

Взаємодія трансгенів та геномів реципієнтів у еукаріотів. Екстрахромосомні трансгени

К. В. Крисан, О. П. Соломко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

В огляді основну увагу приділено екстрахромосомним трансгенам. Такі трансгени викликають підвищену цікавість тому, що в порівнянні з інтегративними трансгенами вони не можуть спричинювати інсерційний мутагенез та є більш контрольованими і ефективними.

Механізми утворення екстрахромосомних трансгенів. Слід відзначити, що в екстрахромосомному стані трансгени існують значно рідше, ніж в інтегрованому. Є кілька стратегій створення конструкцій, здатних до екстрахромосомної реплікації. Одна з найважливіших — це використання нуклеотидних послідовностей вірусів, у життєвому циклі яких є екстрахромосомні форми.

Одним з перших цим шляхом пішов Берг, який показав утворення моно- та олігомерних кільцевих форм вірусу поліоми в інфікованих клітинах [2]. Після відкриття цього явища нуклеотидні послідовності вірусу поліоми широко використовували для створення позахромосомних векторів. Плазмід, яка містила ген великого Т-антигена вірусу поліоми, реплікувалася екстрахромосомно в клітинах миші, але її інтеграції не було виявлено. Однак плазмід, виділена з трансгенних тварин, відрізнялася від введеної плазміді делецією частини вірусних послідовностей та вставкою фрагмента геномної ДНК миші, який, імовірно, сприяв сегрегації плазмід [3].

Зроблено також спроби використання вірусу поліоми, який уражує гризунів, для створення векторів, здатних реплікуватися екстрахромосомно в клітинах інших ссавців. Проте ці спроби закінчилися невдачею — реплікації вірусу не спостерігалось. Виявилось, що пермісивність хазяїв визначається наявністю специфічної ДНК-полімера-

зи — α -праймази [4, 5]. Напевно, є й інші фактори, що забезпечують пермісивність, але їх поки що не ідентифіковано. Серед інших вірусів досить широкого використання набув вірус папіломи бика (ВПБ). Рекombінантний ВПБ, що містив два довгих кінцевих повтори вірусу лейкемії Молоні, реплікувався екстрахромосомно, але зазнавав модифікації.

Причиною перебудов була незаконна рекомбінація, причому вона завжди відбувалася в певних ділянках [6]. Цікавим є те, що цей вірус міг утворювати епісоми та автономно реплікуватися також у клітинах непермісивного хазяїна (миші). При цьому модифікацій вірусу не спостерігалось, а його реплікація відбувалася незалежно від клітинного циклу. Поряд з епісомами, деякі клітинні лінії містили інтегровані копії ВПБ [7, 8]. Поява кільцевих молекул вірусної ДНК, які автономно реплікуються, спостерігалась також після інфекції культури клітин печінки гепатоміоцитами, зокрема, вірусом гепатиту В [9, 10].

Цікаві результати отримано Тарантулом та співавт. [11] при мікроін'єкції плазмід, що містила довгі кінцеві повтори вірусу саркоми Рауса, в грену тутового шовкопряду. Незважаючи на те, що ретровіруси є інтегративними вірусами, трансгенні метелики багатьох субліній містили трансген у вигляді епісом. При цьому в складі трансгена виявлено інсерції фрагментів геномної ДНК тутового шовкопряду. Аналіз вбудованих фрагментів показав, що вони відносяться до фракції помірних повторів, що є еволюційно консервативними. Мож-

ливо, ці фрагменти забезпечували позахромосомну реплікацію та сегрегацію трансгена [11, 12]. Отже, при взаємодії гетерологічних геномів відбувалася своєрідна «адаптація» трансгенів до геному хазяїна. Схоже явище, коли в результаті перебудов трансген набував здатності до позахромосомного існування, спостерігалось при введенні у зиготи миші плазмиди *pATV8*, яка складалася з провірусної ДНК вірусу саркоми Рауса, клонованої у бактеріальний вектор *pBR322*. З трансгенних мишей покоління F_0 та їхніх нащадків було виділено ідентичну плазмиду, яка реплікувалася позахромосомно та відрізнялася від первинної плазмиди делеціями довгих ділянок та внутрішніми перебудовами. Аналіз нуклеотидної послідовності цієї плазмиди дозволив зробити висновок, що функції *ori* реплікації виконували новоутворені в результаті перебудов ділянки [13].

Для перевірки частоти мутування екстрахромосомних трансгенів створено різні модельні системи. В одній з них плазмиди, яка містила *ori* реплікації вірусу SV40 та маркерний ген, у пермісивних клітинах реплікувалася позахромосомно, а частота мутацій у цій плазмиді перевищувала частоту спонтанних мутацій [14, 15]. Тут слід відзначити, що підвищений рівень мутацій не є характерним для більшості екстрахромосомних трансгенів. Частіше буває, що перебудова трансгена відбувається одноразово, через короткий час після введення його в ядро, після чого структура трансгена стабілізується.

У геномах еукаріотів є численні стартові точки реплікації. При клонуванні геномних фрагментів у векторні плазмиди та наступною трансфекцією такими бібліотеками відповідних еукаріотичних клітин можна виявити плазмиди, які здатні реплікуватися автономно. Це свідчить про наявність у клонованому фрагменті елементів, здатних здійснювати реплікацію конструкції. Такі елементи, до складу яких входять *ori* реплікації та додаткові нуклеотидні послідовності, зветься ARS-елементами (ARS — *autonomously replicating sequence*, послідовність, яка автономно реплікується). Вперше їх отримано у дріжджів [16, 17], а пізніше — у дрозофіли [18] та вищих еукаріотів, включаючи людину [19, 20].

Потрібно зазначити, що відомі випадки інтеграції ARS-елементів у геном після кількох раундів позахромосомної реплікації [17]. Деякі з ARS-елементів одержано за допомогою *ori* реплікації, які містилися в генах, здатних до ампліфікації, таких як *cad* [21]. Аналіз нуклеотидних послідовностей, що забезпечують позахромосомну реплікацію ARS-елементів, показав, що в усіх еу-

каріотів є досить консервативна AT-багата канонічна послідовність. Ці послідовності майже однакові навіть у дріжджів та людини [22], причому за допомогою білкового блотингу показано, що дріжджові *ori* реплікації взаємодіють з відповідними білками вищих еукаріотів [23].

Одним з видів ARS-елементів є штучно створені хромосоми. Вони мають великі розміри та містять усі основні складові хромосом — теломери, центромери та *ori* реплікації. Теломери є необхідними для лінійних штучних хромосом — це запобігає їхній інтеграції у хромосоми хазяїна. Найрозповсюдженішими є штучні хромосоми дріжджів (YAC — *yeast artificial chromosomes*). Використовуються також штучні хромосоми бактерій (BAC — *bacterial artificial chromosomes*). Останні створюються зазвичай на основі F'-епісом бактерій або бактеріофага P1. Завдяки високій консервативності нуклеотидних послідовностей, які беруть участь у процесах реплікації та сегрегації хромосом, дріжджові і навіть бактеріальні штучні хромосоми можуть автономно реплікуватися у клітинах вищих еукаріотів [24]. Відзначено можливість інтеграції YAC у геном ссавців, а також нестабільність сегрегації екстрахромосомної форми YAC, що пов'язана, можливо, з порушенням функцій центример дріжджів у клітинах ссавців. Пізніше показано, що YAC можуть бути стабільними та реплікуватися позахромосомно в клітинах миші, формуючи структури, схожі на DM (*double-minute chromosomes*, один з видів природних позахромосомних ДНК еукаріотів) [25, 26]. Такі конструкції, що здатні підтримувати свою чисельність у клітинах ссавців, зветься штучними хромосомами ссавців (MAC — *mammalian artificial chromosomes*). Іноді для підвищення ефективності MAC у вихідні YAC вводяться теломери, центромери та (або) *ori* реплікації ссавців [27].

Незважаючи на наявність теломер, у клітинах ссавців іноді відбувається олігомеризація YAC. Після стабілізації новоутворені MAC можуть мати розмір до 5000 тис. п. н. [28]. Активність реплікації MAC можна значно збільшити шляхом введення до їхнього складу вірусних *ori* реплікації. Кільцеві YAC, що містили *ori* вірусу Епштейна-Барр, стабільно реплікувалися як епісоми в клітинах людини [29]. Можливо, це пояснюється тим, що в еукаріотів є кілька типів *ori* реплікації, які активуються на різних етапах S-фази клітинного циклу [30]. Тому, якщо штучна хромосома містить у своєму складі *ori*, які активуються неодноразово, вона може реплікуватися більше одного разу за клітинний цикл.

Слід зазначити, що в еукаріотів є родина білків

MCM (minichromosome maintenance proteins). Вперше їх виявлено у дріжджів як білки, що зв'язуються з *ori* реплікації дріжджових епісом. У дріжджів, мутантних за генами цих білків, епісоми не могли реплікуватися [31]. Ці білки знайдено в усіх еукаріотів і вони є висококонсервативними. Різні члени родини зв'язуються з різними типами *ori* реплікації [32]. Мутанти за генами окремих MCM-білків не можуть підтримувати реплікацію мініхромосом з відповідними *ori* реплікації [33]. У таких мутантів також спостерігаються порушення реплікативного циклу хромосом [34].

Сегрегація екстрахромосомних трансгенів. Що стосується шляхів сегрегації екстрахромосомних трансгенів, то найвірогіднішими, на нашу думку, є такі: перший — це сегрегація за участю центромер, ДНК яких виявлено в складі епісом та мініхромосом [35]. Трансгени можуть, скоріше за все, набувати центромер через утворення нецентромер з так званих «латентних» центромер, які містяться в деяких повторюваних послідовностях [35]. Так, відомо, що ацентричні мініхромосоми дрозофіли сегрегують подібно до нормальних хромосом, тобто функції центромер виконують якісь інші нуклеотидні послідовності [36], як, наприклад, у малих кільцевих ДНК [37].

Можливий і другий шлях сегрегації — випадкове розділення між дочірніми ядрами у процесі клітинного поділу. Окремо треба підкреслити третю можливість сегрегації автономних трансгенів — вона стосується тих ДНК, які не мають у своєму складі центромер, та базується на тій же основі, що й сегрегація низькокопійних плазмід у прокариотів. Ці плазміди кодують білки, які зв'язуються з центромероподібними нуклеотидними послідовностями плазмід та одночасно з певними ділянками бактеріальної хромосоми.

Таким чином, під час поділу клітини вони розходяться до дочірних клітин разом з хромосомами, а вже потім відділяються від них. Подібний механізм виявлено при сегрегації кільцевої реплікативної форми ВПБ [38]. У дріжджів виявлено білок, що зв'язується з сайтами одного з ацентричних екстрахромосомних елементів. Цей білок має дуже високу гомологію з ідентифікованим раніше білком людини SENP-B, який асоційований з ДНК центромер [39]. Дуже вірогідно, що схожий механізм діє також у випадку інших автономних трансгенів, які, хоча й не кодують специфічних білків, але можуть використовувати для цього хазяїнські ДНК-зв'язуючі білки.

Висновки. Таким чином, в екстрахромосомному стані можуть існувати трансгени різної природи. В цілому, їх можна розділити на дві групи —

трансгени, здатні до позахромосомної реплікації завдяки наявності у їхньому складі специфічних нуклеотидних послідовностей, та такі, що набули цієї здатності *de novo* в результаті вбудовування фрагментів геному хазяїна, які містили відповідні *цис*-діючі послідовності ДНК, або внутрішньомолекулярних перебудов, що призвели до утворення нових нуклеотидних послідовностей, здатних виконувати функції *ori* реплікації.

Як пояснити те, що одні молекули ДНК при трансгенезі інтегруються у геном реципієнта, а інші — утворюють екстрахромосомні трансгени (найцікавішим є те, що іноді навіть при введенні однакових екзогенних ДНК частина отриманих трансгенних тварин містить інтегровані, а частина — позахромосомні трансгени)?

По-перше, це може бути наслідком інтеграції в різні ділянки геному (через випадкові події або спорідненість введеної ДНК до певних ділянок геному), результатом чого стають різні перебудови трансгена та відповідно спроможність чи неспроможність до наступної ексцизії та екстрахромосомного існування.

По-друге, якщо перебудови трансгена відбуваються у позахромосомному стані, стає можливою селекція плазмід, здатних до автономної реплікації, наприклад, разом з природними екстрахромосомними ДНК.

По-третє, різні причини можуть обумовити перебудову трансгенів на окремих етапах раннього розвитку зародка, що вплине на характер перебудов та на форму існування трансгена. Однією з таких причин може бути неодноразовість введення екзогенної ДНК при роботі з великою кількістю зародків. Навіть за невеликий проміжок часу у зиготі можуть відбутися процеси, які стануть вирішальними для долі трансгена, зокрема, це перехід від репресованого стану геному до його мінорної активації у пізній G₂-фазі.

K. V. Krysan, A. P. Solomko

Interaction of recipient genome and transgenes in eukaryotes. Extrachromosomal transgenes

Summary

Two forms of transgenes are known — integrated into the host genome and extrachromosomal. Although the integrated transgenes are more widespread, the extrachromosomal ones are more interesting and promising for biotechnology and biomedicine. At the same time, the mechanisms determining the fate of the introduced DNA molecule, have not been studied entirely. In this review we discuss these mechanisms and analyze the extrachromosomal transgenes of different origin.

К. В. Крисан, А. П. Соломко

Взаимодействие трансгенов и геномов реципиентов у эукариотов. Экстрахромосомные трансгены

Резюме

Известны две формы существования трансгенов — интегрированные в геном реципиента и экстрахромосомная. Хотя интегрированные трансгены встречаются значительно чаще, чем способные к стабильному внехромосомному существованию, последние являются более интересными и перспективными для биотехнологии и медицины. Однако механизмы, определяющие форму существования введенной молекулы ДНК, исследованы не в полной мере. В данном обзоре проанализированы эти механизмы и рассмотрены экстрахромосомные трансгены различного происхождения, способные к стабильной репликации и сегрегации в клетках эукариотов.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Calos M. P. The potential of extrachromosomal replicating vectors for gene therapy // *Trends Genet.*—1996.—12, N 11.—P. 463—466.
- 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.
- 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.
- Moses K., Prives C. A unique subpopulation of murine DNA polymerase alpha/primase specifically interacts with polyomavirus T antigen and stimulates DNA replication // *Mol. and Cell. Biol.*—1994.—14, N 4.—P. 2767—2776.
- Eki T., Enomoto T., Masutani C. Mouse DNA primase plays the principal role in determination of permissiveness for polyomavirus DNA replication // *J. Virol.*—1991.—65, N 9.—P. 4874—4881.
- Kitamura Y., Naito A., Yoshikura H. Illegitimate recombination in a bovine papillomavirus shuttle vector: a high level of site specificity // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1991.—179, N 1.—P. 251—258.
- 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.—P. 59—68.
- Ten Hagen K. G., Ravnan 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.
- Newbold J. E., Xin H., Tencza M. The covalently closed duplex form of the Hepadnavirus genome exists *in situ* as a heterogeneous population of viral minichromosomes // *J. Virol.*—1995.—69, N 6.—P. 3350—3357.
- Tuttleman J. S., Pourcel C., Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in Hepadnavirus-infected cells // *Cell.*—1986.—47, N 3.—P. 451—460.
- Николаев А. И., Чкония Т. Т., Эристави-Кафиани К. А., Тарантул В. В. Анализ «спасенной» плазмиды из трансгенного тутового шелкопряда // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 3.—С. 76—86.
- Николаев А. И., Чкония Т. Т., Эристави-Кафиани К. А. Внехромосомная локализация и передача по наследству рекомбинантной плазмиды, микроинъекцированной в грену тутового шелкопряда // *Молекуляр. биология.*—1991.—25, № 4.—С. 1136—1145.
- Крисан К. В., Кыхно И. М., Строковская Л. И., Соломко А. П. Модификация структуры ДНК плазмиды *pATV8* у трансгенных мышей. 3. Анализ нуклеотидной последовательности экстрахромосомного трансгена и его репликация в клетках насекомых // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 1.—С. 57—62.
- Calos M. P., Lobkowski 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.
- Razzaque A., Mizusawa H., Seidman M. M. Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 10.—P. 3010—3014.
- Newlon C. S., Theis J. F. The structure and function of yeast ARS elements // *Curr. Opin. Gen. Develop.*—1993.—3.—P. 752—758.
- Sohn J.-H., Choi E.-S., Kim C.-H. 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.
- Roth G. E. Replication analysis of plasmid DNAs injected into *Drosophila* embryos // *Chromosoma.*—1991.—100.—P. 267—277.
- 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.
- Taira T., Iguchi-Arigo S. M., Ariga H. A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter // *Mol. and Cell. Biol.*—1994.—14.—P. 6386—6397.
- Carroll S. M., Gaudray P., DeRose M. L. Characterization of an episome produced in hamster cells that amplify a transfected CAD gene at high frequency: functional evidence for a mammalian replication origin // *Mol. and Cell. Biol.*—1987.—7, N 5.—P. 1740—1750.
- Valenzuela M. S. An autonomously replicating sequence from HeLa DNA shows a similar organization to the yeast ARS1 element // *Mol. and Gen. Genet.*—1990.—220.—P. 361—365.
- Васецкий Е. С., Разин С. В. Клетки высших эукариот содержат белок, взаимодействующий с дрожжевой автономно реплицирующейся последовательностью (ARS) // *Докл. АН России.*—1993.—330, № 1.—С. 111—113.
- Allshire R. C., Cranston G., Gosden J. R. A fission yeast chromosome can replicate autonomously in mouse cells // *Cell.*—1987.—50, N 3.—P. 391—403.
- Featherstone T., Huxley C. Extrachromosomal maintenance and amplification of yeast artificial chromosome DNA in mouse cells // *Genomics.*—1993.—17.—P. 267—278.
- Schedl A., Beermann F., Thies E. Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 12.—P. 3073—3077.
- Nonet G. H., Wahl G. M. Introduction of YACs containing a putative mammalian replication origin into mammalian cells can generate structures that replicate autonomously // *Somat. Cell. Mol. Genet.*—1993.—19.—P. 171—192.
- Ikeno M., Grimes B., Okazaki T. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes // *Nat. Biotechnol.*—1998.—16, N 5.—P. 431—439.
- Simpson K., McGnigan A., Huxley C. Stable episomal maintenance of yeast artificial chromosomes in human cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1996.—16, N 9.—P. 5117—5126.
- Donovan S., Diffley J. F. X. Replication origins in eukaryotes // *Curr. Opin. Gen. Develop.*—1996.—6.—P. 203—207.
- Maiti A. K., Sinha P. The mcm2 mutation of yeast affects replication, rather than segregation or amplification of the two micron plasmid // *J. Mol. Biol.*—1992.—224.—P. 545—558.

32. Chong J. P. J., Thommes P., Blow J. J. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication // *Trends Biochem. Sci.*—1996.—21.—P. 102—106.
33. Yan H., Merchant A. M., Tye B. K. Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast // *Genes and Develop.*—1993.—7.—P. 2149—2160.
34. Treisman J. E., Follette R. J., O'Farrell P. H., Rubin G. M. Cell proliferation and DNA replication defects in a *Drosophila* MCM2 mutant // *Genes and Develop.*—1995.—9.—P. 1709—1715.
35. Choo K. H. A. Turning on the centromere // *Nat. Genet.*—1998.—18.—P. 3—4.
36. Williams B. C., Murphy T. D., Goldberg M. L., Karpen G. H. Neocentromere activity of structurally acentric mini-chromosomes in *Drosophila* // *Nat. Genet.*—1998.—18.—P. 30—37.
37. Renault S., Degroote F., Picard P. Identification of short tandemly repeated sequences in extrachromosomal circular DNAs from *Drosophila melanogaster* embryos // *Genome.*—1993.—36, N 2.—P. 244—254.
38. Lehman C. W., Botchan M. R. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95.—P. 4338—4343.
39. Murakami Y., Huberman J. A., Hurwitz J. Identification, purification, and molecular cloning of autonomously replicating sequence-binding protein 1 from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93, N 1.—P. 502—507.

УДК 577.29

Надійшла до редакції 23.10.2000