

МОДИФІКАЦІЯ ГЕНІВ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ РОДИНИ STAT МЕТОДОМ ВАС-РЕКОМБІНАЦІЇ

А. О. Цирульник¹
В. В. Снітинський¹
Р. С. Стойка²

¹Львівський національний аграрний університет

²Інститут біології клітини НАН України, Львів

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Синтезовано модифіковану форму гена STAT3, продукт якого є транскрипційним фактором, задіяним у забезпеченні сигнального шляху JAK/STAT ряду важливих цитокінів. Для досягнення високого рівня експресії гена в геномі миші використовували сучасний ефективний метод ВАС-рекомбінації, що дозволяє модифікувати та вводити в геном фрагменти ДНК розміром до 350 тис. пар нуклеотидів. Застосовуючи ВАС та рекомбінаційну систему Рас-профага (Rec/ET) або λ -фага (Red α /Red β), у геном миші вводили не лише сам ген, але й усі його регуляторні ділянки та промотор, що забезпечує високий рівень його експресії. Обґрунтовано застосування цього методу для модифікації гена будь-якого транскрипційного фактора та створення ефективної трансгенної моделі *in vivo*.

Ключові слова: синтез ДНК, транскрипційні фактори STAT, модифікація генів.

Цитокіни є основними регуляторами міжклітинних взаємодій та клітинних процесів, включаючи ріст, проліферацію, диференціацію й апоптоз за нормальних умов та у відповідь на патологічні дії. Одним із механізмів біологічної дії цитокінів та факторів росту, таких як IFN, EGF, IL5, IL6, HGF, LIF і BMP2, є активація сигнального шляху JAK/STAT у клітині. Зв'язуючись зі специфічними рецепторами на поверхні клітини, вони активують JAK-кіназу (Janus Kinase), яка, у свою чергу, активує протеїни родини STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) шляхом фосфорилування. Після активації ці транскрипційні фактори транспортуються в ядро, де у вигляді димерів зв'язуються з промоторними ділянками ДНК. Залежно від специфіки взаємодії STAT-протеїнів із ДНК активується експресія того чи іншого гена [1]. Порушення процесів активації цих транскрипційних факторів впливає на клітинні процеси та функціонування організму в цілому [2]. Оскільки STAT3 забезпечує активацію проліферації клітин та інгібування їх апоптозу, гіперактивація цього фактора лежить в основі виникнення і розвитку багатьох онкологічних захворювань [3–7].

Дослідження процесів активації транскрипційних факторів та їхньої біологічної ролі *in vivo* здійснюють шляхом створення трансгенних тварин [8, 9]. Тому введення в геном миші ізоформи гена STAT3 β дозволяє дослідити роль гіперактивації цього фактора у механізмах розвитку злоякісних новоутворень та шукати шляхи їх лікування.

Класичний метод дає змогу синтезувати і вводити в геном модифікований ген у складі фрагмента ДНК невеликого розміру. Оскільки розмір фрагмента не перевищує 30 тис. п. н., у геном тварини вводять лише структурну частину гена без його регуляторних ділянок, зокрема промоторної частини. Відсутність основних регуляторних ділянок істотно знижує рівень експресії гена і робить створену генетичну систему малоефективною для моделювання патогенезу онкозахворювання, де експресія та активація транскрипційних факторів є значною.

Для вирішення цієї проблеми розроблено ефективний метод модифікації та введення в геном ДНК великих розмірів [10–12]. У його основу покладено використання штучної бактерійної хромосоми (ВАС; bacterial artificial chromosome) та рекомбінаційної системи Рас-профага (Rec/ET) або

λ -фага (Red α /Red β), перенесеної у бактерійну клітину *Escherichia coli* DH10B. ВАС містить фрагмент хромосоми еукаріотичного організму (100–350 тис. п. н.) з усіма генами, включно з регуляторними ділянками цього фрагмента. Використовуючи метод ВАС-рекомбінації, можна вводити в геном синтезований ген у складі ВАС разом з усіма необхідними для експресії регуляторними ділянками.

Синтез модифікованого гена STAT3 β та введення його у складі ВАС у геном миші сприятиме створенню ефективної моделі для вивчення ролі гіперактивації цього фактора в розвитку патологічних процесів *in vivo*.

Матеріали і методи

Для розроблення стратегії ВАС-рекомбінації використано професійні комп'ютерні програми NTI-vector, DNA-star і Clone manager.

Синтез та клонування трансгенного фрагмента

Трансгенний фрагмент містить кілька елементів: ген STAT3 β , ген-маркер CD5, ген резистентності до відповідного антибіотика та послідовності ДНК, гомологічні до послідовностей штучної бактерійної хромосоми, куди планується ввести цей фрагмент. Розщеплення ДНК ендонуклеазами та їх лігування у плазмиду проведено з використанням широкого арсеналу ензимів та буферних систем (Fermentas). Для ампліфікації ДНК застосовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР, high-fidelity PCR kit, Fermentas), що виключає можливість помилок у синтезованій нуклеотидній послідовності. Усі етапи синтезу та клонування перевіряли шляхом секвенування ДНК.

Рекомбінація у ВАС

Для рекомбінації використовували штам *E. coli* DH10B, що містить необхідну ВАС та допоміжну плазмиду pR6K. $\alpha\beta\gamma$ VAD. Ця плазмida забезпечує експресію рекомбінаційних ензимів у бактерійній клітині. Трансгенний фрагмент вводили в *E. coli* шляхом електропорації за стандартних умов: 1,35 kV, 25 μ F, 200 Ω , використовуючи електропоратор Eppendorf-2510. Для швидкого пошуку модифікованої ВАС застосовували метод ПЛР. Більш детальний аналіз модифікованої ВАС здійснювали ДНК-гібридизацією з радіоактивними пробами (Southern blot). ВАС лінеаризували за допомогою ендонуклеазного розщеплення рестриктазою з *Not* I, сайти якої було попе-

редньо введено в ВАС. Очищення модифікованої ВАС проводили електрофоретичним розділенням у гелі агарози з низькою температурою плавлення (Sea-Plug Low-melting point agarose, Sigma). Оскільки розмір використаної ВАС є досить великим (близько 100 тис. п. н.), застосовували систему для пульс-електрофорезу (Pulse-Field Gel Electrophoresis: PFGE) (CHEF-DR ® III Pulsed Field (BioRad). Умови електрофорезу: початковий час 0,5 с, кінцевий час 20 с, $\alpha = 120$ С, $IEI = 6V/cm$, $I = 140$ mA, загальний час 12–14 год.

Наступний етап ВАС-рекомбінації — мікроін'єкція ВАС у пронуклеус ооцита. Її проводили у 10 mM Tris-HCl-буфері, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl, 30 mM спермін, 70 mM спермідин.

Результати та обговорення

Першим етапом ВАС-рекомбінації є синтез трансгенного фрагмента, який планується ввести в геном миші, та синтез гомологічних послідовностей (ГП) до відповідних ділянок у ВАС. Далі шляхом Rec/Red-залежної гомологічної рекомбінації проводять включення трансгенного фрагмента у ВАС, що містить потрібні регуляторні ділянки ДНК. Заключним етапом є мікроін'єкція модифікованої ВАС у пронуклеус ооцита [13–15]. Схематично метод ВАС-рекомбінації подано на рис. 1.

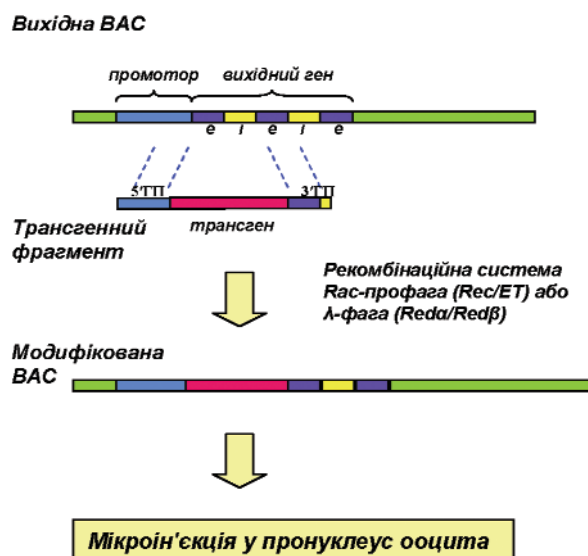


Рис. 1. Рекомбінація трансгенного фрагмента у штучну бактерійну хромосому.

Гомологічні послідовності забезпечують заміщення трансгенним фрагментом частини вихідного гена за повного збереження промоторної ділянки. Це дозволяє одержати високу специфічність експресії трансгенного фрагмента відповідно до використаного промотора

Як основу для створення трансгенного фрагмента використовували попередньо синтезовані елементи: ген STAT3 β , ген-маркер CD5, ген резистентності до антибіотика та допоміжні генетичні елементи IRES і PolyA [16]. Перед СТАРТ-кодом (ATG) гена STAT3 β було введено послідовність 5'-UTR β -глобіну (GACTCACAACCCSAGAAACA) та оптимальну послідовність KOZAK (CCACC). Це забезпечило ефективну експресію модифікованого гена. Гомологічна рекомбінація трансгенного фрагмента у ВАС відбувається лише за наявності 5'-, 3'-ГП з обох сторін цього фрагмента. Оскільки експресія STAT3 β необхідна лише в постнатальному періоді розвитку організму, ми синтезували 5'- та 3'-ГП, що містили у своєму складі *LoxP*-сайти (locus of X-over of P1) (рис. 2).

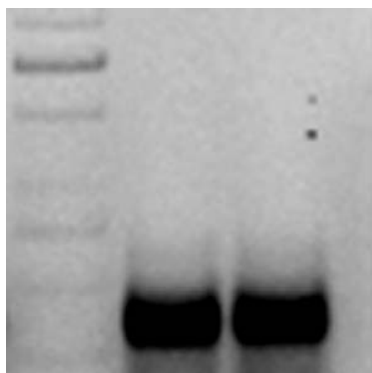


Рис. 2. Синтез 5'- та 3'-гомологічних послідовностей шляхом полімеразної ланцюгової реакції.

Гомологічні послідовності розміром близько 250 п. н. є необхідними для проведення рекомбінації трансгенного фрагмента в штучну бактерійну хромосому

Уведені *LoxP*-сайти були конвергентно спрямовані один щодо одного, тому *CRE*-рекомбіназа каталізує інверсію ДНК-фрагмента між цими двома сайтами. Клонування трансгенного фрагмента у напрямку, протилежному до напрямку транскрипції промотора у ВАС, дозволяє створити *CRE*-залежну експресію трансгена [17] (рис. 3).

Синтезовані 5'-, 3'-ГП було очищено електрофорезом та колонковою хроматографією і включено в плазмиду-носії. Першою у плазмиду клонували 5'-ГП. Одержані колонії клітин тестували ендонуклеазою розщепленням *PstI*, що дозволило виявити бактерійну колонію з модифікованою плазмідною (рис. 4).

Напрямок транскрипції

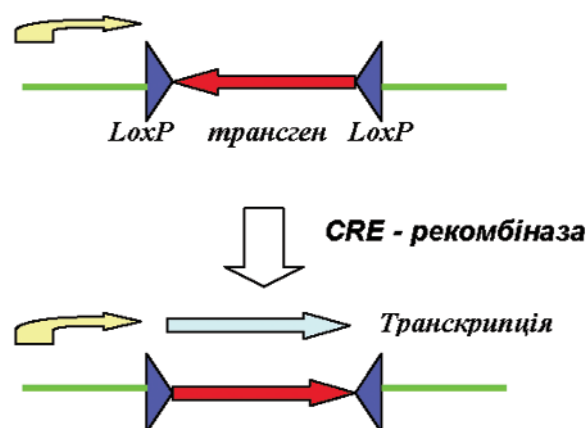


Рис. 3. Плазмідна із *CRE*-залежною експресією трансгенного фрагмента.

Трансгенний фрагмент, який містить *loxP*-сайти на своїх 5'/3' — кінцях, вводять у зворотному напрямку до напрямку промотора. *CRE*-рекомбіназа каталізує інверсію фрагмента між двома конвергентно спрямованими *loxP*-сайтами, що забезпечує його експресію

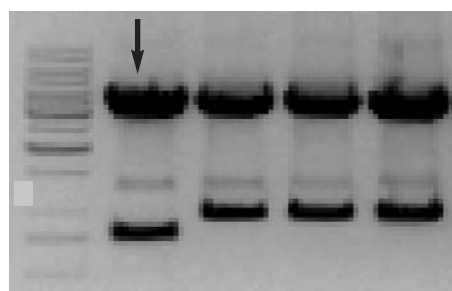


Рис. 4. Аналіз модифікованої плазмід, що містить у своєму складі 5'-гомологічну послідовність.

Проведено розщеплення ДНК ендонуклеазою *PstI* та електрофорез в агарозному гелі (стрілкою позначено позитивну колонію)

Далі проведено клонування 3'-ГП у дану плазмиду. Ендонуклеазне розщеплення ДНК *PstI/BglII* із 4 колоній підтвердило, що всі використані бактерійні колонії містили 3'-ГП (рис. 5).

На наступному етапі у створену плазмиду було включено попередньо синтезовані фрагменти генів STAT3 β -IRES-CD5-PolyA та ген резистентності в інвертованому щодо промотора ВАС напрямку. Одержаний трансгенний фрагмент тестували методом секвенування на наявність неспецифічних змін у нуклеотидній послідовності. При цьому не було виявлено жодних змін у нуклеотидних послідовностях елементів трансгенного фрагмента.

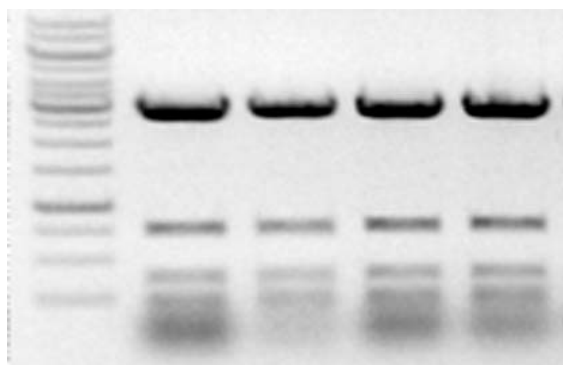


Рис. 5. Аналіз модифікованої плазміди, що містить у своєму складі 5'- та 3'-гомологічні послідовності.

Проведено розщеплення ДНК ендонуклеазами *Pst*I/*Bgl*II та електрофорез в агарозному гелі (усі використані бактерійні колонії містили 5'- та 3'-ГП)

На заключному етапі проведено гомологічну рекомбінацію фрагмента в ВАС. Для цього використали ВАС «*RP23-286F24*», що містить фрагмент мишачої хромосоми 11 із локусом транскрипційних факторів *STAT3*, *STAT5a* та *STAT5b*. Рекомбінацію проводили за стандартною методикою [18]. Для виявлення модифікованої ВАС, що містить у своєму складі трансгенний фрагмент, застосували метод ДНК-гібридизації з радіоактивними пробами (Southern blot). Оскільки рекомбінований фрагмент вносить у ВАС додаткові сайти ендонуклеазного розщеплення, під час розщеплення модифікованої ВАС утворюватимуться нові ДНК-фрагменти, неспецифічні для вихідної ВАС [17, 18]. Після оброблення ВАС ендонуклеазою проводили електрофоретичне розділення одержаних ДНК-фрагментів та перенесення їх на нітроцелюлозну мембрану. Далі здійснювали гібридизацію зі специфічними радіоактивними олігонуклеотидами. Встановлено, що 3 бактерійні колонії містять ВАС із рекомбінованим трансгенним фрагментом (рис. 6).

Специфічність рекомбінації трансгенного фрагмента у ВАС було підтверджено секвенуванням ДНК. Модифіковану ВАС можна використовувати для одержання трансгенних мишей та дослідження ролі транскрипційного фактора *STAT3β* у біологічних процесах *in vivo*.

Таким чином, створено ВАС із CRE-залежною експресією *STAT3β* та гена маркера *CD5*. Уведення цієї ВАС у геном миші дозволяє досягти експресії функціонально активної форми *STAT3β* у постнатальний період розвитку організму. Модифікована ВАС

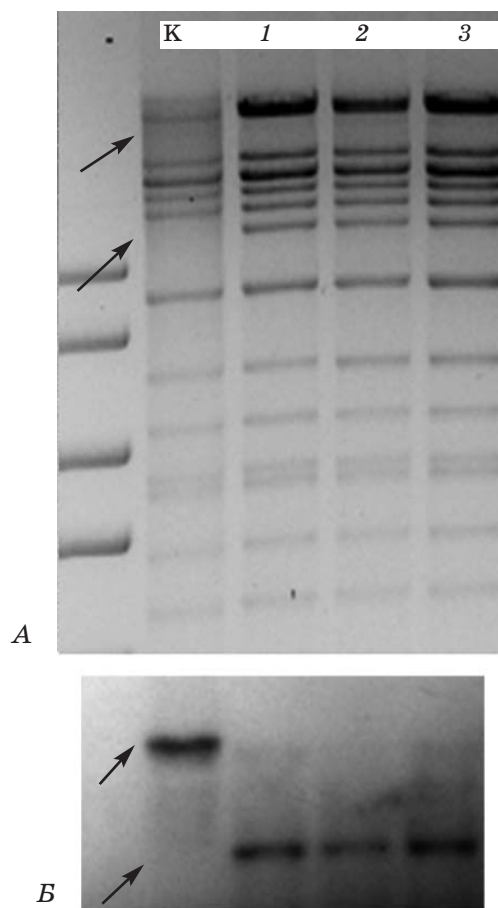


Рис. 6. Ідентифікація штучної бактерійної хромосоми, що містить рекомбінований трансгенний фрагмент, шляхом ДНК-гібридизації (Southern blot).

Фрагменти ДНК після ендонуклеазного розщеплення вихідної (контрольної) ВАС (К) і модифікованих ВАС (1, 2, 3) розділяли електрофорезом у гелі агарози (А) та переносили на нітроцелюлозну мембрану. Далі проводили гібридизацію з радіоактивною пробою, специфічною до ВАС у зоні, близькій до трансгенного фрагмента (Б)

містить у своєму складі всі регуляторні ділянки та промотор вихідного гена *STAT3*, що забезпечує високий рівень експресії трансгенного фрагмента *in vivo*. Використаний підхід уможливорює дослідження ролі цього транскрипційного фактора у виникненні та розвиткові різних патологічних процесів в організмі.

Автори висловлюють щире подяку В. Я. Якимець за допомогу в оформленні та написанні статті.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Hebenstreit D., Horejs-Hoeck J., Duschl A.* JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines // *Drug News Perspect.* — 2005. — V. 18, N 4. — P. 243–249.
2. *Takeda K., Akira S.* STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses // *Cytokine Growth Factor Reviews.* — 2000. — V. 11, N 3. — P. 199–207.
3. *Zhang Y., Wang L., Jove R., Vande Woude G.* Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis // *Oncogene.* — 2002. — V. 21, N 2. — P. 217–226.
4. *Siddiquee K., Zhang S., Guida W. et al.* Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, N 18. — P. 7391–7396.
5. *Corvinus F., Orth C., Moriggl R. et al.* Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth // *Neoplasia.* — 2005. — V. 7, N 6. — P. 545–555.
6. *Burke W., Jin X., Lin H. et al.* Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells // *Oncogene.* — 2001. — V. 29, N 20. — P. 7925–7934.
7. *Kim D., Chan K., Sano S., Digiovanni J.* Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis // *Mol. Carcinog.* — 2007. — V. 46, N 8. — P. 725–731.
8. *Ecker A., Simma O., Hoelbl A. et al.* The dark and the bright side of Stat3: proto-oncogene and tumor-suppressor // *Front Biosci.* — 2009. — V. 14, N 1. — P. 2944–2958.
9. *Redell M., Tsimelzon A., Hilsenbeck S., Twardy D.* Conditional overexpression of Stat3-alpha in differentiating myeloid cells results in neutrophil expansion and induces a distinct, antiapoptotic and prooncogenic gene expression pattern // *J. Leukoc. Biol.* — 2007. — V. 82, N 4. — P. 975–985.
10. *Muylers J., Zhang Y., Stewart A.* Techniques: recombinogenic engineering — new options for cloning and manipulating DNA // *Trends Biochem. Sci.* — 2001. — V. 26, N 5. — P. 325–331.
11. *Copeland N., Jenkins N., Court D.* Recombinering: a powerful new tool for mouse functional genomics // *Nat. Rev.* — 2001. — V. 2, N 10. — P. 769–779.
12. *Sharan S., Thomason L., Kuznetsov S., Court D.* Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering // *Nat. Prot.* — 2009. — V. 4, N 2. — P. 206–223.
13. *Chrast R., Scott H., Antonarakis S.* Linearization and purification of BAC DNA for the development of transgenic mice // *Transg. Res.* — 1999. — V. 8, N 2. — P. 147–150.
14. *Vintersten K., Testa G., Naumann R. et al.* Bacterial artificial chromosome transgenesis through pronuclear injection of fertilized mouse oocytes // *Meth. Mol. Biol.* — 2008. — V. 415. — P. 83–100.
15. *Yang X., Model P., Heintz N.* Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome // *Nat. Biotechnol.* — 1997. — V. 15, N. 9. — P. 859–865.
16. *Цирульник А., Снітинський В., Вовк С.* Модифікація гена транскрипційного фактора STAT3 // *Вісн. Львів. нац. агр. ун-ту.* — 2009. — № 3. — С. 422–425.
17. *Цирульник А., Снітинський В., Стойка Р.* Модифікація еукаріот шляхом ВАС-рекомбінації // *Біологічні студії.* — 2009. — Т. 3, № 3. — С. 29–38.
18. *Tsyurulnyk A., Moriggl R.* A detailed protocol for bacterial artificial chromosome recombineering to study essential genes in stem cells // *Meth. Mol. Biol.* — 2008. — V. 430. — P. 269–293.

**МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОВ
ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ
СЕМЕЙСТВА STAT
МЕТОДОМ ВАС-РЕКОМБИНАЦИИ**

*А. О. Цирульник¹
В. В. Снитинский¹
Р. С. Стойка²*

¹Львовский национальный
аграрный университет

²Институт биологии клетки НАН Украины,
Львов

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Синтезирована модифицированная форма гена, продукт которого является транскрипционным фактором, регулирующим сигнальный путь ряда важных цитокинов. Для достижения высокого уровня экспрессии гена в геноме мыши применяли современный эффективный метод ВАС-рекомбинации, позволяющий модифицировать и вводить в геном фрагменты ДНК размером до 350 тыс. пар нуклеотидов. Используя ВАС и рекомбинационную систему Рас-профага (Rec/ET) или λ -фага (Red α /Red β), в геном мыши вводили не только сам ген, но и все необходимые регуляторные зоны и промотор, что обеспечивает высокий уровень его экспрессии. Обосновано применение этого метода для модификации гена любого транскрипционного фактора и создания эффективной трансгенной модели *in vivo*.

Ключевые слова: синтез ДНК, транскрипционные факторы STAT, модификация генов.

**MODIFICATION OF GENES
OF STAT TRANSCRIPTION
FACTORS USING BAC-RECOMBINATION
METHOD**

*A. O. Tsyurulnyk¹
V. V. Snitynsky¹
R. S. Stoika²*

¹Lviv National Agricultural University

²Institute of Cell Biology
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Lviv

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

The modified form of gene of transcription factor STAT3 which is a potent mediator of JAK/STAT signaling pathway was synthesized. For high level of expression of created transgene in mouse genome, a modern and effective method of BAC (Bacterial Artificial Chromosome) recombination was used. The method is based on recombination system of λ -phage (Rec/ET) or λ -phage (Red α /Red β) transferred into *Escherichia coli* DH10B cells. In case of BAC recombination, a DNA of big size (up to 350 kbp) can be modified and all the known regulatory regions essential for desired transgenic expression can be included and introduced into genome. This method is very convenient for modification of any genes of transcription factors and generation of transgenic animal models.

Key words: synthesis of DNA, STAT transcription factors, gene modification.