

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА РАН

на правах рукописи

ТКАЧУК АРТЕМ ПЕТРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА СТАБИЛИЗАЦИИ ТРАНСГЕНОВ ПОСЛЕ ИХ
ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ**

Специальность 03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в группе биологии теломер Учреждения Российской академии наук
Института биологии гена РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Савицкий Михаил Юрьевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Любомирская Наталия Вениаминовна

доктор биологических наук

Краснов Алексей Николаевич

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН

Защита диссертации состоится 23 декабря 2010 года в 11 час. на заседании
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук
Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии
наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991,
Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан ____ ноября 2010 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Последние успехи в области генетического определения пола насекомых и интенсивная работа над созданием трансгенных комаров, не способных переносить малярию или лихорадку Денге, говорят о том, что внедрение и широкое использование эффективных программ контроля численности вредителей и контроля над трансмиссивными заболеваниями с помощью трансгенных насекомых дело ближайшего будущего.

Основным методом получения трансгенных насекомых является интеграция в геном реципиента генетического материала с помощью неавтономных транспозонов, которые представляют собой векторную молекулу, содержащую концевые инвертированные повторы (TIR от англ. - terminal inverted repeats) транспозона, между которыми заключена последовательность трансгена. При таком способе интеграции трансген оказывается окруженным TIR мобильного элемента. Оба повтора необходимы для перемещения транспозона и узнаются транспозазой, которая вырезает фланкированную ими последовательность из одного места в геноме и вставляет ее в другое (“cut and paste” механизм).

При внедрении в природную популяцию насекомых-вредителей большого числа трансгенных насекомых основной задачей, стоящей перед специалистами, является соблюдение высокого уровня безопасности технологии для человека и окружающей среды.

Одним из главных рисков при использовании трансгенных насекомых в программах контроля численности насекомых-вредителей или при замещении дикой популяции переносчиков малярии или лихорадки Денге резистентными трансгенными насекомыми является возможность ремобилизации трансгена. При внешнем источнике транспозазы трансген ремобилизуется и начнет перемещаться по геному. Как поведет себя тот или иной трансген, предсказать невозможно. Риск повышает и то, что горизонтальный перенос транспозона и последующее его распространение в популяции могут происходить с большой скоростью. Кроме того, многие родственные семейства транспозонов способны к перекрестной мобилизации, т. е. транспозаза одного типа мобильных элементов может вызывать транспозиции другого транспозона.

Существующая сейчас технология получения трансгенных насекомых не соответствует этому требованию. Все методы, предложенные для постинтеграционной стабилизации трансгенов, основаны на одной и той же идее: ввести в конструкцию дополнительный сайт для узнавания транспозазой (TIR одного из транспозонов). Встраиваться и перемещаться при наличии источника транспозазы способна как полноразмерная конструкция, так и маленький трансген в ее составе, окруженный TIR. Если

в геном встроилась полноразмерная конструкция, а после ремобилизации вырезалась только ее часть, то в геноме останется трансген с единственным TIR. Такой трансген уже не способен перемещаться. Однако методы стабилизации трансгенов, основанные на этом принципе, низкоэффективны, сложны и часто не позволяют удалить оба плеча транспозона. Кроме того, использование стадий искусственной дестабилизации генома в процессе получения стабилизированных трансгенов может быть потенциально опасным.

В связи с этим актуальной задачей становится разработка метода стабилизации трансгенов после их интеграции в геном.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было разработать метод стабилизации трансгенов после их интеграции в геном на базе репарации индуцированных двуцепочечных разрывов ДНК.

Для достижения указанной цели в работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать новый метод стабилизации трансгенов после их сайт-неспецифической интеграции в геном на основе репарации индуцированных двуцепочечных разрывов ДНК в модельной системе *Drosophila melanogaster*
2. Выявить эффективный механизм репарации двуцепочечных разрывов ДНК для реализации разработанного метода стабилизации трансгенов
3. Проанализировать характер делеций генетического материала, возникающих в результате репарации индуцированных двуцепочечных разрывов
4. Разработать новый метод стабилизации трансгенов после их сайт-специфической интеграции в геном за счет SSA репарации индуцированных двуцепочечных разрывов ДНК в модельной системе *D. melanogaster*
5. Показать возможность эффективного одновременного удаления обоих плечей неавтономного транспозона и селективных маркеров

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе предложен принципиально новый эффективный метод стабилизации трансгена после его интеграции в геном реципиента. Метод основан на индукции двуцепочечных разрывов ДНК и их последующей репарации, за счет которой происходит удаление плечей транспозона. Впервые показана возможность стабилизации трансгенов за счет удаления обоих плечей транспозона без использования транспозазы. Выявлен размер делеций, возникающих в результате NHEJ-репарации индуцированных двуцепочечных разрывов.

Предложенные схемы строения векторных молекул могут быть использованы при создании удобных векторов для трансгенеза насекомых в интегрированных программах контроля численности вредителей (IPM program – от англ. Integrated pest management program). Кроме того, универсальность используемых принципов стабилизации трансгенов,

позволит создать серию универсальных векторов для трансгеноза животных, растений и клеточных линий со стабилизированными трансгенами.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 12-й и 14-й международных конференциях молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2008, 2010, соотв. Лауреат конкурса на лучшую научную работу), на Международной выставке-конференции «РосБиоТех-2008» в рамках молодежного научно-инновационного форума «Перспективы развития инноваций в биологии» (Москва, 2008. Лауреат конкурса на лучшую инновационную разработку), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2010» (Москва, 2010. Лучший доклад конференции) и на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Из них 1 статья в рецензируемом журнале и 4 тезисов докладов и материалов международных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на ____ страницах, включает __ таблиц и __ рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего __ источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка метода для сайт-неспецифической интеграции и стабилизации трансгенов в модельной системе *D. melanogaster*

1.1 Выбор эффективного механизма репарации двуцепочечных разрывов ДНК в качестве основного инструмента метода

Репарация двуцепочечных разрывов ДНК в отсутствие гомологичной матрицы, по которой возможна точная репарация, часто происходит с потерей части генетического материала. Если двуцепочечный разрыв происходит между двумя сонаправленными повторяющимися участками генома, то одним из вариантов репарации такого разрыва является SSA (от англ. single strand annealing – отжиг одиночной цепи) механизм. Отличительная особенность этого типа репарации – потеря одного из повторов и участка генома между ними (далее – «спейсер»).

Вторым путем репарации двуцепочечного разрыва, даже произошедшего в контексте сонаправленных повторов, является механизм NHEJ (от англ. Non-homologous end joining – негомологичное соединение концов). Репарация двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ механизму часто сопровождается делециями генетического материала. Таким образом, если

расположить точку внесения разрыва рядом со спейсером, то репарация возникшего разрыва по механизму NHEJ может привести к его делеции.

Для транспозиции мобильного элемента необходима не вся последовательность 5' и 3' плеч мобильного элемента. Выделяют несколько функциональных участков длиной 10-100 п.н., без которых перемещение транспозона невозможно.

Мы предположили, что если дублировать небольшой участок плеча транспозона, а его функциональный участок разместить в спейсере, то после внесения двуцепочечного разрыва между копиями, транспозон потеряет способность к перемещению из-за потери функциональной части плеча. Данный механизм будет работать как в случае репарации двуцепочечного разрыва ДНК по SSA механизму (потеря спейсера и одного из повторов вследствие комплиментарного отжига цепей двух сонаправленных повторов), так и в случае NHEJ репарации (делеция спейсера в результате прямого соединения разорванных концов ДНК на основе поиска случайных микромомологичных участков).

Для проверки выдвинутой гипотезы нами была создана векторная генетическая конструкция CTS (от англ. Casper Transgene Stability). При создании CTS за основу была взята коммерчески доступная векторная генетическая конструкция CaSpeR 4.

Этот вектор содержит плечи P-элемента - мобильного генетического элемента, впервые обнаруженного у *D. melanogaster*. CaSpeR 4 широко используется для трансформации *D. melanogaster*, позволяет быстро провести селекцию трансформантов.

В качестве трансгена, подлежащего стабилизации, мы выбрали ген *white* (W), который содержится в CaSpeR 4. Данный ген отвечает за окраску глаз мухи, легко детектируется, поэтому часто используется в работах по трансгенезу у *D. melanogaster* в качестве маркерного.

Для того, чтобы индуцировать SSA репарацию двуцепочечного разрыва ДНК мы дублировали 3'TIR P-элемента и поместили его между геном *white* и 3' плечом транспозона (последовательность 3'miniP). Если бы разрыв, произведенный между сонаправленными копиями TIR транспозона, репарировался по SSA механизму, то последовательность 3' плеча мобильного элемента должна была быть удалена, а в геноме остался только 3'TIR. Из литературных данных известно, что при длине 3' плеча транспозона менее 126 п.н., транспозаза не способна узнать специфическую последовательность TIR и перемещение транспозона в этом случае не происходит.

Для того чтобы индуцировать процесс репарации в геноме необходимо искусственно вызвать двуцепочечный разрыв ДНК в заданном месте. Этого можно добиться, используя сайт-специфические мегануклеазы с длинными сайтами узнавания. Данный класс эндонуклеаз рестрикции имеет протяженные уникальные сайты узнавания (от 12 до 45 п.н.),

поэтому вероятность встречи, например, 18 членного сайта мегануклеазы I-SceI в геноме равна 7×10^{-10} , что на порядок больше, чем геном человека ($\sim 3 \times 10^9$ п.н.). Геном *Drosophila* не содержит сайтов узнавания для I-SceI, что делает рестриктазу удобным инструментом для манипуляций с трансгеном *in vivo*, в частности для изучения репарации, поскольку позволяет индуцировать разрыв в конкретном месте.

Для детекции перестроек генома в процессе репарации между функциональным полноразмерным 3'-концом транспозона и его сонаправленной укороченной копией мы поместили ген *EGFP(G)* под контролем тканеспецифического искусственного промотора 3xP3, который обеспечивает экспрессию маркерного белка только в глазах насекомого. Ген маркерного белка мы окружили сайтами I-SceI. Таким образом, нами была создана конструкция следующего строения: 5'TIR–*white*–I-SceI–*EGFP*–I-SceI– 3'TIR.

Полученной генетической конструкцией с помощью микроинъекций были трансформированы 150 эмбрионов *D. melanogaster* линии y^1w^{1118} . Отбор трансформантов проводился визуально по окраске глаз. Благодаря наличию в трансгене гена *white*, трансформанты имели оранжевую окраску глаз. Также, используя флуоресцентный стереомикроскоп, нами контролировалась экспрессия *EGFP*.

Были получены 11 линий трансформантов. Самцы полученных линий скрещивались с самками, несущими трансген с I-SceI под контролем промотора гена теплового шока. Потомки этих мух (F1) подвергались тепловому шоку на ранних стадиях развития, что индуцировало синтез рестриктазы. Мухи из F1 скрещивались с мухами линии y^1w^{1118} и уже в F2 мы наблюдали потерю маркерного гена *EGFP*, которая в среднем составляла 52%. Схема проведения эксперимента отражена на рисунке 1.

В дальнейшей работе мы использовали две линии мух – CTS2 и CTS8, с трансгенами на 2R и 2L хромосомах, соответственно. Для них методом инвертированной ПЦР были установлены точные места встройки трансгена в геном. Нами было проанализировано по 250 мух – потомков CTS2 и CTS8, потерявших *EGFP*. Эти мухи должны были нести трансген с делецией между сайтами I-SceI, образовавшейся в результате индукции разрывов по ним и последующей репарации. Нас интересовал вопрос, как разрывы вблизи 3'TIR повлияли на его целостность. Мы использовали праймеры из мест инсерции в геном и праймер из последовательности трансгена. Основной задачей эксперимента было найти трансген с делецией 3'TIR *P*-элемента, которая могла возникнуть в результате репарации двуцепочечного разрыва. Ампликоны до 500 п.н. для линии CTS2 и до 350 п.н. для CTS8 свидетельствовали о наличии значимой делеции в районе 3'плеча транспозона и секвенировались. В линии CTS2 нами была найдена муха, репарация у которой прошла с делецией 405 п.н. В результате делеции 3'-конец мобильного элемента был полностью

удален, а, следовательно, конструкция была полностью стабилизирована. В выборке из линии CTS8 также была обнаружена муха с 240 п.н. делецией. Секвенирование показало, что в этом случае 3'плечо транспозона было сильно нарушено. От него осталась только последовательность длиной 51 п.н., то есть он потерял около 80% своей последовательности. Учитывая то, что при длине плеча менее 126 п.н. транспозон полностью теряет способность к перемещению, транспозон с оставшейся 51 п.н. последовательностью 3'плеча можно считать неспособным к перемещению.

ПЦР анализ ДНК трансгенных насекомых, у которых произошла репарация индуцированного двуцепочечного разрыва, не выявил продуктов SSA репарации. Эти данные свидетельствуют о том, что контекст вносимого двуцепочечного разрыва в конструкции созданного вектора не отвечает минимальным требованиям, необходимым для эффективного прохождения репарации разрыва по механизму SSA. Наиболее важными условиями SSA репарации двуцепочечного разрыва ДНК является длина сонаправленных повторов, окружающих разрыв, и размер спейсерных участков. Чем больше длина повтора и меньше спейсер, тем эффективней разрыв репарируется с помощью SSA механизма. Так как в векторе CTS длина небольших сонаправленных повторов (31 п.н.) соразмерна с длиной спейсера – 25 п.н., это привело к резкому снижению эффективности SSA репарации двуцепочечного разрыва ДНК. Поскольку увеличение длины сонаправленных повторов свыше 100 п.н. невозможно из-за риска ремобилизации трансгена, мы отказались от идеи сайт-направленной делеции функциональной части плеча неавтономного мобильного элемента с помощью механизма SSA репарации.

Тем не менее, успешное удаление функциональной части плеча неавтономного транспозона с помощью репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ - механизму доказало принципиальную возможность стабилизации трансгенов после их интеграции в геном.

1.2 NHEJ репарация двуцепочечных разрывов ДНК как основной способ делеции плеча транспозона

Основной задачей на данном этапе исследований было выяснить, с какой частотой NHEJ репарация индуцированных двуцепочечных разрывов приводит к появлению делеций, способных нарушить плечо транспозона, фланкирующее трансген. Отказ от SSA репарации в качестве основного механизма удаления плеч неавтономного транспозона позволил упростить конструкцию вектора CTS – в нем была удалена последовательность 3' miniP. Полученным вектором были трансформированы 150 эмбрионов *D. melanogaster*. Для дальнейшей работы были отобраны три независимые линии трансгенных мух. С помощью

инвертированной ПЦР были установлены точные места встройки трансгенных конструкций в геном.

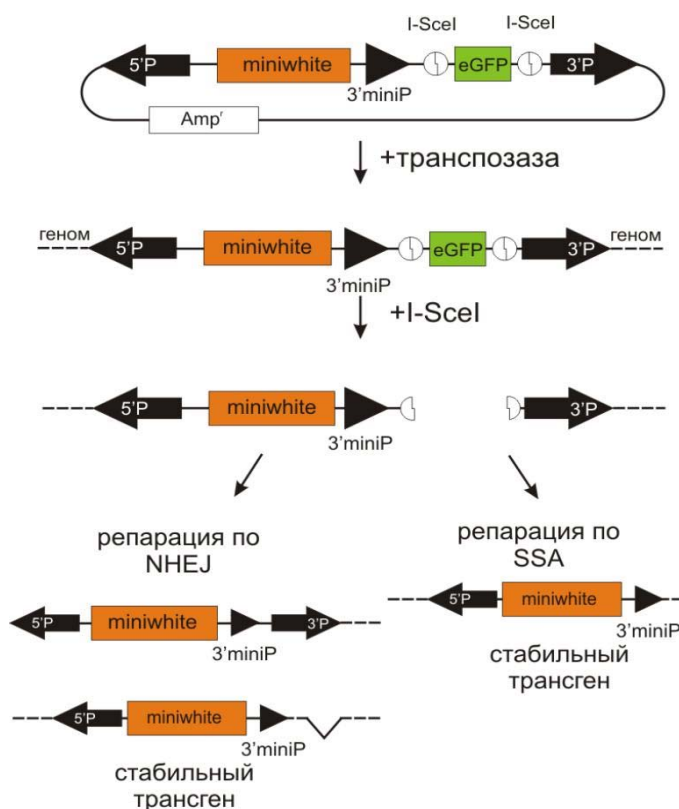


Рис.1 Схема стабилизации трансгена после его интеграции в геном с помощью CTS –вектора.

Все трансгены интегрировались в транскрипционно-активный хроматин, что было выявлено по фенотипическому проявлению маркерных генов *white* и *EGFP*. Две трансгенные конструкции из трех, *CTS2N* и *CTS5N*, интегрированы в непосредственной близости от 5' области прилегающих генов и только *CTS2107* встроилась в межгенный участок.

Большие делеции, которые могли возникнуть в результате репарации индуцированных разрывов ДНК по механизму NHEJ, были способны повредить не только плечо транспозона, но и трансген, подлежащий стабилизации. В нашем случае – это маркерный ген *white*.

Самцы полученных линий скрещивались с самками, несущими трансген с геном *I-SceI* под контролем промотора гена теплового шока. Потомки этих мух (F1) подвергались тепловому шоку на ранних этапах развития, что индуцировало синтез рестриктазы. В поколении F2 мы наблюдали потерю маркерного гена *EGFP*. В выборке из всех трансгенных мух мы выделили четыре фенотипических класса по наличию маркерных белков, определяющих окраску глаз *Drosophila*. В линиях *W+* мухи имели оранжевую окраску глаз, что свидетельствовало о нормальной экспрессии гена *white*. Мухи *W-* имели белые глаза из-за отсутствия экспрессии гена *white*. Аналогично, в линии *G+* глаза мух имели зеленую флуоресцентную окраску вследствие экспрессии маркерного белка *EGFP*, у *G-* флуоресценция отсутствовала (рис. 2). Более 54% всех трансгенных мух имели фенотип *W+G-* - насекомые потеряли *EGFP* в результате рестрикции по сайтам *I-SceI*, окружающим маркерный ген. 37,4 % трансгенных мух несли неповрежденный *EGFP*. Это могло быть связано с недостаточной эффективностью гидролиза рестриктных сайтов из-за недостатка *I-SceI*, а также с разновременным характером внесения разрывов и/или быстрой репарации разрывов. В

результате, когда происходил гидролиз второго сайта рестрикции, первый был уже

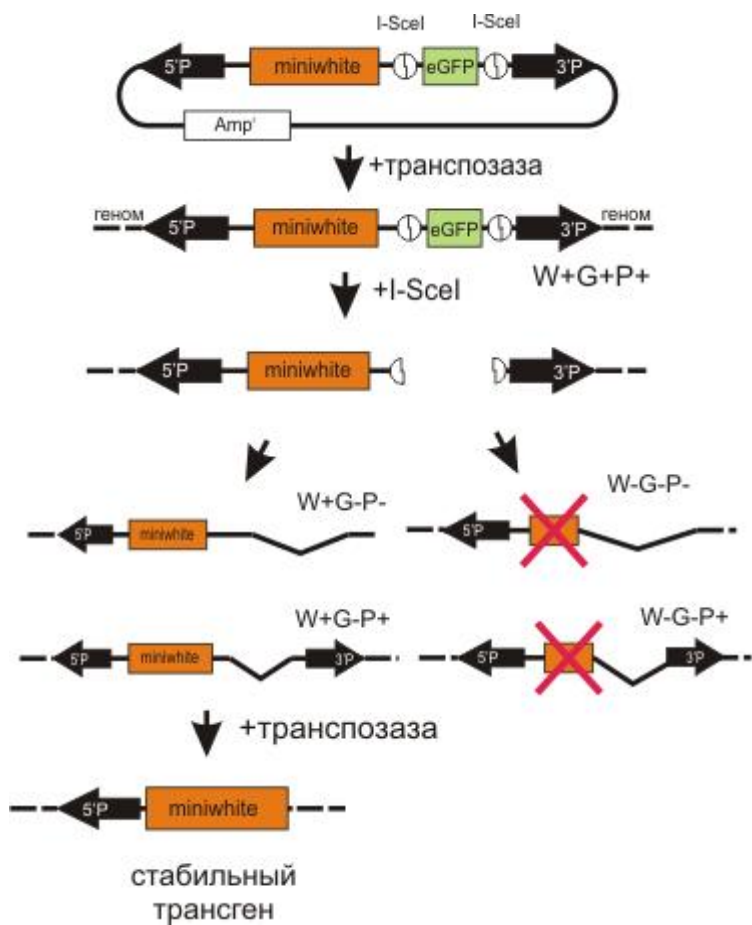


Рис. 2. Схема проведения эксперимента сайт-неспецифической интеграции и NHEJ-зависимой стабилизации трансгенов, где W – ген *white*, G – ген *EGFP*, P – P-элемент. а) трансформация *D. melanogaster*. Интеграция трансгена в геном б) отбор трансформантов по фенотипическому проявлению маркеров - *white* и *EGFP*. Определение места интеграции трансгена в) введение источника *I-SceI* в трансгенную линию д) анализ продуктов репарации, отбор трансгенных мух е) внесение в трансгенную линию с фенотипом W+G- источника транспозазы.

вызвавшему протяженные делеции прилегающих последовательностей ДНК.

Интересна небольшая (2,3%) фенотипическая группа, выявленная только в линии CTS2N, у которой наблюдалась флуоресценция *EGFP*, но не было экспрессии *white*. Механизм образования такой фенотипической группы схож с механизмом образования фенотипа W-G-, только в случае W-G+ репарация дистального разрыва произошла без серьезного изменения окружающей последовательности. Репарация проксимального разрыва, который произошел уже после репарации дистального, произошла с делецией 5' участка последовательности трансгена, где расположен маркерный ген *white*. Таким

восстановлен по NHEJ механизму с минимальными изменениями последовательности ДНК.

В таком случае потери маркера не происходило, и последовательность трансгена не претерпевала кардинальных изменений, которые могли бы сказаться на экспрессии маркерных генов.

В среднем около 8% трансгенных линий имели фенотип W-G-, свидетельствующий о потере всех маркеров. Данную группу насекомых удалось выявить

благодаря генетическому маркированию хромосомы, несущей трансген. В данной группе был не только делетирован *EGFP*, но и получил повреждения или был полностью удален маркерный ген *white*, который подлежал стабилизации. Это могло произойти в случае репарации возникшего двуцепочечного разрыва по NHEJ механизму,

образом, *EGFP* не был удален, а *white* потерял свою способность к экспрессии из-за делеции части своей последовательности. Результаты анализа трансгенных мух приведены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты анализа трансгенных мух в линиях CTS2107, CTS 5N и CTS 2N. n – число проанализированных мух.

Фенотип мух	CTS2107		CTS5N		CTS2N		Среднее, %
	n	%	n	%	n	%	
W-G+	0,0	0,0	0,0	0,0	18	2,3	0,8
W-G-	302	17,80	27	2,46	19	2,38	7,55
W+G+	716	34,8	414	37,7	319	39,8	37,4
W+G-	970	47,5	657	59,7	444	55,5	54,2

Из всех выделенных фенотипических групп корректно стабилизированные трансгены могли быть только в линии W+G–.

Для селекции линий со стабилизированными трансгенами мы использовали известный эффект появления мозаицизма окрашенных глаз у *Drosophila* вследствие дисгенеза. Перемещение генетической конструкции, содержащей ген *white*, приводит к появлению потомков (F1), у которых ярко выражена мозаичность глаз.

Для выявления линий со стабилизированными трансгенами, мух с фенотипом W+G– из трех исследуемых линий CTS2107, CTS2N и CTS5N скрестили с линией, несущей источник транспозазы. Среди потомков отбирали насекомых с равномерно окрашенными глазами. Наличие мозаичных глаз свидетельствовало о перемещении трансгенной конструкции.

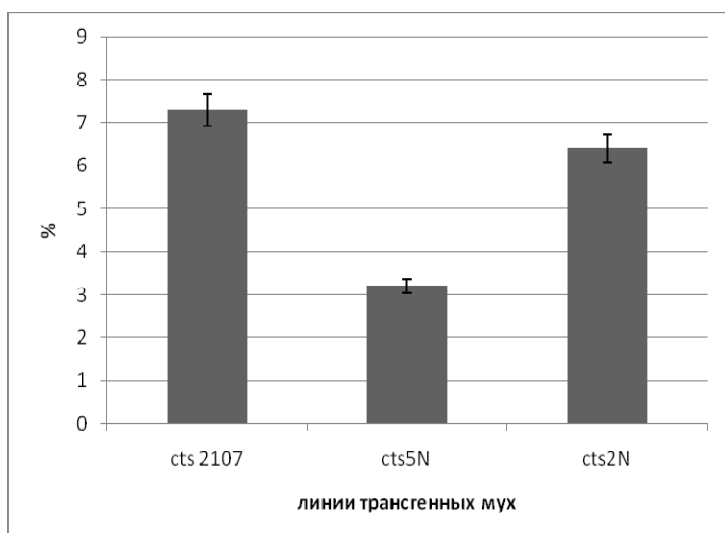


Рис. 3. Доля стабилизированных трансгенов в проанализированных трансгенных линиях. $p < 0,05$

В среднем 5,6% насекомых несли стабилизированные трансгены, не способные к перемещению. Наиболее высокая доля насекомых со стабилизированными трансгенами была найдена в линии CTS2107 – 7,3%, минимальная – 3,2% обнаружена в линии CTS5N (рис.3). Стоит отметить, что в линии CTS2107 большее число двуцепочечных разрывов ДНК по сравнению с остальными линиями репарировалось с образованием делеций. Трансгенных мух с фенотипом W–G– было найдено 17,8%, в то время как в линиях CTS5N и CTS2N их

мух с фенотипом W–G– было найдено 17,8%, в то время как в линиях CTS5N и CTS2N их

число не превышало 2,5%. Возможно, высокая доля делеций в результате NHEJ репарации двуцепочечных разрывов в линии CTS2107 была обусловлена геномным контекстом трансгена. Высокой вероятностью образования делеций в результате NHEJ репарации разрывов в рассматриваемой линии можно объяснить и высокая доля стабилизированных трансгенов, по сравнению с таковым в линиях CTS5N и CTS2N. Для того чтобы определить размер делеций в выделенных фенотипических группах с делециями генетического материала W-G- и W+G-, мы провели ПЦР анализ с последующим секвенированием ПЦР-продуктов. Для анализа использовали праймеры из последовательности трансгена и геномные праймеры, отстоящие от локуса интеграции трансгена от 285 до 4200 п.н.

Анализ мух со стабилизированными трансгенами, имеющих фенотип W+G-, показал, что репарация индуцированного двуцепочечного разрыва ДНК привела к потере участков как самого трансгена, так и участка генома *Drosophila*. Средний размер делетированных участков был 1590 п.н. Наибольшие делеции были зафиксированы в линии CTS2107 – свыше 4000 п.н. В результате делеций у всех мух со стабилизированными трансгенами отсутствовало 3' плечо P-элемента (табл. 2).

Таблица 2. Размер делеций в трансгенных линиях W+G-

Линия мух	Место интеграции	Размер делеции (min-max), п.н.
CTS 2N	X:6892616	985-1654
CTS 5N	2R:5004057	587-1442
CTS2107	2R:21078100	750-4123

В линиях с фенотипом W-G- был не только удален *EGFP*, но и поврежден ген *white*, расположенный в 5' области трансгена. ПЦР анализ мух с фенотипом W-G- показал, что данная фенотипическая группа разнородна по своему составу и содержит разные по строению последовательности продукты репарации разрывов.

Основной принцип, по которому можно классифицировать продукты репарации в рассматриваемой фенотипической группе – «направление» делеции от точки разрыва. В линиях CTS2N и CTS5N большинство трансгенных насекомых содержало полную последовательность плеча 3' плеча P-элемента (95,8% и 66,7% соответственно). В тоже время, в линии CTS2107, наоборот, большинство мух (97,4%) не содержали плечо P-элемента (табл. 3). Вероятно, линии трансгенных насекомых, у которых плечо транспозона было удалено, появились вследствие двунаправленной делеции генетического материала после репарации двуцепочечного разрыва ДНК. В случае, когда делеция затрагивала только 5' участок от точки разрыва (проксимальный сайт I-SceI), последовательность 3' плеча транспозона оставалась в составе трансгена, *EGFP* был удален вследствие рестрикции по

сайтам I-SceI, а ген *white* получал повреждения или полностью удалялся вследствие возникшей делеции.

Таблица 3. Делеционный анализ фенотипической группы W-G-

Линия мух	Место интеграции	+P элемент, %	- P элемент, %	Размер делеции <i>white</i> (min-max), п.н.
CTS 2N	X:6892616	95,8	4,2	270-1970
CTS 5N	2R:5004057	66,7	33,3	1069-1600
CTS2107	2R:21078100	2,56	97,4	1990-4090

Средняя длина делеций в гене *white* была 1833 п.н. Наибольшие делеции – до 4090 п.н., были зафиксированы в линии CTS2107. Вероятно, из-за особенностей геномного окружения трансгена, в линии CTS2107 были выявлены протяженные делеции, причем как в 5' области от точки разрыва, так и в 3' районе, что, по-видимому, и привело к большему числу трансгенов с делецией в последовательности маркерного гена *white* и 3' плеча P-элемента.

Таким образом в результате работы было показано, что в дальнейшем важно учитывать длину возникающих делеций (в среднем около 2000 п.н.), и поэтому целесообразно размещать между трансгеном, подлежащим интеграции и стабилизации в геноме реципиента, спейсерную последовательность длиной около 2000-3000 п.н. Это поможет избежать деградации стабилизируемого трансгена из-за возникающих делеций в ходе репарации индуцируемых двуцепочечных разрывов ДНК и увеличить долю стабилизированных тарнсгенов.

2. Разработка метода для сайт-специфической интеграции и стабилизации трансгенов в модельной системе *D. melanogaster*

2.1 Стабилизация трансгенов за счет последовательной делеции плечей транспозона с помощью SSA репарации индуцированных двуцепочечных разрывов ДНК

Мы показали, что с помощью предложенного метода на основе делеции последовательностей транспозона с помощью NHEJ репарации индуцируемых двуцепочечных разрывов ДНК, можно стабилизировать трансген. Однако, очевидны преимущества SSA репарации для использования ее в целях постинтеграционной стабилизации трансгенов. Эффективность выбора SSA пути при репарации двуцепочечных разрывов ДНК в оптимальных условиях достигает 85%. В отличие от NHEJ, делеции, возникающие в результате репарации двуцепочечных разрывов по SSA механизму, будут иметь предсказуемый размер.

Критическим условием выбора SSA пути репарации разрыва является длина сонаправленных повторов, между которыми происходит разрыв. Невозможность увеличить длину повторов в векторе CTS больше 100 п.н., так как это привело бы к узнаванию такой последовательности транспозазой, что было основным препятствием для использования SSA механизма.

Интеграция конструкции в заранее известный локус генома дала бы возможность обойти это препятствие. Мы предположили, что если окружить ген интереса участками, гомологичными и сонаправленными последовательностям геномного локуса, куда произошла интеграция, а затем внести двуцепочечные разрывы между повторами, то разрывы в части случаев будут репарироваться с помощью SSA механизма. Это приведет к делеции одного из повторов и всей последовательности, прилегающей к разрыву, которая включает в себя TIR транспозона.

Для проверки этой идеи мы создали векторную генетическую конструкцию *phiC31TS51D*. В качестве последовательности, подлежащей интеграции был выбран ген *EGFP* под контролем тканеспецифического промотора *3xP3*, который обеспечивает экспрессию зеленого флуоресцентного белка в глазах *Drosophila*. Кроме того, вектор содержал 5' и 3' последовательности, гомологичные соответствующим участкам генома, куда должна была произойти встройка трансгена. Для внесения одиночных двуцепочечных разрывов ДНК в последовательность трансгена мы поместили сайты узнавания мегануклеаз I-Sce I и I-Cre I. Это рестриктазы с протяженным сайтом узнавания - 18 п.н. у I-SceI и 22 п.н. у I-Cre I. Сайты узнавания I-Sce I не встречаются в геноме *Drosophila*, что делает рестриктазу удобным инструментом для манипуляций с трансгеном *in vivo*. Один сайт I-Cre I содержится в рДНК *Drosophila*, это позволяет работать с ним *in vivo*, но только при низком уровне экспрессии фермента. *phiC31TS51D* содержала рекомбинационный сайт *attB* и маркерный ген *white*.

Полученной генетической конструкцией трансформировали 100 эмбрионов *D. melanogaster*. Трансген был интегрирован в геном с помощью системы сайт-специфической интеграции фага *phiC31*. Мы использовали линию мух со встроенной интеграционной платформой *ZH-51D* в локусе *51D 2R* хромосомы, содержащую ген интегразы фага *phiC31* на X хромосоме. Ген интегразы был маркирован геном *EGFP* под контролем *3xP3* промотора. Интеграционная платформа представляет собой трансген на основе транспозона *mariner*, состоящий из маркерного гена *RFP* (от англ. red fluorescent protein – красный флуоресцентный белок) под контролем *3xP3* промотора (R), и рекомбинационного сайта *attP*. Данный маркерный ген обеспечивает красную флуоресцентную окраску глаз *Drosophila*. После интеграции вектора *phiC31TS51D* за счет рекомбинации между *attP* сайтом

интеграционной платформы и attB сайтом вектора строение интегрированного трансгена оказалось следующим: 3'TIR – *RFP* – сайт I-CreI – сонаправленная последовательность, идентичная участку генома, прилегающему к 3'TIR – *EGFP* – сонаправленная последовательность, идентичная участку генома, прилегающему к 5'TIR – сайт I-SceI – *white* – 5'TIR (рис 4).

Из литературных данных известно, что если длина сонаправленных повторов составляет 500-2000 п.н., то разрыв, расположенный между ними, будет репарироваться преимущественно по SSA-пути. Поэтому последовательность, гомологичную и сонаправленную геномному участку, который примыкает к месту интеграции трансгена с 3' конца, сделали 1000 п.н., а последовательность в 5' регионе – 643 п.н.

За перестройкой генетического материала в ходе репарации индуцированных двуцепочечных разрывов мы следили по экспрессии двух маркерных генов: *RFP* в 5' области трансгена и *white* в 3' области. Исчезновение экспрессии, а следовательно, и фенотипического проявления, маркерных генов свидетельствовало о произошедшей делеции нужного участка трансгена. Помимо SSA – пути, двуцепочечный разрыв в нашем случае мог репарироваться по механизму NHEJ. Как было показано ранее, данный путь репарации в некоторых случаях также может приводить к делеции прилегающих участков генома. Чтобы исключить ложно-положительный результат эксперимента, вызванный делецией промоторов маркерных генов, их регуляторные элементы были расположены на значительном расстоянии (2444 п.н. для *RFP* и 4600 п.н. для *white*) от места разрыва.

Из 100 трансформированных эмбрионов было найдено 20 независимых линий. ПЦР анализ и секвенирование подтвердили, что интеграция произошла в выбранный локус генома, все найденные трансформанты идентичны. Для дальнейшей работы была выбрана одна из полученных линий. Самцы, несущие трансген, были скрещены с линией $y^1w^{1118}; CyO/If; ISceI/ISceI$, несущей источник I-SceI под контролем промотора гена теплового шока. Индукцию I-SceI проводили в двух режимах:

1. на первый и второй день после откладки яиц в течение 2 часов при 37°C (жесткий тепловой шок)
2. только на первый день в течение 1 часа при 36°C (мягкий тепловой шок).

Далее анализировали всех потомков, несущих трансген. При суперэкспрессии фермента 39% потомков, несущих трансгенную конструкцию, имели белую окраску глаз. Это свидетельствовало об отсутствии 5'TIR транспозона и участка с маркерным геном *white*, который прилегает к двуцепочечному разрыву.

При снижении интенсивности теплового шока активация экспрессии I-SceI проходила значительно слабее. В связи с этим значительно снизилось число мух, где произошла

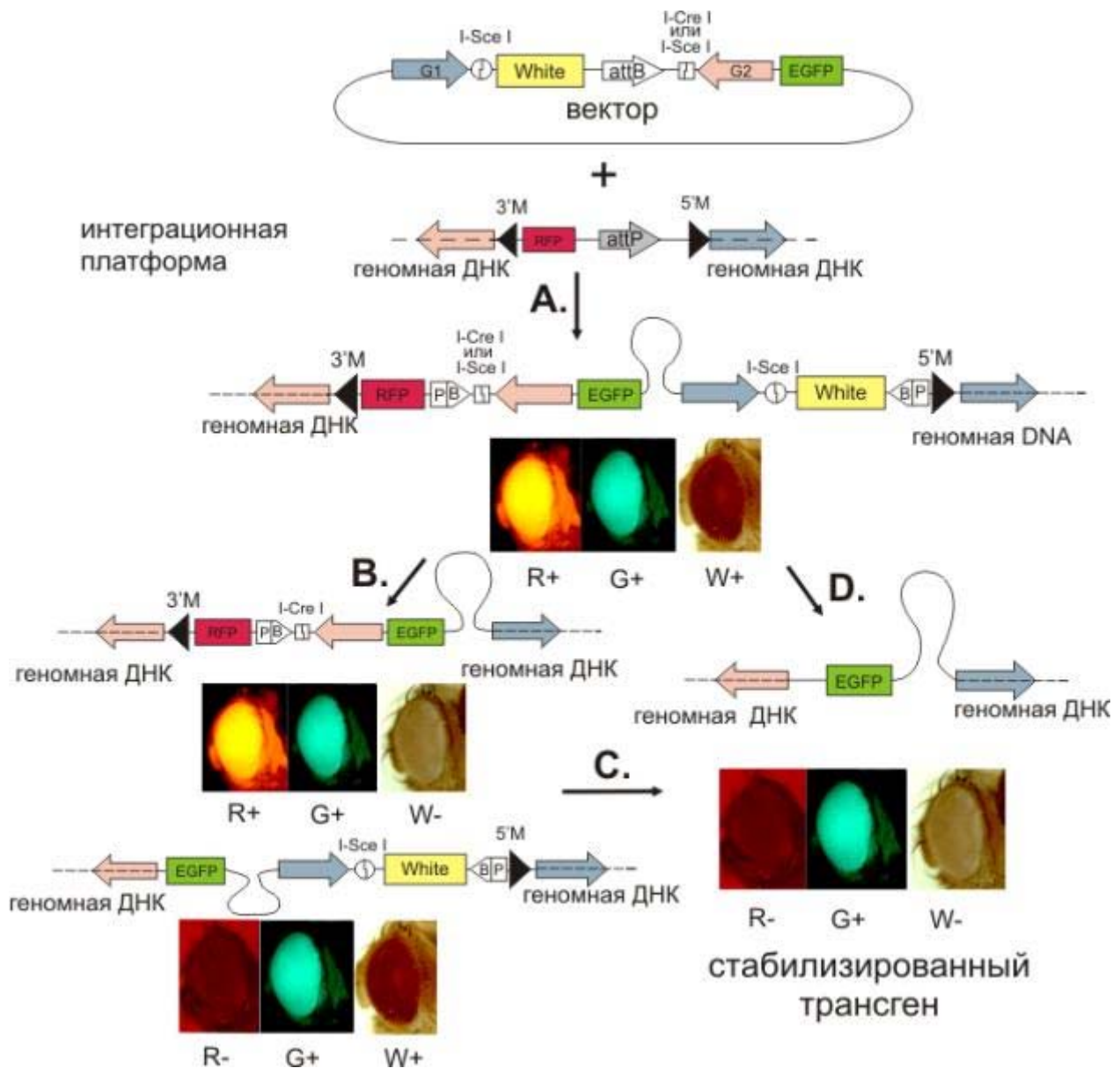


Рис. 4 Общая схема проведения эксперимента по сайт-специфической интеграции и стабилизации трансгенов. Приведены фенотипы трансгенных мух. А,В,С – схема эксперимента по стабилизации трансгенов с помощью вектора phiC31TS51D. Двухцепочечные разрывы и удаление плеч транспозона происходят последовательно. А,Д – схема эксперимента по стабилизации трансгенов с помощью вектора phiC31TS51D2xSce. Разрывы вносятся одновременно, что позволяет удалить оба плеча транспозона за один шаг.

делеция 5' TIR и маркера, до 5,8% (рис.5). Мы предположили, что это связано с недостаточной экспрессией рестриктазы, а не с эффективностью выбора SSA пути репарации двухцепочечного разрыва. Продукты репарации были верифицированы с помощью ПЦР-анализа с праймерами C51D1Rev и Amprev и последующим секвенированием ПЦР-продукта (места отжига праймеров приведены на рис.8).

Полученные линии мух с делецией 5' TIR транспозона и маркерного гена *white* были скрещены с линией $y^+w^{1118}; +/+; ICreI, Sb/TM6$, несущей источник I-CreI, под контролем промотора теплового шока. Так как жесткий тепловой шок при работе с I-CreI невозможен,

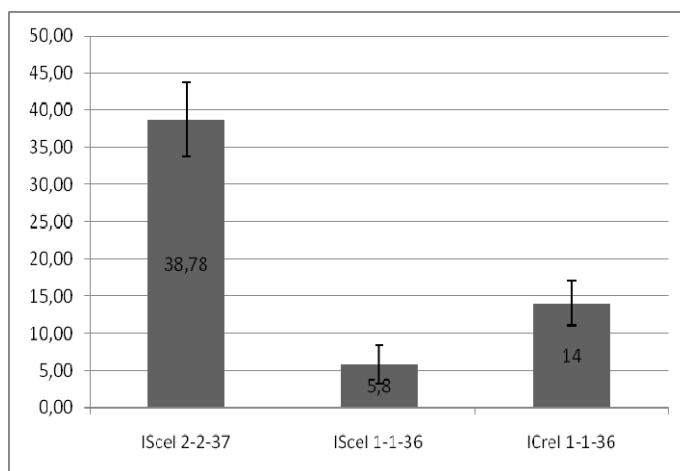


Рис. 5. Доля стабилизированных трансгенов в проанализированных трансгенных линиях. По оси абсцисс приведены разные условия теплового шока, активирующего мегануклеазы, где указаны: кол-во дней инкубации-часы-температура °С. $p < 0,05$

индукцию синтеза фермента проводили на первый день после откладки яиц в течение 1 часа при 36°C. 14% потомков с трансгеном не содержали маркерного гена *RFP* и 3' TIR транспозона. Продукты репарации были верифицированы с помощью ПЦР-анализа с праймерами C51D2For и 3xP3GFPprev и последующим секвенированием ПЦР-продуктов (места отжига праймеров приведены на рис.8). В результате было показано, что полученные линии мух несли только маркерный ген *EGFP*. Таким образом трансген в них оказался стабилизирован

и интегрирован непосредственно в геномный контекст. Последовательности 5' TIR и 3' TIR транспозона, маркерные белки и последовательности, гомологичные участку геномного локуса, куда произошла интеграция трансгена, были удалены.

2.2 Одновременная делеция плечей транспозона как высокоэффективный способ стабилизации трансгенов

Несмотря на сравнительно высокую эффективность получения трансгенных насекомых со стабилизированными трансгенами путем последовательного удаления 5' и 3' TIR транспозона, одностадийный процесс стабилизации трансгенов после их интеграции в геном является предпочтительным. Мы предположили, что если внести в линию мух с трансгенной конструкцией, источник I-Cre I одновременно с I-Sce I, то после индукции синтеза рестриктаз тепловым шоком вследствие одновременного характера внесения разрывов *in vivo*, мы получим набор потомков с разными вариантами репарации двуцепочечных разрывов. Среди них должны быть мухи с трансгеном только без 5' TIR, без 3' TIR и, возможно, без обоих TIRs. Для проверки этой гипотезы была создана линия $y^+w^+I Cre I; CyO; I Sce I/I Sce I$, которая одновременно несла гены I-Cre I и I-Sce I. После введения генов I-Cre I и I-Sce I в линию phiC31TS51D и индукции синтеза рестриктаз, мы

проанализировали всех потомков-самцов, несущих трансген. Было выделено три фенотипических класса мух: 1% W-R+G+; 16% W+R-G+ и 83% W+R+G+ (рис. 6). Первые два класса несли трансген либо без 5'TIR, либо без 3'TIR соответственно. Последним, самым многочисленным был класс, где не произошло удаление ни одного из TIR и прилегающих

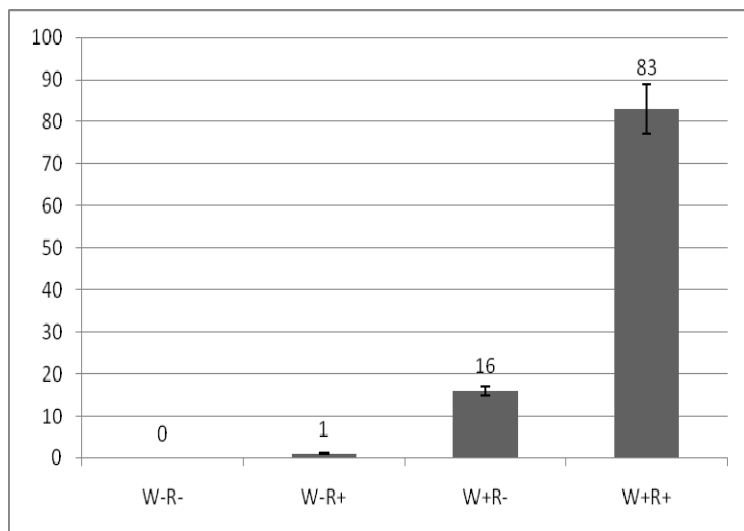


Рис. 6. Фенотипический анализ потомков трансгенной линии ϕ iC31TS51D после одновременного введения рестриктаз I-CreI и I-SceI, где W-фенотип *white*, R-фенотип RFP. Все трансгенные мухи имеют фенотип G+ $p < 0,05$

последовательностей. Вероятно, незначительная эффективность вырезания и отсутствие потомков с трансгеном без обоих TIR были вызваны мягкими условиями теплового шока (на первый день после откладки яиц, 1 час, 36°C). Различия в числе между мухами W-R+G+ и W+R-G+, весьма вероятно, были связаны с разной длиной спейсерной последовательности, содержащей маркерные гены, гибридный рекомбинационный сайт attB/P и TIR транспозона. Длина 3' спейсера

(удален в линии W-R+G+) составляет 4986 п.н., 5' спейсер (удален в линии W+R-G+) в два раза короче – 2444 п.н. Эти данные хорошо согласуются с исследованиями зависимости эффективности репарации двуцепочечных разрывов по SSA-механизму от длины спейсера, известными из литературы. Мы предположили, что отсутствие делеции GFP связано с разновременным характером внесения разрывов, и высокой скоростью репарации возникающих одиночных разрывов.

Полученные нами данные свидетельствовали о том, что при жестком тепловом шоке I-Sce I выход трансгенов без спейсера и TIR транспозона значительно выше, чем при мягком тепловом шоке (39% и 5,8%, соответственно). Отсутствие трансгенов без *EGFP* в случае с одновременной активацией I-Sce I и I-Cre I говорили о том, что мы можем заменить I-Cre I на еще один сайт I-Sce I.

Это позволило бы гиперэкспрессировать рестриктазу и увеличить эффективность работы метода.

Для проверки этого предположения мы сконструировали векторную генетическую конструкцию ϕ iC31TS51D2xSce. Вектор был построен по той же схеме, что и ϕ iC31TS51D, но вместо сайта I-Cre I в нем был расположен сайт I-Sce I. Дальнейшая работа с выбранной

линией ϕ C31TS51D2xSce проводилась аналогично ϕ C31TS51D (рис. 4, А, D). Было отобрано 17 трансформантов, ПЦР-анализ с последующим секвенированием показали, что встройка произошла в выбранный локус генома (интеграционная платформа ZH51D). Для изучения влияния степени теплового шока на выход мух со стабилизированными трансгенами потомство ϕ C31TS51D2xSce, уже содержащее ген I-SceI после скрещивания с линией $y^1w^{1118}; CyO/I\phi; ISceI/ISceI$, было разделено на три равные группы. Первая группа подвергалась жесткому тепловому шоку первые два дня после откладки яиц в течение двух часов при 37°C, вторая группа – только один день после откладки яиц, 1 час, 37°C (средний тепловой шок), третью группу подвергали действию мягкого теплового шока – один день, 1 час, 36°C. Как мы и предполагали, увеличение интенсивности теплового воздействия, значительно увеличивало эффективность работы метода. В первой группе, подвергавшейся наиболее мощному тепловому шоку, мы выявили 4 фенотипические группы 25% W+R-G+(делетирован 3'TIR со спейсером, содержащим RFP), 13% W-R+G+(делетирован 5'TIR спейсером, содержащим white), 7% W-R-G+ (удалены оба спейсера и TIR) и 55% W+R+G+ - мухи, где не найдено делеции спейсеров. Таким образом, суммарно 45% мух несли стабилизированный трансген, причем 7% содержали трансген, интегрированный непосредственно в геномный контекст без TIR транспозона, маркеров. С уменьшением

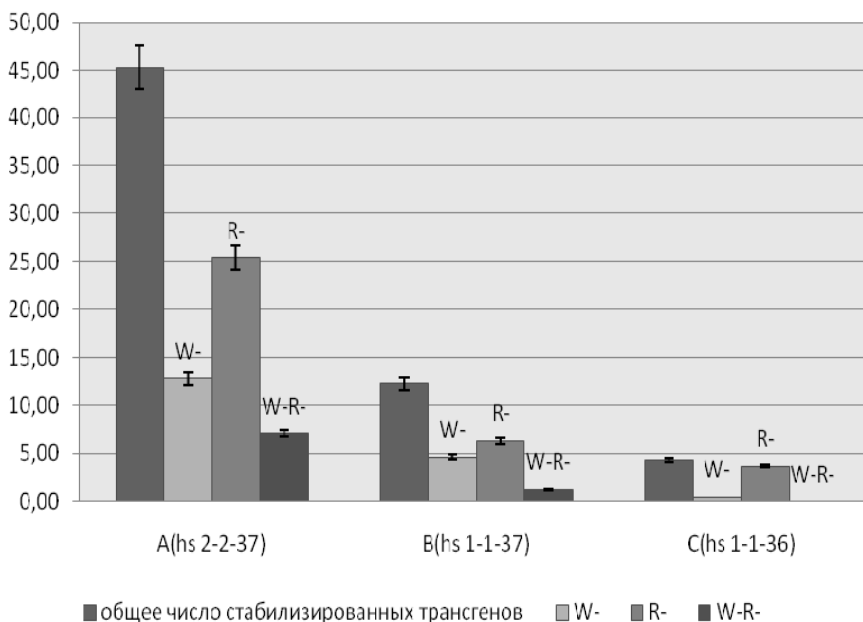


Рис.7. Доля выявленных фенотипических групп трансгенных мух линии ϕ C31TS51D2xSce при разных условиях теплового шока. А 2дня-2часа-37°, В – 1д.-1ч.-37°, С - 1д.-1ч.-36°. W-фенотип white, R-фенотип RFP. Потеря каждого из маркеров свидетельствует о делеции соответствующего плеча транспозона (см. схему эксперимента) $p < 0,05$

интенсивности теплового шока уменьшалось и количество мух со стабилизированными трансгенами. Во второй группе (средний тепловой шок) таких мух оказалось суммарно около 12,3%, причем, только 1,3% из них несли трансген без 5' и 3'TIR. В третьей группе, которая подвергалась самому мягкому тепловому шоку, мух с трансгенами без обоих TIR найдено не было, а общее количество мух со стабилизированными

трансгенами составило 4%. Причем, фенотип W-R+G+ встречался в 0,5% случаев, а W+R-G+ в 3,7% (рис.7). В условиях мягкого теплового шока активация рестриктазы была минимальна, поэтому число потомков, у которых произошла репарация разрыва по SSA механизму, было также минимально. Вероятно, это было связано не с уменьшением эффективности репарации, а с меньшим числом двуцепочечных разрывов ДНК из-за небольшой концентрации I-SceI в клетках. Кроме того два сайта I-SceI могли конкурировать друг с другом за связывание с ферментом и тоже могли снизить общее количество мух, у которых репарация разрывов произошла по SSA механизму. Помимо снижения числа насекомых со стабилизированными трансгенами при уменьшении интенсивности теплового шока, хорошо прослеживалась связь эффективности репарации двуцепочечных разрывов по SSA пути от длины спейсерной последовательности. Было установлено, что более короткий спейсер, содержащий *RFP* в качестве маркера, вырезался чаще, чем длинный спейсер с *white*.

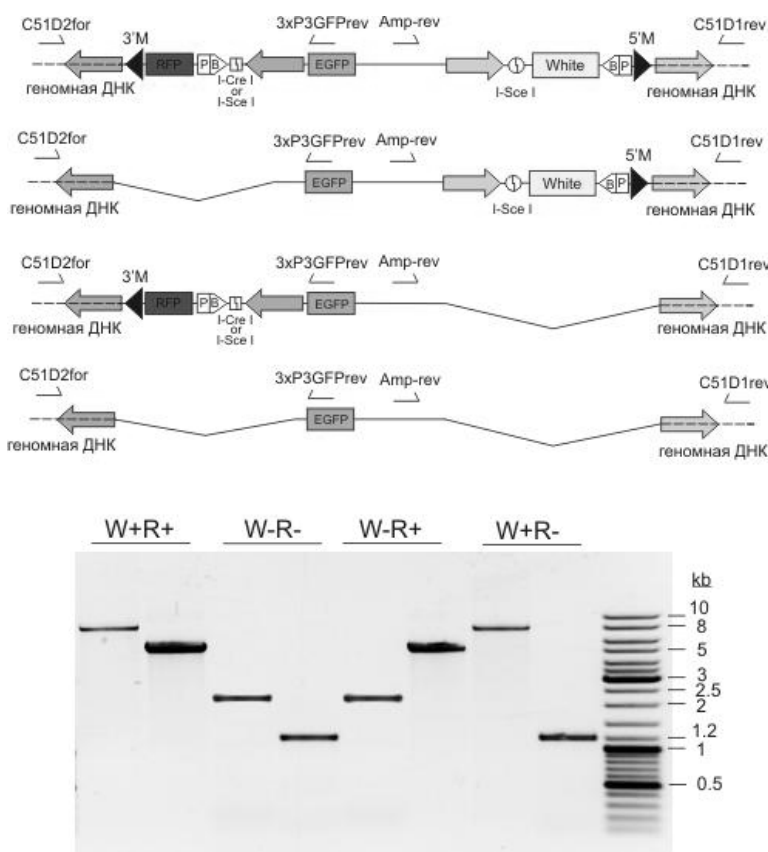


Рис.8. Схемы производных трансгенных конструкций phiC31TS51D и phiC31TS51D2xSce и ПЦР-анализ трансгенных мух после индукции мегануклеаз (I-CreI и I-SceI) и репарации образовавшихся двуцепочечных разрывов ДНК. W- фенотип *white*, R- фенотип *RFP*. Стрелками одного цвета отмечены участки гомологии, тонкими стрелками указаны использовавшиеся праймеры.

На рисунке 8 приведена схема проверки фенотипических групп трансгенных мух и электрофоретический анализ полученных ПЦР-продуктов.

На рисунке изображены все полученные фенотипы трансгенных мух после индукции мегануклеаз (I-CreI и I-SceI) и репарации образовавшихся двуцепочечных разрывов ДНК.

Общая схема экспериментов как для конструкции phiC31TS51D, так и для

phiC31TS51D2xSce приведена на рисунке 4. Из схемы видно, что существует две

возможности стабилизировать трансген после его интеграции в геном реципиента. Это последовательное внесение двуцепочечных разрывов вблизи 3' и 5' последовательностей транспозона с помощью разных мегануклеаз (рис.4 А,В,С) и одновременное внесение разрыва с помощью одной мегануклеазы (на рис. 4 А,Д).

Второй способ является более предпочтительным, так как стабилизировать трансген можно за один шаг без потери эффективности всего метода.

ВЫВОДЫ

1. Создан новый метод стабилизации трансгенов после их сайт-неспецифической интеграции в геном, основанный на удалении функциональной части плеч транспозона за счет NHEJ репарации индуцированных двуцепочечных разрывов ДНК
2. Впервые показано, что размер делеций, возникающих в результате репарации двуцепочечных разрывов ДНК по NHEJ механизму, может достигать в среднем 1000-2000 п.н. Выявлено, что делеции могут носить двунаправленный характер от точки двуцепочечного разрыва ДНК
3. Создан новый метод стабилизации трансгенов после их сайт-специфической интеграции в геном, основанный на удалении всех последовательностей транспозона за счет SSA репарации индуцированных двуцепочечных разрывов ДНК, который позволяет эффективно одновременно удалять все плечи неавтономного транспозона и маркеры

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

Ткачук А. П., Ким М. В., Савицкий М. Ю. 2010. Использование индуцированных двуцепочечных разрывов для стабилизации трансгенов в геноме // Доклады Академии Наук, том 434, №5, с.697-699

Тезисы докладов на конференциях:

Ткачук А. П., Савицкий М. Ю. Разработка технологии стабилизации трансгенов после их интеграции в геном // *Перспективы развития инноваций в биологии*, 5-7 ноября 2008

Ткачук А. П., Савицкий М. Ю. Метод стабилизации трансгена после его интеграции в геном // *Биология – наука XXI века: 12-я международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых*, 10-14 ноября 2008

Ткачук А. П., Савицкий М. Ю. Использование SSA репарации для постинтеграционной стабилизации трансгенов // *Биология – наука XXI века: 14-я международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых*, 19-23 апреля 2010

Ткачук А. П. Разработка векторных систем для сайт-специфической интеграции и стабилизации трансгенов // *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2010»*, 12-15 апреля 2010