



УДК 577.21:578.828.111

ОТСУТСТВИЕ ГЕНОВ ВИРУСОВ САРКОМЫ ПТИЦ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ИМИ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А. В. Рындич, И. Герик, В. Лготак, Б. А. Яцула, Я. Свобода

Введение. Индукцию трансформации клеток в культуре и образование опухолей у животных вирусами саркомы птиц обуславливает ген *src*, входящий в состав вирусного генома [1, 2]. Вирусный онкоген обычно фиксируется в геноме клеток хозяина, и его транскрипция регулируется сильным вирусным промотором [3].

Трансформация вирусами саркомы птиц клеток млекопитающих представляет собой удобную экспериментальную модель для исследования взаимодействия вирусного и клеточного геномов. Такие клетки не пермиссивны для этих вирусов, что позволяет проведение длительных экспериментов для изучения сохранения в клетке и функционирования провирусной ДНК в условиях, исключающих повторную инфекцию.

Ранее было показано, что вирусспецифические РНК, транскрибируемые в клетках млекопитающих, перестают обнаруживаться как в цитоплазме [4], так и в ядре [5] некоторых линий после длительного пассирования их *in vitro* или *in vivo*. В изученных нами моноклеточных клонах [5] репрессия транскрипции происходила без заметной делеции провирусных последовательностей.

Из многих линий клеток опухолей млекопитающих, индуцированных вирусами саркомы птиц наряду с линиями клеток, содержащих полный провирус, были найдены такие, где не удавалось получить трансформирующий вирус при слиянии с индикаторными клетками цыплят, содержащими вирус-помощник [6].

В настоящем сообщении показано, что в ряде случаев такие клетки не содержат в своем геноме последовательностей *src* и других вирусных генов. Полученные данные свидетельствуют о том, что после превращения нормальной клетки в опухолевую для поддержания трансформированного состояния может не возникать необходимость не только в экспрессии вирусного генома, но и в наличии самих вирусных генов в клетке, в том числе и гена *src*.

Материалы и методы. Моноклеточный клон *RVP₃K3* выделен из линии клеток *RVP₃*, полученных из опухоли мыши; опухоль была индуцирована инокуляцией клеток саркомы кур, вызванной у цыплят вирусом саркомы Рауса (штамм *Pr-RSV-C*). После пассирования в культуре клетки *RVP₃K3* вводили подкожно мышам *C57BL/6* [5].

Линия клеток *H-35* изолирована из опухоли сирийского хомячка, образовавшейся после внутриэмбрионального введения клеток куриной саркомы. Эта саркома получена у цыплят инокуляцией фибробластов, которые были трансформированы с помощью ДНК *XC*-клеток [6].

Линии клеток *H-2257-1*, *H-2257-2*, *II-2257-3T* и *H-2257-3M* выделены соответственно из трех различных опухолей и метастазов третьей опухоли, образовавшихся после внутриэмбрионального введения сирийским хомячкам клеток куриной саркомы. Саркома возникла после длительного латентного периода у цыплят, инфицированных трансформационно-дефектным (*td*) мутантом *Pr-RSV-C*, адаптированным к клеткам уток (*td da Pr-RSV-C*) [7]. Линии клеток перелёпки выделены из опухоли, полученной инокуляцией

клеток той же куриной саркомы либо трансформированной в культуре *td Pr-RSV-C* [8], *da Pr-RSV-C* или *td da Pr-RSV-C* [7].

Эксперименты по восстановлению вируса при слиянии опухолевых клеток млекопитающих с куриными фибробластами и определение *gs*-антигена проводили, как описано ранее [7].

Высокомолекулярную ДНК из ядер клеток *RVP₃* выделяли по методу Хирта [9] и очищали экстракцией фенолом и хлороформом [5]; из клеток *H-35* и *H-2257* — используя депротенинизацию протеиназой К [6].

Анализ вирусспецифических последовательностей осуществляли методом блот-гибридизации с соответствующими зондами ядерной ДНК трансформированных клеток после рестрикции эндонуклеазами-*EcoRI* I или *Hind* III, предоставленными А. Янулайтисом и Б. Ребентишем. Для этой цели 20 мкг ДНК обрабатывали 1 ч при 37 °С 5-10-кратным количеством рестриктазы, необходимым для полного гидролиза такого же количества ДНК фага λ , после чего фрагменты разделяли электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозные фильтры [10] и гибридизовали, как описано [11].

Гибридизацию проводили с ³²P-меченными ник-трансляцией [12] вирусспецифическими ДНК: *pATV-8* — рекомбинантная плазмида на основе *pBR322*, включающая полный геном *Pr-RSV-C* [13]; *RSV LTR* — *Bam* I — *EcoRI* I — фрагмент провируса *Pr-RSV-C*, клонированный в составе рекомбинантной плазмиды и вырезанный *EcoRI* I (получен от А. Г. Татосяна); *Ki-ras* — фрагмент, выделенный после обработки рестриктазами *Sst* I и *Xba* I рекомбинантной плазмиды, включающей *Hilfi-3*-участок, онкогена [14]; *env3'/src* — *EcoRI* I — фрагмент провируса *SR-RSV-A*, клонированный в составе рекомбинантной плазмиды *pBR322* и вырезанный *EcoRI* I.

Результаты. Опухолевые клетки мышей (*RVP₃*) и хомяков (*H-35*, *H-2257*) обладают чрезвычайно выраженной способностью индуцировать возникновение злокачественных новообразований при инокуляции животным, от которых они были получены. Введение мышам и хомякам соответственно уже 100 клеток вызвало образование опухолей у всех исследованных животных. Однако ни в одном случае при слиянии этих клеток с фибробластами цыплят, содержащими вирус-помощник, не был получен трансформирующий вирус и не был определен *gs*-антиген.

Гибридизация ядерной ДНК клеток *RVP₃K3*, рестрицированной *EcoRI* I, с зондом ³²P-*pATV8* не выявила никаких вирусспецифических последовательностей. Провирусные гены не обнаруживали как после 20-кратного пассирования клеток *in vivo*, так и в клетках после одного пассажа *in vivo*, которые до этого культивировались *in vitro* (рис. 1, а, см. вклейку). В качестве положительного контроля использовали ДНК из клеток уток, трансформированных *da Pr-RSV-C*, включавшую около пяти копий провируса на геном. Число копий было определено количественной денситометрической полосой гибридизации по сравнению с ДНК ХС-клеток. Интегрированные с геномом клетки последовательности генов вируса саркомы Рауса не обнаружены также в клетках хомяков *H-35*, хотя чувствительность метода позволяет выявить даже одну провирусную копию на клеточный геном. Четкий положительный сигнал отмечали в контрольном эксперименте с ДНК линии *H-20* опухолевых клеток сирийского хомячка. Эти клетки были получены тем же путем, что и линия опухолевых клеток *H-35*, однако в отличие от последних содержат в своем геноме один полный *RSV*-провирус и при слиянии с фибробластами цыплят, содержащими вирус-помощник, продуцируют трансформирующий вирус [6] (рис. 1, б).

Клетки куриной саркомы, с помощью которых были индуцированы опухоли *H-2257* у сирийских хомячков, оказались вируспродуцирующими. Вирус, выделенный из этих клеток (*rASV2257*), трансформирует эмбриональные куриные клетки *in vitro* и вызывает возникновение опухолей у цыплят *in vivo*. Однако ни в одном из исследованных геномов клеток *H-2257* не обнаружены вирусспецифические последовательности при гибридизации с зондом, включающим полный провирус саркомы кур (рис. 1, в).

Таким образом, для нескольких линий опухолевых клеток было показано отсутствие в их геномах последовательностей генов вируса саркомы Рауса (в том числе и гена *src*), с инфекции которым начиналась цепь событий, приводящих к возникновению этих опухолей (см. «Материалы и методы»). Ретровирусные *LTR*, которые могли бы активировать клеточные онкогены [15], не удается заметить в случаях, когда в качестве гибридизационного зонда используют рекомбинатную плазмиду с встроенным в нее полным провирусом. Действительно, при

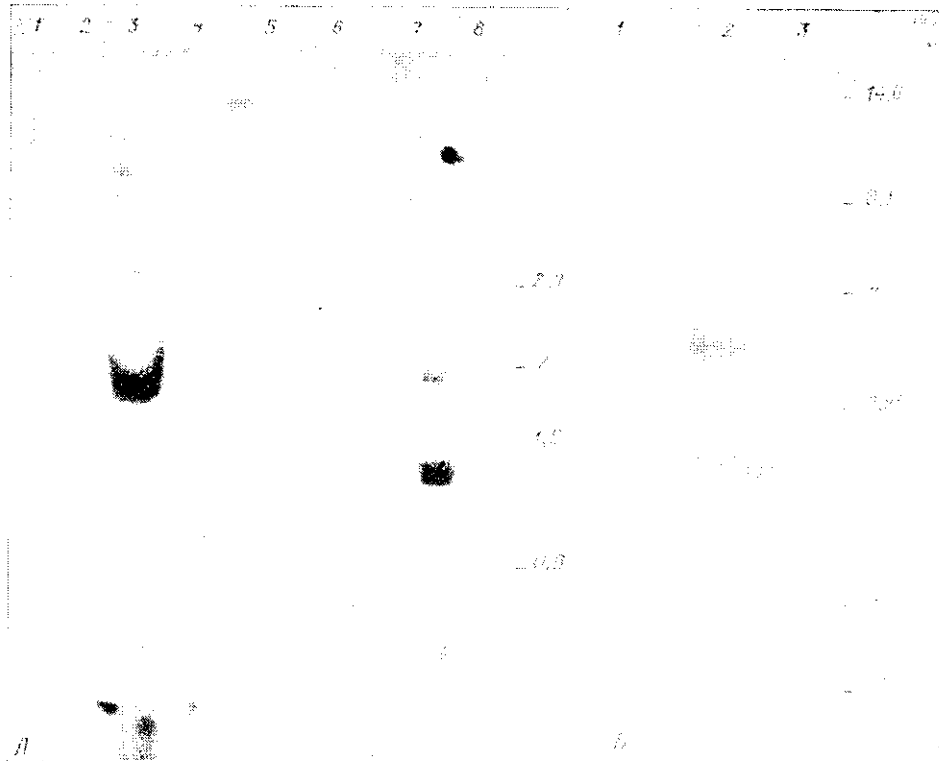


Рис. 2. Тест на присутствие *RSV LTR* в ДНК из опухолевых клеток хомяка. Гибридизация с зондом *RSV LTR*. А — ДНК из: нормальных клеток хомяка (1); *H-2257-1* (2); *H-2257-2* (3); *H-35* (4); *H-2257-3T* (5); *H-20*, положительный контроль (6); клеток опухоли перепелки, индуцированной *rASV2257*, положительный контроль (7); эмбриональных клеток перепелки (8). Рестрикция *EcoRI*. Б — ДНК из: *H-2257-1* (1); *H-2257-3M* (2); *H-2257-3T* (3). Рестрикция *HindIII*.

Fig. 2. Test for presence of *RSV LTR* in DNA from hamster tumour cells. Hybridization with *RSV-LTR* probe. А — DNA from: normal hamster cells (1); *H-2257-1* (2); *H-2257-2* (3); *H-35* (4); *H-2257-3T* (5); *H-20*, positive control (6); from quail tumour cells induced by *rASV 2257*, positive control (7); normal quail embryo cells (8). *EcoRI* digest. Б — DNA from: *H-2257-1* (1); *H-2257-3M* (2); *H-2257-3T* (3). *HindIII* digest.

гибридизации ядерной ДНК с зондом *RSV LTR* такие последовательности были обнаружены в клетках *H-2257-2* и *H-2257-3M*, но не определены в клетках *H-2257-1*, *H-2257-3T*, *H-35* и *RVP₃*. Ядерную ДНК предварительно гидролизовали рестриктазой *EcoRI* (рис. 2, а), сайт для которой расположен в провирусном *LTR*, или *Hind III* (рис. 2, б), которая разрезает провирусную ДНК в участках, оставляющих последовательности *LTR* неповрежденными. Как и в эксперименте, отраженном на рис. 1, четкий положительный сигнал наблюдали при гибридизации с ДНК опухолевых клеток *H-20* хомяка, содержащих в своем геноме один полный *RSV*-провирус. Четкий положительный сигнал наблюдали также с ДНК из клеток опухоли перепелки, полученной инокуляцией клеток той же куриной саркомы, которой были индуцированы опухоли 2257 у сирийских хомячков.

Как описано в разделе «Материалы и методы», эта куриная саркома получена инфицированием цыплят трансформационно-дефектным мутантом вируса саркомы Рауса. Восстановление трансформационной активности таких мутантов связывают с рекомбинацией с клеточным геномом гена *src* [16]. Однако в случае опухоли перепелки, индуцированной инокуляцией клеток куриной саркомы с восстановленным провирусом (*rASV2257*), так же как и в неопухолевых клетках перепелки, инфицированных *td Pr-RSV-C* или *td da Pr-RSV-C*, отмечено отсут-

Рис. 3. Определение *ASV*-провирусных последовательностей в ДНК из клеток перепелки: 1 — эмбриональные клетки перепелки; 2 — клетки опухоли перепелки, индуцированной *rASV2257*; 3 — клетки перепелки, инфицированные *td Pr-RSV-C*; 4 — клетки перепелки, инфицированные *td da Pr-RSV-C*; 5 — клетки опухоли перепелки, индуцированной *da Pr-RSV-C*; 6 — клетки опухоли перепелки, индуцированной *Pr-RSV-C*. Рестрикция *EcoRI*, гибридизация с ^{32}P /ДНК *pATV8*-зондом. Справа показаны размеры внутренних *EcoRI*-фрагментов *Pr-RSV-C*-провируса, отвечающие генам *pol-env5'*; *env3'-src* и *gag* ($2,5$; $2,0$ и $1,5 \cdot 10^6$ соответственно).

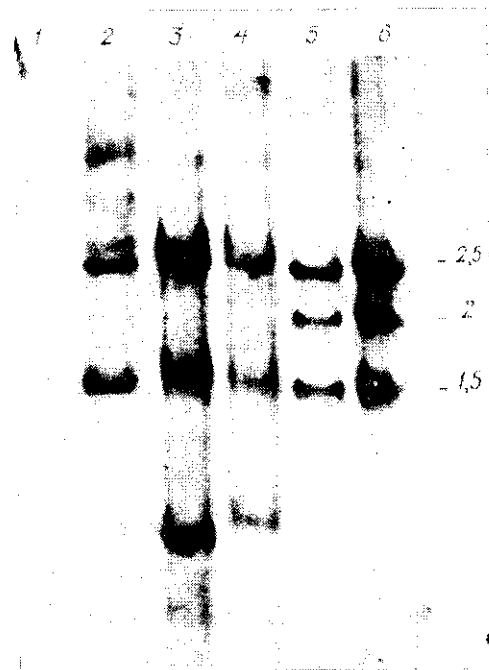


Fig. 3. Determination of *ASV*-proviral sequences in DNA from quail cells: normal quail embryo cells (1); quail tumour cells induced by *rASV2257* (2); quail cells infected with *td Pr-RSV-C* (3); quail cells infected with *td da Pr-RSV-C* (4); quail tumour cells induced by *da Pr-RSV-C* (5); quail tumour cells induced by *Pr-RSV-C* (6). *EcoRI* digest, hybridization with ^{32}P /DNA *pATV8* probe. Molecular weights of *EcoRI Pr-RSV-C* proviral internal fragments 2.5; 2.0 and 1.5 Md corresponding to *pol/env5'*; *env3'/src* and *gag* genes marked on the right-hand side of the picture are shown.

ствие регулярного фрагмента, соответствующего гену *src* нормального провируса (рис. 3, дорожки 2—4 соответственно). На рисунке хорошо видны отличия от автордиограммы гибридизации ДНК из опухоли перепелки, полученной после инфекции *da Pr-RSV-C* (дорожка 5), которая сходна с автордиограммой гибридизации ДНК из опухоли перепелки, полученной после инфекции *Pr-RSV-C* (дорожка 6). Повторная гибридизация того же отпечатка электрофореграммы с зондом *env3'/src* (рис. не приводится) также не позволила выявить полосу, соответствующую фрагменту с геном *src*. Происхождение минорных полос на рис. 3 (дорожка 2) пока неясно. Нельзя исключить, что они представляют собой участки второй копии провируса с измененными сайтами рестрикции. Использование клеток перепелок, инфицированных *ASV*, позволяет исследовать строение провируса, так как геномная ДНК этих животных не содержит эндогенных провирусных последовательностей.

Таким образом, ни в исследованных опухолевых клетках млекопитающих, индуцированных инокуляцией клеток куриной саркомы, ни в опухолевых клетках птиц, содержащих восстановленный провирус нет регулярного гена *src*, как нет его в нетрансформированных клетках перепелок, инфицированных трансформационно-дефектным вирусом.

Гибридизация *EcoRI* — гидролизатов ядерной ДНК с зондом *v-Ki-ras* позволила обнаружить перестройки клеточного онкогена *c-Ki-ras* в клетках *H-2257-1*. На рис. 4 (дорожки 1—3) заметна зона гибридизации в дополнение к двум зонам, имеющимся в *EcoRI* — гидролиза-

тах нормальных клеток. В клетках *RVP*₃ никаких заметных изменений организации *c-Ki-ras* не обнаружено.

Обсуждение результатов. Ядерная ДНК ХС-клеток из фибросаркомы крысы, полученной введением клеток саркомы кур, содержит до 20 копий *RSV*-провируса и способна трансформировать куриные фибробласты, инокуляция которых индуцирует саркому у цыплят [17]. Ранее было показано, что внутриэмбриональное введение клеток



Рис. 4. Гибридизация ядерной ДНК из опухолевых 2257 и нормальных клеток хомяка с зондом *c-Ki-ras*: 1, 2, 3 — ДНК из клеток *H-2257-1* (40, 20, 5 мкг соответственно); 4, 5, 6 — ДНК из нормальных клеток (40, 20, 5 мкг соответственно).

Fig. 4. Hybridization of hamster cell and *H-2257-1* DNA with *c-Ki-ras* probe: 1, 2, 3—DNA from *H-2257-1* cells (40, 20, 5 µg, respectively); 4, 5, 6—DNA from normal hamster cells (40, 20, 5 µg, respectively).

такой саркомы сирийским хомячкам вызывает у них появление злокачественных опухолей и что ядерная ДНК клеток из этих опухолей содержит как полный, так и в различной степени делетированный *RSV*-провирус, вплоть до ситуации, когда ядерная ДНК содержала только ген *src* с прилежащими участками *LTR* [6]. В клетках опухоли мыши, индуцированной инокуляцией клеток вируспродуцирующей куриной саркомы, также найдено всего около 40% последовательностей провирусного генома [18].

В нашей работе впервые обнаружено, что в клетках опухолей млекопитающих могут полностью отсутствовать гены *RSV*-провируса, инициировавшего образование этих опухолей. Мы наблюдали это в клонированных клетках из опухолей мыши и сирийского хомячка, полученных по методу, описанному ранее [5, 6], а также в клетках из опухолей сирийского хомячка, инициированных восстановленным провирусом *rASV*. Недавно было показано, что при пассировании клеток опухолей, индуцированных у хомячков аденовирусом типа 12, может происходить постепенная потеря вирусспецифической ДНК, интегрированной с геномом хозяина. При этом из 39 индуцированных опухолей в трех случаях рестрикционная карта Ad 12 ДНК не изменялась в течение свыше 10 пассажей, а в трех образцах вирусную ДНК не определяли уже после первого пассажа [19]. Аналогично этому, в трех из 39 опухолей, индуцированных у цыплят восстановленным вирусом млекопитающих, не обнаруживали провирусные последовательности [20].

Таким образом, можно полагать, что утрата из опухолевой клетки генов провируса, инициировавшего образование этой опухоли, представляет собой довольно распространенное явление, характерное как для РНК-, так и для ДНК-содержащих опухолевых вирусов. Следовательно, для поддержания опухолевого фенотипа нет необходимости в наличии как генов, участвующих в репликации вируса, что, в общем, вполне понятно, так и в функционировании вирусного онкогена.

Индукция и поддержание неопластической трансформации онкогенными ретровирусами, по-видимому, может происходить не только в результате экспрессии *v-onc*, представляющих активированные гомологи нормальных клеточных последовательностей, но и в результате активации онкогенного потенциала этих последовательностей (*c-onc*-генов), если они оказываются размещенными вблизи вирусных *LTR* [15, 21]. Последовательности, гомологичные *RSV LTR* были обнаружены в двух из пяти исследованных в этой работе линиях опухолевых клеток хомяков, не содержащих последовательностей вирусных генов. Хотя в остальных линиях опухолевых клеток хомяков и клеток *RVP₃K3* мышей *LTR* не обнаружены, последнее обстоятельство не исключает их участия в активации клеточных онкогенов во всех исследованных случаях. Чувствительность использованного метода анализа может быть недостаточной для выявления коротких участков вирусных *LTR* в клеточном геноме.

С другой стороны, в геномной ДНК опухолевых клеток 2257-1 хомяка обнаружены перестановки последовательностей *c-Ki-ras*. Такие перестановки, по-видимому, также могут иметь значение для активации экспрессии клеточного онкогена, необходимой для поддержания опухолевого фенотипа.

ABSENCE OF THE AVIAN SARCOMA VIRUS GENES IN THE TRANSFORMED MAMMALIAN CELLS

A. V. Rynditch, I. Gerik*, V. Lgotak*, B. A. Yatsula, Ya. Svoboda*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

* Institute of Molecular Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague

Summary

DNA from six lines of mouse and syrian hamster tumour cells induced by Rous sarcoma virus (*RSV*), its *XC* *RSV* variant and recovered avian sarcoma virus 2257 (*rASV*) are characterized by the absence of viral gene sequences though these cells retain their oncogenic phenotype while passing. The deletion of transforming gene *src* suggests that in some cases its presence is not needed for maintenance of transformation. In two tumour cell lines *RSV* long terminal repeat sequences (*RSV-LTR*) are revealed. DNA from the hamster tumour cell lines induced by *rASV* 2257 contains the altered cellular oncogene *c-Ki-ras*. Both *RSV LTR*-sequences and altered *c-Ki-ras* gene may participate in the formation and maintenance of *H-2257* hamster tumours.

1. Hanafusa H. Cell transformation by RNA-tumor viruses.— In: Comprehensive Virology / Eds. H. Fraenkel-Conrat, R. Wagner. N. Y.: Acad. Press, 1977, vol. 10, p. 401—483.
2. Vogt P. K. The genetics of RNA tumor viruses.— In: Comprehensive Virology / Eds. H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner. N. Y.: Acad. Press, 1977, vol. 9, p. 341—455.
3. Bishop J. M. Cellular oncogenes and retroviruses.— Annu. Rev. Biochem., 1983, 52, p. 301—354.
4. Tatosyan A. G., Galetzki S. A., Kissel'jov F. L. *RSV*-transformed mammalian cells; an analysis of RNAs specific for exogenous and endogenous viruses.— Arch. Geschwulstforsch., 1980, 50, N 5, p. 423—428.
5. Virus-specific nuclear RNAs in clones of mouse tumor cell lines transformed by Rous sarcoma virus / A. V. Rynditch, J. Svoboda, O. Mach et al.— Folia biol. (CSSR), 1983, 29, N 3, p. 273—281.
6. Characterization of exogenous proviral sequences in hamster tumor cell lines transformed by Rous sarcoma virus rescued from *XC* cells / J. Svoboda, V. Lhotak, J. Geryk et al.— Virology, 1983, 128, N 1, p. 195—209.
7. Replication of transformation-defective mutants of the Prague strain of Rous sarcoma virus and isolation of a td mutant from duck-adapted Pr-*RSV-C* / J. Geryk, A. Mazo, J. Svoboda, I. Hlozaneck.— Folia biol. (CSSR), 1980, 26, N 1, p. 34—41.
8. Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.— J. Mol. Biol., 1967, 26, N 2, p. 365—369.
9. Vogt P. K. Spontaneous segregation of nontransforming viruses from cloned sarcoma viruses.— Virology, 1971, 46, N 3, p. 939—945.
10. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.— J. Mol. Biol., 1975, 98, N 3, p. 503—517.

11. *Linkage of adult α - and β -globin genes in X. laevis and gene duplication by tetraploidization* / A. J. Jeffreys, V. Wilson, D. Wood, J. P. Simons.— *Cell*, 1980, 21, N 2, p. 555 - 564.
12. *Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I* / P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg.— *J. Mol. Biol.*, 1977, 113, N 2, p. 237—251.
13. *Restriction endonuclease and nucleoside sequence analyses of molecularly cloned unintegrated avian tumor virus DNA: structure of large terminal repeats in circle junctions* / R. A. Katz, C. A. Omer, J. H. Weis et al.— *J. Virol.*, 1982, 42, N 1, p. 346—351.
14. *The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes* / R. W. Ellis, D. DeFeo, T. Y. Shih et al.— *Nature*, 1981, 292, N 5823, p. 506—511.
15. *Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M.* Activation of a cellular onc gene.— *Nature*, 1981, 290, N 5806, p. 475—480.
16. *Enrietto P. J., Payne L. N., Wyke J. A.* Analysis of the pathogenicity of transformation defective partial deletion mutants of avian sarcoma virus: characterization of recovered viruses with encode novel src specific proteins.— *Virology*, 1983, 127, N 2, p. 397- -411.
17. *Varmus H. E., Vogt P. K., Bishop J. M.* Integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection of permissive and nonpermissive hosts.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, N 1, p. 3067—3071.
18. *Incomplete viral genome in a non-virogenic mouse tumor cell line (RVP₃) transformed by Praque strain of avian sarcoma virus* / J. Svoboda, M. Popovic, H. Sainerova et al.— *Int. J. Cancer*, 1977, 19, p. 851—858.
19. *Kuhlmann I., Doerfler W.* Loss of viral genomes from hamster tumor cells and non-random alterations in patterns of methylation of integrated adenovirus type 12 DNA.— *J. Virol.*, 1983, 47, N 3, p. 631—637.
20. *Genome structure of HBI, a variant of acute leukemia virus MC 29 with unique oncogenic properties* / K. Bister, H. W. Jansen, T. Graf et al.— *J. Virol.*, 1983, 46, N 2, p. 337 - 346.
21. *Müller R., Müller D.* Co-transfection of normal NIH/3T3 DNA and retroviral LTR sequences: a novel strategy for the detection of potential c-onc genes.— *The EMBO J.*, 1984, 3, N 5, p. 1121—1127.
22. *Hall A.* Oncogenes-implications for human cancer: a review.— *J. Roy. Soc. Med.*, 1984, 77, p. 410 —416.

Ин-т молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т молекулярной генетики АН ЧССР, Прага

Получено 24.09.84