

Взаємодія трансгенів та геномів реципієнтів в еукаріотів. Інтегративні трансгени

К. В. Крисан, О. П. Соломко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Представлено огляд досліджень з проблеми трансгенезу в еукаріотів. Розглядаються питання, пов'язані з формами існування трансгенів, механізмами їхньої інтеграції та модифікації. Узагальнено матеріали досліджень міжгеномних взаємодій при трансгенезі.

Вступ. За останні 10—15 років трансгенез перетворився на надзвичайно потужний інструмент молекулярної генетики. Він відкрив величезні можливості для експериментів, які були б нездійсненними при використанні інших методів. Однак саме завдяки широкому використанню трансгенезу виявилися очевидними не лише його безперечні позитивні якості, але й серйозні вади, що обмежують його застосування. Мова йде про непередбачуваність поведінки трансгенів при їхній взаємодії з геномами реципієнтів. Така взаємодія часто призводить не тільки до артефактів, але й до суттєвої дестабілізації геному реципієнта, аж до порушення його життєво важливих функцій.

У цьому огляді ми проаналізували літературні дані стосовно взаємодії гетерологічних геномів трансгена та клітини реципієнта, що дозволило виявити фактори, які впливають на цю взаємодію. Крім того, в огляді обговорюються перспективи використання трансгенезу з урахуванням передбачуваності поведінки трансгенів.

Результати перших експериментів з переносу чужорідного генетичного матеріалу в клітини еукаріотів [1—4] привели їхніх авторів до висновку про те, що трансген або елімінується, або інтегрує в геном реципієнта. Вважалося, що інших шляхів взаємодії трансгена з геномом не існує. Можливість існування в еукаріотів, зокрема, у ссавців екстрахромосомних ДНК, подібних до плазмід бактерій, категорично заперечувалася. Ця догма панувала

серед дослідників трансгенезу доки не скінчилася ейфорія, викликана першими вдалими експериментами. Тоді було зроблено спробу перейти від простого накопичення фактів до аналізу отриманих результатів та використання трансгенезу для розв'язання певних дослідницьких завдань. З'ясувалося, що взаємодія гетерологічних геномів є набагато складнішою, ніж вважалося раніше, та не обмежується елімінацією трансгена або вбудовуванням його у геном хазяїна. Часто спостерігалася модифікація чужорідної ДНК та(або) прилеглих геномних нуклеотидних послідовностей. Крім того, несподіванкою стало відкриття можливості епісомного існування трансгенів. Спочатку це було показано для рекомбінантних конструкцій, які містили нуклеотидні послідовності вірусів, що мають у життєвому циклі позакромосомні кільцеві форми [4], а потім — і для трансгенів, що не містили в своєму складі таких вірусних послідовностей [5]. Відкриття ампліфікації ділянок хромосом та малих кільцевих ДНК стало підтвердженням того, що екстрахромосомні амплікони є нормальними компонентами геномів еукаріотів. Однак механізми, що впливають на вибір форми існування трансгенів, залишалися (і зараз залишаються) дослідженими в недостатній мірі.

Механізми інтеграції трансгенів. Результатом перших експериментів з трансгенезу було отримання тварин, що містили в своєму геномі чужорідну ДНК в інтегрованому вигляді. Усі ці роботи можна розділити на дві групи — введення вірусних ДНК та окремих маркерних генів. При ін'єкції провірусної ДНК вірусу лейкемії Молоні в зиготи

мишей вона інтегрувала в геном та успадковувала як менделівський ген. Було показано, що екзогена ДНК містилася в геномі трансгенних мишей в кількості однієї копії на диплоїдний геном, з чого було зроблено висновок про наявність дуже обмеженого числа (можливо, одного) сайтів інтеграції [1]. Аналогічну закономірність виявлено у риб: при мікроін'єкції провірусної ДНК того ж вірусу він інтегрував у кількості однієї копії та передавався як менделівський ген [6]. Незважаючи на те, що в згаданому експерименті з мишами трансгенні особини не мали фенотипових відмінностей від нормальних, в іншому експерименті з тим самим вірусом виділено дві групи трансгенних мишей, в одній з яких у геномі містилися 1—2 копії провірусної ДНК і ці миші мали ознаки прелейкемічних, а в другій — 3—4 копії і миші мали всі ознаки лейкемічних. Аналіз сайтів інтеграції показав, що вони різні навіть у межах однієї групи [7]. Отже, геном мишей має численні сайти інтеграції, а інтенсивність експресії вірусних генів залежить від оточуючих нуклеотидних послідовностей. Останній висновок знайшов підтвердження в роботі тих самих авторів, коли було картовано кілька локусів, у які відбувалася інтеграція провірусної ДНК вірусу лейкемії Молоні, та було прямо показано залежність тканинспецифічної експресії вірусу від його локалізації на хромосомі хазяїна. Крім того, в одному з локусів трансген частково делетувався [8].

Як саме сайт інтеграції впливає на експресивність вірусних генів? Один з основних механізмів такого впливу — це різний ступінь метильованості окремих частин геному. При вбудовуванні провірусної ДНК у гетерохроматинові області геному трансген також зазнає метилювання, яке блокує його експресію. Якщо ж сайт інтеграції знаходиться в області, що захищає трансген від метилювання *de novo*, рівень експресії буде набагато вищим [9, 10]. Крім довгих областей високометилюваної ДНК, що відносяться до гетерохроматину, в геномах еукаріотів існує багато коротких метильованих ділянок, які відповідають кластерам генів, окремим генам чи їхнім регуляторним послідовностям. Метилювання в цьому випадку є елементом геномного імпринтингу та має регуляторну роль [11, 12]. Патерни метилювання можуть змінюватися в залежності від етапу онтогенезу, але на кожному конкретному етапі вони є характерними. Імпринтовані гени часто фланковані короткими повторюваними послідовностями, які формують вторинні структури. Завдяки їм метилази «впізнають» нуклеотидні послідовності, які треба метилувати [13]. Якщо трансген вбудовується поблизу

репресованого шляхом метилювання гена, він може набувати характерного для цього гена патерну метилювання. При цьому можлива тканино- та стадієспецифічна експресія трансгена або повне її блокування. Якщо ж трансген містить повторювані послідовності, схожі на сигнали метилювання, він може змінити існуючий патерн та відповідно профіль експресії гена [14].

Ряд трансгенів, особливо вірусного походження, має у своєму складі сильні регуляторні елементи, що можуть безпосередньо впливати на активність експресії тих чи інших генів реципієнта. Геном вірусу раку молочної залози мишей містить регуляторний елемент, що активується глюкокортикоїдними гормонами. В залежності від орієнтації провірусної ДНК під час інтеграції та оточуючих нуклеотидних послідовностей цей регуляторний елемент здатний активувати сусідні промотори миші [15].

У той час, коли вірусні та провірусні ДНК є цілісними геномами зі своїми власними регуляторними послідовностями, окремі гени, навіть з фланкуючими та внутрішніми регуляторами, є більш чутливими до свого генетичного оточення в разі інтеграції. Тому спроби прямого введення маркерних генів для контролювання експресії або коригування мутантних фенотипів у більшості випадків закінчувалися невдачею незалежно від форми введення окремих генів: у лінійній, кільцевій або тандемно повторюваній [16]. Утім, слід відзначити, що звичайно публікувалися лише «позитивні» результати, ті ж дані, які не відповідали схемі експерименту, до друку не потрапляли. Разом з тим описано ряд вдалих експериментів з мікроін'єкції окремих генів. Так, ген трансферину курчати без регуляторних послідовностей було введено в зиготи мишей та потім виявлено в геномі у вигляді чисельних тандемно розташованих копій, які транскрибувалися [17]. Аналогічний результат отримано для гена μ -важкого ланцюга імуноглобуліну з власними регуляторними елементами. Трансгенні миші, які були носіями цього гена, містили його в кількості 20—140 копій на геном, при цьому він активно експресувався у лімфоїдних тканинах [18]. Власні регуляторні елементи часто відіграють найважливішу роль в експресії трансгенів. Повнорозмірний ген β -глюкуронідази з довгими 5'- та 3'-фланкуючими ділянками при мікроін'єкції в зиготи дефектних за цим ферментом мишей експресувався на високому рівні у частини тварин. У тих мишей, що мали низький рівень експресії, вбудовування гена відбулося, певно, в область геному, яка блокувала експресію [19]. Важливе значення мають не лише фланкуючі об-

ласті, але й внутрішні послідовності генів, що вводяться. Нативні гени β -лактоглобуліну та α_1 -антитрипсину з повними наборами інтронів, які було введено в зиготи мишей, експресувалися набагато активніше, ніж їхні кДНК-копії та мутантні форми з делеціями окремих інтронів [20]. Це можна пояснити тим, що інтрони часто містять енхансери та інші *cis*-діючі послідовності, які регулюють експресію на рівні ініціації транскрипції та дозрівання мРНК. Таким чином, причинами активної та сталої експресії введених генів є їхня інтеграція у «сприятливі» ділянки геному або гомологічна рекомбінація з відповідними нуклеотидними послідовностями миші, що спричиняє вбудовування трансгена під контроль специфічних регуляторних елементів.

Пошук сайтів інтеграції трансгенів тривалий час було утруднено у зв'язку з відсутністю необхідних методів. Фактично, до розвитку техніки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) висновки про сайти інтеграції робилися лише за наявності мутантного фенотипу у трансгенних тварин або за закономірностями сумісного успадкування трансгена та певного картованого гена. Ще в 1983 році авторами роботи [21] показано, що вірус лейкемії Молоні при мікроін'єкції в зиготи миші вбудовується в єдиний сайт в X-хромосомі. Фенотипових змін у трансгенних мишей не спостерігалось, хоча вірусоспецифічні мРНК було виявлено [21]. Відсутність фенотипових змін свідчить про те, що жоден з функціональних генів миші не було пошкоджено; разом з тим одна з X-хромосом ссавців імпринтована і, можливо, саме в цю «неактивну» X-хромосому відбулася інтеграція (при цьому слід припустити, що імпринтованість не поширилася на трансген). У той самий час інтеграція могла відбуватися і в некодуючі області «активної» X-хромосоми. Пізніше ця група дослідників виявила, що вірус лейкемії Молоні при мікроін'єкції в зародки миші може вбудовуватися в 5'-кінець (перший інтрон) гена $\alpha 1(I)$ -коллагену, чим викликає летальну мутацію, повністю вимикаючи його експресію на ранніх стадіях ембріогенезу [22, 23]. Той самий вірус може інтегрувати також у 5'-кінець гена цикліну D2 миші (власне, цей ген було ідентифіковано по наявності в ньому сайту інтеграції провірусної ДНК) [24]. Цей феномен (інтеграція в 5'-кінець генів) має надзвичайно важливе значення, докладніше це буде обговорюватися нижче. Про наявність певної спорідненості трансгенів до статевих хромосом свідчать також дані щодо інтеграції конструкції, яка містить ген мишачого β -інтерферону під контролем промотору металотіонеїну. У трансгенних мишей, яких отримано

подібним чином, спостерігалася чоловіча стерильність [25]. Важко припустити, що це явище викликане експресією введеного гена, скоріш за все, це свідчить про інсерційне пошкодження гена, локалізованого на Y-хромосомі. Аналіз сайтів інтеграції в геном миші рекомбінантних плазмід, які містили нуклеотидні послідовності вектора *pBR322* та маркерний ген, показав, що інтеграція переважно відбувається у повторювані послідовності геному. Інтегрований трансген звичайно був фланкований прямими чи зворотними повторами, що перекривалися. Ці повтори належали до різних родин високо- та помірноповторюваних нуклеотидних послідовностей. На відстані 0,5—1 тис. п. н. від трансгена знаходилися довгі помірноповторювані послідовності [26—28]. Напевно, такі послідовності утворюють «гарячі точки» інтеграції. Ці «гарячі точки» можуть формуватися також за рахунок вторинних структур ДНК.

Відомо, наприклад, що зворотні повтори сателітної ДНК можуть формувати шпильки та неканонічні структури ДНК з триспіральною структурою [29]. Показано, зокрема, що ретровіруси часто інтегрують саме в ділянки геному, які мають вторинні структури [30]. У згаданому експерименті з мишами нуклеотидний склад повторів у місці інтеграції варіював — були випадки інтеграції того самого трансгена як в АТ-багаті, так і в GC-багаті нуклеотидні послідовності. Можливою причиною цього явища було те, що до складу трансгена входили бактеріальні ділянки, маркерний ген тимідинкінази вірусу простого герпесу та фрагменти провірусної ДНК вірусу саркоми Рауса, тобто нуклеотидні послідовності різної природи, завдяки чому інтеграція відбувалася в області геному з різним нуклеотидним складом. Принаймні, для ретровірусів, які за однією з систем класифікації поділяються на АТ-багаті та GC-багаті, є спостереження, що ретровіруси, чия ДНК багата на АТ, переважно інтегрують в АТ-багаті ділянки геному. Аналогічна закономірність існує також для GC-багатих ретровірусів [31]. Пояснити це можна тим, що один з механізмів інтеграції полягає у рекомбінації з ділянками слабкої гомології, тобто у випадку з ретровірусами АТ- та GC-багаті віруси мають велику спорідненість з АТ- та GC-багатими ділянками геному відповідно. Відомо, що такі ділянки геному формують довгі області, які є гомогенними за нуклеотидним складом. Ці області, вочевидь, утворюють темні та світлі диски в забарвлених препаратах хромосом. За однією з гіпотез, АТ-багаті ділянки містять, головним чином, тканиноспецифічні гени, а GC-багаті — так звані «гени дошкільного господарства» («housekeeping genes»)

[32]. Якщо взяти до уваги цю гіпотезу, то можна пояснити специфічність ефектів, що їх викликають, наприклад, ретровіруси з різних систематичних груп. Можливо, цей зв'язок між нуклеотидним складом, сайтом інтеграції та відповідно ефектом є загальним для всіх трансгенів.

У той же час провірусні ДНК ретровірусів захищені від інтеграції інших ретровірусів завдяки активації певного «хазяйського» білка [33]. У людини також виявлено ряд білків, що кодуються її власними генами та мають здатність зв'язуватися з довгими кінцевими повторами ендегенного ретровірусу [34]. Можливо, ці білки зв'язуються також і з довгими кінцевими повторами екзогенних ретровірусів, впливаючи на їхню інтеграцію. Однак механізм захисту від автоінтеграції не є універсальним, оскільки вірус імунодефіциту людини переважно інтегрує у ретропозони родин *L1* та *Alu* [35], у тому числі в метильовані [30] (хоча, можливо, вони не містять всіх належних послідовностей). Взагалі, ретропозони родин *L1* та *Alu* є особливо «привабливими» для інтеграції трансгенів. Як вірус раку молочної залози мишей, так і рекомбінантні конструкції часто інтегрують в (або поблизу) *L1*- та *Alu*-елементи [36–38]. Вочевидь причина цього полягає в тому, що ретропозони містять нуклеотидні послідовності, які відіграють роль «гарячих точок» інтеграції або формують структуру хроматину, сприятливу для інтеграції. Також не можна виключити можливості взаємодії позакромосомних копій трансгенів та ретропозонів. Цю можливість буде детально обговорено пізніше. Слід також зазначити, що *L1*-елементи містять промотори, енхансери та інші регуляторні послідовності [39, 40], що може впливати на експресію як розташованих поблизу, так і інтегрованих у ці елементи трансгенів.

Якщо інтеграція трансгенів у повторювані послідовності геномів реципієнтів, як правило, не викликає фенотипових змін і може бути виявлена лише спеціальними методами, то інтеграція в гени звичайно супроводжується порушенням їхніх функцій та відповідно появою нових ознак у трансгенних тварин. Зараз хотілося б повернутися до надзвичайно важливого факту частоті інтеграції трансгенів у 5'-області генів, про що вже йшлося стосовно гена $\alpha 1(I)$ -колагену. Спочатку цей феномен вважався випадковістю. Пізніше дослідники звернули увагу на те, що ретровіруси (та ретропозони), а також ряд інших вірусів дуже часто інтегрують у ділянки геному, які пізніше активно транскрибуються [41, 42]. Далі поняття «ділянки, що транскрибуються» сконцентрувалося до «5'-області генів, що транскрибуються». Таке відбува-

ється в багатьох еукаріотів — від дріжджів до ссавців. *Tu*-елементи дріжджів переважно вбудовуються у 5'-області генів [43, 44]. При цьому у дріжджів виявлено ще одну закономірність — елементи *Tu3* інтегрують, головним чином, перед генами, що транскрибуються РНК-полімеразою III, а *Tu1* — перед генами, які транскрибуються РНК-полімеразою II та генами тРНК [30]. Про механізми такої вибірковості можна лише здогадуватися. Можливо, причина полягає в тому, що на ранніх стадіях ембріогенезу, коли геном зародка ще активно не експресується, має місце мінорна активація геному та з 5'-областями генів, які транскрибуються чи невдовзі будуть транскрибуватися, пов'язана велика кількість різних білків, у тому числі факторів транскрипції, що мають високу спорідненість до ДНК та можуть сприяти інтеграції (можливі механізми такого сприяння будуть обговорюватися пізніше). Крім того, відомо, що в геномах еукаріотів є ділянки, потенційно здатні формувати *z*-форми ДНК, та найчастіше ці ділянки розташовані в 5'-областях генів [45, 46]. Не виключено, що *z*-ДНК є одним з ранніх сигналів, які призводять до активації тих чи інших генів і, таким чином, активація створює «гарячі точки» інтеграції трансгенів. Цікаві дані отримано при вивченні дріжджів, мутантних за геном *rad6*, продукт якого кон'югує з убіквітином та є висококонсервативним для всіх еукаріотів. У той час, коли в дріжджів дикого типу частота інтеграції *Tu1* різко знижується від 5'- до 3'-кінця генів, у мутантів за *rad6* ця частота однакова [47]. Отже, поки що не можна однозначно назвати причини підвищеної спорідненості ретроелементів та трансгенів, які містять такі елементи, до 5'-областей генів. Безперечно, втім, що це явище має надзвичайно важливе значення, оскільки на різних стадіях онтогенезу трансгени можуть пошкоджувати ті чи інші гени, що специфічно експресуються на даній стадії розвитку.

Кращому розумінню закономірностей інтеграції трансгенів буде сприяти вивчення механізмів цього процесу. В інтеграції трансгенів беруть участь, головним чином, такі процеси, як гомологічна та негомологічна рекомбінація та репарація дволанцюгових розривів ДНК. Для гомологічної рекомбінації необхідна наявність ділянок гомології між трансгеном та геномною ДНК реципієнта. При цьому трансген може як інтегрувати шляхом інсерції, так і заміщувати собою ділянку хазяйської ДНК. У випадку трансгенів, що мають ретровірусне походження та містять довгі кінцеві повтори, саме ці послідовності грають основну роль в інтеграції. Для цього, як правило, необхідно, щоб у

хазяйській ДНК утворилися короткі одноланцюгові ділянки, по яких і відбувається рекомбінація. В довгих кінцевих повторах мишачих ретротранспозонів та багатьох ретровірусів є нуклеотидні послідовності, потенційно здатні утворювати одноланцюгову ДНК [48, 49], тому такою високою є частота вбудовування трансгенів у ретропозони. Згадані послідовності відіграють також важливу роль у мейотичній рекомбінації.

Оскільки ретровірусні довгі кінцеві повтори містять повторювані послідовності, можна припустити, що повтори взагалі схильні до підвищеної частоти рекомбінації, тому що вони складають високоваріабельну частину геному та для них є характерними численні перебудови. Мінісателітні ДНК людини, які не містять довгих кінцевих повторів, є ділянками активної внутрішньохромосомної рекомбінації [50]. Перебудови є характерними не лише для високоповторюваних послідовностей геному, а й для помірних повторів, у тому числі, для кластерів генів. Це, наприклад, гени головного комплексу гістосумісності, β -глобіну, інсуліну та ін. [51]. Аналогічне явище описане також для ряду генів, що кодують рецептори [52]. Іноді такі перебудови можуть призводити до втрати функціональних копій тих чи інших генів. Зокрема, відомий випадок втрати супресорного гена пухлин, який кодує білок p53. Це призводить до численних аномалій розвитку [53]. З точки зору універсальності цих процесів викликають цікавість перебудови генів азотфіксації у ціанобактерій за відсутності комбінованих джерел азоту. Ці гени фланковані короткими повторюваними послідовностями, між якими за згаданих умов і відбувається рекомбінація, яка веде до активації відповідних генів [54]. Характерним є те, що в усіх випадках гени, залучені до перебудов, фланковані короткими повторюваними послідовностями, що являють собою «гарячі точки» рекомбінації. При цьому можна виділити загальний консенсус, аналіз якого показав, що він має високу гомологію з сателітними повторами людини та з *chi*-послідовністю, що забезпечує *recbc* рекомбінацію в *Escherichia coli* [51—53]. Це свідчить про наявність загального та еволюційно консервативного механізму гомологічної рекомбінації. Частота рекомбінації набагато збільшується у генів, що транскрибуються [55]. При цьому здатність до рекомбінації прямо залежить від сили промотору. Завдяки наявності сильного промотору дріжджовий ген алкогольдегідрогенази (*adh*) є набагато рекомбінаційно активнішим, ніж гени, що перебувають під контролем слабких промоторів. Переміщений до інших районів геному промотор *adh* активізує рекомбінацію прилеглих

ділянок [56]. Ймовірно, саме цим можна пояснити підвищену спорідненість трансгенів до генів, що транскрибуються. Відомо, що дріжджовий ген *hpr1* кодує білок, який необхідний для елонгації транскрипції. У мутантів за цим геном різко збільшена частота рекомбінацій та хромосомних перебудов [57]. Цього слід було сподіватися, бо ферментний комплекс, який відповідає за ініціацію транскрипції, є активним, внаслідок чого утворюється одноланцюгова ділянка в сайті ініціації (5'-область гена) (взагалі, для промоторів характерна наявність нуклеотидних послідовностей, потенційно здатних утворювати одноланцюгові ділянки [49]), а подальші події блоковано. Тобто в цьому випадку в 5'-області гена утворюється та існує тривалий час одноланцюгова ділянка. Аналогічно, у дріжджів, мутантних за генами топоізомераз, відбувається дуже багато рекомбінацій у високотранскрибованій ДНК [58]. Пояснюється це тим, що топоізомерази, утворюючи суперскручену ДНК, пригнічують рекомбінацію. В імуноглобулінових генів, які взагалі відрізняються нестабільністю, частота рекомбінації збільшується при їхній експресії [59] (помічено, що алелі ссавців, що транскрибуються на низькому рівні, значно рідше рекомбінують, ніж ті ж самі алелі, що транскрибуються активно [58]). За відсутності в імуноглобулінових генів промотору або енхансеру частота перебудов зменшується у 20—100 разів. У процесі спадкових перебудов імуноглобулінових генів делетується сегмент ДНК, що містить елемент, який сильно пригнічує транскрипцію (сайленсер). Якщо в модельному експерименті замінити цей сегмент на ділянку нейтральної ДНК такого самого розміру, то частота перебудов значно збільшується [60]. В експериментах з направлено-го вимкнення генів виявлено, що активний стан гена значно підвищує частоту гомологічної рекомбінації [61].

За перебудови геному в процесі розвитку відповідають різні види рекомбінації. Ці перебудови більш істотно зачіпають повторювані послідовності, ніж окремі гени (слід відзначити, що роль повторів у розвитку видається надзвичайно важливою, хоча вона й не зовсім зрозуміла). Тетра- та тринуклеотидні повтори виявляють високу нестабільність у ході раннього ембріонального розвитку миші [62], морського їжака [63, 64], параміксини [65], людини [66], ряду найпростіших [67], до того ж ця нестабільність є видоспецифічною [68]. Один з подібних мінісателітних локусів миші, що зазнає активних перебудов у ранньому ембріогенезі, має високу гомологію з довгими кінцевими повторами транспозоноподібного елемента миші [69]. Це свідчить про універсальність згаданої нестабільності та,

хоча причини і роль її незрозумілі, дозволяє припустити, що механізми функціонування геномів та відповідно їхня взаємодія з трансгенами є подібними для різних організмів.

Як уже згадувалося, крім гомологічної рекомбінації, інтеграція трансгенів відбувається в місцях репарації дволанцюгових розривів геномної ДНК [70]. Той факт, що при розривах хромосом їхні кінці мають тенденцію до з'єднання, відмітила ще Макклінток [71] (звичайно, мова не йде про обов'язкове відновлення розірваної хромосоми, її кінці можуть зв'язуватися з кінцями будь-яких інших лінійних молекул ДНК). Набагато пізніше стало відомо, що в хромосомах еукаріотів є ділянки, особливо схильні до дволанцюгових розривів. Одними з таких ділянок є тринуклеотидні повтори (існує спостереження, що частота дволанцюгових розривів є особливо високою на межах між R- і G-дисками хромосом [72]); можливо, це пояснюється наявністю в цих ділянках хромосомспецифічних повторюваних послідовностей). Роль повторів і залежність частоти розривів від їхньої довжини продемонстровано в експериментах з дріжджами. З'ясувалося, що із збільшенням кількості повторюваних одиниць частота розривів також збільшується. Тринуклеотидні повтори людини вважаються точками утворення дволанцюгових розривів завдяки тому, що вони можуть блокувати елонгацію реплікації, але не впливають на ініціацію. При цьому ступінь впливу цих повторів залежить від їхньої довжини та орієнтації відносно *ori*. Слід також відзначити, що делеція одного з генів, кодуєчих нуклеазу, яка бере участь у процесингу фрагментів Оказаки при реплікації ДНК (*rad 27*), викликає різке зростання частоти дволанцюгових розривів хромосом. Оскільки цей ген є висококонсервативним в усіх еукаріотів, не виключено, що його пошкодження може бути причиною ламкості хромосом і в інших організмів [73]. Довгі інвертовані повтори також є потенційними точками дволанцюгових розривів [74]. Як відомо, кінці хромосом захищені ділянками ДНК із специфічним нуклеотидним складом та структурою (теломерами), що захищають хромосоми від злиття та дії термінальних нуклеаз. Багато які з вірусів також мають кінцеві структури, які запобігають їхньому пошкодженню. Тому поява будь-яких вільних кінців ДНК сприймається клітиною як пошкодження хромосом та веде до активації специфічних репаративних механізмів [75]. Слід зазначити, що з вільними кінцями ДНК одразу ж зв'язується так званий Ku-білок, який, з одного боку, попереджає гідроліз ДНК нуклеазами, а, з іншого, — є фактором упізнання для еукаріотичних лігаз. Разом з

тим він є кофактором ДНК-залежної протеїнази, яка запускає механізм репарації [76]. Крім Ku-білка, до дволанцюгових кінців ДНК мають спорідненість інші негістонові білки, зокрема, HMG 1 та 2; вони також полегшують лігування шляхом взаємодії з лігазою [77]. Трансген, що потрапляє в ядро клітини, спочатку лінеаризується хазяйською ендонуклеазою [78], а потім до його кінців приєднуються Ku-білок та інші білки, після чого трансген «готовий» до інтеграції у дволанцюговий розрив. Можливо, що за рахунок Ku-білка, який полегшує роботу лігаз, інтегровані трансгени дуже часто виявляються у вигляді численних тандемно з'єднаних копій. Серед білків, що беруть участь у з'єднанні негомологічних кінців ДНК (а також у нематричному додаванні нуклеотидів по місцю розриву — таке явище часто спостерігається в місцях з'єднання послідовностей інтегрованих трансгенів та геномної ДНК), слід вирізнити ДНК-полімеразу β , яку було виявлено у жаб роду *Xenopus* [79].

Ділянки підвищеної ламкості хромосом знайдено поблизу онкогена *bcl2* та гена важкого ланцюга імуноглобулінів. До того ж ділянка поблизу гена *bcl2* містить сайт, чутливий до дії нуклеази S1, що свідчить про наявність одноланцюгової ДНК [80]. Таким чином, можливо, саме одноланцюгові ділянки ДНК є місцями підвищеного ризику для виникнення дволанцюгових розривів та завдяки цьому (разом з передумовами, що обговорювалися вище) є «гарячими точками» інтеграції трансгенів. У згаданому сайті, чутливому до дії нуклеази S1, міститься також ділянка впізнання для нуклеази, яка присутня в незрілих В-лімфоцитах, та ділянка зв'язування з білком, функції якого невідомі, що також наявний у незрілих В-клітинах. Нуклеотидна послідовність, яка впізнається цим білком, має гомологію з *chi*-послідовністю *E. coli*, про яку вже йшлося вище. До того ж показано, що цей білок зв'язується і з іншими сайтами, в яких відбуваються розриви хромосом [80]. Слід також згадати про те, що певну роль в утворенні дволанцюгових розривів відіграє реплікація ДНК [81], оскільки активація *ori* реплікації передбачає виникнення одноланцюгових ділянок. Детальніше це явище буде обговорюватися нижче. Наприкінці хотілося б відзначити, що процеси репарації дволанцюгових розривів разом з нестабільністю геному є консервативними в еукаріотів, що дає підставу припустити наявність загальних закономірностей в інтеграції трансгенів.

Модифікація інтегративних трансгенів та геномів реципієнтів при трансгенозі. Досить часто взаємодія інтегрованих трансгенів та геномів реципієнтів не обмежується інтеграцією. Виявлено,

що багато з інтегрованих трансгенів мають відмінності у порівнянні з введеними ДНК. Генотипна ДНК реципієнта також може зазнавати змін поблизу сайту інтеграції трансгена. Поки що не зовсім зрозуміло, коли відбуваються ці зміни — перед інтеграцією, коли трансген ще знаходиться у вільному стані, або після неї. Що стосується генотипної ДНК, то вона, скоріш за все, змінюється після інтеграції трансгена.

Перебудови трансгенів являють собою, головним чином, делеції окремих ділянок, інсерції фрагментів генотипної ДНК та внутрішньотрансгенні дуплікації та транслокації. При цьому, звичайно, найчастіше перебудови спостерігаються у трансгенах, сконструйованих на основі вірусів при введенні їх у клітини хазяїв, які є непермісивними для цих вірусів. При ін'єкції в зиготи мишей високоонкогенного аденовірусу мавп SA 7 він інтегрував у генотип, однак рестрикційний патерн інтегрованого трансгена, досліджений за допомогою блот-гібридизації, відрізнявся від первинного. Крім того, переважна більшість трансгенних мишей містила лише лівий кінець вірусу, в якому знаходиться онкоген, а правий було еліміновано, хоча в окремих сублініях мишей виявлено також зворотну закономірність [82]. Іноді перебудови того ж самого інтегрованого вірусу SA 7 (або прилеглих генотипних послідовностей) у трансгенних мишах призводять до того, що він перетворюється з такого, що не експресується в поколінні F_0 , на вірус, здатний до експресії в наступних поколіннях [83]. Аналогічно, вірус SV 40 не викликав проявів інфекції у трансгенних хом'яків покоління F_0 , але в їхніх нащадків індукував появу пухлин [84]. Пояснити це можна зміною характеру метилювання трансгенів завдяки модифікації прилеглих генотипних послідовностей або транслокацією трансгенів в інші ділянки генотипу під час раннього розвитку внаслідок мейотичної або мітотичної рекомбінації. Перебудови у вигляді делецій та внутрішніх дуплікацій відбуваються також в інтегрованому вірусі SV 40 у клітинах мишей. Хазяїнська ДНК поблизу сайту інтеграції також містила перебудовані аналогічним чином ділянки [85]. У провірусній ДНК вірусу саркоми Рауса, яку мікроін'єкували в зиготи мишей, відбувалися суттєві перебудови, головним чином, елімінація окремих нуклеотидних послідовностей [86]. Аналогічне явище відбувається також при введенні чужорідної ДНК у ранні ембріони дрозофіли. Провірусна ДНК вірусу саркоми Рауса та аденовірусу SA 7 інтегрували в генотип комахи, викликаючи різні фенотипові мутації. Однак у наступних поколіннях мух ці мутації зникали. Це свідчить про елімінацію трансгенів та відновлення

пошкоджених генів [87]. Така ж сама поступова елімінація інтегрованого вірусу лейкемії Молоні відбувалася після кількох циклів реплікації клітинної ДНК [88]. У цьому випадку інтеграція трансгена відбулася, вочевидь, у високоваріабельні ділянки генотипу.

Спробу з'ясувати, як впливають окремі нуклеотидні послідовності трансгена на його модифікацію, здійснили з серією делеційних мутантів вірусу SV 40, які вводили мікроін'єкцією у зиготи мишей. Повнорозмірний вірус, що містив усі гени та контролюючі області, зазнав дуже частих мутацій (разом з фланкуючими послідовностями генотипу). Меншу частоту мутування мали віруси, позбавлені *ori* реплікації, а ще меншу — ті віруси, які не мали також ранніх генів та їхнього енансера [89]. Оскільки мавп'ячий вірус SV 40 було ін'єковано в зиготи мишей, тобто непермісивного хазяїна, можна припустити, що хазяїнських білків було достатньо лише для ініціації реплікації (або транскрипції). При цьому спостерігалось локальне плавлення ДНК в *ori* реплікації чи промоторній області (білки, що відповідальні за ці процеси, є консервативними у всіх еукаріотів), але подальші події не могли відбуватися через відсутність специфічних факторів. Саме такі одноланцюгові ділянки і були мішенями для рекомбінаційних процесів. Ще одне джерело модифікації трансгенів — це нестабільність повторюваних послідовностей генотипу, про яку йшлося раніше. Так, при аналізі перебудов вірусу лейкемії Молоні в трансгенних мишах виявлено делеції частин провірусної ДНК та інсерції сателітної ДНК миші [90]. Таким чином, основний внесок у великорозмірні перебудови трансгенів (делеції, дуплікації та ін.) роблять, імовірно, різні види рекомбінації. «Гарячими точками» для рекомбінації трансгени можуть бути через наявність нуклеотидних послідовностей, здатних до формування специфічних сигналів. Такі сигнали можуть формуватися за рахунок взаємодій чужорідної ДНК з ДНК-зв'язуючими білками хазяїна, що спричинює утворення ділянок з підвищеною рекомбінаційною здатністю. Якщо трансген містить повторювані послідовності, вони також можуть робити істотний внесок у його модифікацію за рахунок рекомбінації з ділянками слабкої гомології або під час спадкових перебудов генотипу на ранніх етапах розвитку. Що стосується *ori* реплікації та промоторів, то вони, як уже згадувалося, взагалі є досить нестабільними точками генотипу. Іноді, якщо кінці трансгена вбудувалися у дві різні хромосоми, результатом негомологічної рекомбінації можуть стати суттєві хромосомні перебудови, такі як транслокації та дуплікації [91].

Появу в трансгенах точкових мутацій можна пояснити тим, що інтегровані трансгени не мають патерну метилювання, характерного для тієї області геному, в яку відбулася інтеграція, завдяки чому виникають помилки при реплікації. У ссавців існує спеціальний механізм захисту від «внутрішньогеномних паразитів» — ретропозонів. Цей механізм полягає в інактивації промоторів цих елементів шляхом метилювання та наступною транзицією залишків С у Т, що закріплює інактивацію. Іноді, як наприклад, у випадку «адаптації» курячого вірусу саркоми Рауса до качиних клітин [92], деякі точкові мутації можуть давати вірусу селективну перевагу при пасуванні в клітинах непермісивного хазяїна. Така перевага сприяє закріпленню мутацій та розповсюдженню мутантних форм вірусу, які здатні ефективно інфікувати непермісивні клітини. Дестабілізація геномних послідовностей, що фланкують інтегрований трансген, викликається, вочевидь, зміною патерну метилювання та утворенням додаткових вторинних структур.

K. V. Krysan, A. P. Solomko

Interaction of recipient genome and transgenes in eukaryotes. Integrative transgenes

Summary

The review is focused on the investigations concerning a problem of eukaryotic transgenesis. The forms of transgenes existence, mechanisms of their integration and modification are discussed. The data obtained on the genome — genome interactions during transgenesis are generalised.

K. B. Крисан, А. П. Соломко

Взаимодействие трансгенов и геномов реципиентов у эукариотов. Интегративные трансгены

Резюме

Представлен обзор исследований по проблеме трансгеноза у эукариотов. Рассматриваются вопросы, связанные с формами существования трансгенов, механизмами их интеграции и модификации. Обобщены материалы исследований межгеномных взаимодействий при трансгенозе.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jaenish R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1976.—73, N 4.—P. 1260—1264.
2. Breindl M., Doehmer J., Willecke K. Germ line integration of Moloney leukemia virus: identification of the chromosomal integration site // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 4.—P. 1938—1942.
3. Ottolenghi-Nightingale E. DNA-mediated transformation in mammalian cells // Cell communication / Ed. R. P. Cox.—New York, 1974.—P. 33—42.
4. Cuzin F., Vogt M., Dieckmann M., Berg P. Induction of virus multiplication in 3T3 cells transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus. II. Formation of oligometric polyoma DNA molecules // J. Mol. Biol.—1970.—47, N 3.—P. 317—333.
5. Johnson E. M., Jelinek W. R. Replication of a plasmid bearing a human Alu-family repeat in monkey COS-7 cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 13.—P. 4660—4664.
6. Lin S., Gaiano N., Culp P. Integration and germ line transmission of a pseudotyped retroviral vector in Zebrafish // Science.—1994.—265.—P. 666—669.
7. Jahner D., Stuhlman H., Jaenish R. Conformation of free and of integrated Moloney leukemia virus proviral DNA in preleukemic and leukemic BALB/Mo mice // Virology.—1980.—101, N 1.—P. 111—123.
8. Jaenish R., Jahner D., Grotkopp D. Derivation of three mouse strains carrying Moloney leukemia virus in their germ line at different genetic loci // Animal virus genetics / Ed. B. N. Fields.—Hamburg, 1980.—P. 265—279.
9. Jaenish R. Retroviruses and embryogenesis // Hoppe-Seyler's J. Physiol. Chem.—1982.—363, N 2.—P. 1267—1271.
10. Jaenish R., Jahner D. Methylation, expression and chromosomal position of genes in mammals // Biochim. et biophys. acta.—1984.—782, N 1.—P. 1—9.
11. Efstratiadis A. Parental imprinting of autosomal genes // Curr. Opin. Genet. Dev.—1994.—4.—P. 265—280.
12. Li E., Beard C., Jaenish R. Role for DNA methylation in genomic imprinting // Nature.—1993.—366.—P. 362—365.
13. Neuman B., Kubicka P., Barlow D. P. Characteristics of imprinted genes // Nat. Genet.—1994.—9.—P. 451—452.
14. Duhl D., Vrieleing H., Miller K. Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice // Nat. Genet.—1994.—7.—P. 220—226.
15. Chalepakis G., Arnemann J., Slater E. Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory elements of mouse mammary tumor virus // Cell.—1988.—53.—P. 371—382.
16. Kucherlapati R., Skoultschi A. I. Introduction of purified genes into mammalian cells // Crit. Rev. Biochem.—1984.—16, N 4.—P. 349—379.
17. McNight G. S., Hammer R. E., Kuenzel E. A., Brinster R. L. Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice // Cell.—1983.—34, N 9.—P. 335—341.
18. Grosschedl R., Weaver D., Baltimore D., Costantini F. Introduction of a μ -immunoglobulin gene into the mouse germ line: specific expression in lymphoid cells and synthesis of functional antibody // Cell.—1984.—38, N 3.—P. 647—658.
19. Kyle J. W., Birkenmeier E. N., Gwynn B. Correction of murine mucopolysaccharidosis VII by a human β -glucuronidase transgene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87, N 10.—P. 3914—3918.
20. Whitelaw C. B. A., Archibald A. L., Harris S. Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice // Transgenic Res.—1991.—1, N 1.—P. 3—13.
21. Stewart C., Harbers K., Jahner D., Jaenish R. X-chromosome-linked transmission and expression of retroviral genomes microinjected into mouse zygotes // Science.—1983.—221.—P. 760—762.
22. Schnieke A., Harbers K., Jaenish R. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the $\alpha 1(I)$ -collagen gene // Nature.—1983.—304, N 7.—P. 315—320.
23. Breindl M., Harbers K., Jaenish R. Retrovirus-induced lethal mutation in collagen I gene of mice is associated with an altered chromatin structure // Cell.—1984.—38, N 8.—P. 9—16.
24. Hanna Z., Jankowski M., Tremblay P. The *vin-1* gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2 // Oncogene.—1993.—8.—P. 1661—1666.

25. Iwakura Y., Asano M., Nishimune Y., Kawade Y. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon- β -gene under the control of the metallothionein enhancer-promoter // EMBO J.—1988.—7, N 12.—P. 3757—3762.
26. Тарантул В. З., Кузнецова Е. Д., Газарян К. Г. Характеристика участков генома трансгенных животных, прилегающих к интегрированным последовательностям чужеродной ДНК // Молекуляр. биология.—1989.—23, № 4.—С. 1036—1041.
27. Тарантул В. З., Кучерявый В. В., Макарова И. В. Клонирование фрагмента ДНК трансгенной мыши, содержащего интегрированную рекомбинантную плазмиду // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 1.—С. 278—286.
28. Макарова И. В., Тарантул В. З., Газарян К. Г. Структурные особенности участка интеграции чужеродной ДНК в геноме трансгенной мыши // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 6.—С. 1553—1560.
29. Kato M., Matsunaga K., Shimizu N. A novel unusual DNA structure formed in an inverted repeat sequence // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1998.—246, N 2.—P. 532—534.
30. Kirchner J., Connolly C. M., Sandmeyer S. B. Requirement of RNA polymerase III transcription factors for *in vitro* position-specific integration of a retrovirus-like element // Science.—1995.—267.—P. 1488—1491.
31. Rynditch A., Kadi F., Geryk J. The isopycnic, compartmentalized integration of Rous sarcoma virus sequences // Gene.—1991.—106.—P. 165—172.
32. Filipinski J. Correlation between molecular clock ticking, codon usage, fidelity of DNA repair, chromosome banding and chromatin compactness in germline cells // FEBS Lett.—1987.—217, N 2.—P. 184—186.
33. Lee M. S., Craigie R. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95.—P. 1528—1533.
34. Akopov S. B., Nikolaev L. G., Khil D. P. Long terminal repeats of human endogenous retrovirus K family (HERV-K) specifically bind host cell nuclear proteins // FEBS Lett.—1998.—421.—P. 229—233.
35. Stevens S. W., Griffith J. D. Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by LTRs repetitive elements // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—91.—P. 5557—5561.
36. Fanning T. G., Morris D. W., Cardiff R. D., Bradshaw H. D. Characterization of an endogenous retrovirus-repetitive DNA chimera in the mouse genome // J. Virol.—1985.—53, N 3.—P. 998—1000.
37. Dudley J. P. Mouse mammary tumor proviruses from a T-cell lymphoma are associated with the retroposon L1Md // J. Virol.—1988.—62, N 2.—P. 472—478.
38. Kato S., Anderson R. A., Camerini-Otero R. D. Foreign DNA introduced by calcium phosphate is integrated into repetitive DNA elements of the mouse L cell genome // Mol. Cell. Biol.—1986.—6, N 5.—P. 1787—1795.
39. Yang Z., Boffelli D., Boonmark N. Apolipoprotein (a) gene enhancer resides within a LINE element // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 891—897.
40. Keshet E., Schiff R., Itin A. Mouse retrotransposons: a cellular reservoir of long terminal repeat (LTR) elements with diverse transcriptional specificities // Adv. Cancer Res.—1991.—56.—P. 215—251.
41. Sandmeyer S. B., Hansen L. J., Chalker D. L. Integration specificity of retrotransposons and retroviruses // Ann. Rev. Genet.—1990.—24.—P. 491—518.
42. Choo K. B., Chen C. M., Han C. P. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions // J. Med. Virol.—1996.—49.—P. 15—22.
43. Spradling A. C., Stern D. M., Kiss J. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the Drosophila genome project // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92.—P. 10824—10830.
44. Craigie R. Hotspots and warm spots: integration specificity of retroelements // Trends Genet.—1992.—8, N 6.—P. 187—190.
45. Schroth G. P., Chou P. J., Ho P. Mapping z-DNA in the human genome // J. Biol. Chem.—1992.—267, N 17.—P. 11846—11855.
46. Wu H. Y., Shyy S., Wang J. C., Lin L. F. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template // Cell.—1988.—53, N 3.—P. 431—440.
47. Liebman S. W., Newman G. A ubiquitin-conjugating enzyme, RAD6, affects the distribution of Ty1 retrotransposon integration positions // Genetics.—1993.—133.—P. 499—508.
48. Edelmann W., Kroger B., Goller M., Horak I. A recombination hotspot in the LTR of a mouse retrotransposon identified in an *in vitro* system // Cell.—1989.—57, N 6.—P. 937—946.
49. Swamyathan S. K., Nambiar A., Guntaka R. V. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes // FASEB J.—1998.—12.—P. 515—522.
50. Boan F., Rodriguez J. M., Gomez-Marquez J. A non-hyper-variable human minisatellite strongly stimulates *in vitro* intramolecular homologous recombination // J. Mol. Biol.—1998.—278, N 3.—P. 499—505.
51. Kobori J. A., Strauss E., Minard K., Hood L. Molecular analysis of the hotspots of recombination in the murine major histocompatibility complex // Science.—1986.—234.—P. 173—179.
52. Rudiger N. S., Gregersen N., Kielland-Brandt M. C. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic *chi* // Nucl. Acids Res.—1995.—23, N 2.—P. 256—260.
53. Albertoni M., Daub D. M., Arden K. C. Genetic instability leads to loss of both p53 alleles in a human glioblastoma // Oncogene.—1998.—16.—P. 321—326.
54. Golden J. W., Mulligan M. E., Haselkorn R. Different recombination site specificity of two developmentally regulated genome rearrangements // Nature.—1987.—327.—P. 526—529.
55. Kodadek T. Mechanistic parallels between DNA replication, recombination and transcription // Trends Biochem. Sci.—1998.—23.—P. 79—83.
56. Grimm C., Schaer P., Munz P., Kohli J. The strong ADH1 promoter stimulates mitotic and meiotic recombination at the ADE6 gene of *Schizosaccharomyces pombe* // Mol. Cell. Biol.—1991.—11, N 1.—P. 289—298.
57. Chavez S., Aguilera A. The yeast HPR1 gene has a functional role in transcription elongation that uncovers a novel source of genome instability // Genes and Dev.—1997.—11, N 24.—P. 3459—3470.
58. Nickoloff J. A. Transcription enhances intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells // Mol. Cell. Biol.—1992.—12.—P. 5311—5318.
59. Blackuell T. K., Moore M. W., Yamopoulos G. D. Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription // Nature.—1986.—324.—P. 585—589.
60. Lauster R., Reynaud C. A., Martensson J. L., Peter A., Bucchini D., Jami J., Weil J. C. Promoter, enhancer and

- silencer elements regulate rearrangement of an immunoglobulin transgene // *EMBO J.*—1993.—12.—P. 4615—4623.
61. *Thyagarajan B., Johnson B. L., Campbell C.* The effect of target site transcription on gene targeting in human cells *in vitro* // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23.—P. 2784—2790.
 62. *Gibbs M., Collick A., Kelly R.G., Jeffreys A. J.* A tetranucleotide repeat mouse minisatellite displaying substantial somatic instability during early preimplantation development // *Genomics.*—1993.—17.—P. 121—128.
 63. *Бриков В. А., Кухлевский А. Д.* Связь изменений палиндромной фракции с процессами репликации ДНК в раннем развитии морского ежа // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 2.—С. 377—383.
 64. *Dickinson D. G., Baker R. F.* Evidence for translocation of DNA sequences during sea urchin development // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75.—P. 5627—5630.
 65. *Kubota S., Ishibashi T., Kohno S.* A germline restricted, highly repetitive DNA sequence in *Paramyxine atami*: an interspecifically conserved, but somatically eliminated, element // *Mol. and Gen. Genet.*—1997.—256.—P. 252—256.
 66. *Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.* Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA // *Nature.*—1985.—314.—P. 67—73.
 67. *Klobutcher L. A.* Developmentally excised DNA sequences in *Euplotes crassus* capable of forming G quartets // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92, N 6.—P. 1979—1983.
 68. *Collick A., Norris M. L., Allen M. J.* Variable germ line and embryonic instability of the human minisatellite MS 32 (D158) in transgenic mice // *EMBO J.*—1994.—13, N 23.—P. 5745—5753.
 69. *Kelly R. G.* Similar origins of two mouse minisatellites within transposon-like LTRs // *Genomics.*—1999.—24, N 3.—P. 509—515.
 70. *Pipiras E., Coquelle A., Bieth A., Debatisse M.* Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 325—333.
 71. *McClintock B.* The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays* // *Genetics.*—1941.—26.—P. 231—282.
 72. *Korenberg J. R., Rykowski M. C.* Human genome organization: Alu, Lines and molecular structure of metaphase chromosome bands // *Cell.*—1988.—53, N 3.—P. 391—400.
 73. *Freudenreich C. H., Kantrow S. M., Zakian V. A.* Expansion and length-dependent fragility of CTG repeats in yeast // *Science.*—1998.—279.—P. 853—856.
 74. *Ma C., Martin S., Trask B., Hamlin J. L.* Sister chromatid fusion initiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells // *Genes and Dev.*—1993.—7.—P. 605—620.
 75. *Weinert T.* DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair // *Cell.*—1998.—94.—P. 555—558.
 76. *Ramsden D. A., Gellert M.* Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 609—614.
 77. *Nagaki S., Yamamoto M., Yumoto Y., Shirakawa H., Yoshida M., Teraoka H.* Non-histone chromosomal proteins HMG1 and 2 enhance ligation reaction of DNA double-strand breaks // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1998.—246, N 1.—P. 137—141.
 78. *Козлов А. П., Решетников В. Л., Корж В. П., Нейфах А. А.* Чужеродная ДНК в развивающихся зародышах выюна *Misgurnus fossilis* // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 6.—С. 1614—1623.
 79. *Reichenberger S., Pfeiffer P.* Cloning, purification and characterization of DNA polymerase β from *Xenopus laevis* studies on its potential role in DNA-end joining // *Eur. J. Biochem.*—1998.—251.—P. 81—90.
 80. *Jaeger U., Purcher B., Karth G. D.* Mechanism of the chromosomal translocation t (14;18) in lymphoma: detection of a 45-kd breakpoint binding protein // *Blood.*—1993.—81.—P. 1833—1840.
 81. *Windle B., Draper B. W., Yin Y.* A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration // *Genes and Dev.*—1991.—5.—P. 160—174.
 82. *Кузнецова Е. Д., Андреева Л. Е., Серова И. А.* Новые данные о характере структурных изменений ДНК аденовируса обезьян SA 7, микроинъцированного в зиготы мышей // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.*—1988.—№ 1.—С. 6—10.
 83. *Тарантул В. З., Макарова И. В., Андреева Л. Е.* ДНК аденовируса обезьян и ее экспрессия в органах потомства трансгенных мышей // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.*—1986.—№ 1.—С. 22—26.
 84. *Rachlin J., Wollmann R., Dohrmann J.* Inoculation of simian virus 40 into pregnant hamsters can induce tumors in offspring // *Lab. Invest.*—1988.—58, N 1.—P. 26—30.
 85. *Gurney T., Jr., Gurney E. G.* Spontaneous rearrangements of integrated Simian Virus 40 DNA in nine transformed Rodent cell lines // *J. Virol.*—1989.—63, N 1.—P. 165—174.
 86. *Газарян К. Г., Гольцов В. А., Набирочкин С. Д.* Введение последовательностей ДНК вируса саркомы Рауса в геномы дрозофилы и мыши путем микроинъекций в яйцеклетки // *Молекуляр. биология.*—1985.—19.—С. 760—766.
 87. *Газарян К. Г., Набирочкин С. Д., Шахбазян А. К.* Индукция нестабильных мутаций у *Drosophila melanogaster* микроинъекцией онкогенных вирусов и их ДНК в ранние эмбрионы // *Генетика.*—1984.—20, № 8.—С. 1237—1243.
 88. *Reik W., Weiner H., Jaenisch R.* Replication-competent Moloney murine leukemia virus carrying a bacterial suppressor tRNA gene: selective cloning of proviral and flanking host sequences // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 2.—P. 1141—1145.
 89. *Hunter D. J., Gurney E. G.* The genomic instability associated with integrated simian virus 40 DNA is dependent on the origin of replication and early control region // *J. Virol.*—1994.—68, N 2.—P. 787—796.
 90. *Varela-Echavarria A., Prorock C. M., Ron Y., Pougherty J. P.* High rate of genetic rearrangement during replication of a Moloney murine leukemia virus-based vector // *J. Virol.*—1993.—67.—P. 6357—6364.
 91. *Wilkie T. M., Palmiter R. D.* Analysis of the integrant in Myk-103 transgenic mice in which tails fail to transmit the integrant // *Mol. Cell. Biol.*—1987.—7, N 5.—P. 1646—1655.
 92. *Rynditch A., Yatsula B., Hlozaneck I.* Virus-specific nucleotide sequences in duck cells transformed by chicken and duck-adapted RSV // *Fol. Biol.*—1986.—32.—P. 145—153.

УДК 577.29

Надійшла до редакції 23.10.2000