

Модификация структуры ДНК плазмиды *pATV8* у трансгенных мышей.

2. Физическое картирование автономного трансгена и секвенирование клонированных фрагментов его модифицированного участка

Л. И. Чащина, К. В. Крисан, В. И. Матковский, А. П. Соломко

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

*Показано существование в некоторых сублиниях трансгенных мышей экстрахромосомного трансгена, производного плазмиды *pATV8*. Анализ его структуры и биологических свойств обнаружил, что нативность бактериальной части *pATV8* — гена устойчивости к ампицилину и стартовой точки репликации сохранилась, а провирусная область исходной плазмиды существенно модифицировалась. Произошла элиминация части провирусной ДНК и транспозиция новой последовательности. Наблюдаемые регулярная митотическая и мейотическая сегрегация, а также стабильная репликация экстрахромосомного трансгена зависят, скорее всего, от приобретенного фрагмента геномной ДНК мыши.*

Введение. В настоящее время для изучения функционирования генома в целом, а также взаимодействия отдельных его частей и регуляции экспрессии генов широко используется трансгенез. Этот метод позволяет создать модельную систему, с помощью которой можно исследовать перенесенные гены в процессе онтогенеза, следить за их дальнейшей судьбой, контролировать влияние на метаболизм реципиента. Кроме исследовательских целей, трансгенез применяется для решения прикладных задач биотехнологии и медицины. Однако имеются два принципиальных препятствия, ограничивающих применение трансгенеза. Первое — это дестабилизация генома реципиента. Она вызвана реакцией генома реципиента на присутствие гетерологичных нуклеотидных последовательностей (НП) и выражается в повышении количества малых гетерогенных кольцевых ДНК в клетках [1], а также в появлении мутаций в результате интеграции трансгена [2]. Уменьшить дестабилизацию генома

при трансгенезе позволяет применение в качестве донорской ДНК конструкций, существующих экстрахромосомно. Вторым препятствием является модификация или элиминация трансгенов. Одними из первых этот эффект наблюдали авторы работы [3]. Они описали модификацию плазмиды, содержащей нуклеотидную последовательность *pBR322* и вируса SV40, в клетках перmissive для вируса клеточной линии. Интактный вирус саркомы Рауса кур (RSV) в клетках мышей также подвергся модификациям в виде точечных и протяженных делеций [4].

Мы исследовали поведение плазмиды *pATV8* [5], состоящей из плазмиды *pBR322D* и встроенной в нее провирусной ДНК RSV (рис. 1), которую микроинъектировали в зиготы мышей. Был выделен ряд сублиний трансгенных мышей, содержащих трансген в экстрахромосомном или интегрированном в геном состоянии. В обоих случаях произошли существенные перестройки НП трансгена [6—8].

Настоящая работа посвящена изучению модификаций, произошедших в экстрахромосомной форме трансгена.

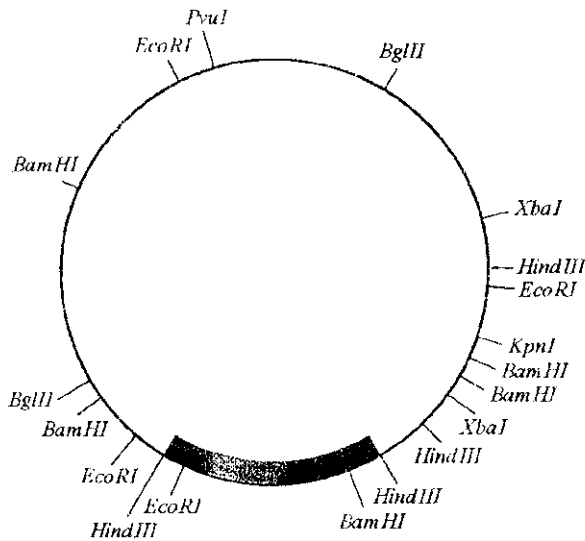


Рис. 1. Карта плазмиды *pATV8*. Заштрихованная область — *pBR322*

Материалы и методы. *Выделение суммарной ДНК мыши.* Органы или ткани мышей измельчали, затем гомогенизировали в буфере (150 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0). Клетки лизировали добавлением DS-Na до 1 % и прогреванием при температуре 50 °C в течение 20 мин. После этого добавляли NaClO₄ до 1 М. Далее белки двукратно экстрагировали смесью фенол — хлороформ (1:1) и осаждали ДНК этанолом. Осадок растворяли в 10 мМ трис-HCl, pH 5,2, и добавляли РНКазу и проназу до концентрации 100 мкг/мл каждой. После обработки в течение 30 мин препараты осаждали этанолом и использовали для трансформации.

Выделение автономно реплицирующейся ДНК. Плазмиду «спасали», трансфицируя компетентные клетки *Escherichia coli* штаммов DH5a, JM 109 или XL1-Blue суммарной ДНК мыши в количестве 20 мкг. Трансформацию проводили по стандартной методике [9]. Длительность теплового шока (при *t* = 42 °C) составляла 90 с. Клоны отбирали после выращивания на среде, содержащей ампициллин в концентрации 40 мкг/мл.

Выделение плазмидной ДНК. Осажденные центрифугированием бактериальные клетки ресуспендировали в буфере (25 мМ трис-HCl, pH 7,5; 10 мМ EDTA; 50 мМ глюкоза), лизировали двойным объемом раствора 0,2 М NaOH; 1 % DS-Na и

обрабатывали 3 М ацетатом натрия, pH 5,2 (1,5 объема от первого раствора). После депротенинизации смесью фенол — хлороформ (1:1) и осаждения этанолом плазмидную ДНК использовали для расщепления рестриктазами и секвенирования.

Рестрикционное картирование. Для картирования использовали рестриктазы фирм «Amersham» (Великобритания) и «Fermentas» (Литва) в условиях, рекомендованных производителями. Рестрикционные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 1,2 %-м агарозном геле. В качестве маркера применяли ДНК фага лямбда, расщепленную рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*.

Блот-гибридизация. После разделения в агарозном геле ДНК (около 0,5 мкг) переносили на нитроцеллюлозный фильтр в буфере 10×SSC (1,5 М NaCl; 0,15 М цитрат натрия) и фиксировали ультрафиолетом. ДНК для зонда (0,2 мкг) метили ³²P-dATP с помощью рассеянной затравки. Гибридизацию проводили по стандартной методике [9].

Клонирование фрагментов экстрахромосомной ДНК мыши. Клонировали отдельные рестрикционные фрагменты, выделенные из агарозного геля, а также использовали метод «short gun». Лигирование осуществляли в течение ночи при 5 °C.

Определение нуклеотидной последовательности. Нуклеотидную последовательность определяли по методу дидезокситерминации (Сэнгера) [10]. Секвенировали одно- и двухцепочечную ДНК. Фрагменты распределяли в 8 %-м акриламидном геле.

Результаты и обсуждение. Известно, что при инфицировании вирусами непермиссивных хозяев вирусные геномы часто не интегрируют в хромосомы хозяина, а существуют в виде эписом [11]. При выборе ДНК *pATV8* в качестве донорской предполагалось, что наличие в ней провирусной ДНК RSV позволит плазмиде в клетках мышей существовать экстрахромосомно. Кроме того, благодаря особенностям входящих в ее состав НП *pATV8* представляла интерес для выяснения условий взаимодействия гетерологичных геномов.

Трансгенных мышей поколения F₀ скрещивали с нормальными мышами той же линии. Анализ результатов скрещиваний показал, что часть трансгенных мышей передавала трансген потомству по менделевскому типу наследования, что свидетельствует об интеграции введенной НП в геном мышей. У другой части трансгенных мышей менделевское наследование трансгена отсутствовало: от 80 до 100 % потомков содержали трансген. Это позволило предположить, что у таких мышей трансген либо существует в экстрахромосомном состоянии,

либо произошла интеграция, как минимум, в две негомологичные хромосомы.

Для проверки первого предположения из различных тканей и органов (печень, мозг, кожа) трансгенных мышей сублинии В-6, в которой предполагалось наличие трансгена в экстрахромосомном состоянии, были выделены суммарные ДНК, которыми трансфицировали компетентные клетки *E. coli*, после чего их выращивали на среде, содержащей ампициллин.

Выделенная из устойчивых к ампициллину трансформантов плазида (обозначенная pB.6.5 по названию первой сублинии мышей, в которой ее обнаружили) отличалась от исходной pATV8 по размеру (pATV8 — 14 тыс. п. н., pB.6.5 — 5,3 тыс. п. н.). Необходимо отметить, что данный метод «спасения» плазмиды не позволяет получить формы трансгенов, возможно, существующие в клетках мышей автономно, но утратившие в результате модификации бактериальную стартовую точку репликации или селективный маркер (в нашем случае — ген устойчивости к ампициллину).

Очередным этапом работы было рестрикционное картирование плазмиды pB.6.5. Использовали следующие рестриктазы: *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *PvuI*, *PvuII*, *BglI*, *ClaI*, *AvaI*, *XbaI*. Полученная физическая карта плазмиды представлена на рис. 2. В результате модификации pATV8

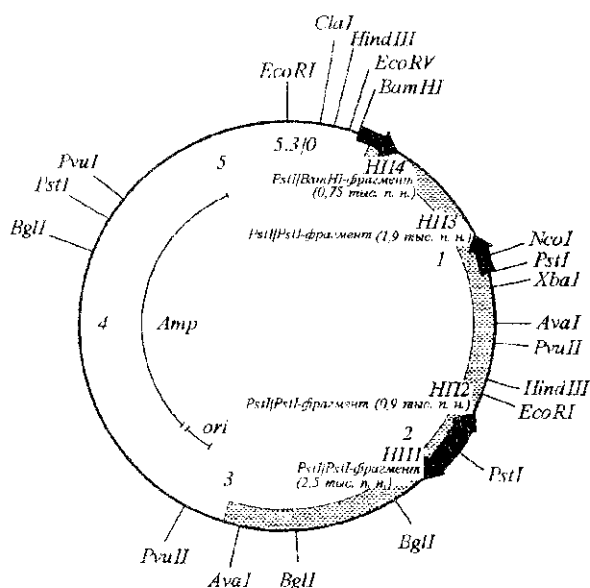


Рис. 2. Карта плазмиды pB.6.5. Заштрихован модифицированный участок. Стрелками указаны направления секвенирования

утрачены сайты расщепления для рестриктаз *BglII*, *Sall* и *KpnI*. Обнаружены новые сайты расщепления для *AvaI*, *PvuI*, *NcoI*, *EcoRI*, *HindIII* и *XbaI*. Сайты узнавания для рестриктаз *EcoRI*, *HindIII* и *XbaI* имелись и в pATV8, но их взаимное расположение было иным.

При сравнении взаимного расположения сайтов рестрикции pB.6.5 и pATV8 выяснилось, что в исходной плазмиде утеряна существенная часть провирусных и бактериальных последовательностей. Сайты для рестриктаз *BglII*, *KpnI* и *Sall*, имеющиеся в исходной плазмиде pATV8 и отсутствующие в pB.6.5, находились для *BglII* в генах *gag* и *src*, для *KpnI* — в гене *pol* провирусной части pATV8, что указывает на локализацию делетированных НП. Сайт для рестриктазы *Sall* находился в гене устойчивости к тетрациклину бактериальной части pATV8. Причины избирательной элиминации провирусной ДНК можно объяснить различной рекомбинационной способностью вирусных генов. Появление дополнительных сайтов рестрикции может свидетельствовать о внутримолекулярных перестройках pATV8 или о встраивании фрагмента чужеродной ДНК.

Избирательная элиминация НП трансгенов отмечена авторами ряда работ. Так, провирусные НП в плазмиде, содержащей часть pBR322 (*ori* репликации и ген устойчивости к ампициллину), ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и двоянный длинный концевой повтор (LTR) RSV, после введения в зиготы мышей элиминировались и замещались геномной ДНК мыши примерно такого же размера [12].

При введении в зиготы мышей высокоонкогенного обезьяньего аденовируса наблюдалась элиминация части провирусной ДНК как левого ее конца, содержащего онкоген [13], так и правого [14].

Таким образом, модификации трансгенов наблюдаются достаточно часто. Механизм этих явлений не вполне ясен. Возможно, здесь играет определенную роль негомологическая рекомбинация.

Предположение о наличии в pB.6.5. фрагмента геномной ДНК мыши позволяет объяснить стабильную репликацию и сегрегацию трансгена в мышцах. Встроившийся фрагмент может содержать хромосомную стартовую точку репликации ДНК мыши и обеспечивать репликацию плазмиды в клетках мышей в экстрахромосомном состоянии (есть данные о том, что *ori* репликации pBR322 гомологична *ori* SV40 и может узнаваться эукариотической ДНК-полимеразой [15], однако маловероятно, что при этом возможна столь длительная и стабильная репликация).

Интересные данные получены А. П. Козловым

и соавт. [16]: показано, что плаزمида *pAT153*, микроинъекцированная в ранние зародыши выюна, изменяется на самых ранних стадиях развития. Вначале хозяйская эндонуклеаза линейризует плазмиду, а затем образуются высокомолекулярные конкатамеры разрезанной по случайным сайтам *pAT153*. При этом до стадии ранней гаструлы трансген интенсивно реплицируется, а затем элиминируется [16].

Образовавшийся в нашем случае ARS-элемент (ARS — *autonomously replicating sequence*) представляет повышенный интерес благодаря наличию бактериальной стартовой точки репликации и селективного маркера — гена устойчивости к ампициллину, что облегчает его исследование.

Что касается мейотической и митотической сегрегации трансгена, то она могла происходить двойко: простым делением между материнской и дочерней клетками при кариокинезе либо при участии веретена деления. Последнее возможно при наличии в составе трансгена центромерных последовательностей [17]. НП, обеспечивающие репликацию и сегрегацию трансгена, могут находиться в составе транспозированного фрагмента ДНК мыши.

Подобная «адаптация» трансгена описана для плазмиды, содержащей НП *pBR322* и ген большого Т-антигена вируса полиомы [11]. Эту плазмиду микроинъекцировали в зиготы мышей, а затем у взрослых особей были обнаружены ее модифицированные формы. Они отличались от материнской утратой или глубокой перестройкой вирусных НП и наличием вставки геномной ДНК мыши. Бактериальная часть плазмиды практически не подверглась перестройкам.

В трансгенных бабочках тутового шелкопряда происходит модификация плазмиды, содержащей фрагмент *pBR322* и 1,5 LTR вируса RSV. При этом в плазмиду встраивается участок геномной ДНК шелкопряда, содержащий эволюционно консервативные повторяющиеся последовательности [18].

Вставка фрагмента в трансген могла произойти вследствие а) интеграции последнего в хромосомную ДНК мыши и последующей неверной эксцизии; б) негомологичной рекомбинации с хромосомной или экстрахромосомной ДНК (которая, впро-

чем, имеет хромосомное происхождение). В составе экстрахромосомных ДНК обнаружены как повторяющиеся, так и уникальные НП. Многие экстрахромосомные ДНК могут реплицироваться во внехромосомном состоянии [19]. Кроме того, их количество при трансгенозе возрастает, на что указывалось выше. Возможность рекомбинации в экстрахромосомном состоянии показана в модельном эксперименте [20].

Нами определена НП части модифицированного участка. На основании полученной рестрикционной карты для секвенирования использовали фрагменты расщепления плазмиды *pB.6.5* рестриктазами: *PstI* (фрагменты размером 2,5; 1,9 и 0,9 тыс. п. н.), *PstI + BamHI* (0,75 тыс. п. н.). Схема секвенирования представлена на рис. 2. Полученная НП1 приведена на рис. 3.

Проведен также поиск гомологии этих НП с таковыми банка данных «GenBank». Оказалось, что последовательности НП2 и НП3 имеют высокую гомологию с геном *env* провирусной ДНК RSV. Это свидетельствует о том, что данные НП представляют собой остатки провирусной ДНК RSV, входившей в состав *pATV8*. Являются ли отдельные замены нуклеотидов ошибками секвенирования или точечными мутациями, покажут дальнейшие исследования. Исходя из данных рис. 2 можно предположить, что в промежутке между последовательностями НП2 и НП3, которые являются частями гена *env*, находится последовательность того же гена. Это также подтверждается сходством расстояний между данными НП и соответствующими им участками провирусной ДНК RSV.

Последовательность 4 гомологична НП гена устойчивости к тетрациклину плазмиды *pBR322* от *BamHI* сайта (5'-конец гена). Отмечено, что при культивировании плазмиды *pBR322* в непермиссивной системе перестройки в виде делеций в первую очередь затрагивают 3'-конец гена устойчивости к тетрациклину и прилегающие участки (В. В. Кацмон, личное сообщение).

Для этой последовательности поиск не выявил сколько-нибудь значительной гомологии с НП вирусов, бактерий и грызунов. Поскольку в банке данных представлены далеко не все НП грызунов,

5'-CTGCAGTGGCTGATGGCTTCTGACGTGGTGGACTACTACAGGAGAGCCGCAG
CGTCGACCGCCTCTCGACTGGGACTGGTGGTTTCTCCACCTACCTGTTAGTCCTGA
AGATTGATTTCTGCATTGCGGATCTGGTGTGGATCTGATCCTTCGCAGCTAAC-3'

Рис. 3. Неидентифицированная нуклеотидная последовательность (НП1) плазмиды *pB.6.5*

можно предположить, что данная НП является неизвестным фрагментом геномной ДНК мыши. Поиск функциональных блоков в исследуемой НП показал наличие некоторой гомологии с «горячими точками» рекомбинации иммуноглобулиновых генов мыши, которые, в свою очередь, сходны с χ -последовательностями, необходимыми для рекомбинации с участием *recBC*-ДНКазы у прокариот [21, 22]. Возможно, эти НП совместно с прилегающими участками хромосомы образовывали блок, обеспечивающий амплификацию определенной части генома мыши. Кроме того, в последовательности 1 имеются открытые рамки считывания.

Что касается биологических эффектов трансгеноза, то в нашем случае интересно было бы связать их с экспрессией генов, входящих в состав плазмиды pATV8. Поскольку причастность бактериальных генов pATV8 к формированию фенотипа трансгенных животных маловероятно, фенотипические проявления трансгеноза можно объяснить наличием в трансгене оставшихся фрагментов провирусной ДНК RSV или интеграцией трансгена в геном мышей. Интеграция могла произойти вблизи генов, существенных для развития зародыша на самых ранних стадиях онтогенеза. Это могло нарушить метаболизм и дифференцировку некоторых типов клеток [23], после чего в одной из сублиний трансген делетировался из генома, замкнулся в кольцевую молекулу и продолжал существовать автономно. Возможно, при этом и произошла делеция части молекулы трансгена.

Изучение закономерностей взаимодействия гетерологичных геномов позволит прогнозировать поведение трансгенов и предотвращать их модификации. Это расширит использование трансгеноза и откроет новые возможности его применения.

Л. І. Чащина, К. В. Крысан, В. І. Матковський, О. П. Соломко

Модифікація структури ДНК плазмиди pATV8 у трансгенних мишей.

2. Фізичне картування автономного трансгеному і секвенування клонованих фрагментів його модифікованої ділянки

Резюме

Показано існування у деяких субліній трансгенних мишей екстрахромосомного трансгеному, похідного плазмиди pATV8. Аналіз його структури та біологічних властивостей виявив, що нативність бактеріальної частини pATV8 —гена стійкості до ампіциліну і стартової точки реплікації зберіглася, а провірусна область вихідної плазмиди суттєво модифікувалася. Здійснилися елімінація частини провірусної ДНК і транспозиція нової послідовності. Регулярна мітотична і мейотична сегрегація, що спостерігалася, а також стабільна реплікація екстрахромосомного трансгеному залежить, скоріш за все, від придбаного фрагмента геномної ДНК миші.

L. I. Chashchina, K. V. Krysan, V. I. Matkovsky, A. P. Solomko

Structure rearrangement of plasmid pATV8 in transgenic mice.

2. Physical mapping of autonomous transgenome and sequencing of cloned fragment of its modified region

Summary

The existence of extrachromosomal transgenome in several substrains of transgenic mice was shown. This transgenome is a modified pATV8 plasmid. Analysis of its structure and biological properties demonstrated that the ori and ampicillin resistance regions of bacterial part of pATV8 did not change, but the proviral part of initial plasmid had severely modified. Partial elimination of proviral DNA and transposition of new sequence occurred. It seems that stable mitotic and meiotic segregation of extrachromosomal transgenome and its stable replication depends upon the acquired fragment of mouse genomic DNA.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wiberg F. C., Sunnerhagen P., Bjursele G. New, small circular DNA in transfected mammalian cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6, N 2.—С. 635—662.
2. Hunter D.J., Gurney E. G. The genomic instability associated with integrated Simian Virus 40 DNA is depended on the origin of replication and early control region // *J. Virol.*—1994.—68, N 2.—Р. 787—796.
3. 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.—Р. 3015—3019.
4. Газарян К. Г., Гольцов В. А., Набировкин С. В. и др. Введение последовательностей ДНК вируса саркомы Рауса в геномы дрозофилы и мыши путем микроинъекций в яйцеклетки // *Молекуляр. биология.*—1985.—19.—С. 760—766.
5. Katz R. A., Omer C. A., Weis J. H. et al. Restriction endonuclease and nucleotide sequence analyses of molecularly cloned unintegrated avian tumor virus DNA: Structure of large terminal repeats in circle junctions // *J. Virol.*—1982.—42, N 1.—Р. 346—351.
6. Соломко А. П., Рындич А. В., Титок Т. Г. Трансгенные мыши, полученные на основе плазмид pATV8 и pBR322 // *Биополимеры и клетка.*—1988.—4, № 5.—С. 18—24.
7. 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.—Р.
8. Чащина Л. И., Петренко А. И., Вагина И. Н., Соломко А. П. Модификация структуры ДНК плазмид pATV8 у трансгенных мышей. I. Исследование структуры интегрированного трансгенома и биологические эффекты трансгеноза // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 4.—С. 323—327.
9. Маннатиус Т., Фрич М., Сэмбрук Ф. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1983.—480 с.
10. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 12.—Р. 5463—5467.
11. Rassoulzadegan M., Leopold P., Vailly J., Cuzin F. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strain // *Cell.*—1986.—46, N 4.—Р. 513—519.
12. Гарантул В. З., Кучерявый В. В., Макарова И. В. и др. Клонирование фрагмента ДНК трансгеномной мыши, содержащего интегрированную рекомбинантную плазмиду // *Молекуляр. биология.*—1986.—20, № 1.—С. 278—286.

13. Кузнецова Е. Д., Андреева Л. Е., Серова И. А. и др. Новые данные о характере структурных изменений аденовируса обезьян SA7, микроинъектированного в зиготы мышей // Молекуляр. генетика.—1988.—1.—С. 6—10.
14. Тарантул В. З., Кузнецова Е. Д., Газарян К. Г. Характеристика участков генома трансгенных животных, прилегающих к интегрированным последовательностям чужеродной ДНК // Молекуляр. биология.—1989.—23, № 4.—С. 1036—1041.
15. Goldberg E. Z., Naroditsky B. S., Felgenhauer P. E. et al. Replication of heterologous DNA in *Xenopus laevis* oocytes // FEBS Lett.—1981.—121.—P. 215—218.
16. Козлов А. П., Решетников В. Л., Корж В. П., Нейфах А. А. Чужеродная ДНК в развивающихся зародышах вьюна *Misgurnus fossilis* L. // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 6.—С. 1614—1623.
17. Huxley C. Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy // Gene Therapy.—1994.—1, N 1.—P. 7—12.
18. Николаев А. И., Чкония Т. Т., Эристави-Кафиани К. А., Тарантул В. З. Анализ «спасенной» плазмиды из трансгенного тутового шелкопряда // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.—С. 76—86.
19. Сальников К. В. Экстрахромосомная ДНК в клетках млекопитающих // Цитология.—1990.—32, № 11.—С. 1061—1071.
20. Puchta H., Kocher S., Hohn B. Extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells is fast and is not affected by CpG-methylation // Mol. and Cell. Biol.—1992.—12, N 8.—P. 3372—3379.
21. Kobori J. A., Strauss E., Minard R., Hood L. Molecular analysis of the hotspot of recombination in the murine major histocompatibility complex // Science.—1986.—234, N 4773.—P. 173—179.
22. Kiyama R., Matsui H., Oishi M. A repetitive DNA family (*Sau* 3A family) in human chromosomes: extrachromosomal DNA and DNA polymorphism // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 13.—P. 4665—4669.
23. Wagner E. F., Cavarrubia L., Stewart T. A. Prenatal lethalties in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in germ line // Cell.—1988.—35.—P. 647—655.

УДК 577.218

Поступила в редакцию 15.01.97