

Эндогенные ALV-родственные ретровирусы в ДНК кур линии СВ

Л. Г. Борисенко, А. В. Рындиц

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

При помощи полимеразной цепной реакции и метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов охарактеризованы ALV-родственные ретровирусы (семейство ev) в ДНК инбредной линии кур СВ (B12/B12), устойчивой к RSV-индуцированному онкогенезу. Обнаруженные провирусы (ev-1, ev-7, ev-10) могут отвечать за продуцирование инфекционных и неинфекционных вирионов. Установлено, что провирусы интегрированы преимущественно в GC-богатые участки генома (51–62 % GC).

Введение. В геноме позвоночных присутствуют разнообразные эндогенные ретровирусы. Интерес к их изучению возрос после того, как стало известно о роли провирусов в возникновении новых высоковирулентных форм ретровирусов [1, 2]. В последние годы появление таких ретровирусов за счет рекомбинации с эндогенными провирусами нанесло большой урон птицеводству всего мира [3]. В то же время присутствие в геноме эндогенных ретровирусов вызывает устойчивость к инфицированию экзогенными ретровирусами, проникающими в клетку с помощью рецептора, аналогичного или родственного рецептору эндогенного провируса [4–6]. Все это обусловило интерес к изучению эндогенных ретровирусов. Птичьи эндогенные ретровирусы являются одной из наиболее интенсивно исследуемых групп ретровирусов.

Долгое время считалось, что интеграция ретровирусов — случайный, сайт-неспецифичный процесс. Однако при использовании методов фракционирования геномной ДНК хозяина по составу оснований было показано, что интеграция является компартиментализованной (происходит в определенный компартимент генома) и изопикнической (GC-состав ретровирусов сопоставим с таковым тех районов генома, в которых происходит интеграция) [7]. До настоящего времени данные об интеграции эндогенных ретровирусов ограничивались исследованием эндогенных ретровирусов мышей [8].

Для птиц характерны провирусы, родственные вирусу лейкоза птиц (ALV), которые у кур представлены многочисленными ретровирусами семейства ev [9]. Провирусы этого семейства (ev-1—ev-22) высокогомологичны друг другу и по-разному распределены в геномах разных линий кур.

В данной работе установлено, какие эндогенные ALV-родственные ретровирусы присутствуют в геноме кур инбредной линии СВ (B12/B12), и выявлены закономерности их распределения. Линия СВ (B12/B12) выведена в Праге (Чехия); гаплотип B12 отвечает за устойчивость к онкогенезу, индуцированному вирусом саркомы Рауса (RSV) [10, 11].

Материалы и методы. Геномная ДНК из образцов тканей трехнедельных эмбрионов кур линии СВ (B12/B12), любезно предоставленных д-ром Хейнартом (Институт молекулярной генетики, Прага, Чехия), выделена с помощью набора «Genomix» («Talent», Италия).

Для детекции некоторых провирусов семейства ev (ev-1—ev-4, ev-6, ev-7, ev-9, ev-12, ev-15, ev-16, ev-21) использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами, специфичными для длинных концевых повторов (LTR) каждого провируса и сайта его интеграции. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,8 (при 25 °C), 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP (каждого типа), 1 ед. Taq-полимеразы, по 50 пмоль каждого праймера и 100 нг геномной ДНК. Нуклеотидные последовательности

праймеров и температурные циклы приведены в работе [12].

Остальные ALV-родственные ретровирусы можно выявить с помощью метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Гидролиз геномной ДНК рестриктазами *BamHI* и *SacI*, электрофорез в 0,8 %-м агарозном геле, перенос ДНК на нейлоновые фильтры Hybond N+ («Amersham», Англия) и гибридизацию в жестких условиях проводили в соответствии с общепринятой методикой [13]. Для рестрикции 10 мкг геномной ДНК инкубировали с 30 единицами рестриктазы в течение 12 ч. В качестве зонда для гибридизации использовали полноразмерный геном вируса саркомы Рауса без гена *src*.

Геномную ДНК курицы фракционировали по составу оснований в градиенте плотности $CsCl_2$ (рефрактометрический индекс 1.3993) [14] в вертикальном роторе VTi90 («Beckman», США) при температуре 20 °С на препаративной центрифуге «Beckman» (30000 об/мин, не менее 24 ч). После этого собирали 60—65 фракций (по 80 мкл каждая) на коллекторе фракций DGF-U («Hitachi», Япония) при температуре в помещении 20 °С. GC-состав полученных фракций определяли при помощи аналитического центрифугирования с маркером плавучей плотности — ДНК фага C2 (плавучая плотность 1,742 г/см³) на аналитической центрифуге «Beckman» [15]. ДНК фракций денатурировали в 0,4 М NaOH в течение 30 мин и переносили по 50 нг из каждой фракции на мембрану «Hybond N+» с помощью дотблот-аппарата фирмы «Bio-Rad» (США). Провирусные последовательности во фракциях определяли с помощью гибридизации с зондом (геном вируса саркомы Рауса без гена *src*). Количественный анализ гибридизационных сигналов проводили на аппарате PhosphorImager («Molecular Dynamics», Англия).

Результаты и обсуждение. Выявление провирусов в геноме. Бенкель [12] разработал тест, в котором при проведении ПЦР с *ev*-специфичными праймерами по длине образующихся продуктов можно судить о присутствии или отсутствии провируса в геноме (табл. 1). Результаты ПЦР представлены на рис. 1. *ev-1*-специфичный фрагмент имеет размер 295 п. н., а *ev-7*-специфичный фрагмент — 565 п. н., что свидетельствует о присутствии этих провирусов в геноме. В случае ретровирусов *ev-2* и *ev-6* продукты ПЦР отсутствуют, а для провирусов *ev-3*, *ev-4*, *ev-9*, *ev-12*, *ev-15*, *ev-16* они представлены фрагментами длиной 270, 565, 450, 320, 180 и 355 п. н. соответственно. Эти результаты показывают, что данных провирусов в геноме нет.

При гидролизе геномной ДНК курицы ре-

Таблица 1
Продукты ПЦР, специфичные для ALV-родственных провирусов (по данным работы [12])

Ретровирус	Длина продукта при наличии ретровируса в геноме, п. н.	Длина продукта в отсутствие ретровируса в геноме, п. н.
<i>ev-1</i>	295	505
<i>ev-2</i>	320	—
<i>ev-3</i>	190	270
<i>ev-4</i>	280	565
<i>ev-6</i>	300	—
<i>ev-7</i>	565	330
<i>ev-9</i>	115	450
<i>ev-12</i>	200	320
<i>ev-15</i>	460	180
<i>ev-16</i>	630	355
<i>ev-21</i>	390	510

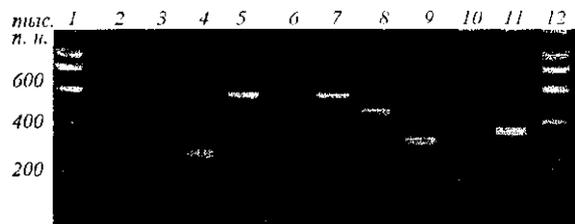


Рис. 1. ПЦР ALV-родственных ретровирусов: 1, 12 — маркер Smart Ladder (Eurogenetec); 2 — *ev-1*; 3 — *ev-2*; 4 — *ev-3*; 5 — *ev-4*; 6 — *ev-6*; 7 — *ev-7*; 8 — *ev-9*; 9 — *ev-12*; 10 — *ev-15*; 11 — *ev-16*

стриктазами *BamHI* и *SacI* и последующей гибридизации с зондом, гомологичным ALV, каждый провирус образует фрагменты определенной длины (табл. 2). На радиоавтографе (рис. 2, дорожка 2) видны полосы длиной 5 и 7,6 тыс. п. н. (рестрикция *BamHI*), а также 9,4 и 13 тыс. п. н. (дорожка 3 на рис. 2, рестрикция *SacI*), которые характерны для провирусов *ev-1* и *ev-7* соответственно. Таким образом, результаты, полученные с помощью метода ПДРФ, сопоставимы с результатами ПЦР.

Однако на радиоавтографе есть и дополнительные сигналы: фрагменты длиной 14 тыс. п. н. (рестрикция *BamHI*) и 20 тыс. п. н. (рестрикция *SacI*), характерные для провируса *ev-10*. Этот ретровирус можно принять за *ev-5*, дающего фрагменты 13 и 19 тыс. п. н. соответственно. Но на основании анализа длин фрагментов на радиоавтографе мы полагаем, что данный провирус является *ev-10*.

Таблица 2
ALV-специфические фрагменты, образующиеся при гидролизе геномной ДНК курицы рестриктазами *SacI* и *BamHI* (по данным работ [16—18])

ALV-родственный провирус	<i>SacI</i> -фрагмент, тыс. п. н.	<i>BamHI</i> -фрагмент, тыс. п. н.
<i>ev-1</i>	9,4	5,2
<i>ev-2</i>	6	8,2
<i>ev-3</i>	6,3	7,3
<i>ev-4</i>	8,7	7,3
<i>ev-5</i>	19	13
<i>ev-6</i>	21	4,4
<i>ev-7</i>	13	7,6
<i>ev-8</i>	18	23
<i>ev-9</i>	23	11
<i>ev-10</i>	21	14
<i>ev-11</i>	13	?
<i>ev-12</i>	8,1	?
<i>ev-13*</i>	?	?
<i>ev-14</i>	9,5	15
<i>ev-15</i>	4,2	—
<i>ev-16</i>	5,4	—
<i>ev-17</i>	11	?
<i>ev-18</i>	10,5	25
<i>ev-19</i>	7,6	9,8 или 18
<i>ev-20</i>	8,1	9,8 или 18
<i>ev-21</i>	9,2	20
<i>ev-22</i>	5,5	?

Примечание. *Провирус *ev-13* охарактеризован только гибридизацией *in situ*, другие данные отсутствуют

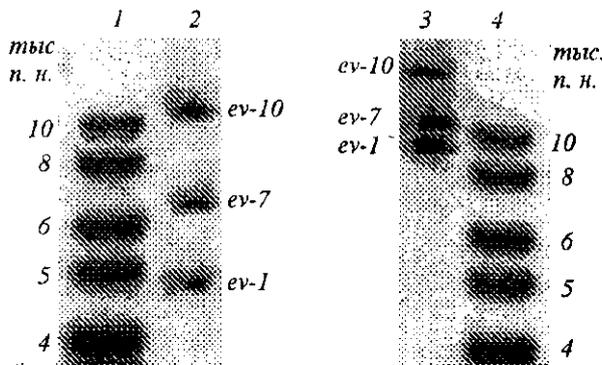


Рис. 2. ПДРФ-анализ геномной ДНК курицы: 1, 4 — маркер длины рестрикционных фрагментов; 2, 3 — рестрикция *BamHI* и *SacI* соответственно

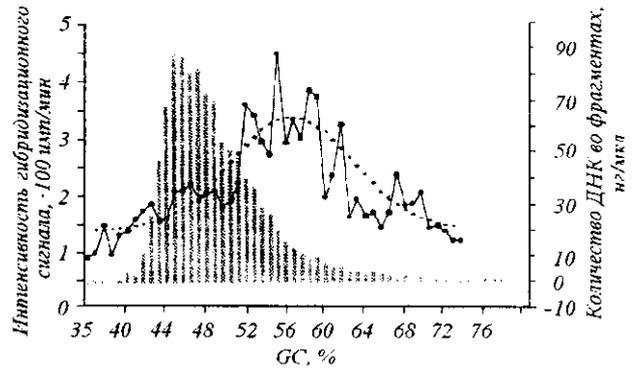


Рис. 3. Распределение ALV-родственных провирсов в ДНК кур линии СВ. Профиль ДНК курицы показан в виде гистограммы; пунктирная линия — кривая Гаусса

Таким образом, линия СВ (B12/B12) содержит в геноме три эндогенных ALV-родственных ретровируса — *ev-1*, *ev-7* и *ev-10*. Первый из них является наиболее распространенным эндогенным ретровирусом как среди яйцекладущих, так и мясных пород кур [9]. Он кодирует РНК длиной 7,5 и 3 тыс. п. н. представляющую собой полноразмерный геном *ev-1* и мРНК гена *env* [19], а также не продуцирует вирусных белков и инфекционных вирионов. *ev-1* локализован на хромосоме 1 вместе с некоторыми другими провирсусами (*ev-4*, *ev-5*, *ev-6*, *ev-8*, *ev-13*).

ev-7 характерен для линии 15В и некоторых редких линий белых леггорнов [12]. Известно, что *ev-7* продуцирует индуцибельный полноразмерный вирион, формирующийся вследствие рекомбинации из вирусной частицы, кодируемой *ev-7* и РНК *ev-1* [20, 21]. Провирус, возможно, содержит делеции в гене *env*. Структура РНК не исследована. *ev-7* является локусом, сцепленным с полом [22], что подтверждается его локализацией на Z-хромосоме [23].

О *ev-10* известно только, что он кодирует инфекционный вирус [24].

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что исследованная линия кур может продуцировать ретровирусные частицы.

Распределение провирсов в геноме. В силу того, что из трех обнаруженных провирсов только для *ev-1* установлена полная нуклеотидная последовательность [25], невозможно исследовать распределение этих ретровирусов независимо друг от друга. Поэтому для гибридизации фракций геномной ДНК курицы мы использовали геном вируса саркомы Рауса, который в жестких условиях отжигается со всеми представителями семейства *ev*.

Пик распределения этих ретровирусов находится в GC-богатой части генома: он начинается с фракции, содержащей 51 % GC, и заканчивается фракцией с GC-составом 62 % (рис. 3). Максимальное количество ретровирусов сосредоточено в районе с GC-составом 55 %. Если сравнить эти результаты с данными по распределению RSV (одного из наиболее близких экзогенных аналогов семейства *ev*) в геноме хомяка [26], то обращает на себя внимание следующий факт: поскольку для RSV пик распределения находится в районе с GC-составом 50 %, то пик распределения эндогенных ретровирусов более сдвинут в сторону GC-богатой части генома. GC-состав самих ретровирусов следующий: 54 % GC у RSV [26] и 52,5 % GC у *ev-1* [25], а, значит, интеграцию можно считать изопикнической.

Компартментализованная и изопикническая интеграция раньше была показана и для таких GC-богатых экзогенных ретровирусов, как BLV и HTLV-I, интегрирующих в GC-богатые компартменты генома, и GC-бедного эндогенного ретровируса мышей MMTV, интегрирующего преимущественно в GC-бедные участки [7].

Таким образом, эндогенным ALV-родственным ретровирусам кур, так же как и экзогенным ретровирусам млекопитающих [7], мобильным элементам генома, интегрирующим путем ретротранспозиции [27], а также ДНК-содержащим вирусам [28] свойственна компартментализованная интеграция. Можно предположить, что компартментализованность связана с большей доступностью «открытых» участков хроматина, характерных для GC-богатых областей генома [7].

L. G. Borisenko, A. V. Rynditch

Endogenous ALV-related retroviruses in chicken line CB

Summary

Using polymerase chain reaction and restriction length polymorphism analysis we detected ALV-related proviruses (*ev* loci) in DNA of inbred chicken line CB (B12/B12). All the found retroviruses (*ev-1*, *ev-7*, *ev-10*) may be responsible for the production of infectious and noninfectious virions. It is shown that a peak of provirus distribution is centered at GC-rich compartments of the genome (51–62 % GC).

Л. Г. Борисенко, А. В. Риндич

Ендогенні ALV-родинні ретровіруси в ДНК курей лінії СВ

Резюме

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції та методу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів охарактеризовано ALV-родинні ретровіруси (родина *ev*) у ДНК інбредної лінії курей СВ (B12/B12), стійкої до RSV-індукованого онкогенезу. Знайдені провіруси (*ev-1*, *ev-7*, *ev-10*) можуть відповідати

за продукування інфекційних і неінфекційних віріонів. Встановлено, що провіруси інтегровані переважно в GC-багаті ділянки геному (51–62 % GC).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Geryk J., Dezelee P., Barnier J., Svoboda J., Nehyba J., Karakoz I., Rynditch A., Yatsula B., Calothy G. Transduction of the cellular *src* gene and 3' adjacent sequences in avian sarcoma virus PR2257 // J. Virol.—1989.—63.—P. 481—492.
- Yatsula B., Geryk J., Briestanska J., Karakoz I., Svoboda J., Rynditch A., Calothy G., Dezelee P. Origin and evolution of the *c-src*-transducing avian sarcoma virus PR2257 // J. Gen. Virol.—1994.—75.—P. 2777—2781.
- Venugopal K. Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses // Res. Vet. Sci.—1999.—67.—P. 113—119.
- Robinson H., Astrin S., Senior A., Salazar F. Host susceptibility to endogenous viruses: defective glycoprotein-expressing proviruses interfere with infections // J. Virol.—1981.—40.—P. 745—751.
- Crittenden L., Fadley A., Smith E. Effects of endogenous leukosis virus genes on response to infection with avian leukosis and reticuloendotheliosis viruses // Avian Diseases.—1982.—26.—P. 279—294.
- Kuhnlein U., Fairfull R., Gowe R., Kulenkamp A., Mou L., Zadworny D. Synergism between the endogenous viral loci *ev6* and *ev9* in inducing immunological tolerance to avian leukosis virus // Brit. Poultry Sci.—1993.—34.—P. 93—104.
- Rynditch A., Zoubak S., Tsyba L., Tryapitsina-Guley N., Bernardi G. The regional integration of retroviral sequences into the mosaic genomes of mammals // Gene.—1998.—222.—P. 1—16.
- Salinas J., Zerial M., Filipski J., Crepin M., Bernardi G. Nonrandom distribution of MMTV proviral sequences in the mouse genome // Nucl. Acids Res.—1987.—15.—P. 3009—3022.
- Борисенко Л., Риндич А. Эндогенные ретровирусы птиц: структура, экспрессия и эволюция // Биополимери і клітина.—2002.—18, № 1.—С. 37—47.
- Plachy J., Hala K., Hejnar J., Geryk J., Svoboda J. *src*-specific immunity in inbred chickens bearing *v-src* DNA- and RSV-induced tumors // Immunogenetics.—1994.—40.—P. 257—265.
- Plachy J., Hala K. Comparative aspects of the chicken immunogenetics (review) // Folia biol.—1997.—43.—P. 133—151.
- Benkel B. Locus-specific diagnostic tests for endogenous avian leukosis-type viral loci in chickens // Poultry Sci.—1998.—77.—P. 1027—1035.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1982.—545 p.
- De Sario A., Geigl E. M., Bernardi G. A rapid procedure for the compositional analysis of yeast artificial chromosomes // Nucl. Acids Res.—1995.—23.—P. 4013—4014.
- Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl₂ // J. Mol. Biol.—1962.—4.—P. 430—443.
- Rovigatti U., Astrin S. Avian endogenous viral genes // Curr. Top. Microbiol. Immunol.—1983.—103.—P. 1—21.
- Humphries E., Danhof M., Hlozaneck I. Characterization of endogenous viral loci in five lines of white leghorn chickens // Virology.—1984.—135.—P. 125—138.
- Ziemięcki A., Kromer G., Mueller R., Hala K., Wick G. *ev22*, a new endogenous avian leukosis virus locus found in chickens

- with spontaneous autoimmune thyroiditis // Arch. Virol.—1988.—100.—P. 267—271.
19. Hayward W., Braverman S., Astrin S. Transcriptional products and DNA structure of endogenous avian proviruses // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1980.—44.—P. 1111—1121.
 20. Astrin S. Endogenous viral genes of the white leghorn chicken: common site of residence and sites associated with specific phenotypes of viral gene expression // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75.—P. 5941—5945.
 21. Robinson H., Eisenman R., Senior A., Ripley S. Low frequency production of recombinant subgroup E avian leukosis virus by uninfected V-15 chicken cells // Virology.—1979.—99.—P. 21—30.
 22. Crittenden L., Astrin S., Smith E. Independent segregation of *ev10* and *ev11*, genetic loci for spontaneous production of endogenous avian retroviruses // Virology.—1983.—129.—P. 514—516.
 23. Tereba A. Asymmetric chromosomal distribution of endogenous retrovirus loci in chickens and mice // Curr. Top. Microbiol.—1983.—107.—P. 29—50.
 24. Astrin S., Robinson H., Crittenden L., Buss E., Wyban J., Hayward W. Ten genetic loci in the chicken that contain structural genes for endogenous avian leukosis viruses // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1980.—44.—P. 1105—1109.
 25. Johnson J. A., Heneine W. Characterization of endogenous avian leukosis viruses in chicken embryonic fibroblast substrates used in production of measles and mumps vaccines // J. Virol.—2001.—75.—P. 3605—3612.
 26. Rynditch A., Kadi F., Geryk J., Zoubak S., Svoboda J., Bernardi G. The isopycnic, compartmentalized integration of Rous sarcoma virus sequences // Gene.—1991.—106.—P. 165—172.
 27. Soriano Ph., Meunier-Rotival M., Bernardi G. The distribution of interspersed repeats is nonuniform and conserved in the mouse and human genomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80.—P. 1816—1820.
 28. Zerial M., Salinas J., Filipski J., Bernardi G. Genomic localization of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line // Nucl. Acids Res.—1986.—14.—P. 8373—8386.

УДК 578.828

Надійшла до редакції 14.10.02