

ОСОБЕННОСТИ МЕЖГЕНЕРАЦИОННОЙ ПЕРЕДАЧИ БЫЧЬЕЙ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

© Н. А. Сломинская,^{1,*} И. О. Сучкова,¹ Т. А. Клинская,¹
М. А. Забегинский,² Е. Л. Паткин¹

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН и

² Институт онкологии им. Н. И. Петрова, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: slominska@mail.ru

Проведен генетический, цитологический и молекулярный анализ пяти поколений трансгенных по чужеродной сателлитной ДНК мышей. Данная линия мышей была получена от самца-фаундера, гемизиготного по бычьей центромерной сателлитной ДНК IV, в результате скрещивания трансгенных животных с контрольными мышами F₁ (CBA × C57Bl). У фаундера не наблюдалось каких-либо отклонений в развитии. В первом поколении частота трансгенных особей среди новорожденных составляла всего лишь 4.5 %, хотя на стадии бластоцисты наблюдалось теоретически ожидаемое (1 : 1) соотношение трансгенных и нетрансгенных зародышей. В последующих поколениях частота носителей трансгена варьировала в зависимости от пола трансгенного прародителя. Так, при наследовании чужеродной сателлитной ДНК от дедушки трансгенными были от 0 до 52.4 % потомков, а при наследовании от бабушки частота трансгенных особей не отличалась от теоретически ожидаемой, т. е. происходила стабилизация транссателлита при прохождении через женский гаметогенез — имел место положительный «бабушкин эффект». У гемизиготных трансгенных самок инсерция чужеродной сателлитной ДНК проводила к повышенной частоте возникновения опухоли молочной железы, воспалительным процессам в рогах матки и нарушению поведения. Картирование трансгена при помощи FISH, совмещенной с дифференциальным G-окрашиванием, показало его локализацию в интерстициальной области хромосомы 12 мыши, содержащей гены *Pax 9* и *Brms 11*, снижение или полное отсутствие экспрессии которых приводит к опухолеобразованию. Предполагается негативное влияние *Sat* на экспрессию данных генов.

Ключевые слова: сателлитная ДНК, трансгеноз, опухоль молочной железы.

Успешное внедрение в медицинскую практику генной терапии невозможно без учета и выяснения последствий интеграции экзогенной ДНК в геном реципиента. Наиболее эффективной моделью для изучения последствий интеграции являются трансгенные животные. За последние годы было создано большое количество линий трансгенных по кодирующей ДНК мышей, с помощью которых изучены функции многих генов и механизмы генной регуляции (Petters, Sommer, 2000). Более того, было показано, что трансгены не ведут себя как независимые единицы. Так, основными факторами, определяющими дальнейшую судьбу и свойства экзогенной ДНК, являются особенности ее нуклеотидного состава, копияность, сайт и время встраивания и, наконец, генетическое окружение (наличие в геноме реципиента так называемых генов-модификаторов) (Aigner et al., 1999; Schumacher et al., 2000).

Актуальным, но менее изученным остается вопрос о функциональном значении некодирующих повторяющихся последовательностей — сателлитных ДНК (Csink, Henikoff, 1998; Ugarkovic, Plohl, 2002). В настоящее время основное внимание уделяется изучению микро- и минисателлитов, нестабильность которых может приводить к развитию ряда серьезных заболеваний человека, таких

как эпилепсия, инсулинозависимый диабет, синдром ломкой X-хромосомы, хорея Гентингтона, нейромышечные и нейродегенеративные заболевания (Bennet et al., 1995; Mitas, 1997; Virtaneva et al., 1997). Исследования по трансгенозу крупных сателлитных ДНК (с повторяющейся единицей от 100 п. н.) наиболее трудоемки и, следовательно, малочисленны.

В целом анализ работ по изучению мышей, трансгенных как по различным генам, так и по мини-сателлитам и тринуклеотидным повторам, показывает, что одним из проявлений инсерции трансгена является возможное отклонение от классического менделевского расщепления при межгенерационной передаче трансгена. Анализ родословных в этом случае, особенно в сочетании с молекулярным и цитологическим анализом, дает возможность оценить фенотипический эффект встроенных последовательностей ДНК.

Ранее нами было показано, что в двух линиях мышей, трансгенных по повторяющейся единице бычьей центромерной сателлитной ДНК IV, на протяжении 1—2 поколений наблюдается межгенерационная структурная нестабильность встроенного трансгена (Попов и др., 2000; Сучкова и др., 2004). Кроме того, в одной из линий происходило формирование эктопического гетерохрома-

тина на одной из хромосом (Попов и др., 2000). Однако не меньший интерес представляет характер наследования в дальнейших скрещиваниях, т. е. возможные отдаленные последствия инсерции некодирующих гетерогенных по своему нуклеотидному составу последовательностей ДНК.

Целью настоящей работы было изучение особенностей межгенерационной и соматической передачи повторяющейся единицы бычьей центромерной сателлитной ДНК у трансгенных мышей частично охарактеризованной ранее (Сучкова и др., 2004) линии № 21.

Материал и методика

Клонирование и выделение *Sat*-последовательности. В качестве вектора для клонирования чужеродной ДНК использовали плазмиду pBR322, содержащую по *Hind*III-сайту вставку 3,8 тыс пар нуклеотидов повторяющейся единицы сателлитной ДНК IV (1.709 г/см³) *Bos taurus* (*Sat*). Рекомбинантная плаزمиды pBR322-*Sat* была любезно предоставлена проф. А. Ф. Смирновым (Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения с.-х. животных, Санкт-Петербург). Для клонирования pBR322-*Sat* использовали штамм *E. coli* DH5 α . Трансформацию проводили с применением хлорида кальция (Sambrook et al., 1989). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Promega protocols..., 1990).

Получение трансгенных мышей. В работе использовали мышей-гибридов F₁ (СВА \times С57BL/6) (питомник «Рапполово» РАН). Трансателлитных мышей получали методом микроинъекции чужеродной ДНК в мужской пронуклеус зигот (Вайсман, Голинский, 1985). В данной работе представлены результаты анализа 1 из 2 полученных трансгенных линий *Sat*-мышей, в качестве контроля использовали нетрансгенных мышей-гибридов F₁ (СВА \times С57BL/6) (питомник «Рапполово» РАН). Для получения 5 поколений гемизиготных по *Sat*-последовательности мышей трансателлитных особей скрещивали с контрольными мышами, а также проводили скрещивания между гемизиготными особями (F₂ и F₄).

Выявление трансгенных носителей. Геномную ДНК выделяли из хвостов взрослых мышей фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984). Скрининг трансгенных мышей проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с двумя парами праймеров: (PR1) 5'-gcagtgcataaatatcaaaagg-3' и (PR2) 5'-gatcaggaggtgttaggaac-3', (PR3) 5'-cccactggatgccgaccctt-3' и (PR4) 5'-tcctttccgtagccctcgtt-3', подобранных с помощью программы «Primer 1.0». ПЦР проводили в термоциклере («Cyclotemp») в 30 мкл реакционной смеси (60 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1 % Тритона X-100, 1.5 мМ MgCl₂, по 400 мкМ каждого dNTP, 0.3 ед. Taq-полимеразы (СибЭнзим, Новосибирск), по 10 пкМ каждого праймера и 200 нг ДНК). Температурный профиль ПЦР был следующим: иницирующая денатурация ДНК — 94 °С, 5 мин; затем 30 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С, 1 мин; отжига при 57 °С, 1 мин; элонгации при 72 °С, 1 мин; заключительный цикл синтеза — 72 °С, 9 мин. Продукты амплификации разделяли с помощью нейтрального электрофореза в 6%-ном ПААГ (Маниатис и др., 1984) и окрашивали 0.1%-ным AgNO₃. Отрицательным контролем являлись образцы ДНК нетрансгенных животных, поло-

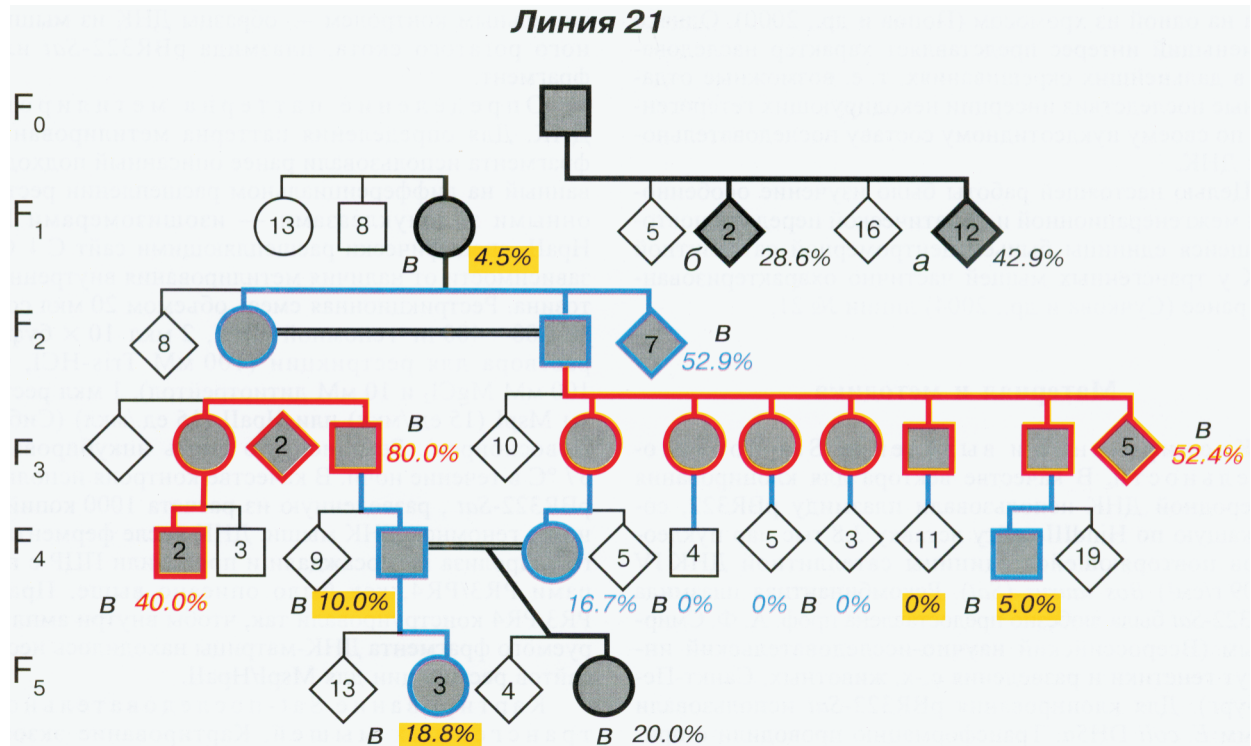
жительным контролем — образцы ДНК из мышц крупного рогатого скота, плазмиды pBR322-*Sat* или *Sat*-фрагмент.

Определение паттерна метилирования ДНК. Для определения паттерна метилирования *Sat*-фрагмента использовали ранее описанный подход, основанный на дифференциальном расщеплении рестрикционными эндонуклеазами — изошизомерами MspI и HpaII, специфически расщепляющими сайт C ↓ CGG в зависимости от наличия метилирования внутреннего цитозина. Рестрикционная смесь объемом 20 мкл содержала 200—400 нг геномной ДНК, 2 мкл 10 \times буферного раствора для рестрикции (100 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 100 мМ MgCl₂ и 10 мМ дитиотрейтол), 1 мкл рестриктазы MspI (15 ед./мкл) или HpaII (15 ед./мкл) (СибЭнзим, Новосибирск). Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение ночи. В качестве контроля использовали pBR322-*Sat*, разведенную из расчета 1000 копий на геном в геномной ДНК мыши. ДНК после ферментативного гидролиза пересаждали и проводили ПЦР с праймерами PR3/PR4, как было описано выше. Праймеры PR3/PR4 конструировали так, чтобы внутри амплифицируемого фрагмента ДНК-матрицы находилось несколько сайтов рестрикции для MspI/HpaII.

Картирование *Sat*-последовательности у трансгенных мышей. Картирование экзогенной ДНК проводили на хромосомных препаратах клеток костного мозга трансгенных мышей; приготовление хромосомных препаратов проводили по стандартной методике (Дарлингтон, Ла Кур, 1980). Дифференциальное G-окрашивание получали в результате обработки препаратов 0.01%-ным раствором трипсина и последующего окрашивания в 5%-ном растворе Гимза. Гибридизацию *in situ* ДНК/ДНК на метафазных хромосомах и интерфазных ядрах проводили по стандартной методике с использованием меченого биотина (Biotin-16-dUTP, Boehringer) методом ник-трансляции зонда bio-pBR322-*Sat* (8171 п. н.). Денатурацию препаратов проводили в 70%-ном формамиде на двукратном буферном растворе SSC в течение 2 мин при 72 °С, отмывки — в 50%-ном формамиде на двукратном буферном растворе SSC при 42 °С. Детекцию проводили с помощью 2 линий антител стрептовидин-FITC (Boehringer) и конъюгата антиavidин-биотин (Boehringer). Препараты заключали в раствор Antifade, содержащий 90 % глицерина, 2.5 % DABCO, 0.5 мкг/мл пропилид иодида и 0.5 мкг/мл DAPI на однократном буферном растворе PBS. Анализировали препараты в центре «Хромас» Биологического научно-исследовательского института С.-Петербургского государственного университета на универсальном микроскопе Leica, оснащенном блоками светофильтров для FITC, иодистого пропилида и компьютерной системой анализа изображения (программное обеспечение для проведения обработки изображения Q-FISH), при длине волны 460—490 нм.

Результаты и обсуждение

В качестве трансгена в нашей работе была использована повторяющаяся единица центромерной сателлитной ДНК IV быка (*Sat*), обладающая рядом особенностей (областью с нитевой асимметрией по содержанию GC и AT нуклеотидов; обогащенностью прямыми и инвертированными повторами; сайтами для узнавания топоизо-

Рис. 1. Родословная *Sat*-трансгенных мышей.

Проанализированы животные на стадии бластоцисты (а) на 13-е сут эмбрионального развития (б) и на 3-й нед жизни (в). Заполненные *серым цветом* фигуры — носители трансгена, *незакрашенные фигуры* — нетрансгенные самцы и самки; *красные линии* — наследование трансгена от бабушки, *синие линии* — наследование трансгена от дедушки; *цифрами в фигурах* указано количество мышей, *цифрами под фигурами* — частоты трансгенных особей, %; *желтая заливка* — различия между теоретически ожидаемой и наблюдаемой частотами трансгенных мышей достоверны при $P < 0.05$.

меразой Торо I и последовательностями, гомологичными некоторым горячим точкам рекомбинации), которые давали основание ожидать ее нестабильного поведения при интеграции в геном мыши, что и было нами показано в предыдущей работе для двух линий трансателлитных мышей на протяжении двух поколений (Сучкова и др., 2004).

Среди 150 мышей в 5 поколениях, полученных от трансателлитного самца-фаундера (линия № 21) методом ПЦР с использованием 2 пар праймеров, были выявлены 34 *Sat*-трансгенные мыши. Хотя инъецированная в мышинные эмбрионы чужеродная ДНК интегрирует в хромосомы и стабильно передается в следующих поколениях согласно законам Менделя (Pravtcheva, Wise, 2003), анализ родословной данной линии показал отклонение от наследования чужеродного сателлита по Менделю уже в поколении F₁ ($P < 0.05$) (рис. 1). Однако после прохождения *Sat*-последовательности через женский гаметогенез (самка F₁) происходило восстановление расщепления до теоретически ожидаемого (1 : 1 и 3 : 1) в F₂ и F₃. Далее при передаче *Sat* от дедушки внукам (F₂ → F₄, F₃ → F₅) опять наблюдалось достоверное отклонение от расщепления 1 : 1 ($P < 0.05$), а при наследовании от бабушки эмпирическое расщепление соответствовало теоретически ожидаемому (рис. 1).

С помощью тетрагорического показателя связи нами установлена связь между сниженной частотой трансгенных особей и передачей трансгена от дедушки независимо от пола родителя ($P < 0.05$).

По данным литературы, в случаях, когда наблюдается передача трансгена менее 50 % потомства, это может говорить о негативном влиянии трансгена или о возника-

ющих инсерционных мутациях, влияющих на жизнеспособность трансгенных гамет или эмбрионов (Palmiter et al., 1984; Covarrubias et al., 1986, 1987; Pravtcheva, Wise, 2003). Кроме того, отклонения от теоретически ожидаемого соотношения могут быть вызваны и наследуемой нестабильностью трансгена при отсутствии негативного влияния на трансгенные особи (Reik et al., 1990; Allen et al., 1994; Collick et al., 1996). Потеря (элиминация) трансгена может происходить как в половых клетках, приводя к сниженной передаче трансгена, так и в соматических тканях трансгенных мышей, приводя к соматическому мозаицизму и ослабленному или даже полному отсутствию трансгенного сигнала (Pravtcheva, Wise, 2003).

Исходя из вышесказанного наблюдаемая нами частота *Sat*-трансгенных мышей меньше теоретически ожидаемой, а в некоторых случаях полное отсутствие трансгенных животных в F₄ и F₅ при передаче *Sat* от дедушки внукам могло быть вызвано по крайней мере двумя причинами — эмбриональной летальностью трансгенных мышей и перестройками *Sat*, приводящими к его частичной или полной элиминации. Нами было проанализировано 28 эмбрионов на стадии бластоцисты и 7 эмбрионов на 13-е сут развития, полученных от скрещиваний самца-фаундера (F₀) с контрольными самками. Частота трансгенных эмбрионов на стадии бластоцисты соответствовала теоретически ожидаемой (50 %) и составляла 42.9 %. Среди 13-суточных эмбрионов и 3-недельных мышат наблюдалось снижение частоты трансгенных носителей — 28.6 и 4.5 % соответственно ($P < 0.05$) (рис. 1). Сравнение плодовитости самок в исследуемой линии с контролем не выявило достоверных различий (4.8 ± 1.3 — от 2

Метилирование *Sat* в области, обогащенной CpG-динуклеотидами, у трансгенных мышей

Номер поколения	Общее количество <i>Sat</i> -трансгенных мышей	Количество трансгенных мышей с метилированным <i>Sat</i>	Количество трансгенных самок с опухолью молочной железы и метилированным <i>Sat</i>	Количество трансгенных самок с опухолью молочной железы и неметилированным <i>Sat</i>
F ₁	1	0	0	1
F ₂	8	2	0	1
F ₃	13	2	1	0
F ₄	7	0	0	0
F ₅	4	1	1	0

до 7 особей в помете и 5.0 ± 1.8 — от 1 до 8 особей в помете соответственно; $P < 0.05$). Таким образом, наиболее вероятной причиной уменьшения частоты *Sat*-трансгенных мышей могла быть частичная или полная элиминация чужеродного сателлита, вызванная его соматической нестабильностью.

В целом описываемый нами положительный «бабушкин эффект» (стабилизация транссателлита при наследовании внуками от бабушки и его нестабильность при передаче от дедушки) может быть обоснован различиями между мужским и женским гаметогенезом. Так, во-первых, во время мужского гаметогенеза происходит больше митотических делений, чем во время женского (McLaren, 1991); во-вторых, несмотря на то что чаще рекомбинационные события возникают в женском мейозе, в определенных участках генома рекомбинация происходит преимущественно в мужском гаметогенезе (Kearns et al., 2000); в-третьих, у самцов установление импринтов происходит во время предмейотических делений, а у самок — на стадии диплотены (Kearns et al., 2000; Murphy, Jirtle, 2003). Суммируя вышесказанное, мы получили возможность объяснить «тупиковость» описанной нами ранее транссателлитной линии № 10 (Попов и др., 2000). Для этой линии были характерны 2 сайта интеграции *Sat* (интерстициально и в прицентромерный район двух разных хромосом) у самца-фаундера F₀; исчезновение 2-го прицентромерного сайта интеграции в F₁; невозможность получить транссателлитных мышей от самцов F₁, хотя были обнаружены трансгенные эмбрионы на 13-е сут развития, но не было достоверных различий в количестве желтых тел, аномальных и нормальных эмбрионов в сравнении с контролем. Очевидно, в линии № 10 в отличие от линии № 21 для стабилизации *Sat* не хватало его прохождения через женский гаметогенез.

Известно, что трансген может претерпевать ряд модификаций, наиболее важной из которых является метилирование *de novo*, следующее за инсерцией трансгена в реципиентный геном. В целом степень и паттерн метилирования трансгена определяются сайтом интеграции (эффект положения), способом рекомбинации, наличием в чужеродной ДНК специфических бактериальных и вирусных мотивов, а также tandemно повторяющихся последовательностей, нуклеотидной последовательностью трансгена, временем инсерции и влиянием других генов реципиентной клетки или организма (Garrik et al., 1998; Schumacher et al., 2000; Pena et al., 2004). При этом генетическое окружение линии мышей может быть критическим фактором в установлении паттернов метилирования трансгенов (Schumacher et al., 2000).

Следует отметить, что инъецированный фрагмент *Sat* первоначально был неметилирован. Для изучения

возможного метилирования *de novo* и изменений в картине метилирования транссателлита в ряду поколений трансгенных мышей с помощью метил-чувствительной ПЦР качественно был изучен характер метилирования *Sat*-трансгена в области с 558-го по 1007-й нуклеотид, обогащенной CpG-динуклеотидами. Было выявлено преимущественно неметилированное состояние данной области *Sat*. Так, среди 34 проанализированных *Sat*-трансгенных мышей 5 (14.7 %) несли метилированный трансген (см. таблицу). При этом частота мышей с метилированным *Sat* варьировала от 0 % в F₄ до 25 % в F₂ и F₅. Отсутствие каких-либо закономерностей в метилировании чужеродного сателлита в области, обогащенной CpG-динуклеотидами, на протяжении 5 поколений трансгенных мышей можно объяснить в первую очередь их смешанным генетическим окружением. Преимущественно неметилированное состояние *Sat* можно объяснить его невысокой копийностью (порядка 10 копий на геном мыши) (Сучкова и др., 2004). Как известно, необычные хромосомные структуры метилируются во избежание возникновения хромосомных перестроек. Следовательно, нарушение установления соответствующего защитного метилирования трансгена может приводить к его нестабильности (Chevalier-Mariette et al., 2003). Таким образом, наблюдаемая нами нестабильность *Sat* хорошо согласуется с низкой частотой его метилирования.

У 4 из 16 *Sat*-трансгенных самок (25 % по сравнению с 6 % в контроле; $P < 0.05$) были обнаружены опухоли молочной железы. Морфология опухолей оценивалась по критериям Международной ассоциации по изучению рака. В нашем случае опухоли молочной железы представляли собой аденокарциномы с участками мелкоакцинарного и солидного строения. Опухоли инвазировали окружающие ткани, в местах инвазий отмечалась лимфоидная инфильтрация. Следует отметить, что у самки F₁ № 22 опухоль возникла во время третьей беременности в возрасте 15 мес, у F₂ № 4 — через 0.5 года после первых родов и лактации в возрасте 16 мес, у F₃ № 12 — через 2 мес после первых родов без лактации в возрасте 20 мес, у F₅ № 5 — сразу после первых родов без лактации в возрасте 28 мес. Таким образом, в ряду поколений опухоль молочной железы возникла в старшем возрасте, и наблюдалось сокращение промежутка времени между родами и возникновением опухоли.

Кроме того, для 10 самок поколений F₃, F₄ и F₅ был характерен каннибализм, а у 4 из них развивался воспалительный процесс из-за нарушений родовой деятельности и разложения оставшихся в рогах матки эмбрионов, обнаруженных при вскрытии умерших самок. В контроле таких явлений не наблюдалось.

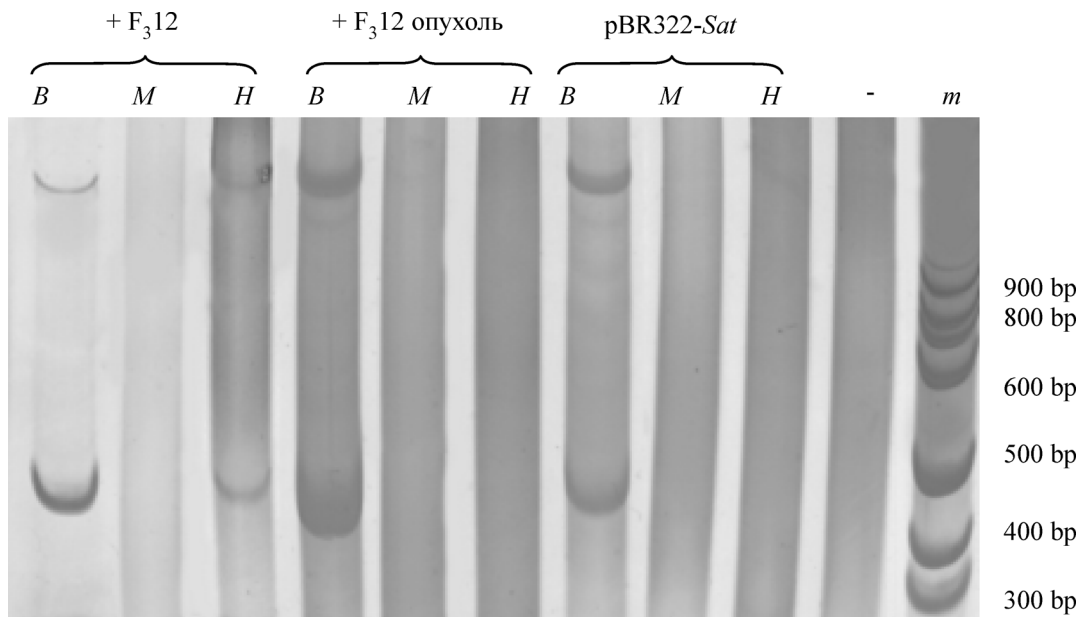


Рис. 2. Результаты метил-чувствительной полимеразной цепной реакции на ДНК *Sat*-трансгенной самки F₃ № 12.

Образцы нанесены в следующем порядке: *B* — инкубация в буферном растворе для рестрикции (без рестриктаз), *M* — пробы после рестрикции с *Msp*I, *H* — пробы после рестрикции с *Hpa*II с последующей ПЦР с праймерами PR3/PR4. Положительный контроль — рекомбинантная плазмида pBR322-*Sat*, содержащая неметилированный *Sat*; отрицательный контроль — ПЦР с праймерами PR3/PR4 без ДНК; *m* — маркер молекулярной массы ДНК с шагом 100 п. н.

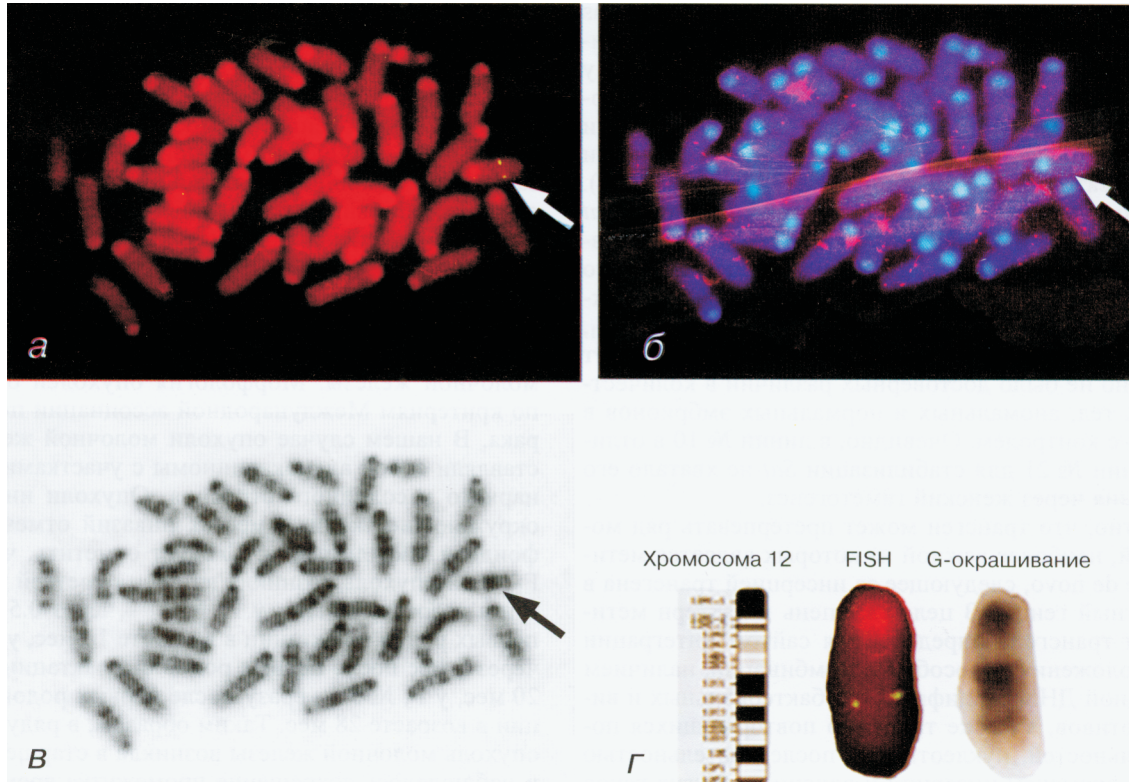


Рис. 3. Картирование *Sat*-трансгена совмещением флуоресцентной гибридизации *in situ* и дифференциальной G-окраски метафазных хромосом трансгенной мыши F₃ № 16.

Хромосомная локализация *Sat*. *a*: красный цвет — окраска пропидиум иодидом, зеленый — детекция гибридизационного сигнала стрептавидин-FITC. *b*: синий цвет — окраска DAPI, красный — детекция гибридизационного сигнала стрептавидин-FITC; стрелками указан гибридизационный сигнал. *в* — G-окрашенные хромосомы. *г* — идентификация дифференциально окрашенной хромосомы (№ 12) с интегрировавшим *Sat*. 1200×.

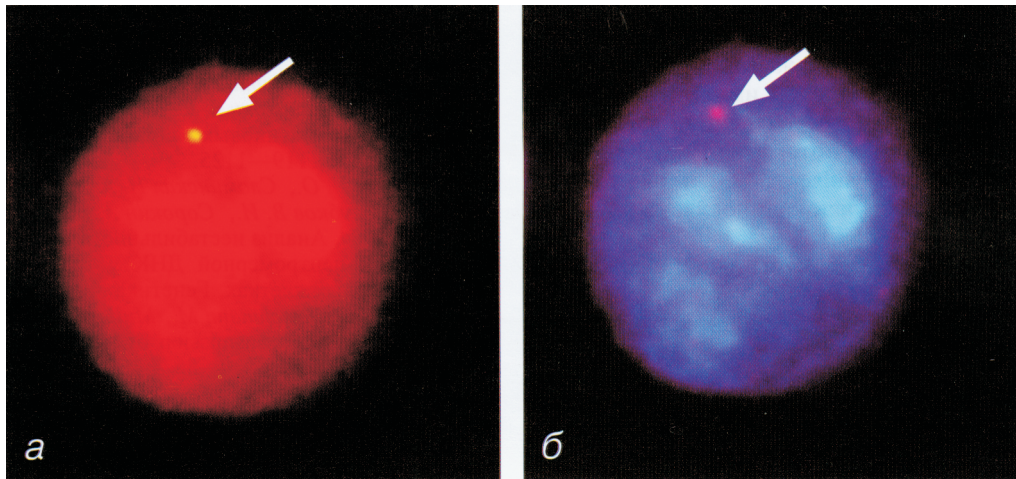


Рис. 4. Локализация *Sat*-трансгена в интерфазном ядре трансгенной мыши F₃ № 16 после флуоресцентной гибридизации *in situ*. Красный цвет — краситель пропидиум иодид (а), синий — краситель DAPI (б). Детекция гибридизационного сигнала стрептавидин-FITC — зеленый (а) и красный (б) цвета. Стрелкой указан гибридизационный сигнал. 1200×.

Общеизвестно, что возникновение и развитие большинства опухолей сопровождаются генетической нестабильностью как на генетическом, так и на эпигенетическом уровне (Leonhardt, Cardoso, 2000). На генетическом уровне наблюдаются изменения нуклеотидного состава и амплификации генов, хромосомные перестройки, изменения количества хромосом (Lengauer et al., 1998). Эпигенетическая нестабильность включает в себя глобальное деметилирование ДНК, приводящее к дестабилизации генома и соответственно к повышению уровня мутаций, и изменения структуры гетерохроматина, особенно в пограничных районах, содержащих эу- и гетерохроматин (Ehrlich, 2002; Goldman, 2002; Eden et al., 2003). Метил-чувствительная ПЦР показала, что экзогенный сателлит во всех опухолях был неметилированным, в то время как в других тканях трансгенных самок он был как метилированным (у 2 мышей; рис. 2), так и неметилированным (у 2 мышей; см. таблицу).

Проведенный нами цитогенетический анализ метафазных хромосом клеток костного мозга трансателлитных самок как с опухолью молочной железы (F₃ № 12), так и без нее (F₃ № 16 и F₄ № 28) не выявил хромосомных aberrаций.

Следует отметить, что для некодирующих tandemно повторяющихся чужеродных последовательностей основным фактором, определяющим их стабильность при наследовании в ряду поколений, может быть сайт интеграции в хозяйский геном. В одной из работ предполагалось, что причиной отклонения от теоретически ожидаемого расщепления у трансгенных по минисателлиту человека MS32 мышей могла быть его интеграция в район, содержащий мышиную мультикопийную гамма-сателлитную ДНК: неравный кроссинговер между сателлитными повторяющимися единицами приводил к делеции трансгена (Collick et al., 1994).

Картирование *Sat*-трансгена с помощью совмещения дифференциального G-окрашивания метафазных хромосом клеток костного мозга (22 метафазные пластинки) и флуоресцентной гибридизации *in situ* показало, что чужеродный сателлит локализован в интерстициальной области хромосомы 12 (12C1—C2) вблизи протяженного гетерохроматинового блока (рис. 3, а, в, г). Окрашивание

с помощью DAPI показало локализацию гибридизационного сигнала на периферии интерфазных ядер (рис. 4, а) и вне гетерохроматиновых блоков как в интерфазных ядрах, так и на метафазных хромосомах (рис. 3, б; 4, б), что указывает на отсутствие гетерохроматинизации как самого чужеродного сателлита, так и прилегающих к нему хромосомных районов.

Интересно отметить, что по результатам компьютерного анализа в области предполагаемой интеграции *Sat* расположены ген *PAX9*, принадлежащий семейству *PAX* транскрипционных факторов, принимающих активное участие в формировании скелета и других органов в эмбриогенезе (Rodrigo et al., 2003), и кодирующая последовательность ДНК, подобная супрессору метастазов рака молочной железы (breast cancer metastasis suppressor) — *BRMS1L* (Meehan, Welch, 2003). В нашем случае можно предположить влияние трансгенной инсерции *Sat* на экспрессию генов *Pax 9* и *Brms 1l* в связи с повышенной частотой возникновения опухоли молочной железы у трансателлитных самок. Известно, что нерегулируемая экспрессия или мутации генов, контролирующих морфогенез во время эмбрионального развития, и онкосупрессоров, играет важную роль в возникновении опухолей (Samant et al., 2002; Meehan, Welch, 2003). Так, для большинства случаев инвазивных карцином и эпителиальных дисплазий было показано снижение или полное отсутствие экспрессии *Pax 9* (Gerber et al., 2002). Кроме того, в субтеломерной области хромосомы 12 находится кластер малоизученных импринтированных генов, влияющих на жизнеспособность, регуляцию пренатального роста и формирование мезодермальных и происходящих из клеток нервного гребня клеточных пулов (Georgiades et al., 2000; Croteau et al., 2002). Часто трансгенная инсерция в импринтированный район вызывает зависимое от пола родителя наследование трансгена и вызванных им эффектов. Причем в таких случаях трудно определить, влияет ли инсерция на импринтированные гены или же, наоборот, зависимые от пола родителя эффекты вызываются импринтированием трансгенной инсерции (Georgiades et al., 2000). Наблюдаемый нами положительный «бабушкин эффект» при наследовании *Sat* указывает на подобный импринтированному характер на-

следования *Sat*-инсерции и не исключает ее влияния на импринтированные гены хромосомы 12. В пользу последнего также говорят предположения о роли нарушения экспрессии отцовских аллелей импринтированных генов в изменении социального поведения мышей, особенно материнской заботы о потомстве (Lefebvre et al., 1998; Li et al., 1999; Walter, Paulsen, 2003), а также и описанные нами регулярные случаи каннибализма у *Sat*-матерей.

По данным литературы, известны еще две трансгенные инсерции в хромосому 12 мыши с нарушениями, возникающими в зависимости от пола родителя. В первом случае проксимальная инсерция в район 29сМ и дистальная в бэнд В3 приводили к возникновению мутации акродисплазии (*Adp*). *Adp* мыши были жизнеспособными, но имели нарушения (уродства) в формировании позвоночника, черепа и конечностей с вариабельной экспрессивностью и неполной пенетрантностью при наследовании от самца (DeLoia, Solter, 1990; Watanabe et al., 1994).

Во втором случае инсерция трансгена *LacZ* в более дистальный район хромосомы 12 также вызывала зависимость от пола родителя эффекты (Schuster-Gossler et al., 1996). Результатом инсерции являлось жизнеспособное, отстающее в росте потомство при наследовании от самца. Данный трансген встраивался рядом с геном *Gtl 2*, кодирующим множественные альтернативно сплайсирующиеся транскрипты (Schuster-Gossler et al., 1996; Takada et al., 2002).

В нашем случае встроенная чужеродная сателлитная ДНК характеризовалась нестабильным поведением при межгенерационной передаче в пяти поколениях трансгенных мышей. Преобладающий низкий уровень метилирования *Sat*-трансгена соответствовал его нестабильности. Кроме того, инсерция чужеродной сателлитной ДНК приводила к возникновению опухолей молочной железы у трансгенных самок. Учитывая интеграцию *Sat* в интерстициальную область хромосомы 12 мыши, содержащую гены *Pax 9* и *Brms 11*, снижение или полное отсутствие экспрессии которых приводит к опухолеобразованию, можно предположить негативное влияние *Sat* на экспрессию этих генов.

В целом наблюдаемые нами множественные эффекты у трансгенных самок независимо от пола родителя, вызванные *Sat*-инсерцией, находящейся в гемизиготном состоянии, указывают на возможную моноаллельную экспрессию данного хромосомного района. Выяснение причин и взаимосвязи описанных эффектов у *Sat*-трансгенных мышей требует дальнейшего молекулярного изучения сайта интеграции и влияния трансгена на экспрессию близлежащих генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48169).

Список литературы

Вайсман Б. П., Голинский Г. Ф. 1985. Техника микроинъекции клонированных фрагментов ДНК (чужеродных генов) в ядро оплодотворенной яйцеклетки мышей. Общие закономерности и контролирующие механизмы раннего эмбриогенеза млекопитающих в норме и патологии. В кн.: Сб. науч. тр. под ред. А. П. Дыбана. Л.: Медицина. 108—113.

Дарлингтон С. Д., Ла Кур Л. Ф. 1980. Хромосомы. Методы работы. Пер. с 6-го англ. изд. М.: Атомиздат. 216 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. Пер. с англ. М.: Мир. 480 с.

Попов А. В., Смирнов А. Ф., Сучкова И. О., Баранова Т. В., Сорокин А. В., Гайцхоки В. С., Паткин Е. Л. 2000. Моделирование гетерохроматиновых районов у трансгенных мышей. Генетика. 36 (8) : 1119—1125.

Сучкова И. О., Сломинская Н. А., Кустова М. Е., Баранова Т. В., Голубков В. И., Сорокин А. В., Васильев В. Б., Паткин Е. Л. 2004. Анализ нестабильности повторяющихся единиц чужеродной центромерной ДНК у трансгенных мышей и в трансфекторных клетках. Генетика. 40 (8) : 1034—1045.

Aigner B., Fleischmann M., Muller M., Brem G. 1999. Stable longterm germ-line transmission of transgene integration sites in mice. Transgen. Res. 8 : 1—8.

Allen M. J., Jeffreys A. J., Surani M. A., Barton S., Norris M. L., Collick A. 1994. Tandemly repeated transgenes of the human minisatellite MS32 (D1S8), with novel mouse gamma satellite integration. Nucl. Acids Res. 22 : 2976—2981.

Bennet S. T., Lucassen A. M., Gough S. C. L., Powell E. E., Undlein D. E. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at *IDDM2* is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. Nat. Genet. 9 : 284—292.

Chevalier-Mariette C., Henry I., Montfort L., Capgras S., Forlani S., Muschler J., Nicolas J. F. 2003. CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. Genome Biol. 4 : 53.

Collick A., Drew J., Penberth J., Bois P., Luckett J., Scaerou F., Jeffreys A., Reik W. 1996. Instability of long inverted repeats within mouse transgenes. EMBO J. 15 : 1163—1171.

Collick A., Norris M. L., Allen M. J., Bois P., Barton S. C., Surani M. A., Jeffreys A. J. 1994. Variable germline and embryonic instability of the human minisatellite MS32 (D1S8) in transgenic mice. EMBO J. 13 : 5745—5753.

Covarrubias L., Nishida Y., Mintz B. 1986. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83 : 6020—6024.

Covarrubias L., Nishida Y., Terao M., D'Eustachio P., Mintz B. 1987. Cellular DNA rearrangements and early developmental arrest caused by DNA insertion in transgenic mouse embryos. Mol. Cell. Biol. 7 : 2243—2247.

Croteau S., Andrade M. F., Huang F. et al. 2002. Inheritance patterns of maternal alleles in imprinted regions of the mouse genome at different stages of development. Mamm. Genome. 13 : 24—9.

Csank A. K., Henikoff S. 1998. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. Trends Genet. 14 : 200—204.

DeLoia J. A., Solter D. 1990. A transgene insertional mutation at an imprinted locus in the mouse genome. Development. (Suppl.): 73—79.

Eden A., Gaudet F., Waghmare A., Jaenisch R. 2003. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science. 300 : 455.

Ehrlich M. 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. Oncogene. 21 : 5400—5413.

Garrick D., Fiering S., Martin D. I., Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. Nat. Genet. 18 : 56—59.

Georgiades P., Watkins M., Surani M. A., Ferguson-Smith A. C. 2000. Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. Development. 127 : 4719—4728.

Gerber J.-K., Richter T., Kremmer E. 2002. Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. J. Pathol. 197 : 293—297.

Goldman M. A. 2002. Cancer: the chromatin connection. Trends Genet. 18 : 390—391.

Kearns M., Preis J., McDonald M., Morris C., Whitelaw E. 2000. Complex patterns of inheritance of an imprinted murine transgene suggest incomplete germline erasure. Nucl. Acids Res. 28 : 3301—3309.

- Lefebvre L., Viville S., Barton S. C., Ishino F., Keverne E. B., Surani M. A. 1998. Abnormal maternal behavior and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nat. Genet.* 20 : 163—169.
- Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancer. *Nature.* 396 : 643—648.
- Leonardt H., Cardoso M. K. 2000. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J. Cell. Biochem. (Suppl.):* 78—83.
- Li L., Keverne E. B., Aparicio S. A. et al. 1999. Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed *Peg3*. *Science.* 284 : 330—333.
- McLaren A. 1991. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *BioEssays.* 13 : 151—156.
- Meehan W. J., Welch D. R. 2003. Breast cancer metastasis suppressor 1: update. *Clin. Exp. Metastasis.* 20 : 45—50.
- Mitas M. 1997. Trinucleotide repeats associated with human disease. *Nucl. Acids Res.* 25 : 2245—2253.
- Murphy S. K., Jirtle R. L. 2003. Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays.* 25 : 577—588.
- Palmiter R. D., Wilkie T. M., Chen H. Y., Brinster R. 1984. Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree. *Cell.* 36 : 869—876.
- Pena R. N., Webster J., Kwan S., Korbel J., Whitelaw E. A. 2004. Transgene methylation in mice reflects copy number but not expression level. *Mol. Biotechnol.* 26 : 215—219.
- Petters R. M., Sommer J. R. 2000. Transgenic animals as models for human disease. *Transgen. Res.* 9 : 347—351.
- Pravtcheva D. D., Wise T. L. 2003. Transgene instability in mice injected with an *in vitro* methylated *Igf2* gene. *Mutat. Res.* 529 : 35—50.
- Promega protocols and applications guide. 1990. Promega. Madison, USA. 40—41.
- Reik W., Howlett S. K., Surani A. 1990. Imprinting by DNA methylation: from transgenes to endogenous gene sequences. *Development. (Suppl.):* 99—106.
- Rodrigo I., Hill R. E., Balling R., Münsterberg A., Imai K. 2003. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development.* 130 : 473—482.
- Samant R. S., Debies M. T., Shevde L. A., Verderame M. F., Welch D. R. 2002. Identification and characterization of the murine ortholog (*Brms1*) of breast-cancer metastasis suppressor 1 (*BRMS1*). *Int. J. Cancer.* 97 : 15—20.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning. In: A laboratory manual. 2nd ed. Gold Spring Harbor Lab. Press. 1 : 182—184.
- Schumacher A., Koetsier P. A., Hertz J., Doerfler W. 2000. Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of *de novo* imposed methylation patterns in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275 : 37 915—37 921.
- Schuster-Gossler K., Simon-Chazottes D., Guenet J.-L., Zachgo J., Gossler A. 1996. *Gtl2lacZ*, an insertional mutation on mouse Chromosome 12 with parental origin-dependent phenotype. *Mamm. Genome.* 7 : 20—24.
- Smith R. J., Konfortova G., Kelsey G. 2003. Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. *Genome Res.* 13 : 558—569.
- Takada S., Paulsen M., Tevendale M. et al. 2002. Epigenetic analysis of the *Dlk1-Gtl2* imprinted domain on mouse chromosome 12: implications for imprinting control from comparison with *Igf2-H19*. *Hum. Mol. Genet.* 11 : 77—86.
- Ugarkovic N., Plohl M. 2002. Variation in Satellite DNA profiles — causes and effects. *EMBO J.* 21 : 5955—5959.
- Virtaneva K., Amato E. D., Miao J., Koskiniemi M., Norio R. 1997. Unstable miniSatellite expansion causing recessively inherited myoklonus epilepsy, *EPMI*. *Nat. Genet.* 15 : 393—396.
- Walter J., Paulsen M. 2003. Imprinting and disease. *Seminars in Cell Develop. Biol.* 14 : 101—110.
- Watanabe T., Tartellin E., Neubuser A., Kimura M., Solter D. 1994. Fine genetic mapping defines the genetic order of Pax9, Tcf3a, and Acrodysplasia (*Adp.*) *Mamm. Genome.* 5 : 768—770.

Поступила 28 VI 2005

TRANSGENERATIONAL TRANSMISSION OF BOVINE SATELLITE DNA IN TRANSGENIC MICE

N. A. Slominskaya,^{1,*} I. O. Suchkova,¹ T. A. Klinskaya,¹ M. A. Zabezhinsky,² E. L. Patkin¹¹ Research Institute of Experimental Medicine RAMS and ² N. I. Petrov Oncological Institute RAMS, St. Petersburg;

* e-mail: slominska@mail.ru

Genetical, cytogenetical and molecular analysis was made for 5 generations of mice transgenic for bovine satellite DNA (Sat). In all cases transgenic mice were generated by crosses of transgenic males and females with normal (CBA × C57Bl) mice. No abnormalities in the founder development were noticed. A normal (near 50 %) ratio of transgenic and nontransgenic offsprings was observed in blastocysts. However, profound differences occurred in the rate of transgene bearing offsprings, depending on the sex of grandparents rather than of parents. The grandfather Sat transmission resulted in the appearance of 0—52.4 % transgenic grandchildren, whereas the grandmother transmission ended in the theoretically expected rate. This means that stabilization of transsatellite took place upon the female germ line transmission (a positive grandmother effect). It is essential that in hemizygous transsatellite mice Sat integration led to the occurrence of mammary tumors, inflammation of uterine horns, and infringement of mother care of transgenic females. Simultaneous FISH and G-banding showed Sat to be localized in the internal region of chromosome 12 near *Pax 9* and *Brms 11* genes. Commonly, these genes are implicated in tumorigenesis as their expression decreases. Thus, a kind of silencing effect of these genes' expression may be supposed.