

# Integracja DNA w transgenезie zwierząt<sup>\*)</sup>

DANIEL LIPIŃSKI\*, EWA MICHALAK\*\*, RYSZARD SŁOMSKI\*/\*\*

\*Instytut Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

\*\*Katedra Biochemii i Biotechnologii Wydziału Rolniczego AR, ul. Wołyńska 32, 60-637 Poznań

## Lipiński D., Michalak E., Słomski R. DNA integration in animal transgenesis

### Summary

Foreign DNA can integrate into DNA genomes via two main classes of integration mechanisms: homologous recombination that draws on sequence similarity between the integrating sequences and the DNA genomes and non-homologous, or, illegitimate integration. Illegitimate integration of foreign DNA facilitates the modification of a cell's genetic content and produces transgenic animals but this process can have dramatic repercussions on the content, organization, and function of the recipient genome. A better understanding of the mechanisms and factors governing illegitimate DNA integration would help reduce the risk of unforeseeable genomic alterations. The article discusses the current state of knowledge about integrating foreign DNA and its consequences.

**Keywords:** transgenesis, DNA integration, DNA repair

Szybki rozwój technik inżynierii genetycznej w ostatnich latach umożliwia praktycznie wszelkie manipulacje z materiałem genetycznym *in vitro*. Wiele problemów stwarza jednak wydajne i swoiste wprowadzanie DNA do komórki. Wprowadzany do komórek kwas dezoksyrybonukleinowy jest hydrofilowym wielkocząsteczkowym polimerem o ujemnym ładunku. Przechodzenie takiego biopolimeru przez błonę komórkową jest mocno utrudnione. Inną poważną przeszkodą, jaką napotyka wprowadzanie DNA do komórek, jest liniowy rozmiar tych makrocząsteczek.

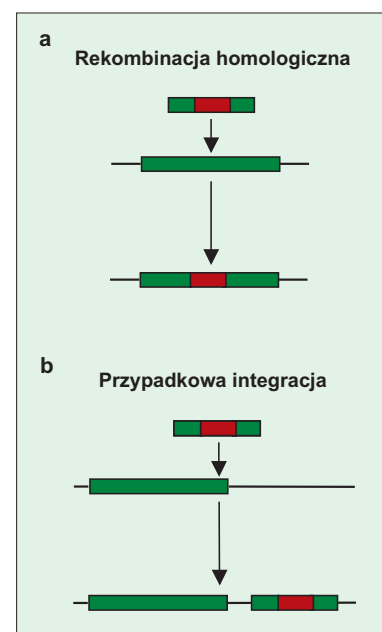
Trudności z wprowadzaniem DNA do komórek przyczyniły się do opracowania wielu nowych technik transfekcji, z których kilka znalazło szersze zastosowanie. DNA można wprowadzać do komórki metodami fizykochemicznymi, do których zalicza się elektroporację, precypitację, mikroiniekcję i biolistykę. Z metod biologicznych powszechnie wykorzystuje się wektory wirusowe i niewirusowe. Wektory wirusowe oparte są głównie na rekombinowanych retrowirusach i adenowirusach. Z wektorów niewirusowych najczęściej stosuje się liposomy.

Proces integracji egzogenego DNA zaczyna się w momencie wprowadzenia DNA do komórki. W większości przypadków w jego wejściu do jądra pośredniczą naturalne procesy komórkowe. Po wejściu do jądra większość egzogenego DNA jest szybko degradowana. Ponadto stężenie wprowadzonego DNA spada wraz z kolejnymi podziałami komórkowymi. Jedynie cząsteczki zawierające miejsce startu replikacji w określonych warunkach mogą przetrwać dłuższy okres jako au-

tonomicznie replikujące episomy. W zależności od rodzaju komórek w około jednej na tysiąc komórek wprowadzony DNA integruje z chromosomalnym DNA.

Egzogeny DNA może integrować z genomowym DNA na drodze rekombinacji homologicznej lub niehomologicznej (ryc. 1). W czasie rekombinacji homologicznej dochodzi do wymiany fragmentu chromosomu komórki gospodarza z fragmentem egzogenego DNA o podobnej sekwencji nukleotydów. Rekombinacja homologiczna jest zjawiskiem naturalnym występującym m.in. podczas wymiany chromatyd siostrzanych. Ponieważ w przypadku rekombinacji homologicznej miejsce integracji oraz jej skutki można przewidzieć,

**Ryc. 1.** Jeśli wprowadzany DNA zawiera sekwencje homologiczne z genomowym DNA, to może zintegrować w genom na drodze rekombinacji homologicznej. Jeżeli natomiast egzogeny DNA nie posiada takich sekwencji, to integruje w genom w przypadkowych miejscach poprzez rekombinację niehomologiczną. Zjawisko to wykorzystywane jest do uzyskiwania zwierząt transgenicznych



<sup>\*)</sup> Praca finansowana z grantów PBZ-KBN-048/P05/2001/03 i PBZ-KBN-048/P05/2002/04.

zjawisko to próbuje się wykorzystać w terapii genowej chorób. Z kolei w przypadku rekombinacji niehomologicznej nie można przewidzieć miejsca integracji egzogenego DNA z genomowym DNA komórki gospodarza, a na proces integracji nie ma wpływu obecność sekwencji homologicznych. Istnieją jednak przesłanki świadczące o tym, że w przypadku rekombinacji niehomologicznej miejsce integracji egzogenego DNA nie jest do końca przypadkowe. Warto dodać, że rekombinacja niehomologiczna jest również procesem występującym naturalnie np. podczas translokacji chromosomowych czy przemieszczania się transpozonów i retrotranspozonów.

### **Modyfikacje transgenu przed integracją z chromosomowym DNA**

Wprowadzony do komórki DNA jest na ogół bardzo szybko degradowany. Egzogenny DNA, który nie ulegnie degradacji podlega licznym modyfikacjom (8). Liniowa forma DNA po uprzedniej modyfikacji końców (36) może być przekształcona w formę kolistą, dzięki czemu unika szybkiej degradacji wynikającej z działalności komórkowych egzonukleaz. Proces łączenia końców jest niezależny od stężenia DNA (3). Zarówno liniowe, jak i koliste cząsteczki egzogenego DNA mogą brać udział w procesie rekombinacji homologicznej występującej pomiędzy cząsteczkami transgenu (9), co prowadzi do powstawania tzw. konkatamerów (10), czyli szeregowo połączonych cząsteczek transgenu. Najczęściej poszczególne kopie transgenu zorientowane są w tym samym kierunku, tworząc tzw. tandemy proste. Znacznie rzadziej obserwuje się cząsteczki transgenu zorientowane w pozycji odwróconej (tandemy odwrócone) (3). Oznacza to, że rekombinacja homologiczna, która prowadzi do powstawania tandemów prostych odgrywa ważniejszą rolę w tworzeniu konkatamerów niż mechanizm łączenia końców (end-joining) (10). W miejscu połączenia się cząsteczek transgenu tworzących konkatamer mogą pojawić się tzw. wypełniacze – krótkie odcinki DNA nieznanego pochodzenia (36). Podobne zjawisko obserwuje się zarówno w przypadku połączeń między transgenem a chromosomowym DNA (6, 37) jak i połączeń między genomem a regionem chromosomu, który uległ translokacji (27). Pomiedzy cząsteczkami transgenu może dochodzić również do wymiany fragmentów DNA w procesie rekombinacji niehomologicznej (38). Egzogenny DNA integruje z genomowym najczęściej w postaci konkatamerów, ponieważ rekombinacja pomiędzy cząsteczką transgenu a chromosomowym DNA występuje  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  razy rzadziej niż pomiędzy cząsteczkami transgenu (32). Ponadto przypadkowa integracja transgenu występuje ok. 1000 razy częściej niż rekombinacja homologiczna (29).

Od stopnia homologii sekwencji między transgenem a genomem biorcy oraz stadium cyklu komórkowego, w jakim znajduje się komórka w momencie transfekcji, zależy, który z mechanizmów rekombinacyjnych zajdzie po wprowadzaniu egzogenego DNA do komórki. Rekombinacja homologiczna zachodzi najczęściej w fazie S-G2 cyklu komórkowego, natomiast rekombinacja nie-

homologiczna wydaje się niezależna od fazy cyklu komórkowego (34). Wpływ na rodzaj rekombinacji ma także postać transgenu. Transgen w formie liniowej łatwiej penetruje środowisko komórki (4), częściej integruje z genomowym DNA (10) i stymuluje raczej integrację przypadkową (20). Ponadto zajście określonego rodzaju rekombinacji może stymulować sekwencja wolnych końców transgenu wprowadzonego do komórki w formie liniowej. Z analizy DNA połączeń transgen–chromosom wynika, że w przypadku integracji niehomologicznej w miejscu połączenia często pojawiają się 1-5 nukleotydowe sekwencje homologiczne (mikrohomologiczne) niewiadomego pochodzenia (10, 29). Może to być rezultat częściowego parowania zasad występujących na wystających jednoniciowych końcach łączonych fragmentów DNA (29). Od sekwencji wolnych końców zależy, który mechanizm łączenia się wolnych końców zostanie wykorzystany (zależny od homologii lub niezależny od homologii), a co za tym idzie, jaka będzie wydajność procesu łączenia.

### **Związek między integracją transgenu a naprawą dwuniciowych pęknięć w DNA**

Uważa się, że w obu rodzajach rekombinacji główną rolę odgrywają mechanizmy naprawy dwuniciowych pęknięć w genomowym DNA. Pęknięcia podwójnej helisy DNA pojawiające się w wyniku działania czynników fizykochemicznych wymagają występowania systemów monitorowania i naprawy powstałych uszkodzeń. Istniejące mechanizmy naprawy takich uszkodzeń wykorzystują wiele czynników i zjawisk działających również podczas procesów rekombinacyjnych, które są również inicjowane przez pojawienie się pęknięcia w podwójnej nici DNA. Niewłaściwe funkcjonowanie systemów naprawy DNA może prowadzić do różnego rodzaju zaburzeń, a w konsekwencji do śmierci komórki. Naturalne systemy naprawy i rekombinacji DNA umożliwiają również integrację egzogenego DNA w miejscu dwuniciowego pęknięcia. W komórkach ssaków dwuniciowe pęknięcia DNA mogą być naprawiane zarówno przy pomocy mechanizmów wykorzystujących zjawisko rekombinacji homologicznej między uszkodzonym DNA a DNA służącym jako substrat (16, 33), jak i mechanizmów wykorzystujących zjawisko rekombinacji niehomologicznej (28).

Wśród mechnizmów rekombinacji homologicznej biorących udział w naprawie dwuniciowego pęknięcia DNA wyróżnia się obecnie 3 modele:

Model DSB (double-strand break) – model naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (33). Rekombinacja homologiczna rozpoczyna się dwuniciowym pęknięciem, które za pomocą egzonukleaz degradujących obie nici jest powiększane. Następnie przerwa ta, uzupełniana jest przez kopiowanie sekwencji homologicznej znajdującej się w homologu (np. chromosomie homologicznym lub sekwencji homologicznej transgenu), poprzedzone obustronną inwazją na drugą cząsteczkę DNA (dawcy). Mechanizm rekombinacji opisany za pomocą modelu DSB jest mechanizmem konserwatywnym, ponieważ nie prowadzi do utraty informacji genetycznej.

Model SSA (single-strand annealing) – model wydłużania jednoniciowych odcinków DNA (16). Końce DNA w miejscu dwuniciowego pęknięcia są degradowane za pomocą specyficznej egzonukleazy, co prowadzi do odsłonięcia sekwencji homologicznych, a następnie ich sparowania. Niehomologiczne fragmenty w miejscu połączenia zostają usunięte, a powstałe przerwy uzupełnione wg homologii drugiej nici. Ponieważ dochodzi do utraty części sekwencji, opisany mechanizm jest mechanizmem rekombinacji niekonserwatywnej.

Model OSI (one-sided invasion) – model jednostronnej inwazji (2). W jednej cząsteczce DNA (biorcy) w miejscu dwuniciowego pęknięcia, nici 3' zostają za pomocą egzonukleazy odsłonięte, a następnie jedna z nich dokonuje inwazji na drugą cząsteczkę DNA (dawcy), co prowadzi do utworzenia pętli D. Rozpoczyna się polimeryzacja nici dokonującej inwazji i powiększenie pętli D. Następnie nowo zsyntetyzowana nić zostaje rozwinięta albo uwolniona po nacięciu nici stanowiącej dla niej matrycę. Kolejnym etapem jest ligacja uwolnionej nici z końcem nie dokonującym inwazji i wypełnianie powstałych luk. Model jednostronnej inwazji może prowadzić zarówno do rekombinacji konserwatywnej, jak i niekonserwatywnej.

W transgenezie zwierząt rekombinację homologiczną wykorzystuje się najczęściej do inaktywacji genu. Konstrukcje genowe typu inaktywującego zawierają sekwencję genu, który ma być inaktywowany z wprowadzoną mutacją. Zwykle ekson kodujący ważną domenę białka (lub koniec 5' tego regionu) zostaje przerwany pozytywnym markerem selekcyjnym, co uniemożliwia powstawanie prawidłowego mRNA. Gen może zostać inaktywowany również poprzez usunięcie fragmentu lub całego genu. W tym przypadku konstrukcja genu musi zawierać sekwencje homologiczne do genomowego DNA, leżące bezpośrednio z obu stron regionu, który ma być usunięty. W ten sposób można usunąć do 15 tysięcy par zasad i całkowicie wyeliminować wiele genów. Podczas rekombinacji homologicznej następuje wymiana genu zmutowanego z prawidłową sekwencją genomowego DNA.

Prawie wszystkie konstrukcje genowe stosowane w rekombinacji homologicznej podlegają selekcji pozytywnej na obecność genu warunkującego oporność na antybiotyk (np. G418). Ten sam gen stosuje się jednocześnie do inaktywacji badanego genu. Selekcja komórek antybiotykiem G418 (pochodna neomycyny) eliminuje zdecydowaną większość komórek, które nie mają konstrukcji stabilnie zintegrowanej z genomem. Jednakże w większości przypadków konstrukcja integruje z genomem w sposób przypadkowy. Najczęściej stosowaną metodą eliminacji komórek z przypadkowo zintegrowaną konstrukcją jest selekcja pozytywno-negatywna. W tego typu konstrukcjach powyżej inaktywowanego genu umieszcza się negatywny marker selekcyjny, np. gen kinazy tymidyny wirusa *Herpes simplex*. W obecności tego genu komórki są wrażliwe na acyklovir i jego analogi (np. gancyklovir). Enzym kinaza tymidyny wprowadza gancyklovir do syntetyzowanego łańcucha DNA, powodując jego terminację i śmierć

komórki. Podczas rekombinacji homologicznej zostają utracone sekwencje leżące poza regionem homologii do genu. W przeciwieństwie do tego, podczas przypadkowej integracji wszystkie sekwencje w konstrukcji zostają zachowane. Rekombinanty homologiczne są odporne na G418 i odporne na gancyklovir, podczas gdy klony z przypadkowo zintegrowaną konstrukcją są odporne na G418, a wrażliwe na gancyklovir. Oprócz kinazy tymidyny i gancykloviru zastosowanie znalazły także inne, również letalne dla komórek markery selekcyjne.

Celem eliminacji komórek z przypadkowo zintegrowanym genem stosuje się również konstrukcje, w których umieszcza się region kodujący marker selekcyjny pozbawiony promotora. Sekwencja kodująca marker przerywa ekson badanego genu i jest zgodna z ramką odczytu. Wprowadzenie do konstrukcji sekwencji IRES pozwala uniknąć potrzeby umieszczania genów selekcyjnych zgodnie z ramką odczytu, co znacznie upraszcza budowę konstrukcji. W ten sposób ekspresja markera selekcyjnego jest uzależniona od promotora endogenego i zachodzi tylko w przypadku rekombinacji homologicznej. W tym przypadku rekombinanty homologiczne są odporne na antybiotyk G418, a komórki z przypadkowo zintegrowaną konstrukcją wrażliwe na ten antybiotyk. Możliwe jest również zastosowanie markera selekcyjnego pozbawionego sygnału poli(A), co czyni jego transkrypt bardzo nietrwałym. Konstrukcję genową przygotowuje się w taki sposób, aby po integracji konstrukcji, w przypadku rekombinacji homologicznej pojawił się sygnał poli(A). W ten sposób transkrypt genu selekcyjnego staje się bardziej trwały, co umożliwia selekcję pozytywną.

W przypadku genów, które są niezbędne dla rozwoju wczesna inaktywacja uniemożliwiłaby uzyskanie osobnika dorosłego. Opóźnienie inaktywacji genu do czasu, aż zwierzę stanie się dorosłe umożliwiłoby jego normalny rozwój, a inaktywacja genu mogłaby nastąpić u dorosłego osobnika. System rekombinazy Cre-loxP umożliwia inaktywację genu ograniczoną czasowo, poprzez kontrolę aktywności lub ekspresji rekombinazy, jak i przestrzennie, dla określonego typu komórek lub tkanek, dzięki zastosowaniu promotorów komórkowo specyficznych lub promotorów indukowanych. System Cre-loxP pochodzi z bakteriofaga P1. Rekombinaza Cre działa na miejsca loxP w DNA. Miejsce loxP składa się z dwóch palindromowych, 13 nukleotydowych sekwencji, rozdzielonych sekwencją 8 nukleotydową. Jeżeli dwa miejsca loxP o tej samej orientacji znajdują się blisko siebie, rekombinaza może utworzyć pętlę z sekwencji leżącej pomiędzy dwoma takimi miejscami i usunąć ją, pozostawiając jedno miejsce loxP w genomowym DNA, a drugie na kolistym fragmencie DNA zawierającym sekwencję wyciętą, szybko ulegającą degradacji. Jeżeli miejsca loxP znajdują się w przeciwnej orientacji, rekombinaza Cre powoduje inwersję sekwencji leżącej pomiędzy nimi. W obu przypadkach reakcja jest odwracalna. Właściwie zaprojektowana konstrukcja zawierająca miejsca loxP może zostać zastosowana do wprowadzania subtelnych mutacji lub do czasowo albo przestrzennie kontrolowanej inaktywacji. Poza rekombina-

zają Cre również inne rekombinazy, takie jak rekombinaza FLP rozpoznająca na DNA miejsca FRT, mogą zostać w podobny sposób wykorzystane.

Rekombinaza Cre może z powodzeniem zostać zastosowana do usuwania markerów selekcyjnych, których obecność w genomowym DNA może powodować liczne niepożądane skutki. Konstrukcja genu musi zawierać markery selekcyjne leżące pomiędzy dwoma miejscami loxP, które mają tę samą orientację. Ekspresja rekombinazy Cre może nastąpić albo poprzez transfekcję do komórek wektora ekspresyjnego produkującego enzym Cre, albo przez lipofekcję enzymu do komórek. Po wycięciu markera selekcyjnego w genomowym DNA pozostaje jedno miejsce loxP, ale konstrukcja może być zaprojektowana w taki sposób, aby pozostawało w miejscu mniej istotnym, takim jak intron.

Mechanizm integracji niehomologicznej wydaje się znacznie prostszy niż przedstawione mechanizmy rekombinacji homologicznej. Wykorzystuje system naprawy pęknięć dwuniciowych zwany łączeniem końców niehomologicznych (NHEJ – nonhomologous end-joining). Proces ten może być wykorzystany nie tylko do naprawy pęknięć dwuniciowych powstających w wyniku działania promieniowania jonizującego oraz mutagenów chemicznych, ale również do łączenia fragmentów egzogenego DNA z wolnymi końcami DNA genomowego (8). W proces zaangażowane są 4 grupy genów kodujące złożony kompleks białkowy kierujący ligazę DNA do miejsca pęknięcia. W skład kompleksu wchodzi białko Ku zbudowane z dwóch podjednostek Ku70 oraz Ku80, które wiążą się z DNA wraz z kinazą białkową zwaną DNA-PK<sub>CS</sub>, aktywującą trzecie białko XRCC4. Białko XRCC4 oddziałuje z ligazą DNA IV, kierując ją w miejsce dwuniciowego pęknięcia. Białka naprawcze mogą również najpierw połączyć się z wolnymi końcami wprowadzonego do komórki transgeny i skierować je w pobliże dwuniciowego pęknięcia DNA. W warunkach laboratoryjnych można zwiększyć częstość integracji stymulując powstawanie dwuniciowych pęknięć poprzez zastosowanie inhibitorów topoizomerazy, enzymów restrykcyjnych, czynników mutagenicznych czy promieniowania UV.

### **Efekty integracji egzogenego DNA**

Integracja egzogenego DNA z genomowym DNA komórki biorcy może prowadzić do ogólnej niestabilności genomu występującej w miejscu wbudowania transgeny. Miejsce integracji staje się podatne na mutacje, które w zależności od rodzaju komórek, jak i metody transfekcji może być przyczyną licznych zaburzeń.

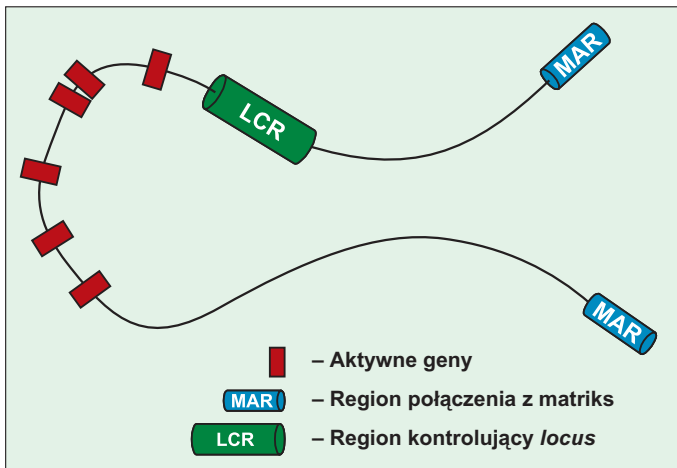
W przypadku mikroiniekcji DNA do zapłodnionego oocyta obserwuje się wysoką śmiertelność zarodków na bardzo wczesnym etapie rozwoju w porównaniu z grupą kontrolną. Przyczyną wysokiej letalności mogą być delecje genomowego DNA (7, 19) lub translokacje wzajemne (18) w miejscu lub w pobliżu miejsca integracji transgeny. Możliwe jest też zaburzenie przez transgen ekspresji kluczowego dla rozwoju zarodka genu (37).

Uważa się, że podobne zjawiska zachodzą w liniach komórkowych po transfekcjach (19). W liniach komór-

kowych obserwuje się delecje genomowego DNA w pobliżu miejsca integracji egzogenego DNA (13), formowanie chromosomów dicentrycznych (25), tworzenie kruchego miejsca w chromosomie (26). Jednak o wiele trudniej ocenić śmiertelność w liniach komórek hodowanych *in vitro*. Stosunkowo częstym zjawiskiem w liniach komórkowych po transfekcjach sekwencjami wirusowymi (np. adenowirusami) jest transformacja nowotworowa, której przyczyną jest niestabilność genomowa komórek (11). Ponadto zjawiska rearanżacji genomowego DNA po integracji egzogenego DNA mogą sprzyjać transpozycji (przemieszczaniu się) endogennych protoonkogenów, co również prowadzi do transformacji nowotworowej (23). Powstałe mutacje (delecje, duplikacje, insercje) mogą utrzymywać się w linii komórkowej (20).

Zjawiskiem często pojawiającym się w związku z integracją egzogenego DNA w komórkach ssaków jest, pomimo stwierdzenia stabilnego wbudowania transgeny w chromosom, wyciszenie ekspresji transgeny. Odkryto, że miejsce wbudowania ulega metylacji *de novo* (22). Prawdopodobnie jest to swoista obrona komórki przed egzogenym DNA. Szczególnie podatne na zmiany w metylacji są sekwencje powtarzalne (22). Ponieważ egzogeny DNA integruje najczęściej w postaci szeregów tandemowych, prowadzi to do ich metylacji i zablokowania ekspresji transgeny. Wraz ze wzrostem liczby kopii transgeny w szeregu tandemowym maleje poziom ekspresji transgeny (21). Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nie są dostatecznie wyczerpujące, aby wyjaśnić, czy metylację stymuluje liczba kopii transgeny, czy też jest to efekt wywołany przez położenie transgeny w chromosomie. Dowiedziano również, że metylacja takiego szeregu transgenicznego może prowadzić do lokalnego tworzenia heterochromatyny (14). W miejscu tym zbiegają się trzy zjawiska: powtarzalności sekwencji (szereg tandemowy transgeny), metylacji i heterochromatynizacji. Wyznaczenie wzajemnych relacji przyczynowo-skutkowych między nimi byłoby niezmiernie ważne dla wyjaśnienia mechanizmów kierujących przebiegiem integracji egzogenych sekwencji z genomowym DNA oraz przewidywania skutków ich integracji.

Ponadto istnieje także fenomen zwany efektem pozycji w chromosomie (PEV – position effect variegation). Miejsce wbudowania transgeny ma wpływ zarówno na poziom ekspresji transgeny oraz czas jego aktywacji, jak i na podatność na różnego typu rearanżacje. Transgen nie będzie ulegał ekspresji, jeżeli włączy się do transkrypcyjnie nieaktywnego regionu chromatyny. Aby temu zapobiec, można zastosować w konstrukcjach genowych sekwencje regulacyjne typu MAR (matrix attachment regions) (30) i LCR (locus control region) (1) umożliwiające, poprzez utrzymywanie otwartej struktury chromatyny, niezależną od pozycji ekspresję genu. Niezależną od pozycji ekspresję genu można również osiągnąć za pomocą wektorów episomalnych, sztucznych chromosomów lub wprowadzając transgen w specyficzne miejsca w genomie wykorzystując zjawisko rekombinacji homologicznej.



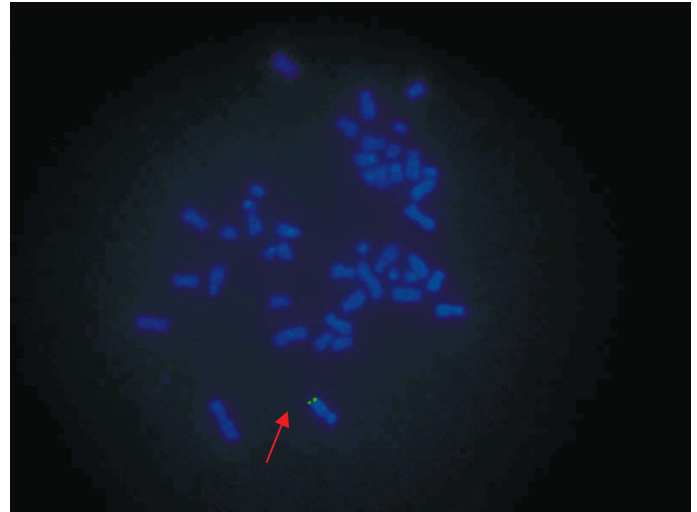
Ryc. 2. W obrębie euchromatyny zawierającej aktywne geny obserwuje się pętle włókna chromatynowego 30 nm połączone z matriks jądrową za pomocą regionów bogatych w AT, zwanych rejonami połączenia z matriks (MAR). Tego typu sekwencje chronią jednostki transkrypcyjne leżące w obrębie jednej pętli DNA przed wpływem elementów regulatorowych, takich jak wzmacniacze czy wyciszacze, kontrolujących ekspresję genów w sąsiadujących pętlach DNA oraz zapobiegają heterochromatyzacji. Pętle DNA połączone z matriks jądrową nazwano domenami strukturalnymi. W obrębie domen strukturalnych występują obszary DNA otaczające gen lub grupę genów ulegających ekspresji, tworzące domeny funkcjonalne. W utworzeniu i utrzymaniu otwartej domeny funkcjonalnej mogą brać udział sekwencje DNA, zwane regionami kontrolującymi locus (LCR)

### Miejsce integracji – czy w pełni losowe?

Miejsca integracji egzogenego DNA w czasie rekombinacji niehomologicznej nie można przewidzieć i w związku z tym uważa się je za losowe. Istnieją jednak przesłanki świadczące o tym, że nie są to miejsca całkowicie przypadkowe.

Z danych literaturowych wynika, że miejscem szczególnie podatnym na integrację niehomologiczną są sekwencje powtórzone (13). Ponieważ jednak genom ssaków składa się w znacznej części z sekwencji powtarzalnych, jest to stwierdzenie dosyć ogólne. Znacznie bardziej interesujące są doniesienia o integracji egzogenych sekwencji DNA w określone sekwencje powtórzone. Sekwencje wirusowe (w tym przypadku wirusa HIV) szczególnie często integrują w obrębie dwóch najbardziej powtarzalnych sekwencji w genomie człowieka, tj. sekwencji L1 i Alu (31). Sekwencje L1 należą do rodziny LINES i występują w genomie w ok. 100 tysięcy kopii, natomiast Alu to sekwencje z rodziny SINES i liczba ich może dochodzić do 900 tysięcy. W innym doświadczeniu stwierdzono częstszą integrację transgenów w indukowane chemicznie (specjalne warunki hodowli) miejsca kruche w chromosomie (26). Najbardziej poznane jest miejsce kruche chromosomu X u człowieka, w którym stwierdzono występowanie powtórzeń CGG (im więcej takich tripletów tym objawy niedorozwoju umysłowego są bardziej widoczne) (24).

Wykonano także szereg doświadczeń, gdzie transgenem były sekwencje powtarzalne. Transfekcja komórek CHO sekwencjami  $\alpha$ -satelitarnymi lub syntetycznym



Ryc. 3. Lokalizacja transgeny metodą FISH na chromosomach metafazowych transgenicznego królika 5K7 (pokolenie F1 po króliku NT20). Transgen WAP(6xHisThr):hGH zamapowano w układzie heterozygotycznym w chromosomie 7q26-27

polimerem poli(dGdT)<sub>200</sub> powodowała liczne rearanżacje chromosomowe w komórkach, prowadzące do niestabilności genomu (12). Eksperyment, w którym wprowadzano sekwencje telomerowe wykazał, że integrowały one w pobliżu telomerów występujących w komórce (15). Nie stwierdzono jednak, jaką rolę w integracji transgeny, w związku z podobieństwem jego sekwencji do sekwencji miejsca, w którym nastąpiła jego integracja, odegrały mechanizmy związane z zjawiskiem rekombinacji homologicznej.

Inne doniesienia wskazują, że oprócz specyficzności sekwencji, preferowaną cechą miejsca wbudowania transgeny może być jego topologia. Ogólnie mówi się o „zagiętej” strukturze DNA (bent DNA) jako strukturze sprzyjającej rekombinacji niehomologicznej. Obecność takich struktur zaobserwowano w czasie replikacji, transkrypcji i rekombinacji homologicznej, ale odnaleziono je także w odległości ok. 1 kb od miejsca połączenia transgen–chromosom po zajściu rekombinacji niehomologicznej (21). W związku z tym powstała hipoteza, że miejsca aktywne transkrypcyjnie są miejscami podatnymi na integrację niehomologiczną (11), a nawet że wysoka aktywność transkrypcyjna ułatwia proces integracji (35). Oczko replikacyjne, a więc otwarta struktura DNA tworząca się podczas replikacji, często jest uważana za czynnik sprzyjający integracji niehomologicznej (3).

Stwierdzono, że zarówno topoizomeraza I (wprowadzająca jednoniciowe nacięcia w DNA), jak i topoizomeraza II (dwuniciowe nacięcia) mogą uczestniczyć w przebiegu rekombinacji niehomologicznej. Topoizomeraza II rozpoznaje sekwencje typu MAR wiążące DNA ze szkieletem jądrowym. Niektórzy autorzy uważają, że sekwencje MAR są miejscem częstego wbudowywania transgeny (30). Doniesiono również o preferencyjnym integrowaniu sekwencji wirusa SV40 w pobliżu miejsca rozpoznawanego przez topoizomerazę I (5). Całkowicie unikalne miejsca integracji transgeny

zaobserwowano podczas spontanicznego pobierania egzogenego DNA przez spermatoocyty myszy. Sugeruje się jednak, że wpływ na przebieg procesu integracji ma proces retranspozycji (17).

### Podsumowanie

Zjawisko nieuprawnionej integracji egzogenego DNA umożliwia modyfikację genetyczną organizmów. Skutki takiej integracji są na dzień dzisiejszy nieprzewidywalne. Egzogeny DNA integruje z genomem bardzo rzadko. Zintegrowany z genomowym DNA transgen może nie ulegać ekspresji albo poziom jego ekspresji może być niewystarczający. Ponadto ekspresja transgenu może się pojawiać w niewłaściwych tkankach lub niewłaściwym stadium rozwoju organizmu. Uzyskanie linii zwierząt transgeniczných o odpowiednio wysokim poziomie ekspresji transgenu, ograniczonej do jednego typu tkanki i odpowiedniego stadium rozwoju, wymaga wyprodukowania i zbadania wielu linii transgeniczných zwierząt. Zrozumienie mechanizmów kierujących integracją egzogenego DNA z genomowym DNA komórki gospodarza umożliwi opracowanie metod, które pozwolą przewidzieć skutki integracji. Możliwe stanie się również opracowanie substancji blokujących proces łączenia końców niehomologicznych, co w przyszłości pozwoli zastosować terapie genowe w leczeniu chorób o podłożu genetycznym.

### Piśmiennictwo

1. Antoniou M., Harland L., Mustoe T., Williams S., Holdstock J., Yague E., Mulcahy T., Griffiths S., Edwards S., Ioannou P. A., Mountain A., Crombie R.: Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics* 2003, 82, 269-279.
2. Belmaaza A., Wallenburg J. C., Brouillette S., Gusew N., Chartrand P.: Genetic exchange between endogenous and exogenous LINE-1 repetitive elements in mouse cells. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 6385-6391.
3. Bishop J. O.: Chromosomal insertion of foreign DNA. *Reprod. Nutr. Dev.* 1996, 36, 607-618.
4. Bishop J. O., Smith P.: Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol. Biol. Med.* 1989, 6, 283-298.
5. Bullock P., Champoux J. J., Botchan M.: Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. *Science* 1985, 230, 954-958.
6. Chen C. M., Choo K. B., Cheng W. T.: Frequent deletions and sequence aberrations at the transgene junctions of transgenic mice carrying the papillomavirus regulatory and the SV40 TAG gene sequences. *Transgenic Res.* 1995, 4, 52-59.
7. Covarrubias L., Nishida Y., Terao M., D'Eustachio P., Mintz B.: Cellular DNA rearrangements and early developmental arrest caused by DNA insertion in transgenic mouse embryos. *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 2243-2247.
8. Dellaire G., Yan J., Little K. C., Drouin R., Chartrand P.: Evidence that extrachromosomal double-strand break repair can be coupled to the repair of chromosomal double-strand breaks in mammalian cells. *Chromosoma* 2002, 111, 304-312.
9. Folger K. R., Thomas K., Capecchi M. R.: Nonreciprocal exchanges of information between DNA duplexes coinjected into mammalian cell nuclei. *Mol. Cell. Biol.* 1985, 5, 59-69.
10. Folger K. R., Wong E. A., Wahl G., Capecchi M. R.: Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* 1982, 2, 372-1387.
11. Heller H., Kammer C., Wilgenbus P., Doerfler W.: Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage  $\lambda$ ) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 5515-5519.
12. Heartlein M. W., Knoll J. H., Latt S. A.: Chromosome instability associated with human aliphoid DNA transfected into the chinese hamster genome. *Mol. Cell. Biol.* 1988, 8, 3611-3618.
13. 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, 1787-1795.
14. Keshet I., Lieman-Hurwitz J., Cedar H.: DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 1986, 44, 535-543.
15. Kilburn A. E., Shea M. J., Sargent R. G., Wilson J. H.: Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21, 126-135.
16. Lin F. L., Sperle K., Sternberg N.: Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell. Biol.* 1984, 4, 1020-1034.
17. Magnano A. R., Giordano R., Moscufo N., Baccetti B., Spadafora C.: Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome. *J. Reprod. Immunol.* 1998, 41, 187-196.
18. Mahon K. A., Overbeek P. A., Westphal H.: Prenatal lethality in a transgenic mouse line is the result of a chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 1165-1168.
19. Mark W. H., Signorelli K., Blum M., Kwee L., Lacy E.: Genomic structure of the locus associated with an insertional mutation in line 4 transgenic mice. *Genomics* 1992, 13, 159-166.
20. Merrihew R. V., Marburger K., Pennington S. L., Roth D. B., Wilson J. H.: High-frequency illegitimate integration of transfected DNA at preintegrated target sites in a mammalian genome. *Mol. Cell. Biol.* 1996, 16, 10-18.
21. Milot E., Strouboulis J., Trimbom T., Wijgerde M., de Boer E., Langeveld A., Tan-Un K., Vergeer W., Yannoutsos N., Grosveld F., Fraser P.: Heterochromatin effects in the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 1996, 87, 105-114.
22. Muller K., Heller H., Doerfler W.: Foreign DNA integration. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 14271-14278.
23. Murnane J. P.: Inducible gene expression by DNA rearrangements in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 1986, 6, 549-558.
24. Oostra B. A., Willemsen R.: The X chromosome and fragile X mental retardation. *Cytogenet. Genome Res.* 2002, 99, 257-264.
25. Randal J. K., Sharp P. A., Latt S. A.: Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences. *Mol. Cell. Biol.* 1983, 3, 699-711.
26. Rassool F. V., McKeithan T. W., Neilly M. E., van Melle E., Espinoza III R., Le Beau M. M.: Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p12: an approach to cloning fragile sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 6657-6661.
27. Roth D. B., Chang X. B., Wilson J. H.: Comparison of filler DNA at immune, nonimmune, and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanisms of formation. *Mol. Cell. Biol.* 1989, 9, 3049-3057.
28. Roth D., Wilson J.: [w:] Kucherlapati R., Smith G. R. (red.): Genetic Recombination. American Society for Microbiology, Washington DC 1988, 621-653.
29. Roth D. B., Wilson J. H.: Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol. Cell. Biol.* 1986, 6, 4295-4304.
30. Sperry A. O., Blasquez V. C., Garrard W. T.: Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 5497-5501.
31. Stevens S. W., Griffith J. D.: Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 5557-5561.
32. Subramani S., Rubnitz J.: Recombination events after transient infection and stable integration and stable integration of DNA into mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 1985, 5, 659-666.
33. Szostak J. W., Orr-Weaver T. L., Rothstein R. J., Stahl F. W.: The double-strand break repair model of recombination. *Cell* 1983, 33, 25-35.
34. Takata M., Sasaki M. S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S.: Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 1998, 17, 5497-5508.
35. Thyagarajan B., Johnson B. L., Campbell C.: The effect of target site transcription on gene targeting in human cells in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1996, 23, 2784-2790.
36. Wake C. T., Gudewicz T., Porter T., White A., Wilson J. H.: How damaged is the biologically active subpopulation of transfected DNA? *Mol. Cell. Biol.* 1984, 4, 387-398.
37. Wilkie T. M., Palmiter R. D.: Analysis of the integrant in MyK-103 transgenic mice in which male fails to transmit the integrant. *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 1646-1655.
38. Wilson J.H., Berget P. B., Pipas J. M.: Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end. *Mol. Cell. Biol.* 1982, 2, 1258-1269.