



УДК 577.21+577.152.5

С. В. Стороженко, Е. Н. Шиша, Ю. Ю. Глеба

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* ГЕНОМ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II ТИПА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

На основе бинарного вектора *pBin19* создана плаزمида *pBin19/t2103*, содержащая структурный ген ДНК-топоизомеразы II типа *D. melanogaster* под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты. Конструкция перенесена в растения табака *N. tabacum* SR-1 с помощью опосредованной аэробактериями трансформации по методу листовых дисков. Селектирован ряд устойчивых к канамицину линий. С помощью методов Саузерн- и Нозерн-блотинг-гибридизаций показана интеграция гена в состав геномной ДНК и его экспрессия на уровне транскрипции. В геноме табака обнаружена последовательность, гибридирующаяся с фрагментом гена ДНК-топоизомеразы II дрозофилы. Эта последовательность, возможно, является геном растительной ДНК-топоизомеразы II типа.

Введение. ДНК-топоизомеразы — особая группа ферментов, которые посредством введения обратимых двухцепочечных (топоизомеразы II типа) или одноцепочечных (топоизомеразы I типа) разрывов способны индуцировать в молекулах ДНК топологические переходы, такие как суперспирализация — релаксация, катенирование — декатенирование, заузливание — разузливание. Как правило, подобные переходы являются следствием разрешения топологических проблем, возникающих при всех естественных процессах клеточного метаболизма ДНК, требующих расплетения цепей. Следовательно, ДНК-топоизомеразы участвуют в процессах репликации, транскрипции, транспозиции, рекомбинации и некоторых других [1]. Кроме того, ДНК-топоизомеразы сами способны индуцировать «незаконную» рекомбинацию *in vitro* и *in vivo* [2]. С другой стороны, они повышают стабильность генома, релаксируя отрицательные супервитки [3].

Несмотря на то, что каталитические свойства ДНК-топоизомераз достаточно хорошо изучены *in vitro* [4], роль их *in vivo* остается, в основном, предметом различного рода спекуляций и умозаключений. Это касается, в частности, участия ДНК-топоизомераз в регуляции экспрессии генов. Так как степень суперспирализации влияет на уровень транскрипции многих генов [1], то топоизомеразы, вероятно, способны модулировать экспрессию генов, изменяя степень суперспирализации ДНК. При этом экспрессия генов самих топоизомераз должна быть строго контролируемой.

Растения являются уникальными организмами, поскольку сочетают в своей клетке три генетические системы: ядра, хлоропластов и митохондрий. Наличие таких относительно независимых систем предполагает существование трех соответствующих пулов ДНК-топоизомераз. Часть из них довольно хорошо охарактеризована [5—8]. О генах растительных топоизомераз информация пока отсутствует. Известно, однако, что активность топоизомеразы II типа возрастает в быстрорастущих недифференцированных тканях и существенно снижается в тканях дифференцированных [9]. Это позволяет предположить, что экспрессия генов топоизомераз является регулируемой.

© С. В. Стороженко, Е. И. Шиша, Ю. Ю. Глеба, 1993

Учитывая все возрастающий интерес к вопросам участия ДНК-топоизомераз в регуляции экспрессии генов, а также к получению и изучению трансгенных растений, экспрессирующих ДНК-модифицирующие белки, мы решили создать растения с экспрессией чужеродной ДНК-топоизомеразы II типа. Исследование последствий такой конститутивной экспрессии на фоне регулируемой экспрессии генов собственных топоизомераз, возможно, прольет свет на некоторые аспекты функционирования этих ферментов *in vivo*, их участия в процессах регуляции экспрессии генов, «незаконной» рекомбинации.

Материалы и методы. Плазмиды и бактериальные штаммы. Плаزمида *pGfc-1* [10], содержащая кДНК топоизомеразы II типа дрожжи, любезно предоставлена д-ром Т. Хснехом (Мед. центр Ун-та штата Северная Каролина, США). Для постановки гена под контроль 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты использовали кассету экспрессии *pRT103* [11].

Во всех процедурах по клонированию применяли штамм *Escherichia coli* JM101.

В качестве векторной системы для трансформации растений табака *N. tabacum* SR-1 был избран бинарный вектор *pBin19* и штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (*pMP90*) [12].

Выделение плазмидной ДНК и процедуры клонирования. Плазмидную ДНК выделяли по методу щелочного лизиса [13]. Во всех процедурах клонирования использовали эндонуклеазы рестрикции и Т4-ДНК-лигазу фирмы «Ферментас» (Литва). Реакции расщепления ДНК рестриктазами и лигирования проводили, как описано в [13], с учетом рекомендаций фирмы-изготовителя ферментов.

Фрагменты ДНК после фракционирования в 0,8 %-м агарозном геле выделяли с помощью электроэлюции [13].

Трансформацию *E. coli* осуществляли по методу, предложенному Симанисом [14].

Трансформация растений табака. Конструкцию в векторе *pBin19* мобилизовали в агробактерии посредством триродительского скрещивания [14]. В качестве штамма-помощника был избран штамм *E. coli* HB101, несущий плазмиду *pRK2013*.

Трансформацию растений проводили по методу листовых дисков [15]. Растения табака выращивали в стерильных условиях на среде МС [16]. Листья двухмесячных растений инкубировали 15 мин в ночной культуре агробактерий и помещали на чашки с регенерационной средой (минеральная основа среды МС с добавлением 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК) на двое суток. Затем листовые диски отмывали в течение 5 мин в жидкой МС с добавлением цефотаксима до концентрации 500 мг/л, слегка подсушивали с помощью фильтровальной бумаги и помещали на селективную регенерационную среду того же состава с добавлением 500 мг/л цефотаксима и 100 мг/л канамицина до появления побегов. Регенеранты переносили на среду МС с 500 мг/л цефотаксима и 100 мг/л канамицина для укоренения. Укоренившиеся растения пересаживали в почву и использовали для дальнейшего анализа.

Выделение нуклеиновых кислот. Суммарную ДНК из растений выделяли с помощью СТАВ [17]; суммарную растительную РНК — по методу, предложенному Кирком и соавт. [18].

Саузерн- и Нозерн-блоттинг-гибридизации. Для гибридизации применяли нейлоновые фильтры Сартолон («Sartorius», ФРГ).

Гель, полученный после электрофореза рестрицированной ДНК, обрабатывали 0,25 М HCl в течение 15 мин и 0,5 М NaOH в течение 30 мин (материал переносили в 25 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,2, в течение ночи).

Электрофорез РНК проводили в 1 %-й агарозе с добавлением формальдегида до концентрации 1,1 М в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 6,5. Перенос осуществляли в 10×SSC буфере.

Как Саузерн-, так и Нозерн-гибридизации вели в 0,5 М Na-фосфатном буфере, pH 7,2, 7 % DS-Na, 1 mM ЭДТА в течение ночи. Фильтры отмывали 4 раза по 1 ч в буфере, содержащем 40 mM Na-фосфат, pH 7,2, 1 % DS-Na, 1 mM ЭДТА при 65 °С [19].

В качестве зонда использовали фрагменты ДНК, меченные ^{32}P по методу рассеянной затравки [20] до удельной активности 10^9 нмп \times \times мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ с помощью набора Random Primed DNA Labelling Kit («Boehringer Mannheim», ФРГ).

Результаты и обсуждение. Схема создания конструкции для экспрессии структурного гена ДНК-топоизомеразы II типа в клетках растений представлена на рис. 1. Структурный ген *top2* вырезали из плазмиды *pGFc-1* по

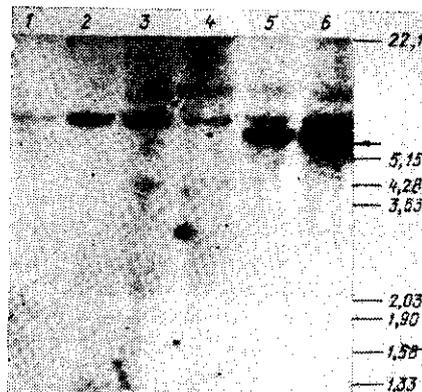
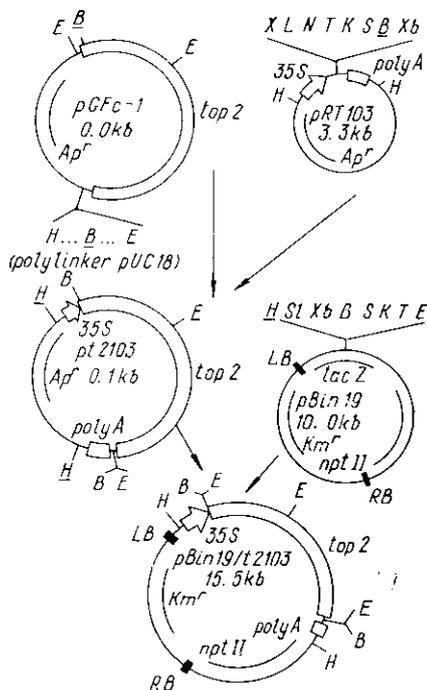


Рис. 1. Схема получения рекомбинантной плазмиды *pBin19/t2103*. Подчеркнуты сайты, по которым проводили клонирование: B — *Bam*HI, E — *Eco*RI, H — *Hind*III, L — *Bal*I, N — *Nco*I, K — *Kpn*I, S — *Sma*I, SI — *Sal*I, T — *Sst*I, X — *Xho*I, Xb — *Xb*I

Рис. 2. Блотинг-гибридизация по Саузерну расщепленной *Hind*III суммарной ДНК трансформированных линий табака: 1 — ДНК нетрансформированного растения; 2 — 6 — ДНК линий 2, 15, 21, 19, 23 соответственно. Стрелкой обозначен фрагмент (5,5 тыс. п. н.), содержащий перенесенный ген с регуляторными элементами

сайту *Bam*HI. При таком варианте ген содержит полную 3'-нетранслируемую область и имеет делецию 28 аминокислотных остатков на 5'-конце. Каким образом эта делеция влияет на активность фермента, пока неясно. Проводятся эксперименты по экспрессии данного фрагмента гена в *E. coli* с целью выяснения его каталитических свойств. Следует также заметить, что при выделении топоизомеразы II из эмбрионов дрозофилы обнаруживается ряд протеолитических фрагментов, обладающих ферментативной активностью [21].

Далее, *Bam*HI-фрагмент гена клонировали в *Bam*HI-сайте кассеты экспрессии *pRT103*, при этом рамка считывания собственного стартового кодона кассеты, находящегося в составе *Nco*I-сайта, и рамка считывания гена совпадают. Полученная таким образом плаزمида *pt2103* содержит неполный ген ДНК-топоизомеразы II дрозофилы под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты и фланкирована на 3'-конце сигналом полиаденилирования того же вируса. Так как кассета экспрессии содержит вместе с собственным АТГ-кодоном консенсусную последовательность сайта связывания малой субчастицы эукариотической рибосомы, то можно ожидать эффективной трансляции гена.

Для введения кассеты экспрессии в растение использовали бинарный вектор *pBin19*, в составе которого по сайту *Hind*III клонировали

ген с регуляторными элементами, вырезанный из плазмиды *pt2103* по тому же сайту.

Выделенная плазида *pBin19/i2103* была мобилизована в штамм агробактерий с помощью триродительского скрещивания. Из клонов, устойчивых к канамицину и рифампицину, выделяли плазмиду и проверяли ее с помощью рестрикционного анализа (данные не представлены).

Полученным штаммом агробактерий инфицировали листовые диски табака. Селектированы 39 клонов, устойчивых к канамицину в концентрации 100—200 мкг/мл. Из клонов регенерировали нормальные растения с несколько замедленным ростом по сравнению с нетрансформированными контрольными растениями. Выводы о нормальном или аномальном фенотипе пока делать рано, так как для этого растения должны пройти все стадии жизненного цикла в почве. Изучению фенотипа трансформированных растений можно посвятить отдельное исследование.

Из селектированных растительных клонов произвольным образом отобрали пять для проверки их трансгенности с помощью блотинг-гибридизации по Саузерну. Суммарную растительную ДНК расщепляли эндонуклеазой рестрикции *HindIII*, фракционировали электрофорезом в агарозном геле, переносили на нейлоновые фильтры и гибридизовали с меченым *BamHI*-фрагментом плазмиды *pGFC-1* (5,5 тыс. п. н.), содержащим структурный ген топоизомеразы. Результаты представлены на рис. 2. Интересно отметить, что во всех пяти клонах присутствует гибридизационный сигнал, соответствующий фрагменту размером примерно 6 тыс. п. н., это касается и контрольного нетрансформированного растения. Мы полагаем, что данный сигнал — это результат гибридизации зонда с собственным геном растительной ДНК-топоизомеразы II типа, так как известно, что все клонированные гены топоизомераз II типа отличаются значительной степенью гомологии [22]. Информации о растительных генах ДНК-топоизомераз пока отсутствует. Два клон (19-й и 23-й), однако, содержат дополнительную полосу гибридизации, отвечающую фрагменту необходимой длины — 5,5 тыс. п. н. Чтобы убедиться, что данная полоса действительно соответствует искомому фрагменту, растительную ДНК расщепляли рестриктазой *EcoRI* и подвергали гибридизации в аналогичных условиях (рис. 3). На дорожках, соответствующих 23-му и 19-му клонам, видны фрагменты размерами 3,2 и 2,1 тыс. п. н., которые возникли вследствие расщепления введенного гена рестриктазой *EcoRI*. В других клонах и контроле данные сигналы отсутствуют. Это свидетельствует о том, что остальные клоны не являются трансгенными. И в этом случае на всех дорожках видны сигналы, отвечающие собственной растительной последовательности, гибридизующейся с зондом.

Для изучения экспрессии на уровне транскрипции из 19-го и 23-го клонов выделяли суммарную РНК. Затем РНК разделяли электрофорезом в агарозе в денатурирующих условиях, переносили на фильтры и гибридизовали с тем же зондом, что и в случае блотинг-гибридизации по Саузерну. Результаты Поуэри-блотинга показаны на рис. 4. Гибридизационные сигналы на дорожках, соответствующих 19-му и 23-му клонам, по величине отвечают ожидаемому размеру мРНК — 4,7 тыс. п. н. РНК нетрансформированного растения с зондом не гибридизуется. В связи с этим уместно рассмотреть вышеупомянутый факт, касающийся генной последовательности, гибридизующейся с зондом. Если предположить, что данная последовательность является собственным геном ДНК-топоизомеразы II типа, то в итоге его экспрессии должна образовываться соответствующая мРНК. Эта РНК будет гибридизоваться с зондом с большей интенсивностью, чем ДНК, вследствие большей стабильности РНК-ДНК гибридов. В нашем случае такой гибридизации не наблюдалось, что может быть результатом либо очень низкого уровня экспрессии, либо вообще отсутствия таковой. Известно, что активность растительной топоизомеразы II возрастает при-

мерно в 2,5 раза в недифференцированных активно пролиферирующих тканях и существенно снижается в тканях дифференцированных [9]. В качестве одного из гипотетических механизмов регуляции активности топоизомеразы II типа ранее обсуждалось фосфорилирование фермента протеинкиназой С у губки *Geodia* [23]. Вторым механизмом, объясняющим колебания активности топоизомеразы, может быть регулируемая экспрессия гена, кодирующего фермент, причем наличие последнего механизма отнюдь не отрицает существования предыдущего. В нашем случае РНК выделяли из листьев, и можно допустить, что

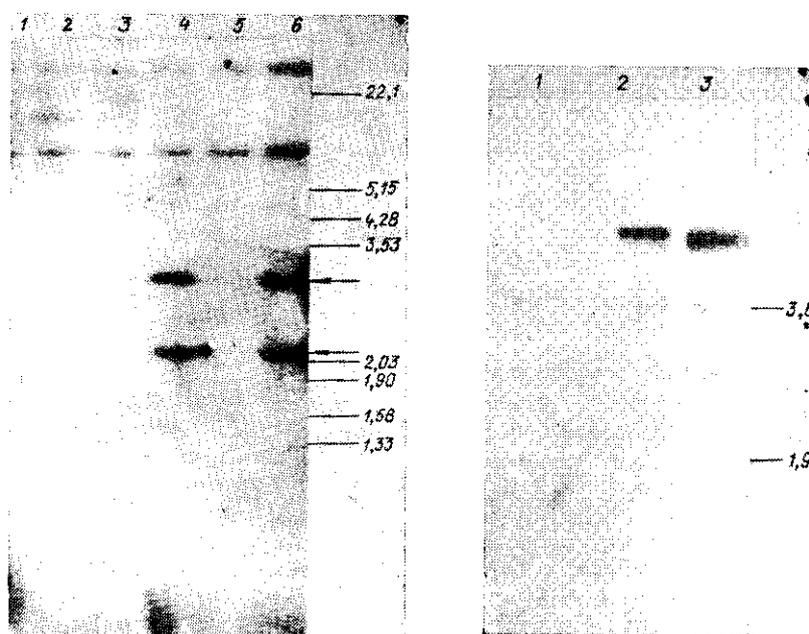


Рис. 3. Саузерн-блоттинг-гибридизация *EcoRI*-перевара суммарной ДНК трансформированных линий табака: 1 — ДНК нетрансформированного растения; 2—6 — линии 2, 15, 19, 21, 23 соответственно. Стрелками обозначены фрагменты введенного гена размером 3,2 и 2,1 тыс. п. н.

Рис. 4. Нозерн-блоттинг-гибридизация суммарной РНК трансгенных линий табака: 1 — РНК нетрансформированного растения; 2, 3 — РНК линий 19, 23 соответственно

ген экспрессируется на очень низком уровне, хотя столь незначительная экспрессия представляется маловероятной. В любом случае, данный факт кажется любопытным и, на наш взгляд, требует более детального изучения.

В настоящее время исследуются экспрессия на уровне трансляции, определение биологической активности продукта экспрессии введенного гена, а также фенотипические эффекты экспрессии. Результаты этих исследований будут опубликованы несколько позже.

Авторы полагают, что полученные трансгенные растения являются интересным материалом для исследования свойств ДНК-топоизомеразы II типа в гетерологичном для нее окружении, ее участия в процессах регуляции экспрессии генов и клеточного метаболизма ДНК в целом.

Summary. A plasmid *pBin19/t2103* based on a binary vector *pBin19* has been constructed. The plasmid carries the structural gene coding for DNA topoisomerase II type from *D. melanogaster* under control of 35S promoter from cauliflower mosaic virus. The construction was introduced into tobacco plants *N. tabacum* SR-1 using *A. tumefaciens*-mediated transformation. An integration of the gene in plant genome and its expression on transcriptional level have been shown. A sequence from tobacco genome was found to hybridized with the fragment of the topoisomerase II structural gene. It seems to be plant DNA topoisomerase II type gene.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vosberg H. P. DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*— 1985.— 114, N 1.— P. 19—102.
2. Ikeda H. DNA topoisomerase-mediated illegitimate recombination // *DNA topology and its biological effects.*— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1990.— P. 341—359.
3. Wang J. C., Caron P. R., Kim R. A. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? // *Cell.*— 1990.— 62, N 3.— P. 403—406.
4. Ocheroff N. Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA // *Pharm. Ther.*— 1989.— 41, N 2.— P. 223—241.
5. Fukata H., Fukasawa H. Isolation and partial characterization of two distinct DNA topoisomerases from Cauliflower inflorescence // *J. Biochem.*— 1982.— 91, N 2.— P. 1337—1342.
6. Руденко Г. Н. Выделение и характеристика двух различных ДНК-топоизомераз I типа из листьев *Pisum sativum* // *Молекуляр. биология.*— 1991.— 25, № 5.— С. 1316.
7. Руденко Г. Н. Растительная ДНК-топоизомераза II типа: выделение, характеристика и свойства // Там же.— № 4.— С. 1125—1135.
8. Сугайло Л. А. Хлоропластная ДНК-топоизомераза I типа из листьев гороха // *Биополимеры и клетка.*— 1991.— 7, № 4.— С. 97—103.
9. Carballo M., Gine R., Santos M., Puigdomenech K. Characterization of topoisomerases I and II activities in nuclear extracts during callogenesis in immature embryos in *Zea mays* // *Plant Mol. Biol.*— 1991.— 16, N 1.— P. 59—70.
10. Nolan J. M., Lee M. P., Wyckoff E., Hsieh T. Isolation and characterization of the gene encoding *Drosophila* DNA topoisomerase II // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 11.— P. 3664—3668.
11. Töpfer R., Matzeit V., Gronenborn B. et al. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions // *Nucl. Acids Res.*— 1987.— 15, N 14.— P. 5890.
12. Koncz C., Schell J. The promoter of T1-DNA gene 5 controls the tissues-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector // *Mol. and Gen. Genet.*— 1986.— 204, N 3.— P. 383—396.
13. Маннштис Т., Фрич Е. Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 521 с.
14. Гловер Д. Клонирование ДНК.— М.: Мир, 1988.— 538 с.
15. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N. L. et al. A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.*— 1985.— 227, N 4691.— P. 1229—1231.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*— 1962.— 15, N 4.— P. 473—497.
17. Murray M. J., Thompson W. E. Rapid isolation of high molecular weight DNA // *Nucl. Acids Res.*— 1980.— 8, N 19.— P. 4321—4325.
18. Kirk M. M., Kirk L. D. Translation regulation of protein synthesis, in response to light at a critical stage of *Volvox* development // *Cell.*— 1985.— 41, N 2.— P. 419—428.
19. Church G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1984.— 81, N 7.— P. 1991—1995.
20. Feinberg A. P., Volgenstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*— 1984.— 137, N 5.— P. 266—267.
21. Hsieh T. Purification and properties of type II DNA topoisomerase from embryos of *D. melanogaster* // *Meth. Enzymol.*— 1983.— 100.— P. 161—170.
22. Wang J. C. Recent studies of DNA topoisomerases // *Biochim. et biophys. acta.*— 1987.— 909, N 1.— P. 1—9.
23. Rottman M., Schroder H. C., Gramasov M. et al. Specific phosphorylation of proteins in pore complex laminal aggregation factor and phorbol ester // *EMBO J.*— 1987.— 6, N 13.— P. 3939—3944.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев

Получено 21.07.92

УДК 577.391

В. И. Древаль

ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ТИМОЦИТОВ

Крыс облучали в дозах 1,5; 4,0; 7,0 и 10,0 Гр. Спустя 1, 8, 15, 22 и 30 сут в тимоцитах определяли связывание 1-анилинонафталин-8-сульфоната, вязкость липидов и константу Штерна—Фольмера для белков плазматических мембран. Установлено, что для процесса пострadiaционных изменений характерна фазовая периодичность структурных перестроек плазматических мембран.

Введение. В настоящее время успешно развиваются исследования, направленные на расшифровку механизма интерфазной гибели клеток, лежащей в основе клеточного опустошения кроветворной системы при

© В. И. Древаль, 1993

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1993. Т. 9. № 1

31