

УДК 591

ПОИСК ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСПОЗОНА *Tol2* КАК ПРИМЕР ЭВОЛЮЦИОННОГО СИНТЕЗА ГЕНОМИКИ И БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ¹

© 2008 г. В. П. Корж

Институт молекулярной и клеточной биологии, Сингапур
(Institute of Molecular and Cell Biology 61 Biopolis Drive, Proteos, 137673 Singapore)

E-mail: vlad@imcb.a-star.edu.sg

Поступила в редакцию 06.11.06 г.

Окончательный вариант получен 22.08.07 г.

Статья посвящается памяти
Александра Александровича
(Сан Саньча) Нейфаха

Ген *GFP* под контролем мини-промотора кератина-8 был встроен в модифицированный неавтономный транспозон *Tol2* из генома медаки. Такой транспозон не способен к самостоятельной транспозиции, но в присутствии транспозазы интегрирует в геном половых клеток и после истощения транспозазы не меняет своего положения в геноме. В результате возникает стабильная трансгенная линия данио, которую можно поддерживать в течение многих поколений. Этот подход был использован для получения нескольких десятков трансгенных линий данио, каждая из которых демонстрирует характерный и стабильно наследуемый паттерн экспрессии зеленого флуоресцентного белка. Каждый паттерн определяется активностью энхансера вблизи места интеграции транспозона. Эти линии используются для изучения последовательности ДНК энхансеров, а также для исследования *in vivo* сложного морфогенеза клеток, характеристики органов, развитие которых у данио описано не было, и анализа активности генов в развитии под контролем выявленных энхансеров. В настоящее время данные о трансгенных линиях мы обобщили в созданной для этой цели базе данных ZETRAP. На втором этапе этого проекта транспозон в двух трансгенных линиях был активирован кратковременным воздействием транспозазы и переместился в геноме, покинув исходную хромосому. В результате были изолированы около 20 трансгенных линий с новыми паттернами экспрессии. Этот подход плодотворен для познания биологии и анатомии данио, изучения активности регуляторной части генома и разработки новых перспективных методов биологии развития и в обозримом будущем – генной терапии.

Ключевые слова: энхансер, трансгенные линии, *Danio rerio*, паттерн экспрессии, методы визуализации биологических объектов и процессов (bioimaging *in vivo*).

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ ЧАСТИ ГЕНОМА ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Несколько лет назад было завершено секвенирование генома человека. Считалось, что человечество получило доступ к информации, сулившей быстрое решение множества проблем современной медицины. Но, как оказалось, это был лишь первый этап сложного процесса познания. С завершением секвенирования генома человека, во-первых, начался анализ геномов других видов животных (фугу, мыши, данио, курицы, амфибий), а во-вторых, изменился в корне характер задач, решение которых необходимо для полного понимания

роли всех генов. Возникла необходимость аннотации генов, т.е. описания их функций, поскольку у примерно половины генов они все еще неизвестны. Малопонятны механизмы регуляции генетической активности, процессы взаимодействия различных генов внутри клетки и межклеточные взаимодействия, не говоря уже о еще менее понятных материях, например таких, как взаимодействие организма с окружающей средой, опосредованное генетической активностью. И если охарактеризовать регуляторные элементы, ответственные в основном за уровень экспрессии – промоторы, которые расположены в 5'-нетранслируемой области гена, относительно легко, поскольку их положение неизменно, то та же задача существенно сложнее в случае тканеспецифических регуляторов ге-

¹ Работа поддержана Агентством по науке, технологии и исследованиям Сингапура.

нетической активности – энхансеров (усилителей) и сайленсеров (ингибиторов). Расположение их в геноме по отношению к гену предсказать практически невозможно, так как они могут находиться где угодно, в том числе на существенном расстоянии от гена в 5'- или 3'-нетранслируемой области, в интронах того же или совсем другого гена и даже на другой хромосоме. В этом последнем случае модель взаимодействия энхансера и промотора гена предполагает их сближение за счет пространственного совмещения петель хроматина из различных хромосом (так называемая трансекция – Lewis, 1982; Duncan, 2002).

Насколько же важна информация о генетических регуляторных элементах? Возможно, это чисто фундаментальная проблема, не имеющая практического значения? Но стоит лишь вспомнить, что рак зачастую возникает вследствие нарушения регуляции активности генов, и все эти, казалось бы, фундаментальные проблемы сразу же приобретают самое практическое значение, поскольку непосредственно затрагивают всех и каждого. Как известно, завершение секвенирования генома человека продемонстрировало, что всего несколько процентов ДНК содержат в себе всю информацию об аминокислотной последовательности белков. Какова же роль остальной, значительно большей части генома? Постепенно пришло понимание того, что если некоторая часть некодирующего генома необходима для поддержания структуры хромосом, то другая его существенная часть ответственна за регуляцию генетической активности.

В какой-то мере процессы регуляции активности генов можно изучать с помощью микрочипов, т.е. *in vitro*. Однако для их познания во всей полноте все равно придется вернуться к живому веществу, т.е. делать эксперименты *in vivo* на позвоночных животных. Так почему бы не начать эту работу как можно раньше? В принципе делу можно помочь, пользуясь модельными животными, в отношении которых применимы крупномасштабные подходы функциональной геномики. Однако одновременный анализ функции сотен и тысяч генов на мышах не представляется возможным ввиду естественных ограничений, среди которых сравнительно малое (всего около 10) число потомков, сложное для анализа эмбриональное развитие в организме матери при относительно невысокой плотности популяции и высокая стоимость содержания вивариев.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В отличие от мышей аквариумные рыбки – сначала данио (*Danio rerio*), введенная в качестве

генетической модели исследований в лаборатории США (Haffter et al., 1996; Driever et al., 1996) и в настоящее время широко используемая во всем мире, а затем медака (*Oryzias latipes*), изучаемая в лаборатории Японии и распространившаяся отсюда в Германию и другие страны (Furutani-Seiki et al., 2004), – лишены этих недостатков. Именно удачное сочетание нескольких биологических свойств предопределило успешное применение этих видов в крупномасштабных генетических скринингах, где в качестве мутагена использовали этилнитрозомочевину или провирусные частицы. В результате сотни и даже тысячи мутантов с характерными фенотипическими дефектами выявлены задолго до того, как была установлена природа генетического нарушения, вызывающего аномалию развития (Amsterdam et al., 1999; Patton, Zon, 2001). В частности, инсерционный провирусный мутагенез значительно облегчает картирование мутаций, но он менее эффективен по сравнению с химическим и имеет ряд других ограничений. Привлекательность костистых рыб в качестве модельных организмов в сравнительно небольшом геноме (меньше генома человека в два и четыре раза у данио и медаки соответственно), относительно коротком периоде репродукции (3–4 мес), практически стремительном развитии вне материнского организма (всего несколько дней) и почти неограниченном числе оптически прозрачных эмбрионов, получаемых еженедельно от каждой самки (200–1000). Все эти факторы и привели к тому, что последние 15 лет число исследователей, работающих на данио, стремительно росло.

ТРАНСПОЗОНЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОЙ ЧАСТИ ГЕНОМА ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для мута- и трансгенеза дрозофил и растений широко используют транспозоны. Они представляют собой сравнительно небольшие фрагменты ДНК, иногда вызывающие наследуемые мутации, которые прерывают кодирующие или регуляторные участки генов или нарушают процесс созревания мРНК. Зная последовательность ДНК в транспозоне, можно легко идентифицировать последовательность ДНК, соседствующую с участком инсерции транспозона. Транспозоны способны нести гены-репортеры, и поэтому их легко приспособить для выявления регуляторных участков генома или новых генов. Ими также можно пользоваться как векторами для высокоэффективного трансгенеза. Таким образом, транспозоны являются мощным орудием обратной генетики. Их делят на автономные и неавтономные, первые из которых кодируют фермент транспозазу, необходи-

мую для переноса транспозона, а последние такого фермента не кодируют и для транспозиции им необходима транспозаза другого транспозона. В искусственной и контролируемой ситуации транспозаза может быть доставлена в клетку в виде гена, содержащегося в плазмиде, или мРНК.

Как и следовало ожидать, первые попытки использования транспозонов для мута- и трансгенеза на позвоночных животных были малоэффективны, но усилия по их модификации не прекращались, и к настоящему времени, по крайней мере, два транспозона – спящая красавица (*Sleeping Beauty, SB*) и *Tol2* – активно применяются для создания стабильных трансгенных линий данио и медаки и мутагенеза в клеточных культурах, в том числе и в эмбриональных стволовых клетках мыши (Kawakami et al., 2000; Grabher et al., 2003; Izsvak, Ivics, 2004; Dupuy et al., 2005; Collier et al., 2005). *SB* относится к семейству транспозонов *Tcl/mariner*. Он был обнаружен в ДНК данио в инактивированном вследствие мутаций состоянии, его удалось реконструировать с применением принципа “молекулярной археологии” по образцу и подобию неавтономных *Tcl*-подобных транспозонов лососевых. *SB* содержит на обоих концах последовательности прямого повтора/инвертированного повтора (ПП/ИП), необходимые для транспозиции (Cui et al., 2002). Транспозиция *SB* происходит, когда транспозаза связывается с последовательностью ИП, вырезает транспозон из донорской молекулы ДНК и интегрирует ее в новый участок, содержащий динуклеотид ТА и ИП. Система синтетического транспозона *SB* состоит из двух элементов – транспозазы и транспозона, содержащего последовательности ПП/ИП, а трансгенез, опосредованный транспозоном, выполняют, например, путем совместной инъекции мРНК транспозазы и ДНК транспозона в эмбрионы данио на 1–2-клеточной стадии. При этом эффективность такого трансгенеза по сравнению с традиционным (посредством инъекции трансгена, содержащегося в плазмиде) возросла в шесть раз (Davidson et al., 2003). На данио же было показано, что *SB* можно использовать и для поиска активных энхансеров (enhancer-trap) (Balciunas et al., 2004). В качестве существенного недостатка *SB* следует упомянуть, что при увеличении размера генетической конструкции до 5 т.п.о. его трансгенная эффективность резко падает. Кроме того, в этой системе транспозаза, активирующаяся в виде тетрамерного белка, достигает пика активности со значительной задержкой и подвержена эффекту самоингибирования при концентрации, выше оптимальной.

ТРАНСПОЗОН *Tol2* И ПОИСК АКТИВНЫХ ЭНХАНСЕРОВ У ДАНИО

Этих ограничений лишен транспозон *Tol2*, выделенный из медаки и активный, даже когда размер всей конструкции достигает 10 т. п. о. *Tol2* относится к семейству транспозонов *hAT* (*hobo/Ac/Tam3*), модифицированный неавтономный *Tol2* в присутствии транспозазы *Tol2* приобретает способность перемещаться в геноме половых клеток данио (Kawakami et al., 2000). К настоящему времени создан мини-*Tol2*, состоящий из терминальных повторов, каждый из которых включает чуть более 200 п. о. Мини-*Tol2* способен без потери эффективности трансгенеза переносить вставки порядка 10 т. п. о. (Steve Ekker, личное сообщение).

Недавно транспозон *Tol2* был применен для поиска новых генов (Kawakami et al., 2004), а в нашей лаборатории им воспользовались для поиска активных энхансеров (Parinov et al., 2004). Для этого в используемый *Tol2* был встроен ген зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ) под контролем относительно слабого мини-промотора эпителийсцифичного кератина-8. После инъекции транспозона, встроенного в плазмиду, в присутствии РНК транспозазы происходит инсерция транспозона в геном, а затем энхансеры проявляют себя посредством экспрессии гена-маркера, кодирующего, например, ЗФБ. Эта конструкция обладает сравнительно низким фоном базальной экспрессии ЗФБ, вероятно, из-за присутствия слабого промотора. В то же время она довольно чувствительна в отношении энхансеров: 75% рыб – первичных носителей трансгена – дали начало трансгенным линиям с ярко выраженной тканеспецифичной экспрессией ЗФП вне кожи при относительно высоком уровне экспрессии по сравнению с другими конструкциями. В небольшом по масштабам пробном трансгенном скрининге энхансеров мы наблюдали эффективность трансгенеза на уровне 16%, отобрав более 30 интересных трансгенных линий. Идентификацию мест вставки транспозона в геном производили с помощью ПЦР.

И, хотя в каждой из трансгенных линий экспрессия ЗФП может выявлять только частичный паттерн экспрессии определенного гена, все вместе эти линии открывают широкие возможности для изучения формирования различных типов клеток и органов. Кроме того, цитоплазматическая локализация ЗФБ позволяет проводить детальный анализ клеточной архитектуры, включая самые тонкие отростки клеток, например нейриты. С помощью стабильных трансгенных линий данио (enhancer-trap lines, ET), в которых произошла интеграция трансгенной конструкции для поисков активных энхансеров, уже удалось идентифицировать и описать ана-

томические структуры, ранее неизвестные у данио, как, например, так называемые корпускулы Станниуса, выполняющие роль паразитовидной железы у костистых рыб и регулирующие обмен двухвалентных ионов. Этот орган необходим для регуляции морфогенеза скелета. Корпускулы Станниуса, вероятно, могли выполнять важную эволюционную роль в процессе адаптации рыб к обитанию в пресной воде.

Количество линий ЕТ постоянно растет, поскольку ими уже начали пользоваться в качестве “стартовых площадок” для инициации транспозиции транспозона в новое положение после инъекции мРНК транспозазы в эмбрионы животных этих линий (Parginov et al., 2004). Учитывая легкость идентификации места инсерции транспозона, этот метод предоставляет возможность создания карты примерного расположения энхансеров в геноме и таким образом позволит глубже понять роль некодирующих участков ДНК.

Генетические элементы, использованные для поиска новых генов – так называемые “гены-ловушки” (trap), – не содержат промоторов. Они снабжены сплайс-акцепторным участком перед кодирующим участком гена-репортера, что позволяет объединить последовательность репортерного гена с неизвестным геном в геноме. Экспрессия таких неизвестных генов проявляется при совпадении ориентации этих генов и гена-репортера. В силу этих и других обстоятельств эффективность такого метода ниже по сравнению с таковой для ЕТ. Однако полагают, что этот подход позволит более точно наблюдать паттерны экспрессии генов и с некоторой вероятностью стимулировать мутагенез, поскольку с его помощью меняется характер сплайсинга гена-мишени. Стоит отметить, однако, что эти обещанные преимущества “гена-ловушки” пока не были реализованы. Более того, вероятно, большей степенью мутагенности обладают генетические конструкции размером более 10 т. п. о., когда эффективность трансгенеза как такового начинает снижаться. К тому же, как оказалось, в линиях ЕТ в некотором проценте случаев неизвестный ген также действует как “ген-ловушка”, а уровень экспрессии репортерного гена значительно превышает таковую неизвестного. Это последнее обстоятельство приобретает важнейшее значение, когда наши трансгенные линии используются для детального наблюдения биологического процесса в живых организмах (bioimaging *in vivo*), как, например, наши трансгенные линии SqET4 и SqET20, с помощью которых проведен анализ роли ранних пронеуральных генов в процессе клеточной дифференцировки механорецепторов в боковой линии данио (Sarrazin et al., 2006).

Вероятно, уже в ближайшем будущем с помощью транспозонов будут реализованы проекты, цель которых – получение мутантов за счет мутагенных свойств генетических конструкций большого размера, в то время как иные скрининги, по типу нашего, ставят своей задачей картирование большинства или всех энхансеров в геноме костистых рыб или *Xenopus tropicalis* (Paul Mead, личное сообщение). С учетом таких возможностей сравнительной геномики, как сохранение в процессе эволюции структуры регуляторных участков и наличие сведений о геноме фугу и человека, нетрудно представить, что выявление и анализ регуляторных участков большинства, если не всех, генов человека окажется лишь делом времени.

Эти идеи уже начали проверяться на практике. С одной стороны, модифицированный вектор “гена-ловушки”, нарушающий сплайсинг мРНК по принципу так называемой “ломки генов” (gene breaking) на базе транспозона *SB*, был успешно использован для мутагенного скрининга, и потенциал транспозонов в такого рода исследованиях тем самым был доказан (Sivasubbu et al., 2006). Более того, долгое время полагали, что регуляторные некодирующие последовательности могут сохраняться неизменными у очень удаленных видов (Müller et al., 2000). Однако насколько широко этот феномен проявляет себя, оставалось неясно. Недавно на данио с помощью трансгенеза на базе транспозонового вектора было экспериментально показано, что гораздо более вероятно наличие регуляторных последовательностей, сохраняющихся в течение сравнительно коротких эволюционных периодов (Fisher et al., 2006).

Как упоминалось выше, линии ЕТ представляют собой незаменимые орудия для детального анатомического анализа живых животных. В настоящее время в силу различных причин, основной из которых является повторное использование одних и тех же генов на более поздних стадиях развития, наши знания сложных процессов клеточного морфогенеза ограничены относительно ранними эмбриональными стадиями. Для решения этой задачи необходимы прижизненные маркеры самых различных клеточных типов. Именно по этой причине каждая из трансгенных линий по мере изучения в какой-то момент депонируется в один из генетических банков, основной целью которых является сохранение и поддержание таких линий. В настоящее время созданы как международные, так и национальные коллекции линий данио, включая Международный центр ресурсов данио в Орегоне, США (ZIRC, <http://zfin.org/zirc/home/guide.php>) или Национальный проект по биоресурсам данио в Японии (http://shigen.lab.nig.ac.jp/zebra/index_en.html). Не-

давно была создана такая же база данных о линиях ET, созданных в нашей лаборатории, которую мы назвали ZETRAP (Choo et al., 2006; <http://plover.imcb.a-star.edu.sg/~zetrap/ZETRAP.htm>). Она оказалась довольно популярной. В течение короткого времени трансгенные линии и реактивы для их создания были предоставлены более 30 лабораториям в 13 странах, включая Россию. С учетом этого обстоятельства легко представить то количество публикаций, в которых эти и новые трансгенные линии, полученные тем же образом, будут использованы для решения различных задач геномики и биологии развития.

В последние годы данио и медака из малоценных аквариальных рыб превратились в незаменимые и популярные модели биологии развития, исследования на которых ежегодно привлекают многомиллионные гранты (Bradbury, 2004). Их популярность для исследований методами функциональной геномики (выражаясь новомодным научным жаргоном, а по старому – генетики) может быть отнесена за счет методологических подходов, разработанных в последние годы для мутагенеза, обратной генетики, трансгенеза и микроманипуляций. Возникшие технические преимущества, будучи дополнены такими природными свойствами этих видов, как малые размеры, внешнее развитие и оптическая прозрачность, делают малых костистых рыб (данио и медаку) все более популярными для изучения генетических основ болезней человека и разработки новых лекарств. Эти же методологические ухищрения, как правило, можно применять без особых модификаций для изучения других костистых рыб и для расширения наших знаний в области молекулярной эволюционной биологии (evo-devo), физиологии и нейробиологии, т.е. в областях, имеющих опыт работы с другими видами костистых рыб. Дальнейшее развитие методологии исследований позволит еще более полно извлекать интересующую нас информацию о молекулярно-биологических закономерностях нашего собственного устройства, пользуясь данио и другими видами костистых рыб.

Необходимо особенно отметить то обстоятельство, что в отличие от вирусного вектора, встраиваемого в геном значительное количество вирусной ДНК, размер ДНК транспозона *Tol2* в новых конструкциях сведен до минимума – всего несколько сот нуклеотидов, при этом они обеспечивают эффективную инсерцию “полезного груза” в несколько т. п. о. Легко представить, что такие искусственные конструкции на базе транспозона, отработанные и проверенные на модельных животных, вскоре найдут применение в области генной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amsterdam A., Burgess S., Gollig G. et al.* A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish // *Genes Devel.* 1999. V. 13. P. 2713–2724.
- Balciunas D., Davidson A.E., Sivasubbu S. et al.* Enhancer trapping in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon // *BMC Genomics.* 2004. V. 5. P. 62.
- Bradbury J.* Small fish, big science // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. E148.
- Choo B.G., Kondrichin I., Parinov S. et al.* Zebrafish transgenic enhancer TRAP line database (ZETRAP) // *BMC Devel. Biol.* 2006. V. 6. P. 5.
- Collier L.S., Carlson C.M., Ravimohan S. et al.* Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse // *Nature.* 2005. V. 436. P. 272–276.
- Cui Z., Geurts A.M., Liu G. et al.* Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 318. P. 1221–1235.
- Davidson A.E., Balciunas D., Mohn D. et al.* Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon // *Devel. Biol.* 2003. V. 263. P. 191–202.
- Driever W., Solnica-Krezel L., Schier A.F. et al.* A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish // *Development.* 1996. V. 123. P. 37–46.
- Duncan I. W.* Transvection effects in *Drosophila* // *Annu. Rev. Genet.* 2002. V. 36. P. 521–556.
- Dupuy A.J., Akagi K., Largaespada D.A. et al.* Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system // *Nature.* 2005. V. 436. P. 221–226.
- Fisher S., Grice E.A., Vinton R.M. et al.* Conservation of RET regulatory function from human to zebrafish without sequence similarity // *Science.* 2006. V. 312. P. 276–279.
- Furutani-Seiki M., Sasado T., Morinaga C. et al.* A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in *Medaka*, *Oryzias latipes* // *Mech. Devel.* 2004. V. 121. № 7–8. P. 647–658.
- Grabher C., Henrich T., Sasado T. et al.* Transposon-mediated enhancer-trapping in medaka // *Gene.* 2003. V. 322. P. 57–66.
- Haffter P., Granato M., Brand M. et al.* The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish // *Development.* 1996. V. 123. P. 1–36.
- Izsvak Z., Ivics Z.* Sleeping Beauty transposition: biology and applications for molecular therapy // *Mol. Ther.* 2004. V. 9. P. 147–156.
- Kawakami K., Shima A., Kawakami N.* Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 11403–11408.
- Kawakami K., Takeda H., Kawakami N. et al.* A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish // *Devel. Cell.* 2004. V. 7. P. 133–144.
- Lewis E.B.* Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex // *Embryonic development: genes and cells (Proc. 9th Congr. Int. Soc. Devel.*

Biol.) / Eds Burger M., Weber R. N.Y.: Liss, 1982. P. 269–289.

Müller F., Albert S., Blader P. et al. Direct action of the Nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS // *Development*. 2000. V. 127. P. 3889–3897.

Parinov S., Kondrichin I., Korzh V., Emelyanov A. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes *in vivo* // *Devel. Dyn.* 2004. V. 231. P. 449–459.

Patton E.E., Zon L.I. The art and design of genetic screens: zebrafish // *Nat. Rev. Genet.* 2001. V. 2. P. 956–966.

Sarrazin A.F., Villablanca E.J., Nunez V.A. et al. Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line // *Devel. Biol.* 2006. V. 295. P. 534–545.

Sivasubbu S., Balciunas D., Davidson A.E. et al. Gene-breaking transposon mutagenesis reveals an essential role for histone H2afza in zebrafish larval development // *Mech. Devel.* 2006. V. 123. P. 513–529.

Search for Tissue-Specific Regulatory Elements Using *Tol2* Transposon as an Example of Evolutionary Synthesis of Genomics and Developmental Biology

V. P. Korzh

Institute of Molecular and Cell Biology, 61 Biopolis Drive, Proteos, 137673 Singapore

e-mail: vlad@imcb.a-star.edu.sg

This paper is devoted to the memory
of Alexander A. Neifakh

Abstract—The *GFP* gene controlled by a mini-promoter of the gene was cloned into a modified nonautonomous transposon *Tol2* from the medaka genome. Such transposon cannot itself transpose, but external transposase allows it to integrate into the germ cell genome, where it remains after transposase is depleted. This gives rise to a transgenic zebrafish line stably maintained for many generations. This approach was used to obtain several tens of transgenic zebrafish lines, each of which demonstrates stably inherited pattern of GFP expression. This pattern depends on the enhancer activity in the vicinity of the transposon integration site. These lines can be used for the analysis of DNA sequences of enhancers, *in vivo* studies of complex cell morphogenesis, description of organs whose development has not been described in zebrafish, and analysis of activity of genes controlled by the identified promoters during development. Current data on the transgenic lines were integrated into the dedicated ZETRAP database. At the second stage of this project, the transposon was mobilized by a short-term exposure of two transgenic lines to transposase and left the initial chromosomal location. This allowed us to isolate about 20 transgenic lines with new expression patterns. This approach can be successfully used to study the zebrafish biology and anatomy, activity of the regulatory part of the genome, and development of new promising techniques in developmental biology and, in the foreseeable future, gene therapy.

Key words: enhancer, transgenic lines, *Danio rerio*, expression pattern, *in vivo* bioimaging.