

ТРАНСФОРМАЦИЯ У ДРОЗОФИЛЫ – НОВЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОД В ГЕНЕТИКЕ

И. Ф. ЖИМУЛЕВ

Новосибирский государственный университет

TRANSFORMATION IN DROSOPHILA: THE NEW EXPERIMENTAL APPROACH IN GENETICS

I. F. ZHIMULEV

A description of the method of genetic transformation which is new and very useful approach for genetic analysis in eukaryotes is given. The insertion of transposons containing additional genes in recipient cells results in the correction of hereditary mistakes or acquisitions of new features and functions by the organism.

Статья посвящена описанию метода генетической трансформации – нового и исключительно успешного подхода в генетическом анализе эукариот. Инсерции транспозонов, содержащих дополнительные гены, в реципиентные клетки приводят к коррекции наследственных ошибок или приобретению организмом новых черт и функций.

www.issep.rssi.ru

Трансформацией в генетике называют перенос генов из одного организма в другой. Это явление было открыто в 1928 году Ф. Гриффитсом при изучении бактерий. Исследование молекулярных механизмов трансформации привело О.Т. Эйвери, К.М. Маклеода и М. Маккарти в 1944 году к важнейшему выводу о том, что носителем информации о наследственности в клетке является именно ДНК, а не белок, как полагали до этого. ДНК, передаваемая в бактериальную клетку, в природе получается в результате гибели и разложения других клеток, в то время как в эксперименте объектом переноса становится специально выделенная и приоттовленная ДНК.

У эукариот трансформация в природе до сих пор не обнаружена. Что же касается экспериментальной передачи ДНК из одной клетки в другую, то на протяжении многих лет опыты не приводили к положительным результатам. В конце 1970-х – начале 1980-х годов многие исследовательские группы азартно конкурировали друг с другом, пытаясь первыми осуществить перенос ДНК. Успехи были весьма редкими: молекулы ДНК, инъецированные микрохирургически в ранние эмбрионы некоторых видов млекопитающих, амфибий, морских ежей, иногда встраивались в хромосомы клетки-хозяина. У дрозофилы искусственно введенная ДНК почти не включалась в хромосомы эмбриона, хотя в культуре клеток типичная трансформация происходит довольно часто. Однако очевидно, что из такой клетки невозможно получить организм и трансформированная ДНК не может передаваться потомству.

В конце концов в 1982 году повезло двум американским исследователям Дж. Рубину и А. Спрадлингу. Для осуществления переноса ДНК они использовали в качестве транспортного средства (вектора) мобильный генетический элемент, так называемый Р-элемент (рис. 1). Мобильные элементы генома – это небольшие фрагменты ДНК длиной 1–7 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.), которые существуют в клеточном ядре, размножаясь вместе с хромосомами клетки хозяина. Они способны

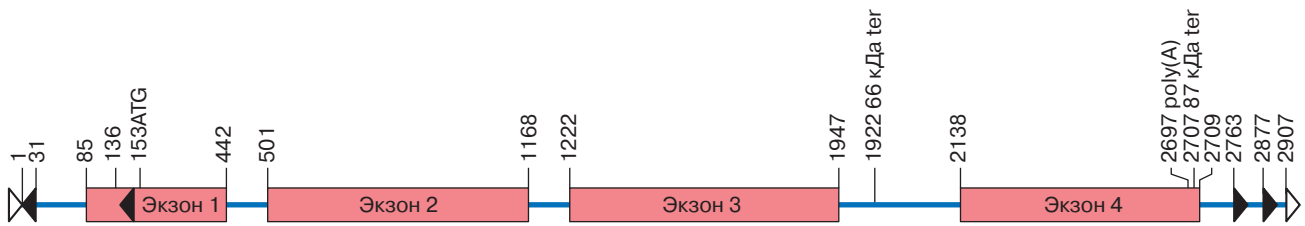


Рис. 1. Молекулярная организация мобильного генетического Р-элемента. Показаны четыре экзона. Черными стрелками показаны концевые повторы, цифрами (с 1 до 2907) обозначены номера нуклеотидов (по [1, с. 988])

перемещаться по геному, то есть могут встроиться в ДНК одного района хромосомы, затем покинуть этот участок и встроиться в другой. Вся структура Р-элемента организована так, чтобы обеспечить его перемещение. Р-элемент имеет длину около 3 т.п.н. и фактически весь представлен одним геном, состоящим из четырех экзонов (см. рис. 1). Этот ген кодирует транскрипт размером 2,7 т.п.н., с которого транслируется белок с молекулярным весом 87 кДа. Этот белок называется транспозазой, он обеспечивает перемещения (транспозиции) Р-элемента в пределах ДНК генома клетки хозяина. Для осуществления транспозиции у Р-элемента существуют специально устроенные структуры – концевые повторы – по 150 п.н. определенной последовательности на каждом конце элемента, совершенно необходимые для перемещений. Именно с этими участками связывается транспозаза и катализирует процесс встраивания–вырезания Р-элемента. Таким образом, для нормального перемещения Р-элемента нужно, чтобы были выполнены два условия: 1) наличие у него неповрежденных концевых повторов и 2) нормальная активность транспозазы. Если будет нарушен какой-либо из экзонов гена транспозазы или во время транскрипции и созревания матричной РНК транспозазы не будет удален один из интронов, полноценного фермента транспозазы не получится и Р-элемент не будет перемещаться. Однако недостаток транспозазы из одного Р-элемента может быть легко компенсирован, если в геноме присутствует еще один Р-элемент (нормальный), который и обеспечит наличие транспозазы.

Учитывая все перечисленное выше, эксперимент по трансформации у дрозофилы схематически выглядит следующим образом: готовят ДНК двух Р-элементов, один из которых может синтезировать транспозазу, но не способен встраиваться в геном, так как у него поврежден один из концевых (с 3'-конца) повторов – рп25,7wc (рис. 2), в то время как во втором Р-элементе удалена значительная часть гена транспозазы, но он может перемещаться по геному, поскольку имеет нормальные концевые повторы – это P[(ry⁺)A] на рис. 2.

В Р-элемент P[(ry⁺)A], являющийся вектором и имеющий дефективный ген транспозазы, обычно встраивают дополнительный фрагмент ДНК длиной до 20 т.п.н., который хотят трансформировать в геном дрозофилы. Р-элемент P[(ry⁺)A] называют транспозоном, а рп25,7wc – элементом-хелпером, или помощником. Затем смесь этих двух сортов ДНК инъецируют в яйцо дрозофилы. Там некоторая ее часть встраивается в ДНК полярных клеток, из которых позднее образуются клетки зародышевого пути. Таким образом, чужеродная ДНК, инъецированная в эмбрион на ранних стадиях развития, передается следующим поколениям потомков.

Многие факторы, в том числе и размер встроенного в Р-элемент фрагмента чужеродной ДНК, влияют на успех трансформации. В среднем только около 14% инъецированных эмбрионов развиваются в плодовитое потомство. Поэтому возникает вопрос, как различить мух, у которых инъецированная ДНК встроилась в геном, и мух без встройки. В Р-элемент P[(ry⁺)A] вводят специальные маркерные гены. Это могут быть либо гены дрозофилы, контролирующие окраску глаз, например ген *rosy*, гены дрозофилы, кодирующие синтез ферментов, например алкогольдегидрогеназы, или даже ген, выделенный из генома медузы, кодирующий белок, обнаруживающий при определенных условиях зеленую флуоресценцию.

Разберем схему, в которой используется ген *rosy* (см. рис. 2). В этом случае в Р-элемент P[(ry⁺)A] введен фрагмент ДНК, содержащий нормальный аллель гена *rosy* (см. рис. 2). ДНК транспозона вместе с ДНК хелпера инъецируют в эмбрионы, гомозиготные по мутации *ry⁵⁰⁶* гена *rosy*. Если транспозон P[(ry⁺)A] встроился в геном, то в поколении G1 появятся мухи с нормальным цветом глаз, поскольку у них – гомозигот по мутации *ry⁵⁰⁶* – появится ДНК с нормальным аллелем гена *ry⁺* в транспозоне.

С какими целями используют трансформацию в экспериментальной генетике? Можно выделить несколько направлений.

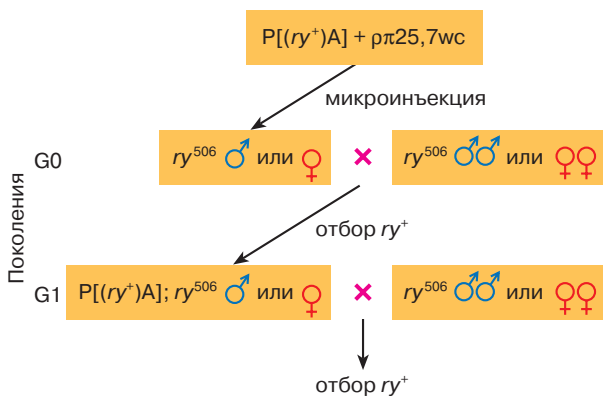


Рис. 2. Схема скрещиваний для осуществления трансформации у дрозофилы (объяснения в тексте, по [6, с. 177])

1. В процессе клонирования и выделения генов всегда остается вопрос, весь ли ген уже в руках экспериментатора, то есть полностью выделены ли его регуляторная и структурная части. Для выяснения вопроса в состав транспозона вводят фрагмент ДНК, предположительно содержащий ген, это фрагмент А в транспозоне $P[(ry^+)A]$ на рис. 2. Затем хромосому со встроенным транспозоном $P[(ry^+)A]$ путем скрещивания вводят мухам, гомозиготным по мутации испытываемого гена. Если в транспозоне присутствуют все части гена А, необходимые для его функционирования, то такая особь будет иметь нормальный фенотип, поскольку мутантное действие гена А полностью перекрывается нормальным аллелем A^+ , расположенным в транспозоне.

Нетрудно заметить, что, хотя эти работы и выполнены на дрозофиле, по сути речь идет об исправлении генетических дефектов посредством вмешательства человека. Если учесть, что трансформация у дрозофилы за последние 16 лет применялась тысячи раз, становится очевидным, что по крайней мере на этом модельном объекте проблема исправления генетических дефектов уже в наше время эффективно решается достаточно рутинными методами.

2. Другая цель использования трансформации заключается в исследовании структуры самого гена. Сейчас известно, что каждый ген у эукариот состоит из регуляторной и кодирующей частей (см. С. 17–24). В свою очередь, в регуляторной части выделяют промоторную и энхансерные зоны. Если промоторная зона в той или иной степени точно определена и занимает около 100 п.н. выше точки начала транскрипции, то размеры энхансерной зоны сильно варьируют. Функции энхансерной зоны заключаются в поддержании готовности данного гена к началу транскрипции (см. С. 17–24). Как было установлено, если отделить энхан-

серную зону от кодирующей и на место последней присоединить кодирующую зону другого гена, то, как правило, с гена будет считываться РНК только в тех типах клеток, в которых активна энхансерная зона. Одним из подходов к изучению организации регуляторной части гена является методика репортерных генов, разработанная в лаборатории выдающегося швейцарского ученого В. Геринга в 1985 году. Впервые этот метод был применен на гене *fushi tarazu* (*ftz*) и состоит в следующем: авторы имели фрагмент ДНК, в котором располагалась кодирующая часть гена *ftz*. Более того, выше 5'-конца кодирующей части гена был расположен еще один отрезок ДНК длиной 6,1 т.п.н., содержащий всю регуляторную часть гена. Если трансформировать мутантов *ftz* транспозоном, содержащим весь фрагмент ДНК, у потомков формируется нормальный фенотип. Это значит, что и регуляторная и структурная части гена функционируют нормально. После этого авторы удалили кодирующую часть *ftz*, присоединили на ее место кодирующую часть гена *lacZ*, выделенного из бактерии *Escherichia coli*, и трансформировали этим транспозоном эмбрионы дрозофилы. Следует отметить, что ген *lacZ* кодирует фермент β -галактозидазу, расщепляющую β -галактозиды. В условиях эксперимента можно подобрать особый галактозид, например вещество, называемое X-gal, в результате расщепления которого образуются соли, имеющие синюю окраску и нерастворимые в воде. Теперь если искусственно созданный ген, состоящий из регуляторной части *ftz* и гена *lacZ*, проработает, а затем органы мухи проинкубировать с X-gal, то клетки, в которых такой ген был активен, окрасятся в синий цвет – цвет водонерастворимого продукта расщепления X-gal. В данном случае ген *lacZ* ведет себя как репортер, сообщающий о работе регуляторной части гена *ftz*. Оказалось, что у трансформантов, содержащих в геноме транспозон, ген *ftz/lacZ* функционирует в тех же самых клетках, что и нормальный ген *ftz*.

Теперь можно попытаться узнать, какие именно участки регуляторной части гена более необходимы для нормального развития. С помощью особых приемов можно удалять разные части энхансерного фрагмента, объединять их с *lacZ*, трансформировать и следить за экспрессией *lacZ*. На рис. 3 показаны результаты такого эксперимента с геном *hunchback*.

В нормальном развитии белковый продукт гена *hunchback*⁺ распределяется в передней части эмбриона (верхний ряд на рис. 3). Используя трансформацию, установили, что регуляторная последовательность гена *hunchback* длиной 747 п.н. выше репортера *lacZ* (второй ряд) вполне достаточна для почти нормального распределения продукта *lacZ*. В последующих экспериментах удалось показать, что фрагмент длиной 263 п.н. (между +55 и +318) абсолютно необходим для экспрессии *lacZ*

(третий ряд). Если добавить только этот фрагмент, его достаточно для почти нормальной экспрессии *lacZ* (четвертый ряд). Другие варианты состава регуляторной зоны дают разные промежуточные уровни активности “репортера” (ряды 5 и 6 на рис. 3).

3. Трансформацию на дрозофиле используют для экспериментальной экспрессии генов, выделенных из других организмов, у которых еще не выделены мобильные элементы, пригодные для создания транспозонов, и разработки метода трансформации. Например, можно выделить какой-то ген из генома бабочки-шелкопряда или комара, ввести в геном дрозофилы и проанализировать экспрессию.

Созданы еще более уникальные конструкции, связанные с пересадками генов. Известно, что в геноме комара *Chironomus thummi thummi* присутствуют фракции, повторенные множество раз. Единицей этого повтора является фрагмент длиной 120 п.н., обогащенный А-Т нуклеотидами. Это так называемый *Cl*-повтор. Он рассеян по всей длине хромосом *Ch. th. thummi*, но почти полностью отсутствует у очень близкого вида *Ch. th. piger*, то есть этот повтор является варьирующей фракцией генома. Считается, что повторенные последовательности оказывают инактивирующее влияние на гены, расположенные рядом.

Для того чтобы проверить предположение об инактивирующем влиянии *Cl*-повтора, был создан транспозон, содержащий кроме маркерного гена *rosy*⁺ еще последовательность нуклеотидов, состоящую из нескольких копий повтора *Cl* из ДНК хирономуса и расположенного рядом с ним гена *white* (*w*), выделенного из генома дрозофилы. Этот транспозон был введен в эмбрионы дрозофилы, мутантные по гену *w*. Дело в том, что нормальный аллель гена *w*⁺ обеспечивает формирование красного цвета глаз у мухи, в то время как у гомозигот по мутации *w* глаза белого цвета. Если *Cl*-повтор не оказывает инактивирующего влияния на ген *w*⁺ в транспозоне, глаза у мух *w/w/Tw*⁺ будут нормаль-

ного красного цвета. Если же *Cl*-повтор инактивирует ген *w*⁺ в транспозоне во всех клетках или только в некоторых, то глаза у мух будут соответственно полностью белыми или мозаичными, то есть в некоторых клетках ген *w*⁺ сохраняет активность, в других клетках *w*⁺ инактивирован.

ПОИСКИ ГЕНОВ, АКТИВНЫХ В ОПРЕДЕЛЕННЫХ ТИПАХ КЛЕТОК

Для понимания процессов развития часто необходимо выявить максимальное число генов, функционирующих в той или иной ткани. В лаборатории В. Геринга в 1987–1989 годах был разработан метод трансформации, позволяющий выявлять гены, вовлеченные в развитие. В. Геринг и его коллеги создали транспозон, в котором ген *lacZ* помещен под контроль слабого промотора, имеющегося в Р-элементе. Если такой транспозон встраивается в окрестности энхансерного элемента какого-то гена, функционирующего у дрозофилы в ходе нормального развития (элемент Е на рис. 4, б), этот энхансер может активировать слабый промотор Р-элемента и соединенного с ним гена *lacZ* (рис. 4, а). В результате активирования гена *lacZ* и окраски внутренних органов дрозофилы реактивом X-gal можно обнаружить клетки, окрашенные в синий цвет, и, таким образом, установить, что в зоне встраивания транспозона в молекуле ДНК находится ген, активно функционирующий в данной клетке. Используя перемещения транспозона и собирая те линии, в которых *lacZ* активен, можно выявить все или существенную часть генов, активно функционирующих в той или иной дифференцированной ткани. Наличие в составе транспозона плазмиды *Bluescript* (см. рис. 4, а) дает возможность клонировать и ген, находящийся под контролем энхансера, и сам энхансер.

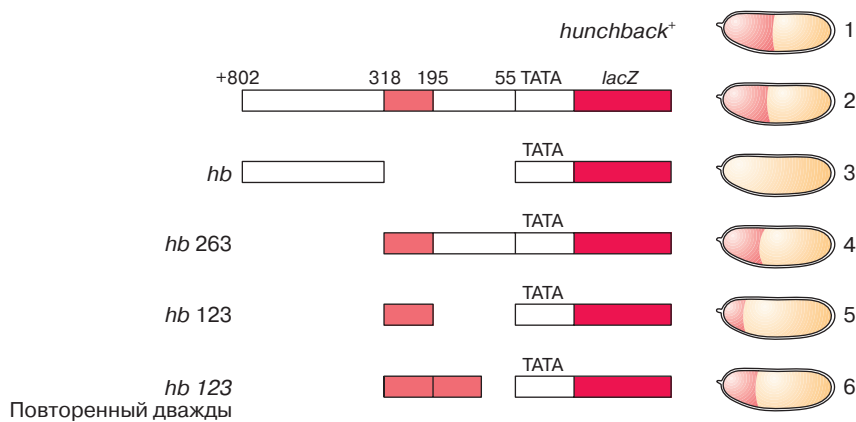


Рис. 3. Локализация регуляторной зоны гена *hunchback* с помощью гена-репортера *lacZ* (по [5, с. 53]). В первой строке красным цветом показано распределение продукта гена *hunchback*⁺ в передней части эмбриона. Строки 2–6 показывают, как изменяется распределение продукта гена *lacZ* при удалении той или иной части регуляторной зоны. Цифры +802, 318, 195, 55 обозначают порядковый номер нуклеотида, считая нулевым первый нуклеотид гена *lacZ*

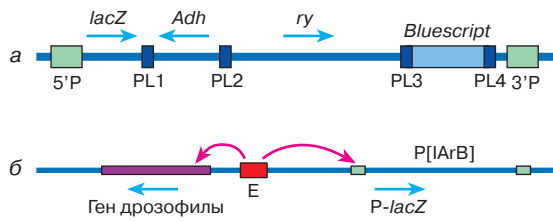


Рис. 4. Структура транспозона P-IArB и схема действия энхансера на промотор P-элемента (по [7]): а – схема транспозона P-IArB; *lacZ*, *Adh*, *ry* – гены бета-галактозидазы *E. coli*, алкогольдегидрогеназы и ксантиндегидрогеназы дрозофилы соответственно. Стрелки указывают направление транскрипции. 5'P и 3'P – концевые части P-элемента; PL1–4 – полилинкеры, содержащие множественные сайты рестрикции; *Bluescript* – плазмиды, позволяющая клонировать геномную ДНК в участке встраивания транспозона; б – воздействие энхансера (E) на природный ген в геноме дрозофилы и на встроенный чужеродный элемент P-IArB

СОЗДАНИЕ СИСТЕМ ТРАНСФОРМАЦИИ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

В некоторых случаях бывает важно активировать ген, заключенный в транспозоне, в определенное время. Для этих целей в последние 10–13 лет применяли главным образом два подхода. Первый подход – это использование промоторов от генов теплового шока. Известно, что при воздействии на организм неблагоприятных факторов внешней среды, таких, как высокая температура, в клетках активируются особые гены и развивается так называемый синдром теплового шока. Цели и объем статьи не позволяют углубиться в детали этого явления. Следует лишь отметить, что гены белков теплового шока имеют особые промоторы, реагирующие на повышение температуры. Поэтому если в транспозоне ген А соединить с промотором белка теплового шока, а затем повысить температуру содержания особей, содержащих транспозон, то гены А активируются. Второй подход заключается в использовании промоторов, активируемых в определенных тканях или на определенных стадиях развития.

В последние несколько лет появился новый метод активирования направленной экспрессии генов у дрозофилы. Суть его заключается в том, что исследователи создают две трансформированные линии мух, в одну из которых вводится так называемый *GAL4*-транспозон, а в другую – *UAS*-транспозон (рис. 5). Для создания первой линии в P-элемент наряду с обычными маркерами вводится ген, кодирующий белок *GAL4* – активатор транскрипции в геноме дрожжей. Такой транспозон встраивается в случайные районы хромосом дрозофилы, в том числе может встроиться под какой-нибудь энхансер, например под энхансер гена, работающего в

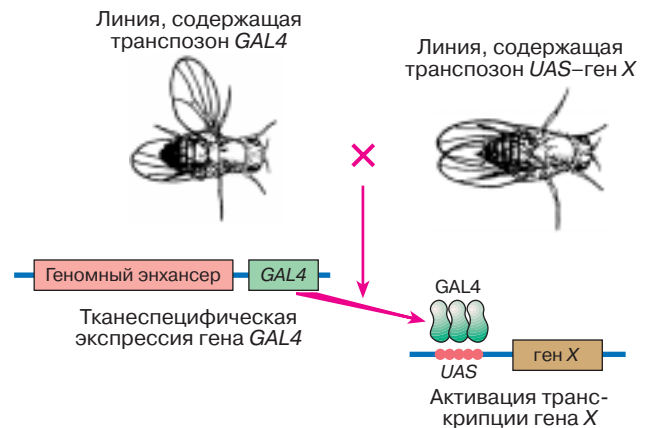


Рис. 5. Схема активирования генов в транспозонах *GAL4*-*UAS*. Ген *GAL4* встраивается под любой энхансер в геноме дрозофилы. В результате экспрессии гена *GAL4* считывается белок, который связывается с промотором *UAS*, активируя встроенный ниже ген X (по [2])

клетках формирующегося крыла или ноги. *GAL4* будет экспрессироваться в клетках крыла или ноги, однако никаких последствий для этих клеток не будет, поскольку белок *GAL4* может активировать транскрипцию другого гена лишь в том случае, если он свяжется с промотором *UAS*, в нормальном развитии функционирующем также только в геноме дрожжей. Поэтому и создают вторую линию дрозофилы, которую трансформируют транспозоном, содержащим испытуемый ген (*X* на рис. 5), сшитый с промотором *UAS*. Когда в результате скрещивания двух линий оба транспозона объединяются в генотипе потомка, ген *GAL4* начинает функционировать в тех клетках, в которых активен его энхансер (см. рис. 5). Белок *GAL4* связывается с промотором *UAS*, который и активирует ген *X*. При этом активация *X* будет совсем не в той ткани, в которой он активируется своим собственным энхансером, а в той, в которой активен энхансер гена *GAL4* (см. рис. 5). Такая экспрессия называется эктопической, то есть не на своем месте. Рассмотрим один из наиболее интересных примеров, связанный с использованием *GAL4*-*UAS* транспозонов.

В лаборатории В. Геринга заинтересовались развитием глаз у дрозофилы и некоторых других животных. Мутации некоторых генов приводят к полному отсутствию глаз, например *eyeless* у дрозофилы. В результате сопоставления молекулярной организации гена *Aniridia* у человека, гена *Small eye* у мыши и *eyeless* у дрозофилы было найдено значительное их сходство. Это тем более удивительно потому, что анатомически глаза у мухи и млекопитающих имеют очень мало черт сходства: всем известный из учебников по анатомии глаз

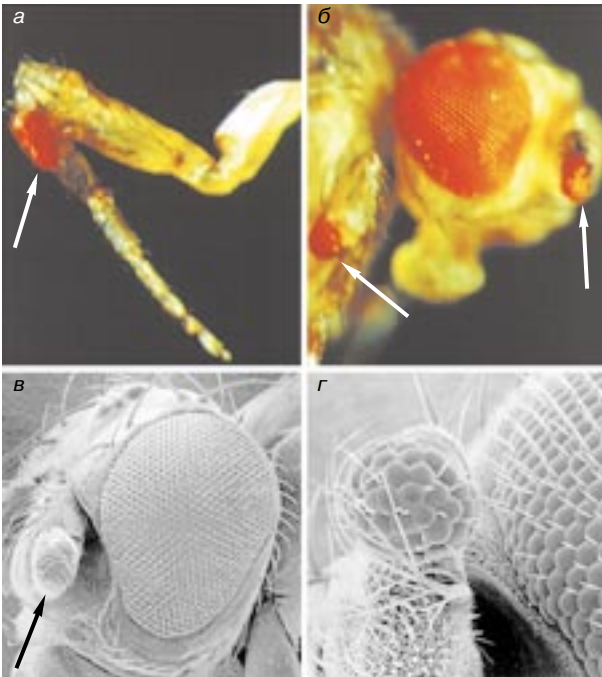


Рис. 6. Формирование глаз в обычных участках головы и маленьких эктопических глаз на ногах, под крыльями и на антеннах у трансформированных дрозофил: эктопический глаз на ноге (а), под крылом и на антенне (б); дрозофилы трансформированы транспозонами, содержащими ген дрозофилы *eyeless*⁺; в, г – развитие нормального и эктопического глаза на антенне (г – большое увеличение); мухи трансформированы транспозонами, содержащими ген *Small eye*, выделенный из мыши. а, б – по [4], в, г – по [3]

человека и сложный глаз, состоящий из 800 отдельных глазков (фасеток), собранных в один общий орган зрения, у дрозофилы. Оказалось возможным получить дрозофил – гомозигот по мутации *eyeless*, которым ввели транспозоны *UAS* и *GAL4*; при этом *GAL4* находится под контролем энхансера, функционирующего в клетках развивающихся ног, крыльев и органов головного комплекса. В транспозон *UAS* на место гена *X* встроена ДНК нормального аллеля гена *eyeless*⁺. В результате функционирования гена *eyeless* появляются нормально функционирующие глаза, а также маленькие глаза в разных участках крыльев, ног, на голове – там, где был активен энхансер (рис. 6).

Затем был проведен другой эксперимент: на место гена *X* в транспозон *UAS* встроили ДНК гена *Small eye*, выделенную из генома мыши. И опять начали формироваться сложные глаза, характерные для дрозофилы, в разных участках тела мухи (см. рис. 6). Как же могло

получиться, что действие гена, контролирующего развитие одного типа глаза у мыши, привело к развитию глаза совершенно другого типа у дрозофилы? Согласно существующим расчетам, в процессах формирования глаз у животных принимает участие около 2500 генов, действующих каскадно. Оказалось, что все три гена – *Small eyes*, *Aniridia* и *eyeless* – находятся в начале каскада, то есть они только дают команду на начало развития глаза, а остальные гены, функционирующие после них, уже определяют, какой глаз будет сформирован.

Рассмотренные примеры показывают, что метод трансформации дает огромные возможности изучать строение гена, сложные системы генных взаимодействий в развитии. Этот метод, разработанный на дрозофиле, можно использовать фактически для анализа любого гена из любого живого организма. Кроме того, с помощью транспозонов можно исправлять любые генные нарушения. Мечта о генных манипуляциях с живыми организмами, как мы видим, уже сбывается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ashburner M. *Drosophila: A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1331 p.
2. Brand A.H., Perimon N. Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes // *Development*. 1993. Vol. 118. P. 401–415.
3. Gehring W.J. The Master Control Gene for Morphogenesis and Evolution of the Eye // *Genes to Cells*. 1993. Vol. 1. P. 11–15.
4. Halder G., Callaerts P., Gehring W.J. New Perspectives on Eye Evolution // *Curr. Opin. Gen. and Develop.* 1995. Vol. 5. P. 602–609.
5. Lawrence P.A. *The Making of Fly*. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1992. 228 p.
6. Spradling A.C. P-element Mediated Transformation // *Drosophila: A Practical Approach* / Ed. by D.B. Roberts. Oxford; Wash.: IPL Press, 1986. P. 175–197.
7. Wilson C., Pearson R.K., Bellen H.J. et al. P-element-mediated Enhancer Detection: An Efficient Method for Isolating and Characterizing Developmentally Regulated Genes in *Drosophila* // *Genes and Develop.* 1989. Vol. 3. P. 1301–1313.

Рецензент статьи Л.И. Корочкин

* * *

Игорь Федорович Жимулев, доктор биологических наук, профессор кафедры цитологии и генетики Новосибирского государственного университета, зав. лабораторией молекулярной цитогенетики Института цитологии и генетики СО РАН, действительный член Европейской академии наук, член-корреспондент РАН и РАЕН. Автор более 200 научных публикаций, в том числе пяти монографий по проблемам организации хромосом.