

УДК 577.2.575

БИОХИМИЯ

Р. А. Захарян, С. Г. Багразян

Перенос „Р“-элемента в зародышевые клетки *Drosophila hydei* и клетки костного мозга мышей

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 30/X 1986)

Перенос гена в клетки высших эукариот путем введения чужеродной генетической информации сопровождается интеграцией вводимого гена в геном, его экспрессией, стабильно наследуемым и сохраняемым изменением в фенотипе реципиентных клеток (¹⁻⁴).

Определенный интерес представляет использование в качестве вектора транспозонподобных генов эукариот с целью повышения частоты трансформации и интеграции вводимого гена в специфические места генома (⁵⁻¹⁰). Спредлинг и Рубин показали высокую частоту транспозиции из плазмиды в геном при соответствующих генетических критериях клонированного Р-элемента в зародышевых клетках *Drosophila melanogaster* (^{7,10}).

В данном исследовании изучена возможность транспозиции из состава рекомбинантной плазмиды и функционирования Р-элемента в зародышевых клетках *Drosophila hydei*, родственной к *Drosophila melanogaster*, и в клетках костного мозга мыши.

Для микроинъекций и транспорта ДНК в зародышевые клетки *Dr. hydei* и в клетки костного мозга мыши были использованы рекомбинантные ДНК, любезно предоставленные Спредлингом и Рубиным: а) рекомбинантная ДНК рП 25.1, содержащая интактный ген Р-элемента в 3,0 т. п. о. (⁷⁻¹⁰); б) рекомбинантная ДНК Carnegie-20, содержащая ген ксантиндегидрогеназы (gu^+) в составе фрагмента в 7,2 т. п. о., вставленного в полилинкерный участок по Hind III сайту вектора Carnegie-2, полученного на основе делеционного мутанта Р-фактора в 1,2 т. п. о., встроенного в вектор рUC (¹¹), с полилинкерами, разобщающими Р-фактор.

Клетки костного мозга получали от мышей линии СЗН, предварительно обработанных винбластином в дозе 3 мг/кг; суспензия 10^8 клеток в 10 мл среды инкубировалась с 1,0 мл Са-преципитата ДНК, содержащей смесь 150 мкг ДНК рП 25.1 и 20 мкг ДНК рекомбинантной плазмиды с геном дигидрофолатредуктазы—PHG (¹), и вводилась внутривенно СЗН мышам, которых за 24 ч до инокуляции клеток облучали в дозе 800 рад. Через 72 ч после инокуляции трансформированных клеток мышам вводили метотрексат в дозе 0,5 мг/кг веса три раза в неделю.

После инокуляции клеток мышей забивали; колонии, сформировавшиеся на селезенке, были использованы для получения ДНК.

В контрольных и опытных экспериментах после рестрикционного анализа геномной ДНК в 1%-ном агарозном геле проведена гибридизация по Саузерну: все гибридизационные пробы были мечены [³²P] методом „*nich translation*“ (12).

С целью выяснения наличия Р-элемента в геноме *Dr. hydei* геномная ДНК *Dr. hydei*, *mosso*, *melanogaster* (дикий тип) и *M-cytotype* была рестрицирована рестриктазой *Eco RI*, фракционирована в 1%-ном агарозном геле и исследована гибридизационным анализом по Саузерну с пробами гена Р-элемента и „*gusy*“, в качестве маркера во всех случаях использованы молекулярные веса фрагментов ДНК фага λ, рестрицированной *Hind III*.

На рис. 1 показаны гибридизация „*gusy*“ гена с *Eco RI* рестриктами ДНК генома *Dr. melanogaster* (1-я полоса), *Dr. hydei white*, женская особь (2-я полоса); мужская особь (3-я полоса). Нижний сигнал гибридизации в полосах соответствует *Eco RI* фрагменту „*gusy*“ гена в 4,7 т. п. о.; *Hind III* фрагмент ДНК с участком из локуса „*white*“ от *Carnegie-1* гибридизуется с *Eco RI* рестриктами ДНК *Dr. melanogaster* (5-я полоса) в районе 16 т. п. о.; ДНК *Dr. mosso*, *hydei white* (соответственно 4, 6, 7-я полосы) не содержат данную последовательность фрагмента из локуса „*white*“ *Dr. melanogaster*. Ген Р-элемента не гибридизуется с *Eco RI* рестриктами ДНК генома *Dr. hydei white* и *mosso*, *Dr. melanogaster M-Cytotype* (8, 10, 11-я полосы). Ген Р-элемента обнаруживается в ДНК *Dr. melanogaster* (9-я полоса), в районе 16 т. п. о.

На рис. 2 представлены результаты рестрикционного и гибридизационного анализа по *Eco RI* геномной ДНК из личинок *Dr. hydei white*, в эмбрионы которых были инъецированы Р-фактор и ген „*gusy*“: полоса 1 — ДНК *Dr. hydei white*; 2 — ДНК *Dr. hydei white*, инъецированные буфером; 3 — ДНК *Dr. hydei* (дикий), инъецированные РП 25.1; 4 — то же, что и 3 в присутствии 5 азацитидина; 5 — *Dr. hydei white*, инъецированные РП 25.1 и *Carnegie-20*; 6 — ДНК *Dr. mel M-cytotype*, инъецированные РП 25.1.

1—4, 6-я полосы гибридизованы с *Hind III* [³²P]-фрагментом гена Р-элемента из *Carnegie-2*: 5-я полоса гибридизована с фрагментом *Hind III* гена Р-элемента и геном-фрагментом в 7,2 т. п. о., „*gusy*“ из *Carnegie-20*. В полосах 1, 2 не выявлены последовательности, гомологичные к Р-элементу. Выявленные фрагменты (полосы 3 и 4) имеют молекулярный вес около 6,7 т. п. о. и соответствуют фрагменту инъецированной плазмиды РП 25.1 (после выщепления из состава ДНК рП 25.1 *Eco RI* фрагмента с мол. весом 2 т. п. о.). Выявленные сигналы гибридизации в полосе 5: нижний — мол. вес около 4,7 т. п. о. соответствует *Eco RI* „*gusy*“ фрагменту геномной ДНК и *Eco RI* фрагменту от инъецированной плазмиды *Carnegie-20*; гибридизация на уровне 6,7 т. п. о. соответствует фрагменту в 6,7 т. п. о. из рП 25.1; гибридизующиеся фрагменты с относительно высоким мол. весом совпадают с аналогичными рестриктами ДНК *Dr. hydei white* полос 2 и 3 на рис. 1.

Выявленные фрагменты — ДНК личинок *Dr. melanogaster M-Cytotype* (полоса 6) имеют наряду с мол. весом в 6,7 т. п. о. более

Высокие мол. веса, свидетельствующие о транспозиции последовательностей гена Р-элемента и интеграции в геномную ДНК *Dg. melanogaster* M-Cytotype.

Полученный результат свидетельствует, что геном *Dg. hydei* «white»,

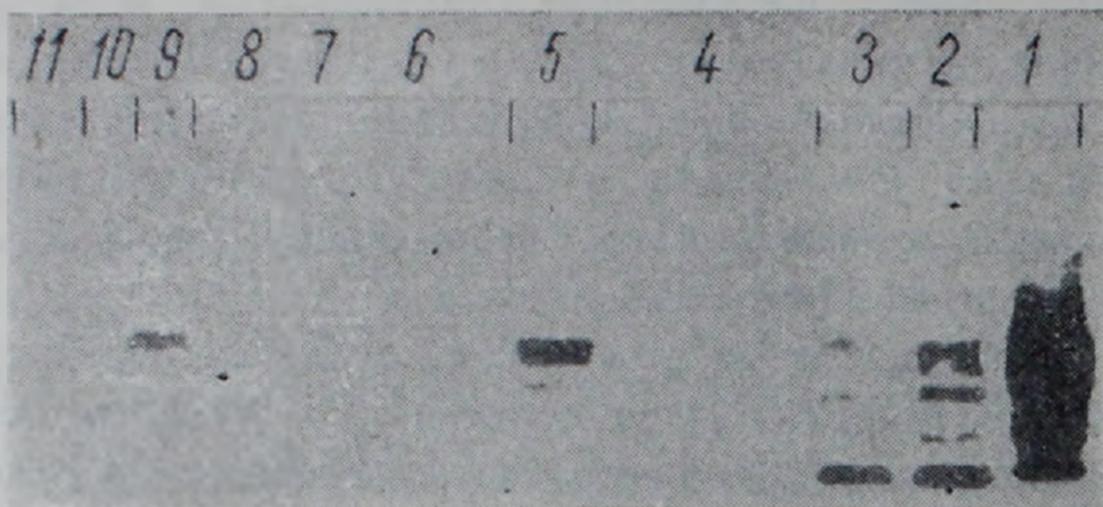


Рис. 1. ДНК *Drosophila* разных линий, рестрицированная *EcoR* I и анализированная в гибридизации на наличие гена Р-элемента (объяснение см. в тексте)

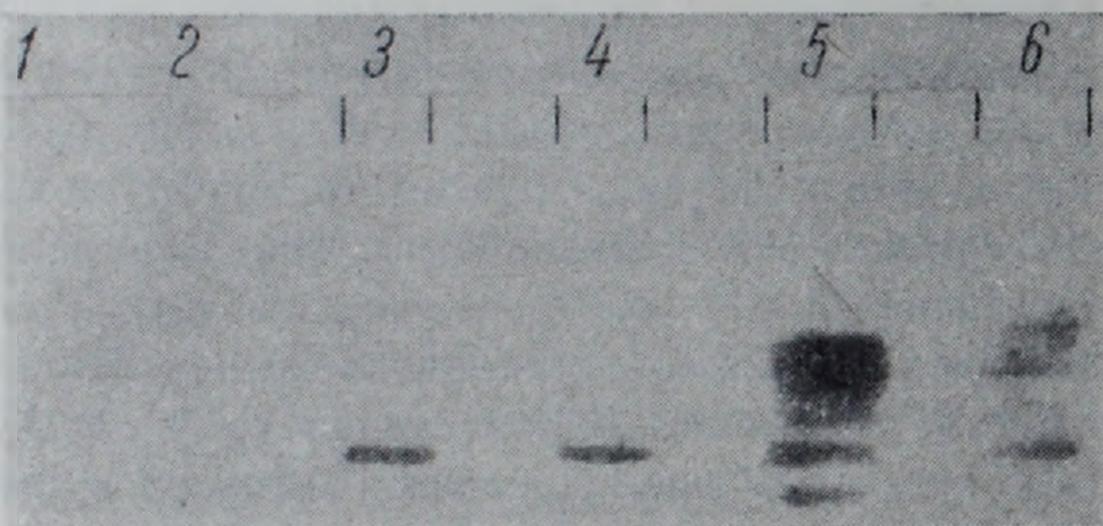


Рис. 2. Гибридационный анализ рестрицированной по *EcoR* I геномной ДНК из личинок *Dg. hydei*, в эмбрионы которых были инъецированы Р-элемент и ген «*gony*» (объяснение см. в тексте)

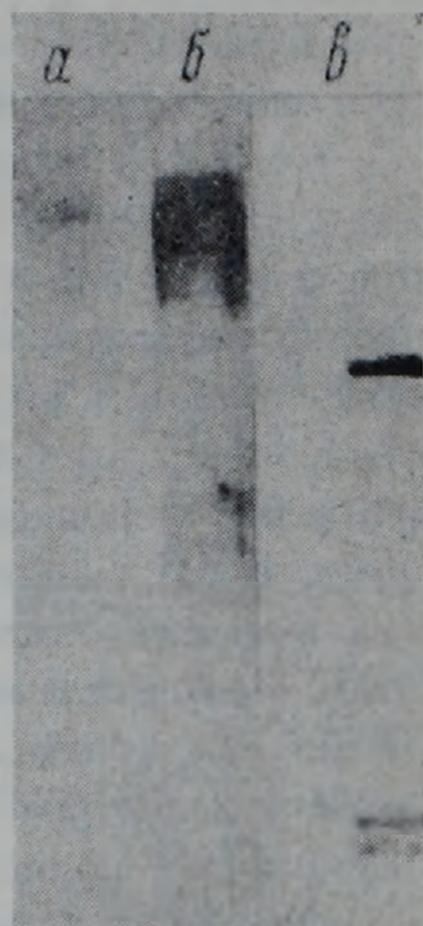


Рис. 3. Гибридационный анализ ДНК колоний миелоидных клеток, трансформированных геном Р-элемента (объяснение см. в тексте)

как и дикий тип, не содержит в своем составе последовательностей, гомологичных к гену Р-элемента; полоса 3 показывает, что инъецированный в эмбрионы интактный ген Р-элемента не переносится в геном и продолжает на определенное время сохраняться в клетках развивающейся личинки, возможно, в виде эписомы рП 25.1.

Известно, что в ряде случаев экзогенная ДНК, введенная в клетки, метилируется, что рассматривается как возможная причина подавления экспрессии введенного гена; с целью ингибирования возможного метилирования гена транспозазы в эксперименте (полоса 4) наряду с геном Р-фактора в эмбрионы был инъецирован 2,5 мМ раствор 5-азацитидина. Полоса 4 показывает, что и в случае инъекции 5-азацитидина ген Р-элемента не интегрирует в геном. Как в полосе 3, так и 4 обнаруживается строгая гибридизация с фрагментом около 6,7 т. п. о., вырезанным *EcoRI* из ДНК рП 25.1.

Полоса 5 свидетельствует, что, как и в случае 3 и 4, транспозиции ни Р-элемента, ни гена «*gony*» не происходит; строгая гибризуемость

обнаруживается для фрагмента в 4,1 т. п. о. и 6,7 т. п. о. от Carnegie-20 и 6,7 т. п. о. от рП 25.1.

Таким образом, ген Р-элемента (Р-семейство генов) отсутствует в линии *Dg. hydei*, и в отличие от заднеполюсных зародышевых клеток эмбрионов *Dg. melanogaster* в клетках *Dg. hydei* процесс транспозиции в хромосому гена Р-элемента и гена «gосу», из состава введенных рекомбинантных ДНК, по-видимому, репрессирован; 5-азацитидин не эффективен в индукции процесса транспозиции. Результат, полученный на примере нового семейства Р-элемента, показывает еще один пример видовой специфичности, описанный и являющийся отличительной чертой ряда семейств мобильных диспергированных генов (м. д. г.) у дрозофилл, некоторым из которых присуща высокая видоспецифичность. Можно предположить, что данная видоспецифичность поддерживается наличием у *Drosophila* определенного репрессирующего механизма, «иммунитета», создаваемого в клетке м. д. г. к суперинфицированию и ограничивающего распространение определенных семейств м. д. г., в том числе и Р-фактора, среди различных линий *Drosophila*, аналогично явлению несовместимости плазмидных генов у бактерий.

В следующей серии экспериментов исследована способность интактного гена Р-элемента функционировать в клетках костного мозга мыши, достаточно отдаленной от *Drosophila* по генетическому содержанию.

ДНК колоний миелоидных клеток, получивших гены Р-элемента в процессе сотрансформации, была рестрицирована *Eco RI*; полученные фрагменты после электрофоретического разделения в 1%-ном агарозном геле были анализированы по Саузерну, с ДНК рП 25.1, меченной [³²P], как описано выше.

Как видно из рис. 3, б, в составе генома трансформированных клеток во фрагментах достаточно высокого молекулярного веса (23—9 т. п. о.) выявляются сигналы присутствия последовательностей плазмиды рП 25.1. Гибридизационный анализ той же ДНК, после рестрикции *Eco RI*, со смесью фрагментов ДНК рП 25.1, содержащих гены области «white» и рBR 322 (рис. 3, а), позволяет сделать заключение, что именно последовательности гена Р-элемента ответственны за гибридизацию в полосе 3 б. С целью установления величины фрагмента гена Р-элемента в составе фрагментов 23—9 т. п. о. элюированная с данной зоны агарозы ДНК была рестрицирована ферментом *Avu II* и вновь анализирована в гибридизации с [³²P] ДНК рП 25.1.

Полученный результат (рис. 3, в) демонстрирует наличие трех четких полос гибридизуемости: 1,5; 0,54; 0,48 т. п. о., соответствующих фрагментам интактного гена Р-элемента в условиях рестрикции *Avu II*.

Таким образом, в отличие от клеток *Drosophila hydei* в миелоидных клетках мыши Р-элемент, по-видимому, способен к автономной репликации и репликативной транспозиции интактного гена в состав генома миелоидных клеток мыши (13).

Авторы приносят благодарность В. Хеннигу, заведующему лабора-

торней генетики Католического университета Неймегена (Нидерланды), где выполнена данная работа, и научному сотруднику П. Хойзеру за оказание квалифицированной помощи при проведении лабораторных экспериментов.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Խ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Ս. Հ. ԲԱԳՐԱԶՅԱՆ

P-էլեմենտի տեղափոխությունը մկների ոսկրածուծի բջիջների և
Drosophila hydei սաղմնային բջիջների մեջ

Ցույց է տված, որ *Drosophila hydei* գենոմում P-էլեմենտը բացակայում է, և որ ի տարբերություն *Drosophila melanogaster* սաղմնային բջիջների, *Drosophila hydei* սաղմնային բջիջներում միկրոնեբարակման մեթոդով ներմուծված ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ների կազմից P-էլեմենտի և լսանտինդեհիդրոգենազի գեների տրանսպոզիցիան բրոմոսոմում ճնշված է: Տրանսպոզիցիայի պրոցեսի ինդուկցիայի համար 5-ազացիտիդինը արդյունավետ չէ: Ի տարբերություն *Drosophila hydei*, մկների միելոիդային բջիջներում P-էլեմենտը ներգրավվում է գենոմ ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ի կազմից P-տրանսպոզոնի ինտակտ դենի կտրման և տրանսպոզիցիայի ճանապարհով:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ K. O'Hare, C. Benoist, K. Breatnach, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 1527 (1981). ² T. B. Shows, A. Y. Sakaguchi, In vitro, v. 11, p. 55 (1980). ³ S. N. Slilaty, V. H. Aposhian, Science, v. 220, p. 725 (1983). ⁴ M. Wigler, S. Silverstein, I. S. Lee e. a., Cell, v. 11, p. 223 (1977). ⁵ Г. П. Георгиев, Ю. В. Ильин, А. П. Рысков и др., Генетика, т. 17, с. 222 (1981). ⁶ P. M. Bingham, M. G. Kidwell, G. M. Rubin, Cell, v. 29, p. 995 (1982). ⁷ G. M. Rubin, A. C. Spradling, Science, v. 218, p. 343 (1982). ⁸ Y. Shimizu, K. Yoshida, Ch. Ren e. a., Nature, v. 302, p. 587 (1983). ⁹ R. J. R. Shmookler, Ch. K. Lumpkin, J. R. McGill e. a., Nature, v. 301, p. 394 (1983). ¹⁰ A. C. Spradling, G. M. Rubin, Science, v. 218, p. 341 (1982). ¹¹ J. Viera, J. Messing, Gene, v. 19, p. 259 (1982). ¹² P. W. S. Rigby, M. Dlekmann, C. Rhodes e. a., J. Mol. Biol., v. 113, p. 237 (1977). ¹³ O. N. Danilevskaya, E. V. Kurenova, B. A. Leibovitch e. a., Mol. gen. genet., v. 197, p. 392 (1984).