

Hücre hatlarını oluşturmakta kullanılan plazmidlerin integrasyon bölgelerinin tanımlanması

The identification of the integration sites of the plasmids that have been used to transduce cell lines

Muzaffer Arıkan¹, Aris Çakiris¹, Zeliha Emrence¹, Atilla Çakar¹,
Ferda Paçal¹, Neslihan Abacı¹, Sema Sırma¹, Duran Üstek¹

¹Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi

ÖZET

Hücre hatlarını oluşturma yollarından biri, hücreleri DNA tümör virüsleri ile enfekte etmektir. İmmortalizasyon işleminde kullanılan vektör DNA dizileri, genomik DNA'ya integre halde bulunurlar. Bu çalışmada, söz konusu vektörlere ait DNA parçalarının binlerce pasaj sonrası durumları K562 hücre hattında sorgulanmıştır. Yapılan çalışmada, DNA parçalarını yakalama (sequence capture array) metodu ile yeni nesil dizileme teknolojisi birleştirilerek genoma integrasyon bölgeleri tespit edilmiştir. K562 hücrelerinde, hücre soyunun immortalizasyonunda kullanılan viral DNA dizileri ile eşleşen 15540 fragman elde edilmiştir. Bu fragmanların %60'ının immortalizasyonda kullanıldığı bilinen Simian virus 40 T antijenine, %12'sinin *pGNS-BAC* klonlama vektörüne, %11'inin FBDki knock-in vektörüne, %11'inin pSTH1-GFP DNA klonlama vektörüne ve %6'sının insan herpes virüs 5 strain Toledo'ya, ait olduğu görülmüştür. Ayrıca, SV-40'ın 3p24.3 kromozomal bölgesindeki TBC1D5 genine integre halde bulunduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, K562 hücre soyunun immortalizasyonunda kullanılan vektör profili çıkarılmış ve SV-40 T antijenin bu hücredeki integrasyon bölgesi tespit edilmiştir.

ABSTRACT

One of the ways to create cell lines is infecting the cells with DNA tumor viruses. The DNA vector sequences that used for immortalization process are found to be integrated in genomic DNA. At this study, the conditions of these DNA segments after thousands of passages in K562 cell line were investigated. Sequence capture array and next generation sequencing technology were combined to identify genome integration sites. In the K562 cells, 15540 fragments matching viral DNA sequences used for immortalization of the cell line were obtained. It was determined that 60% of the fragments is matching Simian virus 40 T antigen, 12% matching *pGNS-BAC* cloning vector, 11% matching knock-in vector FBDki, 12% matching pSTH1-GFP DNA cloning vector and 6% matching human herpes virus 5 strain Toledo. Also, SV-40 was found to be integrated in TBC1D5 gene which is located at 3p24.3 chromosomal region. Here, the profile of the vectors used in immortalization of the K562 cell line and the integration site of the SV-40 at the cell line were determined.

Giriş

İmmortalizasyon; hücre soyu oluşturma çalışmalarında, hücrelerin çoğalma ve büyüme özelliklerinin dengeli hale getirilmesi açısından önemli bir basamaktır (1). Bu aşamada kimyasal maddeler, fiziksel teknikler, onkogenler veya DNA tümör virüsleri kullanılabilir (2). Epstein-Barr (3), Simian virüs (SV40) T antijeni (4), İnsan Papilloma Virüsleri (5) ve Adenovirüsler (6) immortalizasyon çalışmalarında en çok tercih edilen DNA virüsleri olarak bilinmektedirler. İmmortalizasyon aşamasında kullanılan virüslerin konak DNA'ya integrasyonu, daha sonraki hücre kültürü çalışmalarını etkileyebilmektedir (7). Özellikle gen terapisi çalışmalarında hücre soylarındaki bu viral integrasyon bölgelerinin çalışmaya etkisi dikkate alınmalıdır.

Son yıllarda, viral integrasyon bölgelerinin tayini üzerine yapılan gen terapisi çalışmaları yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde ivme kazanarak artmıştır (8,9). Hedefli dizi yakalama (sequence capture array) metodu pek çok yeni genomik uygulamaya uyarlanabilen bir metottur (10,11,12). Yeni nesil dizileme teknolojileri, hedefli dizi yakalama metodu ile birlikte kullanılarak vektörlerin tüm genomdaki integrasyon bölgeleri belirlenebilir.

Bu çalışmada, K562 hücre hattının immortalizasyonunda kullanılmış DNA viral vektörlerinin profili ve integrasyon bölgeleri hedefli dizi yakalama ve yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

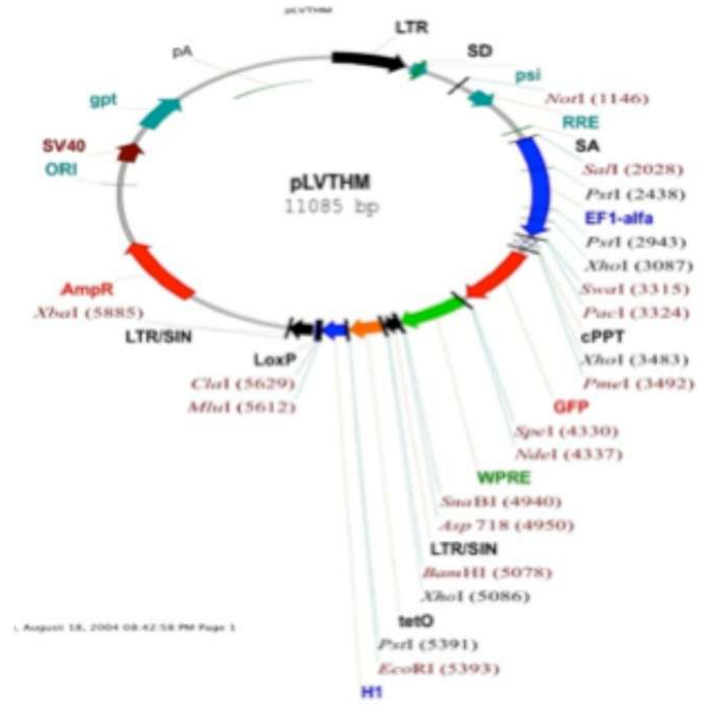
Gereç ve Yöntem

K562 hücre kültürü ve DNA izolasyonu:

İnsan kronik myeloid lösemi hücre soyu K-562 (ATCC CCL-243); 10% fetal calf serum, 200 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin ilave edilen RPMI 1640 medyumunda 37 °C'de, 95% hava ve 5% CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir. K562 hücrelerinin genomik DNA'sı Qiagen DNA Blood Maxi Kit kullanılarak izole edilmiş ve 20 ug genomik DNA, hedefli dizi yakalama işlemi yapıldı.

DNA parçalarını yakalama (Sequence capture array):

pLVTHM vektör (Şekil 1) DNA dizisinin bütününe (11085 bp) 45 bp uzunluğunda örtüşen (overlap) proplar dizayn ettirilerek, DNA yakalama (capture) Nimblegen'e yaptırıldı. (Roche Nimblegen, Madison, WI).



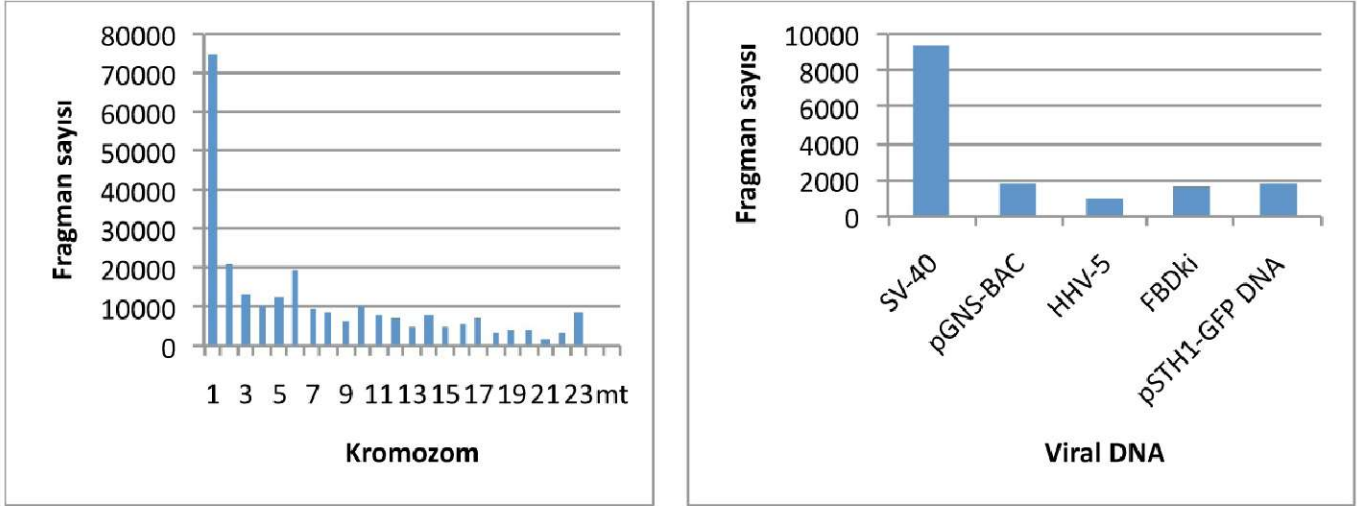
Şekil 1. pLVTHM vektörünün yapısı

Yeni nesil dizileme ve biyoinformatik analiz

Yeni nesil dizileme, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Tüm Genom Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi. Yakalanan DNA dizilerinden 500 ng alınarak Kütüphane oluşturma işlemi üreticinin protokolüne uygun olarak yapılmıştır (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN, USA). DNA dizileri Mini-Elute Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) kullanılarak pürifiye edilmiştir. 100 bp ile 600 bp arasında uzunluğa sahip diziler Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Anaheim, CA, USA) kullanılarak doğrulanmıştır. GS FLX dizileme işlemi üreticinin protokolüne uygun olarak ve 3/4 picotiter plate kullanılarak yapılmıştır. Dizileme sonucu firetilen data GS Run Browser kullanılarak DNA dizilerine dönüştürülmüştür. Bu aşamada düşük kaliteli DNA dizileri program tarafından elenmiştir. Elde edilen DNA dizileri insan kromozomları ile karşılaştırılarak kromozom başına düşen dizi sayısı belirlenmiştir. K562 hücresinde insan kromozomlarına uymayan diziler; NCBI veritabanından indirilen SV 40, Epstein-Barr, İnsan Papilloma Virüsleri, Adenovirüsler gibi immortalizasyonda kullanıldığı rapor edilen DNA virüslerinin dizileri ile CLCBIO Genomic Workbench programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Daha sonra, bu aşamada hiçbir dizileme eşleşmeyen fragmanlar NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) veritabanında aranarak eşleştikleri diziler incelenmiştir. SV-40 T antijeni ile eşleşen fragmanlardan kimerik olanlar incelenerek, kromozomal integrasyon bölgeleri tespit edilmiştir.

Sonuçlar

Yeni nesil dizileme teknolojisi ve hedefli dizi yakalama metodu kullanılarak pLVTHM vektörünün, K562 hücre soyundaki integrasyon bölgeleri dizilenmiştir. Enfekte edilmemiş K562 hücre soyunda dizileme sonucu 272,262 fragman elde edilmiştir. pLVTHM plasmid'inde insan genlerine homolog parçalar bulunmaktadır. Yakalama problemleri bu plasmid temel alınarak tasarlandığından elde edilen fragmanların 256,722 tanesinin insan kromozomlarındaki homolog bölgeler ile eşleştiği görülmüştür (Grafik 1a). Geriye kalan 15540 fragmanın ise K562 hücre soyunda immortalizasyon işlemiyle kullanılan DNA'ya integre olmuş viral ve plasmid kalıntılara ait olduğu görülmüştür (Grafik 1b).

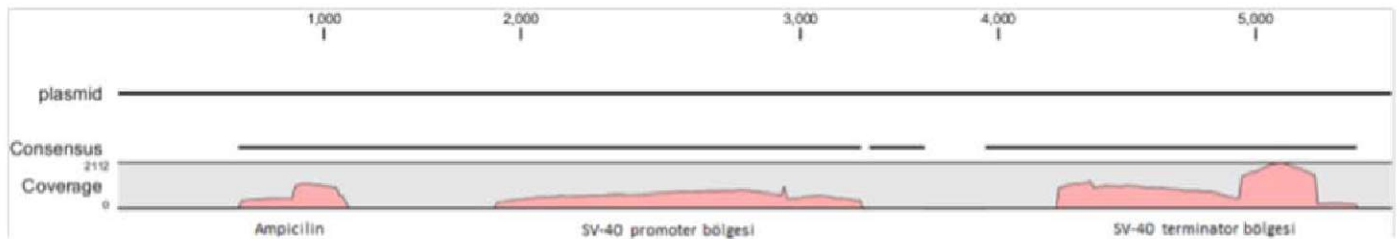


Grafik 1. Enfekte edilmemiş K562 hücre soyunda dizileme sonucu elde edilen fragmanların dağılımı (272,262 fragman)

a) kromozomlara göre dağılım (256,722 fragman)

b) viral DNA kalıntılara göre dağılım (15540 fragman).

Elde edilen 15540 fragmanın, benzerlik gösterdikleri plazmid bölgelerine göre dağılımı CLCBIO Genomic Workbench kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. pLVTHM vektörünün sadece klasik plazmid kısmı (5885-11085 bp arası) ile eşleşen fragmanların toplu görüntüsü.

Bu bölgelere giden fragmanların ait oldukları plazmidler NCBI database taranarak bulunmuştur ve bu fragmanların bu vektörlerde eşleştiği bölgeler gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. K562 hücre soyundan elde edilen fragmanların hücre soyu oluşturulmasında kullanılan vektörlere göre dağılımı.

Vektör adı	Fragman sayısı	Eşleşen bölge	Ortalama fragman uzunluğu (bp)
pGNS-BAC	1831	Replikasyon orijini (colE1)	382
FBDki knock-in	1670	Neomisin direnç geni, Soriano vektörü	342
pSTH1-GFP	1786	PolyA sinyali, insan sitomegalovirüs CMV promotör bölgesi	368
İnsan Herpes Virüs (HHV) 5 strain Toledo	905	UL124- UL133	349

Tartışma

Hücre soylarının oluşturulması ve stabilizasyonun sağlanması için farklı teknikler geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. En yaygın bilinen tekniklerden birisi de DNA virüsleridir. Bu teknikte, kullanılan vektörler hücre DNA'sına integre olur ve zaman içinde seleksiyon ile en uygun lokasyonda sabitlenir.

Yaptığımız çalışmada, K562 hücre soyunun ölümsüzleştirilmesinde ve stabil hale getirilmesinde kullanılan vektörlere ait DNA dizilerinin varlığını ve genomdaki dağılımını inceledik. Kullanılan vektörlere ait DNA parçalarını, hedefli dizi yakalama metodu ile yakaladıktan sonra yeni nesil dizileme teknolojisi kullanarak diziledik. Dizileme sonucu, K562 hücre soyunun ölümsüzleştirilmesinde kullanılan vektörlere ait 15540 fragman elde ettik. Bu fragmanlarla yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, 9348 fragmanın (%60) SV-40 T antijenine ait olduğunu belirledik. SV-40 hücre soyu oluşturma işleminde en sık kullanılan virüs tiplerinden biridir(13). K562 hücre soyunda da SV-40'ın ölümsüzleştirmede kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca, 1831 fragmanın pGNS-BAC klonlama vektörüne, 1786 fragmanın pSTH1-GFP DNA klonlama vektörüne, 1670 tanesinin FBDki knock-in vektörüne ve 905 tanesinin de insan herpes virüs 5 (HHV 5) strain Toledo'ya

ait olduğu belirlenmiştir. Bu fragmanların; pGNS-BAC klonlama vektöründe replikasyon orijini (colE1) bölgesine, FBDki knock-in vektöründe Neomisin direnç geni ile soriano vektörü bölgesine, pSTH1-GFP vektöründe PolyA sinyali ile human sitomegalovirüs CMV promotör gitmektedir. İnsan herpes virüs 5'te UL124- UL133 genleri arasındaki bölgesi ve pGNS-BAC klonlama vektörü parçası ile eşleşmektedir.

SV-40 T antijenine ait fragmanlar incelenerek kimerik fragmanlar belirlenmiştir. Bu fragmanların analizi sonucunda SV-40'ın K562 hücre soyunda 3p24.3 kromozomal bölgesinde bulunan, TBC1D5 adlı gene integre halde bulunduğu görülmüştür. Bulduğumuz sonuçla uyumlu olarak, hücre soylarının SV40 için tek integrasyon bölgesi içerdikleri bilinmektedir (14). SV-40'ın K562 hücre soyunda pek çok farklı bölgeye integre olmasına rağmen, zaman içinde en stabil olduğu bölgenin seleksiyonda varlığını devam ettirmesi hücre soyunun dengede kalması açısından önemlidir (15).

İmmortalizasyonunda kullanılan DNA vektörlerinin profilinin ve integrasyon bölgelerinin belirlenmesi, hücre soylarının gen terapi çalışmaları üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Hyun Min Jung, Seong-Jun Choi, Jin Kyeong Kim. Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;106(4): 703-13
2. Shay, J.W., Wright, W.E., & Werbin, H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072: 1-7
3. Hammerschmidt, W. and Sugden, B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*. 1989; 340:393-397.
4. Ozer HL, Banga SS, Dasgupta T, Houghton J, Hubbard K, Jha KK, Kim SH, Lenahan M, Pang Z, Pardinas JR, Patsalis PC. SV40-mediated immortalization of human fibroblasts. *Exp Gerontol*. 1996;31:303-310.
5. Shiga T, Shirasawa H, Shimizu K, Dezawa M, Masuda Y, Shimizu B. Normal human fibroblasts immortalized by introduction of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6-E7 genes. *Microbiol Immunol*. 1997;41:313-319.
6. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*. 1977;36 (1):59-74.
7. Gama-Norton L, Botezatu L, Herrmann S, Schweizer M, Alves PM, Hauser H, Wirth D. Lentivirus Production Is Influenced by SV40 Large T-Antigen and Chromosomal Integration of the Vector in HEK293 Cells. *Hum Gene Ther*. 2011;22(10):1269-79
8. Wang GP, Garrigue A, Ciuffi A, Ronen K, Leipzig J, Berry C, Lagresle-Peyrou C, Benjelloun F, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, and Bushman FD. DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer *Nucleic Acids Research*. 2008;36(9):e49
9. Gabriel R, Eckenberg R, Paruzynski A, Bartholomae CC, Nowrouzi A, Arens A, Howe SJ, Recchia A, Cattoglio C, Wang W, Faber K, Schwarzwaelder K, Kirsten R, Deichmann A, Ball CR, Balaggan KS, Yáñez-Muñoz RJ, Ali RR, Gaspar HB, Biasco L, Aiuti A, Cesana D, Montini E, Naldini L, Cohen-Haguenauer O, Mavilio F, Thrasher AJ, Glimm H, von Kalle C, Saurin W, Schmidt M. Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. *Nat Med*. 2009;15(12):1431-1436.
10. Okou DT, Locke AE, Steinberg KM, Hagen K, Athri P, Shetty AC, Patel V, Zwick ME Combining microarray-based genomic selection (MGS) with the Illumina Genome Analyzer platform to sequence diploid target regions. *Ann Hum Genet*. 2009 Sep;73(Pt 5):502-13.
11. Duncavage EJ, Magrini V, Becker N, Armstrong JR, Demeter RT, Wylie T, Abel HJ, Pfeifer JD. Hybrid capture and next-generation sequencing identify viral integration sites from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue *J Mol Diagn*. 2011;13(3):325-33.
12. Johansson H, Isaksson M, Sörqvist EF, Roos F, Stenberg J, Sjöblom T, Botling J, Micke P, Edlund K, Fredriksson S, Kultima HG, Ericsson O, Nilsson M. Targeted resequencing of candidate genes using selector probes. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(2): e8.
13. Bryan TM, Reddel RR. SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncol*. 1994;5: 331-357.
14. Liu J, Kaur G, Zhawar VK, Zimonjic DB, Popescu NC, Kandpal RP, and Athwal RS. Role of SV40 Integration Site at Chromosomal Interval 1q21.1 in Immortalized CRL2504 Cells. *Cancer Res*. 2009;69:7819-7825
15. Chang TH, Ray FA, Thompson DA, Schlegel R. Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells. *Oncogene* 1997;14: 2383-2393.