Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*

台大醫院皮膚部 洪楨邦 醫師
台大醫學院分子醫學研究所吳君泰 老師

Development. 2007 Oct;134(20):3571-84

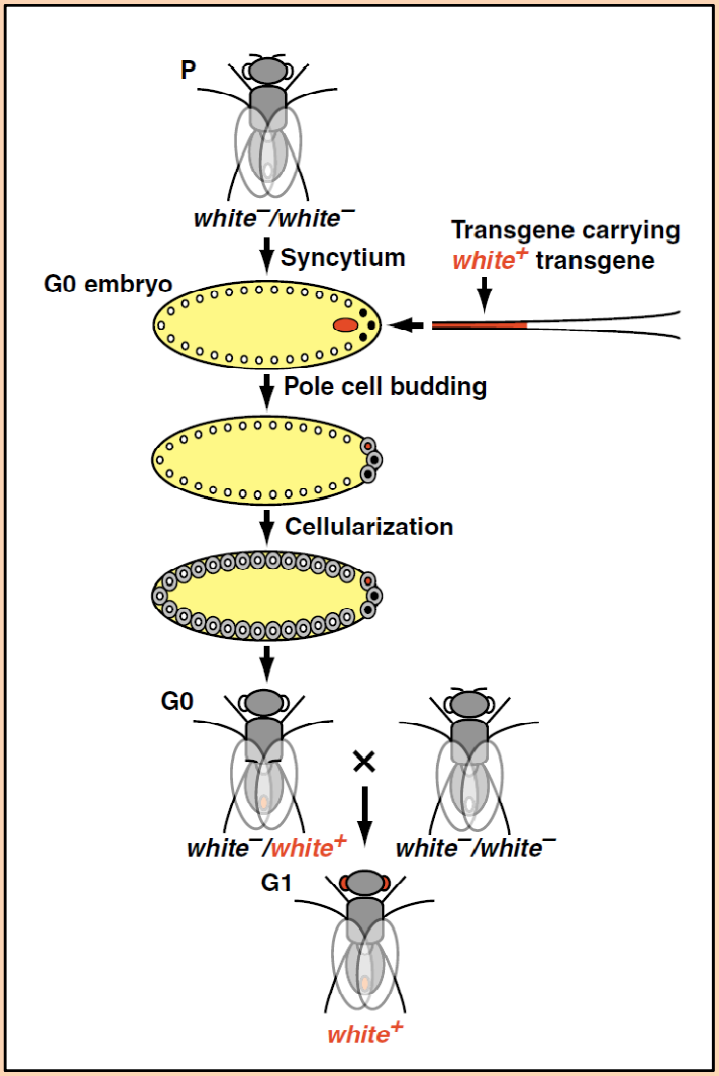
參考文獻:

Koen J.T. Venken and Hugo J. Bellen (2007) Transgenesis upgrades for Drosophila melanogaster. *Development*134(20): 3571-84.

果蠅(***Drosophila melanogaster***)是對發育、基因、細胞生物學、神經科學與疾病研究非常有吸引力的模式生物。以往是以**transposon-mediated integration of DNA**為主要的操作方式，最近幾年則發展了**transgenic techniques**使**DNA integrated**至特定的**DNA**位置，而這個進展則可加速**structure-function analyses of genes.**

傳統Drosophila transgenesis

由於果蠅的G0代(parental generation, P)embryo在發育早期(小於1小時)，會nuclear division without cell division，所以打入的transgene就有機會進到pole cell → germ cell，所以只要再與另一隻果蠅交配就可以生下帶有transgene的G1代. 右圖以帶有eye color(眼色) marker (white^{+})的transgene為例，由原本white$^{(-)}$ mutant白眼色的父代果蠅的background之下，從G1代挑出有深眼色的果蠅，即為transgene成功的例子.



Transposon-mediated transgenesis之應用與限制

主要在果蠅的運用有二:

Gene disruption methods: transposon insertion into gene時，干擾此gene的功能。

Transgenic technology: 有數種不同的應用，transposon-mediated phenotypic rescue of a mutation是做rescue實驗時的convincing evidence。然而，傳統的high-copy-number plasmids(包含*P*-element containing plasmids，最大只能帶20~25kb DNA)，雖然後來有改良將*P* element放到cosmid backbone(可帶40~50kb DNA)，但是要拿到integrated 30-50kb *P* element-based cosmid並不容易。因此，現在的transgenic cDNA rescue實驗，仍然是基於*GAL4/UAS* system.

➡ **GAL4是yeast transcriptional activator, 它的high-affinity binding site是UAS(upstream activating system). 當需要ectopically表現一個gene時，可以選tissue specific GAL4 drosophila line去 cross to an effector line(帶有UAS fused to a gene of interest)，所以只要果蠅子代帶有GAL4與UAS，就可以specifically表現這個gene.**

Position effects

Transposon-mediated transgenesis除了上述的限制，***P* element-mediated transgenesis**還有一個很大的缺點，那就是***P* element**傾向去插入基因的**5' regulatory region.** 所以用有兩個不討喜的結果**: 1. Insertion**會造成某個基因的破壞 **2.** 由於任意插入**genome**的關係，會隨著插入點而有無法預測的**position effects:** 指**local chromosomal environment**造成**transgene**的表現量，或是表現**pattern**改變，這通常與**local chromatin configuration**或**nearby cis-acting regulatory element**有關。

要解決**position effects**也有方法，例如加入**insulator sequences, FLP recombinase-mediated transgene remobilization, *P* element replacement**，或是作費時的**gene targeting.**

這篇**review**的文章提出了一個比較有效率的方法，那就是作**site-specific transgenesis**，也就是用特殊的方法將**transgene**插入同一個**docking site**，而這個**docking site**可以是挑過的，最沒有**position effect**。以下會特別介紹實際的方法。

另外，若要做完整基因的**transgene**，就需將大的**DNA**片段帶到**transposon plasmid**去，但**transposon**要帶大的**DNA**片段並不容易，而且要在這大片段**DNA**上作**manipulation**也不十分容易，因此這篇**review**在後面也有提及**Recombineering by BAC transgenesis.**

Part I

Site-specific transgenesis for *Drosophila*

為了解決**position effect**，上述所使用的方法非常費時費力，因此，需要發展更有效的方法，適用於所有的**transgenesis model**，於是**site-specific transgenesis**即被發展出來。

現在比較常用的**site-specific transgenesis**方法有三種:

ΦC31integrase-mediated transgenesis

Cre- and FLP-mediated RMCE (recombinase-mediated cassette exchange)

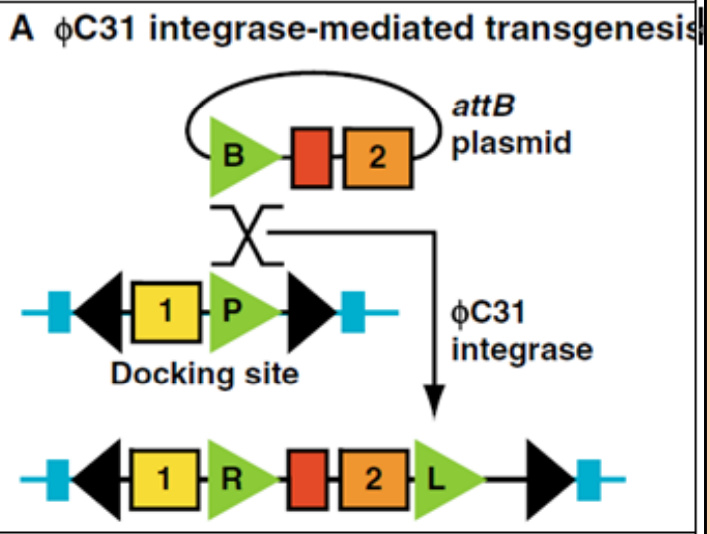
Φ31 integrase-mediated RMCE

以下依次序介紹:

I. ΦC31integrase-mediated transgenesis

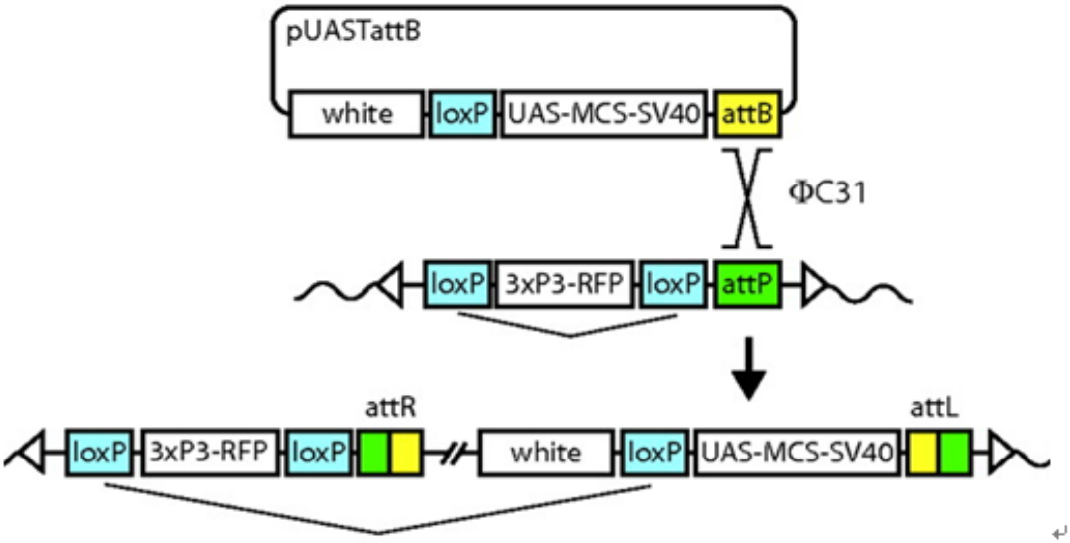
Bacteriophage 的 ΦC31integrase 可以使大片段的 DNA 插入到 donor genome 中特定的 docking site。方法是藉用催化 phage attachment site (*att*P)與 bacterial attachment site (*att*B)之間的 recombination.

(右圖係用單一個 *att*P 與 *att*B 之間的 recombination，所以 donor plasmid 的 DNA 整個都會被放到 docking site)

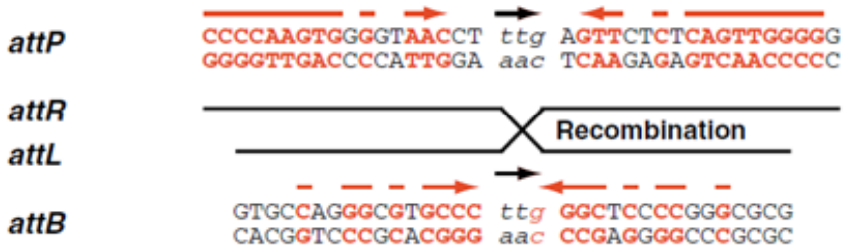


Concept:

見下圖，由於 *att*P 與 *att*B 內部的 recombination，造成(1) donor gene(帶 white marker)會插入 *att*P 所在的特定位置。(2) *att*P 與 *att*B 在 recombination 之後就不完整，變成 *att*L 與 *att*R，如此一來 ΦC31integrase 就認不得，因此，此反應為 irreversible.

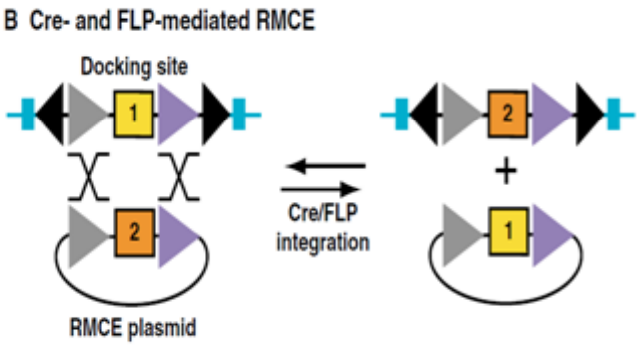


下圖為 *att*P 與 *att*B 作 recombination 的示意圖，完成後變 *att*L 與 *att*R



II. Cre- and FLP-mediated RMCE(recombinase-mediated cassette exchange)

藉由兩組 loxP 或 FRT 之間引發的 recombination，將 flanked gene 插入特定位置，再用 maker 1/2 篩選出來插入的 clone.



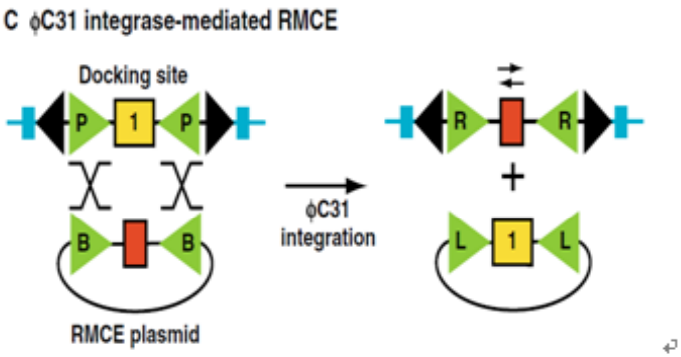
Concept:

同上圖三角型圖示，由於 recombination 中，兩個 vector 上都各帶有一組 loxP (or FRT) flanking cassette 時，可能會造成兩個 cassette 的 exchange (double-reciprocal cross-over)，或者是將自己的 cassette 剪掉，一般而言，後者較容易發生。因但如果我們在 flanking 兩端放的是 heterotypic direct-oriented recombination sites (RS)，例如 'RS1'是 *loxP*(灰)，'RS2' 是 *lox2272* (紫).因為這特別的 RS spacer variants 如 *lox2272*，會傾向於 cassette 之間的 double-reciprocal cross-over 而非 cassette deletion.

另外，由於 RS1, RS2 一直存在，因此這個 cassette exchange 是雙向性的。

III. ΦC31 integrase-mediated RMCE

綜合上述兩種方法的優點，以 ΦC31integrase 將 transgene 用 *attP* 與 *attB* flank 起來，即可將 cassette gene 置換入 docking sites.



Concept:

上圖係用兩個 *attP* 與 *attB* 之間的 recombination，所以只有 flanked cassette 會被置換到 docking site 中，不會有 cassette deletion 的問題。由於是 ΦC31 integrase，所以反應為 irreversible，但置換入的 cassette 有兩種可能的方向(箭頭)

Part II

Recombineering: BAC transgenesis for *Drosophila*

Transposon承載**Cargo**的能力不十分地好(雖然也有學者可以在**transposon**中放入**100kb**的片段)，因此限制了可以移動/插入的**DNA size.** 因此在果蠅作大片段**DNA integration**需要特別的考量**:**

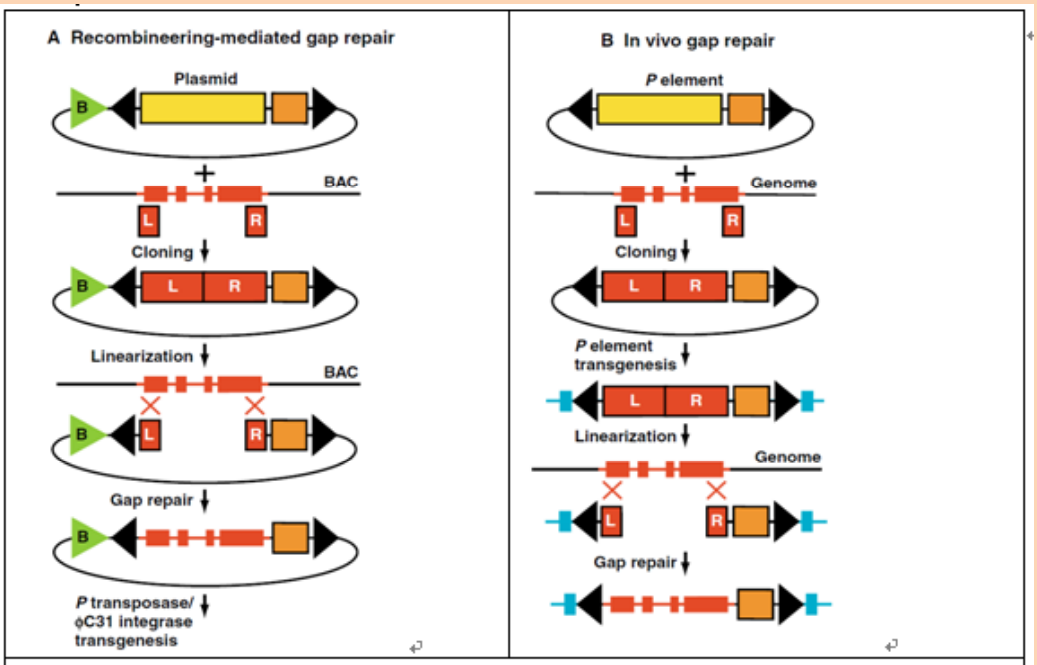
Transgene之**size limitation**，可藉由**site-specific integration system**來達成(例如**ΦC31integrase)**，然而，果蠅並不像**mouse**有**ESC (embryonic stem cell) culture system**，因此沒辦法有效率地在**germline**作**site-specific integration**。**Mouse**的系統中，因為有**ESC culture**，故可以在**ESC**中作**gene targeting**，篩選成功的**clone**，再打**blastocyst**即有機會產生**chimera**，但果蠅沒有類似的**ESC culture**，只能在**G0 embryo**操作，後代也需要每一隻果蠅都去檢查是否有帶**transgene**，因此果蠅需要一個高效率的**targeting system**，否則要挑出**positive**的子代會非常耗時耗力。

通常最大承載大小**(upper size limit of the insert)**與**plasmid copy number**呈反比，也就是可以承載較大片段**DNA**的**plasmid,** 例如**bacterial artificial chromosomes (BACs)**，只會有比較低的**copy number**，而且不幸的是，這些**plasmid**容易干擾**cloning** 與**microinjection procedures**，所以需要高量的**DNA**濃度來進行。但這點現在亦可藉由**specialized plasmid backbone**來改善(即**: conditionally amplifiable BAC**含有兩個**origins of replication,** 以增加複製的效率**)**。

在果蠅的系統中，現在已經由以下三者的結合，形成一個有效率的**recombineering platform: 1. Recombineering: recombination-mediated genetic engineering. 2. The ability to amplify plasmid copy number at will. 3. ΦC31 integrase-mediated transgenesis**。

承上的第1點，用gap repair來達成recombineering，而gap repair方法的好處是，可以從amplifiable BAC backbone中，獲得大片段的gene(即在low-copy number BAC中，利用gap repair的方式夠效率地進行recombineering，再將gene fragment帶入high-copy and medium-copy number plasmid)。若選的是High and medium-copy plasmid，最大可承載30 (high)~80(medium) kb的DNA；若是maintaining the plasmids at low copy number，最大到102kb仍可有效率地經gap-repair接到plasmid上.

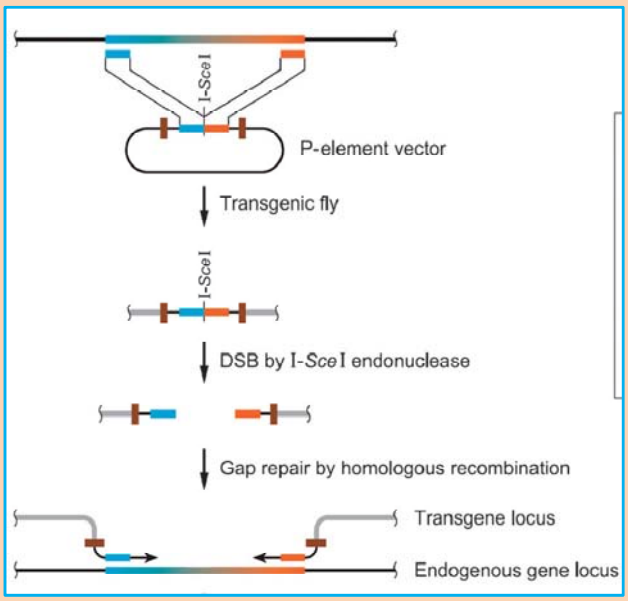
見下頁圖，在一般的bacteria中進行recombineering，設計*P* element transposon帶有homologous arm: L與R接在一起，cloning時將L與R中間切開，即可以利transposon上的L與R的homologous recombination來將BAC gene置換入plasmid中(BAC中同時有這兩段序列，但分別在5'及3'端，因此原本的transposon的L與R需切開才能做recombination)。



Concept:

Gap repair 只是將前述的 RMCE(recombination-mediated cassette exchange)的方法套用，差別在於帶有 transposon 的 plasmid 上，會經由 meganuclease (認 18bp recognition site 的 endonuclease，所以不會亂切到其他的部分)，將設計好的 L 與 R 兩個 homologous 切開(gap 產生)，就可以去認 BAC 上或 Host cell genome 上的大段 DNA 片段的 5' and 3' ends，homologous recombination 之後，就可以將此大段的 DNA 接到 gap 處，即 gap repair.

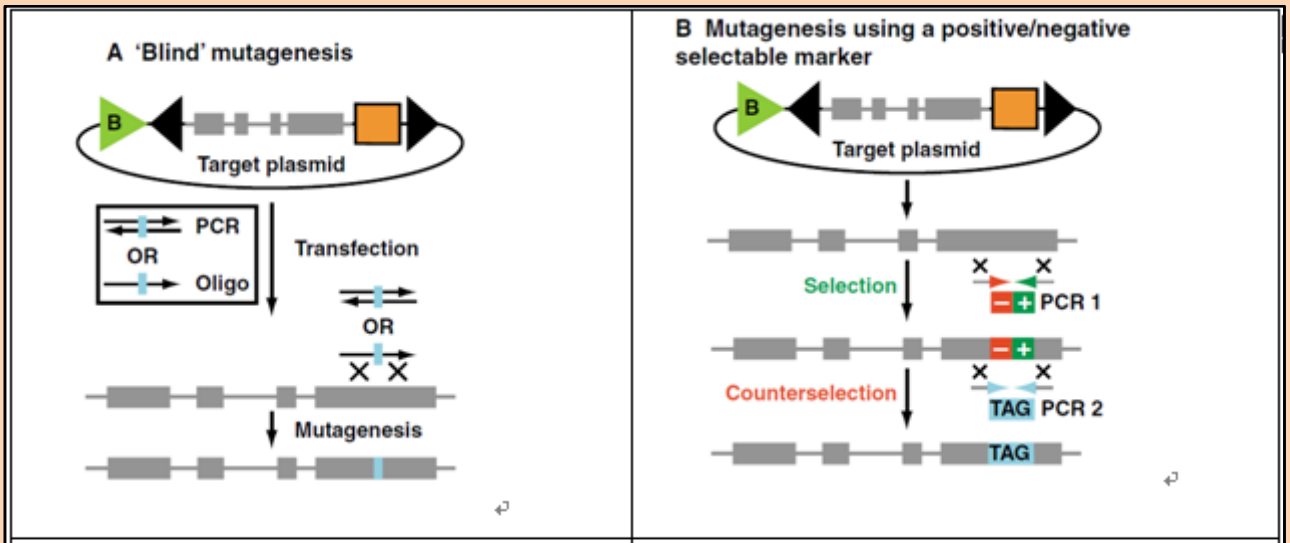
見下圖，**in vivo gap repair**與上述圖**A**很像，只是將**BAC**換成**fly genome**，先將**homologous arm clone**入***P* element**，作出**transgenic fly**，再藉由**endogenous fly enzyme (cross**帶有**I-*Sce*I**的**strain)**將兩個**arm(**藍橘**)**切開後，將**cell genome**中的大**DNA**片段，經由**homologous recombineering**的方式帶入***P* element transposon:**



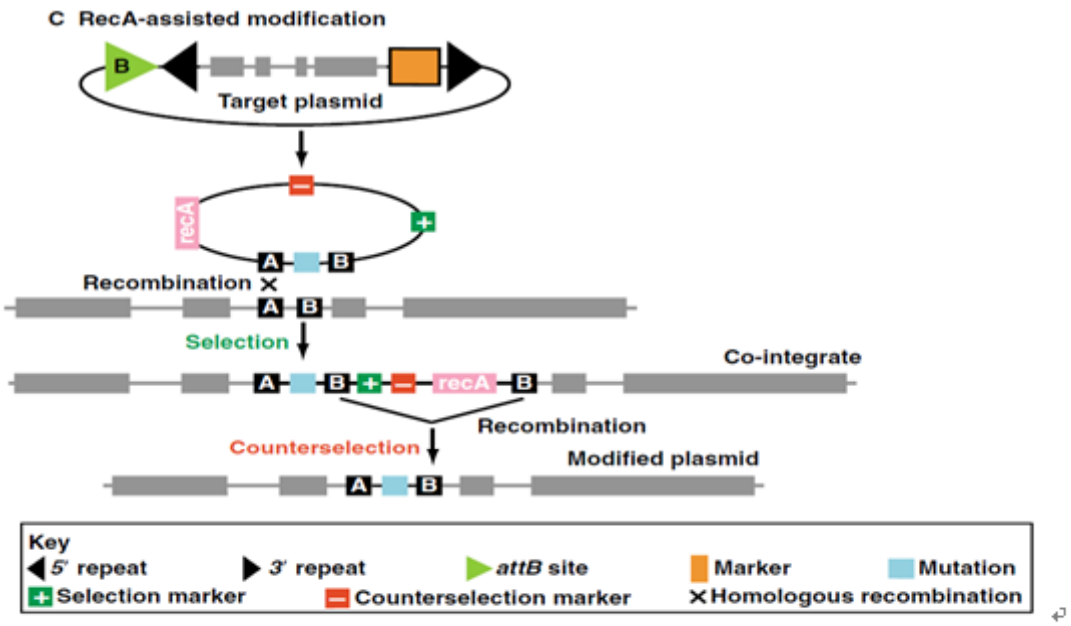
Reference:
In vivo construction of transgenes in Drosophila.
Genetics **175**,2019-2028.

由於對大片段**DNA**而言，**restriction enzyme**與**DNA ligase**並不容易操作，越大的**plasmid size**會造成**unique cutting sites**數目的減少，因此還是作**recombineering**比較容易。這一點對**mouse genetic engineering**很重要，因為**mouse genes**與人一樣，有很多**multiple distant regulatory regions**，**size**太大，所以很難用**high-copy plasmid backbones**來處理，因此需採用**BAC modification by recombineering**的方法來操作。

最後這一個部分來介紹如何作**recombineering-mediated mutagenesis** (下圖): 發展**recombineering**技術還有一個很大的用處，那就是做出含**mutation**的**gene**片段，由上一段可以知道，大**size DNA**的操作不容易用**restriction enzyme**與**ligation**來達成，因此，若要在大片段的**DNA**(或是基因)上製造**mutagenesis**，最好還是用**recombineering**的方法，將設計好的**mutation template**，以**homologous recombination**的方法置換入**target DNA**中，以下介紹三種在果蠅常用的**recombinering mutagenesis.**



簡單將 mutation 帶入 target plasmid 的方法:利用帶有 mutation 的 PCR fragment 或 oligonucleotide，與 plasmid 上的 homologous arm 作 recombination，再去 screen 那些 bacteria clone 帶有這一 mutation.	**利用 positive&negative selection 來帶入 target DNA:** 與 A 圖類似，但先經由 recombineering 帶入 positive&negative selection marker(+ -)，藉 positive selection 篩選出成功 target 入 marker 的 clone; 接著再做 target DNA(這邊是 TAG)的 recombineering，理論上，有成功 target TAG 的 clone，由於去除了 negative selection marker，所以在 negative selection(即上圖的 counterselection)時會存活下來，即可達到有效率的篩選.



Rec-A assisted modification: 概念承上，但 counterselection 的部分，是藉由帶入一個 B arm，與原來的 B arm 會在 recAgene 的產物(RecA protein)作用之下，將兩個 B arm 中間的部分切除掉，於是失去 negative selection maker，在 counterselection 時存活下來

總結:

這一篇**review article**最重要的是告訴我們如何在果蠅的系統中，由於沒有**mouse**的**ESC culture**，因此做**targeting**最有效率的方法仍是以**transposon system**做**transgenesis**，但是**transgenesis**會遇到兩個很大的問題，第一是**position effect**，第二則是**transposon**能攜帶的**cargo size**有限，這篇文章最大的重點就是在解決這兩個問題: 關於**position effect**的問題，可以用**ΦC31 integrase-mediated transgenesis**，固定選擇一個最小**position effect**的**docking site**，來將**position effect**給中和掉。至於**carrier cargo size**的問題，則是用**recombineering-mediated genetic engineering**來操作大片段的基因，同時利用**medium/low-copy number plasmid**來增加可攜帶的**DNA cargo size**。