

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ СОЗДАНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ KNOCK-IN-ВАРИАНТА ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Arabidopsis thaliana*

© 2020 г. П. А. Белавин^а, Н. В. Пермякова^а, А. А. Загорская^а, Т. В. Маренкова^а,
Ю. В. Сидорчук^а, Е. А. Уварова^а, С. М. Розов^а, Е. В. Дейнеко^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

*e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 05.11.2019 г.

После доработки 16.01.2020 г.

Принята к публикации 16.01.2020 г.

Подробно рассмотрены особенности создания генно-инженерного инструментария для геномного редактирования в варианте *knock-in* на примере доставки гена *gfp* в два района-мишени (район ядрышкового организатора и район одного из генов гистона H3) генома *Arabidopsis thaliana* с применением различных способов доставки экзогенных ДНК (агробактериальная трансформация, биобаллистика с использованием различных векторов и РНП-комплексов). Рассмотрены различия в подходах к созданию конструкций матрицы-донора и инструментария Cas9 в зависимости от выбранного способа доставки. Выбранные районы-мишени представляют интерес для дальнейших биотехнологических исследований по созданию линий-биопродуцентов рекомбинантных белков, поскольку относятся к районам генов “домашнего хозяйства” и характеризуются высокой транскрипционной активностью. Установлено, что выбранные районы не равнозначны между собой в качестве мишеней для встраивания экзогенных ДНК. Сложная компартиментализация ядрышка, а также уникальный механизм “нейтрализации” двунитевых разрывов выступают в качестве барьеров, препятствующих доставке генно-инженерного инструментария в этот район. Второй район генов “домашнего хозяйства” (район гена гистона H3.3) представляется доступным и может быть использован для геномного редактирования по варианту *knock-in*.

Ключевые слова: *A. thaliana*, геномное редактирование, *knock-in*, ядрышковый организатор, ген гистона H3.3, культура клеток

DOI: 10.31857/S001533032004003X

ВВЕДЕНИЕ

Открытие сайт-специфических эндонуклеаз позволило исследователям вносить программируемые изменения в геном, открыв широкие возможности для целевого мутагенеза и геномного редактирования. Такие эндонуклеазы, самой известной из которых является эндонуклеаза Cas9, индуцируют двунитевые разрывы в целевом районе генома, которые затем репарируются клеточными системами по пути негомологичного сращивания концов, что может привести к микромутациям и нокаутированию гена, или по пути более точной гомологичной репарации [1–3]. Если при осуществлении гомологичной репарации будет предоставлена матрица, несущая не только гомологичные месту двунитевого разрыва последовательности, но и какой-то дополнительный участок ДНК или целый дополнительный ген, то результатом такой репарации может быть целевое изменение гена

или целевое встраивание дополнительного гена в заданный район генома – *knock-in* [4–6].

Несмотря на то, что к настоящему моменту времени уже известно несколько десятков успешных примеров геномного редактирования в варианте *knock-out* целевых генов в геноме высших растений [7–9], для получения *knock-ins* эффективная технология все еще не разработана [5, 6]. Именно эта часть технологии геномного редактирования заслуживает самого пристального внимания со стороны исследователей, поскольку успешность проведения *knock-in* целевого гена в заранее выбранный район генома определяется многими факторами, среди которых оптимально подобранный генно-инженерный инструментарий представляется как один из наиболее важных [5].

Компоненты для *knock-in*, а именно Cas9, направляющая РНК (sgРНК) и гомологичная матрица, могут быть доставлены в растительную клетку в виде векторов методом биобаллистики или агро-

бактериальной трансформации, а также в виде готового рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) Cas9—sgРНК в смеси с вектором-матрицей с помощью генной пушки или электропорации [6, 10, 11]. Выбор способа доставки во многом диктуется работанностью для той или иной растительной системы протокола регенерации, т.е. отбора и восстановления полноценного растения из отдельной клетки, в которой успешно произошло редактирование выбранного исследователем сайта генома [6, 12, 13]. Наиболее сложным *knock-in*-вариантом является встраивание в заданный район генома целевого гена со всеми соответствующими управляющими элементами [4]. В зависимости от того, какой из подходов выбран исследователем для дальнейшего геномного редактирования растительного объекта, на этапе создания генно-инженерного инструментария, а также выбора места интеграции целевого гена в геном растения могут возникнуть определенные сложности, связанные именно с выбором места и способа доставки.

Цель работы — анализ особенностей создания генно-инженерного инструментария для *knock-in*-варианта геномного редактирования культуры клеток *Arabidopsis thaliana* в зависимости от способов их доставки в целевой район-мишень и эффективности выбора района-мишени. Для доставки в заданный район генома в генно-инженерных конструкциях в качестве репортерного был использован ген *gfp*, кодирующий зеленый флюоресцирующий белок. В качестве районов мишеней были использованы районы расположения генов “домашнего хозяйства”: ядрышкового организатора и район расположения одного из генов гистона H3.3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Исходным растительным материалом послужила быстрорастущая клеточная линия *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Columbia, инбредная линия Col-0), любезно предоставленная д.б.н. Носовым А.В. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва), депонированная во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВКККР, <http://www.ippras.ru/cfc/alccsr/>) под № 85 и обозначенная как NFC-0 [14].

Плазмиды, несущие Cas9 и направляющую РНК

Плазмиды pBlu/gRNA (№59188) для промежуточного этапа клонирования и Cas9 MDC123 (№59184) с геном эндонуклеазы Cas9 под управлением 2x35S CaMV-промотора, оптимизированным для экспрессии в клетках *Glycine max*, были получены в дар от Р. Ступара [15] из репозитория Addgene. Плаزمида pBlu/gRNA несет кассету sgРНК под управлением промотора U6 *A. thaliana* и использу-

ется как промежуточный вектор для встраивания подобранных спейсерных участков в последовательность sgРНК.

Источники элементов генетических конструкций для проведения knock-in

Нуклеотидные последовательности для создания генетических конструкций получали методом ПЦР с использованием соответствующих олигонуклеотидов и матриц. Для последовательностей, фланкирующих сайт интеграции целевого гена, матрицей служила геномная ДНК *A. thaliana*. Последовательность сигнального пептида, направляющего синтезированный белок в апопласт, была синтезирована на матрице геномной ДНК *Daucus carota*. Последовательность ITS, обеспечивающая остановку сплайсинга, была получена на матрице геномной ДНК *A. thaliana*. Для синтеза последовательностей генов *hptII* и *gfp* в качестве матрицы использовалась плаزمида pCambia pGFP, созданная в лаборатории ранее на основе плазмиды pCambia1300. Для синтеза последовательностей гена *nptII* и промотора CaMV35S вируса мозаики цветной капусты матрицей служила плазмида pVi121.

Подбор направляющей РНК

В качестве районов-мишеней для интеграции целевого гена были выбраны два района: область межгенного спейсера генов рРНК и область гена гистона H3.3. Подбор направляющей РНК для модификации области межгенного спейсера генов рРНК проводили с помощью программного обеспечения Stupar Lab's CRISPR Design (<http://cfans-pmorrell.oit.umn.edu/CRISPR>). При подборе за основу была взята последовательность TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>, AT2G01010), длиной 1866 п.н. Для подбора направляющей РНК для встраивания в район гена гистона H3.3 использовали программное обеспечение CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>). За основу была взята последовательность, расположенная между геном, кодирующим гистон H3.3 (AT4G40040), и соседним геном, кодирующим 12КДа субъединицу микросомальной сигнальной пептидазы (AT4G40042), предшествующим кодирующей области гена гистона H3.3. В таблице 1 представлены последовательности олигонуклеотидов, использованных для создания генно-инженерного инструментария и анализа событий геномного редактирования клеточных культур *A. thaliana*.

Создание генетических конструкций Cas9rRNA и Cas9H33 для внесения двуниевых разрывов в выбранные районы-мишени

Подобранные последовательности, определяющие специфичность направляющей sgРНК, были

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для создания генетических конструкций

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность
gRNA_rRNA Up	GATTGGCATCGACACCTTGCGGCT
gRNA_rRNA Lo	AAACAGCCGCAAGGTGTCGATGCC
1_gRNA_H Up	GATTCGGCCTAAACTAAATCCGAA
2_gRNA_H Lo	Lo AA ACTTCGGATT TAGTTTAGGCCG
Up_LF(RI)(64)	CAGTGAATTCGGCCGGATGTCCGAGAAAA;
LF_Lo(62C)(hptII-20b)	AGAGTGTGCTGCTCCACCATTGTCGATGCCCATGGGCGA
Up_hptII(RI-Bso)(66)	CCCGAATTCGGTCTCACGACACTCTCGTCTACTCCA
Lo_hptII (PctI)HIII(64)	CCCAAGCTTAGCATTCCTATTTCTTTGCCCTCGGACG
Up ITS2(PctI)RI(64)	CCCGAATTCGAATGCAATCGTCCCTCACCATCC
ITS2_RF(20)(Low70)	TCCAGTTCCTAGCCGCAAGGTATATGGACTTTGGGTCATCTACAG
RF_Up(64C)	CCTTGCGGCTAGGAACTGGA
Lo_RF(HIII)(64)	CCCAAGCTTGACCGTCATCTTTTGCCC
Up_35S(PctI)RI(60)	CCCGAATTCGAATGCTAACCCACAGATGG
Lo_35S(PctI)HIII(60)	CCCAAGCTTGCAATTCGGTACCAAAGGGA
Up_sig.Bam(72)	CCCGGATCCATGGGAAGAATTGCTAGAGGCTCAA
Lo_sig(72)	AGCTGTGGTTTCGGAAGCCAAATTGA
Up(sig-64)GFP(64)	ATTTGGCTTCCGAAACCACAGCT ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Lo_GFP_Acc(64)	CCCGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Up_LF_RF: 5'	CGCCAACCTGCAGC
Lo_LF_RF: 5'	AATTGCTGCAGTTGG
Up_L_HIII	CCCAAGCTTCGAGCGATTCCAGTAGTTTCACGA
Lo_L_Acc_Sfr	GGTACCAGAGTAATCTCGAGTTTATTTTCAGCGATCCGCGACG
Up_R_Sfr_Acc	CTCGAGATTACTCTGGTACCTTCGGATTTAGTTTAGGCCGTCACA
Lo_R_Sal	CCCGTTCGACCATCATCATCCTAAACGACGCCG
Lo_A-B_pBi(58)	CGAAGGTACCGGATGGATCCCGTGTCTCTCCAAATGAAAT
Up_Xho_pBi(60)	AATCTCGAG GATCATGAGCGGAGAATTAAG
Lo_Acc_GFP(60)	CGAAGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT
Up_Bam_sig(62)	CCGGATCCATGGGAAGAATTGCTAGAGG
Up_gfp	TTGTGCCCCAGGATGTTGCC
Lo_gfp	GGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Hpt test up	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGA
Hpt test lo	CAAACGTGTGATGGACGACACCGT
LF_Up	GGACGATGAATGGGCGATGAA
LF_Lo	TGCCACCTTCTTTTCTACTGTCTT
RF_Up	GAGTTCGTGACCGCCGCCG
RF_Lo	CCGCCACATCCTCTCAAACGCA
Up_H3.3_1	AATCGCATAATCAAGAAAATCAAACCC
Up_H3.3	TAGGCAACGATGGTAAAGCGGATT
Lo_plan3	AGCCGAATAGCCTCTCCACCCAA

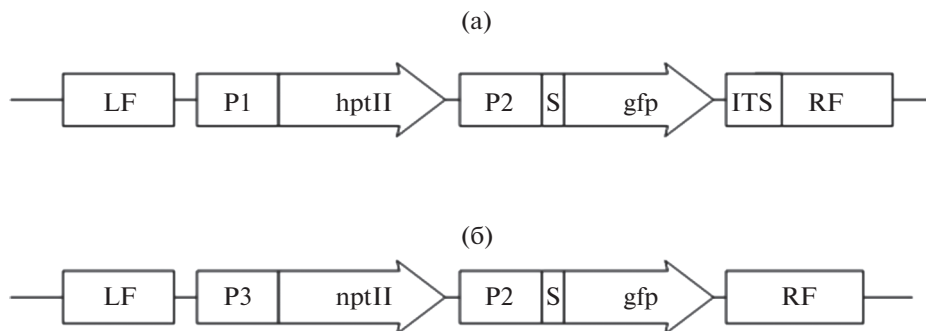


Рис. 1. Схемы строения генетических конструкций для создания векторов доставки гена *gfp* в район ядрышкового организатора (а) и область гена гистона H3.3 (б).

Обозначения: LF и RF – левая и правая фланкирующие последовательности, гомологичные соответствующим участкам в геноме *A. thaliana* (району ядрышкового организатора и межгенному участку перед геном гистона H3.3); P1 – двойной промотор CaMV35S вируса мозаики цветной капусты; P2 – одинарный промотор CaMV35S вируса мозаики цветной капусты; P3 – P-NOS-промотор нопалин синтазы *A. tumefaciens*; *hptII* – ген гигромицин фосфотрансферазы II, обеспечивающий устойчивость растительной клетки к гигромицину; *nptII* – ген неомицин фосфотрансферазы II, обеспечивающий устойчивость растительной клетки к канамицину; S – последовательность ДНК, кодирующая лидерный сигнал гена экстенсина моркови, обеспечивающий транспорт GFP-белка в апопласт; ITS – внутренний транскрибируемый спейсер 2 гена 5.8S рРНК *A. thaliana*, обеспечивающий остановку сплайсинга; *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка.

перенесены в плазмиду Cas9 MDC123 при помощи промежуточной плазмиды pBlu/gRNA с использованием соответствующих олигонуклеотидов (табл. 1): для района ядрышкового организатора – gRNA_rRNA Up и gRNA_rRNA Lo и для района гена гистона H3.3 – 1_gRNA_H Up и 1_gRNA_H Lo. Первый этап сборки конструкции состоял из гибридизации подобранных фосфорилированных олигонуклеотидов и последующей их интеграции в плазмиду pBlu/gRNA, обработанную рестриктазой *Bst*VI (“Сибэнзим”, Россия). Для подтверждения встраивания целевой последовательности, ДНК полученных клонов была секвенирована с использованием стандартного праймера T3 (табл. 1). Второй этап сборки состоял в переносе полученной sgРНК, несущей направляющую последовательность, в плазмиду Cas9 MDC123. Встраивание произошло в сайт рестрикции эндонуклеазы *Eco*RI.

Создание конструкций для интеграции целевого гена *gfp* в район ядрышкового организатора и район гена гистона H3.3

Схемы строения генетических конструкций, предназначенных для доставки целевого гена в выбранные районы-мишени, представлены на рисунке 1. Для доставки гена *gfp* в район ядрышкового организатора было создано две генетических конструкции, одна из которых была предназначена для биобаллистической трансформации (pInt-sGFP) и включала конструкцию, представленную на рисунке 1а, встроенную в плазмиду pUC19. Вторая генетическая конструкция, предназначенная для агробактериальной трансформации (pInt-sGFP-rRNA), включала эту же конструкцию (рис. 1а), встроенную в плазмиду Cas9rRNA, несущую

ген эндонуклеазы Cas9 и последовательность направляющей РНК. Для доставки *gfp* в район гена гистона H3.3 была создана генетическая конструкция (pInt-GFP-H3.3), включающая конструкцию, представленную на рисунке 1б, встроенную в плазмиду pUC19. Данная генетическая конструкция была предназначена только для биобаллистической трансформации.

Создание генетических конструкций pInt-sGFP и pInt-sGFP-rRNA для доставки гена *gfp* в район ядрышкового организатора

Схема сборки генетических конструкций pInt-sGFP и pInt-sGFP-rRNA представлена на рисунке 2. Для сборки промежуточной плазмиды pUC19_LF_hptII_35S_ITS_RF предварительно на основе вектора pUC19 были сконструированы 4 вспомогательные плазмиды и получены 4 фрагмента ДНК. С применением соответствующих олигонуклеотидов в промежуточную конструкцию были добавлены сайты рестрикции ферментов *Bgl*II и *Asc*65I, необходимые для последующих этапов клонирования.

LF-фрагмент получали при помощи ПЦР на матрице геномной ДНК *A. thaliana* с праймерами Up-LF(RI)(64) и LF-Lo(62C)(hptII-20b) (табл. 1). Фрагмент *hptII* синтезировали при помощи ПЦР на матрице плазмиды pCambiaGFP с праймерами Up_hptII(RI-Bso)(66) и Lo_hptII(PctI)HIII(64) (табл. 1). Фрагмент, содержащий правую фланкирующую последовательность (RF), объединенную с регуляторным элементом ITS2, получали с помощью ПЦР на матрице геномной ДНК *A. thaliana* с использованием двух пар праймеров – Up_ITS2(PctI)RI(64), ITS2_RF(20)(Low70) и

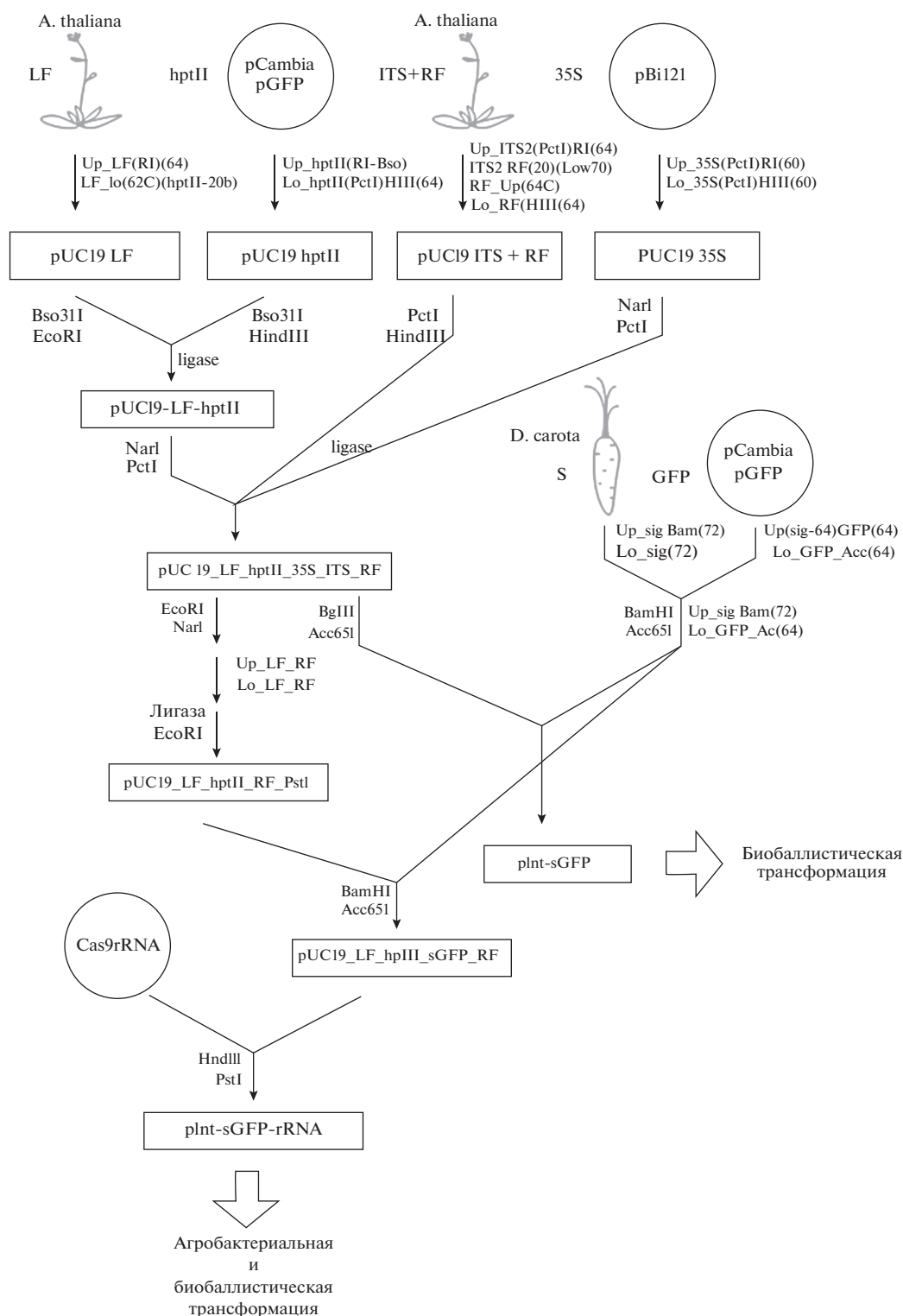


Рис. 2. Схема сборки конструкций pInt-sGFP и pInt-sGFP-rRNA.

Обозначения: pCambia pGFP, pBi121, Cas9rRNA – плазмиды, элементы которых использовались для создания конструкций (обозначены в прямоугольных рамках); LF и RF – левая и правая фланкирующие последовательности, гомологичные соответствующим участкам в геноме *A. thaliana*; *hptII* – ген гигромицин фосфотрансферазы II, обеспечивающий устойчивость растительной клетки к гигромицину; ITS – внутренний транскрибируемый спейсер 2 гена 5.8S рРНК *A. thaliana*, обеспечивающий остановку сплайсинга; 35S – промотор CaMV35S вируса мозаики цветной капусты; S – последовательность ДНК, кодирующая лидерный сигнал гена экстенсина моркови, обеспечивающий транспорт GFP-белка в апопласт; *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка. Плаزمида pUC19 использовалась как промежуточный вектор. Справа от стрелок указаны олигонуклеотиды, слева – использованные ферменты.

RF_Up(64C), Lo_RF(НIII)(64). Нижний праймер для ITS2 (ITS2-(RF(20))(Low70)) и верхний для RF (RF-Up(64C)) присутствовали в реакции в недостатке (концентрация в 100 раз меньше, чем у “внешних” праймеров). Фрагмент ДНК с промотором CaMV35S получали при помощи ПЦР на матрице плазмиды pBI121 с использованием праймеров Up_35S(PctI)RI(60) и Lo_35S(PctI)НIII(60). Нуклеотидные последовательности фрагментов подтверждали при помощи секвенирования. Далее все фрагменты, кроме целевого гена, были последовательно объединены в конструкции pUC19_LF_hptII_35S_ITS_RF методом Golden Gate.

Параллельно был получен фрагмент, несущий последовательность целевого гена *gfp*, слитую с последовательностью S. Последовательность S была получена при помощи ПЦР с использованием в виде матрицы геномной ДНК моркови (праймеры Up_sig.Vam(72) Lo_sig(72) (табл. 1)). Последовательность гена *gfp* была синтезирована при помощи ПЦР на матрице ДНК плазмиды pCambiaGFP (праймеры Up (sig-64)GFP(64) Lo_GFP_Acc(64)) (табл. 1). Затем на матрице фрагментов S и GFP, во втором раунде ПЦР, (праймеры Up_sig.Vam(72) Lo_GFP_Acc(64)) был получен слитый фрагмент SGFP.

После обработки соответствующими эндонуклеазами рестрикции фрагмент SGFP был перенесен в конструкцию pUC19_LF_hptII_35S_ITS_RF. Полученная плаزمида pInt-sGFP использовалась для биобаллистической трансформации.

Для переноса генетической конструкции, собранной в плазмиде pUC19_LF_hptII_35S_ITS_RF в вектор для агробактериальной трансформации (Cas9gRNA), ее было необходимо модифицировать и изменить имеющийся сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* (G[^]ATTC) на сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *PstI* (CTGCA[^]G). Для этого плазмиды pUC19_LF_hptII_35S_ITS_RF была обработана эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *NarI* и гибридизована с олигонуклеотидами Up_LF_RF и Lo_LF_RF (табл. 1), после чего обработана ДНК-лигазой и эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*. В результате была получена плазмиды pUC19_LF_hptII_RF_PstI. Далее в эту конструкцию был перенесен фрагмент SGFP. На завершающем этапе клонирования полученная конструкция была перенесена в вектор Cas9gRNA по сайтам рестрикции *HindIII/PstI* с созданием конструкции pInt-sGFP-gRNA, предназначенной для агробактериальной трансформации.

Создание генетической конструкции pInt-sGFP_H3.3 для доставки гена *gfp* в район гена гистона H3.3

Схема сборки конструкции pInt-sGFP-H3.3 для *knock-in* в район гена гистона H3.3 представ-

лена на рисунке 3. На основе вектора pUC19 была собрана промежуточная плазмиды pInt_plasmid, для которой предварительно были получены три фрагмента. Первые два – LF и RF, были синтезированы при помощи двух последовательных ПЦР на матрице геномной ДНК *A. thaliana* с праймерами: Up_L_HIII и Lo_L_Acc_Sfr для левого фланка и Up_R_Sfr_Acc и Lo_R_Sal для правого фланка в первом раунде ПЦР и Up_L_HIII и Lo_R_Sal (табл. 1) – во втором. Третий фрагмент (nptII 35S), был получен при помощи ПЦР на матрице плазмиды pBI121 с праймерами Lo_A-B_pBI(58) и Up_Xho-pBI(60) (табл. 1). При добавлении фрагмента nptII 35S в pUC19_LF_RF была образована конструкция pInt_plasmid. Фрагмент ДНК SGFP был получен при помощи ПЦР на матрице конструкции pInt-sGFP по методике, описанной выше, с применением праймеров Up_Vam_his6_GFP(62) и Lo_Acc_gfp(60).

На завершающем этапе клонирования фрагмент ДНК, несущий ген *gfp*, был обработан рестриктазами *VamHI/Acc65I* и клонирован по этим сайтам в составе плазмиды pInt_plasmid с образованием конструкции pInt-GFP_H3.3, предназначенной для биобаллистической трансформации.

Доставка созданных генетических конструкций в клетки растений

Агробактериальную трансформацию (штамм GV3101 *A. tumefaciens*) проводили по стандартной методике [16] с последующим отбором клеток на селективной среде SH [17], содержащей фосфинотрицин (50 мг/л).

Биобаллистическую трансформацию проводили при помощи генной пушки PDS1000/He (“BioRad”, США) по методике производителя (размер частиц – 0.6 мкм, давление разрыва мембраны 1100 psi; давление вакуума в камере 27 мм ртутного столба) с применением двух плазмид, одна из которых включала целевой ген, а вторая – ген эндонуклеазы Cas9 и последовательность направляющей РНК. Обе плазмиды добавляли к смеси золотых частиц в эквимольных количествах.

Анализ трансформантов на наличие встроок *gfp* гена

Выявление встроок гена *gfp* проводили в два этапа. Начальный этап включал микроскопический анализ устойчивых к селективным агентам каллусов по их способности к флюоресценции GFP белка. На втором этапе из отобранных по способности к свечению каллусов выделяли ДНК и с применением соответствующих праймеров (табл. 1) проводили ПЦР-анализ и секвенирование. Геномную ДНК выделяли с помощью ЦТАБ-буфера по протоколу Аллена [18]. Секвенирование проводили в ЗАО “Евроген” (Москва).

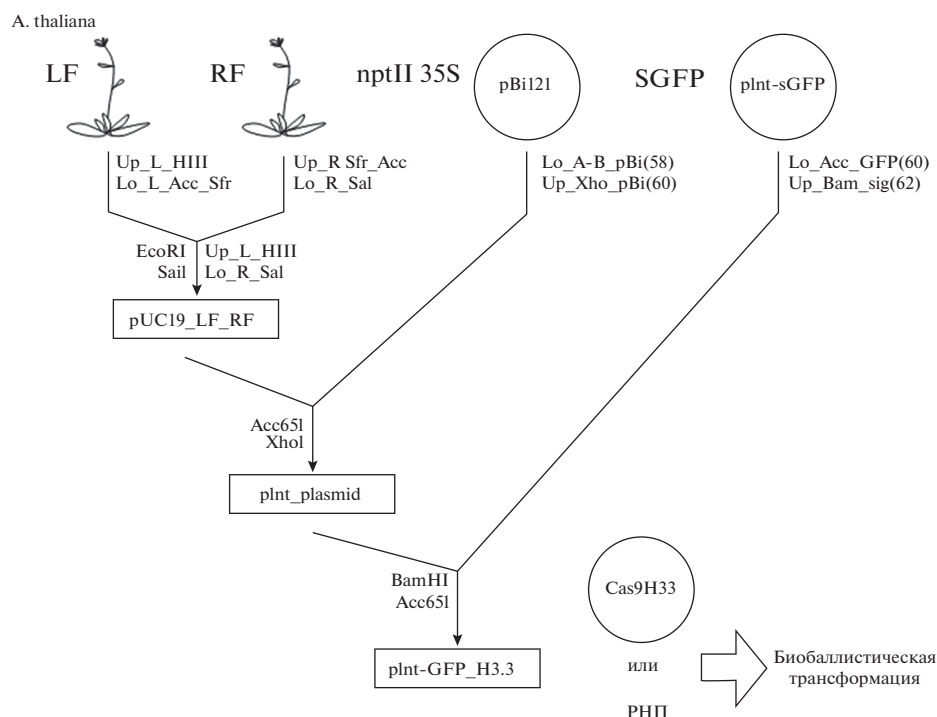


Рис. 3. Схема сборки конструкции pInt-GFP_H3.3.

Обозначения: LF и RF – левая и правая фланкирующие последовательности, гомологичные соответствующим участкам в геноме *A. thaliana*; *nptII* – ген неомидин фосфотрансферазы II, обеспечивающий устойчивость растительной клетки к канамицину; 35S – промотор CaMV35S вируса мозаики цветной капусты; S – последовательность ДНК, кодирующая лидерный сигнал гена экстенсина моркови, обеспечивающий транспорт GFP-белка в апопласт; *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка. pUC19 – плаزمид, используемая в качестве промежуточного вектора; Cas9H33 – плазмид, несущая ген эндонуклеазы Cas9 и направляющую РНК, нацеленную на район генома *A. thaliana*, прилегающий к гену гистона H3.3; РНП – рибонуклеопротеиновый комплекс.

Справа от стрелок указаны использованные на данном шаге олигонуклеотиды, слева – использованные ферменты. В прямоугольных рамках указаны названия плазмид, полученных в ходе конструирования. Название элементов конструкций расположено рядом с использованным для их получения материалом, которыми служили другие плазмиды (pBi121 и pInt-sGFP), или геномная ДНК *A. thaliana*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор сайта для осуществления *knock-in*

Основной принцип при выборе сайта интеграции целевого гена в геном *A. thaliana* был основан на поиске районов с генами, характеризующимися высокой транскрипционной активностью. Такими генами послужили гены домашнего хозяйства с заведомо высокой транскрипционной активностью, для которых адресное встраивание целевых генов может сопровождаться стабильным и высоким уровнем экспрессии последних [19]. В качестве мишеней для интеграции *gfp* гена в геном *A. thaliana* выбраны два района генов домашнего хозяйства, представленные в геноме множественными копиями (от нескольких копий до нескольких тысяч), активно экспрессируемых в течение всей интерфазы клеточного цикла: район ядрышкового организатора и район расположения одного из генов гистона H3.3.

Наиболее привлекательным с точки зрения повышения уровня экспрессии целевых генов

представлялся район расположения генов, кодирующих 18S, 5.8S и 25S рРНК, у высших растений организованный в единую транскрипционную единицу длиной ~5 т.п.н. и разделенный между собой внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS). Такой район получил название ядрышкового организатора. Общее число копий 18S, 5.8S и 25S рРНК на гаплоидный геном *A. thaliana* – более 700, которые расположены двумя кластерами в околоцентромерных регионах 2 и 4 хромосом. Межгенный спейсер содержит два спейсерных и один генный промотор, а также несколько энхансерных повторов, что фактически превращает его в мощный суперпромотор. Транскрибируемый участок межгенного спейсера 5' ETS, в дальнейшем вырезаемый при процессинге 35S транскрипта и отмеченный нами как IR (Insertion Region; рис. 5в), является наиболее привлекательным для встраивания целевых генов, требующих высокого уровня транскрипции и именно этот район был выбран в качестве первой мишени для встраивания целевого гена.

Таблица 2. Способы доставки *gfp* гена в район ядрышкового организатора

Способ доставки	Название генетической конструкции	Количество
Агробактериальная трансформация	<i>pInt-sGFP-rRNA</i>	19 трансформаций (126 колб по 15 мл клеточной суспензии)
Биобаллистика	<i>pInt-sGFP+ Cas9rRNA</i>	12 трансформаций (132 выстрела; 78 каллусов)
	<i>pInt-sGFP-rRNA</i>	

При поиске второй мишени весьма перспективным представлялся район встраивания целевых генов в участки генома, фланкирующие гены гистонов. Гены гистонов являются важнейшими генами домашнего хозяйства, так как обеспечивают необходимую для всех эукариот компактизацию хроматина, принимают участие в эпигенетической регуляции экспрессии генов и располагаются в областях активно транскрибируемого хроматина. У растений наиболее хорошо изучены гены гистона H3 [19]. Гаплоидный геном *A. thaliana* содержит 15 копий генов гистона H3, представленных как генами гистона H3.1, которые экспрессируются только в S-фазе клеточного цикла, так и генами гистона H3.3, которые конститутивно экспрессируются в течение всей интерфазы [20]. Для адресного встраивания репортерного гена был выбран район гена *H3.3* (At4G40040), конститутивный уровень экспрессии которого очень высок именно в клеточных культурах *A. thaliana* [20]. Данный район транскрибируется РНК-полимеразой II и его доступность для ферментов и векторов не ограничена никакими физическими барьерами.

Доставка созданных генетических конструкций в выбранные районы-мишени генома A. thaliana

Доставку *gfp* гена в район ядрышкового организатора проводили с использованием двух подходов – агробактериального переноса и биобаллистики. Вектор *pInt-sGFP-rRNA* использовался для агробактериальной трансформации, тогда как при биобаллистике использовали оба вектора: *pInt-sGFP* и *pInt-sGFP-rRNA*. В случае использования вектора *pInt-sGFP* дополнительно на золотые частицы наносили вектор *Cas9rRNA*. Объемы выполненных работ по доставке *gfp* гена в район ядрышкового организатора представлены в таблице 2.

По результатам отбора клеточных культур на среде с гигромицином после проведения агробактериальной и биобаллистической трансформаций было получено 9 исходных линий, устойчивых к селективному агенту. Для каждой исходной клеточной линии было отобрано по 10–20 моноклональных каллусов, и 1–4 наиболее перспективных каллусов, проявляющих максимальное свечение GFP белка по результатам цитологиче-

ского анализа, были введены в суспензионную культуру для дальнейших исследований.

Для ускорения выявления целевых фрагментов, интегрированных в район ядрышкового организатора, ДНК выделяли одновременно из 5–10 образцов, объединенных в одной пробирке. Всего ДНК выделена из 495 каллусов. Все полученные образцы ДНК тестировали методом ПЦР в нескольких повторностях на наличие участков конструкции – гена *gfp* (праймеры Up_gfp, Lo_gfp, табл. 1), гена устойчивости к гигромицину (Hpt test up, Hpt test lo) и на событие сайт-специфического встраивания. Для выявления последнего один праймер располагался внутри переносимой конструкции, а второй на участке межгенного спейсера за пределами имеющейся у нас в конструкции фланкирующей последовательности (праймеры LF_Up, LF_Lo, RF_Up, RF_Lo). По результатам проведенного анализа были выделены образцы ДНК с положительными сигналами на ген устойчивости к гигромицину, однако ни в одном из них не было выявлено положительного сигнала с праймерами, ориентированными на участки, фланкирующие целевой район межгенного спейсера ядрышкового организатора, кроме одного образца, полученного после биобаллистической трансформации. Анализ результатов секвенирования этого образца не подтвердил событие встраивания *gfp* гена в целевой район. Наличие положительных сигналов в ПЦР с праймерами на участок гена устойчивости к гигромицину объясняется вероятнее всего случайным, не целевым встраиванием переносимой конструкции. Аналогичный результат – отсутствие специфичных фрагментов соответствующей длины, наблюдался и в ПЦР с праймерами на правый участок исследуемой последовательности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ни в одном из проанализированных 495 каллусов после агробактериальной и биобаллистической трансформации не произошло сайт-специфического встраивания целевой конструкции в район ядрышкового организатора.

Доставку гена *gfp* в район гистоновому гена *H3.3 A. thaliana* проводили с помощью биобаллистической трансформации с нанесением на золотые частицы плазмиды pInt-GFP_H3.3 совместно с РНП Cas9-sgRNA, либо совместно с плазмидой Cas9H33. Всего было проведено 9 биобаллистиче-

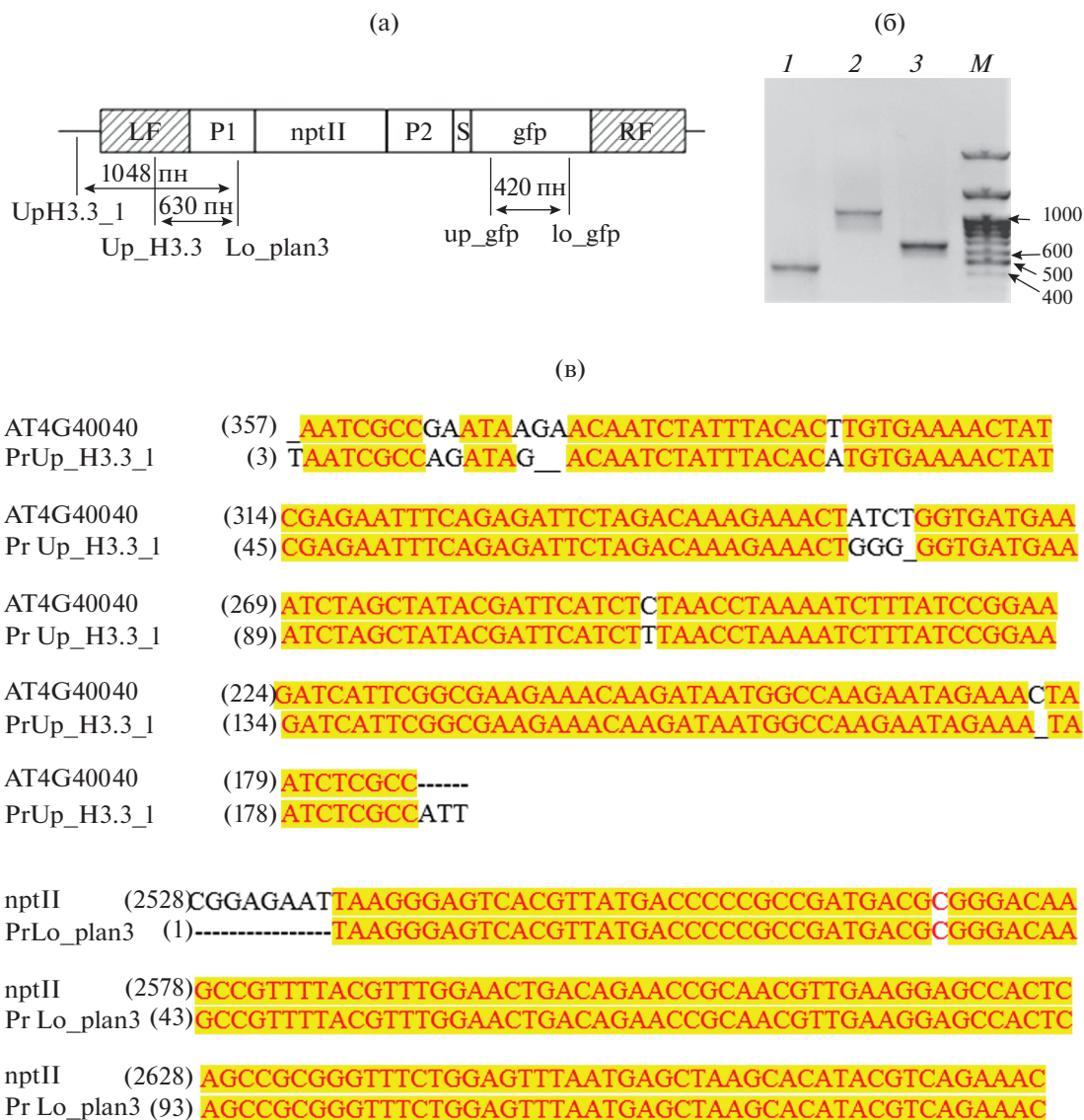


Рис. 4. Молекулярный анализ для подтверждения сайт-специфического встраивания гена *gfp* в район гена гистона H3.3 *A. thaliana*.

а) схематическое расположение праймеров, использованных для анализа. Праймеры Up_H3.3 и UpH3.3_1 локализируются в геномной ДНК *A. thaliana* во фланкирующей последовательности, окружающей генетическую конструкцию и за ее пределами. Праймер Lo_plan3 расположен внутри генетической конструкции, в промоторной области гена *nptII*. Праймеры на ген *gfp* (*up_gfp*; *lo_gfp*) использовались в качестве контроля. Размеры ПЦР-фрагментов указаны рядом со стрелками.

Обозначения: LF и RF – левая и правая фланкирующие последовательности, гомологичные участку перед геном гистона H3.3 в геноме *A. thaliana*; P1 – P-NOS-промотор нопалин синтазы *A. tumefaciens*; P2 – одинарный промотор CaMV35S вируса мозаики цветной капусты; *nptII* – ген неомицин фосфотрансферазы II, обеспечивающий устойчивость растительной клетки к канамицину; S – последовательность ДНК, кодирующая лидерный сигнал, обеспечивающий транспорт GFP-белка в апопласт; *gfp* – ген зеленого флуоресцентного белка.

б) электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами на внутренние фрагменты вектора и с праймерами на событие сайт-специфического встраивания.

Обозначения: 1 – праймеры *up_gfp*; *lo_gfp* на ген *gfp* (420 bp), положительный контроль; 2 – праймеры Up_H3.3_1; Lo_plan3 на растительную ДНК в области гистона H3.3 (1048 bp); 3 – с праймерами Up_H3.3; Lo_plan3 на левый фланк FL (630 bp), положительный контроль; M – маркер ДНК 100 п.н. + 1.5 т.п.н. + 3 т.п.н., справа обозначена длина фрагментов в п.н.

в) Выравнивание нуклеотидной последовательности полученного с праймерами UpH3.3_1 и Lo_plan3 ПЦР-фрагмента с геномной ДНК *A. thaliana* (AT4G40040) и с последовательностью ДНК генетической конструкции (*nptII*).

ских трансформаций и отобрано более 10 клеточных линий, устойчивых к селективному агенту. Для выявления событий *knock-in* методом ПЦР использовалась пара праймеров, один из которых располагался внутри переносимой конструкции, а второй на участке растительной ДНК за пределами имеющейся в конструкции фланкирующей последовательности (Lo_plan3 и Up_H3.3_1). Дополнительно для контроля проводились ПЦР с праймерами, расположенными внутри конструкции (Lo_plan3 и Up_H3.3 и up_gfp, lo_gfp) (табл. 1, рис. 4а). На рисунке 4б представлены результаты ПЦР, проведенной с геномной ДНК линии G8. Выравнивание прочитанной при секвенировании нуклеотидной последовательности ПЦР фрагмента, полученного с праймерами Lo_plan3 и Up_H3.3_1, показало наличие идентичности 95% с *A. thaliana* Histone superfamily protein (AT4G40040) при секвенировании с одной стороны и 99% идентичности с векторной ДНК (а именно с промотором гена *nptII*) при прочтении с другой стороны (рис. 4в). Таким образом, результаты секвенирования специфического ПЦР-фрагмента подтверждают адресную встройку генетической конструкции в район-мишень гистонового гена *H3.3*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный район может быть использован в качестве мишени для доставки целевых генов с применением геномного редактирования. Работы в данном направлении исследований продолжаются, результаты будут предметом будущих публикаций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценивая число описанных в литературе событий редактирования растительных геномов следует отметить, что подавляющее большинство из них составляют примеры нокаутов генов, тогда как число осуществленных *knock-in* весьма незначительно [3, 5]. Целевые двуцепочечные разрывы ДНК, создаваемые эндонуклеазой Cas9, активируют клеточные системы репарации, обеспечивающие сращивание концов. Растительные клетки, как и большинство эукариот, для восстановления двуцепочечных разрывов ДНК используют в основном механизм негомологичного сращивания концов, который функционирует в течение всего клеточного цикла (кроме митоза). Репарация по гомологичному механизму, обеспечивающему точное восстановление последовательности, возможна только при наличии сестринской хроматиды (гомологичной матрицы) и может произойти только в конце S и в G2 фазах [5]. Таким образом, преобладание у растений первого механизма над вторым ставит перед исследователями весьма непростые задачи в случае попыток проведения геномного редактирования в варианте *knock-in*.

Действительно, у растений частота *knock-out*, полученных при восстановлении двуцепочечных разрывов ДНК по механизму негомологичного сращивания концов, составляет 30–70%, а в ряде случаев до 100%, тогда как частота *knock-in* обычно не превышает долей процента или нескольких процентов [5].

Создание генетических конструкций для переноса целевых генов в определенный район генома, осуществляемого при помощи эндонуклеазы Cas9, существенно сложнее, чем создание конструкций для *knock-out*. Для осуществления *knock-in* по механизму гомологичного обмена встраиваемая последовательность нуклеотидов должна быть окружена фланкирующими последовательностями, соответствующими выбранному участку генома. Размер гомологичных фланкирующих участков обычно составляет от 400 п.н. до 2 т.п.н. [6]. Таким образом, для каждого нового района генома требуется новое конструирование. Сложность создания генетических конструкций для осуществления *knock-in* в значительной степени зависит от того, какой способ доставки в клетку матрицы-донора и генно-инженерного инструментария выбирает исследователь, и на встраивание по какому механизму репарации он рассчитывает. Так, например, при биобаллистической трансформации возможна доставка донорной нуклеотидной последовательности и генно-инженерного инструментария (нуклеазы Cas9 и направляющей РНК) на разных плаزمидках, тогда как при агробактериальной трансформации они должны быть объединены в одной генетической конструкции. Конструирование таких протяженных рекомбинантных последовательностей связано не только с некоторыми методическими сложностями, но и с ограниченными возможностями самих векторов. Если ставка делается на встраивание целевого гена по механизму негомологичного сращивания концов, то в донорную нуклеотидную последовательность не нужно вводить протяженные гомологичные фланкирующие последовательности, но следует учесть возможный сдвиг рамки считывания, внося по краям кассеты, до промоторной области, нетранскрибируемые нейтральные последовательности, или встроить в генетическую конструкцию специфические последовательности, например, IRES (Internal Ribosome Entry Site). Кроме того, для повышения эффективности *knock-in* по негомологичному пути по краям кассеты можно вводить сайты узнавания для Cas9, обеспечивающие ее вырезание в клетке в виде линейной молекулы ДНК [5, 21, 22].

В данной работе для создания сложных многокомпонентных генетических конструкций использовалась поэтапная сборка с созданием промежуточных конструкций, несущих блоки генов и управляющих элементов, а также применялось сочетание методов традиционного молекулярно-

го клонирования (сборки по сайтам рестрикции II типа) и современных методов Golden Gate Cloning, использующих рестриктазы IIS, которые формируют уникальные липкие концы. Все в сумме позволило ускорить процесс сборки новых генетических конструкций для *knock-in* в новые районы генома и существенно упростило варьирование компонентов конструкций в зависимости от поставленной цели.

Для интеграции гена *gfp* в качестве районов-мишеней были использованы районы расположения генов “домашнего хозяйства”: ядрышкового организатора и район расположения одного из генов гистона H3. Привлекательность этих районов для доставки целевых генов диктовалась тем, что именно эти районы в растительной клетке характеризуются высокой транскрипционной активностью. Следовательно, при доставке в такие районы целевых генов с высокой долей вероятности можно ожидать и высокий выход рекомбинантных белков. Особенности районов расположения генов домашнего хозяйства, характеризующихся высокой транскрипционной активностью в связи с их использованием в качестве мишеней для интеграции целевых генов при создании клеточных линий-биопродукторов рекомбинантных белков, рассмотрены нами в обзоре [5].

При выборе района межгенного спейсера ядрышкового организатора в качестве мишени для *knock-in* при планировании эксперимента, мы исходили из модели “Christmas tree” строения и транскрипции генов 35S пре-рРНК, считая, что они образуют свободные петли деконденсированного хроматина, доступные для эндонуклеазы Cas9 и генетических конструкций с гомологичными фланками для осуществления *knock-in*, а также РНК-полимеразы II, которая должна транскрибировать встроенные в область генов 35S пре-рРНК репортерные и селективные гены с промоторами для нее. Однако, как показали эксперименты по доставке созданных генетических конструкций как при биобаллистике, так и при агробактериальной трансформации, ни в одном случае не было получено ни одного события доставки *gfp* гена в район ядрышкового организатора.

На основании последних литературных данных стало известно, что ядрышко представляет из себя далеко не однородную аморфную структуру, а разбито на четкие компартменты – нуклеолонемы с центрами транскрипции, содержащими деконденсированный хроматин [23–25]. На рисунке 5 представлена упрощенная схема строения ядрышка в ядрах клеток растений и процессов, происходящих в нём. Наиболее детально строение ядрышка рассмотрено в обзорах [23, 24, 26]. Основными структурными компонентами ядрышка, выявляемыми при ультраструктурном анализе, являются фибриллярные центры (ФЦ), плотный фибрилляр-

ный компонент (ПФК), гранулярный компонент (ГК), ядрышковая вакуоль (ЯВ), а также ассоциированный с ядрышком гетерохроматин (ЯГ) (рис. 5а). Все эти компоненты связаны с определенными функциями. Например, транскрипция рДНК идет на границе фибриллярных центров и плотного фибриллярного компонента, который занимает большую часть объема ядрышка растений. Транскрипция пре-рРНК может происходить одновременно на нескольких участках рДНК (рис. 5б). Процессинг пре-рРНК осуществляется в плотном фибриллярном компоненте, а затем в гранулярном компоненте ядрышка происходят, как предполагается, последние этапы сборки малых и больших рибосомных субъединиц из зрелых рРНК и рибосомных белков (рис. 5а). На рисунке 5в представлена схема строения межгенного спейсера (IGS) генов рРНК.

Последние данные об организации ядрышка и процессах, происходящих в нем, позволяют говорить о крайне плохой доступности этого района для встройки экзогенной ДНК при любых способах ее доставки в клетку. В первую очередь это связано именно с особенностями организации ядрышка, его компартментализацией, а также с крайне высоким уровнем транскрипционной и постранскрипционной активности, в результате которой постоянно образующиеся продукты, такие как преРНК, рибонуклеопротеиновые комплексы, рибосомные субъединицы наряду с рибосомными белками создают практически непреодолимый механический барьер для доставки экзогенной ДНК. Кроме того, присутствие в ядрышке РНК полимеразы II, необходимой для транскрипции генетических конструкций, до сих пор является спорным вопросом [23, 24, 27]. Помимо структурно-функциональных особенностей ядрышка, не меньшим препятствием для осуществления *knock-in* в этот район могут служить системы репарации, обеспечивающие стабильность и сохранность генов рРНК. Высокий уровень транскрипции, наряду с большим числом повторов генов рРНК, делают ее склонной к возникновению двунитевых разрывов [28]. Двунитевые разрывы являются серьезными повреждениями, которые нарушают репликацию ДНК и транскрипцию и могут приводить к значительным хромосомным перестройкам, угрожающим жизнеспособности клетки. Кроме того, необходимость обеспечить защиту генов рРНК от последствий двунитевых разрывов привела к возникновению так называемых ядрышковых колпачков (ядрышковый гетерохроматин) – уникальных структур на периферии ядрышка, в которые перемещаются поврежденные (несущие двунитевые разрывы) участки генов рРНК. Приблизительно половина копий генов рРНК находится в молчащем состоянии в перинуклеолярном гетерохроматине [28]. Следовательно, даже при наличии достаточного количества двунитевых разрывов в районе яд-

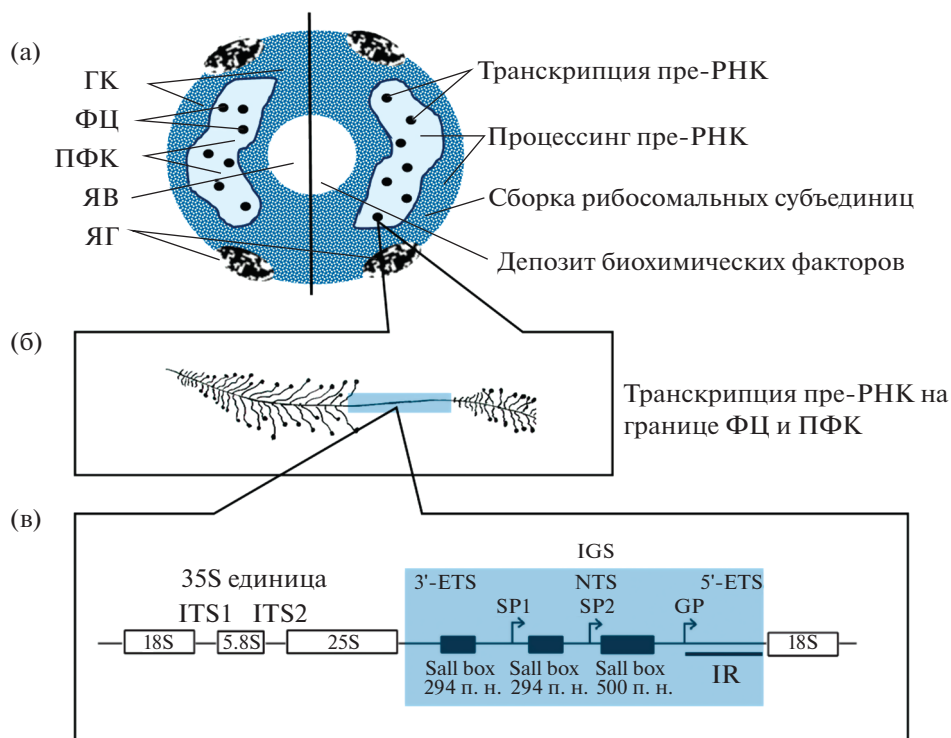


Рис. 5. Общая схема строения ядрышка, локальных районов транскрипции рРНК и межгенного спейсера генов рРНК растений. а – схема строения ядрышка.

Обозначения: ГК – гранулярный компонент; ФЦ – фибриллярный центр; ПФК – плотный фибриллярный компонент; ЯВ – ядрышковая псевдовакуоль; ЯГ – ассоциированный с ядрышком гетерохроматин.

б – рибосомная ДНК с множественными сайтами транскрипции и межгенным спейсером (выделено серым цветом);

в – схема строения межгенного спейсера (IGS) генов рРНК *A. thaliana*.

Обозначения: 3' ETS и 5' ETS – транскрибируемые участки межгенного спейсера (External transcribed spacer); NTS – нетранскрибируемый участок межгенного спейсера (Non transcribed spacer); Sall box – энхансерные тандемные повторы; IR – район инсерции целевых генов (Insertion Region); стрелками обозначены спейсерные (SP1, SP2) и генный (GP) промоторы.

рышкового организатора возможность использования этого района в качестве мишени для целевых генов исключается не только по причине сложности их доставки в целевой район-мишень, но и в связи с тем, что, если даже это событие произойдет, то оно с высокой долей вероятности окажется в молчащем перинуклеолярном гетерохроматине.

Таким образом, несмотря на всю привлекательность района рибосомных генов для направленной встройки целевых генетических конструкций, требующих высокого уровня транскрипции, этот район в связи со своей сложной компартиментализацией, выявленной буквально в последние годы, не представляется доступным для Cas9, векторов-доноров и РНК-полимеразы II, и непригоден для геномного редактирования, что подтверждается нашими неудавшимися попытками доставки генно-инженерного инструментария в этот район.

Использование второго района – района расположения гена гистона H3.3 в качестве мишени для встраивания гена *gfp*, оказалось более обнаде-

живающим. Среди десяти канамицин-устойчивых клеточных линий, полученных к настоящему моменту времени, выявлены события интеграции гена *gfp* в заданный район-мишень. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный район может быть использован в качестве мишени для доставки целевых генов с применением геномного редактирования по варианту *knock-in*. Работы в данном направлении исследований продолжаются и их результаты будут предметом дальнейших публикаций. В дополнение к созданным конструкциям, нацеленным на репарацию двуцепочечных разрывов по механизму гомологичной рекомбинации, планируется создание конструкций, у которых вместо гомологичных фланков будут последовательности ДНК, на которые нацеливается направляющая sgРНК. Введение таких элементов по фланкам обеспечит линейаризацию экспрессионной кассеты одновременно с двунитевым разрывом в ДНК-мишени, что может значительно повысить вероятность осуществления *knock-in* по механизму негомологичного сращивания концов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 17-14-01099.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bortesi L., Zhu C., Zischewski J., Perez L., Bassié L., Nadi R., Forni G., Lade S.B., Soto E., Jin X., Medina V., Villorbina G., Muñoz P., Farré G., Fischer R., Twyman R.M., Capell T., Christou P., Schillberg S. Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 2203.
2. Khatodia S., Bhatotia K., Passricha N., Khurana S.M.P., Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 1.
3. Demirci Y., Zhang B., Unver T. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. P. 1844.
4. Huang T.-K., Puchta H. CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination // *Plant Cell Rep.* 2019. V. 38. P. 443.
5. Rozov S.M., Permyakova N.V., Deineko E.V. The problem of the low rates of CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in plants: approaches and solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3371.
6. Collonnier C., Guyon-Debast A., Maclot F., Mara K., Florence C., Fabien N. Towards mastering CRISPR-induced gene knock-in in plants: Survey of key features and focus on the model *Physcomitrella patens* // *Methods.* 2017. V. 121–122. P. 103.
7. Hanania U., Ariel T., Tekoah Y., Fux L., Sheva M., Gubbay Y., Weiss M., Oz D., Azulay Y., Turbovski A., Forster Y., Shaaltiel Y. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 1120.
8. Hussain B., Lucas S.J., Budak H. CRISPR/Cas9 in plants: at play in the genome and at work for crop improvement // *Brief. Funct. Genomics.* 2018. V. 17. P. 319.
9. Qi Y. *Plant Genome Editing with CRISPR/Cas System.* Humana Press. 2019. 359 p.
10. Mao Y., Botella R.J., Liu Y., Zhu J.-K. Gene editing in plants: Progress and Challenges // *Natl. Sci. Rev.* 2019. V. 6. P. 421.
11. Uniyal A.P., Mansotra K., Yadav S.K., Kumar V. An overview of designing and selection of sgRNAs for precise genome editing by the CRISPR-Cas9 system in plants // *3 Biotech.* 2019. V. 9. P. 1.
12. Soyars C.L., Peterson B.A., Burr C.A., Nimchuk Z.L. Cutting Edge Genetics: CRISPR / Cas9 Editing of Plant Genomes // *Plant Cell Physiol.* 2018. V. 59. P. 1608.
13. Svitashv S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 931.
14. Sedov K.A., Fomenkov A.A., Solov'yova A.I., Nosov A.V., Dolgikh Yu.I. The level of genetic variability of cells in prolonged suspension culture of *Arabidopsis thaliana* // *Biol. Bull.* 2014. V. 41. P. 493.
15. Michno J.-M., Wang X., Liu J., Curtin S.J., Kono T.J.Y., Stupar R.M. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme // *GM Crops Food.* 2015. V. 6. P. 243.
16. Ogawa Y., Dansako T., Yano K., Sakurai N., Suzuki H., Aoki K., Noji M., Saito K., Shibata D. Efficient and high-throughput vector construction and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells for functional genomics // *Plant Cell Physiol.* 2008. V. 49. P. 242.
17. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Can. J. Bot.* 1972. V. 50. P. 199.
18. Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W.F. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 2320.
19. Розов С.М., Дейнеко Е.В. Стратегии оптимизации синтеза рекомбинантных белков в растительных клетках: классические подходы и новые направления // *Молекулярная биология.* 2019. Т. 53. С. 179.
20. Okada T., Endo M., Singh M.B., Bhalla P.L. Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3 // *Plant J.* 2005. V. 44. P. 557.
21. Hahn F., Eisenhut M., Mantegazza O., Weber A.P.M. Homology-directed repair of a defective glabrous gene in *Arabidopsis* with Cas9-based gene targeting // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1.
22. Li J., Meng X., Zong Y., Chen K., Zhang H., Liu J., Li J., Gao C. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9 // *Nat. Plants.* 2016. V. 2. P. 1.
23. Kalinina N.O., Makarova S., Makhotenko A., Love A.J., Taliansky M. The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses // *Front. Plant Sci.* 2018. V. P. 1.
24. Stępiński D. Functional ultrastructure of the plant nucleolus // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 1285.
25. Trinkle-Mulcahy L. *Nucleolus: The Consummate Nuclear Body.* Elsevier Inc. 2018. P. 257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803480-4.00011-9>
26. Shaw P.J. *Nucleolus In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS).* John Wiley & Sons. Ltd: Chichester. 2010. 11 p. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001352.pub3>
27. Pontvianne F., Carpentier M.-C., Durut N., Pavlišťová V., Jaške K., Šchořová Š., Parrinello H., Rohmer M., Pikaard C.S., Fojtová M., Fajkus J., Sáez-Vásquez J. Identification of nucleolus-associated chromatin domains reveals a role for the nucleolus in 3D organization of the *A. thaliana* genome // *Cell Rep.* 2016. V. 16. P. 1574.
28. Tsekrekou M., Stratigi K., Chatzinikolaou G. The nucleolus: In genome maintenance and repair // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18071411>