

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 576.8.095

Транспозон *piggyBac* как инструмент для генетической инженерии

© 2016 г. И.А. ЛАПТЕВ*, Н.М. РАЕВСКАЯ, Н.А. ФИЛИМОНОВА, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

*e-mail: ivanlaptev@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2016

Транспозоны являются мобильными генетическими элементами, входящими в состав геномной ДНК многих организмов и состоящими из двух классов. В отличие от транспозонов первого класса ДНК-транспозоны, относящиеся к второму классу, не используют при своем переносе стадию синтеза РНК, а осуществляют его по механизму “вырезать-вставить” или же, в некоторых случаях, с помощью репликативной транспозиции. При интеграции ДНК-транспозона в новый сайт происходит дупликация последовательности-мишени по обе стороны от транспозона, а при его вырезании, как правило, остаются вставки или делеции. ДНК-транспозон *piggyBac*, выделенный из клеток мотылька *Trichoplusia ni*, обладает рядом свойств, отличающих его от остальных мобильных элементов своего класса. Он является удобным инструментом для разработки генно-инженерных подходов благодаря уникальной способности не оставлять следа после вырезания из сайта интеграции, осуществлять эффективную транспозицию и переносить большие фрагменты ДНК. Сайтом интеграции данного транспозона служит нуклеотидная последовательность ТГАА, при этом встраивание чаще всего происходит в АТ-богатых участках ДНК. Способность *piggyBac* к независимому от клеточного аппарата переносу на новое место и к безошибочному восстановлению участка ДНК после вырезания кроется в механизме его транспозиции, который детально рассмотрен в данном обзоре. Транспозон *piggyBac* наряду с другими транспозонами и вирусами широко применяется для трансгенеза различных организмов; он используется также для проведения инсерционного мутагенеза и в генной терапии.

Ключевые слова: транспозон, *piggyBac*, транспозиция, ДНК, мутагенез.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-35-44

Транспозоны – это мобильные генетические элементы, которые впервые были обнаружены Б. Мак-Клинток (McClintock) в результате ее работы по изучению особенностей окраски листьев и зерен кукурузы и описаны ею в 40-х годах XX в. [1]. С тех пор транспозоны и их остатки были обнаружены в геномах большинства организмов, от бактерий до млекопитающих, и в некоторых из них, как оказалось, они составляют большую часть всей ДНК. Так, из транспозонов состоит около 20% генома плодовой мушки, не менее 44% генома человека, а в геноме кукурузы их доля превышает 85% [2–4].

Транспозоны оказывают влияние на структуру и функции генома, являясь важными элементами в эволюции организмов [5]. На сегодняшний день известно множество как нативных, так и реконструированных транспозонов, некоторые из которых стали применять в качестве удобного ин-

струмента в генетической инженерии и генной терапии, например *Sleeping Beauty*, *Hermes*, *Frog Prince*, *Hasmar1*, *Passport*, *Minos*, *Toll1*, *Tol2*, *hobo*, *Tc1*, *Ac/Ds*, *Harbinger3_DR* и *ORFeus*. Однако транспозон *piggyBac* благодаря своим свойствам представляет особый интерес [6].

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ *piggyBac* И ЕГО СТРУКТУРА

Транспозон *piggyBac*, первоначально названный IFP2, был впервые идентифицирован как вставка ДНК клеток-хозяина в геном вирусов ядерного полиэдроза, выделенных из *Autographa californica* и *Galleria mellonella* при их пассаже на клеточной линии *Trichoplusia ni* TN-368. Встраивание IFP2 происходило с высокой частотой, что нередко приводило к нарушению синтеза белка массой 25 кДа и, как следствие, индуцировало по-

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; п.н. – пары нуклеотидов, т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов.



Рис. 1. Структура транспозона *piggyBac* (IFP2) из *Trichoplusia ni* TN-368

Fig. 1. Structure of *piggyBac* (IFP2) transposon from *Trichoplusia ni* TN-368

явление у мутантного вируса фенотипа, называемого FP. Данный фенотип проявлялся в уменьшении степени преломления наклонного света вирусными блясками за счет снижения числа вирусных полиэдров в инфицированных клетках. При этом проведение дополнительных пассажей в клетках *T. ni* линии TN-368 способствовало возвращению мутантного вируса к исходному фенотипу с высокой частотой. Анализ принадлежности IFP2 к геному вирусов или клеток хозяина путем гибридизации с хромосомной ДНК линии TN-368 неожиданно показал, что данная последовательность во множестве копий разбросана по всему геному этой клеточной линии *T. ni* [7, 8].

При дальнейшем изучении элемента IFP2 было проведено секвенирование его нуклеотидной последовательности, размер которой составляет 2472 п.н. (GenBank, J04364.2), а также определены его структурные элементы. В результате анализа было показано, что элемент IFP2 включает ген транспозазы, а его открытая рамка считывания имеет размер 1785 п.н.; как выяснилось, данный ген не содержит интронов. Было установлено, что вне области рамки находятся промоторный участок, характерный для РНК-полимеразы II, а также сайт полиаденилирования. Ген транспозазы ограничен с двух сторон инвертированными повторами протяженностью 13 п.н.; кроме того, в его составе имеются внутренние повторы длиной 19 п.н., удаленные от концевых повторов на 3 п.н. и на 31 п.н. слева и справа, соответственно (рис. 1) [9].

Сравнение нуклеотидных последовательностей вируса до и после интеграции IFP2 показало, что встраивание элемента происходит в целевую последовательность 5'-ТТАА-3', содержащуюся чаще всего в АТ-богатых областях генома, и приводит к дупликации целевой последовательности по краям вставки. При дальнейшем анализе генома неинфицированных клеток линии TN-368 было отмечено, что элемент IFP2 в них также окружен последовательностью ТТАА. Предпочтение АТ-богатой области для интеграции харак-

терно для многих транспозонов, как про-, так и эукариотических [10–13].

Сравнение последовательностей IFP2 и генома вируса протяженностью 100 п.н., окружающих сайты интеграции, не выявило их гомологии, что позволило исключить гомологичную рекомбинацию как механизм встраивания этого элемента [9].

Таким образом, учитывая высокую частоту интеграции IFP2 в геном вируса, способность к реверсии мутантного вируса при пассажах в клеточной линии TN-368, а также основываясь на структуре данного элемента и присутствии множества его копий в клетках хозяина, был сделан вывод о его принадлежности к ДНК-транспозонам. Элемент IFP2 впоследствии был назван его первооткрывателем *piggyBac* [7–9].

РАСПРОСТРАНЕНИЕ *piggyBac* В ПРИРОДЕ

С момента его открытия транспозон *piggyBac* долгое время оставался единственным известным представителем хорошо известного сейчас суперсемейства транспозонов с тем же названием. На сегодняшний день найдено множество *piggyBac*-подобных транспозонов в различных организмах; в том числе, была обнаружена активная копия транспозона *piggyBac* в клетках млекопитающих.

В ранних работах по изучению *piggyBac* данный транспозон был идентифицирован методом ДНК-гибридизации только в двух из трех клеточных линий *T. ni*, TN-368 и TN-5B1, и долгое время не удавалось выявить последовательности, гомологичные *piggyBac*, в других организмах. Было даже сделано предположение, что данный транспозон существует только в геноме некоторых особей *T. ni* [9, 14]. Но в 2000 г. были опубликованы неожиданные данные, указывающие на то, что в геноме восточной фруктовой мухи присутствуют полноразмерные последовательности, имеющие 95% гомологии с *piggyBac* [15]. В последующие годы стало появляться все

больше информации о последовательностях геномов различных организмов, и при их анализе были обнаружены повторяющиеся последовательности, подобные *piggyBac*. В 2002 г. была определена последовательность гена транспозазы элемента *Pokey*, полностью идентичная по структуре транспозазе *piggyBac* [16]. С тех пор *piggyBac*-подобные последовательности были найдены в геномах грибов, растений, насекомых, ракообразных, амфибий, рыб и млекопитающих [17]. В дополнение, *piggyBac*-подобные транспозоны были обнаружены в геноме мотылька *Manduca sexta* [18], шелкопряда [19], муравья [20], лягушки [21] и летучей мыши *Myotis lucifugu*. Было продемонстрировано, что полноразмерный элемент *piggyBac1_ML* из генома летучей мыши способен к транспозиции не только в клетках исходного организма но и в клетках дрожжей, и человека [22, 23].

В дальнейшем анализ секвенированных геномов выявил, что многие гены произошли из транспозонов. Так, было показано, что “одомашненные” в ходе эволюции транспозазы *piggyBac* играют важную роль в осуществлении клеточных функций инфузорий [24, 25], а в геноме человека присутствуют по крайней мере пять генов, образованных из *piggyBac*. Один из них, *PGBD5*, экспрессируется в основном в клетках мозга и центральной нервной системы [26].

МЕХАНИЗМ ТРАНСПОЗИЦИИ *piggyBac*

piggyBac относится к транспозонам класса II (ДНК-транспозоны), в который также входят и другие элементы, такие как *P*, *hobo*, *mariner*, *Tc1* и *Ac*. Они характеризуются тем, что имеют на концах короткие инвертированные повторы и при их встраивании происходит дупликация последовательности, в которую они интегрируются. При переносе ДНК-транспозонов в геноме остаются “следы” их пребывания, включающие делеции и вставки в последовательность, существовавшую до интеграции мобильного элемента [27–29]. Но *piggyBac* отличает от транспозонов этого класса то, что при его вырезании не остается следов его прошлого присутствия.

Изучение ревертантных вирусов показало, что *piggyBac* подвергается точному вырезанию с восстановлением исходного сайта ТТАА, который был продублирован при встраивании этого транспозона [10]. Данная особенность *piggyBac* связана с механизмом его транспозиции, который был подробно изучен в серии экспериментов, проведенных *in vitro* (рис. 2).

Указанные эксперименты показали, что на начальном этапе переноса транспозаза связывается с концами *piggyBac*, после чего она производит одноцепочечные разрывы на 3'-концах транспозона. В результате этого возникают свободные нуклеофильные ОН-группы, которые атакуют комплементарную цепь прилегающих к транспозону ТТАА-последовательностей с их 5'-конца. При этом происходит образование шпилек на концах транспозона и его высвобождение из места первоначальной интеграции. Затем под действием транспозазы шпильки разрезаются и высвободившиеся ОН-группы 3'-концов транспозона атакуют 5'-концы нового сайта ТТАА, что приводит к ковалентному присоединению одной из цепей каждого конца транспозона к последовательности 5'-ТТАА-3'. Последним этапом интеграции является лигирование оставшихся свободных концов транспозона с комплементарной цепью геномной ДНК.

В молекуле ДНК на месте предыдущего пребывания транспозона остаются 5'-выступающие концы ТТАА, которые комплементарно соединяются и лигируются за счет внутриклеточных факторов, что возвращает последовательность данного сайта в исходное состояние [30]. В некоторых случаях в исходном сайте все же могут возникать небольшие вставки или делеции, хотя и с очень низкой частотой – 1% от числа вырезаний транспозона [31].

Стоит отметить, что присоединение транспозона к ДНК-цели посредством нуклеофильной атаки со стороны ОН-группы является отличительной чертой действия DDE-семейства бактериальных и эукариотических транспозаз, а также ретровирусных интеграз. Эти ферменты, действующие на концевые повторы мобильных элементов, содержат консервативный DDE/D-домен, включающий в себя три консервативных остатка аспарагиновой или глутаминовой кислот на месте последнего аминокислотного остатка [32, 33]. Взаимодействуя с ионом Mg^{2+} , эти остатки отвечают за реакции транспозиции и интеграции. [34]. На принадлежность транспозазы *piggyBac* к данному семейству указывает и ее функциональная зависимость от ионов Mg^{2+} , и наличие консервативной последовательности DDD. В результате экспериментов *in vitro* было продемонстрировано, что замена трех аминокислотных остатков D268A, D346A и D447A не сказывается на связывании транспозазы с инвертированными повторами на концах транспозона, но блокирует образование двухцепочечных разрывов, разрезание шпилек по

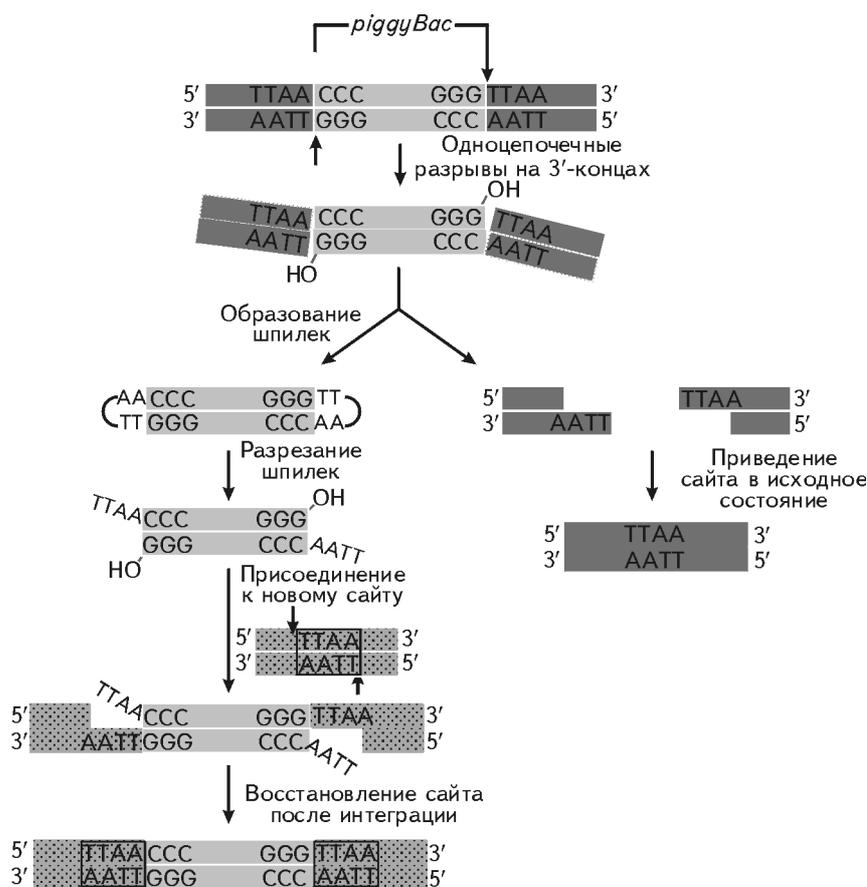


Рис. 2. Схема транспозиции *piggyBac* по типу “вырезать-вставить”

Fig. 2. Scheme of *piggyBac* transposition according to “cut-and-paste” mechanism

концам транспозона и формирование ковалентных связей с новым сайтом интеграции. Блокировка данных процессов указывает на то, что именно этот 3D-домен обеспечивает все этапы рекомбинации. Важность для транспозиции упомянутых аминокислот была подтверждена в экспериментах с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. С их помощью также было показано, что *piggyBac* не требует для проявления своей активности каких-либо внутриклеточных факторов [30].

В других исследованиях транспозазы на С-конце белка *piggyBac* был обнаружен сигнал ядерной локализации размером 94 а.о., что объясняет способность *piggyBac* к интеграции в геном широкого круга организмов [35]. Кроме того, С-концевой участок транспозазы содержит несколько цистеиновых а.о., предположительно образующих структуру «цинковый палец» с гомеодоменом, которая может играть важную роль при связывании транспозазы с хроматином [30, 36].

ПРИМЕНЕНИЕ *piggyBac* В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Подобно другим транспозонам, молекула *piggyBac* состоит из двух частей: гена транспозазы и ДНК-фрагмента, ограниченного с двух сторон инвертированными повторами. Такая структура *piggyBac* наряду с его способностью к переносу больших фрагментов ДНК, а также к проведению точных процессов интеграции и вырезания делает данный элемент удобным инструментом для генетической инженерии.

В 1995 г. Фрэйзер (М.Ж. Fraser) с коллегами впервые показали, что транспозон активен только при введении гена транспозазы *piggyBac* (на вспомогательной плазмиде р3Е1.2) и лишь в ее присутствии происходит точное вырезание и транспозиция этого элемента [37]. Данный подход использовался в большинстве первоначальных экспериментов по трансформации клеток с применением

транспозона, содержащего селективный маркер, встроенный в ген транспозазы [38–44].

Для создания более удобной и эффективной системы на основе транспозона *piggyBac* был проведен ряд экспериментов. В 1997 г. команда ученых во главе с Элик (Т.А. Elick) изучали концевые участки транспозона и прилегающие к нему последовательности 5'-ТТАА-3'. Они выяснили, что делеция даже одной пары нуклеотидов по концам транспозона нарушает его перенос, как и делеция двух пар нуклеотидов АА прилегающей последовательности. Однако замена одной пограничной пары нуклеотидов А прилегающей последовательности не оказывала подобного эффекта [45].

В 2001 г. были опубликованы результаты работы, в ходе которой определялась минимальная длина флангов *piggyBac*, не влияющая на частоту трансформации, а также минимальное расстояние между флангами, обеспечивающее эффективную транспозицию. Изучая межплазмидную транспозицию, авторы пришли к выводу, что размер левого фланга должен быть не меньше 125 п.н., правого – 162 п.н. При уменьшении правого фланга до 36 п.н. транспозиция становилась невозможной, но, по мнению авторов, не из-за стерических ограничений, а из-за содержащихся на этом фланге важных последовательностей. При этом фланги узнавания транспозазы с внешней стороны транспозона должны находиться на минимальном расстоянии в 55 п.н. Эти данные позволили сделать заключение о том, что для осуществления переноса транспозаза должна связываться с двумя флангами одновременно [46]. Формирование подобного комплекса перед разрезанием было продемонстрировано для многих мобильных элементов, таких как *IS50*, *Tn10*, *Tn7*, *P* [47–50].

При проведении дальнейших работ на эмбрионах *Drosophila melanogaster* было установлено, что транспозон с укороченными флангами в отличие от полноразмерного не может обеспечить достаточную частоту транспозиций из плазмиды в геном (0,6% против 26%, соответственно). В результате дополнительных исследований было показано, что минимальная длина левого и правого флангов транспозона, необходимая для его транспозиции в геном, должна быть не менее 311 п.н. и 235 п.н., соответственно. Таким образом, была продемонстрирована важность для эффективной трансформации протяженных внутренних последовательностей, прилегающих к концам транспозона, хотя они и не являются необходимыми для вырезания или межплазмидной транспозиции [40, 51].

При более подробном анализе инвертированных повторов *piggyBac* был получен мутант-

ный 5'-фланг, несущий две замены, T53C и C136T, который обеспечивал увеличение транспозиции на 59% [52].

Размер фрагмента, который может быть размещен между флангами транспозона, составляет от 1000 п.н. до, по некоторым данным, 300 т.п.н. Таким образом, *piggyBac* обладает одной из самых больших емкостей среди мобильных элементов [53, 54].

Показано, что модификация транспозазы *piggyBac*, в частности адаптация кодонов, позволяет в несколько раз увеличить активность транспозиции [55, 56]. В другом эксперименте была получена транспозаза, способная к вырезанию и встраиванию в геном эмбриональных стволовых клеток мышей была увеличена с помощью мутагенеза соответственно в 17 и в 9 раз [57]. Также был получен вариант транспозазы с повышенным уровнем вырезания и очень низким уровнем обратного встраивания транспозона [58].

Приведенные выше данные позволяют создать удобный и эффективный инструмент на основе транспозона *piggyBac* для работы с различными типами клеток.

До недавнего времени лидирующую позицию среди ДНК-транспозонов, применяемых для генетической модификации организмов, имел транспозон *Sleeping Beauty*, однако его склонность к “локальному прыжку”, низкая емкость и свойство оставлять след после транспозиции снизили его привлекательность в сравнении с *piggyBac*.

На сегодняшний день при помощи *piggyBac* были проведены транспозиции в различных организмах: дрожжах, растениях, простейших, насекомых и клетках млекопитающих. Это наиболее широко используемая транспозонная система, применяемая для трансгенеза и мутагенеза, имеющая также потенциал для использования в генной терапии [30, 38].

ПРИМЕНЕНИЕ *piggyBac* ДЛЯ МУТАГЕНЕЗА

Одним из ярких примеров использования *piggyBac* в мутагенезе служит модификация паразита *Plasmodium falciparum*, вызывающего малярию. Эффективность трансфекции в данном организме очень мала, поскольку трансформирующая ДНК, чтобы попасть в ядро клетки плазмодия, должна пройти через многослойную мембрану. Сложность заключается еще и в том, что линейная ДНК разрушается раньше, чем достигает ядра, а кольцевая молекула остается в автономном состоянии. Применение транспозона *piggyBac* для трансформации позволяет решить проблемы переноса фрагмента ДНК в геном паразита [59].

Инсерционный мутагенез с помощью транспозонов также является удобным инструментом для изучения функций генов. С этой целью между флангами транспозона размещают селективный маркер и затем транспозон вводят в клетки в составе плазмиды или встраивают в определенный участок генома. При наличии транспозазы мутагенизирующий элемент начинает перемещаться по геному до тех пор, пока в клетке присутствует активный белок транспозазы *piggyBac*. Ген, обеспечивающий синтез транспозазы, может быть размещен на хромосоме под контролем регулируемого промотора или введен в клетку в составе плазмиды. Альтернативным способом продукции данного фермента внутри клетки является трансформация соответствующей мРНК или самого белка [60, 61].

В некоторых случаях транспозоны могут встраиваться в область интронов и не оказывать мутагенизирующего эффекта. Для решения данной проблемы была разработана целая серия подходов, которая заключается в добавлении в транспозон сайтов для осуществления альтернативного сплайсинга с образованием дефектной копии гена [6].

ПРИМЕНЕНИЕ *piggyBac* ДЛЯ ТРАНСГЕНЕЗА

Классические методы для осуществления стабильной экспрессии чужеродных генов в клетках позвоночных основаны на микроинъекции генетических конструкций в ооциты или зиготы. Недостатками этого метода являются низкая частота интеграции (<10%), встраивание ДНК в виде конкатамера, что может приводить к “молчанию” генов, и тот факт, что интеграция осуществляется не во все клетки, поскольку происходит на поздних стадиях эмбрионального развития. Доставка ДНК с помощью транспозонов лишена указанных недостатков, что было продемонстрировано на примере *piggyBac* с использованием человеческих клеточных линий *HEK293* и *HeLa* [55]. В клетках куриных эмбрионов с помощью *piggyBac* удалось осуществить временную и пространственную регуляцию экспрессии, а также стабильную РНК-интерференцию [62].

ПРИМЕНЕНИЕ *piggyBac* ДЛЯ ВСТРАИВАНИЯ ТРАНСПОЗОННЫХ КАССЕТ ВО МНОЖЕСТВЕ КОПИЙ

Несмотря на то, что перенос транспозона *piggyBac* происходит по механизму “вырезать-вставить”, а не “копировать-вставить”, существуют условия и методические подходы, при кото-

рых возможно увеличение числа копий транспозона или же кассет на его основе в составе генома. Двойные разрывы хромосомы, возникающие во время переноса транспозона, могут быть восстановлены путем гомологичной рекомбинации с использованием копии транспозона на гомологичной хромосоме или на сестринской хроматиде во время прохождения клеткой S-фазы развития [63]. Транспозон может быть также реплицирован дважды, если он «перепрыгнет» из уже реплицированного участка в сегмент перед репликационной вилкой [64].

Для контролируемого увеличения числа копий транспозонных кассет были разработаны подходы, заключающиеся во введении в клетку при наличии активной транспозазы *piggyBac* фрагмента для транспозиции *in trans* или в составе автономной плазмиды. Транспозаза может синтезироваться в клетке с гена, находящегося в составе хромосомы или плазмиды, а также с введенной в клетку мРНК или поступать в нее непосредственно в виде белка. Изменяя количество и соотношение транспозазы и интегрируемого фрагмента, можно варьировать количество интегративных событий на геном [60].

piggyBac В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Обладая неоспоримыми преимуществами перед транспозоном *Sleeping Beauty*, такими как транспозиция протяженных фрагментов и отсутствие следов после транспозиции, *piggyBac* не лишен на сегодняшний день ряда важных недостатков при использовании в генной терапии. Наличие транскрипционной активности инвертированного повтора на 5'-конце транспозона может влиять на близлежащие промоторы, создавая непредвиденный эффект [57]. Кроме того, *piggyBac* интегрируется преимущественно в сайты, лежащие в областях инициации транскрипции, что также ставит под вопрос безопасность его применения в терапии. [65, 66]. И наконец, в небольшом числе случаев (около 2%) транспозон все же способен интегрироваться в сайты, отличные от последовательности ТТАА, что приводит к возникновению мутаций при его последующем вырезании [67].

Несмотря на вышеперечисленные недостатки, с помощью *piggyBac* были созданы модификации клеток для борьбы с различными заболеваниями человека; эти модификации касались эмбриональных стволовых клеток [68], гемопоэтических стволовых клеток [69], индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и человеческих Т-лимфоцитов.

Т-лимфоциты являются перспективным средством в иммунотерапии рака. Так, на примере клеточной линии лимфомы было продемонстрировано, что модифицированные с применением *piggyBac* Т-лимфоциты эффективно борются с раковыми клетками [70].

Недавнее открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток разворачивает большие перспективы перед регенеративной медициной, поскольку появляется возможность легко получать такие клетки и превращать их в любые типы клеток. С помощью экспрессии только четырех генов, кодирующих транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Klf4 и c-Мус, соматическим клеткам может быть придана способность, присущая стволовым клеткам эмбрионов. Ранее такое превращение осуществляли путем трансдукции ретро- или лентивирусами, что вызывало сомнения в безопасности полученных конструкций. Альтернатива указанной процедуре заключалась в разработке и применении системы трансформации на основе *piggyBac*, обладающей высокой эффективностью, а также способностью вырезать интегрированный фрагмент после перепрограммирования клетки, оставляя ее геном в неизменном состоянии [71, 72].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что транспозон *piggyBac* обладает целым набором уникальных свойств, которые дают исследователю возможность выбора при создании удобных инструментов для исследования и модификации организмов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57914X0013).

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of RF (Project Unique Identifier RFMEFI57914X0013).

ЛИТЕРАТУРА

- McClintock B. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics*, 1953, 38(6), 579–599.
- Perrat P.N., DasGupta S., Wang J., et al. Transposition-driven genomic heterogeneity in the *Drosophila* brain. *Science*, 2013, 340(6128), 91–95. doi: 10.1126/science.1231965
- Mills R.E., Bennett E.A., Iskow R.C., and Devine S.E. Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet.*, 2007, 23(4), 183–191. doi: 10.1016/j.tig.2007.02.006
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K., et al. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, 1996, 274(5288), 765–768. doi: 10.1126/science.274.5288.765
- Kazazian H.H. Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 2004, 303(5664), 1626–1632. doi: 10.1126/science.1089670
- Ivics Z., Li M.A., Mötts L., et al. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat. Methods.*, 2009, 6(6), 415–422. doi: 10.1038/nmeth.1332
- Fraser M.J., Smith G.E., and Summers M.D. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: Relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 1983, 47(2), 287–300.
- Fraser M.J. FP mutation of nuclear polyhedrosis viruses: A novel system for the study of transposon-mediated mutagenesis. In: *Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture* [Ed. K. Maramorosch]. N. Y.: Academic Press, 1987, 265–293.
- Cary L.C., Goebel M., Corsaro B.G., et al. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 1989, 172(1), 156–169. doi: 10.1016/0042-6822(89)90117-7
- Fraser M.J., Ciszczon T., Elick T., and Bauser C. Precise excision of TTAA-specific Lepidopteran transposons TFP3 and IFP2 from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.*, 1996, 5(2), 141–151. doi: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00048.x
- Galas D. J., Calos M. P., and Miller J.H. Sequence analysis of Tn9 insertions in the lacZ gene. *J. Mol. Biol.*, 1980, 144(1), 19–41. doi: 10.1016/0022-2836(80)90213-2
- Meyer J., Iida S., and Arrer W. Does the insertion element IS1 transpose preferentially into A+T-rich DNA segments? *Mol. Gen. Genet.*, 1980, 178(2), 471–473. doi: 10.1007/bf00270502
- Eibel H., and Philippsen P. Preferential integration of yeast transposable element Ty into a promoter region. *Nature.*, 1984, 307(5949), 386–388. doi: 10.1038/307386a0
- Handler A.M., McCombs S.D., Fraser M.J., and Saul S.H. The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(13), 7520–7525. doi: 10.1073/pnas.95.13.7520
- Handler A.M., and McCombs S.D. The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Mol. Biol.*, 2000, 9(6), 605–612. doi: 10.1046/j.1365-2583.2000.00227.x
- Penton E.H., Sullender B.W., and Crease T.J. Pokey, a new DNA transposon in *Daphnia* (cladocera: crustacea). *J. Mol. Evol.*, 2002, 55(6), 664–673. doi: 10.1007/s00239-002-2362-9

17. Sarkar A., Sim C., Hong Y.S., et al. Molecular evolutionary analysis of the widespread *piggyBac* transposon family and related “domesticated” sequences. *Mol. Genet. Genomics*, 2003, 270(2), 173–180. doi: 10.1007/s00438-003-0909-0
18. Wu M., Sun Z.C., Hu C.L., et al. An active *piggyBac*-like element in *Macdunnoughia crassisigna*. *Insect Sci.*, 2008, 15(6), 521–528. doi: 10.1111/j.1744-7917.2008.00241.x
19. Xu H.F., Xia Q.Y., Liu C., et al. Identification and characterization of *piggyBac*-like elements in the genome of domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics*, 2006, 276(1), 31–40. doi: 10.1007/s00438-006-0124-x
20. Bonasio R., Zhang G., Ye C., et al. Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Science*, 2010, 329(5995), 1068–1071. doi: 10.1126/science.1192428
21. Hikosaka A., Kobayashi T., Saito Y., and Kawahara A. Evolution of the *Xenopus piggyBac* transposon family TxpB: domesticated and untamed strategies of transposon subfamilies. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, 24(12), 2648–2656. doi: 10.1093/molbev/msm191
22. Mitra R., Li X., Kapusta A., et al. Functional characterization of *piggyBat* from the bat *Myotis lucifugus* unveils an active mammalian DNA transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(1), 234–239. doi: 10.1073/pnas.1217548110
23. Ray D.A., Feschotte C., Pagan H.J., et al. Multiple waves of recent DNA transposon activity in the bat, *Myotis lucifugus*. *Genome Res.*, 2008, 18(5), 717–728. doi: 10.1101/gr.071886.107
24. Baudry C., Malinsky S., Restituito M., et al. *piggyMac*, a domesticated *piggyBac* transposase involved in programmed genome rearrangements in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Genes Dev.*, 2009, 23(21), 2478–2483. doi: 10.1101/gad.547309
25. Cheng C.Y., Vogt A., Mochizuki K., and Yao M.C. A domesticated *piggyBac* transposase plays key roles in heterochromatin dynamics and DNA cleavage during programmed DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Biol. Cell.*, 2010, 21(10), 1753–1762. doi: 10.1091/mbc.E09-12-1079
26. Pavelitz T., Gray L.T., Padilla S.L. et al. PGBD5: a neural-specific intron-containing *piggyBac* transposase domesticated over 500 million years ago and conserved from cephalochordates to humans. *Mob. DNA.*, 2013, 4(1). doi: 10.1186/1759-8753-4-23
27. Finnegan D.J. Transposable elements and DNA transposition in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Bio.*, 1990, 2(3), 471–477. doi: 10.1016/0955-0674(90)90130-7
28. Weil C.F., and Kunze R. Transposition of maize Ac/Ds transposable elements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.*, 2000, 26(2), 187–190. doi: 10.1038/82827
29. Ivics Z., and Izsvök Z. Sleeping beauty transposition. *Microbiol Spectr.*, 2015, 3(2). doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014
30. Mitra R., Fain-Thornton J., and Craig N.L. *piggyBac* can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J.*, 2008, 27(7), 1097–1109. doi: 10.1038/emboj.2008.41
31. Yusa K., Zhou L., Li M.A., et al. A hyperactive *piggyBac* transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108(4), 1531–1536. doi: 10.1073/pnas.1008322108
32. Rice P.A., and Baker T.A. Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8(5), 302–307. doi: 10.1038/86166
33. Richardson J.M., Dawson A., O’Hagan N., et al. Mechanism of Mos1 transposition: insights from structural analysis. *EMBO J.*, 2006, 25(6), 1324–1334. doi: 10.1038/sj.emboj.7601018
34. Yuan Y.W., and Wessler S.R. The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108(19), 7884–7889. doi: 10.1073/pnas.1104208108
35. Keith J.H., Fraser T.S., and Fraser M.J.Jr. Analysis of the *piggyBac* transposase reveals a functional nuclear targeting signal in the 94 c-terminal residues. *BMC Mol. Biol.*, 2008, 9(1), 72. doi: 10.1186/1471-2199-9-72
36. Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.*, 2006, 31(1), 35–40. doi: 10.1016/j.tibs.2005.11.001
37. Fraser M.J., Cary L., Boonvisudhi K., and Wang H.G. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. *Virology*, 1995, 211(2), 397–407. doi: 10.1006/viro.1995.1422
38. Horn C., and Wimmer E.A. A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev. Genes Evol.*, 2000, 210(12), 630–637. doi: 10.1007/s004270000110
39. Beames B., and Summers M.D. Sequence comparison of cellular and viral copies of host cell DNA insertions found in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1990, 174(2), 354–363. doi: 10.1016/0042-6822(90)90089-A
40. Handler A.M., and Harrel R.A. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol. Biol.*, 1999, 8(4), 449–457. doi: 10.1046/j.1365-2583.1999.00139.x
41. Berghammer A., Bucher G., Maderspacher F., and Klingler M. A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Genes Evol.*, 1999, 209(6), 382–389. doi: 10.1007/s004270050268
42. Handler A.M., and Harrel R.A. Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a *piggyBac* vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 31(2), 199–205. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00119-3
43. Tamura T., Thibert C., and Royer C. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18(1), 81–84. doi: 10.1038/71978
44. Hediger M., Niessen M., Wimmer E.A., et al. Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon *piggyBac*. *Insect Mol. Biol.*, 2001, 10(2), 113–119. doi: 10.1046/j.1365-2583.2001.00243.x

45. Elick T.A., Lobo N., and Fraser M.J.Jr. Analysis of the cis-acting DNA elements required for *piggyBac* transposable element excision. *Mol. Gen. Genet.*, 1997, 255(6), 605–610. doi: 10.1007/s004380050534
46. Li X., Lobo N., Bauser C.A., and Fraser M.J.Jr. The minimum internal and external sequence requirements for transposition of the eukaryotic transformation vector *piggyBac*. *Mol. Genet. Genomics*, 2001, 266(2), 190–198. doi: 10.1007/s004380100525
47. Goryshin Yu., Kil Y.V., and Reznikoff W.S. DNA length, bending, and twisting constraints on IS50 transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91(23), 10834–10838. doi: 10.1073/pnas.91.23.10834
48. Haniford D.B., Benjamin H.W., and Kleckner N. Kinetic and structural analysis of a cleaved donor intermediate and a strand transfer intermediate in Tn10 transposition. *Cell*, 1991, 64(1), 171–179. doi: 10.1016/0092-8674(91)90218-N
49. Bainton R., Gamas P., and Craig N.L. Tn7 transposition in vitro proceeds through an excised transposon intermediate generated by staggered breaks in DNA. *Cell*, 1991, 65(5), 805–816. doi: 10.1016/0092-8674(91)90388-f
50. Beall E.L., and Rio D.C. *Drosophila* P-element transposase is a novel site-specific endonuclease. *Genes Dev.*, 1997, 11(16), 2137–2151. doi: 10.1101/gad.11.16.2137
51. Li X., Harrell R.A., Handler A.M. et al. *PiggyBac* internal sequences are necessary for efficient transformation of target genomes. *Insect. Mol. Biol.*, 2005, 14(1), 17–30. doi: 10.1111/j.1365-2583.2004.00525.x
52. Lacoste A., Berenshteyn F., and Brivanlou A.H. An efficient and reversible transposable system for gene delivery and lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells. *Cell. Stem. Cell*, 2009, 5(3), 332–342. doi: 10.1016/j.stem.2009.07.011
53. Li M.A., Turner D.J., Ning Z., et al. Mobilization of giant *piggyBac* transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(22), e148. doi: 10.1093/nar/gkr764
54. Ding S., Wu X., Li G., et al. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3), 473–483. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.013
55. Doherty J.E., Huye L.E., Yusa K., et al. Hyperactive *piggyBac* gene transfer in human cells and *in vivo*. *Hum. Gene Ther.*, 2012, 23(3), 311–320. doi: 10.1089/hum.2011.138
56. Cadinanos, J., and Bradley A. Generation of an inducible and optimized *piggyBac* transposon system. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35(12), e87. doi: 10.1093/nar/gkm446
57. Bumight E.R., Staber J.M., Korsakov P., et al. A Hyperactive transposase promotes persistent gene transfer of a *piggyBac* DNA transposon. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2012, 1(10), e50. doi: 10.1038/mtna.2012.12
58. Li X., Bumight E.R., Cooney A.L. et al. *PiggyBac* transposase tools for genome engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(25), E2279–E2287. doi: 10.1073/pnas.1305987110
59. Balu B., Shoue D.A., Fraser M.J.Jr., and Adams J.H. High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element *piggyBac*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(45), 16391–16396. doi: 10.1073/pnas.0504679102
60. Li J., Zhang J.M., Li X., et al. A *piggyBac* transposon-based mutagenesis system for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(6), e40. doi: 10.1007/978-1-4939-0799-1_16
61. Eanes W.F., Merritt T.J., Flowers J.M., et al. Direct evidence that genetic variation in glycerol-3-phosphate and malate dehydrogenase genes (Gpdh and Mdh1) affects adult ethanol tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2009, 181(2), 607–614. doi: 10.1534/genetics.108.089383
62. Lu Y., Lin C., and Wang X. *PiggyBac* transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37(21), e141. doi: 10.1093/nar/gkp686
63. Engels W.R., Johnson-Schlitz D.M., Eggleston W.B., and Sved J. High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell*, 1990, 62(3), 515–525. doi: 10.1016/0092-8674(90)90016-8
64. Ros F., and Kunze R. Regulation of activator/dissociation transposition by replication and DNA methylation. *Genetics*, 2001, 157(4), 1723–1733. doi: 10.1186/1759-8753-4-15
65. Huang X., Guo H., Tammana S., et al. Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and *piggyBac* transposons in human primary T cells. *Mol. Ther.*, 2010, 18(10), 1803–1813. doi: 10.1038/mt.2010.141
66. Gogol-Doring A., Ammar I., Gupta S., et al. Genome-wide profiling reveals remarkable parallels between insertion site selection properties of the MLV retrovirus and the *piggyBac* transposon in primary human CD4(+) T cells. *Mol. Ther.*, 2016, 24, 592–606. doi: 10.1038/mt.2016.11
67. Li M.D., Bronson D.L., Lemke T.D., and Faras A.J. Phylogenetic analyses of 55 retroelements on the basis of the nucleotide and product amino acid sequences of the pol gene. *Mol. Biol. Evol.*, 1995, 12, 657–670. doi: 10.2307/2419717
68. Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302(5644), 415–419. doi: 10.1126/science.1088547
69. Grabundzija I., Irgang M., Mates L., et al. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. *Mol. Ther.*, 2010, 18(6), 1200–1209. doi: 10.1038/mt.2010.47
70. Manuri P.V., Wilson M.H., Maiti S.N., et al. *PiggyBac* transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum. Gene Ther.*, 2010, 21(4), 427–437. doi: 10.1089/hum.2009.114
71. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., et al. *PiggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239), 766–770. doi: 10.1038/nature07863
72. Yusa K., Rad R., Takeda J., and Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the *piggyBac* transposon. *Nat. Methods.*, 2009, 6(5), 363–369. doi: 10.1038/nmeth.1323

piggyBac Transposon as a Tool in Genetic Engineering

I.A. LAPTEV*, N.M. RAEVSKAYA, N.A. FILIMONOVA, and S.P. SINEOKY

*The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika),
117545, Moscow Russia*

**e-mail*: ivanlaptev@mail.ru

Received November 23, 2016

Abstract – Transposons are mobile elements that comprise DNA of numerous organisms and belong to two classes. Unlike the I class transposons, II class DNA transposons do not use the stage of RNA synthesis in their transition; they perform it by the *cut-and-paste* mechanism or using replicative transposition. The integration of a DNA transposon in a new site results in the duplication of a target sequence on either side of a transposon, and its excision is associated as a rule with insertions and deletions. The *piggyBac* transposon that has been isolated from a *Trichoplusia ni* butterfly differs from other mobile elements of its class. Due to its unique capacities of leaving no traces after the excision from an insertion site, carrying out the successful transposition and transferring large DNA fragments, *piggyBac* is a convenient tool for the development of gene engineering approaches. The TTAA sequence serves as a target site for the transposon integration: the insertion in AT-rich DNA regions is more frequent. The ability of *piggyBac* to be transferred to a new area independently from the cell apparatus and to unmistakable restoration of a DNA site after excision lies in the mechanism of its transposition that is discussed in detail in the present review. Along with other transposons and viruses, the *piggyBac* transposon is widely used in transgenesis of various organisms; it also finds application in insertion mutagenesis and gene therapy.

Key words: DNA, mutagenesis, *piggyBac*, transposition, transposon.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-6-35-44