

# Модификация структуры ДНК плазмиды *pATV8* у трансгенных мышей.

## 1. Исследование структуры интегрированного трансгена и биологические эффекты трансгеноза

Л. И. Чащина, А. И. Петренко, И. Н. Вагина, К. В. Крисан, А. П. Соломко

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

*Взаимодействие провирусной ДНК вируса саркомы Рауса птиц с геномом мыши при трансгенозе приводит к существенной модификации векторной молекулы. Обнаружены две формы существования стабильных генетических структур на основе трансгена: кольцевая экстрахромосомная ДНК и ДНК, интегрированная в геном мыши. В случае интеграции трансгена отмечена полная потеря последовательностей провирусной ДНК и части структуры бактериальной векторной плазмиды. Показано, что наличие экзогенной ДНК в клетках трансгенных мышей оказывает существенное влияние на функционирование генома реципиента, что характеризуется повышенной частотой опухолеобразования, снижением плодовитости. Индуцированные трансгеномом генетические и физиологические изменения являются результатом его непосредственного взаимодействия с генетическим материалом клеток многоклеточного организма и свидетельствуют о структурно-функциональной дестабилизации генома мыши.*

**Введение.** Известно, что многие вирусы эукариот тканеспецифичны. Это определяет их перспективность в использовании для целей геной инженерии и в качестве геномных зондов при изучении процессов дифференцировки [1, 2]. Интегрированная в геном эукариот провирусная ДНК обнаруживает сходство с транспозонами [3, 4] и подвергается подобным механизмам регуляции и модификации внутри клетки, оказывая при этом влияние на экспрессию клеточного генома [5, 6].

Ранее нами сообщалось о создании экспериментальной модели, позволяющей исследовать в непермиссивной для вируса системе механизмы взаимодействия генома ретровируса птиц (плазида *pATV8*) и генома мыши на основе трансгенных мышей [7, 8]. Анализ потомков FMV трансгенных мышей дал основание предположить существование трансгена в двух формах: экстрахромосомной и интегрированной в геном. В данном сообщении

приводятся результаты изучения структуры и ее наследования у трансгенных мышей с интегрированными последовательностями трансгена.

**Материалы и методы. Выделение ДНК.** Тотальную ДНК экстрагировали из 1–1,5 см участка хвоста месячной мыши [9]. После экстракции осадок ДНК проводили через 80 %-й этанол, растворяли в 10 мМ трис (рН 7,4), 0,1 мМ ЭДТА, переосаждали этанолом на холоду и растворяли в 200 мкл того же буфера. Концентрацию ДНК в препарате измеряли на спектрофлуориметре с использованием красителя «Хехст» H33258 [10].

**Блот-гибридизация.** Для проведения блот-анализа 20 мкг препарата ДНК, полученного из участка хвоста экспериментальной мыши (в 20 мкл), обрабатывали при 37 °С в течение 12 ч соответствующей рестриктазой (*EcoRI* или *BamHI*). После рестрикции проводили электрофорез в 0,8 %-й агарозе («Bio-Rad», США) в течение ночи и затем переносили на нейлоновый фильтр Hubbond («Amersham», США). Фильтр отмывали, высушивали, ДНК фиксировали при 254 нм в течение

5 мин. Гибридизацию проводили в течение ночи с  $^{32}\text{P}$ -меченной ДНК плазмиды (удельная активность  $3 \cdot 10^6$  имп./мин/мкг<sup>1</sup>). После гибридизации фильтры отмывали при 68 °С в  $2 \times \text{SSC}$ , затем в  $2 \times \text{SSC}$ , содержащем 0,1 % DS-Na и  $0,1 \times \text{SSC}$  с 0,1 % DS-Na, высушивали и экспонировали с пленкой РМ-1.

**Результаты и обсуждение.** Анализ тотальной ДНК из хвостов мышей F<sub>0</sub> показал, что при рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*, имеющей на плазмиде *pATV8* четыре сайта рестрикции, неожиданно обнаруживается по одному фрагменту, однако разного размера в различных сублиниях (рис. 1). Молекулярная масса трансгеномов была определена в пределах от 2,6 до 5,3 тыс. п. н., что существенно меньше, чем у плазмиды, которая была инъецирована (*pATV8*), — 14 тыс. п. н.

После скрещивания исходных трансгенных мышей с нормальными той же линии ISR мы обнаружили отсутствие менделевского наследования трансгена в сублиниях В1 и В6, в то время как в ряде других, в том числе В9 и В14, трансгеном наследовали около половины потомков.

Для исследования структуры интегрированного трансгена мы изучали тотальную ДНК мышей, производных от В9. В качестве позитивного контроля использовали ДНК *pBR322* (разные разведения в смеси с ДНК нормальных мышей).

В первой серии экспериментов после расщепления ДНК нуклеазой *EcoRI* и гибридизации с меченой ДНК *pBR322* во всех препаратах ДНК трансгенных мышей разных поколений (F<sub>0</sub>—F<sub>5</sub>) этой сублинии был обнаружен один фрагмент (рис. 2). Гибридизация с провирусной ДНК вируса саркомы Рауса и ее клонированными фрагментами дала отрицательный результат, что свидетельствовало о



Рис. 1. Анализ тотальной ДНК из трансгенных мышей поколения F<sub>0</sub>, зонд  $^{32}\text{P}$ -*pATV8*. Мыши: 1 — В1; 2 — В6; 3 — В9; 4 — В14

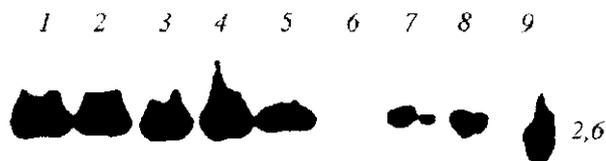


Рис. 2. Блот-анализ геномной ДНК трансгенных мышей сублинии В9, рестрикция *EcoRI*, гибридизация с  $^{32}\text{P}$ -*pBR322*: 1—9 — трансгенные мыши поколений F<sub>0</sub>—F<sub>5</sub>

селективной элиминации провирусных последовательностей из структуры интегрированного трансгена.

Размер обнаруженного фрагмента 2,6—2,7 тыс. п. н. Интенсивность сигнала была приблизительно одинаковой во всех образцах, и сравнение с интенсивностью сигнала позитивного контроля позволило оценить копиюность интегрированной последовательности как одну копию на гаплоидный геном. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что интегрированный трансгеном наследуется в ряду поколений без видимых изменений.

Однако существовала некоторая вероятность того, что последовательность в тотальной ДНК трансгеников, гибридизующаяся с ДНК *pBR322*, является посторонней примесью, а именно: плазмидой из серии *pUC* (подобный размер генома — 2,7 тыс. п. н., один сайт расщепления *EcoRI*). Чтобы подтвердить или опровергнуть это допущение были проведены следующие эксперименты. Препараты геномных ДНК исследуемых мышей, обработанные рестриктазой *EcoRI* и деградированные многократным пропусканием через иглу или нерасщепленные, гибридизовали после разделения в агарозном геле и переноса на нейлоновые фильтры по очереди: с  $^{32}\text{P}$ -*pUC18*,  $^{32}\text{P}$ -M13,  $^{32}\text{P}$ -*pBR322*. Суть этого была в том, что плазмиды серии *pUC* состоят частично из последовательностей ДНК *pBR322*, частично — из ДНК M13. В том случае, если зона, дающая позитивный сигнал, гибридизуется с мечеными ДНК *pUC18* и M13, загрязнение препаратов геномных ДНК плазмидой *pUC18* будет доказано.

В результате гибридизации геномных ДНК с ДНК M13 позитивный сигнал отсутствовал, а при гибридизации с ДНК *pBR322* и *pUC18* присутствовал один фрагмент. Таким образом, было установлено, что экзогенная последовательность в геномных ДНК трансгенных мышей сублинии В9, во-

первых, интегрирована в геном; во-вторых, интегрирована одна копия на гаплоидный геном; в-третьих, интегрирована неполная копия введенной последовательности — 0,5 генома *pBR322* или 1/6—1/7 генома *pATV8*. Как было установлено ранее, провирусных последовательностей в структуре трансгенома нет.

Детальный анализ (с использованием набора рестриктаз) структуры интегрированной последовательности показал, что она содержит сайт для рестриктазы *PvuII*, однако не имеет сайтов для *PstI* и *BamHI*. В результате совместной переварки геномной ДНК рестриктазами *EcoRI* и *PvuII* обнаруживается фрагмент размером около 2,6 тыс. п. н. Поскольку плазмида *pUC18*, дающая позитивный сигнал при гибридизации с ДНК трансгеников, содержит последовательности *pBR322* от сайта *PvuII* (2067) (по карте *pBR322*) до сайта *EcoRI* (4361) и поскольку интегрированная последовательность содержит внутренний сайт расщепления для *PvuII*, но не содержит сайтов расщепления *PstI*, интегрированная экзогенная ДНК должна быть представлена частью молекулы *pBR322*, показанной на рис. 3.

Более детальное картирование интегрированной последовательности и прилежащих к ней последовательностей генома мыши затруднено из-за отсутствия селективного маркера, утерянного в процессе интеграции.

Таким образом, в случае интеграции введенных в зиготы мышей последовательностей плазмиды *pATV8* мы обнаружили элиминацию практически всех провирусных последовательностей и большей части последовательностей бактериальной векторной плазмиды *pBR322*.

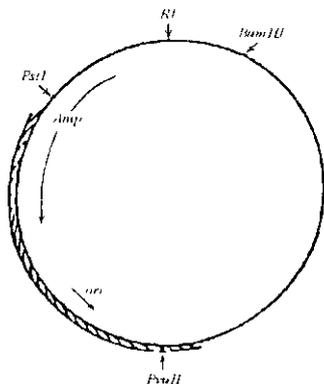


Рис. 3. Фрагмент плазмиды *pBR322*, интегрированный в геномную ДНК трансгенных мышей сублинии В9

Селективность элиминации последовательностей трансгенома была отмечена при введении обезьян аденовируса Ad7 [11], при этом была обнаружена потеря правого или левого конца генома аденовируса в разных сублиниях трансгенных мышей. Подобная селективная элиминация последовательностей вирусного *tk*-гена отмечена и в работах [12, 13].

Обращает на себя внимание тот факт, что как в нашем исследовании, так и в ряде других работ для трансгеноза использовали рекомбинантные плазмиды, содержащие гетерологичные LTR — длинные концевые повторы вируса саркомы Рауса. Плазмида *pATV8*, использованная нами для трансгеноза, содержит один длинный концевой повтор [13], плазмида *pMA3* имеет длинный сдвоенный концевой повтор [15], плазмида *P* — 1,5 LTR [16].

Механизм селективной элиминации специфических вирусных последовательностей пока неизвестен, однако необходимо отметить, что геномные вирусные последовательности в непермиссивной для вируса системе подлежат элиминации с повышенной частотой. Это, вероятно, отражает некую специфику взаимодействия негомологичных геномов вируса и клетки еще на раннем этапе эмбрионального развития.

**Биологические эффекты трансгеноза.** Анализ результатов скрещивания исходных трансгенных мышей с нормальными мышами той же линии свидетельствует о нарушении репродуктивной функции у ряда трансгенных самок. Так, из 13 исследованных трансгенных самок четыре дали всего 1—2 небольших помета. От одной самки не удалось получить потомства в скрещиваниях с разными самцами, которые предварительно были проверены в других скрещиваниях. У трансгенных самок В7 и В17 после первых родов развились опухоли и они погибли.

Существенное нарушение репродуктивных способностей отмечено также и в поколении  $F_1$  трансгенных самок: в сублиниях В3 (самка № 4), В16 (самки №№ 3, 11, 18, 20), В6 (самки №№ 16, 18), В14 (самки №№ 1 и 2), В16 (самки №№ 1, 12).

Для изучения влияния трансгенома на частоту возникновения опухолей у трансгенных мышей проводили сравнение с таким же показателем для контрольных животных той же линии ICR. Самки этой линии характеризуются повышенным уровнем спонтанных опухолей молочной железы, однако при сопоставлении одинаковых возрастных групп (от 7 до 12 месяцев) обнаружено, что частота возникновения опухолей у исходных трансгенных самок ( $F_0$ ) составляет  $73 \pm 12\%$ , в то время как в

контрольной группе этот показатель равен  $31 \pm 4$  % (данные достоверны при  $P = 0,999$ ). В поколении  $F_1$  этот показатель у трансгенных самок снижается, но все же превышает контрольный уровень и составляет  $38 \pm 8$  %.

В отличие от исходных трансгенных и контрольных самцов, у которых не отмечалось возникновения опухолей в течение всего срока наблюдения (до двух лет), у шести самцов  $F_1$  разных сублиний (B9, B14, B15, B17) были обнаружены опухоли печени, куперовой железы, щитовидной железы, асцитные опухоли. Необходимо подчеркнуть, что у самцов линии ICR каких-либо опухолей в норме ранее нами не наблюдалось.

Также крайне неожиданным для нас было обнаружение у трансгенных мышей обоих полов в возрасте от шести месяцев дефектов кожи, выпадения шерсти и возникновения больших изъязвлений на теле и ушах, нарушения координации движений — нейропатии. В последующих поколениях уровень проявления этих нарушений изменялся, однако они постоянно обнаруживались и, более того, в поколениях  $F_3$ — $F_5$  отмечено появление мышей с феноменом «мокрой шерсти», существенное теряющих в массе.

Вполне допустимо было бы связать фенотипические проявления, наблюдаемые у трансгенных мышей в наших экспериментах, с экспрессией тех или иных генов, входящих в состав плазмиды *pATV8*. Тем более, что провирусная ДНК содержит ген *src*, находящийся под весьма сильным промотором (LTR). Однако довольно высокий уровень опухолеобразования у трансгеников  $F_0$  и, более того, у самцов не может быть результатом присутствия в трансгеноме онкогена, поскольку в интегрированном трансгеноме не обнаружено каких-либо провирусных последовательностей, в том числе и гена *src*. Таким образом, аномалии развития, повышенный уровень опухолеобразования — это следствие присутствия и интеграции в геном мыши экзогенной последовательности. Скорее всего, интеграция произошла вблизи генов, отвечающих за ранние этапы развития зародыша, и это влияет на регуляцию их экспрессии, что в свою очередь приводит к негативным последствиям на этапе раннего развития (повышенная эмбриональная гибель) или в онтогенезе.

Вагнер и соавт. [15] считают, что среди вторичных эффектов встраивания чужеродных последовательностей может быть нарушение метаболизма и дифференцировки некоторых типов клеток, вследствие чего происходит индукция опухолей. Дополняя это предположение, необходимо отметить, что встраивание чужеродных последователь-

ностей в геном мышей вызывает, вероятнее всего, существенную дестабилизацию части генома. Это приводит к возникновению генетических эффектов, которые мы и наблюдали у трансгенных мышей в наших экспериментах.

Дестабилизация генома подтверждена рядом авторов, исследовавших трансгены и фланкирующие их последовательности. Показано, что в сайтах интеграции трансгеномов происходят значительные перестройки структуры ДНК, отражающиеся на функционировании всего генома [11, 13].

В нашем случае при микроинъектировании экзогенной ДНК в одноклеточные зародыши линейных мышей ICR взаимодействие геномов провируса саркомы Рауса птиц и мыши на ранних этапах эмбрионального развития и дифференцировки приводит, скорее всего, к селективной элиминации последовательностей вирусного генома и существенной модификации интегрированного трансгенома. В некоторых случаях обнаруживаются стабильные автономные рекомбинантные трансгеномы, исследованию структуры которых посвящено следующее сообщение.

Л. И. Чащина, О. И. Петренко, I. M. Vagina, K. B. Krysan, O. P. Solomko

Модифікація структури ДНК плазмиди *pATV8* у трансгенних мишей. 1. Дослідження структури інтегрованого трансгеному і біологічні ефекти трансгенозу

Резюме

*Взаємодія провірусної ДНК вірусу саркоми Рауса птахів з геномом миші при трансгеннозі призводить до суттєвої модифікації векторної молекули. Виявлено дві форми існування стабільних генетичних структур на основі трансгеному: кільцева екстрахромосомна ДНК і ДНК, інтегрована у геном миші. У випадку інтеграції трансгеному відмічено повну втрату послідовностей провірусної ДНК та частини структури бактеріальної векторної плазмиди. Показано, що наявність екзогенної ДНК у клітинах трансгенних мишей суттєво впливає на функціонування геному реципієнта, що характеризується підвищеною частотою пухлинотворення, зниженням плодовитості. Індуковані трансгеномом генетичні і фізіологічні зміни є результатом його безпосередньої взаємодії з генетичним матеріалом клітин багатоклітинного організму та свідчать про структурно-функціональну дестабілізацію геному миші.*

L. I. Chashchina, A. I. Petrenko, I. N. Vagina, K. V. Krysan, A. P. Solomko

Structure rearrangement of plasmid *pATV8* in transgenic mice. 1. Study of structure of the integrated transgenome and biological effects of transgenesis

Summary

*Interactions of avian Raus sarcoma proviral DNA with mouse genome during transgenesis lead to significant modifications of the vector molecule. Two stable genetic structures derived from trans-*

genome were discovered: extrachromosomal circle DNA and DNA, integrated into mouse genome. In the integrated DNA there was a complete loss of proviral DNA sequences and a partial deletion of bacterial vector plasmid. The presence of exogenic DNA in transgenic mice cells had a profound influence on the function of their genome, characterized by the increase in tumorigenity and the decrease of fertility. Genetical and physiological changes induced by the transgenome are the consequence of its interactions with the mice genome. Our results indicate that the transgene caused the structural and functional destabilization of mouse genome.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Газарян К. Г., Генинг Л. В., Незнанов Н. С. и др. Микроинъекция в зиготы мышей рекомбинантных ДНК, содержащих ген тимидинкиназы вируса герпеса и последовательности ДНК ретровирусов // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1984.—№ 10.—С. 22—28.
- Wei C. M., Gibson M., Spear P. G., Scholnik E. M. Construction and isolation of transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and thymidine kinase gene of Herpes complex virus type 1 // J. Virol.—1981.—39, N 3.—P. 935—944.
- Beveren C. V., Goddard J. G., Berns A., Verma I. M. Structure of Moloney murine leukemia viral DNA: nucleotide sequence of the 5' long terminal repeat and adjacent cellular sequences // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77, N 6.—P. 3307—3311.
- Shimotohno K., Mizutani S., Temin H. M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements // Nature.—1980.—285, N 5716.—P. 550—554.
- Payne G. S., Courtneidge S. A., Crittenden L. B. et al. Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state // Cell.—1981.—23, N 2.—P. 311—322.
- Varmus H. E., Quintrell N., Ortiz S. Retroviruses as mutagens: insertion and excision of a nontransforming provirus // Ibid.—25, N 1.—P. 23—26.
- Соломко А. П., Рындич А. В., Титок Т. Г. и др. Трансгенные мыши, полученные на основе плазмид рАТV8 и рBR322 // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 5.—С. 267—269.
- Solomko A. P., Morozova L. M., Vagina I. N. et al. Transgenic mice with integrated sequences of RSV provirus DNA // Genome.—1988.—30. Suppl. 1.
- Palmiter R. D., Norstedt G., Gelinis R. F. Metallothionein — human GH fusion genes stimulate growth of mice // Science.—1983.—22.—P. 809—814.
- Kiessling U., Becker K., Strause M. Rescue of tk-plasmid from transgenic mice reveals its episomal transmission // Mol. and Gen. Genet.—1986.—204.—P. 328—333.
- Кузнецова Е. Д., Андреева Л. Е., Серова В. А. Новые данные о характере структурных изменений ДНК аденовируса обезьян, микроинъецированной в зиготы мышей // Молекуляр. генетика.—1989.—4.—С. 6—10.
- Газарян К. Г. Микроинъекции генов в зиготы и эмбрионы: интеграция в геном и генетические эффекты // Успехи соврем. генетики.—1985.—13.—С. 75—88.
- Katz R. A., Omer C. A., Weis J. H. Restriction endonuclease and nucleoside sequence analysis of molecularly cloned unintegrated avian tumor virus DNA: structure of large terminal repeats in circle junctions // J. Virol.—1982.—42.—P. 346—351.
- Николаев А. И., Чкоция Т. Т., Кафиани-Эристави К. А. Внехромосомная локализация и передача по наследству рекомбинантной плазмиды, микроинъецированной в грену тутового шелкопряда // Молекуляр. биология.—1991.—25.—С. 1136—1145.
- Wagner E. F., Covarrubia L., Stewart T. A. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in germ line // Cell.—1988.—35.—P. 647—655.

УДК 577.29

Поступила в редакцию 15.01.87