

УДК 577.221

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕСТА И ХАРАКТЕРА ИНТЕГРАЦИИ ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЛОКУС ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА, У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

© 2008 г. А. Р. Галимов^{1, 2*}, А. А. Круглов^{1, 2}, Н. Л. Большева¹, О. Ю. Юркевич¹, Д. Я. Липиньш⁴, И. А. Муфазалов^{1, 2}, Д. В. Купраш¹, С. А. Недоспасов^{1, 3}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119899

³Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119992

⁴Центр исследования рака, Национальный институт рака, Фредерик, Мэриленд 21702, США

Поступила в редакцию 14.12.2007 г.

Принята к печати 04.03.2008 г.

Определена молекулярная организация, а также копияность и хромосомная локализация трансгенов локуса TNF/LT человека в геномах двух линий трансгенных мышей. В геноме одной из линий имеются две копии трансгена, которые организованы по принципу “голова-к-хвосту” и согласно кариотипированию интегрировали в восьмую хромосому; единственная копия трансгена в геноме второй линии, по данным кариотипирования, интегрировала в пятую хромосому. Эти мыши представляют собой модель для изучения физиологических функций фактора некроза опухолей и лимфотоксина.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей, лимфотоксин, человеческий трансген.

CHROMOSOMAL LOCALIZATION AND MOLECULAR ORGANIZATION OF HUMAN GENOMIC FRAGMENT CONTAINING TNF/LT LOCUS IN TRANSGENIC MICE, by A. R. Galimov^{1, 2*}, A. A. Kruglov^{1, 2}, N. L. Bolsheva¹, O. Yu. Yurkevich¹, D. J. Liepinsh⁴, I. A. Mufazalov^{1, 2}, D. V. Kuprash¹, S. A. Nedospasov^{1, 3} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; * e-mail: urrsus@gmail.com; ²Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, ³Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia; ⁴Basic Research Program, SAIC-Frederick, Inc., and Laboratory of Molecular Immunoregulation, Center for Cancer Research, NCI-Frederick, Frederick, Maryland 21702, USA). Molecular organization, copy number and chromosomal localization of human TNF/LT locus fragment were determined in genomes of two transgenic mouse lines. Genome of the first one contains two copies, organized in head-to-tail manner and determined on eighth chromosome by karyotyping; single transgene copy of the second line is observed on the fifth chromosome. These mice could serve as valuable model for studying both human tumor necrosis factor and lymphotoxin physiological functions.

Key words: TNF, LT α , human transgene

Белки TNF, LT α и LT β принадлежат к суперсемейству цитокинов фактора некроза опухолей. Близкосцепленные гены этих цитокинов у мыши локализованы внутри МНС (главный комплекс гистосовместимости) на 17-й хромосоме, а у человека – на 6-й [1–3]. Гомотример LT α , существующий только в растворимой форме, и гомотример TNF (как растворимый, так и мембраносвязанный) взаимодействуют с рецепторами TNF-R1 и TNF-R2 (также называемыми p55 и p75), в то время как мембраносвязанный

LT α в составе гетеротримера LT α_1 /LT β_2 взаимодействует с отдельным рецептором LT β R, принадлежащим к суперсемейству рецепторов TNFR [4, 5]. Хотя функции TNF и лимфотоксинов перекрываются, функции сигнальных путей, опосредованных этими цитокинами, можно разграничить: передача внутриклеточного сигнала через LT β R приводит к активации генов, необходимых, в первую очередь, для развития и поддержания структуры вторичных лимфоидных органов, в то время как передача сигнала от TNF через TNFR1 является ключевой для развития воспаления и защиты от патогенов [6–8].

* Эл. почта: urrsus@gmail.com

TNF служит основным молекулярным посредником в механизме развития септического шока (общего воспалительного статуса организма) в ответ на липополисахарид (LPS, компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий) [9]. LPS инициирует передачу сигнала через Toll4-R [10], что приводит к активации ряда транскрипционных факторов семейств NFkB/Rel и AP1 [11]. Активный NFkB1/RelA-гетеродимер проникает в ядро и взаимодействует с kB-сайтами в промоторе гена *TNF*, выполняя функцию главного индуктора TNF в ответ на LPS [12].

Поскольку TNF обладает провоспалительной активностью, а также способностью прямо влиять на пролиферацию и смерть некоторых неиммунных типов клеток (синовиальных фибробластов [13], клеток кишечного эпителия [14] и олигодендроцитов [15]), активно изучается роль TNF в патогенезе аутоиммунных заболеваний человека [16, 17]. Оказалось, что при ряде заболеваний локальная сверхпродукция TNF играет патологическую роль. К настоящему времени блокаторы TNF широко и успешно применяются в терапии ревматоидного артрита (РА), анкилозирующего спондилита, псориаза и некоторых других заболеваний [18].

Роль TNF в развитии этих заболеваний была показана на мышинных моделях *in vivo* в работах лаборатории Коллиаса [19], где было получено несколько линий трансгенных мышей, содержащих (в дополнение к мышинному) ген *TNF* человека. В линиях Tg197 и Tg1480, в частности, 3'-нетранслируемая область (untranslated region, UTR) гена человека, была заменена на 3'-UTR β -глобина [19]. Эта мутация увеличивает стабильность и эффективность трансляции мРНК *TNF* и, таким образом, обуславливает хроническую сверхэкспрессию *TNF*, что приводит к тяжелому эрозивному хроническому полиартриту. Использование TNF-блокаторов полностью предотвращает развитие болезни [19].

Для сравнения регуляции экспрессии генов *TNF* и *LT* у человека и мыши в нашей лаборатории получены две линии мышей, обозначенные ZC и ZW, которые несут трансгены геномного локуса TNF/LT человека, содержащего гены *TNF*, *LT α* и *LT β* под контролем природных регуляторных последовательностей (т.е. без использования искусственных промоторов и других регуляторных элементов). В настоящей работе мы определили копийность и изучили молекулярную организацию, а также хромосомную локализацию трансгенов в геномах двух линий трансгенных мышей. В дальнейшем мы предполагаем оценить пригодность этих линий в качестве моделей аутоиммунных заболеваний человека, для изучения действия блокаторов TNF человека и лимфотоксинов, а также регуляции генов *TNF/LT* локуса человека и мыши *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши и их генотипирование. Получение линий мышей ZC и ZW и описание фенотипа будут подробно представлены в отдельной статье. Для определения трансгена использовали ПЦР с праймерами HSTS1 (5'-GAA GGT ACC AGC ACC TGT GGA GC) и HSTS2 (5'-TGT GGC TGG ATG AAA TCT AGA GGC), позволяющими идентифицировать локус TNF/LT человека [20]. Амплификацию проводили по программе: 94°C, 3 мин, затем 34 цикла по схеме (94°C, 30 с, -60°C, 1 с, -72°C, 40 с), -72°C, 5 мин. В ходе работы разработана также ПЦР, которая позволяет различать две полученные трансгенные линии (см. ниже).

Первичная культура эмбриональных фибробластов мыши (MEF). Использовали эмбрионы 12-дневного возраста, которые переносили в раствор Хенкса с антибиотиком. Удаляли головы, конечности и внутренние органы, оставшуюся массу измельчали ножницами и переносили в раствор трипсина и EDTA на 30–40 мин при 37°C, после чего осаждали клетки центрифугированием при 150g в течение 5 мин. Затем ресуспендировали клетки в среде, содержащей 90% DMEM, 10% FBS и 2 mM D-глутамин, до конечной концентрации 300 тыс. клеток/мл и переносили во флакон для культивирования.

Саузерн-блот-гибридизация. Для точного картирования концов вставки в космиде 031A, использованной для получения трансгена, проводили секвенирование космиды с использованием вектор-специфических праймеров pWE15_1 (5'-AAC TGT GAT AAA CTA CCG C) и pWE15_2 (5'-CCT GAC GTC TAA GAA ACC), и далее подтверждали с помощью ПЦР на геномной ДНК из трансгенных мышей (данные не показаны).

Пробы, гибридизующиеся вблизи концов трансгенной вставки, амплифицировали с помощью праймеров 5'-CAG TAG ACA GCT GAG TCA CC, 5'-AGT AAA GAT AGA GGA AGT GGG (для LT α конца, длина 341 п.н.) и 5'-GCC TTG GGA CTT GGA GTA GA, 5'-CTG ATT AGC GCA GCA GTT CC (для LT β -конца, длина 318 п.н.), затем очищали от продуктов неспецифической амплификации при помощи электрофореза в 2%-ном агарозном геле и элюировали из геля, используя коммерческий набор QIAquick Gel Extraction Kit ("Qiagen", www.qiagen.com) для специфической обратимой сорбции ДНК на силикагеле в присутствии хаотропных солей. Радиоактивно меченные пробы получали при помощи синтеза со случайной олигонуклеотидной затравкой (Megaprime™ DNA Labelling Systems, "Amersham Biosciences", USA) с использованием [α -³²P]dATP. Пробы очищали от невключившейся радиоактивной метки методом гель-фильтрации на сефарозных колонках Illustra ProbeQuant™ G50 ("Amersham Biosciences").

Для изучения геномной организации ДНК мышей из каждой трансгенной линии подвергали гид-

Число копий трансгена, нормированное на число копий гена β -актина (независимые измерения)

Линия мышей	Число копий трансгена (независимые измерения)										
ZC	1.39	1.34	1.36	1.48	1.50	1.59	1.76	1.85	2.17	1.87	
ZW	0.31	0.70	0.85	0.92	1.11	1.20	1.38	1.41	1.52	1.56	2.16

ролизу в течение ночи рестриктазой PstI, взятой в соотношении 10 е.а/мкг ДНК. В каждой реакции использовали 6 мкг ДНК. Далее продукты расщепления разделяли на 0.7%-ном агарозном геле и переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану (HybondTM-N+, “Amersham Biosciences”) по методу Саузерна [21]. Мембраны гибридизовали с пробами на LT α - и LT β -концы трансгена, меченными [α -³²P]dATP, в буфере PerfectHybTM plus (“Sigma-Aldrich”, www.sigmaaldrich.com) при 65°C в течение ночи, в соответствии с рекомендациями изготовителя буфера. Изображение картины гибридизации получали при помощи Cyclone Storage Phosphor System (“Packard Bioscience”, Canada), мембрану экспонировали с накапливающим экраном (CycloneTM Storage Phosphor Screen, “Meriden”, USA) в течение 24 ч.

В опытах по саузерн-блот-гибридизации для определения копийности все операции выполняли, как описано выше. Геномную ДНК мышей линий ZC, ZW, C57Bl/6 и человека расщепляли рестриктазой PstI, а гибридизационная проба длиной 430 п.н. была выбрана в пределах внутреннего фрагмента трансгена длиной около 3.3 т.п.н., получающегося при действии PstI. Для нормирования использовали фрагмент гена цитохрома с мыши (амплифицирован с помощью праймеров 5'-CTT GTG TGT CCC CAA CTT TC и 5'-AGG AAG GAG AAG AGG CTG AG) длиной 500 п.н., находящийся внутри фрагмента PstI длиной около 4.7 т.п.н. Для измерения интенсивности полос на саузерн-блоте, а также для определения количества ДНК в агарозном геле использовали программу ImageQuant 3.3.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием красителя SYBRGreen I. Для этого к 50 нг геномной ДНК, полученной из мышей, содержащих трансген локуса человека, добавляли немодифицированные олигонуклеотиды в конечной концентрации 500 нМ, смесь LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Master Mix (“Roche Applied Science”, Germany), содержащую необходимые компоненты для ПЦР, и краситель SYBRGreen I, в конечном объеме 10 мкл. Для амплификации фрагмента гена LT α человека использовали праймеры hLta_F: 5'-AAC TTG GAA AAA TCC AGA AAG AAA и hLta_R: 5'-TCC CCT CCC TGC CTC TAG T, а для амплификации контрольного фрагмента гена β -актина мыши – праймеры b-actin_F: 5'-CTC CTG AGC GCA AGT ACT CTG TG и b-actin_R: 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC. Амплификацию проводили на приборе LightCycler (“Roche Applied

Science”), используя следующую программу: 94°C, 3 мин, 44 цикла по схеме (94°C, 30 с, 60°C, 30 с, 72°C, 30 с).

Статистический анализ данных ПЦР в реальном времени. Независимые измерения числа копий трансгена, нормированные на соответствующие значения для β -актина, приведены в таблице. Выборки сравнивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни (<http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>). Выборки различаются на пятипроцентном уровне значимости. Далее, поскольку копийность может принимать только дискретные значения и значения обеих выборок лежат ниже 2.2, можно утверждать, что копийность одной из линий равна единице, а другой – двум. С помощью критерия Колмогорова-Смирнова (http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.n.plot_form.html) можно оценить приближенность выборки к нормальной. Выборка ZW удовлетворяет параметру H_0 о соответствии нормальной выборке с величиной $p = 0.81$, а выборка ZC – с величиной $p = 0.77$. С учетом вышесказанного, среднее значение для ZC = 1.63 можно аппроксимировать до двух, а среднее для ZW = 1.19 – до одного.

Хромосомные препараты готовили из эмбриональных фибробластов мыши (см. выше). Клетки выращивали в культуральных флаконах (площадь 75 см²) в среде, содержащей 90% DMEM, 10% FBS и 2 mM L-глутамин, до 70% конфлюэнтности, после чего их осторожно промывали PBS и добавляли 2 мл подогретой до 37°C смеси 0.25% трипсина (“HyClone”, USA). Инкубировали 2–3 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе, при этом от пластика откреплялись преимущественно клетки, находящиеся на стадии митоза, тогда как остальные оставались прикрепленными. Затем суспензию переносили в пробирку центрифугировали 5 мин. при 150 g и комнатной температуре на центрифуге Eppendorf 5810R. Супернатант удаляли, оставляя 300 мкл, и ресуспензировали осадок в этом остатке раствора, после чего добавляли суспензию клеток к 5 мл 0.075 M KCl на 15 мин. Далее опять центрифугировали (условия см. выше), осторожно ресуспензировали пипеткой осадок в 300 мкл раствора. По каплям добавляли 1 мл фиксатора (смесь этанола и уксусной кислоты 3 : 1), а затем доливали еще 4 мл фиксатора и оставляли на 15 мин. Повторяли фиксацию три раза. Суспензию клеток в третьем фиксирующем растворе оставляли на ночь. На следующий день наносили каплю суспензии на стекла, которые предварительно держали над водяным паром, затем снова

насыщали паром (пока суспензия не растеклась по стеклу) и чуть подсушивали. После этого наносили на стекло каплю фиксирующего раствора, опять держали над паром и высушивали. Стекла заливали этанолом и хранили на -20°C .

Гибридизация флуоресцентных проб *in situ*. В качестве матрицы для приготовления гибридизационной пробы использовали космиду 031A, содержащую локус TNF/LT человека длиной 38 т.п.н. [22]. Пробу метили биотином с использованием набора для мечения Biotin DecaLabel™ DNA Labeling Kit ("Fermentas", Germany). Гибридизационная смесь (ГС) состояла из буфера (50%-ный формамид, $2\times\text{SSC}$, 50 мМ Na_2HPO_4 , 10% декстрансульфат), пробы и 50-кратного избытка конкурентной ДНК ("Human CotI DNA", Invitrogen), обогащенной повторяющимися последовательностями генома человека. Денатурированную 5 мин при 80°C смесь инкубировали при 37°C для прегибридации пробы и ДНК-конкурента. Затем 15 мкл ГС помещали на хромосомный препарат, предварительно денатурированный в смеси 50% формамида/ $2\times\text{SSC}$ и обезвоженный этанолом под покровное стекло. Края стекла обрабатывали резиновым клеем, а препарат помещали в инкубатор при 37°C на сутки.

Отмывали препарат при 50°C в нескольких смесях 50% формамида и $2\times\text{SSC}$ и затем $2\times\text{SSC}$. Окрашивали по принципу двойного бутерброда. Вначале добавляли авидин, слитый с красным флуоресцентным красителем алекса (avidin, Alexa Fluor 488 conjugate, invitrogen), затем биотинилированные антитела к авидину (Rabbit Anti-Avidin Antibody, Biotin Conjugated, "ABR-Affinity BioReagents", USA) и снова конъюгат авидин-алекса инкубировали в буфере, содержащем обезжиренное молоко, $4\times\text{SSC}$ и детергенты Tween 20 и Triton X-100 в концентрации 0.05%. После окрашивания препараты заключали в смесь 0.21 М раствора DABCO и 90% глицерин и анализировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика трансгенных линий мышей

Основная цель настоящей работы состояла в том, чтобы максимально полно охарактеризовать участки интеграции клонированного сегмента хромосомы 6 человека в геном двух линий трансгенных мышей. Второй, более технической задачей, была разработка методики, позволяющей различать линии ZC и ZW. Первоначально наличие трансгенного локуса определяли по продукту ПЦР, в которой с помощью праймеров HSTS1 и HSTS2 амплифицировали внутренний участок трансгена.

Поскольку мы не знали последовательностей геномных участков, с которыми граничит трансген в геноме мышей линий ZC и ZW, в дополнение к методу ПЦР мы могли использовать только доста-

точно громоздкий, но надежный метод саузерн-блот-гибридизации.

Для получения необходимого количества ДНК из эмбрионов трансгенных мышей ZC и ZW, а также мышей дикого типа были получены клеточные линии эмбриональных фибробластов (MEF).

На следующем этапе необходимо было выбрать подходящие ДНК-пробы для гибридизации, и здесь мы учитывали тот факт, что этот локус генома человека содержит много Alu-повторов [23]. Мы попытались найти на обоих концах трансгена участки, не содержащие повторяющихся элементов. Поиск повторов производился с помощью интернет-сервиса repeat masker (www.repeatmasker.org). Для расщепления геномной ДНК были выбраны рестриктазы, сайты которых отстоят от края трансгена дальше, чем последовательности гибридизационных проб. Таким образом, этот метод позволил нам оценить размер фрагментов, содержащих пограничные области между трансгеном и геномной ДНК для обоих концов трансгена, а также определить стык между трансгенами, в том случае, если бы они интегрировались в виде тандема. Результаты саузерн-блот-гибридизации геномной ДНК, расщепленной PstI, с гибридизационными пробами к концевым фрагментам трансгена, а также схема расположения проб представлены на рис 1.

Мы обнаружили, что в геном мыши линии ZC трансгены интегрируют в виде тандема: после действия рестриктазы PstI на геномную ДНК мыши ZC при гибридизации как с пробой к LT α -, так и к LT β -концевым участкам трансгена, наблюдали полосу, предсказанную для границы между трансгенами, соединенными "голова-к-хвосту". В то же время, в опытах с мышами ZW такая полоса отсутствует (рис. 1б). Кроме того, в обеих трансгенных линиях не наблюдали полос, характерных для границ между трансгенами, соединенными по принципу "голова-к-голове" и/или "хвост-к-хвосту".

Для того чтобы подтвердить результаты, полученные с помощью саузерн-блот-гибридизации, использовали ПЦР, в результате которой была амплифицирована пограничная область между трансгенами, соединенными "голова-к-хвосту". Действительно, ожидаемый продукт (113 п.н.) наблюдался только при исследовании линии ZC (рис. 2а). Был сделан предварительный вывод о том, что в линии ZC имеются две или более копии трансгена, расположенных тандемно, и о том, что в линии ZW происходит интеграция одиночной (нетандемной) вставки (или вставок). Одновременно разработан простой ПЦР-тест, позволяющий различать линии трансгенных мышей ZC и ZW. Этот результат был подтвержден далее при прямом секвенировании продукта ПЦР, соответствующего пограничному участку (рис. 2б).

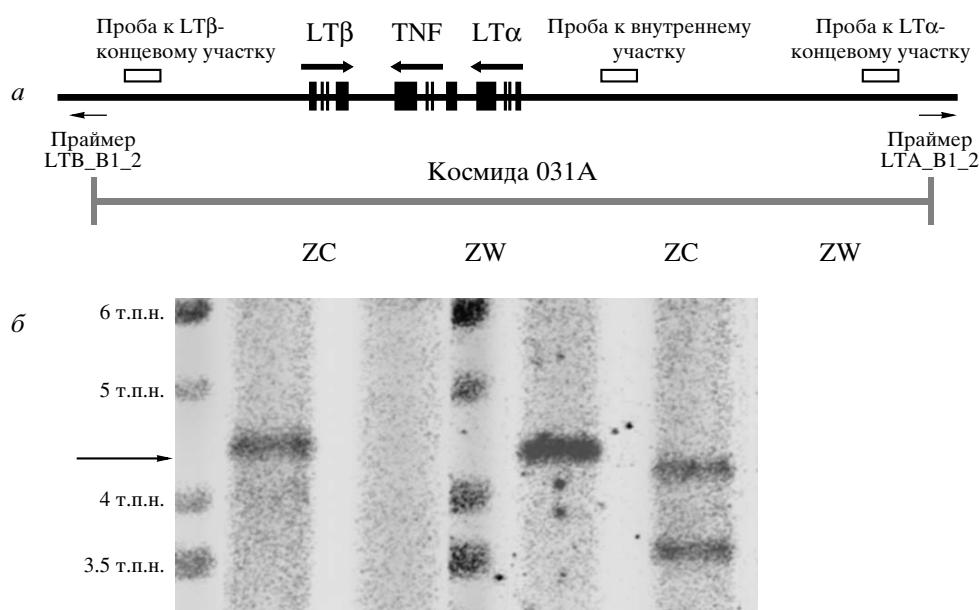
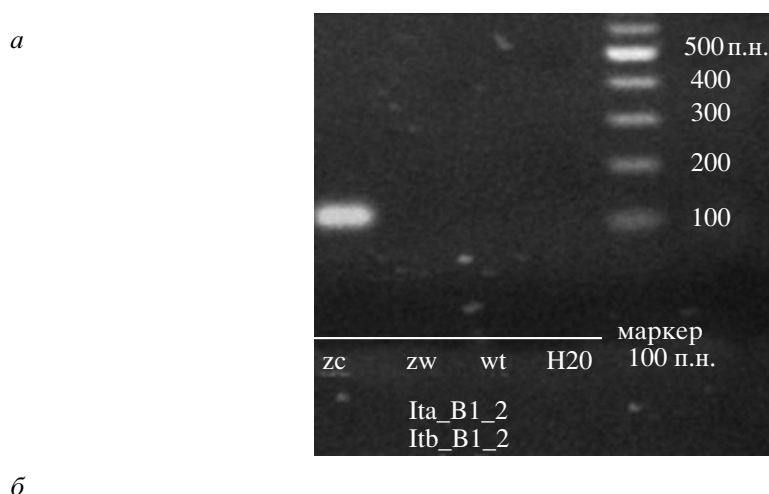


Рис. 1. Определение молекулярной организации трансгенов в линиях ZC и ZW мышей с использованием метода саузерн-блот-гибридизации. *a* – Схема расположения гибридных проб и праймеров в последовательности трансгена. *б* – Саузерн-блот-гибридизация LTα-концевой пробы (слева) и LTβ-концевой пробы (справа) с расщепленной PstI геномной ДНК мышей ZC и ZW.



LTα-концевой фрагмент						LTβ-концевой фрагмент				
GATCCCTATAGTGAGTCGTATTATGCGG						CCGCAATTAAACCTCACTAAAGG				
35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85

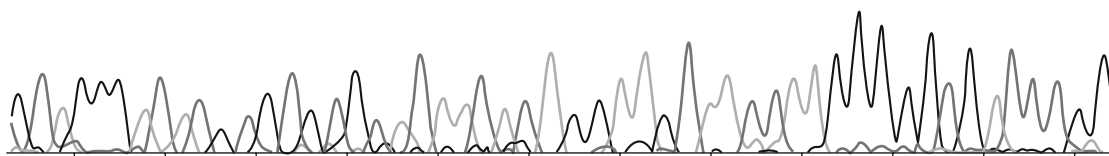


Рис. 2. Определение пограничной области между трансгенами, соединенными по принципу “голова-к-хвосту”. *a* – Результаты ПЦР по амплификации области между трансгенами, соединенными по типу “голова-к-хвосту”. Использовали праймеры 5'-TTGGCCATACTAGTCTTGAACC и 5'-AAAAGTCCACAATCCAGCACAG. Ожидаемая полоса (113 п.н.) наблюдается только в случае ZC-линии. *б* – Секвенированная последовательность ПЦР-продукта, соответствующего пограничному участку между трансгенами.

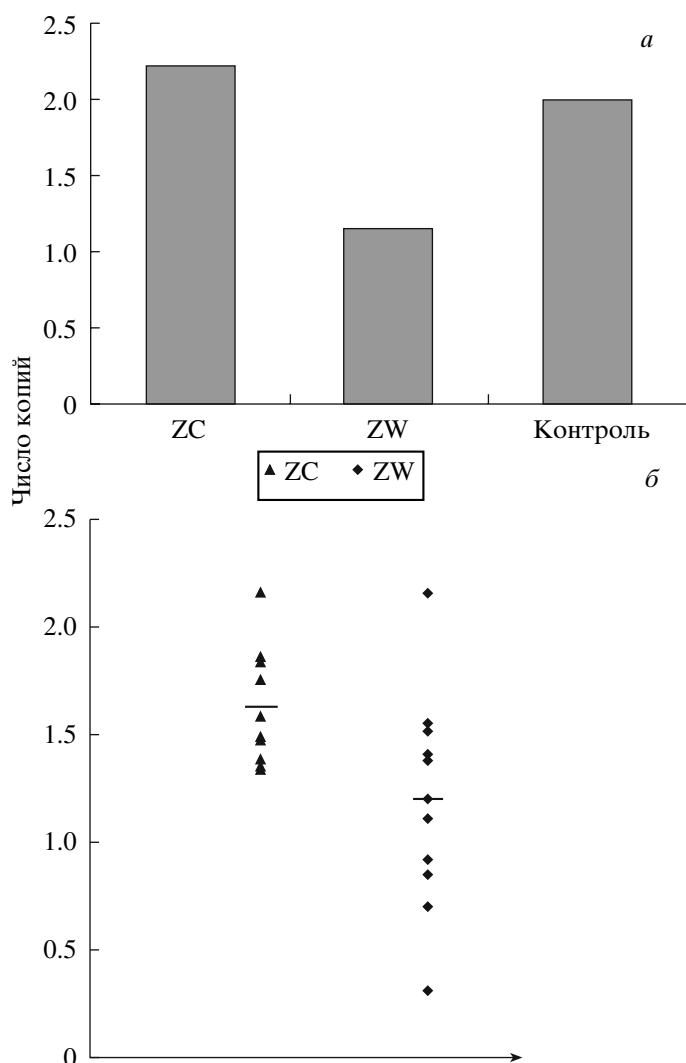


Рис. 3. Определение копийности трансгена в линиях ZC и ZW мыши с использованием методов саузерн-блот-гибридизации и ПЦР в реальном времени. *а* – На графике отображены результаты опыта по определению копийности трансгена в линиях ZC и ZW мыши с учетом нормировки на количество ДНК, нанесенной в лунку геля, а также на интенсивность сигнала к гену цитохрома с человека (+контроль) (см. Экспериментальная часть). *б* – Указаны независимые измерения числа копий трансгена у мышей ZC- и ZW-линий с помощью количественной ПЦР (данные нормированы на соответствующие значения числа копий гена β -актина).

Определение числа копий трансгена в линиях ZC и ZW мышей

На следующем этапе мы более точно определили число копий трансгена у мышей ZC и ZW. Во-первых, это число оценивали путем сравнения на саузерн-блоте интенсивности полос, соответствующих внутреннему фрагменту трансгена, полученному при расщеплении PstI (рис. 3а). Для каждой из линий результат измерения копийности нормировали

на количество ДНК в образце, внесенном в лунку агарозного геля, а также на интенсивность полосы, полученной при гибридизации с пробой к гену цитохрома с мыши, который имеется в каждой из линий в двух копиях (см. “Экспериментальная часть”). Кроме того, в качестве положительного контроля использовали ДНК человека, на диплоидный набор которой приходится две копии TNF/LT-локуса. Таким образом, было установлено абсолютное число копий в линиях мыши. Анализ саузерн-блотов показал, что ZC содержит две, а ZW – одну копию трансгена. Это согласуется с результатами саузерн-блот-гибридизации, в которой использовали пробы к концевым фрагментам трансгена. Кроме того, эти данные согласуются с данными ПЦР, подтверждающими тандемную организацию трансгенов в геноме линии ZC, но не ZW (см. выше). Во-вторых, на тех же препаратах ДНК проводили ПЦР в количественном варианте (рис. 3б), результаты которой согласуются с копийностью 1 и 2 для линий ZW и ZC, соответственно (см. “Экспериментальная часть”). Таким образом, нами получены мыши, содержащие одну и две копии трансгена.

Визуализация трансгенов с помощью метода FISH

Для того чтобы визуализировать трансгены *in situ*, а также определить их хромосомную локализацию в обеих трансгенных линиях, применяли метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Для приготовления хромосомных препаратов использовали эмбриональные фибробласты (MEF) мыши, а в качестве матрицы для мечения – исходную космиду A031 [22], содержащую весь локус TNF/LT человека. На метафазных пластинках мы обнаружили по одному сигналу на диплоидный набор в обеих трансгенных линиях (рис. 4а, слева; рис. 4в и рис. 5а, верху; рис. 5в), что подтверждает данные по саузерн-блот-гибридизации о том, что имеется лишь одно место интеграции трансгена в геномы мышей ZC, и ZW. По результатам кариотипирования, в линии ZC трансген интегрировал в восьмую (рис. 4а, внизу), а в линии ZW – в пятую (рис. 5а, внизу) хромосому соответственно.

Поскольку локус содержит большое количество повторяющихся последовательностей – около 44%, меченую пробу предварительно гибридизовали с препаратом ДНК, обогащенным повторами геномной ДНК человека. В результате поиска повторяющихся последовательностей ДНК в TNF/LT-локусе человека показано, что LTB- и LTA-концевые области трансгена содержат, в основном, идущие друг за другом Alu-повторы, которые в сумме составляют около 10 т.п.н., что согласуется с ранее опубликованными результатами нашей лаборатории по изучению геномного локуса TNF/LT человека [23]. Далее, мы предположили, что, используя меченую

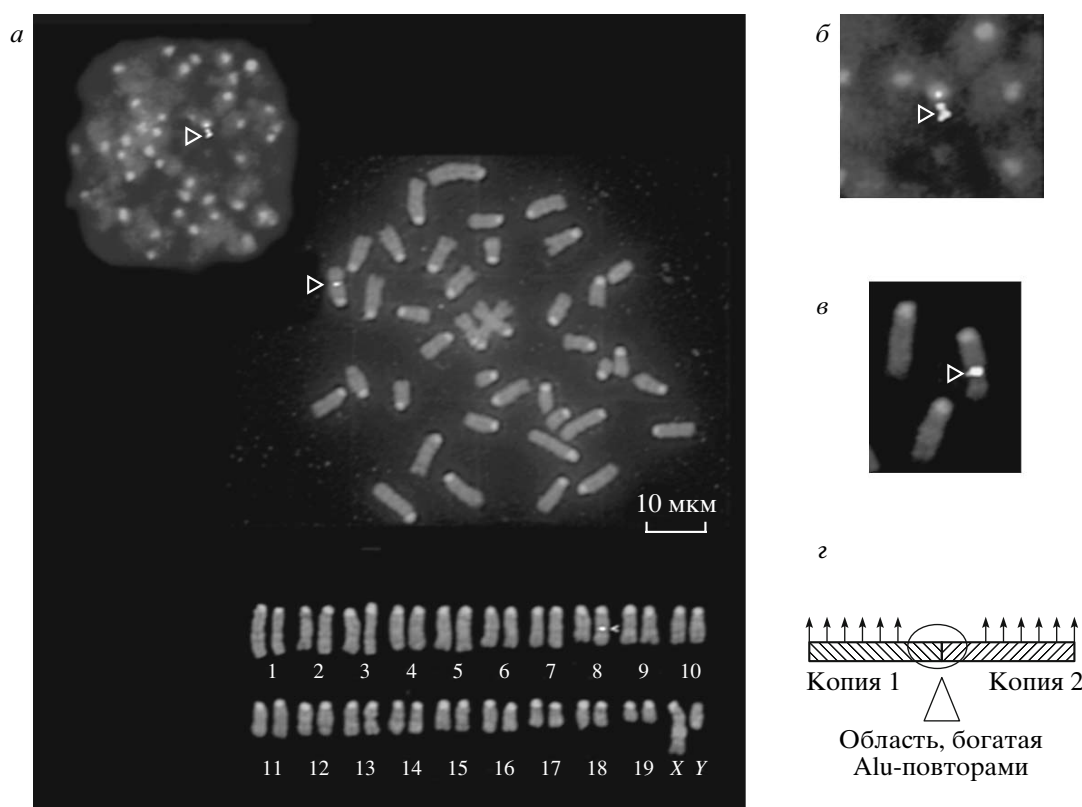


Рис. 4. Визуализация трансгена в MEF линии ZC с помощью метода FISH. *а* – Показано профазное ядро (слева, овал), митотические хромосомы MEF, выделенные из мыши ZC-линии (справа), а также результат кариотипирования (внизу). Хромосома 8, содержащая трансген, указана стрелкой. В менее конденсированном профазном ядре видно четыре отдельных сигнала от трансгенов (по два сигнала на гаплоидный набор, указаны стрелкой), в то время как на более компактизованных митотических хромосомах – два сигнала (один сигнал на гаплоидный набор); см. объяснения в тексте. *б* – Увеличенное изображение сигналов от трансгенов в профазном ядре. *в* – Увеличенное изображение сигналов от трансгенов на метафазных пластинках. *г* – Схема тандема из двух трансгенов. Пограничная область, обогащенная Alu-повторами (выделена овалом), не визуализируется флуоресцентным зондом (см. объяснения в тексте). Области, меченные флуоресцентным зондом, обозначены вертикальными стрелками.

флуоресцентную пробу, предварительно гибридизованную с препаратом повторов генома человека, в менее конденсированном (по сравнению с метафазными хромосомами) хроматине профазного клеточного ядра можно будет визуализировать обе копии трансгена, образующие тандем по принципу “голова-к-хвосту” (рис. 4г). На хромосомном препарате, полученном из клеток линии ZC, было обнаружено клеточное ядро на такой стадии профазы, в которой центромерные области хромосом уже успели перейти в конденсированное состояние, тогда как ядерная мембрана еще оставалась целостной. При этом наблюдалось четыре сигнала, расположенных близко друг к другу возле одной из центромер. Поскольку в профазном ядре содержится четыре набора хромосом, число трансгенов в нем должно быть равно четырем (два тандема по две копии трансгена в каждом) в ZC-линии, что мы и наблюдали. Именно четыре копии трансгена в профазном ядре визуализируются в виде четырех отдельных сигналов (см. рис. 4а, б). В то же время, на метафазных

пластинках наблюдался один сигнал на диплоидный набор (рис. 4а, в). Таким образом, нам удалось визуально подтвердить тандемную организацию двух трансгенов в ZC-линии трансгенных мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

“Мышиные” модели являются излюбленным инструментом для изучения физиологии и патофизиологии млекопитающих. С другой стороны, ряд биоинформатических постгеномных исследований ставит вопрос о допустимости использования данных, полученных на мышах, для объяснения физиологических процессов, происходящих в клетках или организме человека. Так, было показано, что лишь треть всех сайтов связывания четырех консервативных транскрипционных факторов, специфичных для печени, обнаруживаются в гомологичных положениях в промоторах конкретных генов человека и мыши, находящихся под контролем этих факторов [24].

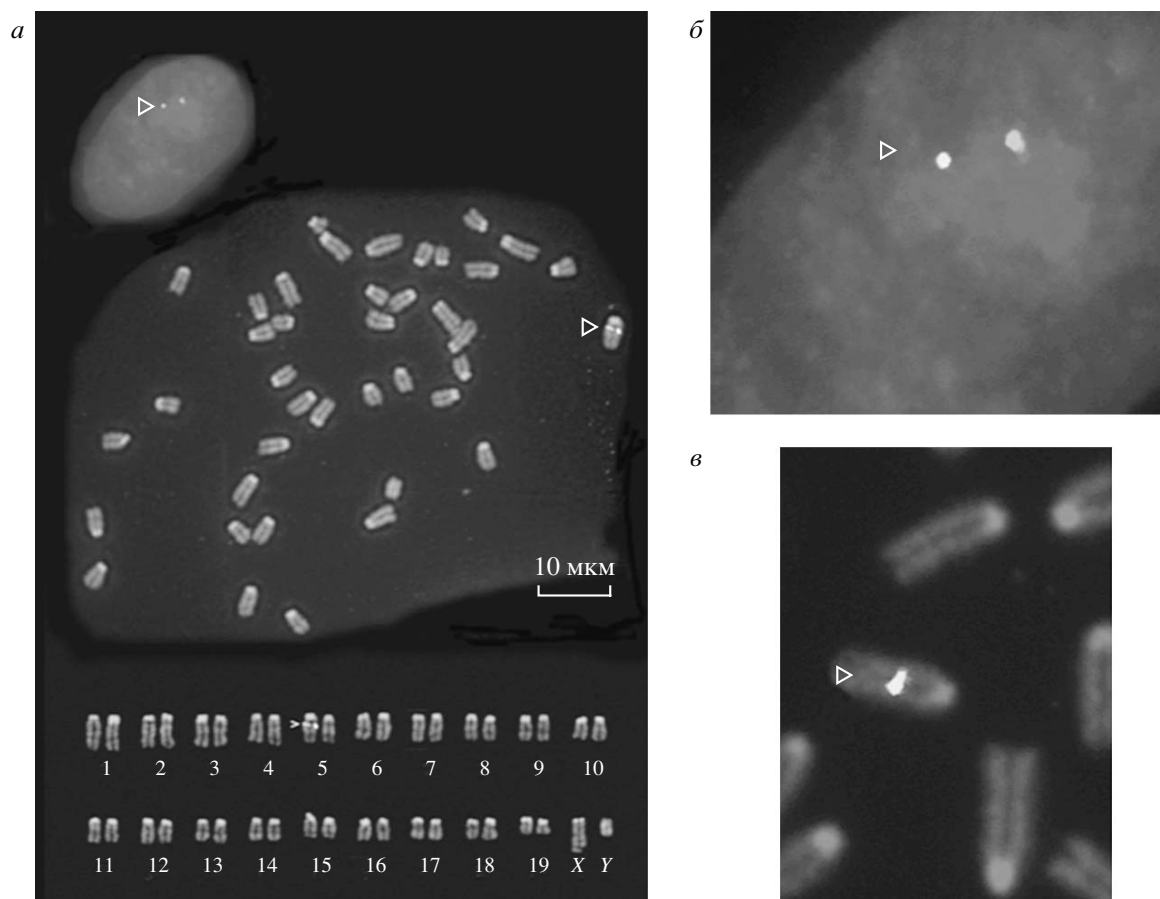


Рис. 5. Визуализация трансгена в MEF линии ZW с помощью метода FISH. *а* – Профазное ядро (вверху) и митотические хромосомы (внизу) MEF, полученные из мыши линии ZW. Внизу представлен результат кариотипирования (пятая хромосома, содержащая трансген, указана стрелкой). И в ядре, и на метафазной пластинке видно два сигнала, следовательно, на диплоидный набор приходится один сигнал. Число сигналов в менее компактизованном профазном хроматине такое же, как и в метафазных хромосомах. *б* – Увеличенное изображение сигналов от трансгенов в профазном ядре. *в* – Увеличенное изображение сигналов от трансгенов в на метафазных пластинках.

Одним из аспектов сравнительной биологии TNF является то, что чувствительность к LPS у человека и мыши сильно различается (летальная доза для мыши в 200 раз превышает таковую для человека) [6, 25]. В другой работе [26] было показано, что сублетальные дозы LPS для кролика и мыши, сильно отличающихся по чувствительности к этому эндотоксину, вызывают одинаковую продукцию TNF [26]. Это указывает на то, что межвидовые отличия в чувствительности к LPS не связаны с разной реакцией сосудов на TNF, а, скорее, определяются различиями в регуляции передачи сигнала или в регуляции экспрессии TNF.

Некоторые проведенные ранее эксперименты *in vivo* и *in vitro* указывают на то, что характер экспрессии генов *TNF* человека и мыши качественно сходен, хотя количественных сравнений сделать не удалось. Так, в ранних работах нашей лаборатории была выявлена высокая гомология последовательностей промоторов *TNF* человека и мыши, а также идентифицированы *in vitro* консервативные кВ-сай-

ты, удаление которых существенно влияет на LPS-опосредованную экспрессию конструкций промотор-репортер [27].

На трансгенных по TNF человека мышцах Tg1278 [19] *in vivo* было показано, что происходит совместная индукция эндогенного (мышь) и трансгенного (человека) TNF в ответ на LPS. Однако фрагмент генома человека, использованный в качестве трансгена в мышцах Tg1278, не содержит дистальной области промотора *TNF*, которая отвечает за максимальную LPS-индукцию в макрофагах. Этот факт может объяснить, почему у этих мышей, содержащих 50 копий трансгена, уровень экспрессии *TNF* человека сравним с уровнем экспрессии эндогенного *TNF* мыши. Кроме того, фенотип этих мышей характеризуется фоновой экспрессией *TNF* в тимусе, селезенке и почках, что, вероятно, связано с высоким содержанием копий трансгена [19]. Таким образом, ZC- и ZW-мыши представляют собой более “правильную” модель экспрессии *TNF*, поскольку трансгенный локус у этих мышей содержит полную дистальную область

промотора, а копияность трансгена – одна и две копии генов человека у ZW и ZC соответственно – идеально удобна для сравнительного анализа экспрессии.

Второе важное отличие мышей ZC и ZW от мышей линии Tg1278 заключается в том, что, помимо гена *TNF*, трансгены ZC и ZW дополнительно несут гены лимфотоксинов. Поэтому после скрещивания с мышами, дефицитными по генам *LT*, гибридные мыши могут быть использованы для изучения действия блокаторов *LTβ* человека, роль которых в развитии патологии РА и воспалительного колита показана на мышиных моделях [28–30]. Для этих опытов, а также для опытов по блокировке *TNF* человека, этих трансгенных мышей целесообразно скрещивать с мышами, несущими делецию всего локуса *TNF/LT* [31]. Такие мыши будут “гуманизированы” по генам этого важного локуса.

Таким образом, трансгенные мыши ZC и ZW представляют собой перспективную модель *in vivo* для изучения сравнительной экспрессии *TNF* человека и мыши, а также действия блокаторов *TNF* и *LT* человека.

Мы благодарим Т. Спиза (Т. Spies) за предоставление космиды 031A, а также Д. Пенькова и Р. Казаряна за помощь в работе.

Работа получила финансовую поддержку Программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН и Медицинского института Говарда Хьюза, а также Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 07-04-12208-офи и 08-08-00391).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Spies T., Morton C.C., Nedospasov S.A., Fiers W., Pious D., Strominger J.L. 1986. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 8699–8702.
- Muller U., Jongeneel C.V., Nedospasov S.A., Lindahl K.F., Steinmetz M. 1987. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature*. **325**, 265–267.
- Nedospasov S.A., Hirt B., Shakhov A.N., Dobrynin V.N., Kawashima E., Accolla R.S., Jongeneel C.V. 1986. The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7713–7725.
- Browning J.L., Ngam-ek A., Lawton P., DeMarinis J., Tizard R., Chow E.P., Hession C., O’Brine-Greco B., Foley S.F., Ware C.F. 1993. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*. **72**, 847–856.
- Crowe P.D., Van Arsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. 1994. A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science*. **264**, 707–710.
- Rothe J., Lesslauer W., Lotscher H., Lang Y., Koebel P., Kontgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., Bluethmann H. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. **364**, 798–802.
- Beutler B., Cerami A. 1989. The biology of cachectin / TNF-a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 625–655.
- Ware C.F. 2005. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 787–819.
- Mozes T., Ben-Efraim S., Tak C.J., Heiligers J.P., Saxena P.R., Bonta I.L. 1991. Serum levels of tumor necrosis factor determine the fatal or non-fatal course of endotoxic shock. *Immunol. Lett.* **27**, 157–162.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., et al. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. **282**, 2085–2088.
- Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 588–593.
- Kuprash D.V., Udalova I.A., Turetskaya R.L., Kwiatkowski D., Rice N.R., Nedospasov S.A. 1999. Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **162**, 4045–4052.
- Kontoyiannis D., Kollias G. 2000. Fibroblast biology. Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: leading role or chorus line? *Arthritis Res.* **2**, 342–343.
- Piguet P.F., Vesin C., Guo J., Donati Y., Barazzzone C. 1998. TNF-induced enterocyte apoptosis in mice is mediated by the TNF receptor 1 and does not require p53. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3499–3505.
- Robbins D.S., Shirazi Y., Drysdale B.E., Lieberman A., Shin H.S., Shin M.L. 1987. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J. Immunol.* **139**, 2593–2597.
- Feldmann M., Maini R.N. 2001. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 163–196.
- Zheng L., Fisher G., Miller R.E., Peschon J., Lynch D.H., Lenardo M.J. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature*. **377**, 348–351.
- Feldmann M., Steinman L. 2005. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature*. **435**, 612–619.
- Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E., Kiousis D., Kollias G. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* **10**, 4025–4031.
- Udalova I.A., Kuprash D.V., Turetskaya R.L., Nedospasov S.A. 1991. An STS in the human TNF locus located at 6p21.3. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4784.
- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.
- Spies T., Blanck G., Bresnahan M., Sands J., Strominger J.L. 1989. A new cluster of genes within the human

- major histocompatibility complex. *Science*. **243**, 214–217.
23. Nedospasov S.A., Shakhov A.N., Turetskaya R.L., et al. 1986. Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β) in the human genome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 611–624.
24. Odom D.T., Dowell R.D., Jacobsen E.S., Gordon W., Danford T.W., MacIsaac K.D., Rolfe P.A., Conboy C.M., Gifford D.K., Fraenkel E. 2007. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature Genet.* **39**, 730–732.
25. Sauter C., Wolfensberger C. 1980. Interferon in human serum after injection of endotoxin. *Lancet*. **2**, 852–853.
26. Dinges M.M., Schlievert P.M. 2001. Comparative analysis of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor α activity in serum and lethality in mice and rabbits pretreated with the staphylococcal superantigen toxic shock syndrome toxin 1. *Infect. Immun.* **69**, 7169–7172.
27. Kuprash D.V., Udalova I.A., Turetskaya R.L., Kwiatkowski D., Rice N.R., Nedospasov S.A. 1999. Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **162**, 4045–4052.
28. Fava R.A., Notidis E., Hunt J., Szanya V., Ratcliffe N., Ngam-ek A., de Fougères A.R., Sprague A., Browning J.L. 2003. A Role for the Lymphotoxin / LIGHT Axis in the Pathogenesis of Murine Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* **171**, 115–126.
29. Mackay F., Browning J.L., Lawton P., Shah S.A., Comiskey M., Bhan A.K., Mizoguchi E., Terhorst C., Simpson S.J. 1998. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology*. **115**, 1464–1475.
30. Douni E., Akassoglou K., Alexopoulou L., et al. 1995. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J. Inflamm.* **47**, 27–38.
31. Kuprash D.V., Alimzhanov M.B., Tumanov A.V., et al. 2002. Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling *in vivo*: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. *Mol. Cell Biol.* **22**, 8626–8634.