

28
И20

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ИВАНОВ
Андрей Владимирович

ИССЛЕДОВАНИЕ СУДЬБЫ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК, ИНТЕГРИРОВАННОЙ В ГЕНОМ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Навукова-
бібліографічний
збірник
АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Установа адукації
«Вищий державний університет
імя П.М.Машерова»
НАВУКОВАЯ БІБЛІОТЕКА

Санкт-Петербург
2006

28.05.2007
И 20

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

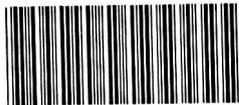
Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии Отделения молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Филатов Михаил Валентинович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Михельсон Виктор Михайлович



* 20504117 *

кандидат химических наук
Аленин Владимир Владимирович

Ведущее учреждение:

ГУ «Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины РАН».

Защита состоится «15» февраля 2007 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.212.232.12 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, СПбГУ, биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и селекции, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета по адресу: 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

Автореферат разослан «10» января 2007 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Л.А. Мамон

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Геном клеток высших эукариот находится под постоянным риском инвазии чужеродной ДНК. *In vivo* клетки млекопитающих продолжительное время контактируют с различными бактериями, вирусами и фрагментами их ДНК, что предполагает возможность горизонтального переноса генетической информации. В действительности, свидетельства о захвате и сохранении бактериальной ДНК в геноме млекопитающих достаточно ограничены (Scrabble, Stambrook 1999; Doerfler et al., 2001). Практическое отсутствие остатков фрагментов бактериальной ДНК в геноме млекопитающих дает основание для предположения о наличии в их клетках высокоэффективной системы по защите собственного генома от приобретения нежелательной чужеродной ДНК. Экспериментально доказать наличие таких систем достаточно сложно, и исследования в этой области находятся на начальной стадии (Awadala, 2003). Несмотря на то, что подобные защитные системы были описаны для бактерий, простейших (Selker, 2003; Yao et al., 2003) и растений (Matzke et al., 2000), об их существовании у млекопитающих свидетельствуют лишь немногочисленные отрывочные данные (Hemmi et al., 2000; Pravtcheva, Wise, 2003; Pipes et al., 2005).

Знание подобных аспектов стабильности генома особенно важно в случаях направленного введения в клетки высших эукариот желательных фрагментов ДНК, таких как геномные исследования, генная терапия, получение трансгенных животных и т.д. (Smith, 2004).

В сфере медицинских исследований большое значение имеет вопрос об особенностях интеграции в геном соматических клеток человека вирусов, в том числе и онкогенных. Кроме достаточно хорошо изученного момента интеграции вирусной ДНК в клеточный геном, остаётся плохо понятной дальнейшая судьба чужеродной ДНК и ее взаимоотношения с системами поддержания стабильности генома (Doerfler et al., 1997).

На начальной стадии исследования было предложено две основных гипотезы, объясняющие это явление:

1) клетка млекопитающих может “узнавать” и удалять места интеграции чужеродной ДНК за счет взаимодействия с гомологичной хромосомой или хроматидой;

2) основное влияние на стабильность интегрированного в геном трансгена оказывают нуклеотидные последовательности флангов, окружающих сайт внедрения чужеродной ДНК в хромосому.

Цель исследования:

Целью данного исследования является демонстрация явления нестабильности интеграции чужеродной ДНК в геном соматических клеток млекопитающих на модели культур клеток, количественная характеристика этого явления для линии клеток китайского хомячка A23, поиск и изучение факторов, влияющих на удаление чужеродной ДНК из генома клеток млекопитающих.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

4

Задачи исследования:

1) на модели культуры соматических клеток китайского хомячка А23 продемонстрировать и количественно охарактеризовать феномен нестабильности интегрированной в геном плазмидной ДНК;

2) с помощью метода ПЦР доказать действительную потерю интегрированных последовательностей ДНК из генома клонов клеток, характеризующихся подобной нестабильностью;

3) продемонстрировать функциональность модифицированного бактериального белка RecA в клетках исследуемых линий;

4) рассмотреть влияние возможного усиления гомологичной рекомбинации на стабильность интегрированной чужеродной ДНК на примере введения в соматические клетки млекопитающих бактериального белка RecA;

5) разработать подход для анализа областей генома, окружающих место интеграции плазмиды, попытаться определить роль влияния фланговой геномной ДНК на стабильность интегрированной чужеродной ДНК.

Научная новизна.

На модели культур клеток продемонстрирован и впервые количественно описан феномен потери интегрированной чужеродной ДНК. Выявлено, что основным фактором, влияющим на такую нестабильность, могут являться фланги хромосомной ДНК, окружающие место интеграции плазмиды.

Показано, что бактериальный белок RecA, модифицированный сигналом ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV40, а также гиперрекомбиногенный белок RecA-X53, экспрессированные в клетках млекопитающих, функционально активны и приводят к некоторому уменьшению повреждений ДНК после облучения. Данная картина визуализирована методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (Comet assay). Установлено, что усиление процессов гомологичной рекомбинации с помощью экспрессии этих белков практически не влияет на нестабильность трансгенов.

Разработан оригинальный подход конструирования «вторичной» плазмиды, содержащей участки генома клетки китайского хомячка вокруг места интеграции первоначальной плазмиды.

Теоретическое и практическое значение результатов работы.

Полученные данные о нестабильности интеграции плазмидной ДНК в геном культивируемых клеток млекопитающих говорят о существовании в клетках высших эукариот пока до конца неизвестных механизмов защиты генома от инвазии чужеродной ДНК. Хотя предположения о существовании подобных систем у эукариот существуют достаточно давно, а их работе у растений посвящен целый выпуск журнала «Nature» (Dangl, Jones, 2001; Waterhouse et al., 2001), об их действиях по защите генома млекопитающих свидетельствуют только единичные отрывочные данные (Doerfler et al., 2001). Данное исследование говорит о

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

необходимости дополнительного изучения систем поддержания стабильности генома и репарации у млекопитающих. Это приобретает особую актуальность в случаях удаления из генома интегрированной ДНК провирусов, а также в случаях генной терапии различных заболеваний. Хотя данное исследование проведено на культурах клеток, явление нестабильности введенной ДНК проявляется и на трансгенных животных (Scrable, Stambrook, 1999; Pravtcheva, Wise, 2003), что также необходимо учитывать при проведении соответствующих экспериментов. Кроме того, настоящая работа нарушает “классическую” концепцию, согласно которой трансген после интеграции в геном рассматривается как часть хозяйской хромосомной ДНК, неотличимая от собственных генов организма. Разработана стратегия оценки степени нестабильности в динамике во время культивирования клеток млекопитающих *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) На модели культуры клеток A23 и плазмиды p16 наблюдается явление направленного удаления чужеродной ДНК, предварительно интегрированной в геном.
- 2) Попытки усилить ГР в клетках исследуемых линий с помощью экспрессии бактериального белка RecA не приводят к существенным изменениям нестабильности интегрированных чужеродных генов.
- 3) С помощью оригинального подхода по определению влияния нуклеотидной последовательности флангов геномной ДНК, окружающих места интеграции плазмиды, на стабильность существования чужеродной плазмидной ДНК в геноме соматических клеток млекопитающих демонстрируется возможность зависимости судьбы чужеродной ДНК от места ее интеграции в геном.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 30th Nordic-Baltic Postgraduate Course in Plant Breeding (Ош, Норвегия, 2004), на III съезде Всероссийского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2004), 45th Annual meeting of American Society for Cell Biology (Сан-Франциско, США, 2005), а также на научных семинарах Отделения молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ, совместных семинарах Лабораторий клеточной биологии, биофизики макромолекул и молекулярной генетики ОМРБ ПИЯФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 2 статьи и 3 тезиса.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение), выводов и списка литературы. Работа изложена на 145 страницах текста, содержит 4 таблицы и 27 иллюстраций. Список литературы включает 227 работ, в том числе 209 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. Линии клеток китайского хомячка A23 ТК⁻, фибробластов человека, больного синдромом Вернера, трансформированных вирусом SV40, AG11395 и клеток эмбриональной тератокарциномы мыши F9 культивировали в среде Игла (ВМЕ) (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением 10% сыворотки крови

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

крупного рогатого скота (КРС) и 10 нг/мл ампициллина при 37°C во флаконах Карреля (Orange Scientific, США). Для получения отдельных клонов клеток высевались в чашки Петри или 24-луночные планшеты (Costar, США) и помещались в CO₂ инкубатор (Flow Laboratories, США) в атмосферу 5 % CO₂. Для длительного хранения клеток использовались стандартные методы криоконсервации.

Плазмиды, использованные в работе. Плаزمида p16 получена как комбинация плазмид pMC1TK и pRV9.2 (д-р P. Nasty, проф. M. Saracchi, University of Utah, США). Плазмида несет полный ген *TK* человеческого вируса простого герпеса, энхансер вируса полиомы, ген *HPRT* со вставкой гена устойчивости к аминогликозидфосфорибозилтрансферазы (G418) *NEO*, и вектор для репликации в *E. coli* pTZ с устойчивостью к ампициллину (Thomas, Saracchi, 1987). Плазмида pATR4 (проф. K. Kohno, Institute of Molecular and Cellular Biology, Osaka, Япония), несет ген *recA* *E. coli* и ген гигромицин В-фосфотрансферазы, придающий устойчивость к гигромицину В. Плазмида pсDNA3.1-Hygr также имеет ген устойчивости к гигромицину В (д-р M. Grey, США). Плазмида p42_3-3 получена автором.

Электропорация; получение и селекция *TK*⁺ клеток линии A23. Транфекцию плазмид в клетки проводили методом электропорации. 3×10⁶ выращенных в стандартных условиях клеток суспендировали в 0.3 мл среды Игла, смешивали с 20-100 мкг плазмидной ДНК и электропорировали при U=1.08 кВ, C=0.1 мкФ, средняя продолжительность импульса 1 мсек. После электропорации отбирали отдельные клоны устойчивых к G-418 и одновременно чувствительных к ганцикловиру клеток. Далее клетки каждого клона наращивали и рассеивали на 4 флакона. Через 24 часа в один из флаконов добавляли 5 мкг/мл ганцикловира, во вторую среду НАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин), в третий повторно G-418, четвертый служил контролем. Через 15-20 дней каждый эксперимент повторялся для клеток, выросших в нормальных условиях или после селекции клеток на среде НАТ. Частота потери селективных признаков измерялась путем подсчета количества колоний, выросших на ганцикловире в пересчете на число высеянных клеток.

Для получения вторичных трансфектов выделенную из *E. coli* плазмиду p42_3-3 электропорировали в клетки линии A23 аналогично плазмиде p16, но брали 100-150 мкг пДНК для каждой трансфекции. Выход устойчивых к G-418 колоний оказывался существенно ниже, чем в опытах с p16, и составлял ~ 1×10⁵ клеток.

Анализ наличия трансгенной ДНК в клетках. ДНК из культивируемых клеток млекопитающих выделяли, лизируя клетки саркозилем и расщепляя белки протеиназой К в присутствии ЭДТА (Херрингтон, Макги, 1999). При проведении опытов по вторичной трансфекции суммарной геномной ДНК клона 42 линии клеток A23 очищенную ДНК дробили воздействием ультразвука частотой 40 × 10³ Гц в течение 10 сек. на приборе производства ОМРБ ПИЯФ РАН.

амплификация трансгенов до 20 копий уже после интеграции в геном (Mugape, Yezzi, 1988; Doerfier, 1997). Подобная амплификация после интеграции отмечена и

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

7

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась по стандартной методике (Mullis, Fallona, 1987) по схеме: 1 цикл – 92°C в течение 200 сек., 20 циклов – 92°C – 60 сек., 58°C – 90 сек., 73°C – 120 сек., последний цикл 73°C – 200 сек. на термоциклере производства ОМРБ. На каждую реакцию брали 100 нг обработанной ДНК, 0,2 мкМ нуклеотид трифосфатов, 2,8 мМ MgCl₂, 50 мкг/мл BSA, 1 мкМ каждого из праймеров, 1 единицу Taq полимеразы.

Были использованы следующие праймеры (Хеликс Лимитед, СПб): NEO/S1693 5'-TTGTCAAGACCGACCTGTC-3', NEO/AS2307 5'-GCTGCGAATCGGGAGCG-3', HSVTK/S368 5'-GAAGCGCGTATGGCTTCG-3', HSVTK/AS561 5'-GCACCCGCCAGTAAGTCA-3'. Определение нуклеотидной последовательности части плазмиды p42_3-3, содержащей участки флангов места первоначальной интеграции, осуществляли по Сенджеру с использованием реактивов и оборудования фирмы «Хеликс Лимитед» (СПб). Был использован праймер P4233R 5'-ACAAGCGCCCAGATAACAATG-3'. Анализ полученной нуклеотидной последовательности проводили с помощью программы BLASTN, входящей в пакет Vector NTI.

Получение и анализ клонов клеток, экспрессирующих белок ResA. ДНК плазмиды pATR4 вводилась в клетки линии F9 методом электропорации, как описано выше. Для каждого опыта брали 5×10^6 клеток и 50-80 мкг пДНК.

Вестерн-блот. Для выявления белка ResA, находящегося на мембране, проводилось **обработка антителами двухэтапным непрямой метод.** В качестве первых антител были использованы поликлональные кроличьи антитела на белок ResA (д-р А.В.Суслов, ПИЯФ РАН), в разведении 20 мкг/мл. Реакция связывания проводилась при комнатной температуре в растворе TBS в течение часа, после чего следовали 3 отмывки в TBS по 5 мин. (все при покачивании). В качестве вторых антител использовались козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Реакция проходила при комнатной температуре в растворе TTBS и 0,1% молока в течение 1 часа, после чего следовала аналогичная отмывка. После отмывки производилось окрашивание 3,3'-диаминобензидином (ДАБ) или люминолом. Для этого был использован набор реактивов Super signal West Pico Trial Kit (Pierce).

Для визуализации разрывов ДНК в клетках после облучения жестким рентгеновским излучением был применен метод Comet assay в вариации Коллинса с коллегами (Horvathova et al., 2004). Клетки смешивались с раствором 1% агарозы в ФБ, наносились на предметные стекла двумя аликвотами по 80 мкл, обрабатывались лизирующим раствором (2,5 М NaCl, 0,1 М EDTA, 10 мМ Tris/HCl, pH 10, 1% Triton X-100) в течение 1 часа для удаления мембран и разгонялись в электрическом поле 0,8В/см. Перед наблюдением в флуоресцентный микроскоп готовые препараты окрашивались ДНК-связывающими красителями: Hoechst, DAPI или бромистым этидием. В каждой пробе оценивалось 100 комет, которые разделялись на 5 классов в зависимости от выраженности и размеров хвоста.

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

В работе использованы методы статистической обработки материалов, осуществлявшиеся с использованием стандартного пакета программ EXCEL'XP. При расчете погрешностей для построения графиков потери селективных маркеров статистическую обработку результатов гибели клеток проводили с помощью метода наименьших квадратов, используя коэффициент Стьюдента для заданной надежности $\alpha=0.95$. Расчет доверительных интервалов при построении диаграмм распределения клеток различных типов проводился по критерию χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из моделей для изучения нестабильности стали культуры клеток. В серии работ Глебов с соавторами (Глебов и др., 1985; Глебов, Абрамян, 1985) описали явление нестабильности искусственно введенной в геном клеток линии СНО тимидин киназы вируса простого герпеса и обнаружили мозаичность TK^+ фенотипа.

В данной работе нам удалось развить эти подходы и продемонстрировать эффективную потерю предварительно включенной в геном чужеродной ДНК при культивировании клеток млекопитающих. Предложенная экспериментальная система позволяет легко следить за изучаемым процессом, используя экспрессию двух селективных маркеров (Рис. 1). Устойчивость к G418 служит для отбора трансфектантов, несущих встроившуюся в геном экзогенную ДНК, а устойчивость к ганцикловиру используется для селекции клонов, потерявших чужеродную ДНК.

Анализировались только клоны, изначально устойчивые к G418 и чувствительные к ганцикловиру. Те из этих клонов, клетки которых в более поздние сроки становились устойчивыми к ганцикловиру и одновременно чувствительными к G418 и среде НАТ, рассматривались как ревертанты.

Для трансформации клеток линии A23 была получена плазмидная конструкция p16, включающая ген *NEO*, обуславливающий устойчивость к G418, и ген тимидинкиназы вируса простого герпеса – *TK* ВПГ. Сильные эукариотические промоторы – β -актина цыпленка для гена *NEO* и вируса простого герпеса для гена *TK*, а также энхансер вируса полиомы и сигнал инициации трансляции Козак обеспечивают эффективную экспрессию этих генетических маркеров в клетках млекопитающих (Kido et al., 1992).

Интеграция гена *NEO* в геном ведет к появлению клонов клеток, способных расти в присутствии G418. Интеграция же гена *TK* ВПГ сообщает клеткам, дефектным по эндогенному гену тимидинкиназы, способность расти на среде НАТ, но делает клетки чувствительными к такому аналогу природных нуклеозидов, как ганцикловир. Такая ситуация реализуется только в случае встройки вводимой плазмидной ДНК в геном клеток – реципиентов. Данная конструкция, как и все подобного рода конструкции, не имеющие специальных вирусных *ori* репликации ДНК, не может сохраняться и работать в клетках

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

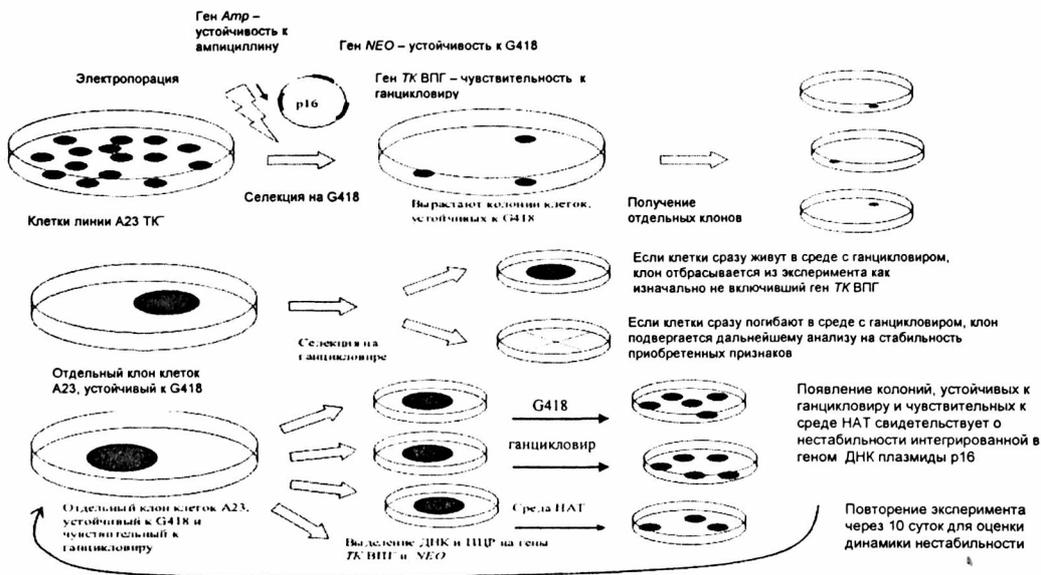


Рис. 1. Схема основных экспериментов по демонстрации явления нестабильности чужеродной ДНК, интегрированной в геном соматических клеток млекопитающих.

млекопитающих в эпизодном состоянии сколь либо долгое время. Она должна либо интегрироваться в клеточный геном, либо будет утрачена. Не интегрированные генные конструкции такого рода обычно утрачиваются клетками уже после нескольких делений (Тимченко и др., 1990). Таким образом, полученная конструкция позволяет вести отбор клеток, в геном которых она интегрировалась – по устойчивости к G418 и наоборот – вести среди этих интегрантов отбор клеток, потерявших ее, по устойчивости к ганцикловиру.

Селекция на среде НАТ помогает удалять ревертантов по гену *TK* в случаях, когда доля таких ревертантов приближается к 100%, но не достигает этого значения. После зачистки на среде НАТ выживают только клетки, сохранившие TK^+ фенотип, они образуют колонии, число которых легко подсчитать.

Было получено и проанализировано 64 независимых клон клеток линии A23. Установлено несколько вариантов поведения чужеродной плазмидной ДНК при вторичной селекции на ганцикловире, G418 и среде НАТ. Как видно из Рис. 2, клетки теряли селективные признаки с разной скоростью в течение первых недель с момента трансфекции. В результате анализа динамики потери селективных признаков все исследуемые клоны разбиваются на два класса – стабильные (23 клон) и нестабильные (41 клон). Класс нестабильных клонов, в свою очередь, делится на три группы, обозначенные как полная потеря (f), частичная потеря 1 (p-1) и частичная потеря 2 (p-2).

ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ

Murnane, Young, 1989; Doerfler et al., 1997), значительно расширяя и дополняя их, хотя и несколько различаются в деталях.

ВЫВОДЫ:

1. Интеграция чужеродной плазмидной ДНК в геном соматических клеток млекопитающих линий А23, F9 и Ag11395 происходит как стабильно, так и нестабильно.
2. В случае нестабильной интеграции можно выделить три типа динамики потери селективных признаков: полная потеря на 90 сутки после трансфекции, и два типа частичной потери, статистически различающиеся темпами потери селективных признаков на 40 – 90 сутки эксперимента.
3. Ген бактериального белка RecA, обеспечивающего проявление гомологичной рекомбинации у бактерий, дополненный нуклеотидной последовательностью сигнала транспорта в ядро и эукариотическим промотером, активно экспрессируется в клетках млекопитающих различных линий и не является токсичным для таких клеток.
4. По всей видимости, экспрессия бактериального белка RecA в клетках млекопитающих не оказывает существенного влияния на стабильность существования интегрированной чужеродной ДНК в геноме таких клеток.
5. На основе использования обработанной ультразвуком совокупной геномной ДНК клеток млекопитающих в качестве вектора для трансфекции разработан подход по выделению и анализу последовательностей флангов сайта интеграции плазмидной конструкции.
6. Получены аргументы в пользу того, что влияние на стабильность интегрированной в геном клеток млекопитающих чужеродной плазмидной ДНК могут оказывать фланги сайта интеграции.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Ivanov A.V. Deleting of Foreign DNA from the Genome of Transformed Cells: A Novel Genom-Guarding Function. In: Plant production in 2025 - transgenic or ecological? Norway, As-NLH 2003. P. 53-56.

Иванов А.В., Бахланова И.В., Пантина Р.А., Филатов М.В. Изучение нестабильности интеграции плазмидной ДНК в геном соматических клеток млекопитающих. Цитология, 2004. Т. 46, С. 740-747.

Иванов А.В., Филатов М.В. Особенности потери интегрированной плазмидной ДНК из генома соматических клеток млекопитающих. Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. III ВОГиС. Москва, 6-12 июня 2004 г. Т. 2, С. 285.

Ivanov A.V. Instability of Foreign DNA Integrated into the Genome of Transformed Cells. 45th Annual meeting of The American Society for Cell Biology. San Francisco, 2005, P. 347.

Иванов А.В. Изучение факторов, влияющих на гомологичную и негомологичную застройку экзогенной ДНК в геном соматических клеток млекопитающих. VII Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов. С-Петербург, 2002. С. 46-47.