

7. Химия и биохимия нуклеиновых кислот.— Л.: Медицина, 1968.— 430 с.
8. Белякова Н. В., Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Механизм активирующего действия АТР на репаративный синтез ДНК в хроматине // Молекуляр. биология.— 1980.— 14, № 3.— С. 586—594.
9. Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Неспецифическая кислая нуклеозидтрифосфатаза цитозоля и хроматина печени крысы: частичная очистка и основные свойства // Биохимия.— 1982.— 47, № 4.— С. 569—574.
10. Крутяков В. М., Кравецкая Т. П. Эндогенный синтез ДНК в выделенном хроматине // Молекуляр. биология.— 1978.— 12, № 3.— С. 654—662.
11. Zannis-Hadjopoulos M., Chepelinsky A. B., Martin R. G. Mapping of the 3'-end positions of SV nascent strands // J. Mol. Biol.— 1983.— 165, N 4.— P. 599—607.
12. Yoshida S., Tamiya-Koizumi K., Kojima K. Interaction of DNA polymerases with phospholipids // Biochim. et biophys. acta.— 1989.— 1007, N 1.— P. 61—66.

Ленинград. ин-т ядер. физики  
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 11.02.91

УДК 575.155:575.224.46

С. М. Ландау, А. В. Тихонов, И. С. Варзанова, Л. Г. Жарова

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПЛИКАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ РАЙОН ВИРУСА SV40, В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Предложен метод выявления функциональной активности эукариотического регуляторного района вируса SV40 в составе рекомбинантных плазмид, который может быть применен при тестировании плазмид, используемых в генной терапии. Показано, что исследованные рекомбинантные плазмиды реплицируются в культурах клеток CV1 и, следовательно, содержат функционально активный эукариотический регуляторный район вируса SV40.*

**Введение.** Одной из основных задач генной терапии является конструирование векторов и изучение их биологической активности (репликации и экспрессии) в культурах клеток млекопитающих до их использования в модельных опытах на животных. В связи с этим представляет интерес исследование репликативной активности рекомбинантных плазмид, содержащих эукариотический регуляторный район, в частности, регуляторный район вакуолизирующего вируса SV40. Анализ репликации таких рекомбинантных плазмид дает возможность сделать заключение о функциональной активности регуляторного района этого эукариотического вектора. Кроме того, известно, что реплицирующиеся ДНК являются преимущественной матрицей для транскрипции. Таким образом, оптимизируя условия репликации плазмид, содержащих ориджин SV40, можно, по-видимому, оптимизировать и экспрессию генов, находящихся под промотором SV40.

Известно, что рекомбинантные плазмиды, содержащие в качестве ориджина репликации регуляторный район SV40, не могут самостоятельно реплицироваться в перmissive для SV40 культурах обезьяньих клеток ввиду отсутствия Т-антигена (за исключением COS клеток, в которых Т-антиген синтезируется). В то же время даже наличие гена А-белка (Т-антигена SV40) в *цис*-положении в составе рекомбинантных плазмид также не приводит к их репликации из-за наличия «ядовитых последовательностей» [1].

Ранее нами было показано, что рекомбинантные плазмиды, в состав которых входили один и два полных генома вируса SV40, реплицируются в культурах перmissive клеток CV1 в присутствии вируса

© С. М. ЛАНДАУ, А. В. ТИХОНОВ, И. С. ВАРЗАНОВА, Л. Г. ЖАРОВА, 1991

SV40, несмотря на наличие «ядовитых последовательностей» [2, 8]. Из результатов этих опытов было видно также, что в отсутствие вируса плаزمиды *pSV9* не реплицируются. Плазмиды *pBR322* (контрольная) не реплицировались ни при каких условиях [2, 3].

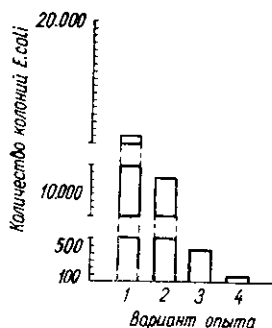
В задачу настоящего исследования входила индукция репликации плазмид, содержащих из всего генома SV40 только регуляторный район этого вируса, и выявление ее двумя методами: дот-гибридизацией и трансформацией компетентных клеток *Escherichia coli*.

В работе анализировали плазмиды: *pHG*, содержащую ген прокариотической дигидрофолатредуктазы под ранним промотором SV40 [4], *pKCR*-векторы для клонирования генов на *Bam*III-сайте под ранним промотором SV40 [4], *pGA293*, содержащую ген прокариотической β-галактозидазы под ранним промотором SV40 [5].

Все исследуемые нами рекомбинантные плазмиды содержали «ядовитые последовательности» и не содержали гена Т-антигена, необходимого для репликации этих плазмид.

Для создания условий, в которых может происходить репликация этих рекомбинантных плазмид в культурах клеток млекопитающих, мы вводили плазмиды одновременно с помощником — вирусом SV40 [2, 3, 6].

Рис. 1



**Материалы и методы.** Трансформацию проводили в культурах клеток *CV1* во флаконах объемом 50 мл после нарастания монослоя, состоящего примерно из  $10^6$  клеток. Плазмидную ДНК (1 мкг) в составе кальциевого преципитата вводили в культивируемые клетки *CV1*. Непосредственно перед трансформацией рекомбинантной ДНК культуры клеток инфицировали вирусом SV40. В ходе исследований использовали вирус SV40 с титром  $10^6$  ВОЕ/мл (по 700 мкл на 50 мл флакон) [7]. Плазмидную ДНК выделяли из культур клеток, лизированных по методу Хирта, сразу после трансфекции (0-точка) для выявления ее связывания с культурой клеток и через сутки после трансфекции для выявления ее репликации в культурах клеток.

Количество плазмидной ДНК, выделенной из культур клеток млекопитающих, определяли по трансформирующей активности на компетентных клетках *E. coli* (рис. 1: влияние вируса SV40 на репликацию плазмиды *pHG*, содержащей регуляторный район SV40: 1 — количество колоний *E. coli*, выросших на среде с Amp после трансформации 0,3 мкг плазмиды *pHG*; 2 — то же после трансформаций компетентных клеток плазмидной ДНК, выделенной из культур клеток на нулевой точке инфекции; 3 — то же через сутки после совместного введения с вирусом SV40; 4 — то же через сутки после введения) и автордиографическим методом, учитывая соответствующие контроли (рис. 2: репликация рекомбинантных плазмид, содержащих регуляторный район, в культурах перmissive клеток *CV1* в присутствии вируса SV40 (последовательность пятен на автографе и пиков соответствующих автордиограмм справа налево: 1 — 0,1 мкг *pBR322*; 2 — ДНК из необработанных клеток; 3 — нулевая точка инфекции; 4 — первые сутки после совместной с вирусом SV40 трансфекции с плазмидой): а — репликация плазмиды *pHG* в присутствии вируса SV40; б — то же плазмиды *pKCR*; в — то же плазмиды *pGA293*; г — репликация плазмиды *pHG* в отсутствие вируса SV40).

Методика проведения исследований с использованием автордиографического метода описана ранее [2, 3]. В качестве меченого зонда использовали  $^{32}\text{P}$ -*pBR322* ( $10^8$  имп/мкг).

Данные радиоавтографа изучали на денситометре «1.КВ Ultra-scan-XL», по показателям которого площади пиков на графиках соответствуют плотностям пятен на радиоавтографе.

Предварительно были изучены данные по титрованию плазмиды *pBR322* для определения зависимости между количеством наносимой на нитроцеллюлозный фильтр плазмидной ДНК и площадью полученного на денситометре пика. На всех графиках по оси абсцисс отложена длина (мм), а по оси ординат — интенсивность поглощения. Расчеты количества рекомбинантной плазмидной ДНК, соответствующие определенному пику, проводили исходя из средней арифметической площади пика плазмиды *pBR322*, соответствующего 0,1 мкг ДНК. Пятна

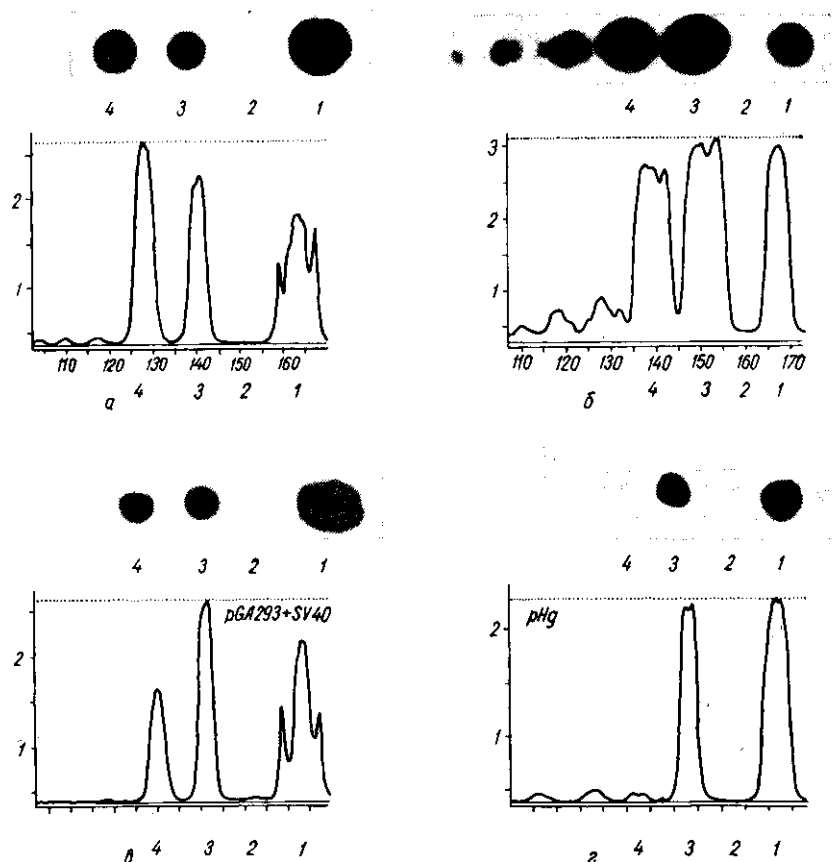


Рис. 2

на автографах и пики денситограмм на рисунке в порядке справа налево соответствуют 0,1 мкг ДНК *pBR322* (контроль), затем контроль клеток *CV1*, затем нулевая точка трансфекции и первые сутки после трансфекции.

**Результаты и обсуждение.** Прежде всего мы исследовали уровень связывания плазмидной ДНК с культурой клеток. При учете результатов трансформации на одних и тех же компетентных бактериальных клетках оказалось, что связывание плазмидной ДНК с клетками в культуре ткани колеблется в пределах 10—70 % от всего количества препарата, добавленного к клеткам.

Например, в одном из пяти опытов были получены следующие результаты (см. рис. 1): 1) трансформирующая активность плазмидной ДНК в бактериальных компетентных клетках составляла  $3,7 \cdot 10^4$  колоний на 1 мкг; 2) трансформирующая активность всего препарата связавшейся с клетками плазмидной ДНК, выделенной сразу после трансфекции, т. е. на нулевой точке, составляла  $2 \cdot 10^4$ .

Таким образом, судя по результатам трансформации, из культур клеток сразу после трансфекции удалось выделить 0,5 мкг плазмиды, а так как к клеткам был добавлен 1 мкг плазмиды, следовательно, с

культурой клеток связалось 50 % препарата. По-видимому, величина колебаний 10—70 % связана не столько с соотношением количества связавшейся и не связавшейся с клетками плазмидной ДНК в различных опытах, сколько с вариабельностью результатов самой реакции трансформации в компетентных клетках *E. coli*, хотя все варианты опытов осуществлены на одних и тех же компетентных клетках.

Более четкие результаты получены при использовании метода дот-гибридизации. Здесь результаты опытов по связыванию плазмид с культурой клеток млекопитающих были более стабильны и составляли в среднем из семи опытов примерно 20 % (рис. 2, *a—г*, пик 3, нулевая точка инфекции), величина колебаний была 13—30 %. На рис. 2 четко видно также отсутствие пятна на автографе и соответственно пика на денситограмме там, где была нанесена ДНК из необработанных клеток *CV1*, т. е. фон практически полностью отсутствует (рис. 2, *a—г*, точка 2).

Исследование индукции репликации рекомбинантных плазмид в культурах клеток млекопитающих методом трансформации компетентных клеток *E. coli* показало, что при одновременном введении вируса SV40 и плазмидной ДНК через сутки можно выявить от 0,02 до 0,1 мкг препарата. В то же время количество плазмиды, введенной без вируса SV40, через сутки составляло всего несколько наногرامмов, либо плазмиды вообще отсутствовала (см. рис. 1).

Результаты анализа индукции репликации рекомбинантных плазмид, содержащих регуляторный район вируса SV40, в присутствии этого вируса с помощью автордиографического метода показаны на рис. 2. В случае репликации (см. рис. 2, *a—в*) видны два пика рекомбинантной плазмиды: первый (пик 3) — соответствует ДНК плазмиды, связавшейся с культурой клеток млекопитающих (0-точка трансфекции), второй (пик 4) — соответствует ДНК рекомбинантной плазмиды, реплицирующейся в присутствии вируса SV40, через сутки после трансфекции. Если же в культуру клеток *CV1* не внесен вирус SV40, репликация отсутствует (рис. 2, *г*), отсутствует пятно на автографе (пятно 4) и соответствующий пик на денситограмме (пик 4). Из рис. 2 (*a—в*) видно, что все три исследуемые нами плазмиды *pHG*, *pKCR*, *pGA293* реплицировались в присутствии вируса SV40 (пятно 4, пик 4).

Результаты, полученные при исследовании репликации плазмиды *pHG* в присутствии вируса SV40, свидетельствуют о наличии достаточного высокого ее уровня в первые сутки после трансфекции. Понятно, что репликация плазмид может происходить только в инфицированных вирусом клетках *CV1*. Известно, что количество инфицированных вирусом SV40 клеток составляет примерно 6 % от общего количества клеток [7], а так как во флаконах объемом 50 мл в среднем  $1 \cdot 10^6$  клеток, то количество инфицированных клеток —  $6 \cdot 10^4$ .

1 мкг плазмиды *pHG* содержит  $1,5 \cdot 10^{11}$  копий ДНК (исходя из того, что ее размер 5,5 тыс. п. о.). Соответствующие вычисления с учетом размера пика реплицирующейся плазмиды *pHG* показывают, что ее количество составляет 0,25 мкг, а количество копий —  $10^6$  на инфицированную клетку.

Аналогичные расчеты выполнены с плазмидами *pKCR* и *pGA293*, соответствующие размеры их 0,5 и 14 тыс. п. о. Количество копий реплицирующихся плазмид соответственно  $10^6$  и  $10^5$  на инфицированную клетку, соответствующие пики реплицирующейся ДНК составляют 0,45 и 0,12 мкг.

Таким образом, при использовании двух методов (трансформации компетентных клеток *E. coli* и дот-гибридизации) показано, что исследуемые нами плазмиды *pHG*, *pKCR*, *pGA293* реплицируются в культуре клеток *CV1* в присутствии вируса SV40. Эти данные свидетельствуют о том, что трансактивированный вирусом SV40 Т-антиген связывается с регуляторным эукариотическим районом этих плазмид и индуцирует их репликацию практически до уровня репликации вирусной ДНК [3].

В данной работе предложен метод выявления функциональной ак-

тивности эукариотического регуляторного района вируса SV40 в составе рекомбинантных плазмид, который может быть применен при тестировании плазмид, используемых в генной терапии. Показано, что исследуемые нами рекомбинантные плазмиды *pHG*, *pKCR*, *pGA293* реплицируются в культурах клеток *CV1* и, следовательно, содержат функционально активный эукариотический регуляторный район вируса SV40.

#### Резюме

Запропоновано метод виявлення функціональної активності еукаріотичного регуляторного району вірусу SV40 у складі рекомбінантних плазмід, який може бути застосований при тестуванні плазмід, що використовуються в генній терапії. Показано, що досліджені рекомбінантні плазмиди реплікуються в культурах клітин *CV1* внаслідок вмісту функціонально активного еукаріотичного регуляторного району вірусу SV40.

#### Summary

The recombinant plasmids replication in mammalian cell cultures has been employed as a method for estimating the functional activity of SV40 eukaryotic regulatory region.

It was shown that recombinant plasmids examined replicate in mammalian cell cultures and therefore possess functional active SV40 regulatory region.

This method can be used for the purposes of gene therapy.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lusky M., Botchan M.* Inhibition of SV40 replication of simian cells by specific *pBR322* sequences // *Nature*.— 1981.— 293.— P. 79—81.
2. *Исследование* репликации плазмид, содержащих геном SV40 в клетках млекопитающих / С. М. Ландау, Л. К. Сасина, Н. А. Чашин, Л. А. Чашина // *Биополимеры и клетка*.— 1987.— 3, № 3.— С. 134.
3. *Изучение* репликации плазмид, содержащих полный геном SV40, в перmissive культурах клеток млекопитающих / С. М. Ландау, Л. К. Сасина, М. А. Шлянкевич, О. Б. Дризе // Там же.— 1989.— 5, № 2.— С. 94.
4. *O'Hare K., Benoist C.* Transformation of mouse fibroblast to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1981.— 78, N 3.— P. 1527—1531.
5. *Gynheung A., Hidaka K., Siminovitch L.* Expression of bacterial  $\beta$ -galactosidase in animal cells // *Mol. and Cell. Biol.*— 1982.— 2, N 2.— P. 1628—1632.
6. *Сасина Л. К., Ландау С. М., Кордюм В. А.* Конструирование и анализ двурепликонных гибридных плазмид, содержащих геном обезьяньего паповавируса SV40 // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*.— 1986.— № 1.— С. 26.
7. *Landau S. M., Nosach L. N., Pavlova G. V.* Morphological method for estimation of simian virus 40 infectious titer // *Arch. Virol.*— 1982.— 73.— P. 79—84.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 05.07.90