



Биополимеры и регуляция гена

УДК 577.218

МИКРОИНЪЕЦИРОВАНИЕ ГЕНОВ. ПРОБЛЕМЫ ИХ ЭКСПРЕССИИ И РЕГУЛЯЦИИ

Л. М. Морозова, А. П. Соломко

При введении различными способами экзогенных ДНК в культивируемые клетки животных и человека стало возможным получение важной дополнительной информации о механизмах генетической регуляции у высших эукариот. Однако неспособность культивируемых клеток к дифференцировке и организменному развитию является весьма существенным недостатком такого подхода. Кроме того, не все линии культивируемых клеток можно использовать для изучения экспрессии определенного введенного гена.

Микроинъецирование экзогенных ДНК в мужской пронуклеус оплодотворенных мышинных яйцеклеток позволяет использовать высокоэффективную систему переноса генов, с помощью которой можно изучать внесенную генетическую информацию в процессе нормального развития организма, исследовать ее хромосомную локализацию, экспрессию, регуляцию, в том числе тканеспецифичность проявления, ограничение экспрессии стадиями развития организма, наследуемость и стабильность.

Еще в 1974 г. было показано [1], что последовательности ДНК SV40 персистируют в соматических клетках взрослых особей мышей, полученных из бластоцист, в которые эта ДНК была инъецирована.

Однако в первых работах по введению чужеродных генов в культивируемые клетки и зиготы мышей не была обнаружена их экспрессия, хотя наличие введенных последовательностей ДНК в реципиентных клетках [2, 3] было продемонстрировано с помощью метода гибридизации на фильтрах. И только в последующих работах была показана экспрессия введенных генов как в системе *in vitro* (культивируемые клетки), так и в системе *in vivo* (мышь, полученные из инъецированных зигот, так называемые трансгенные мыши) [4, 5].

При микроинъецировании чужеродную ДНК вводят в клетку в достаточно большом количестве — от нескольких сотен копий гена (200—400) до сотен тысяч. Это объясняется обычно довольно быстрым разрушением введенной ДНК на фрагменты с молекулярной массой $1-3 \cdot 10^6$, которая соответствует размеру нескольких генов, с последующей деградацией их на более мелкие фрагменты [6—9]. Правда, есть свидетельства того, что введение столь большого количества ДНК может влиять на выживаемость зигот после микроинъецирования [3].

При этом процесс интеграции введенной ДНК, скорее всего, не зависит ни от числа введенных генов (концентрации ДНК), ни от ее структуры при введении. Так, например, снижение числа копий вводимого гена с 200000 до 2000 на клетку не приводило к заметной разнице во включении чужеродной ДНК в геном реципиента. При этом экспрессию гена обнаруживали уже при введении 20 молекул [10].

Предварительные результаты свидетельствуют о том, что введение фрагментов ДНК различного размера с «тупыми» или «липкими» кон-

цами не влияет на частоту встраивания их в ДНК реципиента, но Палмитер с соавт. [11] отмечают, что включение все же предпочтительно для линейных фрагментов с гетерологичными концами. По-видимому, окончательный вывод о влиянии структуры вводимой ДНК на частоту её встраивания в геном реципиента можно будет сделать после того, как накопится достаточно обширный материал по этому вопросу.

Весьма интересны результаты, свидетельствующие о стабильности первичной структуры введенной ДНК [3, 9, 12]. Так, показано, что нуклеотидная последовательность β -глобинового гена в мышечных фибробластах сохранялась постоянной в течение 200 генераций клеточной популяции [13]. Однако в более ранних работах указывается на изменение введенных последовательностей ДНК как при микроинъекции в мышечные яйцеклетки, так и культивируемые клетки.

Количество копий введенной ДНК, обнаруживаемых с помощью метода гибридизации по Саузерну [14], колеблется в различных экспериментах от одной до 150 на клетку, и встраивание их происходит тандемно «голова—хвост», что, по-видимому, предполагает рекомбинацию вводимых молекул до или после их интеграции.

Существенный вклад в исследования, проводящиеся с целью выяснения механизма регуляции генов в системах *in vivo* и *in vitro*, был внесен благодаря созданию рекомбинантных молекул методами генной инженерии с использованием регуляторно-промоторной части мышечного металлотииониевого гена. Интерес к этому гену вызван тем, что изучение металлотииониевой белки, присутствующей почти во всех тканях животных, и самого гена выявило четкую регуляцию его экспрессии ионами тяжелых металлов и глюкокортикоидами [15, 16]. Ген металлотиионина мышцы (*MT*) имеет размер до 1100 нуклеотидных пар и состоит из трёх экзонов и двух интронов, а его промотор-регуляторная часть находится непосредственно перед структурной частью гена [17].

Разрезая ген металлотиионина в области инициации транскрипции и сшивая затем его промотор-регуляторную часть со структурной частью чужеродных генов, получили ряд рекомбинантных молекул. Рекомбинантные гены открыли перед исследователями возможность проследить, что происходит с ними при инъекции: регулируются ли эти гены специфичными для *MT*-гена индукторами, каковы особенности этой регуляции и каков уровень экспрессии этих комбинированных генов в чужеродном окружении, передаются ли они следующим поколениям, модифицируется ли их структура и сохраняется ли при этом экспрессия в поколениях.

Прежде чем приступить к подобным исследованиям, была изучена экспрессия и регуляция самого *MT*-гена в системах *in vivo* и *in vitro*. Было установлено, что уровни синтеза *MT*-мРНК значительно возрастали при индукции как тяжелыми металлами (Cd, Zn, Cu, Hg), так и глюкокортикоидами, например дезоксиметазоном (ДМ). Максимум транскрипции наблюдали через 1 ч, а максимальное содержание мРНК металлотиионина — через 4 ч после введения индуктора [15]. Увеличение количества мРНК *MT* авторы связывают главным образом с изменением скорости их синтеза и повышением стабильности. При этом отмечается строгая органоспецифичность в отношении уровней синтеза мРНК *MT* как при индукции, так и без неё (в порядке уменьшения: печень, почки, селезёнка, сердце, кишечник, мускулатура).

Установлено также, что разные индукторы вызывают разные по силе, но всегда параллельные ответы (реакции), наблюдаемые в одних и тех же органах. Необходимо отметить, что не все клеточные линии отвечают на оба индуктора: обнаружены линии клеток, резистентные к глюкокортикоидам или к обоим индукторам [16]. Причины отсутствия регуляции собственного *MT*-гена в таких клеточных линиях еще неясны, однако, например, в Cd-устойчивых клетках, потерявших свойство индуцироваться дезоксиметазоном, обнаружена амплификация гена *MT* [18, 19].

Трансформация ряда клеточных линий рекомбинантными генами,

сконструированными на основе регуляторно-промоторной части мышечного металлотионеинового гена и структурной части тимидинкиназного гена вируса герпеса (рекомбинантный ген *МК*), структурной части гена дегидрофолатредуктазы (рекомбинантный ген *MTDHFR*) или структурной части гена гормона роста крысы (рекомбинантный ген *MGH*), выявила отсутствие регуляции экспрессии этих комбинированных генов дезоксиметазоном при сохранении регуляции тяжелыми металлами [20, 21]. Аналогичные результаты были получены и в случае инъекирования рекомбинантного гена *МК* в мужской пронуклеус яйцеклеток мыши [9, 10].

Среди целого ряда выдвинутых авторами объяснений этого факта наиболее вероятными, с нашей точки зрения, кажутся следующие:

отсутствие амплификации регуляторной части гена при одновременной амплификации структурной части гена;

метилирование участков рекомбинантного гена, являющихся рецепторами для ДМ;

потеря при конструировании гена структуры ДНК, отвечающей за связь с ДМ.

Бринстер с соавт. [10] предприняли попытку локализовать последовательности ДНК, отвечающие за регуляцию активности гена тяжелыми металлами, используя для этого ряд делеций в 5'-фланкирующей области гена *MT*. В результате исследования было установлено, что индукция экспрессии кадмием зависела от наличия 5'-фланкирующего участка гена металлотионеина длиной около 90 нуклеотидных пар. К сожалению, не удалось отделить промотор от Cd-регулируемой части гена и вычленить участок ДНК, ответственный за регуляцию дезоксиметазоном.

Кажется вполне вероятным, что такая потеря регуляции экспрессии гена глюкокортикоидами присуща только *MT*-гену, поскольку встроенный и амплифицированный ген *ГГФРТ* при трансфекции мышечных клеток линии *3T6* сохранял способность к регуляции дезоксиметазоном [22]. То же самое отмечено для α -микроглобулинового гена крысы при трансфекции мышечных *L*-клеток [23].

Одной из особенностей этих работ было выявление относительно низкого уровня синтеза мРНК некоторых из введенных рекомбинантных генов. Так, например, у трансгенной мыши с почти 40-разовым превышением активности тимидинкиназы по сравнению с другими животными, у которых тоже экспрессировался ген тимидинкиназы вируса герпеса, обнаруживали всего 28 молекул соответствующей мРНК на клетку, а у остальных особей — около 2 молекул мРНК на клетку [24].

Однако при введении рекомбинантного *MGH*-гена (промотор-регуляторная часть *MT*-гена+ген гормона роста крысы) в яйцеклетки мышечной результаты были иными — уровни синтеза мРНК *MGH* при индукции оказались сопоставимыми с таковыми для собственного гена металлотионеина и были в 100 раз выше, чем при введении *МК*-гена [20]. Вполне возможно, что различия в экспрессии связаны с неодинаковой стабильностью мРНК этих белков, но возможны и другие объяснения, например изменения в скорости трансляции и эффективности процессинга.

Необходимо при этом учитывать и другие возможные факторы, влияющие на регуляцию. Например, введение β -глобинового гена кролика в клетки мышечной не приводило к высокому уровню синтеза соответствующей мРНК, что связано, как оказалось, с наличием в фибробластах мышечной регуляторного фактора, ингибирующего экспрессию глобинового гена [13]. Важно отметить и то, что, по данным Хансера [25], транскрипт встроенного гена сохраняет свою индивидуальность независимо от того, в клетки какого вида ген был встроен.

Неоднозначна также картина при определении степени выражения рекомбинантного гена на уровне трансляции. Обнаружено отсутствие зависимости количества синтезируемого белка от дозы гена (*МК*-ген), в одних случаях, и наличие такой корреляции — в других (*MGH*-ген).

Как и для собственного *MT*-гена, наблюдается тканеспецифичность в отношении степени экспрессии инъецированных генов [24, 26]. У животных, в тканях которых при анализе клеточной ДНК выявляются последовательности интегрированных генов, экспрессия генов либо отсутствует полностью, либо проявляется в различной степени [9, 26—28].

Палмитер [9], проведя подробный анализ экспрессии гена *МК* у двух поколений потомков трансгенных мышей, отметил затухание, подавление или усиление активности гена *МК* у различных особей. Анализ 54 потомков самца-носителя *МК*-гена показал сохранение количества интегрированных генов в ряду поколений, в то время как в родословной одной из трансгенных самок (*Мук84*) наблюдалась потеря *МК*-генов в поколениях.

Отсутствие экспрессии гена связывают с местом его локализации, с попаданием его в «молчащий» район хромосомы реципиента либо с нарушением структуры обычно транскрибируемого участка ДНК, в частности, с изменением степени метилирования участков ДНК в последовательностях *CCGG* или *CGCG* [9, 26].

Сделана попытка объяснить изменение экспрессии *МК*-генов в ряду поколений трансгенных мышей также различной степенью метилирования ДНК потомков. Показано, что введенная ДНК метилируется в разные периоды развития организма в разных участках, что даёт основание предположить наличие системы метилирования *de novo* [9]. Метилирование *de novo* вирусного генома с последующей инактивацией его экспрессии наблюдали также при трансфекции вирусом *M-MuLV* [29], причем и в данном случае на разных стадиях онтогенеза характер метилирования был различным. В противоположность этим результатам, трансфекция *L*-клеток различными плазмидами редко приводит к метилированию *de novo* [30, 31]. Связь между степенью метилирования ДНК и её экспрессией отмечается многими исследователями [26, 32—34].

Особенности метилирования могут наследоваться в одних случаях и теряться в других, что указывает на наличие связи между степенью метилирования и локализацией гена в определённом участке хромосомы. При сопоставлении уровней метилирования введенного гена у трансгенных мышей и их потомков было обнаружено, что для особей, у которых ген экспрессировался, характерен более низкий уровень метилирования по сравнению с особями, несущими неактивный ген. Потеря метильных групп, которые присутствовали у родителей, сопровождается повышением активности гена у потомков [9].

Конструируя рекомбинантные гены с регулируемыми промоторами, можно управлять степенью выражения того или иного гена. Это даст возможность исследовать ответную реакцию клеток и организма на различную степень выражения гена, его тканеспецифическую и неспецифическую экспрессию, не говоря уже о том, что таким образом можно нарабатывать значительные количества некоторых белков, вводя их рекомбинантные гены в системы *in vivo* и *in vitro* [11, 25, 35].

Клайн и его коллеги впервые попробовали коррелировать наследственное заболевание с помощью методов генной инженерии. В частности, они предложили принципиальный подход к лечению больных с наследственными гемоглобинопатиями, в основе которого лежит введение нормальных глобиновых генов совместно с селективирующими агентами [36, 37].

Возможность осуществления такого подхода была показана в работах этих авторов, где селективирующим агентом был метатрексат — антиметаболит, ингибирующий активность дегидрофолатредуктазы. Ген этого фермента вводили в клетки костного мозга мышей, устойчивых к метатрексату. Затем трансформированные клетки инъецировали животным, которым вводился метатрексат, в результате чего интенсивнее размножались трансформированные клетки. Авторы высказывают предположение о возможности применения такого подхода и для лечения других наследственных заболеваний.

Однако не стоит забывать, что работы по микроинъекции генов в культивируемые клетки и зиготы мышей — это исследования последнего десятилетия и, несмотря на успехи, до сих пор многое остаётся неясным: не известны места встраивания большинства изучаемых генов; не известно, существуют ли какие-то предпочтительные места на хромосомах для встраивания, насколько важна специфичность этих участков и чем она характерна.

Пока неясно, каким образом можно стабилизировать экспрессию вводимых генов, возможно, пришивая к ним определённые олигомеры ДНК, поскольку известно, что метилирование ДНК в значительной мере зависит от специфики последовательностей. Стабилизировать экспрессию можно и подавляя активность ферментов метилирования, для чего, в свою очередь, необходимо знать, на каких этапах онтогенеза начинают транскрибироваться исследуемые гены и когда происходит их метилирование.

Предстоит выяснить, наконец, суть тканеспецифической экспрессии генов, её регуляцию, найти способы управления этим процессом. Одним из подходов к выяснению этих вопросов и является введение клонированных рекомбинантных генов в новое для них окружение, в котором они могут быть обнаружены с помощью специфических зондов в составе хромосомной ДНК организма-хозяина.

MICROINJECTION OF GENES. PROBLEMS OF THEIR EXPRESSION AND REGULATION

L. M. Morozova, A. P. Solomko

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

Summary

The review summarizes results of the study on incorporation of foreign genes into mammalian genome. The problems concerning these genes' expression regulation, its stability and inheritance of the introduced genetic information are discussed.

1. *Jaenisch R., Mintz B.* Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, N 2, p. 1250—1254.
2. *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA / J. W. Gordon, G. A. Scanco, D. J. Plotkin et al.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, N 12, p. 7380—7384.
3. *Gordon J. W., Rudde F. H.* Integration and stable germ line transmission of gene injected into mouse pronuclei.—*Science*, 1981, 214, N 4526, p. 1244—1246.
4. *Introduction and expression of rabbit β -globin gene in mouse fibroblasts / B. Wold, M. Wigler, E. Lacy et al.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, N 11, p. 5684—5688.
5. *Microinjection of rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring / T. E. Wagner, P. C. Hoppe, J. D. Jollick et al.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, N 10, p. 6376—6380.
6. *Wagner T. E., Mintz B.* Transfer of nonselectable genes into mouse teratocarcinoma cells and transcription of transferred human β -globin gene.—*Mol. and Cell Biol.*, 1982, 2, N 2, p. 190—198.
7. *Anderson F., Diacumakos E. G.* Genetic engineering in mammalian cells.—*Sci. Amer.*, 1981, 245, N 1, p. 60—93.
8. *Constantini F., Lacy E.* Introduction of rabbit β -globin gene into the mouse germ line.—*Nature*, 1981, 294, N 5836, p. 92-94.
9. *Palmiter R. D., Chen H. Y., Brinster R. L.* Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring.—*Cell*, 1982, 29, N 6, p. 701—710.
10. *Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs / R. U. Brinster, H. Y. Chen, R. Warren et al.*—*Nature*, 1982, 296, N 5852, p. 39-41.
11. *Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion gene / R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. E. Hammer et al.*—*Nature*, 1982, 300, N 5893, p. 611—615.
12. *Constantini F., Lacy E.* Gene transfer into the mouse germ line.—*J. Cell Physiol.*, 1982, suppl., N 1, p. 219-226.
13. *Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjec-*

- ted into mouse fibroblasts / W. F. Anderson, L. Killos, L. Sanders-Haigh et al.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, N 9, p. 5399-5403.
14. *Southern E. M.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.—*J. Mol. Biol.*, 1975, **98**, N 3, p. 503-517.
 15. *Durnam D. H., Palmiter R. D.* Transcriptional regulation of mouse metallothionein-1 gene by heavy metals.—*J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, N 11, p. 5712-5716.
 16. *Mayo K. E., Palmiter R. D.* Glucocorticoid regulation of metallothionein-1 mRNA synthesis in cultured mouse cells.—*J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, N 6, p. 2621-2624.
 17. *Isolation and characterization of the mouse metallothionein-1 gene (recombinant DNA/DNA sequence / heteroduplex mapping / cadmium) / D. M. Durnam, F. Perrin, F. Gannon, R. D. Palmiter.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, N 11, p. 6511-6515.
 18. *Beach L. R., Palmiter R. D.* Amplification of the metallothionein-1 gene in cadmium resistant mouse cells.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, N 3, p. 2110-2114.
 19. *Gick Y. Y., McCarthy K. S.* Amplification of the metallothionein-1 gene in cadmium and zinc resistant Chinese hamster ovary cells.—*J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, № 15, p. 9049-9053.
 20. *Pavlaskis G. N., Hamer D. H.* Regulation of metallothionein growth hormone hybrid gene in bovine papilloma virus.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, N 2, p. 397-410.
 21. *Mayo K. E., Palmiter R. D.* Altered regulation of mouse metallothionein-1 gene following gene amplification or transfection.—In: *Gene Amplificat. Conf. (Cold Spring Harbor, Oct. 4-7, 1981): Abstracts*. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982, p. 67-73.
 22. *Amplification and hormone-regulated expression of a mouse mammary tumor virus Eco gpt fusion plasmid in mouse 3T6 cells / A. B. Chapman, M. A. Costello, F. Lee, Y. M. Ringold.*—*Mol. and Cell Biol.*, 1983, **3**, N 8, p. 1421-1429.
 23. *Kurtz D.* Hormonal inducibility of rat α_{2n} -globin genes in transfected mouse cells.—*Nature*, 1981, **291**, N 5817, p. 629-631.
 24. *Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of fusion gene into eggs / R. L. Brinster, H. Y. Chen, M. Trumbauer et al.*—*Cell*, 1981, **27**, N 1, p. 223-231.
 25. *Inducibility of human β -interferon gene in mouse L-cell clones / H. Hanser, G. Gross, W. Bruns et al.*—*Nature*, 1982, **297**, N 5868, p. 650-654.
 26. *Brinster R. L., Palmiter R. D.* Induction of foreign genes in animals.—*Trends Biochem. Sci.*, 1982, **7**, N 12, p. 438-440.
 27. *Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice / G. S. McKnight, R. E. Hammer, E. A. Kuenzee, R. L. Brinster.*—*Cell*, 1983, **34**, N 2, p. 335-341.
 28. *A foreign β -globin gene in transgenic mice integration at abnormal chromosomal position and expression in inappropriate tissue / E. Lacy, S. Roberts, E. P. Evans et al.*—*Cell*, 1983, **34**, N 2, p. 343-358.
 29. *Germline integration of Moloney Murine leukemia virus at the Mov 13 locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death / R. Jaenisch, K. Harbers, A. Schnick et al.*—*Cell*, 1983, **32**, N 1, p. 209-216.
 30. *Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells / Y. Pollack, R. Stein, A. Rasin, H. Ceder.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, N 10, p. 6463-6467.
 31. *Clonal inheritance of pattern of DNA methylation in mouse cells / R. Stein, I. Cruenbaum, Y. Pollack et al.*—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, N 1, p. 61-65.
 32. *Waechter D. E., Baserga R.* Effect of methylation on expression of microinjected genes.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, N 4, p. 1106-1110.
 33. *Vanyushin B. F.* DNA methylation in eukaryotes.—In: *Macromol. Funct. Coll. (Pushchino, Dec. 9-12, 1980): Abstracts 2 Sov.-Ital. Symp. Moscow, 1982*, p. 174-175.
 34. *Felsenfeld G., McGhee J.* Methylation and gene control.—*Nature*, 1982, **296**, N 5858, p. 602-603.
 35. *Прямая экспрессия гена человеческого лейкоцитарного интерферона F в клетках Escherichia coli / Ю. А. Овчинников, Е. Д. Свердлов, С. А. Царев и др.*—*Докл. АН СССР*, 1982, **265**, № 1, с. 238-242.
 36. *Gene transfer in intact animals / M. Cline, H. Stang, K. Mercola et al.*—*Nature*, 1980, **284**, N 5755, p. 422-425.
 37. *Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice / K. Mercola, H. Stang, J. Browre et al.*—*Science*, 1980, **208**, N 4447, p. 1033-1035.

Ин-т молекулярной биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 22.08.84