



УДК 577.218

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОЧНЫХ И РЕТРОВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ МЫШЕЙ

Л. М. Морозова, А. П. Соломко

Регуляция активности генов в сложноконтролируемых процессах развития и специализации сегодня становится одной из самых актуальных и важных проблем биологической науки. Введение вирусных и рекомбинантных ДНК в клетки разной степени дифференциации, а также в яйцеклетки эукариот с последующим анализом событий, происходящих на молекулярном уровне и сопровождающих развитие организма, является одним из эффективных подходов к решению этой проблемы. В настоящее время интенсивно исследуют структуру и регуляцию активности ряда генов, встроенных в геном мышей путем инъецирования их в проуклеус оплодотворенных яйцеклеток: анализируют рекомбинантные молекулы ДНК с встроенными генами глобина кролика и человека [1, 2], тимидинкиназы вируса герпеса [3, 4], гормона роста крысы и человека [5, 6], иммуноглобулина [7, 8], трансферина птиц [9], эластазы крыс [10] и др. Структурный ген в рекомбинантной молекуле присутствует либо с собственным промотором [7, 8], либо его заменяют на другой активный промотор, к которым относятся и *LTR* вирусов [3, 4, 11]. Особое внимание обращается на выяснение природы тканеспецифичности экспрессии введенных генов.

Известно, что многие вирусы эукариот тканеспецифичны, что делает их весьма интересным объектом как для целей генной инженерии с перспективой использования в качестве векторов, так и в качестве геномных зондов для изучения процесса дифференцировки. В частности, с этой целью используют эндогенные вирусы С-типа [11, 12]. Эти вирусы присутствуют в соматических и половых клетках многих видов эукариот, а их провирусная ДНК передается в ряду поколений как стабильный генетический элемент [13]. Интегрированная в геном эукариот провирусная ДНК обнаруживает сходство с транспозонами [14, 15] и, скорее всего, подвергается подобным механизмам регуляции внутри клетки, оказывая при этом влияние на экспрессию генов самой клетки [16—18].

В последнее время привлекает внимание серия работ, посвященная изучению взаимодействия вируса лейкоза мышей Молони (*Mo-MuLV*) с геномом клеток эмбрионов мышей, проводимая лабораторией Джениша. В результате инфицирования вирусом мышей на различных стадиях их онтогенеза (на стадии 4—16 бластомеров с последующей трансплантацией их самкам-реципиентам, *in utero* на 9—10-й день развития либо сразу после рождения мышат) были получены 13 сублиний мышей, которые в зависимости от места интеграции вирусного генома в геном клеток были обозначены *Mov1-13*. В экспериментах были использованы зародыши нескольких линий мышей. Сублинии *Mov1*, *Mov2-4*, *Mov5-9* получены в результате культивирования доимплантационных зародышей соответственно линий мышей *BALB*, *ICR* и *129* на монослое клеток *Cl-I-1a*, продуцирующих вирус [19—24]. Сублинии *Mov10-12* происходят от зародышей, инъецированных в бластоцель клеткой *Cl-I-1a*, линии мышей *129* [21, 22], а сублиния *Mov13* получена после инъецирования вируса Молони через стенку матки зародышам

мышей линии *C57Bl* и *129* на 8,5—9,5 дни развития [25]. Сублиния *Mov14* получена в результате инфицирования клонированной последовательности вируса Молоди из сублинии *Mov3* в оплодотворенные яйцеклетки мышей [26].

Как правило, введение тем или иным способом вируса во всех случаях приводило к образованию мозаиков, которые при скрещивании их с нормальными животными передавали вирусную последовательность с частотой, значительно меньшей 50 %. Только введение клонированного генома вируса в зиготы мышей позволило избежать мозаицизма уже в  $F_0$ . Последующее скрещивание гетерозиготных по *MuLV* мышей с нормальными особями позволило установить, что носительство экзогенного вирусного генома передается с частотой около 50 % их потомкам, т. е. провирусные последовательности наследовались как единая единица наследственности, подчиняющаяся законам Менделя [19].

Анализ первичной структуры интегрированной провирусной ДНК, проведенный с помощью нуклеаз рестрикции, позволил обнаружить перестройку, скорее всего делецию, на 3'-конце ДНК *MuLV* только у двух сублиний — *Mov4* и *Mov6* [22]. При этом выявилась существенная гетерогенность размеров *EcoRI*-фрагментов геномной ДНК, несущих вирусную последовательность у разных сублиний мышей (от 9000 до 30000 пар нуклеотидов для *Mov4* и *Mov11* соответственно). Размер генома *MuLV* составляет 9000 пар нуклеотидов [22, 27, 28]. Так как внутри генома вируса нет сайтов рестрикции для *EcoRI*, то полученные результаты свидетельствуют, скорее всего, в пользу того, что встройка провирусной ДНК произошла у разных сублиний в различные места генома мышей. Достаточно точно локализация провирусной ДНК установлена только у линии *Mov1*. С помощью генетического анализа показана встройка ДНК *MuLV* в шестой хромосоме на расстоянии 31 рекомбинационной единицы от маркера *wa-1* (*wa-ved*) [20].

Относительно ряда ретровирусов достаточно точно показано, что интеграция их геномов в геном клеток сайтнеспецифична, они с равной вероятностью могут включаться в уникальные и повторяющиеся последовательности генома хозяина [29]. То же самое было показано и для генома *MuLV*. Последовательности ДНК мышей, прилегающие в 5'-положении к геному вируса, были клонированы, а затем гибридизовались с *EcoRI*-фрагментами ДНК мышей линии *C57Bl*, *129*, *BALB*, *ICR* и сублиний *Mov1* и *Mov2*. В результате оказалось, что клонированные последовательности гибридизуются с рядом *EcoRI*-фрагментов ДНК мышей разных линий и сублиний, демонстрируя тем самым, что последовательности, аналогичные местам встройки вируса, встречаются в геноме мышей достаточно часто [30, 31].

Полученные сублинии мышей, несущие экзогенный провирусный геном, были проанализированы для выявления возможной активации провируса и образования зрелых вирусных частиц (время). Оказалось, что только 5 из 13 проанализированных сублиний мышей были временными (*Mov1-3*, *Mov9* и *Mov13*), причем у одной из сублиний, *Mov2*, провирус активировался только у 20 % животных и в достаточно позднем возрасте (2—4 месяца). Генетическая основа мышей, использованных для получения сублиний, не сказывалась существенным образом на предпочтительной активации вируса у какой-либо одной линии. Различия в локализации генома вируса у отдельных сублиний нашли подтверждение в том факте, что активация провируса у этих сублиний происходила в разные сроки их жизни.

Отсутствие времени у остальных сублиний можно было объяснить либо интеграцией вирусного генома в неактивные области генома мышей, либо появлением дефектов в провирусной ДНК или в последовательностях ДНК мышей, ограничивающих геном *MuLV*, тем более, что у двух сублиний (*Mov4* и *Mov6*) изменения провирусной ДНК были обнаружены на 3'-конце. Для проверки этого предположения проведен эксперимент, в котором были выделены *EcoRI*-фрагменты геномной

ДНК мышей, содержащие вставку провирусной экзогенной ДНК. Затем их клонировали и сопоставили с ДНК вируса. Рестрикционный анализ и гибридизация не позволили обнаружить изменений в структуре исследуемых фрагментов у трех вирусных и двух невирусных сублиний [21, 22]. Основываясь на этих результатах и наличии факта высокой частоты появления дефектных по репликации вирусов мышей [32, 33], авторы предположили, что в провирусном геноме невирусных сублиний мышей имеются мутации, которые вышеприведенными методами не могут быть обнаружены. На эту же мысль наводили и результаты по котрансфекции клонированными фрагментами геномной ДНК мышей сублиний *Mov7* и *Mov10*, содержащими провирусную ДНК. В результате котрансфекции образовался инфекционный вирус, в то время как в отдельности клонированные фрагменты не приводили к продукции вируса. При дополнительном анализе структуры клонированного фрагмента *Mov7* было установлено наличие дефекта, локализованного в гене «*pol*» [24, 34].

Сопоставление инфекционности клонированных фрагментов, содержащих провирусную ДНК, с ДНК тех же фрагментов, но выделенных из генома различных сублиний, показало, что инфекционность первых была значительно выше, чем геномной ДНК, например, инфекционность *pMov9* была в 100 раз выше, чем у *Mov9*. Сравнительный рестрикционный анализ клонированных и неклонированных фрагментов, содержащих *MuLV* из сублинии *Mov3*, не обнаружил иных различий в структуре, кроме степени метилирования. Было установлено, что геном провируса *MuLV* и фланкирующие последовательности мышинной ДНК в сублинии *Mov3* интенсивно метилированы, выделенная ДНК неинфекционна, в то время как клонированный геномный фрагмент, содержащий провирусную ДНК, высокоинфекционен и неметилирован [35, 36]. Эти результаты отражают наличие корреляции между активностью генов и степенью метилирования, которая показана для ряда вирусов [37—39] и генов эукариот [40—43]. Результаты, аналогичные вышеприведенным, получены Граудайном и др. [38], показавшими, что различающиеся по уровню транскрипционной активности провирусы *ev1* и *ev3* в клетках цыплят отличаются и по степени метилирования. В то время как ДНК *ev1* не чувствительна к обработке ДНКазой I и гиперметилирована, ДНК *ev3* метилирована слабо и чувствительна к обработке ДНКазой I. Экспонирование клеток с 5-азациитидином, который не метилируется, приводит к снижению уровня метилирования ДНК *ev1* и появлению транскрипционной активности. Таким образом, удаление метильных групп при клонировании или экспонировании клеток, несущих провирус с 5-азациитидином, приводит к активации генов и может служить пусковым механизмом в контроле генной экспрессии. Так, уже одноразовая инъекция 5-азациитидина мышам постнатального периода развития сублиний *Mov7* и *Mov10*, каждая из которых несла мутацию в кодирующем районе в неидентичных положениях, приводила к индукции транскрипции эндогенных дефектных провирусных геномов, которые до обработки были сильно метилированными и не экспрессировались [44].

Метилирование ДНК *de novo* в эмбриональных клетках отмечено не только в случае вирусной нуклеиновой кислоты, но и при микроинъекции в пронуклеус оплодотворенных мышинных яйцеклеток рекомбинантных ДНК [45, 46]. Однако при инфицировании вирусом *MuLV* постимплантационных эмбрионов отмечают довольно низкий уровень метилирования его ДНК. Рестрикционный анализ свидетельствует, что около 80 % молекул ДНК *MuLV*, инъектированного на этой стадии, остаются полностью неметилированными. Существенные различия в уровне метилирования вирусной ДНК были отмечены как в дифференцированных, так и в недифференцированных эмбриональных клетках [47].

Необходимо отметить, что процесс метилирования *de novo* характерен, в основном, для зародышевых клеток и ранних этапов эмбрио-

гене́за и, по-видимому, служит своего рода защитным механизмом от повреждающего действия чужеродной ДНК развивающихся зародышей и недифференцированных клеток. Суммируя, можно сказать, что процесс метилирования ДНК на разных этапах развития и функционирования организма несомненно является важной составной частью весьма сложного процесса регуляции экспрессии генов, что особенно четко видно на примере метилирования так называемых «усилителей», часто расположенных на достаточно большом расстоянии от структурных генов и влияющих на их активность при изменении конформации хроматина [48, 49].

С нашей точки зрения было бы очень интересно исследовать на примере интегрированной ДНК *MuLV* степень ее метилирования в динамике развития организма, поскольку процесс деметилирования и активации провирусного генома, его связь с этапами онтогенеза и специализацией клеток и тканей представляется существенно важным моментом для решения проблем дифференцировки и развития. Тем более, что накапливаются данные, показывающие независимость уровня транскрипционной активности некоторых генов от степени их метилирования [50, 51].

Не менее важно установить причины и выяснить механизмы амплификации вирусного генома, наблюдаемой в экспериментах. В ряде тканей сублинейных животных отмечается увеличение числа встроенных провирусных ДНК (соматическая амплификация) в дополнение к основным эндогенным копиям, полученным в результате инфицирования или инъектирования и передающихся вертикально половым путем. Амплификация возникает в результате реинтеграции провирусной ДНК в клеточный геном, в основном, в тканях-мишенях и отсутствует в других (мозг, печень). Интересно, что процесс амплификации происходит в два этапа: в прелейкемической стадии находят 1—2 копии провирусной ДНК на гаплоидный геном, а в лейкемической происходит увеличение до 3—4. Дальнейшее увеличение числа копий провирусной ДНК до 5—8 копий было обнаружено в более старых опухолях [20, 30, 52]. Однако уровень экспрессии вирусного генома коррелирует с числом копий только в прелейкемической и лейкемической фазах жизни животного [53]. Подобная амплификация провирусного генома отмечена и для вируса опухоли молочной железы мышей [54].

Проведение пассивной иммунизации мышей сублинии *Mou1* антисывороткой против *MuLV* предохраняло большинство животных от развития лейкемии, при этом показано, что амплификация провирусной ДНК отсутствует и не наблюдается вирусспецифической транскрипции [55]. Амплификация провирусной ДНК *MuLV* происходит также в случае инъектирования в пронуклеус мышинных зигот клонированных фрагментов ДНК *MuLV* из сублинии *Mou3* [56]. Было установлено, что единственным отличием реинтегрированных амплифицированных копий *MuLV* по сравнению с эндогенными провирусными копиями, передаваемыми половым путем, является их слабое метилирование [24, 35].

Исследование экспрессии вирусного генома на уровнях транскрипции (блотгибридизацией) и трансляции (обнаружение радиоиммунным методом белка *p30*, появление которого характерно для инфекции, вызванной *MuLV*) было проведено у вируспродуцирующих сублиний *Mou1*, *Mou2*, *Mou3*, *Mou9* и *Mou13*, контролем служили мыши линии *BALB*. В результате экспериментов установлено, что клетки селезенки всех исследованных сублиний мышей характеризуются наличием довольно высоких концентраций вирусспецифической РНК и белка *p30*, в других же органах уровень экспрессии вирусного генома существенно зависел от времени активации вируса в онтогенезе животного. Для сублиний мышей, у которых вирус активировался в постнатальном периоде (*Mou1* и *Mou2*), экспрессия вирусного генома в клетках печени, кишечника, сердца, легкого, почек, тестиса оказалась на уровне контроля, в то время как у сублиний мышей, характеризующихся активацией вируса в эмбриогенезе (*Mou3* и *Mou13*), уровень экспрессии вирусного генома

варьировал в разных органах, превышая контрольный уровень [22, 53]. Количество молекул вирусспецифических мРНК в клетках мозга, печени и тестиса было в 50—100 раз меньшим, чем в клетках селезенки, почек и лимфоузлов.

У всех вируспродуцирующих сублиний мышей отмечается экспрессия вирусного генома в клетках лимфоидной ткани, которая, по-видимому, представляет собой ткань — мишень для вируса *MuLV*. Была предпринята попытка выяснить, происходит ли активация вирусного генома именно на стадии дифференцировки лимфоидной ткани [57]. С этой целью сублетально облученным животным линии *BALB* вводили эмбриональные клетки гемо- и лимфопоэтического ряда, взятые на 15-й и 19-й дни развития зародышей сублинии *Mov1*, а также клетки селезенки и костного мозга взрослых животных, предварительно обработанные противовирусной антисывороткой. Последующее изучение популяции клеток селезенки и тимуса облученных животных показало наличие в них до 70 % клеток из сублинии *Mov1*, а рестрикционный анализ выявил в их геноме вирусспецифическую ДНК в составе фрагмента размером 27000 пар нуклеотидов, характерного для сублинии *Mov1*. Наблюдение, проведенное в течение дальнейших четырех месяцев, не позволило обнаружить синтез вирусспецифического белка *p30*, при этом не определялась и вирусспецифическая мРНК.

В параллельных экспериментах введение клеток селезенки взрослых мышей сублинии *Mov1* мышам линии *BALB* приводило к развитию виремии.

Вероятнее всего, что активация вируса происходит в какой-то специфической популяции клеток на определенной стадии дифференциации, так как простого клеточного деления явно недостаточно для активации провируса, поскольку за время наблюдения лимфоциты делились много раз. Таким образом, разный уровень экспрессии вирусного генома в различных тканях мышей сублиний *Mov3* и *Mov13*, скорее всего, является следствием соматической реинтеграции *MuLV*, а не экспрессии генома эндогенного вируса и определяется степенью инфильтрации органов лимфоцитами.

Степень выражения вирусного генома в различных тканях животных зависит от места встраивания, что достаточно хорошо демонстрируется экспериментами, проведенными с клонированным фрагментом клеточной ДНК из сублинии *Mov3*, содержащим провирусный ген. В результате микроинъектирования такого фрагмента *pMov3* в оплодотворенные яйцеклетки встраивание его происходит в участок генома, отличающийся от такового для сублинии *Mov3* [35, 56]. У мышей новой сублинии *Mov14*, полученной в результате микроинъектирования, также наблюдалась амплификация *MuLV* в лимфоидных тканях, в частности в селезенке. В то же время при отсутствии амплификации в клетках мышечной ткани количество обнаруживаемой вирусспецифической мРНК в сублинии *Mov14* оказалось в пять раз большим, чем в селезенке. Более высокая степень экспрессии *MuLV* в мышечной ткани, по-видимому, является следствием нового местоположения эндогенного вируса. Количество молекул вирусспецифической РНК распределялось в клетках различных органов следующим образом (по мере уменьшения): мышцы, селезенка, легкое, тестис [56].

Таким образом, весьма четко прослеживается тканеспецифическая регуляция экспрессии вирусного генома. Были предприняты попытки обнаружить специальные последовательности хозяйского генома, отвечающие за тканеспецифичность экспрессии, однако в большинстве случаев их не удалось найти, и только в опытах с анализом экспрессии кристаллинового гена кур в хрусталиках глаза мышей было установлено, что последовательности, локализованные выше 5'-концов чужеродного гена, являются ответственными за тканеспецифичность его экспрессии. Анализ делеционных карт показал, что эти последовательности расположены в области между 50—100 парами нуклеотидов перед первым экзоном [58, 59].

Анализировали и возможность изменения активности генов в результате структурных изменений хроматинового комплекса, характерного для каждой ткани, при встраивании чужеродной ДНК. Структурные изменения, приводящие к активации специфических районов хроматина, сопровождаются повышением чувствительности к нуклеолитическим энзимам. Оказалось, что встроенный и наследуемый половым путем геном провируса *MuLV* в сублиниях мышей *Mov1* и *Mov3* нечувствителен к ДНКазе I как в опухолевых, так и нормальных тканях в отличие от соматически реинтегрированных провирусных геномов, чувствительных к обработке ДНКазой I. При этом отмечено, что в чувствительной к ДНКазе I хроматиновой конформации, главным образом, располагался 5'-конец провирусной ДНК [60—62].

Аналогичные результаты были получены для транскрипционно активного локуса *ev3* в клетках цыплят, который имел районы, чувствительные к ДНКазе I в каждом из двух своих *LTR*, в то время как транскрипционно инактивированный локус не обнаруживал такой чувствительности. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что последовательности, находящиеся возле промоторного района в активно транскрибируемых генах, гиперчувствительны к ДНКазе I. Однако не стоит забывать, что и кодирующие последовательности активно транскрибируемых генов также находятся в более чувствительном к ДНКазе I структурном состоянии, чем нетранскрибируемые.

Исследование мышей сублинии *Mov13* в случае нахождения провируса в гомозиготном состоянии позволило обнаружить изменение структуры хроматина в клеточной ДНК недалеко от места встройки генома *MuLV*. Интеграция провируса у сублинии *Mov13* произошла в первый интрон  $\alpha 1$ -коллагенового гена и привела к появлению рецессивной летали у зародышей 12-го дня эмбрионального развития, вызывая инактивацию  $\alpha 1$ -коллагенового гена [63—66].

Анализ фрагментов клеточной ДНК, несущих  $\alpha 1$ -коллагеновый ген со вставкой генома *MuLV* в гомо- и гетерозиготном состоянии, а также тканей, продуцирующих и непродуцирующих коллаген, выявил два участка ДНК с повышенной чувствительностью к ДНКазе I и более существенный третий, расположенный на расстоянии 100—200 пар нуклеотидов от начала транскрипции  $\alpha 1$ -коллагенового гена. Третий участок выявлялся только в тех тканях, где обнаруживалась и мРНК  $\alpha 1$ -коллагена. Этот участок, связанный с транскрипцией коллагенового гена, отсутствовал в мутантном аллеле, в то время как чувствительность к ДНКазе I двух других не менялась при наличии вставки вирусного генома [66]. Было высказано предположение, что такие участки хроматина, обладающие повышенной чувствительностью к ДНКазе I, могут являться местами связывания РНК-полимеразы и тем самым играть важную роль в процессе транскрипции генов [67].

Отсутствие транскрипционной активности в тканях эмбрионов мышей сублинии *Mov13*, гомозиготных по *MuLV*, было продемонстрировано с помощью метода *Northern*-блот-гибридизации с использованием в качестве зонда ДНК локуса *Mov13*. При использовании в качестве зонда последовательностей первого экзона  $\alpha 1$ -коллагенового гена в реакции гибридизации с РНК эмбрионов дикого типа (*wt/wt*), гетерозигот (*Mov13/wt*) и гомозигот (*Mov13/Mov13*) было обнаружено отсутствие реакции гибридизации для гомозигот 12-го дня развития. У гетерозигот уровень межмолекулярной гибридизации РНК/ДНК составил только 50 % по отношению к дикому типу, указывая тем самым на зависимость уровня транскрипции  $\alpha 1$ -коллагенового гена от дозы гена. Результаты вышеприведенных экспериментов свидетельствуют также о том, что провирусная вставка не просто терминирует транскрипцию, а запрещает ее уже в первом экзоне [65].

Влияние интеграции чужеродной ДНК на жизнеспособность зародышей мышей отметили Вагнер и др. [68]. Инъецировав в оплодотворенные яйцеклетки мышей плазмиду, несущую ген гормона роста человека, авторы попытались получить гомозиготных по этому гену

животных. Однако в постнатальном периоде в двух сублиниях гомозигот не выявили, отметив при этом снижение количества мышат в пометах. Как выяснилось, обе сублинии явились носителями рецессивной пренатальной летали, обусловленной встройкой чужеродной ДНК.

Встройка чужеродной ДНК оказывает влияние не только на жизнеспособность животных, но может повлечь и изменение их фенотипа. Так, для мышей сублинии *Mov13* показано характерное изменение цвета волос между шестой и восьмой неделями постнатального развития, которое не наблюдается в этом возрасте у мышей линии *C57Bl*, на основе которой была получена сублиния *Mov13* [22, 25]. Изменение окраски мышей под влиянием вставки вирусных *LTR* было отмечено и для линии *DВА<sub>1/2</sub>* [69, 70].

Таким образом, наличие гено- и фенотипических изменений, обусловленных интеграцией провирусной ДНК в геном мышей и проявляющихся на различных этапах эмбриогенеза и постнатального развития, а также зависимость проявления экспрессии провирусов во времени от места их локализации делают *MuLV* интересным и удобным объектом для изучения механизмов генной регуляции и выражения функции генов в онтогенезе животных. Идентификация хромосом с вирусными последовательностями позволяет использовать вирус в качестве маркера хромосом мышей [26]. Исследование взаимодействия вируса *Mo-MuLV* с геномом развивающихся зародышей дало возможность использовать его для переноса генов в системе *in vivo* [71].

Однако еще много вопросов, связанных с интеграцией провирусной ДНК в геном мышей, остаются нерешенными: неясна причина и место первоначальной активации вируса, которые влекут за собой соматическую амплификацию и лейкоз. Это в свою очередь затрудняет дальнейшие исследования, связанные со спецификой экспрессии вводимых ретровирусов, их генов и сцепленных с ними чужеродных генов, ввиду возможной рекомбинации с родственными эндогенными вирусами. Представляется более интересным использование чужеродных вирусов (или их НК), микроинъектируя их в зиготы.

#### INTERACTION BETWEEN CELLULAR AND RETROVIRAL GENOMES IN ONTOGENESIS OF MICE

L. M. Morozova, A. P. Solomko

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

#### S u m m a r y

Certain data concerning retrovirus genome introduction into murine genome as well as retrovirus activation in different tissues depending on the virus localization in chromosome and ontogenesis period of mice are discussed.

1. *Microinjection* of a rabbit  $\beta$ -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.
2. *Stewart T. A., Wagner E. F., Mintz B. H.* Human  $\beta$ -globin gene sequences injected into mouse eggs retained in adults and transmitted to progeny // Science.— 1982.— 217, N 4564.— P. 1046—1048.
3. *Replication* and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts / W. F. Anderson, L. Killos, L. Sandes-Haigh et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1980.—77, N 9.— P. 5399—5403.
4. *Regulation* of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmid injected into mouse eggs / R. L. Brinster, H. Y. Chen, R. Warren et al. // Nature.— 1982.—296, N 5852.— P. 39—41.
5. *Introduction* of rat growth hormone gene into mouse fibroblasts, a retroviral DNA vector: expression and regulation / J. Doehmer, M. Barinaga, W. Vale et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1982.—79, N 8.— P. 2268—2272.
6. *Dramatic* growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes / R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. E. Hammer et al. // Nature.— 1982.—300, N 5893.— P. 611—615.

7. *Introduction of a  $\mu$ -immunoglobulin gene into mouse germ line: specific expression in lymphoid cells and synthesis of functional antibody* / R. Grosschedl, D. Weaver, D. Baltimore, F. Constantini // *Cell*.— 1984.—**38**, N 3.— P. 647—658.
8. *Expression of microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice* / R. L. Brinster, K. A. Ritchie, R. E. Hammer et al. // *Nature*.— 1983.—**306**, N 5941.— P. 332—336.
9. *Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice* / G. S. McKnight, R. E. Hammer, E. A. Kuenzel, R. L. Brinster // *Cell*.— 1983.—**34**, N 2.— P. 335—341.
10. *Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice* / G. H. Swift, R. E. Hammer, R. J. MacDonald, R. L. Brinster // *Ibid.*— 1984.—**38**, N 3.— P. 639—646.
11. *Микроинъекция в зиготы мышей рекомбинантных ДНК, содержащих ген тимидинкиназы вируса герпеса и последовательности ДНК ретровирусов* / К. Г. Газарян, Л. В. Генинг, Н. С. Незнанов и др. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*.— 1984.— № 10.— С. 22—28.
12. *Construction and isolation of transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and thymidine kinase gene of Herpes complex virus type I* / C. M. Wei, M. Gibson, P. G. Spear, E. M. Scholnick // *J. Virol.*— 1981.—**39**, N 3.— P. 935—944.
13. *Weis R. A. Retroviruses as host mendelian elements* // *Folia biol.*— 1983.—**29**, N 2.— P. 156—163.
14. *Structure of Moloney murine leukemia viral DNA: nucleotide sequence of the 5' long terminal repeat and adjacent cellular sequences* / C. V. Beveren, J. G. Goddard, A. Berns, I. M. Verma // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1980.—**77**, N 6.— P. 3307—3311.
15. *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.
16. *Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumors: viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state* / G. S. Payne, S. A. Courtneidge, L. B. Crittenden et al. // *Cell*.— 1981.—**23**, N 2.— P. 311—322.
17. *Structure of viral DNA and RNA in mammalian cell infected with avian sarcoma virus* / N. Quintrell, S. Hughes, H. E. Varmus, J. M. Bishop // *J. Mol. Biol.*— 1980.—**143**, N 4.— P. 363—393.
18. *Varmus H. E., Quintrell N., Ortiz S. Retroviruses as mutagens: insertion and excision of a nontransforming provirus alter expression of a resident transforming provirus* // *Cell*.— 1981.—**25**, N 1.— P. 23—26.
19. *Jaenisch R. Germ line integration and mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1976.—**73**, N 4.— P. 1260—1264.
20. *Germ line integration of Moloney leukemia virus: identification of the chromosomal integration site* / M. Breindl, J. Doehmer, K. Willecke et al. // *Ibid.*— 1979.—**76**, N 4.— P. 1938—1942.
21. *Jähner D., Jaenisch R. Integration Moloney leukemia virus into the germ line of mice: correlation between site of integration and virus activation* // *Nature*.— 1980.—**287**, N 5781.— P. 456—458.
22. *Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice* / R. Jaenisch, D. Jähner, P. Nobis et al. // *Cell*.— 1981.—**24**, N 3.— P. 519—529.
23. *Infectivity and structure of molecular clones obtained from two genetically transmitted Moloney leukemia proviral genomes* / K. Harbers, A. Schnieke, H. Stuhlmann, R. Jaenisch // *Nucl. Acids Res.*— 1982.—**10**, N 8.— P. 2521—2537.
24. *Cloning of two genetically transmitted Moloney leukemia proviral genomes: correlation between biological activity of the cloned DNA and viral genome activation in the animal* / I. Chumakov, H. Stuhlmann, K. Harbers, R. Jaenisch // *J. Virol.*— 1982.—**42**, N 3.— P. 1088—1098.
25. *Jaenisch R. Retroviruses and embryogenesis microinjection of Moloney leukemia virus into midgestation mouse embryos* // *Cell*.— 1980.—**19**, N 1.— P. 181—188.
26. *X-chromosome linked transmission and expression of retroviral genomes microinjected into mouse zygotes* / C. Stewart, S. Harbers, D. Jähner, R. Jaenisch // *Science*.— 1983.—**221**, N 4612.— P. 760—762.
27. *Verma I. M. Genome organization of RNA tumor viruses. I. In vitro synthesis of full genome-length single-stranded and double-stranded viral DNA transcripts* // *J. Virol.*— 1978.—**26**, N 3.— P. 615—629.
28. *In vitro synthesis of a 9 kbp terminally redundant DNA carrying the infectivity of Moloney leukemia virus* / E. Gilboa, S. Goff, A. Shields et al. // *Cell*.— 1979.—**16**, N 3.— P. 863—874.
29. *Characterization of endogenous and exogenous mouse mammary tumor virus proviral DNA with site-specific molecular clones* / B. Groner, E. Buetti, H. Diggelmann, N. E. Hynes // *J. Virol.*— 1980.—**36**, N 3.— P. 734—745.
30. *The integration site of endogenous and exogenous Moloney murine leukemia virus* / H. Van der Putten, E. Terwindt, A. Berns, R. Jaenisch // *Cell*.— 1979.—**18**, N 1.— P. 109—116.
31. *Bachelor L. H., Fan H. Multiple integration sites for Moloney murine leukemia virus in productively infected mouse fibroblasts* // *J. Virol.*— 1979.—**30**, N 3.— P. 657—667.



32. *A replication defective variant of Moloney murine leukemia virus* / A. Rein, B. I. Gerwin, R. H. Bassin et al. // *Ibid.*—1978.—25, N 1.—P. 146—156.
33. *High frequency of aberrant expression of Moloney leukemia virus in clonal isolates* / A. Schields, O. Witte, E. Rothenberg, D. Baltimore // *Cell.*—1978.—14, N 3.—P. 601—609.
34. *Endogenous Moloney leukemia virus in nonviremic Mov substrain of mice carries defects in proviral genome* / A. Schnieke, H. Stuhlmann, K. Harbers et al. // *J. Virol.*—1983.—45, N 2.—P. 505—513.
35. *DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infections after molecular cloning* / K. Harbers, A. Schnieke, H. Stuhlmann et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78, N 12.—P. 7609—7613.
36. *Stuhlmann H., Jähner D., Jaenisch R. Infectivity and methylation of retroviral genomes is correlated with expression in animal* // *Cell.*—1981.—26, N 2.—P. 222—232.
37. *DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and infected cells* / L. Vardimon, R. Neumann, I. Kuhlmann et al. // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 11.—P. 2461—2473.
38. *Groudine M., Eisenmann R., Weintraub H. Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation* // *Nature.*—1981.—292, N 5821.—P. 311—317.
39. *Cohen I. C. Methylation of milk-borne and genetically transmitted mouse mammary tumor virus proviral DNA* // *Cell.*—1980.—19, N 3.—P. 653—662.
40. *Doerfler W. DNA methylation — a regulatory signal in eukaryotic gene expression* // *J. Gen. Virol.*—1981.—57, N 1.—P. 1—20.
41. *Felsenfeld G., McChee J. Methylation and gene control* // *Nature.*—1982.—296, N 5858.—P. 602—603.
42. *Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation in vivo and in vitro* / A. Rasin, C. Webb, M. Szyf et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 8.—P. 2275—2279.
43. *Naven-Mary T., Ceder H. Active gene sequences are undermethylated* // *Ibid.*—1981.—78, N 8.—P. 4246—4250.
44. *Jaenisch R., Schnieke A., Harbers K. Treatment of mice with 5-azacytidine efficiently activates silent retroviral genomes in different tissues* // *Ibid.*—1985.—82, N 5.—P. 1451—1455.
45. *De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis* / D. Jähner, H. Stuhlmann, C. L. Stewart et al. // *Nature.*—1982.—298, N 5875.—P. 623—628.
46. *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 3.—P. 701—710.
47. *De novo methylation, expression and infectivity of retroviral genomes introduced into early mouse embryonic cells* / C. L. Stewart, D. Jähner, H. Stuhlmann, R. Jaenisch // *Hereditas.*—1983.—98, N 1.—P. 156.
48. *Rasin A., Szyf M. DNA methylation patterns. Formation and function* // *Biochim et biophys. acta.*—1984.—782, N 9.—P. 331—342.
49. *Mosche Y. Regulation of eukaryotic gene expression by transactivating proteins and cis acting DNA elements.* // *Biol. Cell.*—1984.—50, N 3.—P. 203—216.
50. *Unusual methylation pattern of  $\alpha$ -2(1) collagen gene* / C. McKoon, H. Ohkudo, I. Pastan, B. de Crombrughe // *Cell.*—1982.—20, N 1.—P. 203—210.
51. *Mather E. L., Perry R. P. Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 16.—P. 4689—4693.
52. *Jähner D., Stuhlmann H., Jaenisch R. Conformation of free and of integrated Moloney leukemia proviral DNA in preleukemic and leukemic BALB / Mo mice* // *Virology.*—1980.—101, N 1.—P. 111—123.
53. *Jaenisch R. Moloney leukemia virus gene expression and gene amplification in preleukemic and leukemic BALB / Mo mice* // *Ibid.*—1979.—93, N 1.—P. 80—90.
54. *Amplification and hormone-regulated expression of a mouse mammary tumor virus-Eco gpt fusion plasmid in mouse 3T6 cells* / A. B. Chapmann, M. A. Costello, F. Lee, G. M. Ringold // *Mol. and Cell. Biol.*—1983.—3, N 8.—P. 1421—1429.
55. *Nobis P., Jaenisch R. Passive immunotherapy prevents expression of endogenous Moloney virus and amplification of proviral DNA in BALB / Mo mice* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 6.—P. 3677—3681.
56. *Harbers K., Jähner D., Jaenisch R. Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal* // *Nature.*—1981.—293, N 5833.—P. 540—542.
57. *Differentiation and virus expression in BALB / Mo mice: endogenous Moloney leukemia virus is not activated in hematopoietic cell* / W. Fiedler, P. Nobis, D. Jähner, R. Jaenisch // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1982.—79, N 6.—P. 1874—1878.
58. *Hayashi S., Kondoh H., Okada T. S.  $\beta$ -crystallin gene expression: the requirement of upstream region* // *Develop. Growth and Differ.*—1984.—26, N 4.—P. 961.
59. *Tissue-specific expression of  $\beta$ -crystallin gene as demonstrated by the intranuclear injection of cloned genes* / T. S. Okada, H. Kondoh, S. Hayashi, K. Yasuda // *J. Embriol. and Exp. Morphol.*—1984.—82, Suppl.—P. 138.
60. *Chromatin conformation of integrated Moloney leukemia virus DNA sequences in tissues of BALB / Mo mice and in virus-infected cell lines* / M. Breindl, L. Bacheler, H. Fan, R. Jaenisch // *J. Virol.*—1980.—34, N 2.—P. 373—382.

61. *Moloney* murine leukemia virus-induced tumor: recombinant proviruses in active chromatin regions / H. Van der Putten, W. Quint, I. M. Verma, A. Berns // Nucl. Acids Res.—1982.—10, N 2.—P. 577—592.
62. *DNAse* I sensitivity of endogenous and exogenous proviral genome copies in *MuLV*-induced tumors of *Mov-3* mice / M. Breindl, U. Nath, D. Jähner, R. Jaenisch // Virology.—1982.—119, N 1.—P. 204—208.
63. *Schnieke A., Harbers K., Jaenisch R.* Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the  $\alpha$  1(1) collagen gene // Nature.—1983.—304, N 5924.—P. 315—320.
64. *Germ* line integration of Moloney murine leukemia virus at the *Mov13* locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death / R. Jaenisch, K. Harbers, A. Schnieke et al. // Cell.—1983.—32, N 1.—P. 209—215.
65. *Insertion* of retrovirus into first intron of  $\alpha$  1(1) collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice / K. Harbers, M. Kuehn, H. Delius, R. Jaenisch // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 5.—P. 1504—1508.
66. *Breindl M., Harber K., Jaenisch R.* Retrovirus-induced lethal mutation in collagen 1 gene of mice is associated with an altered chromatin structure // Cell.—1984.—38, N 1.—P. 9—16.
67. *Wasylyk B., Chambon P.* Potentiator effect of the *SV40* 72 bp repeat on initiation of transcription from heterologous promoter elements // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1982.—47.—P. 921—934.
68. *Prenatal* lethality in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line / E. F. Wagner, L. Covarrubias, T. A. Stewart, B. Mintz // Cell.—1983.—35, N 3.—P. 647—655.
69. *Copeland N. G., Hutchison K. W., Jenkins N. A.* Excision of the *DBA* ecotropic provirus in dilute coat-color revertants of mice occurs by homologous recombination involving the viral *LTR* // Ibid.—1983.—33, N 2.—P. 379—387.
70. *Copeland N. G., Jenkins N. A., Lee B. K.* Association of the lethal yellow (*A<sup>y</sup>*) coat color mutation with an ecotropic murine leukemia virus genome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 1.—P. 247—249.
71. *Introduction* of selectable gene into different animal tissue by retrovirus recombinant vector / H. Stuhlmann, R. Cone, R. C. Mulligan, R. Jaenisch // Ibid.—1984.—81, N 22.—P. 7151—7155.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 24.07.85

## К сведению читателей

**В июне 1986 г. выйдет из печати  
журнал всесоюзного химического общества  
им. Д. И. Менделеева, № 3,  
посвященный молекулярной природе рака.**

В последние годы произошло коренное изменение наших знаний о молекулярной природе рака, связанное с развитием новейших методов биологии и химии (генетическая и клеточная инженерия, онковирусология, расшифровка структур нуклеиновых кислот и белков, методы введения генетического материала в клетки и т. д.).

В обзорных статьях ведущих советских и иностранных ученых в номере представлено современное состояние таких ключевых вопросов физико-химической биологии и медицины, как роль онкогенов, протоонкогенов, онкобелков, РНК- и ДНК-содержащих опухолеродных вирусов, полипептидных факторов роста в дифференцировке, делении, росте и трансформации клеток. Обсуждаются проблемы химического канцерогенеза, разработки новых подходов к химиотерапии опухолей, рассмотрены вопросы диагностики и лечения опухолей иммунологическими методами, включая получение и применение моноклональных антител.

Журнал в продажу не поступает и распространяется только по подписке. По письму, подписанному руководителем и бухгалтером, редакция может выслать счет для предварительной оплаты нужного Вам количества экземпляров. Цена номера — 2 руб. плюс стоимость почтовых расходов — 45 коп. Просим прислать такое письмо не позднее 15 марта 1986 г.

Индивидуальная подписка принимается всеми отделениями связи без ограничения на указанный номер до 1 апреля 1986 г. Индекс издания 70285. Можно подписаться также и в редакции по адресу: 101000, Москва, Кривоколенный пер., 12.