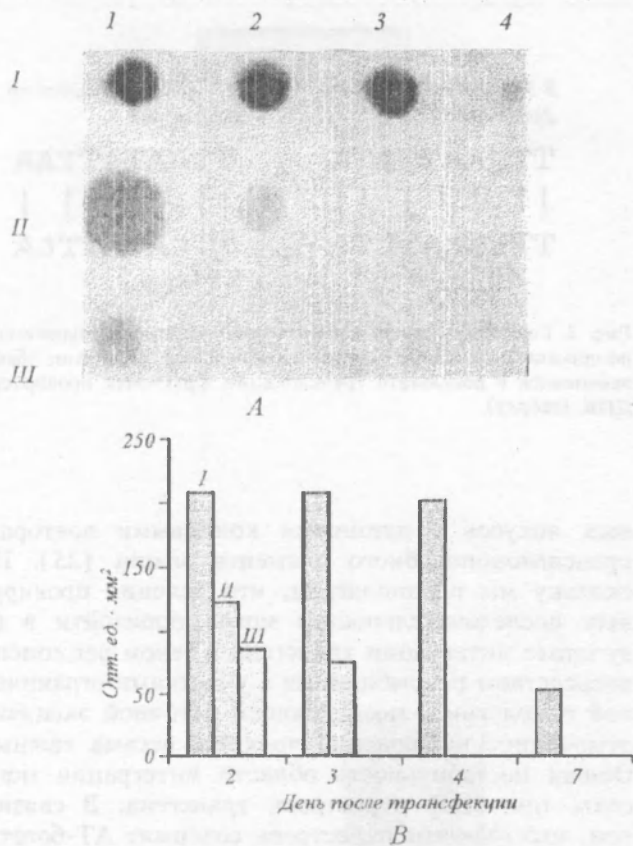


Рис. 3. А — дот-гибридизация клеток насекомых, трансфицированных плазмидами *pB.6.5* (I), *pBR322* (II) и *pATV-8* (III): 1, 2, 3, 4 — 2, 3, 4 и 7-й дни после трансфекции соответственно; Б — блот-гибридизация суммарной ДНК клеток насекомых, трансформированных плазмидой *pB.6.5*: 1 — контроль (плазмида *pB.6.5*; 0,1 мкг), 2, 3, 4, 5 — 2, 3, 4 и 7-й дни после трансфекции соответственно; В — сравнение интенсивности и динамики изменения сигналов при дот-гибридизации (ось ординат — относительный уровень интенсивности сигнала): I — *pB.6.5*; II — *pBR322*; III — *pATV-8*

сегрегация трансгена могла происходить и без участия центромера, т. е. простым делением плазмид вместе с кариоплазмой между дочерними ядрами.

Для проверки способности полученного автономного трансгена реплицироваться в клетках других эукариот мы ввели его в клетки насекомых линии SF 21. В качестве контролей в те же клетки вводили плазмиды *pBR322* и *pATV-8*. Продолжительность клеточного цикла у клеток данной линии составляет около 24 ч, поэтому репликативное поведение плазмид исследовали на 2, 3, 4 и 7-й дни после трансфекции. Для этого аликвоты клеточных культур, содержащие равное количество клеток, лизировали на фильтре и гибридизовали с радиоактивно меченой *pBR322* (рис. 3, А). На денситограмме (рис. 3, Б) видно, что содержание *pB.6.5* в клетках остается практически постоянным на 2, 3 и 4-й дни, что подтверждает репликацию плазмиды. На 7-й день происходит деградация культуры клеток.

Содержание контрольных плазмид *pBR322* и

pATV-8 уже на 2-й день было заметно меньше, чем *pB.6.5* (несмотря на то, что для трансфекции использовали равные количества плазмидных ДНК), а затем резко снижалось вплоть до полного исчезновения на 4-й день. Это свидетельствует об отсутствии репликации и кратковременном «переживании» плазмид в клетках. Для установления факта внехромосомной репликации *pB.6.5* в клетках насекомых из них была выделена суммарная ДНК. Эту ДНК использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма DH 5α, в результате чего были получены колонии, содержащие плазмиду, идентичную *pB.6.5*. Для подтверждения последнего факта проведено сравнение рестрикционных паттернов при расщеплении рестриктазами *BglII*, *HindIII* и *PstI*, из которого следует вывод об отсутствии перестроек трансгена при репликации в клетках нового хозяина. Другая часть суммарной ДНК клеток, трансфицированных плазмидой *pB.6.5*, была использована для блот-гибридизации с зондом, описанным выше (рис. 3, В). Видно, что

размеры гибридизующихся полос суммарных ДНК соответствуют таковым у контроля — плазмиды pV.6.5. Геномные ДНК трансфицированных клеток не гибридизуются, что свидетельствует об отсутствии интеграции трансгена в геном хозяина.

Таким образом, в результате взаимодействия плазмиды pATV-8 с геномом мыши произошла своеобразная «адаптация» трансгена и образовалась молекула, способная реплицироваться экстрахромосомно. Тот факт, что нуклеотидные последовательности, обеспечивающие репликацию автономного трансгена в клетках мышей, сохраняют свои функции и в клетках эволюционно далеких организмов, подтверждает высокую консервативность репликативного аппарата эукариот. Насколько широк круг хозяев, способных поддерживать репликацию pV.6.5, покажут дальнейшие исследования.

К. В. Крисан, I. М. Кихно, Л. I. Строковська, О. П. Соломко

Модифікація структури ДНК плазмиди pATV-8 у трансгенних мишей. 3. Аналіз нуклеотидної послідовності екстрахромосомного трансгена та його реплікація у клітинах комах

Резюме

Визначено нуклеотидну послідовність екстрахромосомного трансгена миші. Аналіз послідовностей ДНК, новоутворених у результаті перебудов вихідної плазмиди, показав високу гомологію деяких з них з консенсусом *ori* реплікації еукариот. Можливо, ці послідовності забезпечують стабільну реплікацію трансгена у клітинах миші. Показано, що даний трансген є також здатним до реплікації у клітинах комах.

К. V. Krysan, I. M. Kikhno, L. I. Stokovskaya, A. P. Solomko

Modification of the DNA structure of plasmid pATV-8 in transgenic mice. 3. Analysis of nucleotide sequence of the extrachromosomal transgene and its replication in insect cells

Summary

We have determined the nucleotide sequence of the murine extrachromosomal transgene. Analysis of DNA sequences, which were generated by rearrangements of the primary injected plasmid, revealed high homology with consensus sequence for eukaryotic *ori* replication. Most probably, due to these sequences transgene has gained the ability to replicate in mouse cells. We have also demonstrated, that given transgene is able to replicate in the insect cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cuzin F., Vogt M., Dieckmann M., Berg P. Induction of virus multiplication in 3T3 cells transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus. II. Formation of oligometric polyoma DNA molecules // J. Mol. Biol.—1970.—47, N 3.—P. 317—333.

2. Rassoulzadegan M., Leopold P., Vailly J., Cuzin F. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains // Cell.—1986.—46, N 4.—P. 513—519.
3. Moses K., Prives C. A unique subpopulation of murine DNA polymerase alpha/primase specifically interacts with polyomavirus T antigen and stimulates DNA replication // Mol. Cell. Biol.—1994.—14, N 4.—P. 2767—2776.
4. Eki T., Enomoto T., Masutani C., Miyajima A., Takada R., Murakami Y., Ohno T., Hanaoka M. Mouse DNA primase plays the principal role in determination of permissiveness for polyomavirus DNA replication // J. Virol.—1991.—65, N 9.—P. 4874—4881.
5. Calos M. P., Labkowski J. S., Botchan M. R. High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 10.—P. 3015—3019.
6. Razzaque A., Mizusawa H., Seidman M. M. Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells // Ibid.—1983.—80, N 10.—P. 3015—3019.
7. Gilbert D. M., Cohen S. N. Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle // Cell.—1987.—50, N 1.—P. 59—68.
8. Hagen K. G. T., Ravnán J.-B., Cohen S. N. Disparate replication properties of integrated and extrachromosomal forms of bovine papilloma virus in ID13 cells // J. Mol. Biol.—1995.—254.—P. 119—129.
9. Николаев А. И., Чкония Т. Т., Эристави-Кафиани К. А., Тарантул В. З. Анализ «спасенной» плазмиды из трансгенного тутового шелкопряда // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.—С. 76—86.
10. Николаев А. И., Чкония Т. Т., Эристави-Кафиани К. А. Внехромосомная локализация и передача по наследству рекомбинантной плазмиды, микроинъецированной в грену тутового шелкопряда // Молекуляр. биология.—1991.—25, № 4.—С. 1136—1145.
11. Newlon C. S., Theis J. F. The structure and function of yeast ARS elements // Curr. Op. Gen. Dev.—1993.—3.—P. 752—758.
12. Sohn J.-H., Choi E.-S., Kim C.-H., Agaphonov M. O., Ter-Avanesyan M. D., Rhee J.-S., Rhee S.-K. A novel autonomously replicating sequence (ARS) for multiple integration in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 // J. Bacteriol.—1996.—178, N 15.—P. 4420—4428.
13. Roth G. E. Replication analysis of plasmid DNAs injected into *Drosophila* embryos // Chromosoma.—1991.—100.—P. 267—277.
14. Masukata H., Satoh H., Obuse C., Okazaki T. Autonomous replication of human chromosomal DNA fragments in human cells // Mol. Biol. Cell.—1993.—4, N 11.—P. 1121—1123.
15. Taira T., Iguchi-Arigo S. M., Ariga H. A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter // Mol. Cell. Biol.—1994.—14.—P. 6386—6397.
16. Carroll S. M., Gaudray P., DeRose M. L., Emery J. F., Meinkoth J. L., Naikkin E., Subler M., Von Hoff D. D., Wahl G. M. Characterization of an episome produced in hamster cells that amplify a transfected CAD gene at high frequency: functional evidence for a mammalian replication origin // Ibid.—1987.—7, N 5.—P. 1740—1750.
17. Donovan S., Diffley J. F. X. Replication origins in eukaryotes // Curr. Op. Gen. Dev.—1996.—6.—P. 203—207.
18. Васецкий Е. С., Разин С. В. Клетки высших эукариот содержат белок, взаимодействующий с дрожжевой автономно реплицирующейся последовательностью (ARS) // Докл. РАН.—1993.—330, № 1.—С. 111—113.
19. Katz R. A., Omer C. A., Weis J. H., Mitsialis S. A., Faras A. J., Gunzaka R. V. Restriction endonuclease and nucleotide

- sequence analyses of molecularly cloned unintegrated avian tumor virus DNA: structure of large terminal repeats in circle junction // *J. Virol.*—1982.—42, N 1.—P. 346—351.
20. Соломко А. П., Рындич А. В., Титок Т. Г., Морозова Л. М., Вагина И. Н., Чащина Л. И., Евсиков С. В., Кириченко И. В., Саранина Н. А. Трансгенные мыши, полученные на основе плазмид рАТВ-8 и рВВ322 // *Биополимеры и клетка.*—1988.—4, № 5.—С. 267—269.
21. Чащина Л. И., Крисан К. В., Матковский В. Й., Соломко А. П. Модификация структуры ДНК плазмиды рАТВ-8 у трансгенных мышей. 2. Физическое картирование автономного трансгена и сиквенирование клонированных фрагментов его модифицированного участка // *Там же.*—1997.—13, № 5.—С. 1—6.
22. Makino Y., Kanno R., Koseki H., Taniguchi M. Development of V alpha 4 + NK T cells in the early stages of embryogenesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 6516—6520.
23. Бриков В. А., Кухлевский А. Д. Связь изменений палиндромной фракции с процессами репликации ДНК в раннем развитии морского ежа // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 2.—С. 377—383.
24. Gibbs M., Collick A., Kelly R. G., Jeffreys A. J. A tetranucleotide repeat mouse minisatellite displaying substantial somatic instability during early preimplantation development // *Genomics.*—1993.—17.—P. 121—128.
25. Kelly R. G. Similar origins of two mouse minisatellites with transposon-like LTRs // *Ibid.*—1994.—24, N 3.—P. 509—515.
26. Сальников К. В. Экстрахромосомная ДНК в клетках млекопитающих // *Цитология.*—1990.—32, № 11.—С. 1061—1071.
27. Johnson E. M., Jelinek W. R. Replication of a plasmid bearing a human *Alu*-family repeat in monkey COS-7 cells // *Proc Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 13.—P. 4660—4664.
28. Goldberg E. Z., Naroditsky B. S., Felgenhauer P. E. Replication of heterologous DNA in *Xenopus laevis* oocytes // *FEBS Lett.*—1981.—121—P. 215—218.

УДК 577.2⁰

Поступила в редакцию 17.11.98