

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039928**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)

(21) Номер заявки
201891919

(22) Дата подачи заявки
2017.03.23

(54) СПОСОБЫ ТРАНСФЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЯ СОБЫТИЙ СЛУЧАЙНОЙ ИНТЕГРАЦИИ

(31) 16162322.8

(32) 2016.03.24

(33) EP

(43) 2019.04.30

(86) PCT/NL2017/050182

(87) WO 2017/164738 2017.09.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**УНИВЕРСИТЕЙТ ЛЕЙДЕН;
АКАДЕМИШ ЗИКЕНХЕЙС ЛЕЙДЕН
Х.О.Д.Н. ЛЮМК (NL)**

(72) Изобретатель:
**Тейстерман Марсел, Ван Крегтен
Мартье, Хойкас Паул (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) INAGAKI S ET AL.: "Arabidopsis TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems", PLANT CELL APRIL 2006 AMERICAN SOCIETY OF PLANT BIOLOGISTS US, vol. 18, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 879-892, XP002760786, DOI: 10.1105/TPC.105.036798, cited in the application abstract, page 883, left-hand column, line 1 - line 14 page 882, left-hand column, line 10 - line 13

INAGAKI SOICHI ET AL.: "A Link among DNA Replication, Recombination, and Gene Expression Revealed by Genetic and Genomic Analysis of TEBICHI Gene of Arabidopsis thaliana", PLOS GENETICS, vol. 5, no. 8, August 2009 (2009-08), XP002760787, page 2, right-hand column, line 8 - line 11, page 3, left-hand column, line 10 - line 13, page 4, left-hand column, line 34 - line 39

(57) В настоящем изобретении предложены способы трансфекции растения и экспрессии в растениях молекул РНК или полипептида. В частности, растения, имеющие пониженную экспрессию и/или активность POLQ, трансфицируют для того, чтобы снизить события случайной интеграции. В изобретении также предложены трансфицированные растения и потомство растений, полученных способами, описанными в настоящем документе.

B1

039928

039928 B1

Область техники

В настоящем изобретении предложены способы трансфекции растения и экспрессии в растениях молекул РНК или полипептида. В частности, растения, имеющие пониженную экспрессию и/или активность POLQ, трансфицируют для того, чтобы снизить события случайной интеграции. В изобретении также предложены трансфицированные растения и потомство растений, полученных способами, описанными в настоящем документе.

Уровень техники

Генетическая модификация растений путем трансфекции позволяет вносить в их признаки изменения, такие как повышенная урожайность, устойчивость к болезням и вредителям, повышенная вегетативная биомасса, устойчивость к гербицидам, пищевая ценность, устойчивость к засухе и стрессам, а также важные для садоводства качества, такие как пигментация и рост, и другие агрономические характеристики для улучшения сельскохозяйственных культур. Кроме того, генетическую модификацию растений используют в качестве системы для экспрессии рекомбинантных белков.

Трансфекция растений нуклеиновой кислотой в настоящее время является стандартной практикой, которую можно проводить рядом различных способов, известных в данной области техники. Однако одним из недостатков существующих способов трансфекции является то, что сравнительно часто происходит случайная интеграция ДНК в геном хозяина. Случайная интеграция может иметь непредсказуемые и/или вредные последствия для организма-хозяина. Кроме того, интеграция ДНК в геном растений не всегда желательна, особенно когда генетически модифицированные (ГМО) растения вызывают экологические и политические проблемы. Таким образом, остается потребность в разработке улучшенных систем для экспрессии трансгенов в растениях.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту в изобретении предложен способ сокращения случайной интеграции трансфицируемых молекул нуклеиновой кислоты в растительную клетку, указанный способ включает обеспечение растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, при этом экспрессия и/или активность POLQ в указанной растительной клетке снижена.

Согласно дополнительному аспекту в изобретении предложен способ трансфекции растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, способ включает обеспечение растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, при этом экспрессия и/или активность POLQ в указанной растительной клетке снижена.

В предпочтительных вариантах реализации способы применяют для направленного воздействия на ген. В частности, способы предназначены для получения растительной клетки, которая в результате генетической рекомбинации несет в определенном участке своего генома последовательность ДНК.

Согласно дополнительному аспекту в изобретении предложен способ экспрессии в растительной клетке молекулы РНК или полипептида, способ включает обеспечение растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную молекулу РНК или полипептид, при этом экспрессия и/или активность POLQ в указанной клетке-хозяине снижена.

Согласно дополнительному аспекту в изобретении предложен способ получения растения, экспрессирующего молекулу РНК или полипептид, способ включает обеспечение растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную молекулу РНК или полипептид, при этом экспрессия и/или активность POLQ в указанной клетке-хозяине снижена, и получение растения из указанной растительной клетки.

Предпочтительно молекулу нуклеиновой кислоты трансфицируют в растительную клетку, имеющую сниженную экспрессию и/или активность POLQ. В некоторых вариантах реализации молекулу нуклеиновой кислоты трансфицируют в растительную клетку временно. Предпочтительно нуклеиновая кислота содержит растительную экспрессионную кассету. Предпочтительно растительная экспрессионная кассета содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид или молекулу РНК и регуляторные последовательности, управляющие экспрессией. Предпочтительно нуклеиновая кислота представляет собой нуклеазу. Предпочтительно нуклеиновая кислота является компонентом системы Crispr/Cas.

В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты встроена в определенный сайт в хромосоме растительной клетки путем генетической рекомбинации (или, скорее, путем сайт-специфической генетической рекомбинации или гомологичной рекомбинации). Предпочтительно такая стабильная интеграция приводит к экспрессии гетерологичного полипептида или молекулы РНК. В некоторых вариантах реализации интеграция является результатом гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах реализации такая стабильная интеграция разрушает или модифицирует эндогенный ген. В некоторых вариантах реализации интеграция является результатом сайт-специфической рекомбинации.

В некоторых вариантах реализации указанная растительная клетка содержит антисмысловый олигонуклеотид, специфичный для пре-мРНК, кодируемой геном POLQ, или двуцепочечную молекулу РНК, специфичную для пре-мРНК, кодируемой геном POLQ. В некоторых вариантах реализации растительная клетка содержит мутантный ген POLQ. В некоторых вариантах реализации в растительной клетке ген POLQ нокаутирован.

Согласно дополнительному аспекту в изобретении предложено растение, полученное описанными в настоящем документе способами, и его потомство (включая семена). Предпочтительно указанное растение и его потомство содержат молекулу нуклеиновой кислоты, стабильно интегрированную в геном путем генетической рекомбинации (то есть сайт-специфическая, а не случайная интеграция).

В некоторых вариантах реализации, упомянутых выше, указанная растительная клетка не является *Arabidopsis thaliana*.

Согласно дополнительному аспекту в изобретении предложено растение или растительная клетка, в котором(ой) экспрессия и/или активность POLQ в указанном(ой) растении или растительной клетке понижена и в котором(ой) указанное(ая) растение или растительная клетка не является *Arabidopsis thaliana*. В изобретении дополнительно предложено применение указанных растений и клеток для трансфекции молекулы нуклеиновой кислоты.

Согласно дополнительному аспекту в изобретении предложено применение растения или растительных клеток, обладающих пониженной экспрессией и/или активностью POLQ для получения растения, экспрессирующего молекулу РНК или полипептида, в которой а) молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанную молекулу РНК или полипептида, не интегрирована в хромосому растительной клетки или б) молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая указанную молекулу РНК или полипептида, интегрирована путем сайт-специфической генетической рекомбинации или гомологичной рекомбинации в хромосому растительной клетки.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Растения, дефицитные по Pol θ , с трудом поддаются интеграции Т-ДНК путем трансформации методом погружения цветка.

Принцип трансформации методом погружения цветка: (1) цветущие растения *A. thaliana* погружают в суспензию, содержащую клетки *Agrobacterium*, после чего (2) растению дают возможность образовать семена; (3) семена, маленький процент которых мог стать трансгенным, высевают (4) на твердую среду, содержащую соответствующий гербицид как селективный маркер.

б) Репрезентативные изображения пластин, содержащих гербицид фосфинотрицин (ФФТ), на которые высевают семена дикого типа (слева) и семена *teb-5* (справа), собранные после трансформации методом погружения цветка. Трансформированные проростки, которые имеют стабильно интегрированную Т-ДНК, содержащую селективный маркер, устойчивы к ФФТ.

с) Эксперименты с погружением цветка проводили с применением двух различных "обезоруженных" штаммов *Agrobacterium*: LBA1100 с добавлением бинарного вектора pCAMBIA1301 и AGL1 с добавлением бинарного вектора pSDM3900.

д) Репрезентативные изображения развивающихся эмбрионов, временно экспрессирующих интрон-содержащий GUS репортерный ген (*gusA*) под контролем промотора АСТ11 в развивающихся стручках.

Фиг. 2. Pol θ необходима для опосредованной трансгенезом *Arabidopsis* трансформации корней.

Принцип трансформации корней.

Семена проращивают в жидкой культуре (1) и у 10-дневных проростков *A. thaliana*, до этого культивировавшихся два-три дня на твердой среде и совместно с клетками *Agrobacterium*, собирают корни (2). Каллусам/побегам дают возможность сформироваться на твердой среде, содержащей гербицид ФФТ, и после трех недель переносят на свежие планшеты, на которых побеги, имеющие стабильно интегрированную Т-ДНК и в результате этого имеющие маркер устойчивости, могут продолжать рост (3).

б) Репрезентативные изображения планшетов, содержащих гербицид фосфинотрицин (ФФТ), на котором выращивали корни дикого типа (слева) и *teb-5* (справа), чтобы дать возможность сформировать побеги. Побеги дикого типа (левая панель) имеют приобретенную устойчивость к ФФТ, указывающую на стабильную интеграцию Т-ДНК, а побеги *teb-5* (правая панель) приходят в упадок.

с) С помощью ТАИЛ-ПЦР для восстановления соединений Т-ДНК-растительный геном получают продукты для большинства каллусов дикого типа (верхняя панель), а каллусы *teb-5* не дают каких-либо продуктов в ТАИЛ-ПЦР (нижняя панель).

д) Эксплантат дикого типа, в котором стрелка указывает на GUS-положительный участок, где *Agrobacterium* доставил одну или больше Т-ДНК, содержащих интрон-содержащий репортерный ген GUS.

е) GUS-положительные участки в эксплантате подсчитали для дикого типа Col-0, *teb-2* и *teb-5*. На один эксперимент подсчитывали по меньшей мере 100 корневых эксплантатов.

ф) Образование зеленых побегов, указывающее на стабильную интеграцию Т-ДНК, подсчитывали для дикого типа Col-0, *teb-2* и *teb-5*.

Фиг. 3. Филер ДНК отражает Pol θ -зависимое удлинение минимально парных молекул Т-ДНК - геном *Arabidopsis*.

а) Предполагаемое действие Pol θ при интеграции Т-ДНК: синтез ДНК с помощью Pol θ стабилизирует минимально парные выступающие 3' концы ДНК, один конец получен из Т-ДНК, а другой - из генома *Arabidopsis*. Соединения Т-ДНК-геном представляют собой один из двух типов: ~57% секвенированных соединений содержат филерную ДНК, а ~43% секвенированных аллелей не содержат филера.

б) Схематическое изображение наибольшей общей подпоследовательности (LCS). Для каждого фи-

лера определяют наибольшую общую подпоследовательность между филером и целевой последовательностью.

с) Изображения тепловой карты LCSs для Т-ДНК с филерами размером от 6 до 40 нуклеотидов. На левой панели нанесена псевдослучайная вероятность (см. детали в разделе "Методы"), а в средней панели отражен полный набор данных, в котором пространство поиска содержит геномную последовательность *Arabidopsis* по обеим сторонам инсерции Т-ДНК (от -120 пар оснований до +160 пар оснований по отношению к соединению), 160 пар оснований последовательности Т-ДНК внутри инсерции (начиная от соединения) и 120 пар оснований первоначального окружения Т-ДНК, которое представляет собой плазмидную ДНК. На правой панели изображен дифференциал данных сверх вероятности, который таким образом визуализирует сверхпредставленность и недопредставленность. Из этого дифференциальной тепловой карты процент интеграции Т-ДНК, в которых их родственные филеры в 10 раз превышают вероятность, составляет 48,2%.

d) Подкатегория (n=1653), как определено в с), использована для нанесения участка с учетом сайта интеграции (размер сайта 5 пар оснований).

e) Изображение тепловой карты филеров, содержащих соединения Т-ДНК, на которой содержащиеся филеры соединения нанесены в соответствии с их родственными соответствующими филерам последовательностями поблизости от соединений для визуализации степени идентичности последовательностей.

f) Изображение тепловой карты соединений интеграции Т-ДНК без филеров, в которых определяют степень идентичности последовательностей между Т-ДНК и геномом *Arabidopsis*.

Фиг. 4. Модель интеграции Т-ДНК.

a) Т-ДНК предпочтительно захвачена на 3' конце, где $\rho\theta$ может удлинять от прайминга путем минимального спаривания оснований. Последующий захват 5' конца геномом приводит к инсерции однопочечной Т-ДНК в геном (левое изображение). Однако в большинстве случаев (63%) наблюдаются двойные интеграции, где обе Т-ДНК инвертированы, что указывает на предпочтительный захват 3' конца Т-ДНК растительным геномом.

b) После захвата 3' конца Т-ДНК, повторяющиеся циклы прайминга, удлинения и переключения праймер-матрицы приводят к инсерции Т-ДНК с мозаично работающими филерами, несущими множественные инсерции матрицы.

Подробное описание раскрытых вариантов реализации изобретения

В целом генетическая рекомбинация в растениях является в основном негомологичной, или, скорее, интродуцированная ДНК случайным образом вставляется в любое положение на хромосоме. Случайная интеграция может иметь отрицательные последствия, если интродуцированная ДНК нарушает, например, экспрессию эндогенного гена. Кроме того, экспрессия РНК или белка, кодируемых случайным образом интегрированной ДНК, менее предсказуема, чем при сайт-специфической интеграции, поскольку на экспрессию могут влиять как участок интеграции, так и количество событий интеграции. Одной из целей способов, описанных в настоящем документе, является снижение (включая устранение или избегание) или устранение случайной интеграции трансфицированной ДНК. Дополнительной целью способов является обеспечение эффективного способа адресного взаимодействия с геном.

В некоторых случаях желательна только транзистная трансфекция ДНК в растение. Могут иметься, например, экологические или политические причины, чтобы избегать или ограничивать применение (стабильно) генетически модифицированных растений. Кроме того, в некоторых ситуациях желательная экспрессия может быть нужна лишь на короткое время. Одной из целей способов, описанных в настоящем документе, является обеспечение способов и растений, в которых представляющая интерес молекула нуклеиновой кислоты трансфицирована лишь временно, или, скорее, представляющая интерес молекула нуклеиновой кислоты не вставлена в хромосомы растения. В предпочтительных вариантах реализации трансфицированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеазу или компонент системы Crispr/Cas.

Согласно одному аспекту в изобретении предложены способы трансфицирования растительной клетки представляющей интерес молекулой нуклеиновой кислоты. Трансфицированные растительные клетки можно применить для экспрессии представляющих интерес РНК или полипептида. Из таких трансфицированных растительных клеток можно создать растения. Предложены способы сокращения случайной интеграции трансфицированных молекул нуклеиновой кислоты.

Описанные в настоящем документе способы включают обеспечение молекулы нуклеиновой кислоты в растительной клетке, где экспрессия POLQ в растительной клетке снижена. Как показано в примерах, трансфекция растений со сниженной экспрессией POLQ приводит к устранению случайной интеграции трансфицированной молекулы нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации предпочтительными являются способы, обеспечивающие транзистную экспрессию представляющих интерес РНК или полипептида. В других вариантах реализации предпочтительными являются способы, обеспечивающие стабильную, сайт-специфическую интеграцию молекулы нуклеиновой кислоты путем генетической рекомбинации. Транзистная экспрессия относится к экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в хромосому хозяина, но функционирует независимо. Стабильная интеграция относится к интеграции нуклеиновой кислоты в ДНК

хозяина ковалентными связями. "Генетическая рекомбинация" делает возможным введение выбранной нуклеиновой кислоты в геном в определенном участке и включает в себя как гомологичную рекомбинацию, так и сайт-специфическую рекомбинацию.

Предпочтительно представляющую интерес нуклеиновую кислоту не вставляют путем негомологичной рекомбинации. Раскрытые в настоящем документе способы описаны как создание клеток и растений, в которых представляющая интерес нуклеиновая кислота не интегрирована в хромосому растительной клетки (т.е. транзистентная трансфекция) или интегрирована в хромосому растительной клетки путем сайт-специфической рекомбинации или гомологичной рекомбинации. Специалисту должно быть понятно, что при осуществлении описанных здесь способов можно получить маленький процент растительных клеток, в которых представляющую интерес нуклеиновую кислоту вставили путем негомологичной комбинации. Однако специалист может легко определить и исключить такие растительные клетки.

Любую подходящую молекулу нуклеиновой кислоты можно применить для трансфекции растительной клетки. Хотя предпочтительной молекулой нуклеиновой кислоты является ДНК, трансфекция РНК также входит в объем изобретения. Например, Эн с соавт. описывает способ трансфекции РНК в *Arabidopsis* (An et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003 Dec, 67 (12): 2674-7).

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид или молекулу РНК (например, кодирующая полипептид РНК или некодирующая РНК, например, длинная некодирующая РНК, микроРНК, тРНК, рибосомная РНК, мякРНК и т.д.). Представляющие интерес молекулы нуклеиновой кислоты включают те, которые влияют на устойчивость растения к инсектицидам, устойчивость к заболеваниям, устойчивость к гербицидам, содержание питательных веществ и целлюлозы, устойчивость к абиотическому стрессу, гены повышения урожайности, гены устойчивости к засухе, гены устойчивости к холоду, устойчивость к антибиотикам и маркерные гены. Например, в заявке US 20140130207 описаны молекулы РНК-интерференции, которые могут экспрессироваться в растениях, обеспечивая тем самым устойчивость к вредителям и патогенам.

Предпочтительно трансфицированная молекула нуклеиновой кислоты является гетерологичной. В настоящем описании гетерологичная нуклеиновая кислота (или гетерологичный ген) включает в себя нуклеиновую кислоту, обычно не обнаруживаемую в растении, например, нуклеиновую кислоту из других видов. Гетерологичная нуклеиновая кислота также включает в себя нативный для организма полинуклеотид, который был изменен каким-либо образом (например, мутировал, добавлен в нескольких копиях, связан с ненативной промоторной или энхансерной последовательностью и так далее). Гетерологичные растительные гены отличаются от эндогенных растительных генов тем, что гетерологичные генные последовательности обычно соединены с нуклеотидными последовательностями, содержащими регуляторные элементы, такие как промоторы, которые в природе не связаны с геном белка, кодируемого гетерологичным геном, или с последовательностями растительного гена в хромосоме, или связаны с теми участками хромосомы, где они не встречаются в природе (например, гены, экспрессирующиеся в локусах, где ген в норме не экспрессируется).

В некоторых вариантах реализации трансфицированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеазу. Предпочтительные нуклеазы включают нуклеазы "цинковые пальцы" (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), нуклеазы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), мегануклеазы и никующие эндонуклеазы. Такие нуклеазы можно применять в способах редактирования гена или генома.

Предпочтительно трансфицированная молекула нуклеиновой кислоты является частью системы Crispr/Cas, такой как Cas нуклеаза и/или направляющая нуклеиновая кислота. Как известно специалистам, систему Crispr/Cas можно использовать для редактирования генов. Применяя эту систему, гены можно редактировать, мутировать, заменять или подвергать нокауту. Crispr/Cas/Cas также можно применять для модуляции экспрессии генов с помощью модифицированных "мертвых" белков Cas, сшитых с доменами активации транскрипции (см., например, последние обзоры методики в Crispr в Khatodia et al. *Frontiers in PlantScience* 2016 7: статья 506 и Ma et al. *FEBS Journal* 2014 5186-5193).

В предпочтительных способах изобретения трансфицируют молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas. Белок Cas может быть белком Cas типа I, типа II, типа III, типа IV, типа V или типа VI. Белок Cas может состоять из одного или больше доменов. Неограничивающие примеры доменов включают домен распознавания направляющей нуклеиновой кислоты и/или связывания с ней, нуклеазные домены (например, домены ДНКазы или РНКазы, RuvC, HNH), ДНК-связывающий домен, РНК-связывающий домен, домены геликазы, домены белок-белкового взаимодействия и домены димеризации. Домен распознавания направляющей нуклеиновой кислоты и/или связывания с ней может взаимодействовать с направляющей нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах реализации нуклеазный домен может содержать одну или больше мутаций, дающих в результате никазу или "мертвый" фермент (то есть нуклеазный домен с нехваткой каталитической активности).

Предпочтительные белки Cas включают c2c1, C2c2, c2c3, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (CasD), CasH, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9 (Csn1 или Csx12), Cas10, Cas10d, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Cpf1, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (CasA), Cse2 (CasB), Cse3 (CasE), Cse4 (CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6,

Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 и Cul966, а также их гомологи или модифицированные варианты.

В предпочтительных способах изобретения адресно взаимодействующая последовательность Crispr трансфицирована. Такие последовательности известны специалистам и включают gPHK (направляющие PHK), crPHK, tracrPHK и sgPHK. Адресно взаимодействующая последовательность Crispr связывается с комплементарной последовательностью в геноме растения-хозяина и адресно взаимодействует с белком Cas в соответствующем участке.

Трансфекция системы Crispr/Cas в растительную клетку со сниженной экспрессией и/или активностью POLQ снижает случайную вставку компонентов Crispr/Cas в геном растения. Не желая быть связанными теорией, транзитная трансфекция компонентов Crispr может снижать ненаправленное действие и/или повышать специфичность системы Crispr/Cas. В других вариантах реализации изобретения предложены способы создания растений, в которых компоненты Crispr (такие как фермент Cas) являются стабильно трансфицированными путем генетической рекомбинации или гомологичной рекомбинации.

В некоторых вариантах реализации предложены способы транзитной трансфекции молекулы нуклеиновой кислоты. Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты для транзитной трансфекции содержит растительную экспрессионную кассету. Подходящая растительная экспрессионная кассета содержит 5' и 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей транскрипт. Термин "функционально связанный" относится к нуклеотидным последовательностям в одном фрагменте нуклеиновой кислоты, связанным таким образом, что функцию одной регулирует другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью так, что он способен регулировать экспрессию этой кодирующей последовательности (то есть кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем данного промотора).

Предпочтительно растительная экспрессионная кассета содержит промотор, который стимулирует экспрессию в растениях и сигнал полиаденилирования. Примеры промоторов экспрессии нуклеотидной последовательности включают растительные промоторы, такие как промотор CaMV 35S (Odell et al., 1985), CaMV 19S (Lawton et al., 1987), nos (Ebert et al., 1987), Adh (Уокер et al., 1987), сахарозсинтаза (Yang и Russell, 1990), α -тубулин, актин (Wang et al., 1992), cab (Sullivan et al., 1989), Case (Hudspeth and Grula, 1989) или связанные с комплексом R-гена (Chandler et al., 1989). Можно также применять тканеспецифичные промоторы, такие как промоторы клеток корня (Conkling et al., 1990) и тканеспецифичные энхансеры (Фромм et al., 1986). Примеры растительных векторов экспрессии включают подробно описанные в Becker, D. et al., 1992, *New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border*, *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197; и Bevan, M. W., 1984, *Binary Agrobacterium vectors for plant transformation*, *Nucl. Acid. Res.* 12:8711-8721; и *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; в: *Transgenic Plants*, Vol. 1, *Engineering and Utilization*, eds.: Kung и R. Wu, Academic Press, 1993, С. 15-38.

В некоторых вариантах реализации предложены способы, обеспечивающие стабильную, сайт-специфическую интеграцию молекулы нуклеиновой кислоты путем генетической рекомбинации. Сайт-специфическая интеграция относится к интеграции в определенный участок генома, которая зависит от нуклеотидной последовательности в геноме. Это отличает ее от случайной интеграции. В одном варианте реализации нуклеиновая кислота интегрирована в геном растения путем гомологичной рекомбинации. Известны подходящие способы и векторы для индуцирования гомологичной рекомбинации. Например, можно получить вектор гомологичной рекомбинации, содержащий представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты, фланкированную на ее 5'- и 3'-концах нуклеотидными последовательностями, которые гомологичны эндогенным растительным последовательностям. Гомологичную рекомбинацию можно применять, например, для замены на хромосоме гена дикого типа не имеющим к нему отношения новым геном, инактивированным геном или модифицированной версией гена дикого типа (новым аллелем). Гомологичную рекомбинацию можно также индуцировать нуклеазами, такими как нуклеазы "цинковые пальцы" (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), нуклеазы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), мегануклеазы и никующие эндонуклеазы.

Например, нуклеиновая кислота может кодировать мутировавшую форму эндогенного полипептида или молекулы РНК. Мутации могут приводить к усилению функции или потере функции (например, инактивирующая мутация). В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты могут содержать, например, первый участок, второй участок и третий участок. Первый и третий участки по существу гомологичны представляющему интерес геном. Второй участок может содержать мутировавшие формы эндогенного гена или, например, кодировать маркер. Предпочтительно маркер представляет собой положительный маркер селекции, такой как ген устойчивости к лекарственным средствам, ген, кодирующий поверхностный маркер, ген, кодирующий флюоресцентный маркер, или ген, кодирующий 3-галактозидазу. Подходящие для растений способы и векторы гомологичной рекомбинации известны в данной области техники и описаны, например, в заявке WO 2003027261.

В одном варианте реализации нуклеиновая кислота интегрирована в геном растения путем сайт-специфической рекомбинации. В растениях протестировано несколько систем сайт-специфической рекомбинации, включая систему Cre/lox, систему Flp/FRT и систему R/RS. Рекомбиназы оказывают свои

эффекты путем стимуляции рекомбинации между двумя рекомбинирующими участками. В случае сайта рекомбинации является сайтом Lox, а в случае Flp сайт рекомбинации является сайтом Frt. Эти сайты рекомбинации содержат палиндромы, разделенные ассиметричной последовательностью. Рекомбинация между целевыми сайтами, расположенными параллельно (так называемые "прямые повторы") на одной и той же линейной молекуле ДНК, приводит к удалению промежуточной последовательности ДНК в виде кольцевой молекулы. В описанных в настоящем документе способах для трансфекции представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты, фланкированной соответствующей распознаваемой последовательностью совместно с подходящей рекомбиназой (например, Flp, Cre, or R рекомбиназа), можно применять растения и растительные клетки, несущие в своем геноме стабильные распознаваемые последовательности (например, сайт FRT, lox или RS). Трансфекция приводит к стабильной интеграции молекулы нуклеиновой кислоты.

При транзientной либо стабильной трансфекции трансфицируемая молекула нуклеиновой кислоты может содержать селективные или скринируемые маркеры, "Маркерные гены" представляют собой гены, которые придадут определенный фенотип клеткам, экспрессирующим маркерный белок, и таким образом дают возможность отличить трансфицированные клетки от клеток, у которых маркер отсутствует. Такие гены могут кодировать селективный либо скринируемый маркер, в зависимости от того, наделяет ли маркер признаком, который можно "отобрать" химическими средствами, то есть с помощью селективного агента (например, гербицида, антибиотика или тому подобного), или же это просто признак, который можно определить путем наблюдения или тестирования, то есть, "скрининга" (например, зеленый флюоресцирующий белок). Селективные маркерные гены включают гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, например кодирующие неомицин фосфотрансферазу II (NEO) и гигромицин фосфотрансферазу (HPT), а также гены, наделяющие устойчивостью к гербицидным соединениям. Гены устойчивости к гербицидам обычно кодируют модифицированный целевой протеин, нечувствительный к гербициду, или фермент, который расщепляет или нейтрализует гербицид в растении, прежде чем тот начнет действовать. (См. DeBlock, et al., (1987) EMBO J. 6:2513-2518; DeBlock, et al., (1989) Plant Physiol. 91:691-704; Fromm, et al., (1990) 8:833-839; Gordon-Kamm, et al., (1990) 2:603-618). Например, устойчивость к гербицидам глифосату или сульфонилмочевине получают с помощью генов, кодирующих мутантные целевые ферменты, 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS) и ацетолактатсинтазу (ALS). Многие примеры подходящих маркерных белков известны в данной области техники и могут быть применены в практике осуществления настоящего изобретения. В предпочтительных вариантах реализации способов изобретения наличие селективного или скринируемого маркера проверяют в трансфицированных растительных клетках или регенерированных из них растениях.

"Трансфекция" в настоящем документе определяется как процесс введения нуклеиновой кислоты в растительную клетку и включает в себя термин "трансформация". Растительные клетки и части растений включают отдельные клетки и ткани из пыльцы, семязачатков, листьев, эмбрионов, корней, кончиков корня, пыльников, цветков, фруктов, побегов, стеблей и семян; а также пыльцу, семязачатки, листья, эмбрионы, корни, кончики корня, пыльники, цветки, фрукты, стебли, побеги, черенки, корневые побеги, семена, протопласты, каллус и тому подобное. Трансфекция может происходить в естественных или искусственных условиях с применением различных общеизвестных в данной области техники способов. Подходящие способы включают вирусную инфекцию, электропорацию, липофекцию и бомбардировку частицами. Примеры подобных методик описаны в Paszkowski et al., EMBO J. 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986), и Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987). Трансфекция включает введение нуклеиновой кислоты в клетки растений физическими или химическими способами или с помощью вирусной инфекции. Однако специалисту в данной области техники должно быть понятно, что этот процесс не включает в себя введение нуклеиновой кислоты путем скрещивания.

Применив стандартные методики, известные в данной области техники, из трансфицированных клеток можно регенерировать целое растение. В дополнение к трансфекции культивируемых *in vitro* растительных клеток, тканей или органов, можно также трансфицировать целое живое растение. Для введения генов в растительные клетки широко применяют систему передачи, опосредованную *Agrobacterium*, с помощью которой можно ввести ДНК в ткани целого растения. Подходящие процессы включают в себя погружение саженцев, листьев, корней, семядолей и так далее в суспензию *Agrobacterium*, что можно усилить вакуумной инфльтрацией, а также для некоторых растений применяют погружение цветущего растения в раствор *Agrobacterium* (погружение цветка), после чего оплодотворяют трансформированные гаметы.

Успешно трансфицированным клеткам, которые предпочтительно идентифицируют путем селекции или скрининга и культивируют в соответствующей среде, способствующей регенерации, затем дают возможность регенерировать в растении. "Регенерация" относится к процессу выращивания растения из растительной клетки (например, растительного протопласта или эксплантата), и такие способы общеизвестны в данной области техники.

В предпочтительном варианте реализации представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты трансфицируют с помощью системы T-ДНК *Agrobacterium*. Подходящие штаммы *Agrobacterium*

включают LBA4404, EHA101, C58, EHA105, AGL1 или GV3101. Т-ДНК может представлять собой модифицированную плазмиду Ti или искусственный вектор, полученный из плазмиды Ti (вызывающей опухоль плазмиды), к которым в настоящем документе относится обозначение "Т-ДНК вектор". Плазмида Ti представляет собой кольцевую молекулу ДНК, содержащую участок Т-ДНК и участок *vir* (вирулентный). Эндогенный участок Т-ДНК содержит гены для биосинтеза ауксина (*aux*), цитокинина (*цита*) и опина (*ocs*), фланкированные по правой и левой границам. Границы представляют собой несовершенные прямые повторы, имеющие 24 пары оснований. Гены вирулентного участка ответственны за перенос Т-ДНК в растительные клетки. Например, эндонуклеаза *VirD2* с помощью *VirD1* делает разрез на границах Т-ДНК, высвобождая одноцепочечную копию Т-ДНК, Т-нить, которую транспортирует в растительные клетки транспортная система, кодируемая *virB*. Белок *VirE2* связывает Т-нить в клетке-хозяине, и комплекс входит в ядро растительной клетки.

В некоторых вариантах реализации представляющую интерес нуклеиновую кислоту вставляют в область Т-ДНК плазмиды Ti. Предпочтительно удаляются гены *aux*, *сyt* и *ocs* плазмиды Ti (то есть плазмиды "обезоружена").

В некоторых вариантах реализации используют искусственный вектор, полученный из плазмиды Ti.

Применение для введения ДНК в растительную клетку опосредованных *Agrobacterium* растительных векторов интеграции общеизвестно в данной области техники. См., например, способы, описанные в Fraley et al., (1985), Rogers et al., (1987) и U.S. Pat. № 5,563,055, специально включены в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах реализации один или больше генов плазмиды Ti мутированы для усиления эффективности трансформации, например, как в штаммах *Agrobacterium*, где экспрессия гена *vir* и/или его индукция изменена из-за присутствия мутанта или химерных генов *virA* или *virG* (например, Chen и Winans, 1991, J. Bacteriol. 173: 1139-1144; и Scheeren-Groot et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 6418-6246). В другом варианте реализации штамм *Agrobacterium* может содержать добавочную копию гена *virG*, такую как супер ген *virG*, полученный из pTiBo542.

В предпочтительном варианте реализации используют бинарную систему Т-ДНК. В бинарной системе Т-ДНК и необходимые для передачи Т-ДНК в растительные клетки гены *vir* находятся на разных плаزمидах. "Бинарная плазмида" содержит представляющую интерес нуклеиновую кислоту и предпочтительно растительный маркер, фланкированный с левой и правой стороны Т-ДНК. Бинарная плазмида также обычно содержит одну или больше точек начала репликации, дающих возможность репликации в *E.coli* и *Agrobacterium*, и бактериальный селективный маркер. "Плазмида-помощник" содержит гены *vir* из плазмиды Ti. Векторы бинарной системы Т-ДНК доступны на коммерческой основе. Раскрыта также бинарная векторная система, где Т-участок расположен на хромосоме штамма *Agrobacterium* (см., например, EP 176 112 В).

В предпочтительных вариантах реализации способов настоящего изобретения способы включают предоставление растительной клетки с молекулой нуклеиновой кислоты, указанная молекула содержит представляющую интерес нуклеотидную последовательность, фланкированную по правой границе (ПГ) последовательностью, полученной из последовательности Т-ДНК *Agrobacterium*, и по левой границе (ЛГ) последовательностью Т-ДНК, полученной из последовательности Т-ДНК *Agrobacterium*. Как обсуждалось в настоящем документе, молекула нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать регуляторные последовательности для стимулирования экспрессии в растениях и/или маркерных генах. Предпочтительно в способах предложен также домен *vir*, полученный из плазмиды Ti. Домен *vir* может присутствовать на той же молекуле нуклеиновой кислоты, которая описана выше, или может быть предложен в виде отдельного вектора, например, плазмиды-помощника. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что полный домен *vir* из плазмиды Ti не является необходимым.

Не желая быть связанными теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что незащищенный 3' конец одноцепочечной Т-ДНК (левая граница) обычно является субстратом для опосредованной POLQ реакции репарации, которая приводит к случайной интеграции. Снижение POLQ в растительной клетке снижает или устраняет случайную интеграцию Т-ДНК, не оказывая при этом действия генетическую рекомбинацию и транзистентную экспрессию. Соответственно ожидается, что снижение POLQ будет снижать или устранять случайную интеграцию, если в растительную клетку трансфицирован любой источник нуклеиновой кислоты, который приводит к присутствию в ядре одноцепочечной ДНК с незащищенным 3' концом.

В принципе для трансфекции можно применять все растения. Предпочтительные трансгенные растения выбирают, например, из семейств Aceraceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Agnesaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Carifolaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae или Poaceae и предпочтительно из растений, выбранных из группы семейств Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae или Poaceae. Предпочтительными являются культурные растения, такие как растения, преимущественно выбранные из группы родов хлопчат, дыня, цикорий, папайя, слива, арахис, рапс, канола, подсолнечник, сафлор, маслина, кунжут, фундук, миндаль, авокадо, лавр, тыква, лен, соя, фисташка, огуреч-

ник, кукуруза, пшеница, рожь, овес, сорго и просо, тритикале, рис, ячмень, маниок, картофель, сахарная свекла, баклажан, люцерна, а также многолетние травы и кормовые растения, масличная пальма, овощи (кочанные овощи, корнеплодные овощи, клубневые овощи, стручковые овощи, плодоносящие овощи, луковичные овощи, листовые овощи и стеблевые овощи), греча, топинамбур, кормовые бобы, вика, чечевица, карликовая фасоль, люпин, клевер и люцерна, упомянув лишь некоторые из них. Предпочтительно растение представляет собой Corn, Oilseed Rape, Canola, Cotton, Potato, Soybean, Sugar Beet, Squash, Cantaloupe, Rice, Flax, Raddicchio, Papaya, Alfalfa или Wheat. Наиболее предпочтительными растениями являются Corn, Cotton, Soybean, Canola and Rice. В предпочтительном варианте реализации растительная клетка не является *Arabidopsis thaliana*.

Растения, как и все многоклеточные эукариоты, экспрессируют полимеразу тета, которую кодирует ген POLQPol (0). В настоящем изобретении POLQ и полимеразы тета используются взаимозаменяемо. POLQ содержит центральный домен, который у растений имеет примерно 800 остатков, и полимеразный домен, который принадлежит к семейству ДНК-полимераз "А" (см, например, Yousefzadeh and Wood DNA Repair 2013 12:1-9). Полимеразный домен содержит 5 "мотивов" (см. фиг. 2А в Yousefzadeh and Wood). В этих участках последовательности у растений особенно сохраняют свою гомологичность, в частности в мотивах 2, 5 и 6.

Иллюстративная последовательность POLQ из растений представляет собой "геликазу и полимеразу, содержащую белок ТЕВІСНІ" из *Arabidopsis thaliana*. Белковую последовательность из 2154 аминокислот можно найти в базе данных NCBI под регистрационным номером BAD93700.1. Последовательность ТЕВІСНІ была также опубликована в Inagaki et al. (Plant Cell 18 (4), 879-892 (2006)). Гены POLQ в других растениях можно идентифицировать, например, с помощью поиска выравнивания BLAST с последовательностью POLQ из *Arabidopsis thaliana*. Например, гены POLQ из следующих иллюстративных растений перечислены в базе данных NCBI под следующими регистрационными номерами:

рис *Oryza sativa*: XP_015619406;
 картофель *Solanum tuberosum*: XP_006356662;
 соя *Glycine max*: XP_003545584;
 сахарная свекла *Beta vulgaris*: XP_010667709;
 томат *Solanum lycopersum*: XP_010325163;
 банан *Musa acuminata* Код последовательности: ref|XM_009385225.1|;
 яблоко *Malus x domestica*: Код последовательности: ref|XM_008380001.1|;
 виноград *Vitis vinifera* Код последовательности: ref|XM_010650232.1|;
 рапс *Brassica napus* Код последовательности: ref|XM_013882859.1|;
 апельсин *Citrus x sinensis* Код последовательности: ref|XM_006476088.2|;
 кукуруза *Zea mays* Код последовательности: AQQ40086.

Семейство программ BLAST, которые можно применять для поиска сходства по базе данных, включает: BLASTN для запроса нуклеотидных последовательностей по базе данных нуклеотидных последовательностей; BLASTX для запроса нуклеотидных последовательностей по базе данных белковых последовательностей; BLASTP для запроса белковых последовательностей по базе данных белковых последовательностей; TBLASTN для запроса белковых последовательностей по базе данных нуклеотидных последовательностей; TBLASTX для запроса нуклеотидных последовательностей по базе данных нуклеотидных последовательностей.

Альтернативно для идентификации гена POLQ из определенных видов растений можно применять стандартные молекулярные методики. Например, для идентификации желаемого полинуклеотида в кДНК или библиотеке геномной ДНК из желаемых видов растений можно применять олигонуклеотидные зонды, основанные на последовательности ТЕВІСНІ. Зонды можно применять для гибридизации с последовательностями геномной ДНК или кДНК, чтобы выделить гомологичные гены в представляющих интерес растениях.

Альтернативно, ген POLQ можно легко амплифицировать из образцов нуклеиновой кислоты с применением обычных методик амплификации. Например, ПЦР можно использовать для амплификации последовательностей генов непосредственно из мРНК, из кДНК, из геномных библиотек или библиотек кДНК. ПЦР и другие способы амплификации *in vitro* также могут быть полезны, например, для клонирования последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белки, которые надо экспрессировать, для создания нуклеиновых кислот, используемых в качестве зондов для детекции наличия желаемой мРНК в образцах, для секвенирования нуклеиновой кислоты или для других целей. Подходящие для идентификации гена POLQ в растениях праймеры и зонды можно создать на основе последовательности ТЕВІСНІ. Общий обзор ПЦР см. в протоколах ПЦР: A Guide to Methods and Applications (Innis, M, Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.), Academic Press, San Diego (1990). В растительных клетках, применяемых в описанных в настоящем документе способах, экспрессия и/или активность POLQ снижается. Снижение экспрессии POLQ может происходить на уровне нуклеиновых кислот или белков. Предпочтительно объем функциональной экспрессии POLQ снижен по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа. Предпочтительно экспрессия и/или активность снижена по меньшей мере на 50% по сравнению с соответствующей расти-

тельной клеткой дикого типа, более предпочтительно экспрессия и/или активность снижена по меньшей мере на 70%.

В некоторых вариантах реализации экспрессию POLQ определяют путем измерения экспрессии нуклеиновой кислоты POLQ. Подходящие способы включают ПЦР в режиме реального времени, количественную ПЦР, нозерн-блоттинг, секвенирование генов, в частности секвенирование РНК, и методики выявления экспрессии генов, например, анализ на микрочипах. В предпочтительных вариантах реализации экспрессию определяют, измеряя уровень белка POLQ. Подходящие способы включают ELISA, иммуноцитохимию, проточную цитометрию, вестерн-блоттинг, протеомику и масс-спектрометрию. Предпочтительно экспрессию POLQ определяют с помощью иммуноферментного анализа. Подходящие иммуноанализы включают радио-иммуноанализ, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммуноанализ "сэндвич", иммунорадиометрический анализ, гель-диффузионную реакцию преципитации, иммунодиффузионный анализ, реакцию преципитации, реакцию агглютинации (например, реакция агглютинации в геле, реакция гемагглютинации и т.д.), реакцию связывания комплемента, иммунофлюоресцентный анализ, анализ с белком А и иммуноэлектрофорез.

В некоторых вариантах реализации активность POLQ относится к способности POLQ связывать ДНК, в частности хроматин. Такую активность можно измерить любым способом, известным специалисту в данной области техники, таким как иммуноблоттинг хроматиновых фракций с антителом POLQ, как описано в Fernandez-Vidal et al., 2014 Nature Communications 5.

В некоторых вариантах реализации активность POLQ относится к его способности действовать как полимеразы. Такую активность можно измерить, например, с помощью метода удлинения праймера, описанного в Hogg et al. Nucleic Acids Res. 2012 Mar; 40(6): 2611-2622, с помощью анализа MMEJ, как описано Kent et al. Nat Struct Mol Biol. 2015 Mar; 22(3): 230-237. Zhan et al. (Nat Struct Mol Biol. 2015 Apr; 22(4): 304-311) описывает дополнительные анализы для измерения активности POLQ. Как понятно специалисту в данной области техники, снижение активности POLQ относится к снижению активности по отношению к активности дикого типа POLQ из того же организма.

Подавления POLQ можно достичь путем интродукции мутации, которая разрушает ген, уменьшая экспрессию POLQ, путем полного подавления экспрессии или путем приведения продукта гена в нефункциональное состояние. Например, мутация может представлять собой точечную мутацию, инсерцию или делецию, и мутация может находиться в кодирующей (например, в экзоне POLQ) или некодирующей части гена POLQ (например, в области промотора POLQ). Yousefzadeh и Wood (DNA Repair, Volume 12, Issue 10, 2013, Page 871) предлагают структурные сравнения членов семейства POLQ и обсуждают местоположение каталитических доменов. Предпочтительные мутации разрушают полимеразный домен POLQ, как показано на фиг. 2 в Yousefzadeh и Wood, которая тем самым включена в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительно мутант POLQ снижает экспрессию и/или активность по меньшей мере на 50% по сравнению с геном дикого типа.

Мутации в гене POLQ можно создать любым из способов, общеизвестных специалистам в данной области техники, включая методы случайного мутагенеза, такие как облучение, случайную инсерцию ДНК (например, с помощью транспозонов Т-ДНК), или с помощью химического мутагена. Кроме того, согласно определенным аспектам изобретения ген POLQ можно мутировать с применением сайт-направленного мутагенеза. В некоторых вариантах реализации ген POLQ мутирован или разрушен с применением гомологичного вектора рекомбинации или целевой нуклеазы, такой как нуклеазы "цинковые пальцы" (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), нуклеазы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) или мегануклеазы. Предпочтительно используют систему CRISPR/Cas. Эти способы известны в данной области техники, и специалист будет способен определить такие способы как подходящие в свете раскрытия настоящего изобретения. Известно несколько методик скрининга специфичных мутантных аллелей, например Deletegene (Delete-a-gene; Li et al., 2001, Plant J27: 235-242) применяет анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР) для скрининга мутантов с делецией, вызванной мутагенезом быстрых нейтронов, TILLING (целевые индуцированные местные повреждения в геномах; McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18:455-457) идентифицирует EMS-индуцированные точечные мутации и т.д.

В предпочтительном варианте реализации в растительной клетке есть мутантный ген POLQ гена, предпочтительно мутантными являются оба аллеля. В предпочтительных вариантах реализации мутация представляет собой "нокаут" аллеля, то есть функциональный белок не вырабатывается.

В некоторых вариантах реализации для снижения экспрессии или активности POLQ используют систему CRISPR/Cas. Система CRISPR/Cas основана на направляемой РНК нуклеазе Cas9 из прокариотической адаптивной иммунной системы CRISPR типа II (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) (см., например, Belahj et al., Plant Methods 9:39, 2013). Эта система содержит три компонента: Белок Cas9, crРНК и tracrРНК. CrРНК и tracrРНК обычно предложены в виде одной молекулы РНК, относящейся к gРНК (направляющая РНК). Направляющую РНК можно экспрессировать с помощью малых ядерных РНК промоторов, таких как U3 и U6. Описаны также растительные кодон-оптимизированные версии Cas9, и их можно экспрессировать в растениях либо с помощью конститутивных промоторов (например, промотор 35S), либо с помощью тканеспецифичного или индуцируемого

промотора.

Эта система содержит Cas9, адресно взаимодействующие с конкретным локусом генома с помощью gРНК. Каноническая длина gРНК составляет 20 пар оснований, однако для адресного взаимодействия с растительными локусами можно применять 19-22 пар оснований. gРНК предназначена для связывания с целевой последовательностью, в данном случае с геном POLQ. Сайт связывания выбирают таким образом, чтобы целевая ДНК сопровождалась последовательностью PAM (мотивом, прилегающим к протоспейсеру). В этой системе часто используют белок из Cas9 *Streptococcus pyogenes*, SpCas9, поскольку он имеет короткую PAM последовательность распознавания NGG. Поэтому при использовании SpCas9, можно разработать подходящие gРНК, скринируя в геномном локусе POLQ последовательность (N) 19-22NGG. Также для определения подходящих целевых сайтов доступен онлайн-инструмент CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>, Ren et al).

Дополнительную информацию относительно использования системы CRISPR/Cas9 для индукции мутаций у растений можно найти в Lowderet al. *Plant Physiology* 2015 169:971-985 and Belhaj et al. 2013 *Plant Methods* 9:39.

Снижения экспрессии POLQ можно также достичь с помощью "ингибирующей молекулы нуклеиновой кислоты", присутствие которых в клетке приводит к деградации или угнетению функции, транскрипции или трансляции его целевого гена специфичным к последовательности образом. Иллюстративные молекулы нуклеиновой кислоты включают аптамеры, siРНК, искусственные микроРНК, интерферирующие РНК или РНКи, малые интерферирующие РНК, рибозимы, антисмысловые олигонуклеотиды и экспрессионные кассеты ДНК, кодирующие указанные молекулы нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты является антисмысловым олигонуклеотидом. Антисмысловые олигонуклеотиды (AON) обычно ингибируют свою цель, связывая целевую мРНК и пространственно блокируя экспрессию путем препятствия рибосоме. AON могут также ингибировать свою цель путем связывания с целевой мРНК, формируя таким образом гибрид ДНК-РНК, который может быть субстратом для РНКазы H. AON можно также создать как составные структуры двух или больше олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды, олигонуклеозиды, миметики олигонуклеотидов или их участки или части. Такие соединения в данной области техники относятся также к гибридам или гапмерам. Способы конструирования и модификации таких гапмеров описаны, например, в публикации патента США № 20110092572 и 20100234451. AONs обычно содержат от 12 до 80, предпочтительно от 15 до 40 нуклеотидных оснований. Предпочтительно AON содержат участок из по крайней мере 8 нуклеотидных оснований, на 100% комплементарный целевой мРНК.

В другом способе нуклеиновую кислоту можно транскрибировать в рибозим или каталитическую РНК, которая влияет на экспрессию мРНК. См. патент США № 6423885. Можно сконструировать рибозимы для специфичного спаривания с целевой РНК и расщепления фосфодиэфирного остова в определенном участке с целью функциональной инактивации целевой РНК. Гетерологичные нуклеиновые кислоты могут кодировать рибозимы, сконструированные для расщепления определенных транскриптов мРНК, тем самым предотвращая экспрессию полипептида. Рибозимы типа "головка молотка" расщепляют мРНК в участках, обозначенных фланкирующими участками, которые формируют комплементарные пары оснований с целевой мРНК.

Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты является молекулой двуцепочечной РНКи, специфичной для мРНК, кодируемой геном POLQ. Предпочтительно молекула содержит фрагмент гена POLQ, молчащий в структуре перевернутого повтора. Перевернутые повторы разделены спейсером, часто интроном. Конструкт РНКи запускают подходящим промотором и трансфицируют в растение. Транскрипция трансгена приводит к образованию молекулы РНК, которая складывается, формируя двуцепочечную шпильчатую РНК. Растение распознает эту структуру двуцепочечной РНК и разрезает на маленькие РНК (длиной около 21 нуклеотидов), называемые малыми интерферирующими РНК (siРНК). siРНК образуют соединение с белковым комплексом (RISC), который продолжает непосредственное разрушение мРНК целевого гена. Конструкт может быть преобразован в конструкт, содержащий последовательность, которая функционально связана с регуляторным участком и последовательностью терминации транскрипции и которая транскрибируется в РНК, способную образовывать двуцепочечную РНК. Способы применения РНКи для ингибирования экспрессии гена известны специалистам в данной области техники. См., например, патент США № 5034323; 6326527; 6452067; 6573099; 6753139; и 6777588. См. также WO 97/01952; WO 98/53083; WO 99/32619; WO 98/36083; и публикацию патента США 20030175965, 20030175783, 20040214330 и 20030180945. siРНК, направленные на POLQ человека, были описаны в Ceccaldi et al. *Nature*. 2015 Feb 12; 518(7538): 258-262.

Методики вирус-индуцированного подавления генов (VIGS) являются вариацией методик РНКи, в которой задействована эндогенная противовирусная защита растений. Инфицирование растений рекомбинантными вирусами VIGS, содержащими фрагменты ДНК хозяина, приводит к посттранскрипционному подавлению целевого гена. В одном варианте реализации можно применять систему VIGS на основе вируса погрешковости табака (ВПТ). VIGS системы на основе вируса погрешковости табака, описаны, например, в Baulcombe, *Curr. Opin.*

Plant Biol. 2: 109-113 (1999); Lu, et al, *Methods* 30: 296-303 (2003); Ratcliff, et al, *The Plant Journal* 25:

237-245 (2001); и пат. США № 7229829.

В некоторых вариантах реализации активность POLQ снижена в результате обеспечения растительной клеткой со связывающей POLQ молекулой. Предпочтительно активность POLQ снижена по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа. Предпочтительно молекула, связывающая POLQ, связывается с POLQ и ингибирует его ферментную активность и/или его способность связывать ДНК.

Предпочтительно молекула, связывающая POLQ, является маленькой молекулой. Дополнительные связывающие агенты включают антитела, а также неиммуноглобулиновые связывающие агенты, такие как полученные благодаря фаговому дисплею связывающие пептидов, и имитаторы антител, например, аффитела, тетранектины (CTLD), аднектины (монотела), антикарины, DARP (анкирины), авимеры, iMab, пероксисомы, пептидные аптамеры, домены Куница, аптамеры и аффилины. Термин "антитело" включает, например, антитела как естественного, так и искусственного происхождения, поликлональные и моноклональные антитела, химерные антитела и полностью синтетические антитела и их фрагменты, такие как, например, фрагменты Fab', f(ab')₂, Fv или Fab, или другие иммуноглобулиновые фрагменты, распознающие антиген.

Предпочтительно молекула, связывающая POLQ, является антителом к POLQ или его фрагментом, связывающим антиген. Распознающие POLQ антитела доступны на коммерческой основе (см., например, X3-Q588V7 [ABX] от "Абмарт" [Abmart], который произведен с использованием белка TEBICHI).

Антитела, которые связывают конкретный эпитоп, можно создать способами, известными в данной области техники. Например, поликлональные антитела можно получить стандартным способом иммунизации млекопитающего (например, кроликов, мышей, крыс, овец, коз). Поликлональные антитела затем содержатся в сыворотках иммунизированных животных, и их можно выделить с помощью стандартных процедур (например, аффинной хроматографии, иммунопреципитации, эксклюзионной хроматографии и ионообменной хроматографии). Моноклональные антитела можно получить стандартным методом иммунизации млекопитающего с последующим выделением из плазмы крови В-клеток, вырабатывающих соответствующие моноклональные антитела, и гибридизацией с клеткой миеломы (см., например, Mishell, et al., 1980). Скрининг для распознавания эпитопа можно провести с помощью стандартных методов иммуноанализа, включая методы ELISA, радиоиммунологические анализы, иммунофлюоресценцию, иммуногистохимию и вестерн-блоттинг (Ausubel, et al., 1992). Для получения антител можно также применять методы отбора антител *in vitro*, такие как фаговый дисплей антитела (см., например, Schirrmann et al., 2011). Предпочтительно для повышения локализации в ядре к антителу добавляют сигнал ядерной локализации.

В объем настоящего изобретения также входит не встречающееся(ая)ся в естественных условиях растение или растительная клетка, в котором(ой) экспрессия и/или активность POLQ в указанном растении или растительной клетке снижена, как описано в настоящем документе, при этом растение или растительная клетка не является *Arabidopsis thaliana*. В предпочтительном варианте реализации растение или растительная клетка экспрессирует "ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты" POLQ, как описано в настоящем документе. В предпочтительном варианте реализации растение или растительная клетка имеет мутированный POLQ, как описано в настоящем документе. Указанные растения и растительные клетки являются полезными для выполнения способов, описанных в настоящем документе. Соответственно, в объем настоящего изобретения также входит применение растения или растительной клетки для трансфекции представляющей интерес молекулы нуклеиновой кислоты.

В объем настоящего изобретения также входят растительные клетки и растения, произведенные способами, которые описаны в настоящем документе. Указанные растения и растительные клетки обладают преимуществом, поскольку содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но в их геноме события случайной рекомбинации нуклеиновой кислоты ограничены или отсутствуют. В предпочтительных вариантах реализации в указанные растительные клетки и растения имеют сниженную экспрессию и/или активность POLQ, как описано в настоящем документе.

В объем настоящего изобретения также входит потомство растительных клеток и растений, произведенных способами, которые описаны в настоящем документе. В настоящем описании термин "потомство" означает потомство (включая семена) любого поколения родительского растения, полученное в соответствии с описанными в настоящем документе способами, где потомство содержит представляющую интерес молекулу нуклеиновой кислоты.

Определения

В настоящем описании "содержать" и его спряжения используют в неограничивающем смысле, означая, что понятия, следующие за словом, включены, но понятия, не упомянутые отдельно, не исключены. Кроме того, глагол "состоять" можно заменить на "состоять главным образом из", что означает, что соединение или соединение или вспомогательное соединение, как определено в настоящем документе, может содержать дополнительный(е) компонент(ы) к отдельно упомянутым, при этом указанный(е) дополнительный(е) компонент(ы) не изменяет уникальные характеристики изобретения.

Единственное число в настоящем описании относится к одному или более чем одному (то есть по меньшей мере одному) грамматическому объекту. Например, "элемент" означает один элемент или более

чем один элемент. Все ссылки на патенты и литературу, приведенные в настоящей заявке, включены посредством ссылки во всей полноте.

В настоящем описании гомологичная рекомбинация (HR) относится к безошибочной репарации разрыва с применением неповрежденной матрицы (обычно сестринской хроматиды).

В настоящем описании HDR (репарация по гомологии) относится более широко к применению гомологичных последовательностей для прямой репарации по матрице. Разрыв также может быть восстановлен, если он фланкирован гомологичными последовательностями, и в этом случае режим репарации называется SSA, для одноцепочечного отжига; результат в этом случае подвержен ошибкам.

Все другие репарации, не являющиеся HR, HDR или SSA, обычно называются соединениями концов (EJ). Поскольку EJ не использует гомологию для прямой репарации, его первоначально называли негомологичным соединением концов (NHEJ). Для самого известного пути EJ, который был открыт первым, необходимы и/или белки KU70, KU80, LIG4, и его называют NHEJ или классический NHEJ (cNHEJ). EJ, который не является cNHEJ (который проявляется в клетках, дефицитных по cNHEJ), называют "альтернативным" EJ или alt-EJ. Поскольку в этом типе EJ часто на соединениях продукта репарации обнаруживают отрезки идентичных оснований, его также называют микро-гомологически-опосредованным EJ или MMEJ.

В настоящем описании TMEJ (pol тета-опосредованный EJ) относится к опосредованной POLQ репарации, принятой в данной области техники. Не желая связывать себя теорией, авторы настоящего изобретения предполагают, что большинство alt-EJ репараций фактически опосредовано TMEJ. Изобретение далее объяснено в следующих примерах. Эти примеры не ограничивают объем изобретения, но служат просто для иллюстрации изобретения.

Примеры

Пример 1 Трансфекция Т-ДНК.

Уровень техники

Agrobacterium tumefaciens является возбудителем заболевания корончатый галл у двудольных растений. Часть ДНК патогена, Т-ДНК, переносится в растительные клетки, где она интегрируется в геном, являясь примером генетического переноса между царствами. Гены, расположенные на Т-ДНК, трансформируют растительные клетки в опухолевые клетки, синтезирующие питательные вещества, которые бактерия может использовать в качестве источника углерода и азота, создавая таким образом для себя экологическую нишу². Способность этого патогена передавать ДНК широко используют в биотехнологиях как средство инсерции чужеродных генов в растения. Несмотря на то, что сейчас много известно о взаимодействии между *Agrobacterium* и растительными клетками и процессах, приводящих к интеграции Т-ДНК в геном хозяина, фактический механизм интеграции остается неизвестным¹. Уже два десятилетия назад выдвинули гипотезу, что *Agrobacterium* использует ферменты репарации двухцепочечного разрыва (DSB) хозяина для катализации интеграции Т-ДНК, что привело к генетическому исследованию ключевых белков различных путей репарации DSB³. Участие в интеграции Т-ДНК канонического негомологичного соединения концов и факторов гомологичной рекомбинации изучено, но с ограниченными и изменчивыми результатами⁴⁻⁷. Даже когда разные пути были одновременно сделаны невозможными, интеграция Т-ДНК оставалась возможной^{8,9}, что предполагает участие неизвестного пути, который еще предстоит идентифицировать.

Одна потенциально информативная особенность интеграции Т-ДНК, которая может говорить о механизме интеграции - это тип геномного "шрама", так называемая "филерная ДНК", часто встречающаяся в участках интеграции Т-ДНК. Филерные ДНК - это вставки последовательностей ДНК, которые иногда содержат участки, идентичные последовательностям, присутствующим в непосредственном окружении сайта интеграции^{10,11}. Авторы настоящего изобретения заметили поразительное сходство композиции филерной ДНК в событиях интеграции Т-ДНК с продуктами репарации подверженного ошибкам DSB у нематоды *C. elegans* и мухи *D. melanogaster*. У этих видов связанные с репликацией, а также вызванные нуклеазой DSB могут репарироваться по пути альтернативного соединения концов, который критически зависит от полимеразы тета А-семейства (Pol θ), и в некоторых случаях результатом являются филеро-подобные вставки¹²⁻¹⁴. Эта отличительная особенность Pol θ -опосредованного соединения концов эволюционно консервативна, и ее также можно обнаружить в сайтах репарации в ДНК-вставках в клетках млекопитающих^{15,16}. Кодрующие Pol θ гены можно найти в геномах всех многоклеточных эукариот, включая модельное растение *Arabidopsis thaliana*, в котором ген называется *Tebichi*^{17,18}.

Для решения вопроса, ответственен ли Pol θ за синтез филерной ДНК в растениях и *ipso facto* за катализацию интеграции Т-ДНК, авторы настоящего изобретения трансформировали растения дикого типа (Co1-0) и два нокаутных аллеля Pol θ (*teb-5* и *teb-2*¹⁷) методом погружения цветка. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что трансформация растений дикого типа Co1-0 происходила нормально, тогда как от растений *teb-2* и *teb-5* не удалось получить ни одного трансформанта (фиг. 1а-с).

Чтобы исключить вероятность того, что эти результаты появились вследствие неочевидного морфологического дефекта цветка, который предотвратил проникновение *Agrobacterium* в женские гаметофиты (целевые клетки для трансформации), авторы настоящего изобретения проанализировали транзи-

ентную экспрессию Т-ДНК в этих клетках. С этой целью авторы настоящего изобретения применили Т-ДНК, экспрессирующую маркер GUS::интрон под контролем промотора АСТ11, который экспрессируется в семязачатках/развивающихся семенах^{19,20}. После инфицирования *Agrobacterium* авторы настоящего изобретения обнаружили, что Т-ДНК-опосредованная транзientная экспрессия в растениях дикого типа и мутантах *Pol θ* не различалась (фиг. 1). Таким образом, Т-ДНК может достигать ядер целевой ткани, но ее интеграция полностью зависит от функционирующего *Pol θ*. Ранее было выдвинуто предположение, что интеграция Т-ДНК в клетках корня может отличаться от интеграции Т-ДНК в цветках²¹. Если при трансформациях цветка у *Arabidopsis* возможны тысячи соединений Т-ДНК в растительном геноме, то у трансформантов, полученных в ходе трансформации корня, выявлено только ограниченное их количество, что делает невозможным априорный прогноз. Следовательно, авторы настоящего изобретения инфицировали *Col-0* и дефицитные по *pol θ* корни штаммом *Agrobacterium*, доставляющим Т-ДНК, которая обеспечивает устойчивость к гербициду фосфинотрицину (ФФТ), и использовали в качестве маркера стабильной интеграции образование зеленых побегов на селекционных планшетах, содержащих ФФТ. Как ожидалось, у *Col-0* авторы настоящего изобретения обнаружили ~80% успешную трансформацию, но частота трансформации у дефицитных по *pol θ* корней была значительно снижена (фиг. 2a-b, f); фактически, ни у одного из 853 каллусов зеленые побеги не развились. Регенерация побегов из каллуса при неселективных условиях в корнях, дефицитных по *pol θ*, была не нарушена. Авторы настоящего изобретения отметили, что инфицированные дефицитные по *pol θ* корни не формировали каллус, но они не росли и погибали через несколько недель, что подтверждает, что формирование каллуса может быть результатом транзientной экспрессии неинтегрированной Т-ДНК. Действительно, при исследованиях ТАИЛ-ПЦР, направленных на клонирование и валидацию интеграции Т-ДНК, были получены продукты только в ДНК, выделенной из инфицированных каллусов *Col-0*, но не в ДНК, выделенной из инфицированных каллусов *teb-5* (фиг. 2c). Чтобы подтвердить эффективность доставки Т-ДНК и транзientной экспрессии в дефицитных по *pol θ* корнях, авторы настоящего изобретения показали успешную экспрессию кодируемого Т-ДНК гена GUS::интрон в инфицированных корнях *teb-2* и *teb-5* (фиг. 2d-e). Исходя из этих данных авторы настоящего изобретения делаем заключение, что для трансформации клеток корня, как и в случае гамет цветка, успешность интеграции Т-ДНК зависит от работы *pol θ*. Т-ДНК переносят в растительные клетки в виде одноцепочечной молекулы ДНК (ssДНК), при этом бактериальный белок VirD2 ковалентно присоединяется к 5' концу¹. Этот конец называют правой границей Т-ДНК (ПГ). 3' конец Т-ДНК, левая граница (ЛГ), остается незащищенным, что делает его отличным субстратом для *pol θ*-опосредованной реакции репарации: *in vitro* синтез ДНК с помощью *pol θ* стабилизирует два минимально парных 3' выступающих конца ДНК²². Это биохимическое свойство *pol θ* совместно с его продемонстрированной ролью в репарации физиологических разрывов генома дает возможность предположить удивительно простой механизм интеграции Т-ДНК в геном растения: непреднамеренный захват Т-ДНК при репарации спонтанных геномных DSB (фиг. 3a). Крайняя чувствительность мутантных по *pol θ* растений к индуцированным DSB агентам¹⁷ говорит в пользу важной роли *pol θ* в репарации геномных разрывов. В поддержку влияния эндогенных DSB на сайты захвата Т-ДНК говорят данные, что причиненный ДНК дополнительный ущерб геному путем либо ионизирующей радиации, либо эктопической экспрессии эндонуклеаз стимулирует и направляет интеграцию Т-ДНК^{23,24}. Чтобы исследовать особенности действия *pol θ* *in vivo*, авторы настоящего изобретения провели систематический анализ >10,000 продуктов его действия: соединений Т-ДНК/растительного генома, получающихся в растительных клетках дикого типа при интеграции путем погружения цветка¹¹. Почти в 70% всех событий интеграции одно или оба соединения содержат филерную ДНК по большей части неизвестного происхождения. В недавнем исследовании с использованием строгих критериев провели картирование происхождения 16% филеров последовательностей, расположенных в пределах 10 килобаз от инсерции Т-ДНК, или в фланкирующих участках генома, или в самой Т-ДНК¹¹. Однако полученные ранее данные позволили предположить, что филеры могут отражать молекулярную мозаику существующих композиций из множества более мелких сегментов, которые имеют различное происхождение¹⁰. Авторы настоящего изобретения систематически анализировали коллекцию из ~5000 филеров с применением принципа наибольшей общей подпоследовательности (LCS), который определяет наиболее длинный возможный участок идентичности между филером и изучаемой последовательностью (фиг. 3b). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что ~60% филеров имеют по меньшей мере одно совпадение с ДНК в пределах 1-- пар оснований у соединения. В ~20% из них авторы настоящего изобретения определили дополнительные участки, картируя другие фланкирующие позиции. Матрицы, используемые для синтеза филера, по преимуществу находятся рядом с соединением (фиг. 3b-d), и задействованы как Т-ДНК, так и растительный геном (фиг. 3d). Многие филеры имеют сложные композиции с несколькими участками, которые можно с достоверностью отследить, но иногда между ними встречаются нуклеотиды неизвестного происхождения. Такое расположение сегментарных последовательностей обеспечивает проверку *in vivo* предположения, что *pol θ* может способствовать репарации, делая возможным один или больше циклов праймерного переключения матрицы, функции, которая может способствовать образованию комплементарных концов, стимулирующих распад.

Чтобы проверить, действительно ли взаимодействие праймер-матрица стимулирует филеры, авторы

настоящего изобретения создали тепловые карты, по которым построили содержащие филеры соединения по их родственным соответствующим филерам последовательностям поблизости от соединений. Такой подход визуализирует степень идентичности последовательности между предсказанным 3'-концом, который образует соединение, то есть праймером, и последовательностью непосредственно выше матрицы, которая задействована в синтезе филеров. Чтобы избежать возможной двусмысленности при интерпретации, авторы настоящего изобретения ограничили анализ лишь теми случаями ($n=589$), в которых филер имеет только одно пограничное совпадение в фланкирующей области, авторы настоящего изобретения действительно обнаружили значительную избыточность совпадающих оснований (фиг. 3e): 66% филеров имеют по меньшей мере 1 нуклеотидный праймер, 57% содержат по меньшей мере 2 совпадения между праймером и матрицей, а 47% имеют 3 праймерных нуклеотида на 3'-конце. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что i) что филер ДНК представляет собой продукт $\rho\theta$ удлинения 3' конца геномного разрыва, являющийся минимально парным основаниям с 3'-конца Т-ДНК, или наоборот и, ii) что за сложную композицию филеров отвечает способность этой полимеразы делать переключение праймер-матрица. Представляет интерес, что тепловая карта, которая отражает степень микрогомологии соединений Т-ДНК без филеров (которые также требуют для своего формирования $\rho\theta$), очень похожа на тепловую карту праймер-матрица соединений, содержащих филеры (фиг. 3e, f). Это наблюдение подтверждает идею, что микрогомология репарации DSB не отражает незначительно повышенную стабильность при спаривании некомплементарных нитей ssДНК, но, напротив, отражает биохимическое свойство полимеразы предпочтительно удлинять 3'-конец, парный небольшому количеству комплементарных оснований. Совокупно результаты авторов настоящего изобретения говорят о концептуально простом механизме интеграции Т-ДНК в растительные геномы: растительный $\rho\theta$ -опосредованный путь репарации вместо соединения концов геномного разрыва соединяет концы экзогенно обеспеченных молекул Т-ДНК. Результат аналогичен и в зародышевых клетках, и в соматических клетках. Большинство интеграций Т-ДНК (63%) имеют инвертированную конфигурацию репарации, где к одной из сторон растительного генома присоединена 3' ЛГ Т-ДНК, что говорит о том, что 3' конец Т-ДНК является предпочтительным субстратом. Способность $\rho\theta$ расширять минимально парные 3' концы обеспечивает объяснение механизма присоединения левой границы Т-ДНК к растительному геному, а его толерантность к переключению праймер-матрица может объяснять существование мозаичности филеров (см. фиг. 4). Менее ясен вопрос, как 5' правая граница Т-ДНК присоединяется или к растительному геному (в случае однокопийной интеграции), или к другой 5' границе Т-ДНК (в случае инвертированной ориентации репарации). Однако подробный анализ соединений ПГ-Т-ДНК/растительный геном подтверждает очень похожий механизм присоединения: здесь также обнаружены филеры, указывающие на действие $\rho\theta$. Возможно, что этой реакции предшествует переход одноцепочечной Т-ДНК в двухцепочечную конфигурацию, инициированный либо геномным захватом 3'-конца Т-ДНК, либо еще неизвестным механизмом^{25,26}. Интересно, что DSB, который захватывает 3' конец Т-ДНК на одной из сторон, защищен от 5'-резекционного действия ковалентно присоединенного бактериального белка VirD2. В заключение, этот 5' конец может требовать дополнительной ферментативной обработки, что может объяснять пониженную эффективность интеграции в растениях, несущих мутации в различных обрабатывающих ДНК ферментах 4-9.

Помимо предоставления понимания механизма интеграции Т-ДНК в растениях, данные авторов настоящего изобретения оказывают глубокое влияние на биотехнологические пути создания трансгенных культур: адресно взаимодействующий $\rho\theta$ будет полностью исключать нежелательную случайную интеграцию в технологиях направленного воздействия на ген, при этом не влияя на HR - у всех изученных к настоящему времени видов $\rho\theta$ для HR не нужен. Абсолютная зависимость от $\rho\theta$ интеграции Т-ДНК в гаметофиты, а также в корни *Arabidopsis* вместе с многочисленными проявлениями отличительных признаков влияния $\rho\theta$ на интеграцию Т-ДНК во всех изученных высших растениях, включая культурные виды, такие как рис, томат, клубника или табак, имеет в перспективе широкое применение²⁷⁻³⁰.

Методы

Линии растений и условия роста

Информация о мутантах с инсерцией была получена на веб-сайте SIGnAL по адресу <http://signal.salk.edu>. *teb-5* (SALK_018851) и *teb-2* (SALK_035610) были получены из коллекции SALK Т-ДНК³¹. Аллели *teb-5* и *teb-2* были описаны ранее¹⁷. Растения выращивали на почве при 20°C в цикле 16 ч освещения/8 ч темноты.

Трансформация методом погружения цветка

Дикий тип (экотип *Col-0*) и мутантные растения *Arabidopsis* были трансформированы с применением обезоруженного штамма *Agrobacterium* LBA1100³², несущего бинарный вектор pCambia1301, методом погружения цветка, как описано ранее³³. Трансгенные семена отобрали на твердой среде MA без сахарозы с добавлением 100 мкг/мл нистатина, 100 мкг/мл тиментина (чтобы убить все оставшиеся *Agrobacterium* и предотвратить развитие инфекции) и 15 мкг/мл гигромицина для отбора событий интеграции. Альтернативно, растения трансформировали с применением *A. tumefaciens* штамма AgI³⁴, несущего бинарный вектор pSDM3900³⁵. Трансгенные семена отобрали на твердой среде MA без сахарозы с добавлением 100 мкг/мл нистатина, 100 мкг/мл тиментина (чтобы убить все оставшиеся *Agrobacterium* и пре-

дотратить развитие инфекции) и 15 мкг/мл фосфинотрицина для отбора событий интеграции. Чтобы определить транзитные события, цветущие растения подвергли погружению цветка в штамм *Agrobacterium AgI*, несущий рСАМВ1А1301_АСТ11, который создавали путем клонирования фрагмента в 850 пар оснований из генома Со1-0, содержащего промотор АСТ11, в бинарный вектор рСАМВ1А1301, из которого извлекали маркер стабильной интеграции и его промотор (последовательность доступна по запросу). Через 6 дней цветы собирали и окрашивали в течение ночи в фосфатном буфере (рН=7,3), содержащем 1 мМ $K_3Fe(CN)_6$ и 1 мМ $K_4Fe(CN)_6$, 10 мМ $Na_2ЭДТА$, 0,1% ДСН, 0,1% Тритон X-100 и 2 мМ циклогексиламмониевой соли. После этого цветки очищали 70% этанолом.

Трансформация корней

Трансформации корня выполняли на дикого типа (Со1-0) и мутантных растениях *A. thaliana*, как описано ранее³⁶, с применением обезоруженного штамма *A. tumefaciens* LBA1100³², несущего бинарный вектор рСАМВ1А3301. После двух дней совместного культивирования часть корневых эксплантатов немедленно окрашивали в фосфатном буфере (рН=7,3), содержащем 1 мМ $K_3Fe(CN)_6$ и 1 мМ $K_4Fe(CN)_6$, 10 мМ $Na_2ЭДТА$, 0,1% ДСН, 0,1% Тритон X-100 и 2 мМ циклогексиламмониевой соли, а оставшуюся часть корневых эксплантатов переносили на твердую среду, содержащую 10 мкг/мл ФФТ для селекции трансформантов и 500 мкг/мл карбенициллина и 100 мкг/мл ванкомицина, чтобы убить оставшиеся *Agrobacterium*.

Аmplification инсерционных соединений

Растительный материал измельчали в порошок в TissueLyser (Retch, Хан, Германия) в жидкости №2. ДНК выделяли, как описано ранее³⁷. 1 мкл выделенной ДНК использовали для ПЦР в общем объеме 20 мкл. Полимераза Taq и буферы были сделаны в местной лаборатории. Соединения Т-ДНК-геном выделяли с помощью ТАИЛ-ПЦР³⁸, применяя вырожденный праймер AD2 (NGTCGASWGANAWGAA)³⁸ и специфичные вложенные праймеры:

ЛГ0	GTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTA ³⁸	погружение цветка, ЛГ
ЛГ1	GAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACC ³⁸	погружение цветка, ЛГ
ЛГ2	GTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAG ³⁸	погружение цветка, ЛГ
ЛГ0 рС3301	CAAGCACGGGAACCTGGCATGACGTG	трансформация корня, ЛГ
ЛГ1 рС3301	GTCCCTGCCCGTCACCGAGATTTGAC	трансформация корня, ЛГ
ЛГ2	GTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAG ³⁸	трансформация корня, ЛГ
ПГ0	GGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGT ⁹	трансформация корня, ПГ
ПГ1	TGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCA ⁹	трансформация корня, ПГ
ПГ2	GTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGT ⁹	трансформация корня, ПГ

Определение геномных инсерций Т-ДНК

Все подтверждающие интеграцию Т-ДНК последовательности скачали с ENA/GenBank (регистрационные номера LN484267 через LN515397)¹¹. Чтобы определить соединения Т-ДНК инсерции, проводили MegaBLAST поиск между каждой последовательностью и эталонным геномом *Arabidopsis* (TAIR10) и соответствующей бинарной плазмидой. Затем анализировали обратный комплемент последовательности в последовательностях, где Т-ДНК присутствовала в 3'-участке. Чтобы сосредоточиться на высококачественных соединениях последовательностей, авторы настоящего изобретения включали только последовательности, где было показано идеальное соответствие 3' концу Т-ДНК, а также 5' геномному участку (≥ 20 пар оснований, без несоответствия, без разрыва) по соответствующему лучшему совпадению BLAST. Последовательности, в которых Т-ДНК и геномные совпадения BLAST не перекрывались, обозначали как филерную интеграцию, а последовательности, которые перекрывались или соединялись с совпадениями BLAST, обозначали как нефилерную интеграцию. Филеры, содержавшие неинформативные основания, удаляли. После применения таких фильтров для дальнейшего анализа осталось 10616 событий инсерции Т-ДНК.

Происхождение филеров

Чтобы определить происхождение филеров, авторы настоящего изобретения использовали алгоритм наибольшей общей подпоследовательности (LCS). Алгоритм определяет наибольшую общую последовательность между филером (запрос) и другой последовательностью (объект). Для каждого филера (≥ 6 пар оснований и ≤ 40 пар оснований) авторы настоящего изобретения определяли LCS в Т-ДНК и эталонном геноме *Arabidopsis*, в обоих направлениях цепей, в соответствии с положением геномного соединения Т-ДНК, которое определяли по его соответствующему лучшему совпадению BLAST, авторы настоящего изобретения искали плазмидную последовательность Т-ДНК и эталонный геном 25-6400 оснований от соединения в обоих направлениях. Чтобы вычислить избыточность найденных протяженностей LCS, авторы настоящего изобретения определили псевдослучайную вероятность нахождения LCS определенной длины для данного филера в последовательности ДНК. С этой целью авторы настоящего изобретения перетасовывали ДНК объекта для каждого филера и искали LCS (10-100 раз для каждого филера). Затем было создано распределение вероятности псевдослучайных длин LCS для каждого размера филера (≥ 6 пар оснований и ≤ 40 пар оснований). Избыточность между вероятным распределением и фактическим размером найденного размера LCS рассчитывали как фракция филеров, которые имеют длину LCS на правом конце вероятного распределения минус фракция ожидаемых филеров, авторы настоящего изобретения отмечали отдельные филеры как избыточные, если фактическое распределение его длины LCS было по меньшей мере в десять раз больше, чем вероятное. Чтобы определить, происходит ли филер из дающей Т-ДНК плазмиды, авторы настоящего изобретения применяли LCS с добавлением того, что участок использовали только в том случае, если LCS имела длину ≥ 13 пар оснований. Чтобы определить возможное происхождение филеров в геноме *Arabidopsis*, авторы настоящего изобретения применяли BLAST с отсекающим значением $E10^{-4}$.

Пример 2. Гомологичная рекомбинация.

Пример 1 показывает, что для стабильной случайной интеграции Т-ДНК необходим функционирующий Pol θ . Настоящий пример демонстрирует, что для стабильной интеграции путем гомологичной рекомбинации функциональный Pol θ не требуется.

Готовили конструктор Т-ДНК, содержащий около 6 пар оснований, гомологичных эндогенному локусу протофорфориноген оксидазы (PPO) *Arabidopsis*. Гомологичный участок содержит две точечные мутации, которые подтверждают устойчивость к гербициду бутафеницилу при интеграции путем гомологичной рекомбинации в локусе PPO (см. описание мутаций в Hanin et al., Plant J 2001). Кроме того, Т-ДНК кодирует фермент Cas9 (кодон-оптимизированный Cas9-AteCas9 *Arabidopsis* (Fauser et al. Plant J 79:348-359 2014)) и направляющую РНК, которая направляет фермент Cas9 в локус PPO. Экспрессией Cas9 управляет убиквитиновый промотор, а направляющая РНК находится под контролем промотора U6 (AtU6).

Растения дикого типа (Col-0) и два аллеля с нокаутом по Pol θ (teb-5 и teb-2¹⁷) преобразовывали трансформацией методом погружения цветка. Стабильную интеграцию Т-ДНК путем гомологичной рекомбинации измеряли по устойчивости к бутафеницилу.

Уровень стабильной интеграции в сайт-специфичном локусе между растениями дикого типа и мутантами по Pol θ будет аналогичным.

Пример 3. Трансфекция линейаризованной плазмидой.

Готовили плазмиду, содержащую около 6 пар оснований, гомологичных эндогенному локусу протофорфориноген оксидазы (PPO) *Arabidopsis*. Гомологичный участок содержит две точечные мутации, которые подтверждают устойчивость к гербициду бутафеницилу при интеграции путем гомологичной рекомбинации в локусе PPO (см. описание мутаций в Hanin et al., Plant J 2001). Кроме того, плазида кодирует фермент Cas9 (кодон-оптимизированный Cas9-AteCas9 *Arabidopsis* (Fauser et al. Plant J 79:348-359 2014)) и направляющую РНК, которая направляет фермент Cas9 в локус PPO. Экспрессия Cas9 находилась под контролем убиквитинового промотора, а направляющая РНК находилась под контролем промотора U6 (AtU6). Плазида также содержит уникальный сайт рестрикции. Плазмиду линейаризовали путем расщепления в соответствующем сайте рестрикции.

Протопласты получали из дефицитных по WT и Pol θ растений (teb-5 и teb-2), а линейаризованную плазмиду трансформировали в протопласты по стандартному протоколу трансформации PEG. Для селекции стабильных событий интеграции путем гомологичной рекомбинации колонии поддерживали в среде, содержащей бутафеницил. Уровень стабильной интеграции в сайт-специфичном локусе между растениями дикого типа и мутантами по Pol θ будет аналогичным.

Пример 4. Трансфекция растений томата.

Настоящий пример продемонстрирует снижение случайной интеграции в культурные растения, а именно томат (*Solanum lycopersum*). Ген POLQ из томатов идентифицировали из базы данных NCBI по регистрационному номеру XP_010325163 на основе поиска BLAST с использованием последовательности Tebichi.

Дефицитные по Pol θ мутанты томата создавали путем использования Pol θ как мишени для CRISPR и самоопыления для создания в следующем поколении гомологичных мутантов. Вкратце, гото-

вили конструктор Т-ДНК, кодирующий селективный по канамицину маркер, фермент Cas9 (растительный кодон-оптимизированный Cas9-pcoCas9 (Li et al. 2013 Nat Biotechnol 31:688-691)) и направляющую РНК, которая направляет фермент Cas9 в локус POLQ. Экспрессия Cas9 находилась под контролем промотора 35S, а направляющая РНК находилась под контролем промотора U3 (AtU3). Семядоли эксплантатов томатов трансформировали путем погружения в суспензию *Agrobacterium*, выбирали по устойчивости к канамицину и проводили скрининг по мутациям POLQ. Скрининг саженцев по мутациям POLQ проводят с применением анализа Surveyor (Voitas 2013 Annu Rev Plant Biol 64:327-350), и саженцы, содержащие в POLQ инактивирующие мутации, выращивали и проводили самоопыление для создания гомозиготных мутантов в следующем поколении. Влияние POLQ на случайную интеграцию демонстрировали с помощью опухолевого анализа, проведенного на растениях томата дикого типа и на мутантах томатах, дефицитных по Pol Θ . Вкратце, *Agrobacterium* вставляли в отверстие в стебле растений томатов дикого типа и дефицитных по pol Θ растений томатов. Случайную интеграцию измеряли путем измерения образования опухоли. В растениях томата WT появлялись опухоли, указывающие на события случайной интеграции, а в дефицитных по pol Θ растениях томата опухоли не появлялись.

Пример 5. Создание культурных растений, дефицитных по polQ.

Культурные растения, например пшеницу, сою, рис, хлопок, кукурузу или рапс, имеющее мутацию в одном или нескольких генах polQ (например, в одном или нескольких гомологичных генах), идентифицировали или создавали путем (случайного) мутагенеза или целенаправленного нокаута (например, с применением специфичной для последовательности нуклеазы, такой как мегануклеазы, нуклеазы "цинковые пальцы", TALEN, Crispr / Cas9, Crispr / Cpf1 и так далее). Снижение экспрессии и/или активности PolQ подтверждали с помощью количественной ПЦР, вестерн блоттинга или подобными методами.

Культурные растения, например пшеницу, сою, рис, хлопок, кукурузу или рапс, трансформировали конструктором, кодирующим ингибирующую polQ молекулу нуклеиновой кислоты или связывающую polQ молекулу (например, кодирующую polQ шпилечную РНК, антитело и так далее, под контролем конститутивного или индуцибельного промотора). Снижение экспрессии и/или активности PolQ подтверждали с помощью количественной ПЦР, вестерн блоттинга или подобными методами.

Пример 6. Трансфекция дефицитных по polQ растений с геном селективного маркера.

Растение из примера 5, имеющее пониженную экспрессию PolQ, а также соответствующее растение, имеющее экспрессию polQ дикого типа, трансформировали геном селективного маркера (например, *bar*, *gus*) с применением *Agrobacterium*, в соответствии с общеизвестными в данной области техники способами.

Проводят скрининг трансформантов по экспрессии гена селективного маркера. Трансформанты с пониженной экспрессией polQ демонстрировали транзистентную экспрессию гена селективного маркера, тогда как трансформанты с экспрессией polQ дикого типа демонстрировали стабильную экспрессию гена селективного маркера.

Геномную интеграцию гена селективного маркера оценивали с помощью, например, саузерн блоттинга геномной ДНК, выделенной из трансформированных растений с экспрессией polQ дикого типа или пониженной. Наличие гена селективного маркера можно определить в геномной ДНК растений с polQ дикого типа, тогда как растения с пониженной экспрессией polQ демонстрировали меньшую интеграцию гена селективного маркера или даже ее отсутствие.

Пример 7. Целевая инсерция путем гомологичной рекомбинации в дефицитных по polQ культурных растениях.

Дефицитные по PolQ растения из примера 5 и соответствующие растения, имеющие экспрессию polQ дикого типа, трансформировали представляющей интерес нуклеиновой кислотой для целевой интеграции путем гомологичной рекомбинации. Представляющая интерес нуклеиновая кислота содержит последовательности, гомологичные геномной ДНК в целевом сайте генома. Необязательно растение ко-трансформировали с помощью экспрессионного конструктора для последовательности специфичной нуклеазы, способной индуцировать разрыв ДНК на целевом сайте для усиления гомологичной рекомбинации. Проводили скрининг растений по интеграции представляющей интерес нуклеиновой кислоты с помощью, например, саузерн-блоттинга или ПЦР.

Растения, имеющие экспрессию polQ дикого типа, демонстрировали случайную инсерцию представляющей интерес нуклеиновой кислоты, а также целевую инсерцию путем гомологичной рекомбинации в целевом сайте. Растения с пониженной экспрессией polQ демонстрировали меньшую инсерцию представляющей интерес нуклеиновой кислоты или даже ее отсутствие, но демонстрировали при этом целевую инсерцию путем гомологичной рекомбинации представляющей интерес нуклеиновой кислоты в целевом сайте.

Ссылки.

1. Gelvin, S. B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 45–68
2. Zhu, J. *et al.* The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* **182**, 3885–3895 (2000).
3. Tinland, B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**, 178–184 (1996).
4. Gallego, M. E., Bleuyard, J.-Y., Daoudal-Cotterell, S., Jallut, N. & White, C. I. Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J.* **35**, 557–65 (2003).
5. Friesner, J. & Britt, A. B. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J.* **34**, 427–40 (2003).
6. Van Attikum, H. *et al.* The *Arabidopsis* AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4247–55 (2003).
7. Li, J. *et al.* Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19231–19236 (2005).
8. Mestiri, I., Norre, F., Gallego, M. E. & White, C. I. Multiple host-cell recombination pathways act in *Agrobacterium* mediated transformation of plant cells. *Plant J.* (2013). doi:10.1111/tpj.12398
9. Park, S.-Y. *et al.* *Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins. *Plant J.* (2015). doi:10.1111/tpj.12779

10. Windels, P., De Buck, S., Van Bockstaele, E., De Loose, M. & Depicker, A. T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. *Plant Physiol* **133**, 2061–2068 (2003).
11. Kleinboelting, N. *et al.* The structural features of thousands of T-DNA insertion sites are consistent with a double-strand break repair based insertion mechanism. *Mol. Plant* (2015). doi:10.1016/j.molp.2015.08.011
12. Chan, S. H., Yu, A. M. & McVey, M. Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in Drosophila. *PLoS Genet.* **6**, e1001005 (2010).
13. Roerink, S. F., van Schendel, R. & Tijsterman, M. Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in *C. elegans*. *Genome Res.* (2014). doi:10.1101/gr.170431.113
14. Koole, W. *et al.* A Polymerase Theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nat. Commun.* **5**, 3216 (2014).
15. Mateos-Gomez, P. A. *et al.* Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature14157
16. Yousefzadeh, M. J. *et al.* Mechanism of Suppression of Chromosomal Instability by DNA Polymerase POLQ. *PLoS Genet.* **10**, e1004654 (2014).
17. Inagaki, S. *et al.* Arabidopsis TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems. *Plant Cell* **18**, 879–92 (2006).
18. Yousefzadeh, M. J. & Wood, R. D. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. **12**, 1–9 (2013).
19. Desfeux, C., Clough, S. J. & Bent, A. F. Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. *Plant Physiol* **123**, 895–904 (2000).
20. Huang, S., An, Y. Q., McDowell, J. M., McKinney, E. C. & Meagher, R. B. The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Mol. Biol.* **33**, 125–39 (1997).

21. De Buck, S., Podevin, N., Nolf, J., Jacobs, A. & Depicker, A. The T-DNA integration pattern in Arabidopsis transformants is highly determined by the transformed target cell. *Plant J.* **60**, 134–45 (2009).
22. Kent, T., Chandramouly, G., McDevitt, S. M., Ozdemir, A. Y. & Pomerantz, R. T. Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ . *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2015).
doi:10.1038/nsmb.2961
23. Köhler, F., Cardon, G., Pöhlman, M., Gill, R. & Schieder, O. Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? *Plant Mol. Biol.* **12**, 189–99 (1989).
24. Salomon, S. & Puchta, H. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* **17**, 6086–95 (1998).
25. Tzfira, T., Frankman, L. R., Vaidya, M. & Citovsky, V. Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double-stranded intermediates. *Plant Physiol* **133**, 1011–1023 (2003).
26. Chilton, M. D. & Que, Q. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol* **133**, 956–965 (2003).
27. Zhu, Q.-H., Ramm, K., Eamens, A. L., Dennis, E. S. & Upadhyaya, N. M. Transgene structures suggest that multiple mechanisms are involved in T-DNA integration in plants. *Plant Sci.* **171**, 308–22 (2006).
28. Thomas, C. M. & Jones, J. D. Molecular analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration in tomato reveals a role for left border sequence homology in most integration events. *Mol Genet Genomics* **278**, 411–420 (2007).
29. Oosumi, T., Ruiz-Rojas, J. J., Veilleux, R. E., Dickerman, A. & Shulaev, V. Implementing reverse genetics in Rosaceae: analysis of T-DNA flanking sequences of insertional mutant lines in the diploid strawberry, *Fragaria vesca*. *Physiol. Plant.* **140**, 1–9 (2010).
30. Singer, K., Shibolet, Y. M., Li, J. & Tzfira, T. Formation of complex extrachromosomal T-DNA structures in *Agrobacterium tumefaciens*-infected plants. *Plant Physiol.* **160**, 511–22 (2012).

31. Alonso, J. M. *et al.* Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653–7 (2003).
32. Beijersbergen, A., Dulk-Ras, A. D., Schilperoort, R. A. & Hooykaas, P. J. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science (80-.)*. **256**, 1324–1327 (1992).
33. Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735–743 (1998).
34. Lazo, G. R., Stein, P. A. & Ludwig, R. A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnol. (N Y)* **9**, 963–967 (1991).
35. De Pater, S., Pinas, J. E., Hooykaas, P. J. J. & van der Zaal, B. J. ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 510–5 (2013).
36. Vergunst, A. C. *et al.* VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science (80-.)*. **290**, 979–982 (2000).
37. De Pater, S., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Hooykaas, P. J. & van der Zaal, B. J. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J* **7**, 821–835 (2009).
38. Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. & Whittier, R. F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* **8**, 457–463 (1995).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ сокращения случайной интеграции трансфицированных молекул нуклеиновой кислоты в растительную клетку, причем указанный способ включает трансфекцию растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, при этом экспрессия и/или активность полимеразы тета (POLQ) в указанной растительной клетке снижена по сравнению с растительной клеткой дикого типа за счет мутации и/или прямого нацеливания POLQ.

2. Способ трансфекции растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, причем способ включает трансфекцию растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, при этом экспрессия и/или активность полимеразы тета (POLQ) в указанной растительной клетке снижена по сравнению с растительной клеткой дикого типа за счет мутации и/или прямого нацеливания POLQ; и при этом указанный способ приводит к сокращению случайной интеграции трансфицированных молекул нуклеиновой кислоты в растительную клетку.

3. Способ экспрессии молекулы РНК или полипептида в растительной клетке, причем указанный способ включает трансфекцию растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную молекулу РНК или полипептид, при этом экспрессия и/или активность полимеразы тета (POLQ) в указанной растительной клетке снижена по сравнению с растительной клеткой дикого типа за счет мутации и/или прямого нацеливания POLQ; и при этом указанный способ приводит к сокращению случайной интеграции трансфицированных молекул нуклеиновой кислоты в растительную клетку.

4. Способ получения растения, экспрессирующего молекулу РНК или полипептид, причем указанный способ включает трансфекцию растительной клетки молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную молекулу РНК или полипептид, при этом экспрессия и/или активность полимеразы тета (POLQ) в указанной растительной клетке снижена по сравнению с растительной клеткой дикого типа за счет мутации и/или прямого нацеливания POLQ, и получение растения из указанной растительной клет-

ки; при этом указанный способ приводит к сокращению случайной интеграции трансфицированных молекул нуклеиновой кислоты в растительную клетку.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты интегрирована путем сайт-специфической генетической рекомбинации или гомологичной рекомбинации в хромосому растительной клетки.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная растительная клетка содержит антисмысловый олигонуклеотид, специфичный для пре-мРНК, кодируемой геном POLQ, или двуцепочечную молекулу РНКи, специфичную для мРНК, кодируемой геном POLQ.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что растительная клетка имеет один или более мутированных аллелей POLQ, таким образом, что экспрессия и/или активность POLQ снижена по меньшей мере на 70% по сравнению с геном дикого типа.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанная растительная клетка не является *Arabidopsis thaliana*.

9. Способ по любому из пп.1-4 или 6-8, отличающийся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты транзитивно трансфицирована в растительную клетку.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная транзитивно трансфицированная молекула нуклеиновой кислоты кодирует нуклеазу.

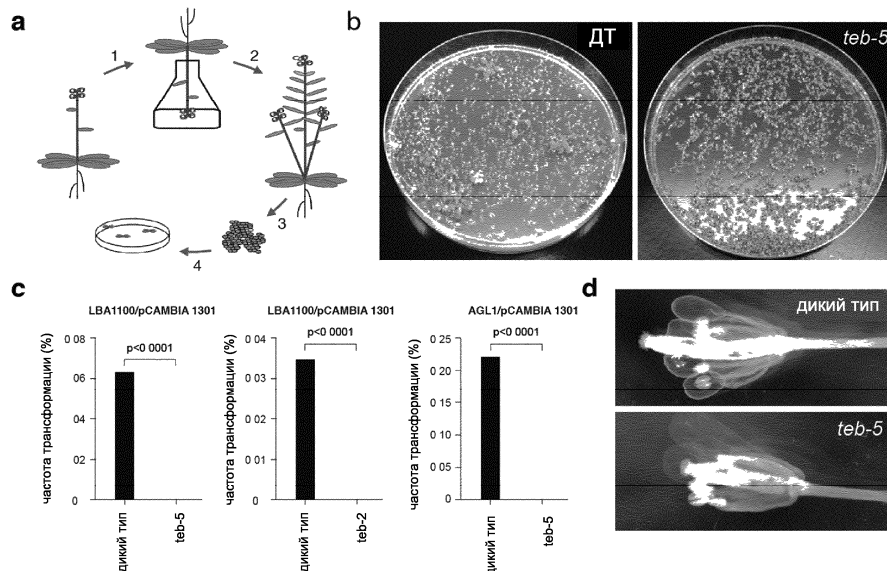
11. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная транзитивно трансфицированная молекула нуклеиновой кислоты кодирует компонент системы CRISPR/Cas.

12. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная транзитивно трансфицированная молекула нуклеиновой кислоты содержит растительную экспрессионную кассету.

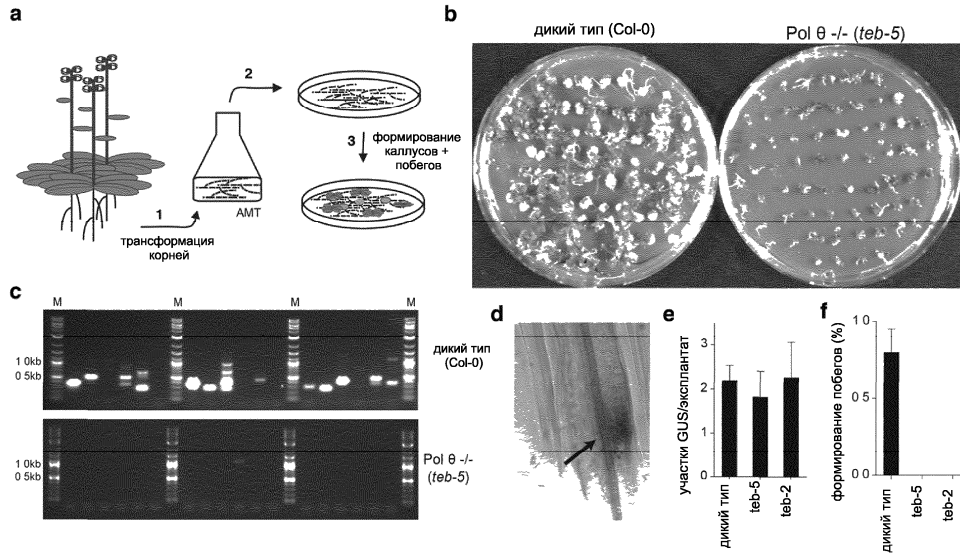
13. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что экспрессия POLQ в указанной растительной клетке снижена посредством мутации одного или более аллелей POLQ с использованием облучения, химического мутагена, случайной интеграции с использованием транспозона, сайт-направленного мутагенеза, гомологичного вектора рекомбинации или целевой нуклеазы.

14. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что экспрессия POLQ в указанной растительной клетке снижена путем обеспечения растительной клетки с ингибирующей POLQ молекулой нуклеиновой кислоты, причем указанная ингибирующая POLQ молекула нуклеиновой кислоты непосредственно нацелена на POLQ.

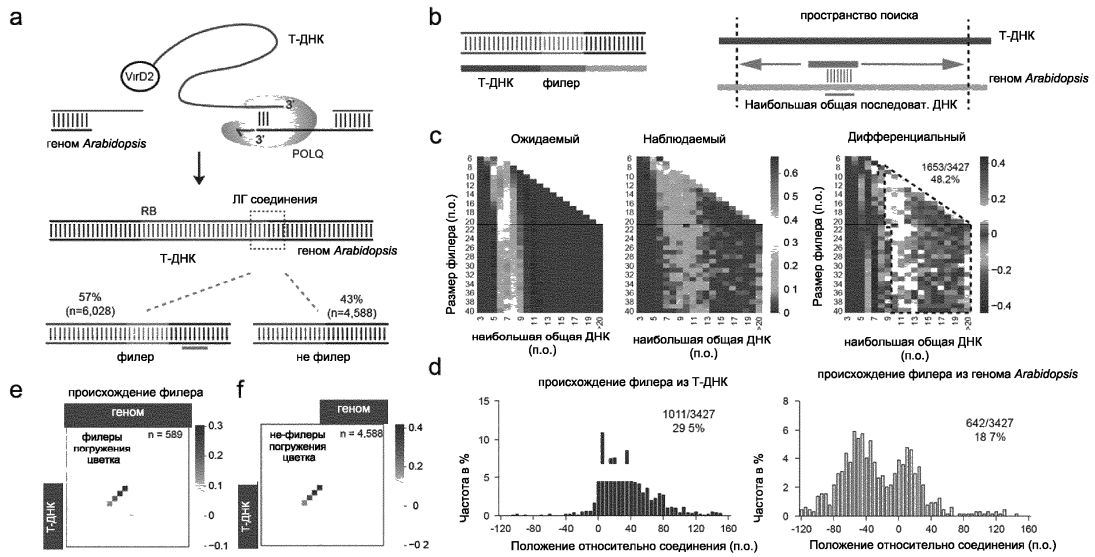
15. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что активность POLQ в указанной растительной клетке снижена путем обеспечения растительной клетки со связывающей POLQ молекулой, причем указанная связывающая POLQ молекула связывается с POLQ и ингибирует ее ферментативную активность и/или ее способность связывать ДНК.



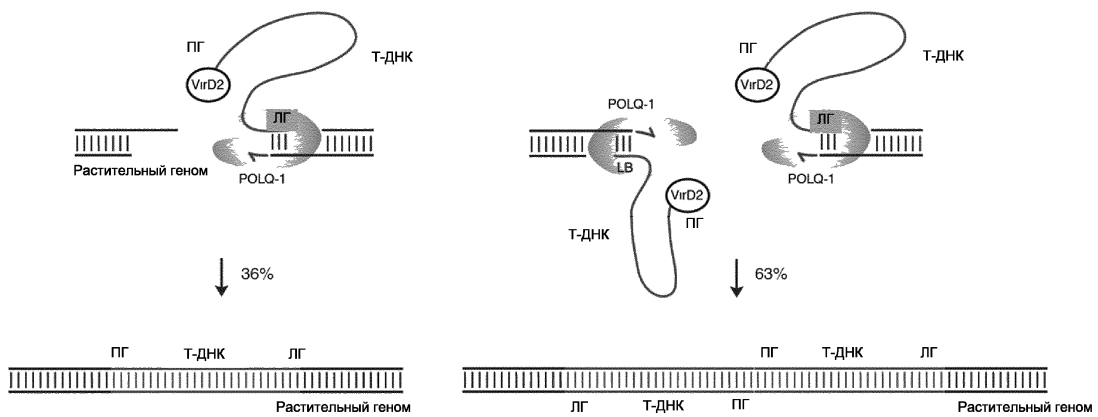
Фиг. 1



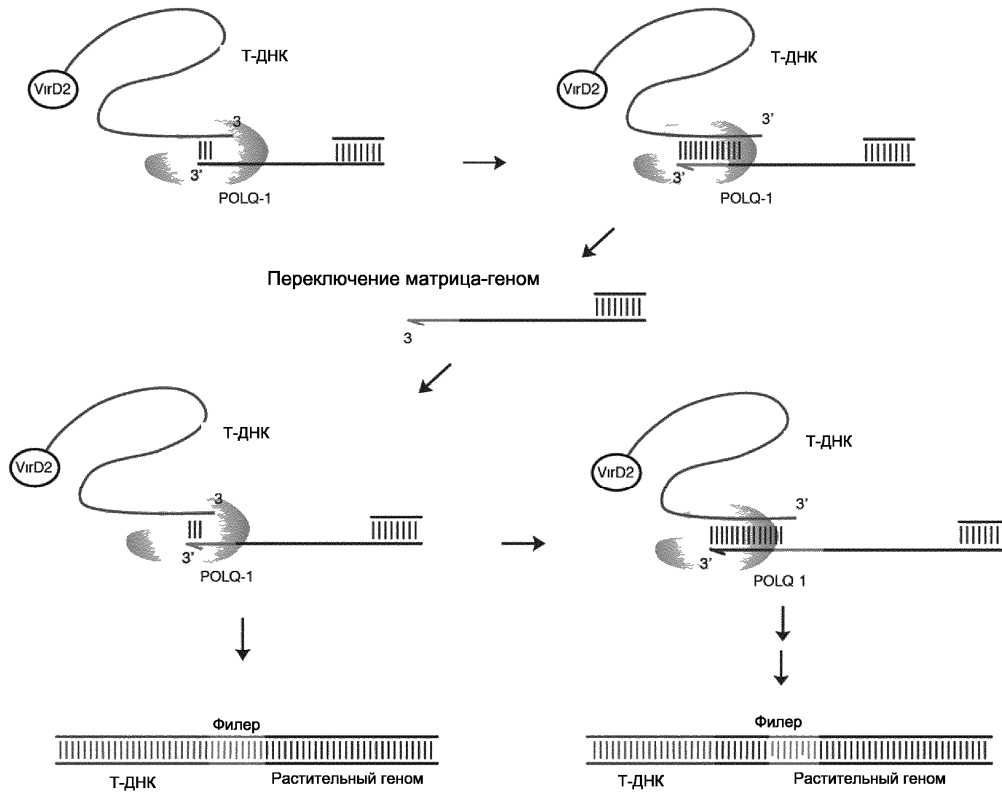
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4а



Фиг. 4b

