

На правах рукописи

ЯКОВЛЕВ
КОНСТАНТИН ВЛАДИМИРОВИЧ

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭМБРИОНОВ
МОРСКИХ ЕЖЕЙ И НАРУШЕНИЕ ХОДА ЭМБРИОГЕНЕЗА ПРИ
ЭКСПРЕССИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОНКОГЕНОВ *rolB* И *rolC***

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2008

Работа выполнена в Лаборатории биофизики клетки Института биологии моря
имени А.В. Жирмунского ДВО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, вед. н. с.
Одинцова Нэлия Адольфовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
Исаева Валерия Васильевна
член-корреспондент РАН,
Михайлов Валерий Викторович

Ведущая организация:
Институт цитологии РАН

Защита состоится «___» февраля 2008 г. в «10» часов на заседании
диссертационного совета Д.005.008.01 при Институте биологии моря имени
А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского,
17. факс: (4232) 310-900,
e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря
имени А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Адрес: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «___» января 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Вашенко

Вашенко М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На сегодняшний день агробактериальная трансформация растений является самым изученным примером горизонтального переноса генов от бактерий к эукариотам *in vivo*. В ходе эволюции бактерии рода *Agrobacterium* (в соответствии с новой классификацией большинство видов реклассифицировано в род *Rhizobium*, однако большинство ученых, изучающих агробактериальную трансформацию растительных клеток, используют старое название) приспособились к переходу от сапротрофного типа питания к своеобразному паразитическому типу. Это происходит путем переноса в растительные клетки генов синтеза опинов (продуктов реакции кетосахаров и аминокислот) и генов, вызывающих неопластическую трансформацию клеток растений. В результате такой трансформации у растений появляются быстро делящиеся клетки, синтезирующие опины, которые служат для агробактерий источником углерода и азота. Агробактериальная трансформация нашла широкое применение в генной инженерии растений и сейчас является одним из распространенных методов генетической трансформации растений.

Наличие у ряда представителей некоторых групп морских беспозвоночных (кольчатые черви, моллюски, ракообразные, иглокожие) ферментов опинового синтеза позволило сделать предположение о возможном переносе генов опинсинтетаз от агробактерий к морским беспозвоночным. Вопрос о возможной агробактериальной трансформации животных клеток долгое время оставался открытым, пока в 2001 году не было показано на культуре клеток человека *HeLa*, что агробактерии могут трансформировать клетки млекопитающих (Kunik *et al.*, 2001). Несколько лет ранее было показано, что агробактерии могут трансформировать клетки грибов (Bundock, Ноукаас, 1996; Piers *et al.*, 1996).

На сегодняшний день известно, что активация генов под контролем растительных промоторов (*nos* и *35S*) в животных клетках возможна благодаря распознаванию их регуляторными элементами клетки-реципиента (Ballas *et al.*, 1989; Zahm *et al.*, 1989). Эти промоторы имеют либо вирусную природу (*35S*, вирус мозаики цветной капусты), либо агробактериальную (*nos*, бактерии рода *Agrobacterium*). Однако информации о функционировании именно регуляторных генов растений в клетках животных нет. Это особенно касается функционирования растительных онкогенов *rol* из *Agrobacterium rhizogenes* (*Rhizobium rhizogenes*) в связи с возможностью агробактериальной трансформации клеток животных.

В наших экспериментах мы показали, что в условиях морской среды *in vitro* может происходить агробактериальная трансформация при совместном культивировании эмбрионов морских ежей с агробактериями *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*), которые несут растительные онкогены *rolB* и *rolC*. У части эмбрионов нарушается ход эмбриогенеза с образованием опухолеподобных структур (ОПС). Такие структуры формируются на поверхности эмбрионов и получили свое название из-за внешнего вида. Подобное нарушение эмбриогенеза было описано ранее после трансформации генетическими конструкциями, несущими ген универсального активатора транскрипции *gal4* (Bulgakov *et al.*, 2002). В наших исследованиях мы изучали строение эмбрионов с ОПС после трансформации плазмидной ДНК, несущей ген *gal4*, и после агробактериальной трансформации генами *rolB* и *rolC*. Это позволило выявить различия в строении эмбрионов с опухолеподобными структурами и в строении самих ОПС, а на основании этого установить, что возникновение опухолеподобных структур является следствием действия разных механизмов.

Цели и задачи исследования. При выполнении работы мы преследовали две цели. Во-первых, изучить явление агробактериального переноса Т-ДНК (transferred DNA, переносимая одноцепочечная ДНК) в геномную ДНК эмбрионов морских ежей, доказать встройку чужеродной ДНК и активность перенесенных генов *rolB* и *rolC*. Во-вторых, изучить влияние растительных онкогенов *rolB* и *rolC* на ход эмбриогенеза морских ежей.

Для достижения этих целей были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Подобрать и оптимизировать условия агробактериальной трансформации эмбрионов морских ежей в процессе их совместного культивирования со штаммами *A. tumefaciens*, которые несут бинарный вектор: рMP90RK (*vir*-хелперная плаزمида) и рPCV002, содержащую в составе Т-ДНК один из генов *rol* (*rolB* или *rolC*). Определить возможные механизмы трансформации.
2. Оценить эффективность агробактериальной трансформации в сравнении с полиэтиленгликоль(ПЭГ)-опосредованной трансформацией плазмидными конструкциями, несущими чужеродные гены.
3. Доказать встройку Т-ДНК в геномную ДНК эмбрионов морских ежей, используя методы ПЦР и ТАИЛ-ПЦР. Определить активность генов *rolB* и

rolC методом обратнo-транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ ПЦР) после совместного культивирования эмбрионов с агробактериями.

4. Провести сравнительный морфологический анализ эмбрионов с опухолеподобными структурами, возникающими вследствие трансформации генетическими конструкциями, несущими ген *gal4* и гены *rolB* и *rolC*. Определить сходство и различие в строении эмбрионов и опухолеподобных структур после трансфекции.

Научная новизна и теоретическая значимость. В нашей работе впервые продемонстрирована возможность агробактериальной трансформации в условиях морской среды на примере эмбрионов морских ежей. Это является подтверждением гипотезы о переносе генов опинового синтеза от агробактерий к представителям различных групп морских беспозвоночных. Более того, нами зафиксирована встройка агробактериальной Т-ДНК в геномную ДНК морских ежей. Наряду с известным фактом трансформации клеток млекопитающих наши данные указывают на целенаправленный транспорт Т-ДНК в ядра клеток животных.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 7-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2003), на I и IV Всероссийских симпозиумах по клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003, 2006), на международном научном семинаре «Проблемы репродукции и раннего онтогенеза морских гидробионтов» (Мурманск, 2004), на Международной научной конференции «Инновации в науке и образовании – 2006» (Калининград, 2006), на X Международной молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС, ТИБОХ, 2006) и на годичной научной конференции Института биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, включая 2 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 108 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 рисунками и содержит 2 таблицы. Список литературы содержит 193 наименования.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президиума ДВО РАН (гранты 03-3-Ж-06-096, 04-3А-06-047, 06-II-СО-06-025 и 06-III-B-06-214) и при финансовой поддержке НОЦ ДВГУ за счет

средств фонда US CRDF (проект VL-003) и Министерства Образования РФ (А03-2.12-524).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальную часть работы проводили на морской биологической станции «Восток» Института биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН (Приморский край, Находкинский район). Морских ежей (*Scaphechinus mirabilis*, *Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*) собирали в заливе Восток Японского моря с июля по октябрь и держали в ваннах с проточной аэрированной водой. Нерест морских ежей стимулировали инъекцией 0,5 М КСl в область аристотелева фонаря. Эмбрионов получали искусственным оплодотворением.

Для агробактериальной трансформации использовали штамм *A. tumefaciens* GV3101, который несет бинарный вектор: рMP90RK (*vir*-хелперная плаزمида) и рPCV002. Плазмида рPCV002 содержит в составе Т-ДНК один из онкогенов *rol* из *A. rhizogenes* (*rolB* либо *rolC*) и ген *nptII*, кодирующий неомицинофосфотрансферазу. Агробактериальную трансформацию проводили путем совместного культивирования агробактерий и эмбрионов морских ежей с последующим добавлением антибиотика цефатоксима через 10-13 часов после начала эксперимента.

Для трансформации плазмидной ДНК с генами *rol* использовали штаммы *Escherichia coli* TG2 с плазмидами рPCV002-*rolC*, рPCV002-*rolB* и рPCV002. В эксперименте по изучению влияния гена *gal4* мы использовали штамм *E. coli* TG2 с плазмидой рМА563, любезно предоставленной доктором М. Пташне (М. Ptashne, Гарвардский университет, США). Гены *rol* в плазмидах находятся под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, гены *nptII* и *gal4* – под контролем нопаинсинтазного промотора *nos*. Выделение плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса. Трансформацию плазмидной ДНК проводили ПЭГ-опосредованным методом (Bulgakov *et al.*, 2002).

Для изучения влияния растительных онкогенов на ход эмбриогенеза мы использовали штамм *A. tumefaciens* A348, несущий одну из плазмид: рTi237 (мутантный ген *virA*), рTi243 (мутантный ген локуса *virB*) или рTi19 (мутантный ген *virG*). Данные гены инактивированы вставкой транспозона Tn3-Но-Hol (Stachel, Nester, 1986).

ДНК из эмбриональных культур выделяли согласно Т. Маниатису (Maniatis *et al.*, 1982), с использованием буфера, содержащего р-р 7 М

мочевины. Тотальную РНК выделяли из эмбрионов с помощью набора YellowSolve (Клоноген, Санкт-Петербург, Россия) с последующей обработкой ДНКазой (Amresco, США) и депротеинизацией сорбентом BlueSorb (Клоноген, Санкт-Петербург, Россия). Обратную транскрипцию проводили, используя набор фирмы Силекс М (Москва, Россия). Доказательство трансгенности и экспрессии перенесенных генов проводили с помощью генспецифических ПЦР и ОТ-ПЦР с последующим секвенированием по методике, описанной ранее (Bulgakov *et al.*, 2002; Одинцова и др., 2003; Bulgakov *et al.*, 2006). Доказательство встройки Т-ДНК в геномную ДНК эмбрионов морских ежей проводили методом ТАИЛ (thermal asymmetric interlaced)-ПЦР по схеме, описанной Я. Лиу с соавторами (Liu *et al.*, 1995), с последующим клонированием продуктов реакции при помощи набора «InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit» (Fermentas, Vilnius, Литва) согласно протоколу фирмы-производителя. ПЦР-продукты клонированных фрагментов после ТАИЛ-ПЦР были секвенированы при помощи пары праймеров M13. Генспецифические ПЦР-продукты секвенировали с праймерами, которые использовали при ПЦР фрагментов этих генов. Реакцию проводили, используя набор реактивов «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit» V. 3.1 (Perkin-Elmer Biosystems, Forster City, США) по методике производителя. Последовательность фрагментов ДНК определяли на секвенаторе ABI 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer Biosystems, США) на базе Биолого-почвенного института ДВО РАН.

Для определения изменения рН в процессе культивирования мы проводили измерения рН морской воды в совместной культуре агробактерий (*A. tumefaciens* GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002-rolC) и эмбрионов морских ежей в течение 3 суток. Измерения значения рН проводили при помощи рН-метра OR-211/1 с комбинированным электродом (Radelkis, Венгрия). В эксперименте ставили три параллели: 1) эмбрионы без добавления агробактерий; 2) эмбрионы с добавлением агробактерий; 3) эмбрионы с добавлением агробактерий и с добавлением цефатоксима через 12-13 часов совместного культивирования. Отдельно проводили измерение рН морской воды, которую брали для культивирования.

Морфологию эмбрионов исследовали методами световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Эмбрионы фиксировали 2% глютаральдегидом на изоосмотичном фосфатном буфере (исходя из того, что соленость морской воды 32‰) с последующей дофиксацией 1% тетраоксидом осмия на том же буфере. Материал заливали в смесь смол Эпон

и Аралдит (Fluka, Швейцария), либо в Спурр (Sigma, США). Срезы получали на ультратоме Ultracut-E (Reichert-Jung, Австрия). Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим (Уикли, 1975) и изучали под световым микроскопом Polyvar (Reichert-Jung, Австрия). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по методу Рейнольдса (Уикли, 1975) с последующим просмотром на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Локализацию пролиферирующих клеток в эмбрионах определяли методом иммуноцитохимического выявления включения 5-бромо-2'-дезоксинуридина (БДУ). Для этого к эмбрионам морских ежей, культивируемым совместно с агробактериями (агробактериальная трансформация), через 24 часа после оплодотворения добавляли БДУ до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 8 часов (32 часа развития). Выявление включения БДУ проводили по протоколу Танаки и Дана (Ettensohn, Ruffins, 1993) с незначительными модификациями.

Статистические данные обработаны с помощью программы GraphPadPrizm (версия 4.0) и представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Полученные данные оценивали по спаренному *t*-критерию Стьюдента. Уровень значимости 0,05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность агробактерий в морской воде и формирование контактов между агробактериями и эмбрионами морских ежей

Возможность агробактериальной трансформации в условиях повышенной солености напрямую связана с изучением вопроса о жизнеспособности агробактерий в морской воде и способности клеток последних нормально размножаться в этой среде. В данной работе мы проверяли жизнеспособность агробактерий *A. tumefaciens* GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002-*rolC* в чистой морской воде и в совместной культуре с эмбрионами морских ежей. В течение 5 дней агробактерии остаются живыми в морской воде, но их количество постепенно уменьшается. Однако, при культивировании с живыми эмбрионами количество агробактерий сильно возрастает, что приводит к гибели эмбрионов на 2-3 сутки совместного культивирования.

Другая сторона вопроса об агробактериальном переносе в морской воде связана с рассмотрением возможности формирования первичных

контактов, активации *vir*-региона и сборки аппарата пилей для осуществления контактов между агробактериями и клетками-реципиентами с последующей передачей Т-ДНК. Нам удалось обнаружить нитевидные контакты между бактериями и клетками морских ежей на 2-3 сутки совместного культивирования (Рис. 1, А). Диаметр нитей составил около 10 нм. Исходя из этого, можно предположить, что контакт сформирован агробактериальными Т-пилями, так как, согласно данным Лаи с соавторами, диаметр пилей агробактерий составляет 10 нм (Lai *et al.*, 2000). Формирование Т-пилей наблюдается также у бактерий, которые не контактируют с клетками морских ежей (Рис. 1, Б). Это говорит об активации *vir*-региона агробактерий в культуре при совместном культивировании с эмбрионами.

Встройка Т-ДНК в геномную ДНК эмбрионов и экспрессия растительных онкогенов *rolB* и *rolC*

Помимо встройки Т-ДНК в геномную ДНК клетки-реципиента главным критерием успешного исхода агробактериальной трансформации служит экспрессия локализованных в Т-ДНК генов. Используемые нами в экспериментах штаммы *A. tumefaciens* несут гены *rolB* и *rolC* родственной агробактерии *A. rhizogenes*. Векторы, содержащиеся в штамме GV3101(pMP90RK), являются конструкциями, разработанными для растений. Однако гены *rolB* и *rolC* под промоторами вируса мозаики цветной капусты 35S и нопаинсинтазным промотором *nos*, исходя из литературных данных, могут быть активными в клетках животных. Экспрессия генов под данными промоторами и их распознавание, как и распознавание растительных сигналов полиаденилирования, отмечены для ооцитов лягушки ксенопуса (Ballas *et al.*, 1989). Кроме того, показано, что *nos* промотор активен и в клетках млекопитающих (Zahm *et al.*, 1989). Для проверки экспрессии растительных онкогенов *rol* мы провели ОТ ПЦР анализ. В качестве контрольной реакции ОТ ПЦР мы определяли экспрессию гена актина морского ежа *CyIIb* (экспрессия в оральной эктодерме и ротовой области) (Рис. 2).

Экспрессия генов *rolB*, *rolC* и *nptII* отмечается у эмбрионов морских ежей после совместного культивирования с агробактериями (Рис. 3, линии 1, 5, 6, 7). Анализ последовательностей ПЦР-продуктов показал 100% гомологию с генами *rolB* и *rolC* (GenBank, Ac. No. K03313) и геном неомицинофосфотрансферазы *nptII* (GenBank, Ac. No. AJ414108).

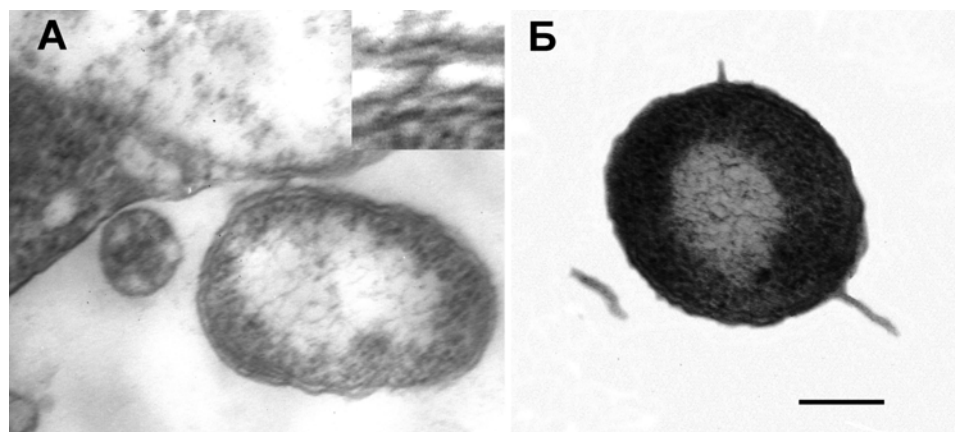


Рис. 1. *A. tumefaciens* в культуре с эмбрионами морских ежей (3 суток совместного культивирования). А – контакт между агробактерией и клеткой морского ежа, Б – единичная бактерия. Линейка 200 нм.

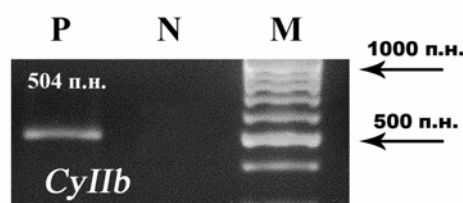


Рис. 2. Экспрессия гена актина *CyIIb* эмбрионов морских ежей *S. nudus* на стадии гастрюлы. Р – положительный контроль (ПЦР с кДНК), N – негативный контроль (ПЦР с РНК), М – молекулярный маркер с шагом 100 п.н.

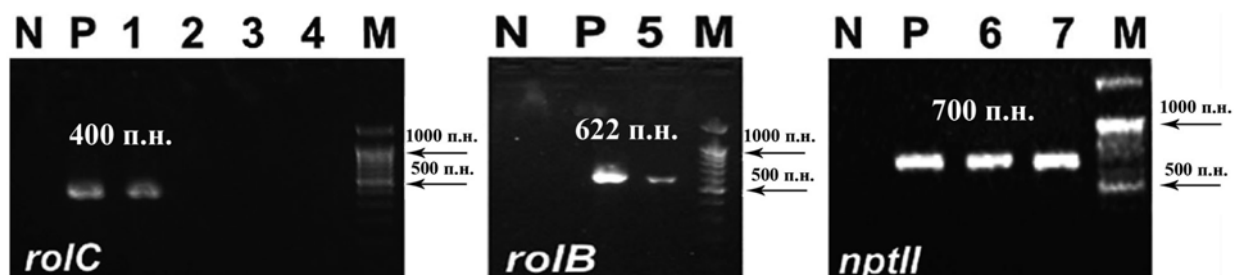


Рис. 3. Выявление транскрипции генов *rol* и *nptII* в эмбрионах морских ежей после совместного культивирования с *A. tumefaciens* методом ОТ ПЦР.

N – негативный контроль (кДНК нетрансформированных эмбрионов); P – положительный контроль, амплификация с плазмидой pPCV002-*rolABC*; эмбрионы, трансформированные штаммами с плазмидами: 1 – pPCV002-*rolC*, 2 – pPCV002-*rolC* + мутантный *virA* (pTi237), 3 – pPCV002-*rolC* + мутантный локус *virB* (pTi243), 4 – pPCV002-*rolC* + мутантный *virG* (pTi19), 5 – pPCV002-*rolB*, 6 – транскрипция *nptII* в трансформированных pPCV002-*rolB* эмбрионах, 7 – транскрипция *nptII* в трансформированных pPCV002-*rolC* эмбрионах, M – молекулярный маркер с шагом 100 п.н.

При использовании агробактериальных штаммов, несущих мутантные гены *vir* (*virA*, *virB*, *virG*), экспрессию генов *rol* и *nptII* не наблюдали (Рис. 3, линии 2, 3, 4). Эти данные подтверждают результаты ПЦР-анализа. При использовании штаммов, мутантных по генам *vir*, не обнаружено присутствия генов *rol* и *nptII* в эмбрионах морских ежей. Из этого следует, что при передаче Т-ДНК задействован *vir*-опосредованный механизм переноса.

Для доказательства встройки Т-ДНК мы использовали метод ТАИЛ-ПЦР. Этот метод позволяет амплифицировать участок ДНК, где произошла сшивка чужеродной и геномной ДНК, с использованием специфического и вырожденного (рэндом) праймеров. Для доказательства встройки мы выбрали участок Т-ДНК, прилегающий к правому бордеру. После трех амплификаций (Рис. 4, А) ПЦР-продукт был клонирован и секвенирован. Точная масса ампликона составила 161 п.н., из которых 34 п.н. приходились на фрагмент, прилегающий к правому бордеру участка Т-ДНК, 2 п.н. – на остаток бордера и 125 п.н. – предположительно, на последовательность ДНК морского ежа (Рис. 4, А, Б). Анализ фрагмента величиной 125 п.н. не показал гомологии с последовательностью плазмиды pRCV002-*rol*, поэтому мы предполагаем, что данная последовательность является последовательностью ДНК морского ежа. К сожалению, гомологии на данный участок среди известных последовательностей ДНК морского ежа *S. purpuratus* (GenBank) не было обнаружено. Это дает основание предположить, что встройка Т-ДНК произошла в видоспецифическую неконсервативную последовательность. Наличие границы, где прошла сшивка при встраивании между Т-ДНК и геномной ДНК морских ежей, опровергает вероятный ненаправленный путь трансформации путем захвата эмбриональными клетками плазмидной ДНК из разрушенных бактериальных клеток и свидетельствует о нормальном протекании процесса агробактериальной трансформации, который является единым для животных и растительных клеток.

Появление и возможные причины формирования опухолеподобных структур (ОПС) у эмбрионов морских ежей

В ходе совместного культивирования агробактерий *A. tumefaciens*, несущих растительные онкогены *rolB* и *rolC*, у части эмбрионов наблюдается формирование опухолеподобных структур – такие структуры представлены неоформленными скоплениями клеток на поверхности эмбрионов и получили название вследствие их внешнего вида.

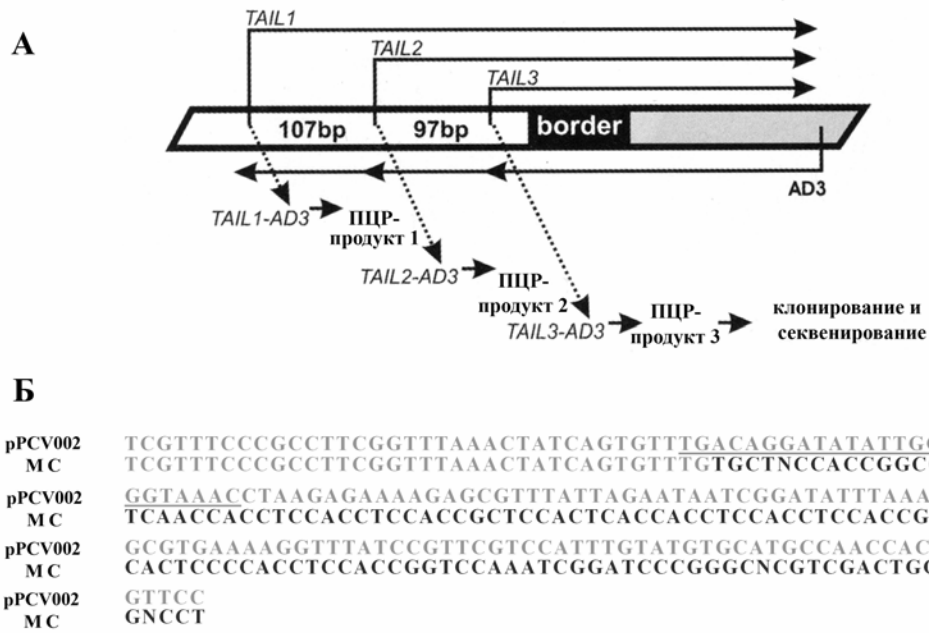


Рис. 4. Клонирование последовательности, содержащей шивку Т-ДНК *A. tumefaciens* и геномной ДНК *S. intermedium*. А – схема проведения TAIL-ПЦР. На схеме представлены три последовательные амплификации. Часть Т-ДНК, прилегающая к правому бордеру (черный сегмент), отображена белым цветом, геномная ДНК *S. intermedium* представлена серым сегментом. Б – выравнивание нуклеотидной последовательности участка плазмиды pPCV002-rolC, несущего прилегающие к правому бордеру области, и клонированной нуклеотидной последовательности в месте соединения Т-ДНК с геномной ДНК *S. intermedium*.

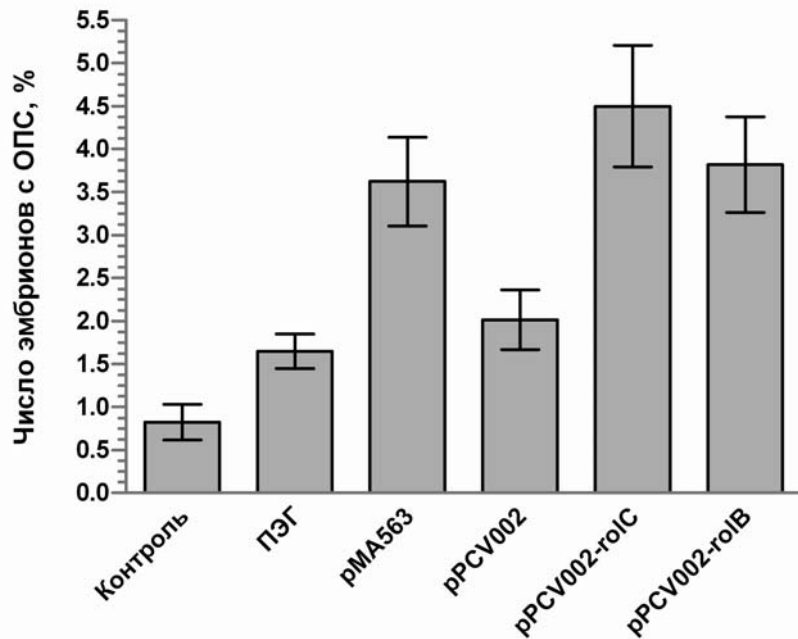


Рис. 5. Число эмбрионов *S. nudus* с опухолеподобными структурами при трансформации плазмидами, несущими гены *gal4* (58-59 часов после оплодотворения), *rolB* и *rolC* (24-29 часов после оплодотворения).

Ранее ОПС были описаны у трансформированных геном *gal4* эмбрионов морских ежей. В связи с этим, мы, наряду с агробактериальной трансформацией, проводили ПЭГ-опосредованную трансформацию плазмидами, несущими ген *gal4* или растительные онкогены *rolB* и *rolC*, для сравнения количества эмбрионов с ОПС, а также для сравнительного анализа морфологии опухолеподобных структур.

Эксперименты по ПЭГ-опосредованной трансформации плазмидной ДНК (Рис. 5), несущей либо ген *gal4*, либо растительные онкогены *rolB* или *rolC*, показали, что процент эмбрионов с ОПС находится на одном уровне (3-5,5 %). Такого рода сходство говорит о высокой эффективности ПЭГ-опосредованной трансформации. Количество эмбрионов с ОПС при трансфекции геном *gal4* в процентном соотношении составляет $3,6 \pm 0,5\%$. В этом случае опухолеподобные структуры наблюдали на 3 сутки после оплодотворения. Эффект растительных онкогенов *rolB* и *rolC* проявляется уже к концу первых суток, содержание эмбрионов с ОПС при этом составляет $4,5 \pm 0,75\%$ для гена *rolC* и $3,8 \pm 0,6\%$ для *rolB*. В контрольной культуре эмбрионов наблюдали небольшой процент (в среднем $0,82 \pm 0,15\%$) эмбрионов с ОПС, по-видимому, это связано с нарушением хода эмбриогенеза у части эмбрионов. При обработке ПЭГ 4000 Да и плазмидой pPCV002 процент ОПС несколько возрастает ($1,65 \pm 0,15\%$). Незначительное увеличение процента ОПС можно объяснить токсическим эффектом ПЭГ. Увеличение количества ОПС при трансформации pPCV002 ($2 \pm 0,38\%$), вероятнее всего, связано со встройкой чужеродной ДНК в геномную ДНК морских ежей, что может приводить к сбою программы развития вследствие инактивации генов или их неконтролируемой активности.

Результаты агробактериальной трансформации, которую проводили путем совместного культивирования *A. tumefaciens* с эмбрионами морских ежей трех видов, представлены на рисунке 6. Максимальное количество эмбрионов с ОПС наблюдали через 20-24 часа у *Scaphechinus mirabilis* и через 24-28 часов у *S. nudus* и *S. intermedius*. После этого количество эмбрионов с такими аномалиями развития сокращалось, но в культуре появлялось большое количество одиночных клеток. По-видимому, спустя какое-то время происходил распад эмбрионов с ОПС на клетки. Подводя итог, можно сказать, что при совместном культивировании со штаммом агробактерий GV3101(pMP90RK), несущих плазмиду pPCV002, количество эмбрионов с ОПС варьировало в пределах 1-3%. Процентное содержание в культуре эмбрионов с ОПС составило 4-8% для pPCV002-*rolC* и 4,5-14% для

pPCV002-*rolB*. При сравнении количества эмбрионов с ОПС при агробактериальной и ПЭГ-опосредованной трансформациях оказалось, что при совместном культивировании эмбрионов морских ежей с *A. tumefaciens* процент ОПС выше. Кроме того, увеличение числа таких эмбрионов практически не зависит от присутствия бактерий в культуре, так как относительное количество эмбрионов с ОПС при культивировании со штаммом GV3101(pMP90RK), который не несет гены *rol*, находится на уровне обработанной ПЭГ эмбриональной культуры. Процент эмбрионов морских ежей с ОПС при агробактериальной трансформации генами *rolB* и *rolC*, различается у трех видов морских ежей: *Scaphechinus mirabilis*, *S. intermedius* и *S. nudus*, но достоверное увеличение числа ОПС при использовании конструкций с генами *rolB* и *rolC* говорит о влиянии растительных онкогенов на ход эмбриогенеза у всех трех видов.

Для того, чтобы проверить, связано ли появление опухолеподобных структур с трансформацией эмбрионов агробактериальной Т-ДНК, а также, идет ли перенос ДНК по *vir*-опосредованному механизму, мы провели ряд экспериментов по совместному культивированию эмбрионов с штаммами *A. tumefaciens*, несущими бинарные векторы с мутантными генами *virA*, *virG* и мутацией в локусе *virB*. Используемые мутантные гены приводят к потере функций кодируемых белков (Stachel, Nester, 1986).

В таблице 1 приведены данные, показывающие снижение количества эмбрионов с ОПС при совместном культивировании со штаммами, несущими бинарные векторы с мутантными генами *vir*. Процент эмбрионов с ОПС при этом такой же, как и при использовании штаммов с бинарным вектором без генов *rol*. Этот факт указывает на то, что формирование опухолеподобных структур у эмбрионов связано с интеграцией гена *rolC* в геномную ДНК морских ежей и что трансформация клеток эмбрионов морских ежей идет по *vir*-опосредованному механизму, по которому происходит агробактериальный перенос Т-ДНК в растительные клетки. Более того, это говорит о влиянии растительных онкогенов *rolB* и *rolC* на ход эмбриогенеза морских ежей. Таким образом, активность растительных онкогенов *rolB* и *rolC* способна влиять на судьбу эмбриональных клеток морских ежей. К сожалению, на сегодняшний день функции генов *rolB* и *rolC* до конца не ясны. Известно лишь то, что белок RolB обладает тирозинфосфатазной активностью (Filippini *et al.*, 1996).

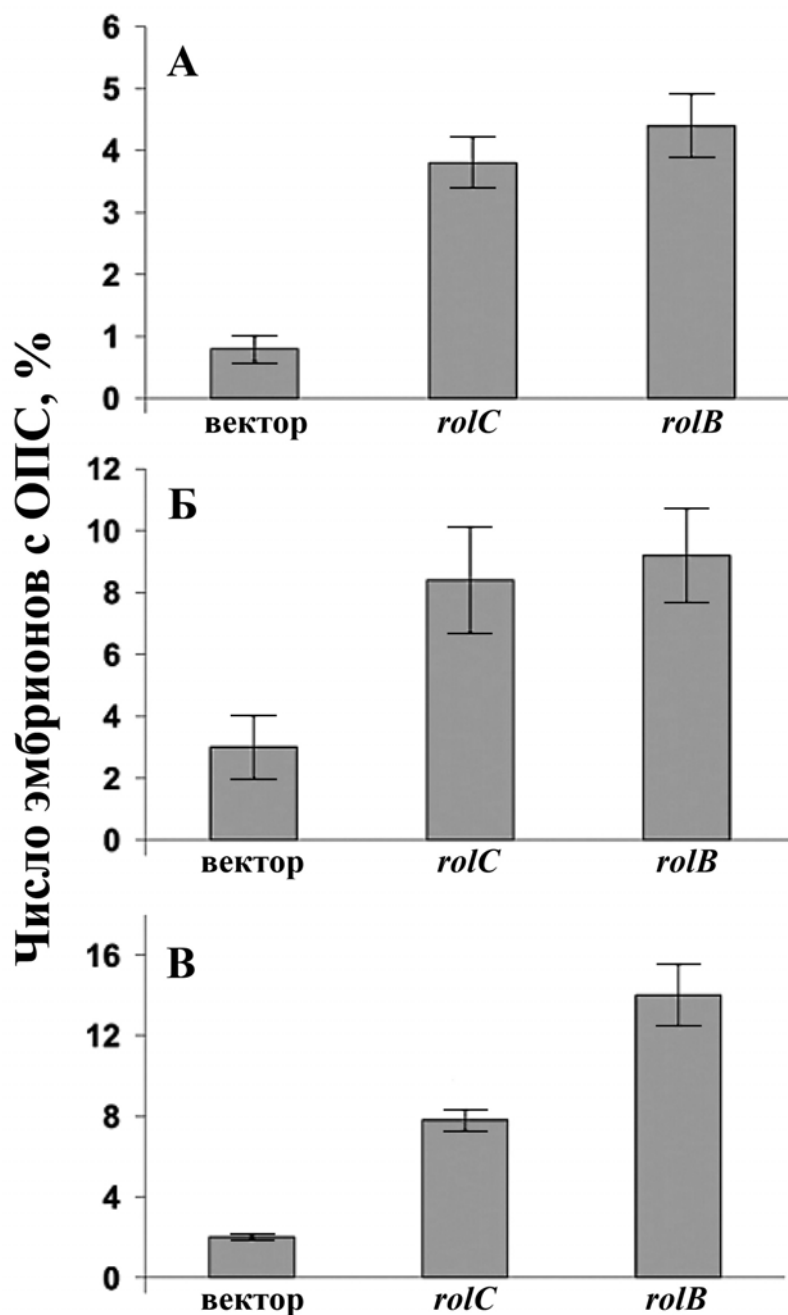


Рис. 6. Число эмбрионов с опухолеподобными структурами (%) у разных видов морских ежей. А – *Scaphechinus mirabilis*; Б – *S. intermedius*; В – *S. nudus*. Эмбрионов культивировали совместно с *A. tumefaciens* GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002 (вектор), GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002-*rolC* (*rolC*), GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002-*rolB* (*rolB*) в течение 24-28 часов.

Одна из других наиболее вероятных причин нарушения хода эмбриогенеза морских ежей – это изменение рН морской воды. При неизменности других параметров окружающей среды, определенное значение рН является фактором, обуславливающим нормальное протекание физиологических процессов в организме, в том числе и в зародыше. Значение рН может варьировать в некоторых пределах, при этом жизнеспособность и физиологические процессы клеток будут протекать нормально. Также известно, что изменение рН морской воды значительно влияет на ход эмбриогенеза морских ежей: снижение значения рН ниже оптимума на 0,2-0,5 может приводить к дефектам развития (Pagano *et al.*, 1985), хотя обычно рН морской воды варьирует в диапазоне 8,0-8,2. При совместном культивировании эмбрионов морских ежей и *A. tumefaciens* рН морской воды меняется, но эти изменения незначительные (в течение трех суток от 8,15 до 7,8-8) и больше связаны с жизнедеятельностью эмбрионов. Несомненно, добавление агробактерий в морскую воду с эмбрионами вызывает небольшое уменьшение значения рН на 0,1-0,35. Однако, такое незначительное изменение рН не может отразиться на процессах эмбриогенеза и тем более не может приводить к гибели эмбрионов на третьи сутки.

Внешний вид и строение опухолеподобных структур

Как уже ранее упоминалось, опухолеподобные структуры у эмбрионов морских ежей располагаются на поверхности и представляют собой неоформленные группы клеток. При сравнении эмбрионов с ОПС, трансформированных генами *gal4*, либо *rolC* или *rolB* были выявлены морфологические различия. Во-первых, трансформированные *gal4* эмбрионы с опухолеподобными структурами имеют округлую форму, ОПС также округлые (Рис. 7, Б, В), иногда красного цвета. Это говорит о наличии в клетках эхинохрома – пигмента, который на ранних эмбриональных стадиях синтезируется пигментными клетками, берущими начало от вторичной мезенхимы. Второй немаловажный момент – время появления опухолеподобных структур. При трансформации геном *gal4* ОПС наблюдаются на 2-3 сутки с момента оплодотворения. Контрольные эмбрионы в это время находятся на стадии 4-рукого плутеуса (Рис. 7, А). Эмбрионы с опухолеподобными структурами не имеют пищеварительной системы (Рис. 8, Б). Практически все внутреннее пространство заполнено мезенхимными клетками. Однако в центре эмбриона сохраняется небольшое свободное пространство – остаток бластоцеля.

Таблица 1. Частота встречаемости ОПС у эмбрионов *S. intermedius* и *S. nudus*, культивируемых с разными штаммами *A. tumefaciens* (через 28 часов после оплодотворения).

Агробактериальные векторы	% эмбрионов с ОПС	
	<i>S. intermedius</i>	<i>S. nudus</i>
Контроль (без обработки)	0	0
pPCV002 + полная функция <i>vir</i> (pMP90RK)	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2
pPCV002- <i>rolC</i> + полная функция <i>vir</i> (pMP90RK)	4.5 ± 0.4	5.5 ± 0.7
pPCV002- <i>rolC</i> + мутация <i>virA</i> (pTi237)	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.2
pPCV002- <i>rolC</i> + мутация <i>virB</i> (pTi243)	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.3
pPCV002- <i>rolC</i> + мутация <i>virG</i> (pTi19)	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.1
pMP90RK (только функция <i>vir</i>)	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.4

Штаммы содержат различные плазмиды, несущие ген *rolC*.

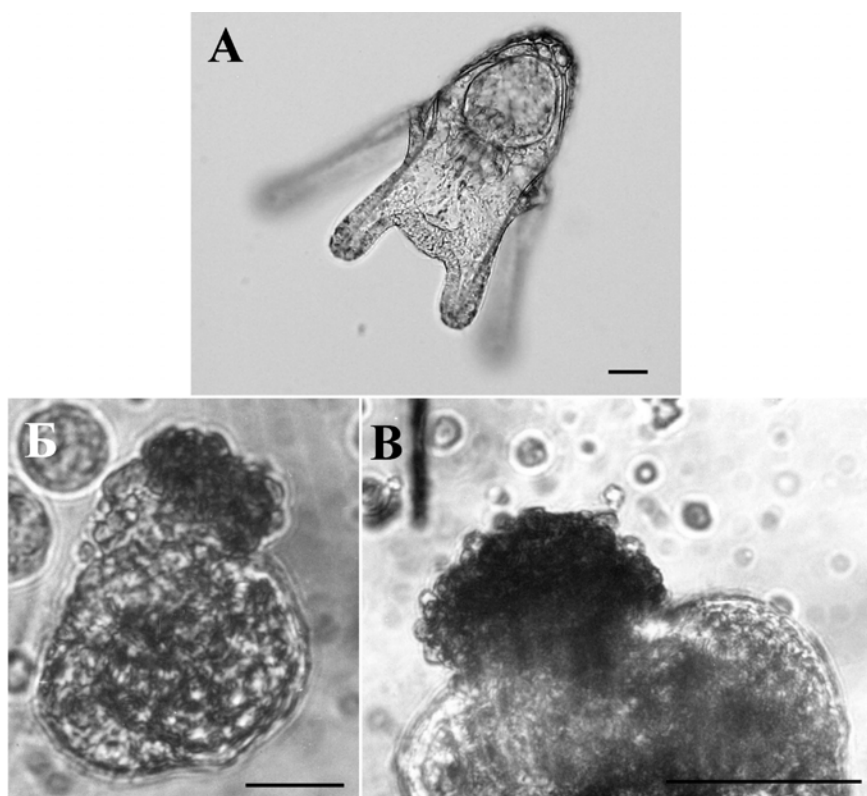


Рис. 7. Внешний вид эмбрионов *Scaphechinus mirabilis*, обработанных плазмидой pMA563, несущей ген *gal4* (60 часов после оплодотворения). А – контрольный эмбрион (плутеус), Б, В – эмбрионы с ОПС. Линейка 20 мкм.

На полутонких срезах хорошо видно, что опухолеподобные структуры представлены рыхлым скоплением клеток и, очевидно, возникают из-за разрыва эктодермы эмбриона и выселения части чрезмерно развитой мезенхимы наружу. По-видимому, экспрессия *gal4* приводит к увеличению пролиферативной активности эмбриональных клеток морских ежей, как это было показано на первичных культурах эмбриональных клеток морских ежей (Vulgakov *et al.*, 2002). К какому зачатку (эктодерма или энтодерма) следует относить поверхностный эпителий зародыша с опухолеподобной структурой, морфологически определить невозможно, поэтому мы характеризуем его как внешний слой клеток. Из этого следует, что, несмотря на неорганизованный рост клеток внутренней массы, после трансфекции геном *gal4*, клетки претерпевают детерминацию, т. к. в таких эмбрионах можно различить эпителиальные структуры и производные мезодермы. Кроме того, наблюдаемые в этом случае процессы изменения хода эмбриогенеза при формировании ОПС сильно отличаются от таковых, имеющих место при экзогастрюляции, где при вегетализации эмбриона сдвиг детерминации клеточных полей эмбрионов происходит в энто-мезодермальном направлении. Механизмы, по которым запускается ненормированный рост мезенхимы эмбрионов, неизвестен. Скорей всего, это происходит благодаря активации гена эпидермального фактора роста (ЭФР) морских ежей, в промоторной последовательности которого обнаружен участок UAS (Delgadillo-Reynoso *et al.*, 1989). Известно, что ЭФР участвует в формировании как эктодермальных, так и мезодермальных тканей (Schuldiner, Benvenisty, 2003). Хотя не исключено, что мишенями могут оказаться другие гены.

Эмбрионы с ОПС, сформировавшиеся в результате агробактериальной трансформации генами *rolB* (Рис. 9, В) и *rolC* (Рис. 9, Г) имеют значительные отличия как в строении эмбрионов в целом, так и в структуре опухолеподобных образований. Эмбрионы имеют вытянутую форму, в бластоцеле видны мезенхимные клетки, плотность которых увеличивается в направлении к ОПС. Опухолеподобные структуры, в отличие от трансформированных *gal4* эмбрионов, представляют собой группу клеток, локализованную на поверхности эмбрионов без видимых повреждений стенки эмбрионов (Рис. 10, А, Б). Ультраструктурный анализ клеток эктодермы контрольных и трансформированных эмбрионов не выявил различий.

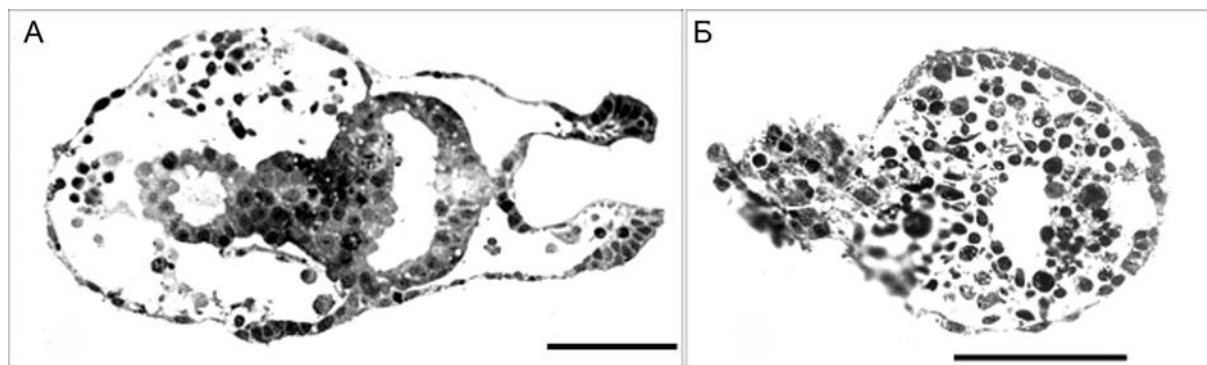


Рис. 8. Полутонкие срезы эмбрионов *Scaphechinus mirabilis*, обработанных плазмидой рМА563, несущей ген *gal4* (60 часов после оплодотворения). А – контрольный эмбрион на стадии раннего плутеуса. Б – эмбрион с ОПС. Окраска метиленовым синим. Линейка 50 мкм.

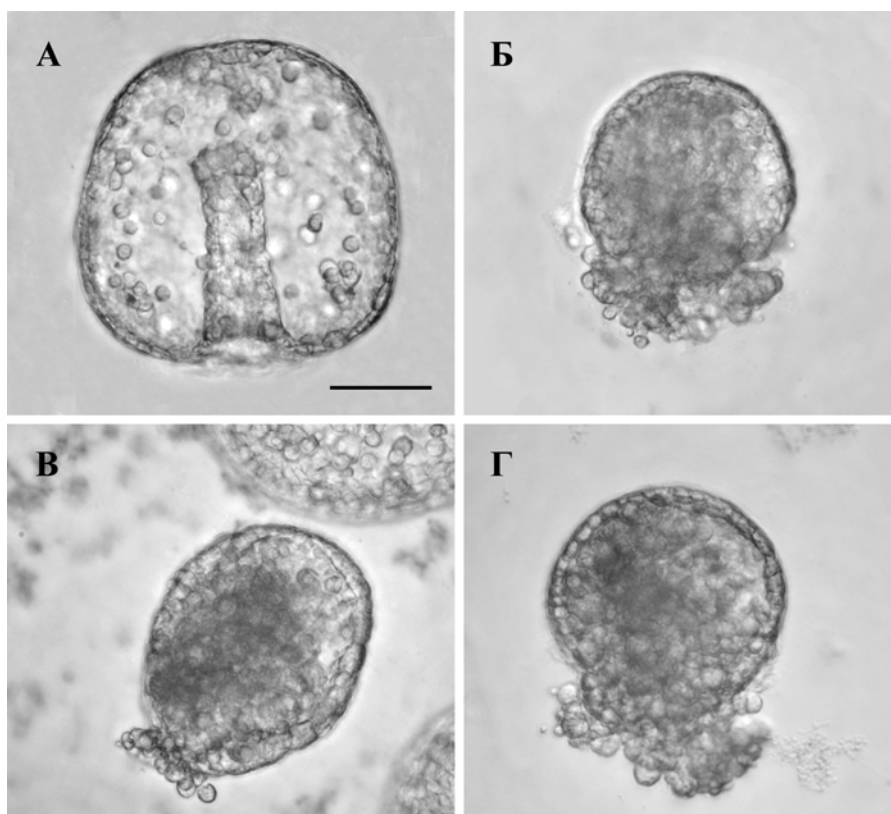


Рис. 9. Внешний вид эмбрионов с ОПС морского ежа *S. intermedius*, культивированных совместно с *A. tumefaciens* спустя 32 часа после оплодотворения. А – внешний вид контрольного эмбриона на стадии поздней гастролы. Эмбрион из культуры с добавлением штамма *A. tumefaciens* GV3101(рMP90RK) с плазмидой рPCV002 (вектор) (Б), с плазмидой рPCV002-*rolC* (В), с плазмидой рPCV002-*rolB* (Г). Линейка 45 мкм.

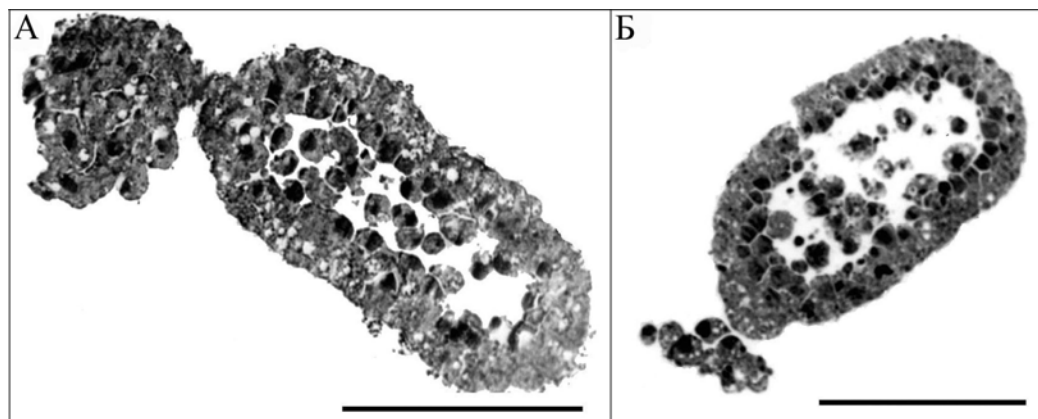


Рис. 10. Полутонкие срезы эмбрионов с ОПС *Scaphechinus mirabilis* (А) и *S. intermedius* (Б), культивированных совместно со штаммами *A. tumefaciens* GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002-*rolB* (А) и GV3101(pMP90RK) с плазмидой pPCV002-*rolC* (Б). 20 часов совместного культивирования. Окраска метиленовым синим. Линейка 50 мкм.

Также обнаружено значительное морфологическое сходство между клетками вторичной мезенхимы контрольных эмбрионов на стадии поздней гаструлы и клетками ОПС.

Морфологические нарушения эмбриогенеза морских ежей, наблюдаемые в наших экспериментах по агробактериальной трансформации, сходны с нарушениями, которые наблюдали Коффман с коллегами у эмбрионов после блокировки активности гена транскрипционного фактора *spRunt*, регулирующего экспрессию актинового гена *CyIIIa* в аборальной эктодерме (Coffman *et al.*, 2004).

Хотя авторы сравнивают эти нарушения с экзогастроулой, тем не менее, они указывают на формирование рудиментарной первичной кишки или на полное отсутствие экзоархентерона. При ингибировании *spRunt* эмбриональные клетки морских ежей приобретают черты, свойственные раковым клеткам, при этом в эмбрионах наблюдается апоптоз и вторичная эктопическая пролиферация клеток. Это неудивительно, так как гены группы *Runx* часто функционируют как супрессоры онкогенеза (Coffman, 2003). При анализе клеток в эмбрионах морских ежей на включение БДУ после агробактериальной трансформации мы также обнаружили эктопическое включение метки. Из этого следует, что растительные онкогены, вызывающие процессы неопластической трансформации растительных клеток, не ингибируют пролиферацию эмбриональных клеток морских ежей, но влияют на дифференцировку эмбриональных полей, что приводит к нарушению хода эмбриогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Впервые доказан факт агробактериальной трансформации эмбриональных клеток морских ежей в условиях морской среды. Процесс трансформации проходит в ходе совместного культивирования эмбрионов морских ежей с агробактериями и сопровождается формированием контактов между бактериями и эмбриональными клетками при помощи T-пилей. Визуальный эффект агробактериальной трансформации выражается в появлении у части эмбрионов на поверхности опухолеподобных структур.
2. Использование агробактериальных штаммов, несущих мутантные гены по локусу *vir*, приводит к снижению числа ОПС у эмбрионов. Это, наравне с формированием контактов при помощи T-пилей, является доказательством *vir*-опосредованного механизма переноса T-ДНК. Помимо этого, наличие границы между последовательностями T-ДНК и геномной ДНК морских ежей свидетельствует о том, что трансформация идет именно за счет T-ДНК, а не за счет других участков плазмидной или хромосомной ДНК агробактерий.
3. Впервые показано, что экспрессия генов *rolB* и *rolC* приводит к появлению ОПС у эмбрионов морских ежей. Время появления и морфология таких эмбрионов достаточно сильно отличается от эмбрионов с ОПС, трансформированных плазмидной ДНК, несущей ген универсального активатора транскрипции *gal4*. Нарушение хода эмбриогенеза в обоих случаях связано с ненормальным и чрезмерным развитием клеток мезенхимы. Хотя, вероятно, в случае трансформации геном *gal4* и генами *rolB* и *rolC* задействованы разные механизмы.
4. Растительные онкогены *rolB* и *rolC* влияют на дифференцировку эмбриональных полей. Результатом этого является нарушение хода эмбриогенеза морских ежей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Киселев К.В., Одинцова Н.А., Кольцова Е.А., Булгаков В.П., Яковлев К.В. Влияние активатора транскрипции GAL4 на рост и развитие эмбрионов и эмбриональных клеток в первичных культурах плоского морского ежа (*Scaphechinus mirabilis*) // Тезисы научной конференции НОЦ ДВГУ «Морская биота» (Владивосток, 2 октября 2002). Владивосток: изд-во ДВГУ, 2002. С. 82.

2. Киселев К.В., Одинцова Н.А., Булгаков В.П., Кольцова Е.А., Яковлев К.В. Клетки плоских морских ежей как возможные продуценты биологически активных веществ // Вестник ДВО РАН. 2002. № 5. С. 101-104.
3. Киселев К.В., Дячук В.А., Яковлев К.В., Одинцова Н.А., Булгаков В.П. Перенос Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* в эмбрионы и клеточные культуры морских ежей // Сборник тезисов 7-ой Международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 14-18 апреля 2003). Пушино: ПНЦ РАН, 2003. С. 341.
4. Одинцова Н.А., Киселев К.В., Булгаков В.П., Кольцова Е.А., Яковлев К.В. Влияние активатора транскрипции эукариот GAL4 на рост и развитие эмбрионов и эмбриональных клеток в первичных культурах морского ежа *Scaphechinus mirabilis* // Онтогенез. 2003. Т. 34, № 4. С. 267-272.
5. Одинцова Н.А., Киселев К.В., Дячук В.А., Яковлев К.В., Булгаков В.П. Инициация опухолеподобных структур в эмбрионах морских ежей // Материалы 1-го Всероссийского симпозиума по клеточной биологии (Санкт-Петербург, 14-17 октября 2003). Цитология. 2003. Т. 45, № 9. С. 908-909.
6. Киселев К.В., Дячук В.А., Яковлев К.В., Одинцова Н.А., Булгаков В.П. Экспрессия агробактериальных генов в эмбриональных клетках морских ежей // Сборник тезисов 8-ой Международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 17-21 мая 2004). Пушино: ПНЦ РАН, 2004. С. 14.
7. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., Киселев К.В., Булгаков В.П. Генно-инженерная регуляция дифференциации и пролиферации эмбриональных клеток морских ежей // Тезисы Международного научного семинара «Проблемы репродукции и раннего онтогенеза морских гидробионтов» (Мурманск, 2-4 ноября 2004). Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2004. С. 93-95.
8. Яковлев К.В., Одинцова Н.А., Киселев К.В., Булгаков В.П. Взаимодействие *Agrobacterium tumefaciens* с клетками морских ежей, сопровождающееся переносом Т-ДНК и нарушением эмбрионального развития морских ежей // Тезисы Международного научного семинара «Проблемы репродукции и раннего онтогенеза морских гидробионтов»

(Мурманск, 2-4 ноября 2004). Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2004. С. 149-150.

9. Bulgakov V.P., Kiselev K.V., Yakovlev K.V., Zhuravlev Y.N., Gontcharov A.A., Odintsova N.A. *Agrobacterium*-mediated transformation of sea urchin embryos // *Biotechnology Journal*. 2006. Vol. 1. P. 447-453.

10. Яковлев К.В. Одинцова Н.А., Киселев К.В., Булгаков В.П. Трансформация эмбрионов морских ежей агробактериями // Сборник X Международной молодежной Школы-конференции (МЭС, ТИБОХ, 12-19 сентября, 2006). Владивосток: ДВО РАН, 2006. С. 54.

11. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., Дячук В.А. Регуляция процессов роста и дифференцировки клеток морских беспозвоночных в культуре // Материалы Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 17-19 октября, 2006). Цитология. Т 48, № 9. С. 785-786.

12. Одинцова Н.А., Яковлев К.В., Дячук В.А. Культуры клеток морских беспозвоночных: проблемы, успехи, перспективы // Сборник тезисов Международной научной конференции «Инновации в науке и образовании – 2006» (Калининград, 18-20 октября, 2006). Калининград: изд-во КГТУ, 2002. С. 50-52.

Константин Владимирович ЯКОВЛЕВ

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ
ЭМБРИОНОВ МОРСКИХ ЕЖЕЙ И НАРУШЕНИЕ ХОДА ЭМБРИОГЕНЕЗА
ПРИ ЭКСПРЕССИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОНКОГЕНОВ *rolB* И *rolC***

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук