

УДК: 615.33:577.182.

Б. ОСТАШ

Львівський національний університет імені Івана Франка  
boast0@yahoo.com

## САЙТ-СПЕЦИФІЧНІ РЕКОМБІНАЗИ У ГЕНЕТИЧНІЙ ІНЖЕНЕРІЇ: НОВІТНІ ТЕХНОЛОГІЇ *IN VIVO*



Зроблено огляд сучасних досягнень у галузі дослідження сайт-специфічних рекомбіназ (ССР) та їхнього практичного використання для маніпуляцій геномами про- та еукаріотів. Розглянуто принципи функціонування ССР та основні типи каталізованих ними генетичних перебудов. Приклади, наведені у цьому огляді, демонструють потенціал ССР для розв'язання широкого кола фундаментальних та практичних проблем, вирішення яких іншими методами було б набагато складнішим або й неможливим. Застосування ССР для ширшого кола біологічних систем, створення ССР, експресія яких суворо контролюється у часі і просторі, та пошук рекомбіназ із новою субстратною специфічністю є основними напрямками подальшого розвитку технології сайт-специфічної рекомбінації.

© Б. ОСТАШ, 2010

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2010. № 4

### Вступ

Маніпуляції ДНК *in vitro* з використанням ендонуклеаз рестрикції, полімераз та ДНК-лігаз були основою генетичної інженерії ХХ століття [1]. Стрімкий розвиток технології секвенування ДНК [2] призвів до накопичення величезного масиву даних про первинну структуру цілих геномів, зокрема і кількох людських [3–5].

На момент написання цього огляду у базі даних GenBank зареєстровано 5229 геномів (з них третина – еукаріотичні), приблизно стільки ж геномів є у процесі секвенування (див. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes>). Поступ структурної геноміки призвів до появи бібліотек геномів на основі космід, бактеріальних та дріжджових штучних хромосом, що містять надзвичайно великі фрагменти ДНК (до 300 тис. п.н.). Разом з тим з'явилась і потреба в інженерії цих гігантських молекул ДНК, а також цілих хромосом бактерій, рослин та тварин.

Нові завдання дуже складно, а інколи й неможливо вирішити за допомогою традиційних методів генетичної інженерії *in vitro* з двох причин. По-перше, ці методи є ефективними для маніпуляцій відносно невеликими молекулами ДНК (плазмиди). По-друге, значно зросла потреба у багаторазових модифікаціях тієї ж молекули ДНК (косміди, хромосоми тощо). Тому «засмічення», наприклад, досліджуваної хромосоми залишками векторних молекул ДНК (що використовувались для експресії чи мутагенезу) є небажаним, а деколи й неприпустимим, і ускладнює подальші маніпуляції цією хромосомою.

Обмеження, які притаманні традиційним методам генетичної інженерії, стимулювали розробку нових, точніших і ефективніших підходів, що практично не залежать від маніпуляцій *in vitro*, і засновані на природних процесах сайт-специфічної рекомбінації *in vivo*. Розроблені методи дозволяють маніпулювати молекулами ДНК будь-якого розміру та вносити зміни різноманітного характеру в їхню структуру.

Цей огляд присвячено прикладним аспектам біології сайт-специфічних рекомбіназ (ССР), що відносно недавно (10–15 років) стали популярним, а деколи і незамінним знаряддям функціональних досліджень геномів про- та еукаріотів.

### Сайт-специфічні рекомбінази Cre та Flp – походження та принципи функціонування

Білок Cre (343 амінокислотних залишки (ак); *cyclization-recombination protein*) кодується геном *cre*, який виявили у геномі фага P1. Cre належить до сайт-специфічних рекомбіназ родини Int (надродина  $\lambda$ -інтеграз), які здійснюють сайт-специфічну рекомбінацію ДНК за єдиним механізмом, що включає гідроліз ланцюгів ДНК із використанням залишку тирозину в активному центрі білка, їхній обмін та лігування [6]. Білок Cre розпізнає специфічну послідовність завдовжки 34 п.н., яка отримала назву *loxP* (*locus of crossingover* (X) in P1). Cre та *loxP* у життєвому циклі фага P1 забезпечують циклізацію лінійної фагової ДНК у перші хвилини інфекції кишкової палички [1]. Сайт *loxP* містить дві паліндромні послідовності розміром 13 п.н. (інвертовані повтори), які розділені асиметричною ділянкою розміром 8 п.н. (кор, або спейсер; рис. 1).

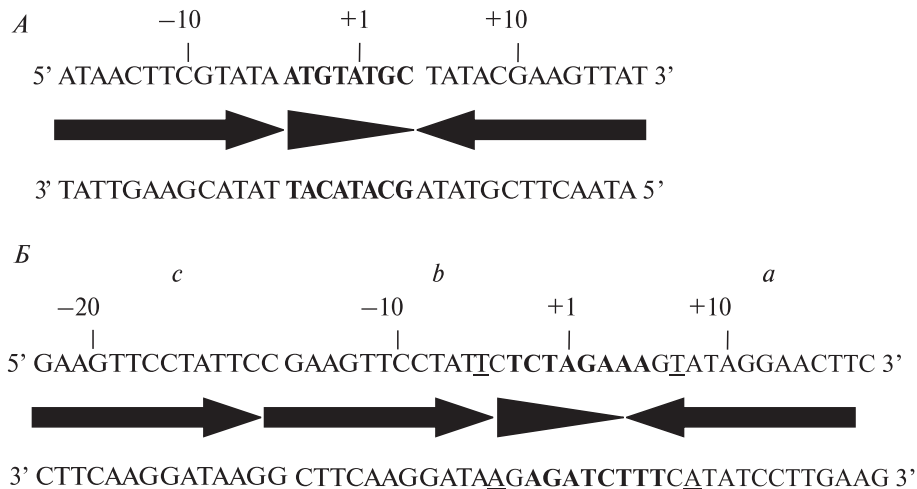
За наявності двох ділянок *loxP* мономери білка Cre зв'язуються з інвертованими повторами і стимулюють формування синаптичного комплексу та рекомбінацію між двома *loxP* (рис. 2). Розрив ДНК, обмін ланцюгів та їхнє лігування відбуваються у межах спейсерів. Оскільки спейсери асиметричні, то обмін нитками ДНК можливий тільки тоді, коли два *loxP* з'єднані синапсом у одній орієнтації. Тому орієнтація двох ділянок *loxP* визначає результат рекомбінації.

Так, рекомбінація між *loxP* у тій самій орієнтації призведе до вирізання (делеції) ДНК між *loxP*-сайтами, а рекомбінація між двома інвертованими ділянками *loxP* – до інверсії ДНК. Крім того, Cre може інтегрувати кільцеву молекулу ДНК у лінійну ДНК, якщо кожна з них містить *loxP*, або зумовлювати обмін ділянками ДНК на двох лінійних *loxP*-вмісних молекулах, наприклад негомологічних хромосомах (рис. 2). Висока точність Cre-залежної рекомбінації, її незалежність від додаткових білків чи кофакторів та активність у різних біологічних системах (прокаріоти, рослини, комахи, лінії клітин ссавців) зумовлюють цінність Cre-*loxP* в експериментах з маніпуляцій ДНК *in vivo*, які будуть розглянуті докладніше далі.

Ген, що кодує іншу ССР – Flp, та ділянка FRT (*Flp recombination target*), яку Flp розпізнає, були виявлені у складі 2 мкм плазмиди у *Saccharomyces cerevisiae*. Ця плазида складається з малого та великого районів, які розділені двома інвертованими повторами розміром 599 п.н. [7]. В межах цих повторів знаходяться ділянки FRT. Білок Flp (423 ак) забезпечує рекомбінацію між двома FRT, що зумовлює перетворення 2 мкм плазмиди з А-ізоформи у В-ізоформу і навпаки. Розмір FRT – 48 п.н. Він складається з трьох паліндромів (кожен 13 п.н. завдовжки, позначених як *a*, *b*, *c*) та центральної ділянки (спейсера) розміром 8 п.н., що містить сайт для EP XbaI (рис. 1). Елементи *c* і *b* ідентичні та розташовані однокерунково, тоді як елементи *a* та *b* є, фактично, інвертованими повторами, які розділені спейсером. Елемент *c* не є необхідним для активності Flp, тому мінімальний біологічно активний сайт FRT, як і *loxP*, складається з 34 п.н. – двох інвертованих повторів (*a* і *b*, 13 п.н. кожен) та спейсера (8 п.н.). Механізми каталізу та типи рекомбінаційних реакцій є ідентичними для Flp та Cre (рис. 2).

### Застосування ССР для індукування делецій ДНК

Типовим генно-інженерним експериментом є конструювання організмів, що містять «нокаут» певного гена X – інсерцію у його послідовність маркерного гена Y (наприклад дермінанта стійкості до антибіотика тощо), що порушує функціонування X. Очевидно, що кожен маркерний ген можна використати лише один раз для модифікації певного організму, і це значно обмежує кількість змін, які можна ввести у досліджуваний геном. Використання ССР дозволяє отримувати немарковані мутації, як зображено на рис. 3. Для цього застосовують маркерні гени, фланковані сайтами FRT чи *loxP* у прямій орієнтації. У мутанті після отримання очікуваної мутації в хромосомі, експресують Flp чи Cre, що зумовлює вирізання маркерного гена. По завершенні рекомбінаційної реакції у хромосомі залишається одна із ділянок FRT чи *loxP* – так звана «шрамова послідовність» (*scar sequence*), розмір якої залежить від типу використаної плазмиди,



**Рис. 1.** Структура сайтів, що розпізнаються рекомбіназами: *A* – сайт *loxP*; *B* – сайт FRT. Нуклеотиди пронумеровані з центра сайта. Інвертовані повтори у *loxP* є ідентичними, а елементи *b* і *a* у FRT відрізняються 1 п.н. (підкреслено)

однак зазвичай не перевищує 90 п.н. Показано, що ця послідовність переважно не спричинює полярних ефектів на експресію сусідніх генів. На сьогодні ССР успішно використали для отримання комерційно важливих генетично модифікованих рослин, що виявляють підвищену соле- та посухостійкість [8–10]. Очевидно, що ССР можна використати для отримання умовно-летальних мутацій, на кшталт *ts*-мутацій у генах фага  $\lambda$  [1]. Однак у випадку ССР-залежних делецій умовним фактором є індукція гена рекомбінази, що контролює вирізання чи інверсію певного життєво важливого гена. Зараз створено низку ліній мишей, що є умовно-летальними мутантами за певними генами [11]; до появи ССР не існувало технологічної бази для конструювання таких організмів.

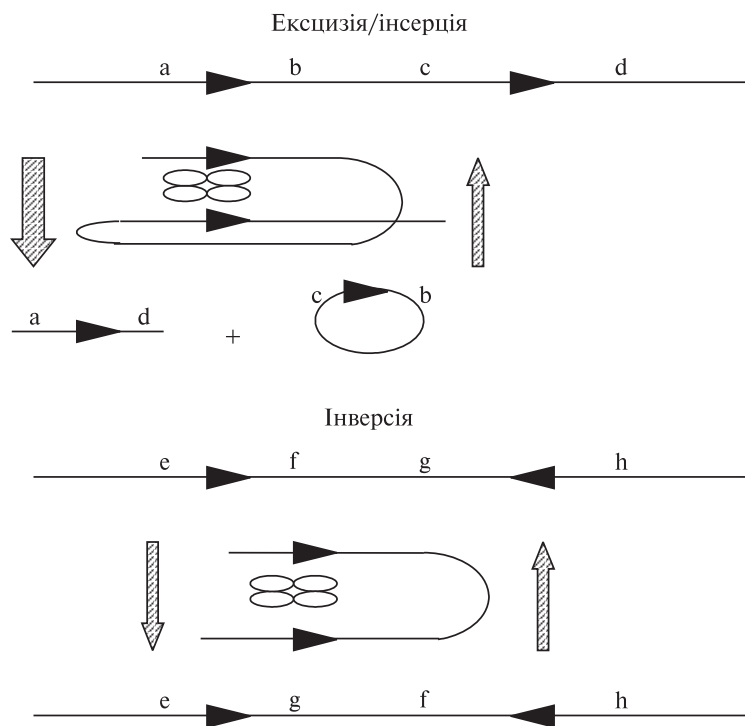
Хоча одну і ту ж маркерну касету, фланковану ділянками FRT/*loxP*, можна використати для конструювання багатьох мутацій в одній хромосомі, присутність багатьох сайтів FRT/*loxP* може мати небажані побічні ефекти, такі як інверсії та делеції між цими ділянками. Наприклад, в *Pseudomonas aeruginosa* Flp-залежна рекомбінація між двома мутантними локусами спричинила інверсію ділянки геному розміром 1,59 млн п.н. [12]. Однак такі події є рідкісними, і нині описано випадки отримання п'яти немаркованих делецій в одній хромосомі без небажаних наслідків. Ключовим моментом у конструюванні мутанта є повна елімінація

плазмиди, що кодує ССР, зразу ж після отримання запланованої рекомбінаційної події. Слід зазначити, що частота рекомбінаційних подій залежить від багатьох факторів, зокрема активності ССР та відстані між сайтами рекомбінації. Так, із збільшенням відстані між FRT/*loxP* зменшується частота рекомбінації. На сьогодні продемонстровано можливість делеції фрагментів ДНК розміром до 100 тис. п.н. [13].

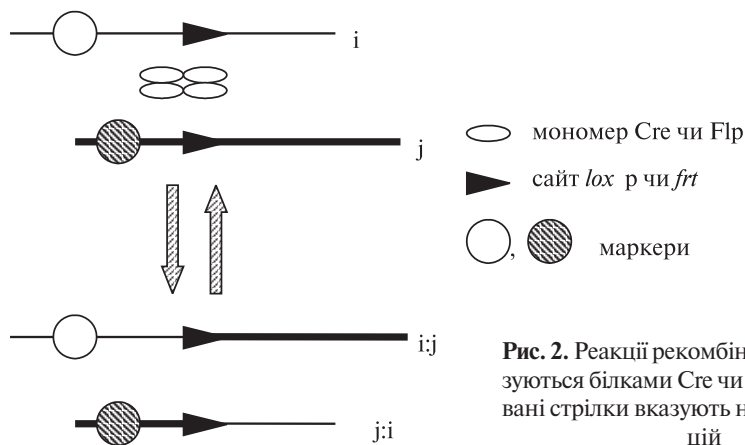
#### Застосування ССР для інтеграції та інверсії ДНК

Оскільки ССР каталізують рекомбінацію між ділянками FRT/*loxP* навіть коли вони знаходяться на різних репліконах, то їх можна використати не тільки для ексцизії ДНК, але й у зворотному напрямі, як зображено на рис. 2. У такий спосіб можна ввести чужорідну ДНК у геном. Першим кроком у цьому підході є введення однієї ділянки FRT/*loxP* у досліджуваний геном. Для цього використовують транспозонний мутагенез або спрямовану інсерцію за допомогою гомологічної рекомбінації; у випадку деяких ентеробактерій можна також скористатись  $\lambda$ RED-залежною рекомбінацією [14, 15].

В той час як реакція вирізання ДНК між двома сайтами FRT/*loxP* є незворотною, інсерція чи інверсія ДНК внаслідок рекомбінації між FRT/*loxP* знаходиться під постійною загрозою реверсії. На сьогодні розроблено стратегії, що дозволяють отримати незворотні



Реципрокна транслокація між двома негомолігичними лінійними молекулами ДНК



**Рис. 2.** Реакції рекомбінації, що каталізуються білками Cre чи Fpr. Заштриховані стрілки вказують на напрям реакцій

FRT/*loxP*-залежні інсерції та інверсії. В основі цих стратегій є здатність Cre та Fpr розпізнавати змінені (альтернативні) ділянки FRT/*loxP*, але рекомбінувати тільки певні пари цих альтернативних ділянок.

Альтернативні ділянки FRT/*loxP* поділяються на два класи: спейсерні варіанти та варіанти зі зміненою будовою інвертованих повторів. Перший клас містить нуклеотидні за-

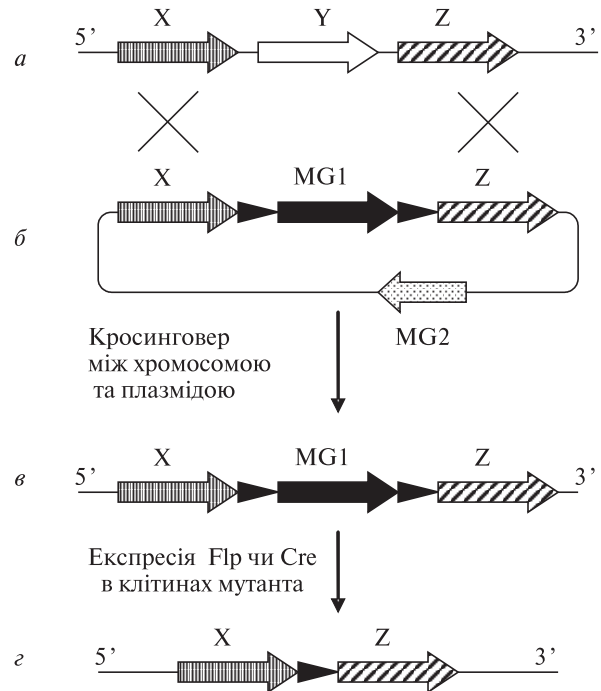
міни у послідовності спейсера і базується на спостереженні, що розмір спейсера (8 п.н.) є визначальним для ефективної рекомбінації, в той час як його послідовність не є критичною, якщо вона ідентична в двох FRT/*loxP*, які беруть участь у реакції. Таким чином, ССР-залежна рекомбінація відбудеться між парою гомотипових (наприклад, FRT-FRT чи F<sub>3</sub>-F<sub>3</sub>), але не гетеротипових (FRT-F<sub>3</sub>) ділянок. Цю

властивість використовують у підході, що отримав назву «обмін касети опосередкований рекомбіназою» (RMCE – *recombinase-mediated cassette exchange*; рис. 4) і застосовується для інсерцій ДНК та у стратегії інверсії ДНК, що називається FLE<sub>x</sub> (*flip excision*) [11]. В RMCE селективний маркер, фланкований гетеротиповими ділянками, вводиться у геном за допомогою гомологічної рекомбінації. Потім потрібна ДНК вводиться у район інсерції маркерного гена, замінюючи його у ССР-залежній рекомбіназній реакції. Кінцевий продукт обміну не здатний вступати у нові раунди рекомбінації, оскільки його фланкують гетеротипові (несумісні) ділянки. У стратегії FLE<sub>x</sub> фрагмент ДНК, який планують інвертувати, фланкований двома парами сумісних гетеротипових сайтів. Рекомбінація між будь-якою з цих двох пар призводить до інверсії ДНК, включно з інверсією внутрішнього сайту FRT/*loxP*. Це в свою чергу розташовує гомотипові ділянки у одній орієнтації і зумовлює ексцизію ДНК між ними. Кінцевим продуктом є інвертована касета, фланкована двома гетеротиповими ділянками, що не здатні рекомбінувати.

Інший клас альтернативних FRT/*loxP* ділянок – із змінами у структурі інвертованих повторів – також використовують для конструювання стабільних інсерцій та інверсій. У цьому випадку ділянки FRT/*loxP* містять нуклеотидні заміни у межах інвертованих повторів, що порушує здатність рекомбінази зв'язуватись із ДНК. Ділянка FRT/*loxP*, що містить нуклеотидну заміну у лівому інвертованому повторі (LE мутантний сайт), може рекомбінувати з низькою ефективністю із ділянкою FRT/*loxP*, що містить аналогічну заміну у правому інвертованому повторі (RE мутантний сайт). Продукт рекомбінації між LE та RE мутантними ділянками міститиме одну ділянку FRT/*loxP* дикого типу та одну мутантну – LE+RE, що не є субстратом для рекомбіназної реакції [11]. Цей клас мутантних ділянок FRT/*loxP* зазвичай використовують для введення плазмід у хромосому чи отримання стабільних інверсій.

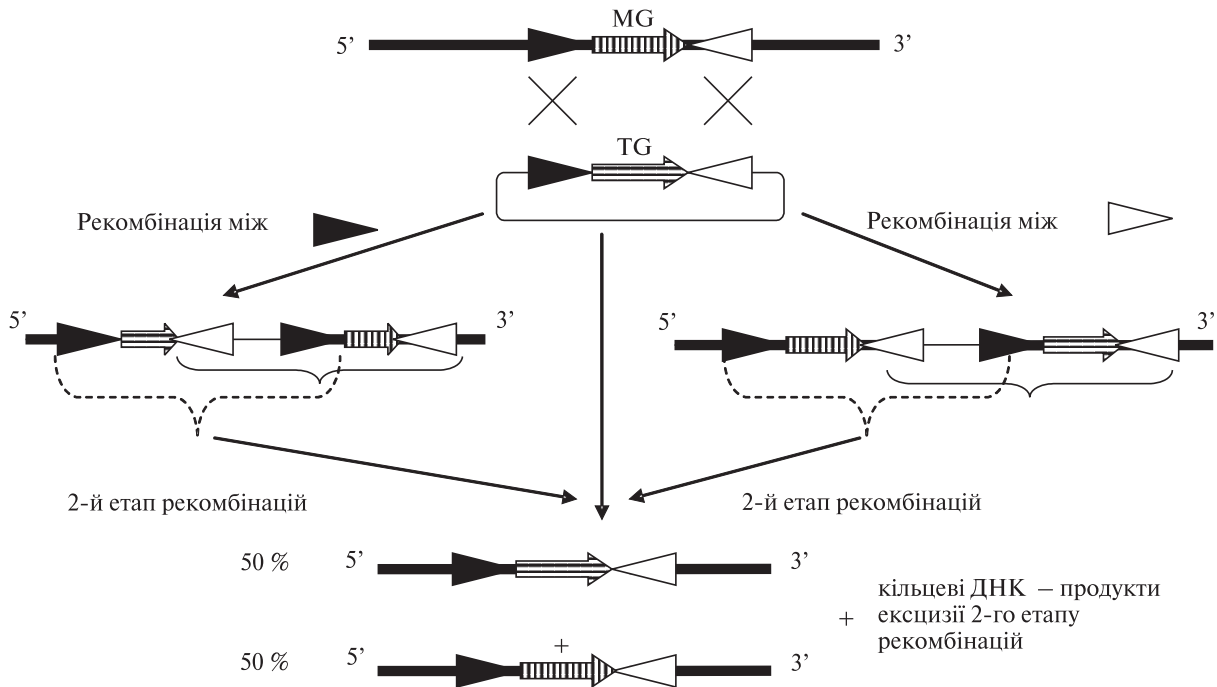
#### RIVET – ССР-залежний підхід до виявлення генів, що експресуються *in vivo*

RIVET (*recombinase-mediated in vivo expression technology*) застосовується для виявлення



**Рис. 3.** Конструювання немаркованих делецій за допомогою ССР: X, Y, Z – гени у хромосомі (косміді, плазміді); MG1 – маркерний ген 1 (наприклад, ген стійкості до хлорамфеніколу), яким заміщували ген Y; MG2 – маркерний ген 2 (наприклад, ген стійкості до канаміцину) на векторній ДНК. Чорний трикутник позначає ділянки рекомбінації FRT чи *loxP* для F<sub>l</sub>p чи C<sub>r</sub>e відповідно; а – вихідна хромосома; б – плазміда для делеції гена Y; в – хромосома, в якій ген Y заміщений на MG1, фланкований FRT чи *loxP*; г – хромосома, в якій маркерний ген 1 (MG1) зазнав ексцизії внаслідок активності F<sub>l</sub>p чи C<sub>r</sub>e. На місці гена Y залишається «шрам» – одна ділянка FRT чи *loxP*

генів, які не експресуються за лабораторних умов культивування (*in vitro*), але специфічно індукуються *in vivo*, наприклад при інвазії/колонізації тваринних чи рослинних тканин мікроорганізмами тощо. Таку групу генів позначають як *ivi* гени (*in vivo induced genes*). Ідентифікація *ivi* генів є важливим кроком у розробці нових методів боротьби з патогенами, вдосконалених штамів для харчової промисловості, сільського та лісового господарств тощо. Хоча існують і інші методи виявлення *ivi* генів (транскрипційний аналіз за допомогою RT-ПЛР, секвенування бібліотек кДНК тощо), RIVET є мабуть найгнучкішим та найчутливішим посеред них, оскільки дозволяє



**Рис. 4.** Заміна касети опосередкована рекомбінацією (RMCE). У хромосомі (косміді, ВАС, YAC тощо) міститься маркерний ген (MG), фланкований парою гетеротипових ділянок рекомбінації для ССР (чорний та білий трикутники). Плазміді містять чужорідну ДНК (трансген; TG), фланковану ідентичною парою гетеротипових ділянок. ССР каталізують заміну MG на TG в один етап (одночасна рекомбінація між двома парами ділянок) або в два етапи, як зображено на рисунку. Оскільки ССР-залежна реакція є зворотною, то приблизно 50 % молекул ДНК міститимуть очікувану заміну, яку можна буде відібрати за втраченою

виявляти навіть ті гени, які експресувалися в клітинах господаря тимчасово, протягом короткого проміжку часу [16]. RIVET складається з кількох етапів. Спочатку маркерний ген (зазвичай детермінант стійкості до певного антибіотика) інтегрують у хромосому мікроорганізму, що є об'єктом дослідження. Далі геномну ДНК вихідного мікроорганізму обробляють EP, фракціонують і фрагменти розміром 1–2 тис. п.н. лігують з плазмідною, що містить безпромоторний репортерний ген рекомбінази Cre/Flp. Таким чином, експресія гена рекомбінази буде залежати від промоторної активності клонованого фрагмента геному мікроорганізму. Лігазною сумішшю (що, в ідеалі, має репрезентувати усі промотори досліджуваного штаму) трансформують бактерію, отримуючи бібліотеку клонів (або RIVET-бібліотека). Для контрелекції клонів, що експресують ген рекомбінази за лабораторних умов, RIVET-бібліотеку вирощують впродовж кіль-

кох десятків генерацій у присутності антибіотика, стійкість до якого забезпечується маркером у геномі мікроорганізму. Після цього RIVET-бібліотеку вводять у господаря (організм, що має індукувати *ivi* гени), інкубують протягом певного часу та відбирають бактерії (з певних органів/тканин у певні моменти часу). У популяції мікроорганізмів, які виділили з господаря, відбирають клони, що втратили стійкість до антибіотика внаслідок ексцизії маркерного гена. Саме втрата маркерного гена є свідченням активності *ivi* промотора, що індукував експресію рекомбінази, у відповідь на певний сигнал (індуктор), який генерував господар. Виділення плазмід з транскрипційним злиттям *ivi* промотора і гена рекомбінази та її молекулярно-генетичний аналіз завершують скринінг *ivi* генів.

RIVET не потребує постійного селективного тиску на репортерний ген під час експериментів *in vivo*, оскільки активація *ivi* промотора,

навіть якщо вона була нетривалою, незворотно «фіксується» у геномі мікроорганізму у вигляді ексцизиї маркерного гена, яка стабільно успадковується усіма нащадками цієї клітини і може бути виявлена після їхнього виділення з господаря. Описана схема RIVET заснована на негативній селекції потрібних клонів; на сьогодні відомі підходи з позитивною селекцією *ivi* генів. Для цього у геном бактерії інтегрують касету, що містить маркерний ген, ген репресора  $\text{LacI}_q$  та сайти рекомбінації на кінцях касети. В інший локус геному бактерії інтегрують ген зеленого флуоресцентного білка GFP під контролем промотора *lac* оперону. При активації рекомбінази з геному бактерії вирізається маркерний ген разом з геном репресора *lacI<sub>q</sub>*, що дерепресує ген *gfp*. Клітини, в яких відбулася індукція гена рекомбінази, легко виявити за флуоресценцією [17].

#### Застосування ССР для вирізання та клонування фрагментів ДНК *in vivo*

Продемонстровано, що Flp-FRT можна використати для ексцизиї та подальшого клонування *in vivo* великих фрагментів генома в *E. coli*. Процедура полягає у введенні сайтів рекомбінації та плазмідного реплікону на кінці ділянки ДНК, яку планують клонувати. Далі у клітини вводиться в *trans* положенні плазміда з геном, що кодує Flp, експресія якого зумовлює вирізання та FRT-залежну циклізацію фрагмента геному. Так вдалося клонувати геномний острів патогенності LEE розміром 35 тис. п.н. із *E. coli* [12].

#### Контроль активності ССР

На сьогодні відпрацьовано ряд підходів, що дають змогу контролювати активність рекомбінази у часі. Наприклад, описано метод тимчасової реверсії фенотипу *E. coli* від  $\text{RecA}^-$  до  $\text{RecA}^+$ , що дозволяє трансдукцію у  $\text{RecA}^-$  штаммах. Для цього безпромоторний ген *recA* клонують у плазмиду між двох конвергентно орієнтованих ділянок FRT таким чином, щоб індукційний промотор *tetAp* прилягав до стопкодона *recA*. При додаванні хлортетрацикліну індукується експресія рекомбінази Flp (ген якої знаходиться під контролем *tetAp* на тій самій плазмиді, де є *recA*), яка інвертує *recA*, що запус-

кає продукцію  $\text{RecA}$ . Найвитонченіші стратегії часового контролю експресії рекомбінази використовуються у дослідженнях генетики розвитку еукаріотів [18]. Наприклад, сконструйовано ген, що кодує злитий білок Flpе-LBD, де Flpе — це рекомбіназа Flp, оптимізована для експресії в еукаріотах, а LBD — рецептор певного стероїдного гормона. За відсутності гормона білок Flpе-LBD захоплюється комплексом білків теплового шоку Hsp90, тоді як взаємодія гормону з Flpе-LBD вивільняє білок з Hsp90. Після цього рекомбіназа проникає в ядро клітини і каталізує реакцію. Для транскрипційного контролю експресії генів рекомбінази в еукаріотах використовують тетрациклін-залежні регуляторні системи, що базуються на регуляторних елементах *E. coli* — *tetR-tetO*.

#### Властивості та застосування ССР PhiC31

ССР PhiC31 (68 кДа), що належить до родини резольваз-інвертаз, походить із помірного актиноміцетного фага  $\phi\text{C31}$  і широко застосовується у генетиці актиноміцетів для конструювання стабільних вставок у їхні геноми [19]. PhiC31 успішно функціонує в клітинах ссавців та рослин, що робить цю ССР цінним знаряддям у генетиці вищих організмів [8, 20]. PhiC31 опосередковує рекомбінацію тільки між гетеротиповими сайтами *attB* (34 п.н.) та *attP* (39 п.н.) із використанням залишку серину в активному центрі білка. Обидва сайти рекомбінації містять недосконалі інвертовані повтори, з якими, мабуть, взаємодіють гомодимери PhiC31. Продукти рекомбінаційної реакції — *attL* та *attR* — не здатні вступати у гомологічну чи PhiC31-залежну рекомбінацію, що робить реакцію односторонньою та незворотною. Під час вивчення особливостей функціонування PhiC31 у клітинах ссавців показано, що *attB*-вмісна ДНК зазнає інсерції у геномний *attP* сайт швидше, ніж *attP*-вмісна ДНК у геном з *attB* сайтом. Тому у типовому випадку *attP* сайт спочатку поміщають у певний локус геному за допомогою гомологічної рекомбінації, а потім вводять *attB*-вмісну конструкцію, яка завдяки PhiC31 зазнає рекомбінації між *attB* та *attP*.

Крім інтеграції чужорідної ДНК, PhiC31 можна використати для генних заміщень. Принципову можливість цього продемонстровано для *Schizosaccharomyces pombe*. На кінці лінійного фрагменту ДНК, яким планують замінити певну ділянку геному, вводять сайти *attB* в одній орієнтації. Цим фрагментом ДНК трансформують штам *S. pombe*, що містить пару *attP* сайтів у одній орієнтації, які оточують ділянку геному. ССР PhiC31 (знаходиться на плазміді) каталізуватиме утворення коінтегратів різного типу, серед яких буде і заміщення ДНК між *attP* сайтами лінійним фрагментом ДНК, яким трансформували штам [21].

Слід зазначити, що в лініях клітин людини та мишей виявлено багато псевдо-*attP* сайтів (тобто ділянок, які подібні, але не ідентичні до *attP* дикого типу), а саме 31 та 57 відповідно [20]. У деяких лініях клітин людини та мишей ці ендogenous псевдо-*attP* здатні рекомбінувати із *attB*-вмісними конструкціями, навіть за наявності сайту *attP* дикого типу. Таким чином, чужорідні гени можна вводити у відносно випадкові локуси людського геному, або, використовуючи особливі векторні системи, забезпечити точну інтеграцію ДНК у сайт *attP* дикого типу. Крім того, досвід використання PhiC31 показує, що зазвичай псевдо-*attP* не перешкоджають відбору потрібних рекомбінаційних подій за наявності відповідних схем селекції, і ще раз підкреслює першочергову важливість молекулярно-генетичного аналізу отриманих рекомбінантних організмів чи ліній клітин. Псевдо-*attP* також виявлено у багатьох мікроорганізмів, а псевдо-*loxP* – в геномі миші [11], однак у цих випадках досі не виявлено негативного впливу таких сайтів на конструювання запланованих генетичних перебудов за умов нормальної експресії ССР.

#### Інші відомі ССР та майбутні напрями досліджень

Flp, Cre та PhiC31 є найвживанішими, однак не є єдиними ССР, які застосовуються для конструювання рекомбінантних ДНК *in vivo*. Нині у дослідженнях використовують також ССР із плазміди RP4 (система ParA-*res*), транспозону  $\gamma\delta$  (система TnpR-*res*), плазміди SR1 *Zygosaccharomyces rouxii* (система R-RS), бак-

теріофага Mu (система Gin-*xis*) та плазміди pSM19039 (система  $\beta$ -*six*) [8]. За принципом функціонування і використання усі згадані ССР подібні до Flp.

На сьогодні ССР вже призвели до революційних змін у підходах до інженерії рекомбінантних молекул ДНК та організмів. Однак слід зазначити, що ця революція наразі зачепила в основному модельні організми (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Drosophila*, *Arabidopsis*, лінії клітин людини та миші, деякі роди дріжджів), а приклади застосування ССР для широкого спектра біологічних систем є нечисленними. Наприклад, потенціал ССР досі недостатньо розкритий у генетиці грам-позитивних бактерій, хоча принципових перешкод цьому, вочевидь, не існує. Найбільш серйозними проблемами у використанні ССР для деяких груп організмів є особливості ініціації трансляції та вживання кодонів у їхніх геномах та у Flp/Cre, що значно знижує експресію останніх. Однак поступ у хімічному синтезі ДНК робить можливим конструювання синтетичних генів, адаптованих до експресії у певному організмі. Так, на сьогодні сконструйовано ген *cre*, в якого модифіковано сайт ініціації трансляції, а вживання кодонів відображає таке у людському геномі [11]. Подібним чином синтезовано гени ССР для оптимальної експресії в актиноміцетах – одній з найбільших груп бактерій, що продукують багато відомих антибіотиків, протипухлинних та імуносупресорних препаратів [22, 23]. Створення ССР, експресію яких можна контролювати у часі, є іншим важливим напрямом досліджень. Розробляються нові версії ССР на основі згаданих стратегій, а також здійснюється пошук нових ССР, які значно розширять арсенал генетичної інженерії і сприятимуть вирішенню низки життєво важливих питань, що постали перед людством [24].

B. Ostash

#### SITE-SPECIFIC RECOMBINASES IN GENETIC ENGINEERING: MODERN IN VIVO TECHNOLOGIES

Current advances in the field of site-specific recombinases (SSR) and their application for pro- and eukaryotic genomics are reviewed. Functions of SSR and main types of the genetic rearrangements they catalyze are outlined. Examples described in the review show the potential of SSR



for studies of a diverse array of fundamental and applied problems, which are not easily solved (or not solved at all) with the help of other experimental approaches. Use of SSR for wider set of biological systems, generation of recombinases with a strict temporal and spatial control of their activity and search for SSR displaying new substrate specificity are major directions of development of SSR-based technology.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. – New York : Cold Spring Harbor Lab. – 2001.
2. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods // Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. – 2008. – 9. – P. 387–402.
3. Wheeler D.A., Srinivasan M., Egholm M. et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing // Nature. – 2008. – 452. – P. 872–876.
4. Bentley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // Nature. – 2008. – 456. – P. 53–59.
5. Wang J., Wang W., Li R. et al. The diploid genome sequence of an Asian individual // Nature. – 2008. – 456. – P. 60–65.
6. Yu B.J., Kim C. Minimization of the *Escherichia coli* genome using the Tn5-targeted Cre/loxP excision system // Meth. Mol. Biol. – 2008. – 416. – P. 261–277.
7. Sadowski P. The FLP recombinase of the 2-Mm plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* // Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. – 1995. – 51. – P. 53–91.
8. Gidoni D., Srivastava V., Carmi N. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants // In Vitro Cell Dev. Biol.–Plant. – 2008. – 44. – P. 457–467.
9. Zhang Y., Liu H., Li B., Zhang J.T., Li Y., Zhang H. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the Cre/loxP DNA excision system // Transgenic Res. – 2009. – DOI 10.1007/s11248–009–9251–6.
10. Moravcikova J., Vaculkova E., Bauer M., Libantova J. Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision Cre/loxP strategy focused on generation of marker-free transgenic plants // Theor. Appl. Genet. – 2008. – 117. – P. 1325–1334.
11. Branda C.S., Dymceki S.M. Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice // Developmental Cell. – 2004. – 6. – P. 7–28.
12. Schweizer H.P. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP-FRT system in bacterial genetics // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – 5. – P. 67–77.
13. Wild J., Sektas M., Hradecna Z., Szybalski W. Targeting and retrofitting pre-existing libraries of transposon insertions with FRT and oriV elements for in-vivo generation of large quantities of any genomic fragment // Gene. – 1998. – 223. – P. 55–66.
14. Zhang Y., Buchholz F., Muyrers J.P.P., Stewart A.F. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* // Nat. Genet. – 1998. – 20. – P. 123–128.
15. Sharan S.K., Thomason L.C., Kuznetsov S.G., Court D.L. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering // Nat. Protocols. – 2009. – 4. – P. 206–223.
16. Bron P.A., Grangette C., Mercenier A., de Vos W.M., Kleerebezem M. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice // J. Bacteriol. – 2004. – 186. – P. 5721–5729.
17. Jackson R.W., Giddens S.R. Development and application of *in vivo* expression technology (IVET) for analysing microbial gene expression in complex environments // Infect. Disorders – Drug Targets. – 2006. – 6. – P. 207–240.
18. Sharma N., Moldt B., Dalsgaard T., Jensen T.G., Mikkelsen J.G. Regulated gene insertion by steroid-induced  $\phi$ C31 integrase // Nucl. Acids. Res. – 2008. – 36. – P. 1–12.
19. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Gromyko O. et al. IncP plasmids are most effective in mediating conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* // Rus. J. Genet. – 2006. – 42. – P. 476–481.
20. Keravala A., Calos M.P. Site-specific chromosomal integration mediated by  $\phi$ C31 integrase // Meth. Mol. Biol. – 435. – P. 165–173.
21. Thomason L.C., Calendar R., Ow D.W. Gene insertion and replacement in *Schizosaccharomyces pombe* mediated by the *Streptomyces* bacteriophage  $\phi$ C31 site-specific recombination system // Mol. Genet. Genom. – 2001. – 265. – P. 1031–1038.
22. Fedoryshyn M., Petzke L., Welle E. et al. Marker removal from actinomycete genomes using FLP recombinase // Gene. – 2008. – 213. – P. 114–119.
23. Fedoryshyn M., Welle E., Bechthold A., Luzhetskyy A. Functional expression of the Cre recombinase in actinomycetes // Appl. Microbiol Biotechnol. – 2008. – 78. – P. 1065–1070.
24. Блюм Я., Сиволап Ю., Рудий П., Созінов О. Нова хвиля «зеленої революції». Перспективи застосування в Україні досягнень молекулярної біотехнології та геноміки // Вісн. НАН України. – 2006. – 3. – С. 21–31.

Надійшла 22.05.09