

Методы редактирования генома

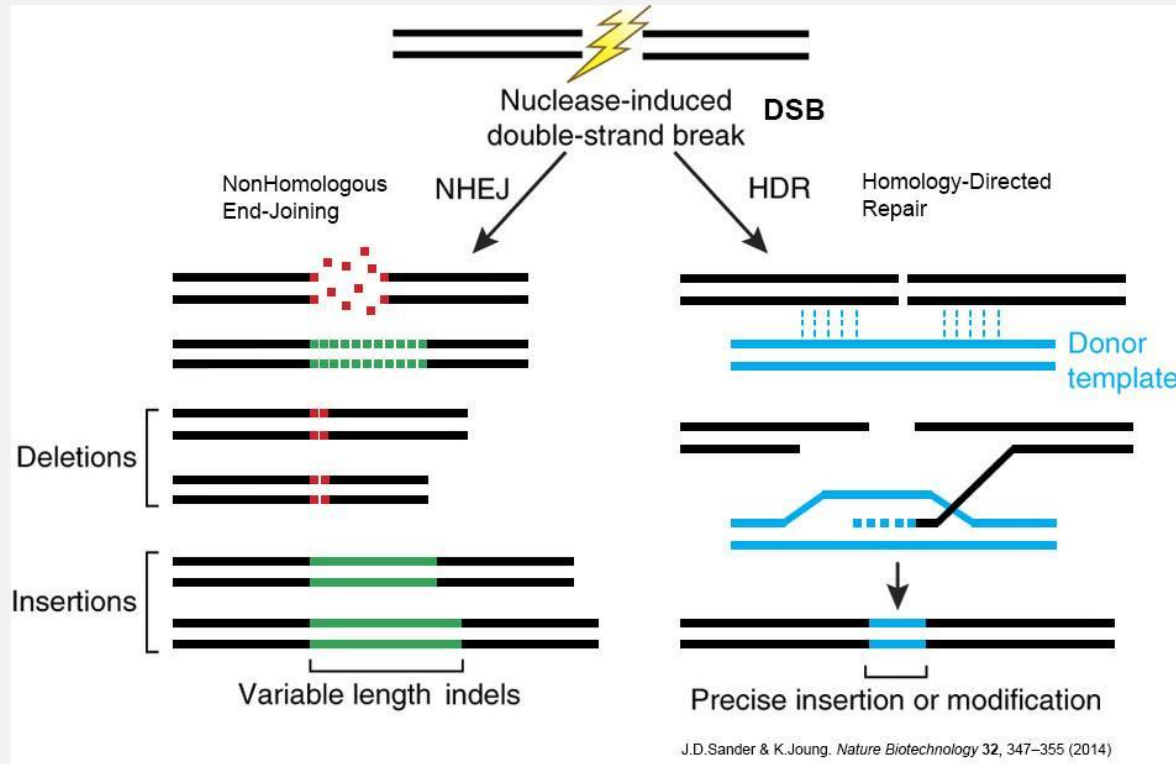
Mouravlev A., PhD, Research Fellow,
Centre for Brain Research,
Faculty of Medical and Health Sciences,
The University of Auckland,
Auckland, New Zealand

Редактирование генома

- Набор молекулярно-биологических методов по направленной модификации (делеции, вставки, точечные замены) геномной ДНК с использованием искусственных высокоспецифичных сайт-направленных нуклеаз (молекулярных ножниц).
Genome Editing with Engineered Nucleases (GEEN)
- Недостатки предшествующих технологий:
- Ограниченный круг организмов (гомологичная рекомбинация у дрожжей или “recombineering” (recombination-mediated genetic engineering) у мышей),
- Необходимость использования селективных маркеров (антибиотиков),
- Наличие остаточных последовательностей ДНК (*loxP* sites from Cre recombinase-mediated excision).

Два основных внутриклеточных пути репарации разрывов геномной ДНК:

1. Non-Homologous End Joining (NHEJ)
 2. Homology Directed Repair (HDR) or Homologous Recombination (HR)
- Присутствуют практически во всех типах клеток и организмов



NHEJ - образование вставок или делеций различной случайной длины (insertion/deletion mutations - indels), которые могут нарушать трансляцию белков за счет сдвига рамки считывания или блокировать связывание транс-активаторов с промоторами или энхансерами.

HDR - введение точечных мутаций, встройка протяженных участков ДНК.

Частота событий от 1% до 50% - отбор без селективных маркеров.

4 типа или семейства искусственных сайт-направленных нуклеаз:

1. Meganucleases (re-engineered homing endonucleases)
2. ZFNs (Zinc Finger Nucleases)
3. TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
4. CRISPR/Cas System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Nuclease)

Мегануклеазы

Мегануклеазы - искусственно сконструированные варианты природных эндонуклеаз рестрикции, хоминг нуклеаз (homing nuclease), с протяженными сайтами узнавания от 14 до 40 пн.

"Эгоистичные" белки – обеспечивают перемещение собственного нуклеазного гена и фланкирующих его последовательностей по геному.

Впервые обнаружены в 1990-х годах.

Известно несколько сотен мегануклеаз с различными сайтами узнавания длиной до 40 пн.

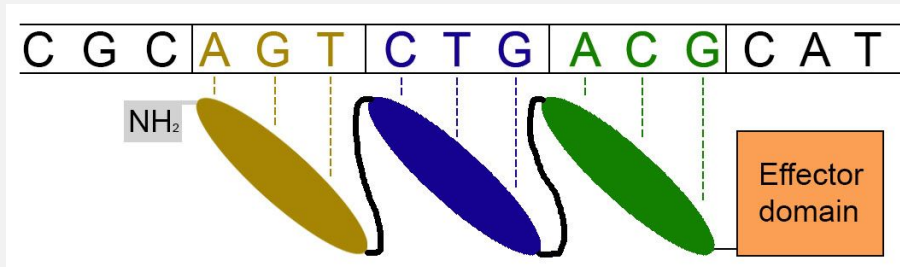
Последовательности узнавания вырождены.

Основной способ получения новых искусственных нуклеаз - введение аминокислотных замен в сайты узнавания с последующим анализом и отбором.

Основной недостаток - ограниченность набора сайтов узнавания и большая трудоемкость получения новых нуклеаз с заданной специфичностью.

Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

- Цинковый палец - небольшой домен в составе ДНК-связывающих белков (около 20 аминокислотных остатков), содержащий ионы цинка.
- Часто встречается в составе транскрипционных факторов, обеспечивая их специфическое связывание с промоторами.
- В зависимости от аминокислотного состава цинковые пальцы могут распознавать и связываться с различными фрагментами ДНК длиной от 3-х до 6-ти нп.
- В состав ДНК-связывающего домена (DNA Binding Domain, DBD) входит более 3-х цинковых пальцев.

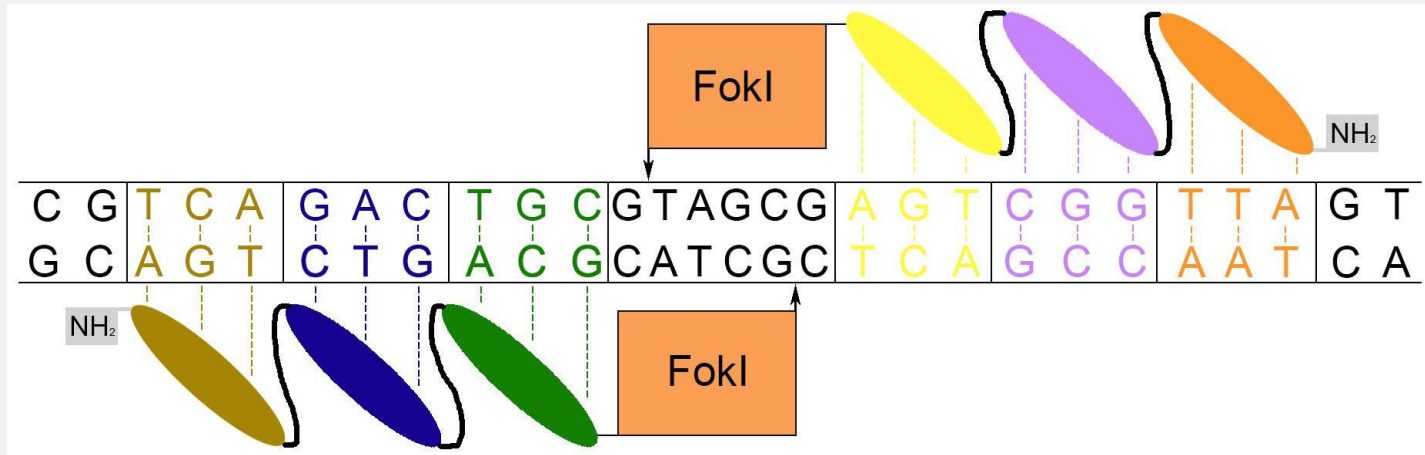


- ZFNs получают слиянием ДНК-связывающего домена (DNA Binding Domain, DBD), образованного набором цинковых пальцев определенной специфичности, с ДНК-разрезающим центром какой либо рестриктазы, обычно FokI.
- Новые ZFNs желаемой специфичности конструируют путем различной комбинации цинковых пальцев, распознающих 3 нп.
- В свою очередь, цинковые пальцы с новой специфичностью получают, используя технологии фагового дисплея, one- or two-hybrid system в дрожжах и бактериях.

Zinc Finger Nucleases (ZFNs)

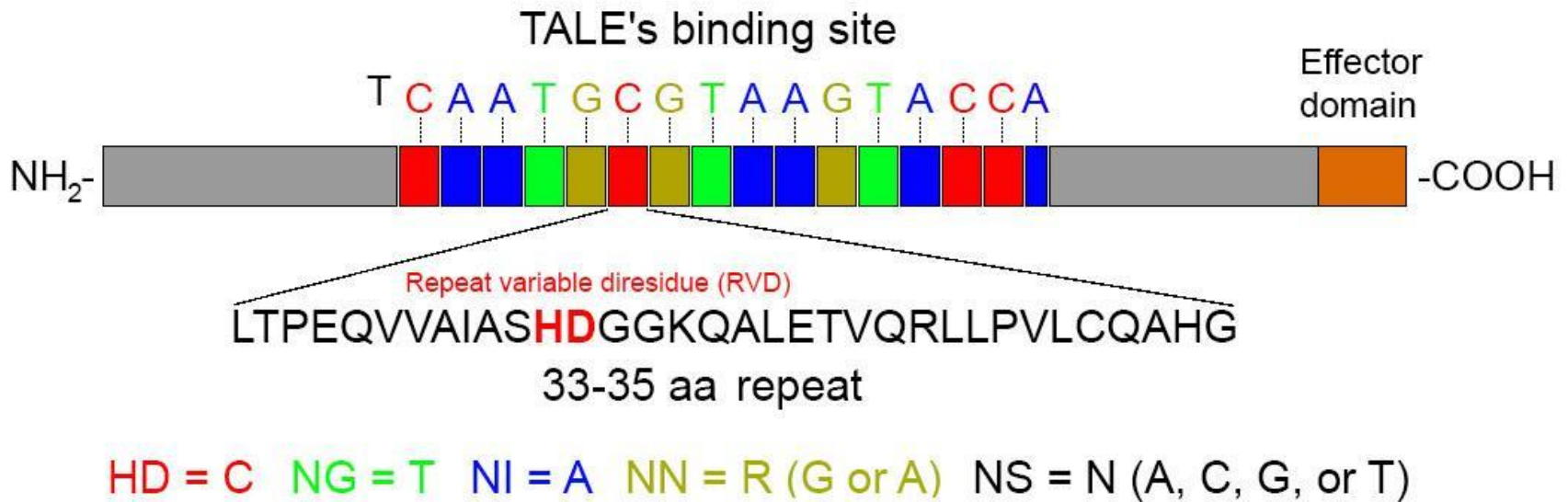
Выбор рестриктазы IIS типа (FokI) обусловлен тем, что она разрезает ДНК вне сайта узнавания.

Расщепляющие домены FokI должны образовывать димеры, поэтому для получения двухцепочечного разрыва ДНК необходима пара ZFN, сайты связывания которых разнесены на оптимальное расстояние в 5-7 пн.



TALE - transcription activator-like effector

TAL эффекторы - ДНК связывающие белки, встречающиеся в некоторых патогенных бактериях растений, которые способны направленно связываться с промоторами хозяйских генов и регулировать их экспрессию в предпочтительном для себя направлении, повышая как инфекционность, так и последующую пролиферацию и диссеминацию этих патогенов.

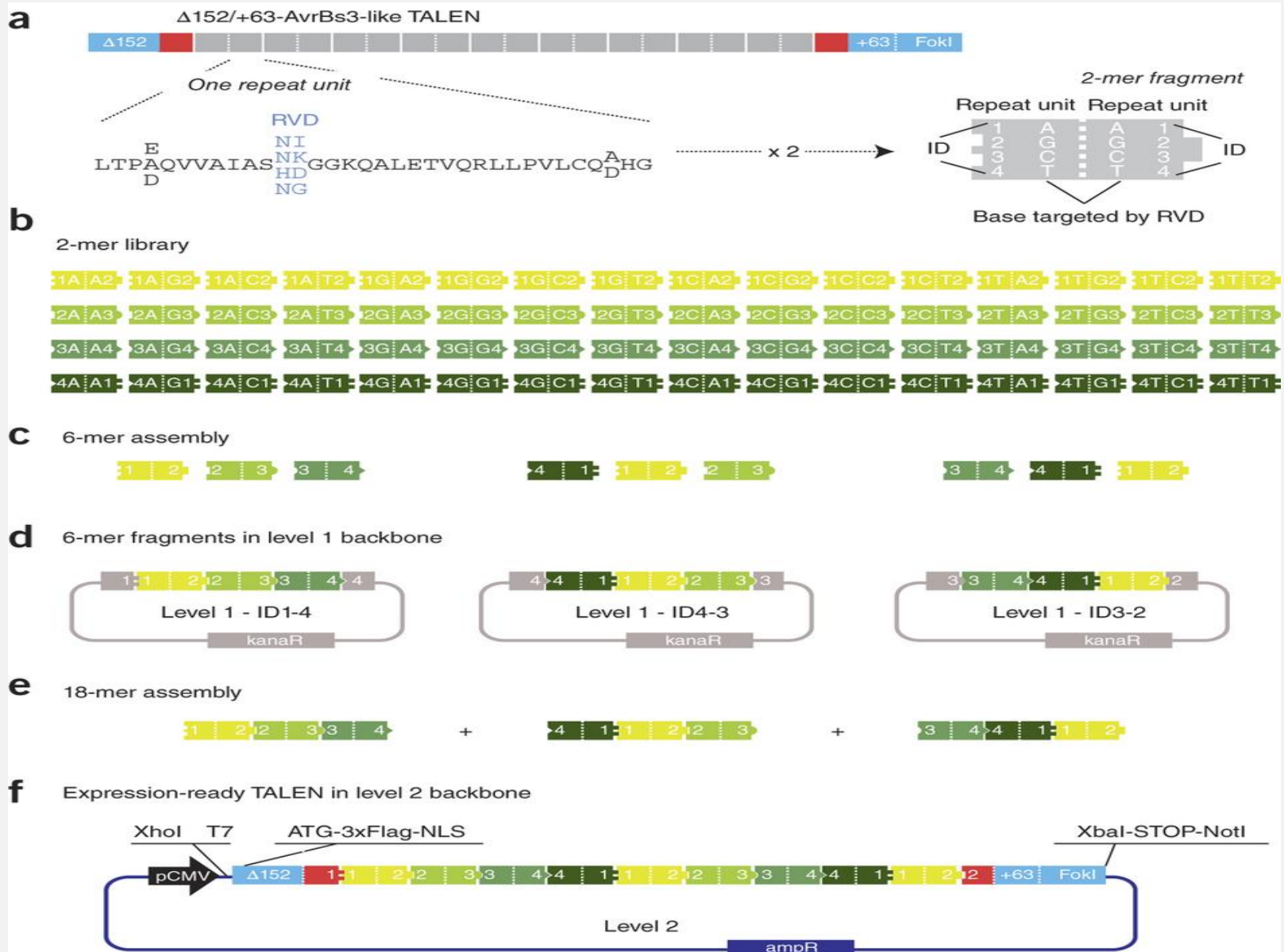


- Центральная область белка представлена тандемными повторами, каждый из которых связывается с единственным нуклеотидом в сайте узнавания ДНК.
- Количество повторов - от 1,5 до 35,5 (последний повтор укорочен).
- Каждый повтор состоит из 33-35 аминокислотных остатков.
- Аминокислотные остатки в положениях 12 и 13 высоко вариабельны и определяют нуклеотид связывания.

TALEN - transcription activator-like effector nuclease.

- Эффекторный домен природного ТАЛЕ - небольшой пептид, способный взаимодействовать с компонентами транскрипционного комплекса, обеспечивая либо его активацию, либо репрессию.
- По аналогии с ZFN для целей редактирования генома эффекторный домен TALE может быть заменен ДНК-разрезающим центром рестриктазы FokI, с образованием TALEN (transcription activator-like effector nuclease).
- Наличие простого, **не зависящего от окружающего контекста** кода между аминокислотной последовательностью повтора и единичным нуклеотидом связывания дает возможность конструирования TALEN с любым сайтом связывания.
- Ограничение - необходимость иметь нуклеотид Т перед сайтом связывания. На практики это не создает особых проблем.
- Более серьезная проблема - конструирование и синтез кодирующих TALE фрагментов ДНК, содержащих многочисленные повторы.

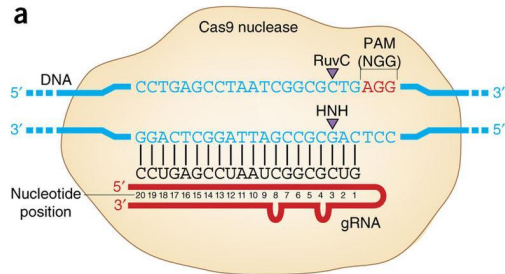
A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator–like effector genes. Schmid-Burgk et al., *Nat Biotechnol.* 2013 Jan;31(1):76-81.



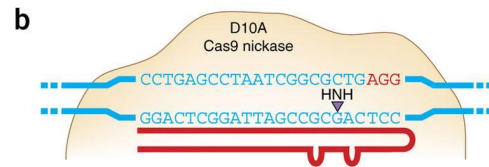
CRISPR/Cas System (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Nuclease)

- Система CRISPR/Cas является адаптивным иммунным механизмом архей и бактерий, защищающий их от чужеродных генетических элементов, таких как ДНК фагов или плазмид.
- Деградация чужеродной ДНК осуществляется с помощью эндонуклеаз Cas (CRISPR-associated), однако ее распознавание происходит на уровне РНК/ДНК-ового взаимодействия.
- В качестве распознающих элементов выступают короткие эндогенные РНК, комплементарные участкам чужеродной ДНК, в комплексе с нуклеазами Cas.
- Первые эксперименты по редактированию генома с помощью системы CRISPR/Cas9 были осуществлены в 2012 году.

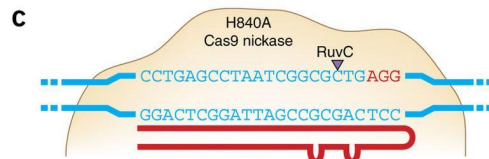
Различные варианты использования системы CRISPR/Cas9



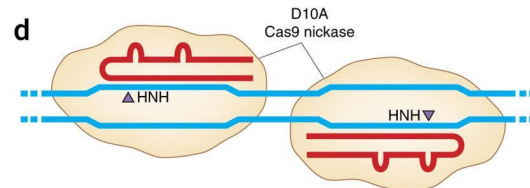
Cas9 nuclease creates double-strand breaks at DNA target sites with complementarity to the 5' end of a gRNA. Cas9 contains RuvC and HNH nuclease domains.



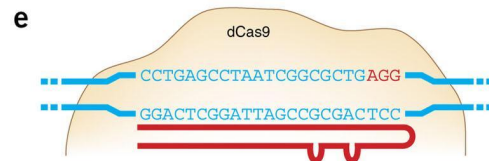
Cas9 nickase created by mutation of the RuvC nuclease domain with a D10A mutation. This nickase cleaves only the DNA strand that is complementary to and recognized by the gRNA.



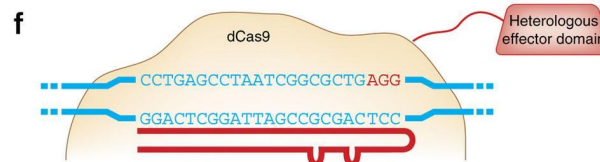
Cas9 nickase created by mutation of the HNH nuclease domain with a H840A mutation. This nickase cleaves only the DNA strand that does not interact with the gRNA.



Paired nickase strategy for improving Cas9 specificity. Two D10A Cas9 nickases are directed by a pair of appropriately oriented gRNAs. This leads to induction of two nicks that, if introduced simultaneously, would be expected to generate a 5' overhang.

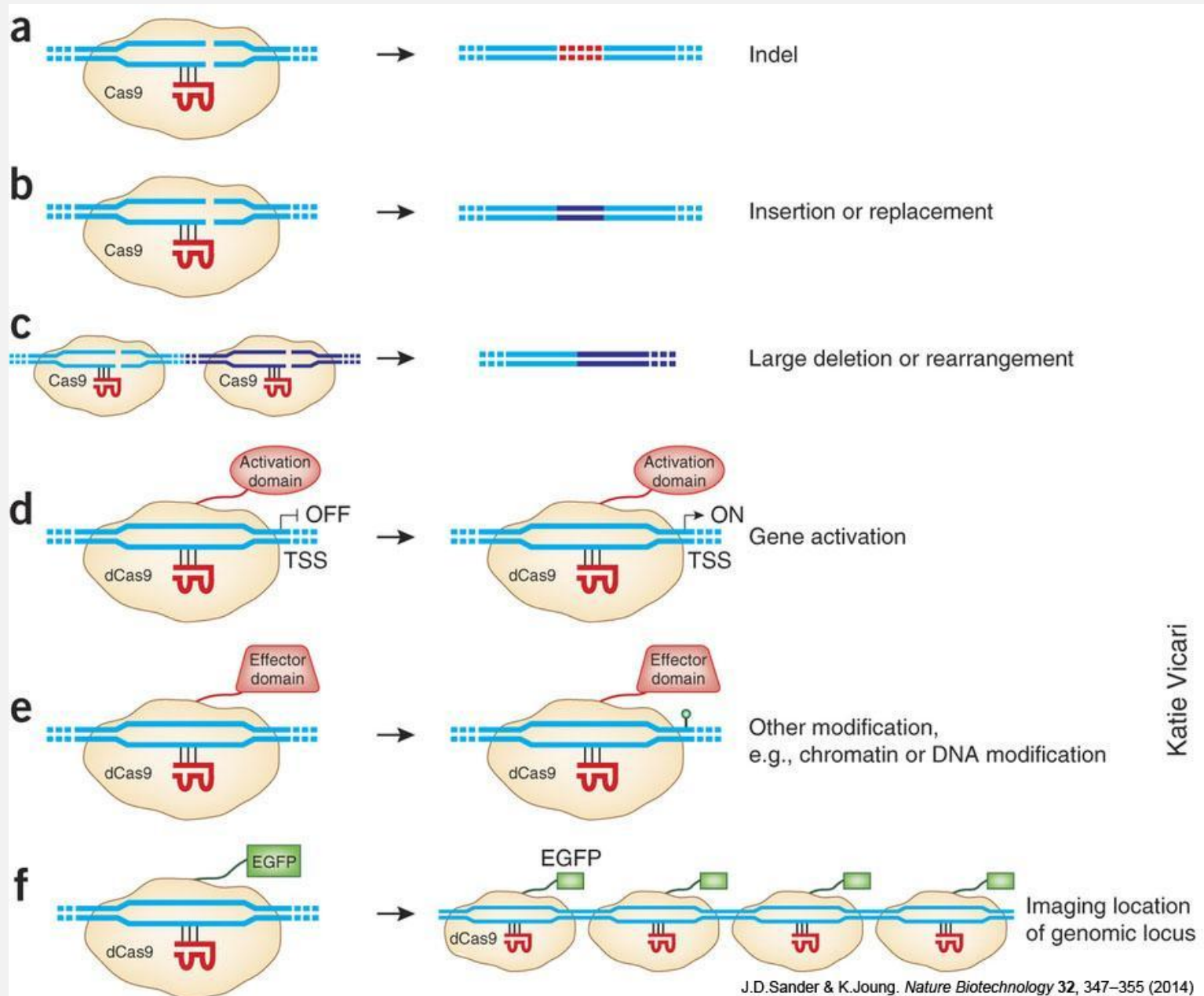


Catalytically inactive or 'dead' Cas9 (dCas9) (e.g., with mutations in both the RuvC and HNH domains). This can be recruited by a gRNA without cleaving the target DNA site.



Catalytically inactive dCas9 can be fused to a heterologous effector domain.

Различные варианты использования системы CRISPR/Cas9

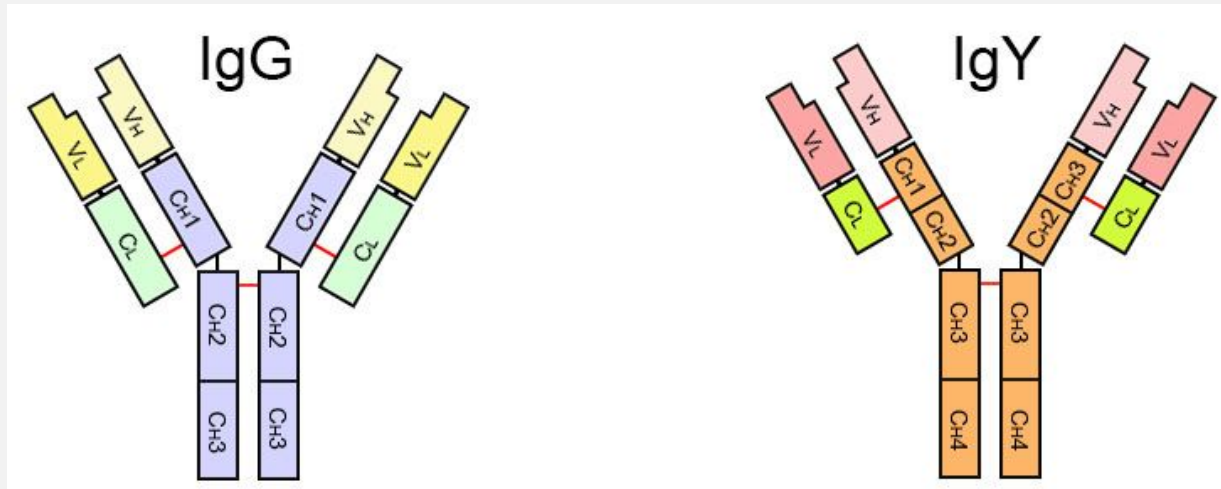


Katie Vicari

Практические приложения техники редактирования генома

Типы клеток и организмов	Способы доставки	Применение
Бактерии, дрожжи	<ul style="list-style-type: none">• Свободная ДНК	<ul style="list-style-type: none">• Трансгенные линии,• Продуценты
Культуры клеток эукариот	<ul style="list-style-type: none">• Вирусные вектора• Свободная ДНК,• РНК,• Белки	<ul style="list-style-type: none">• Модели заболеваний <i>in vitro</i>,• Клеточная терапия,• Трансгенные линии
Животные	<ul style="list-style-type: none">• РНК,• Вирусные вектора	<ul style="list-style-type: none">• Модели заболеваний человека• Трансгенные лабораторные животные• Нокаутные лабораторные животные• Новые породы домашних животных
Растения	<ul style="list-style-type: none">• Свободная ДНК,• Агробактерии	<ul style="list-style-type: none">• Трансгенные растения

Иммуноглобулины Y, IgY



- Иммуноглобулины Y птиц, рептилий и двоякодышащих рыб - функциональные аналоги IgG млекопитающих.
- Так же, как и IgG, молекулы IgY состоят из двух тяжелых и двух легких цепей.
- Основные отличия связаны с тяжелыми цепями.
- Тяжелая цепь немного больше чем у IgG, а легкая, наоборот, меньше.
- В отличие от IgG, IgY не связываются с белками A и G, с клеточными рецепторами Fc и не активируют систему комплемента.
- В высокой концентрации накапливаются в яичном желтке.

Практическое использование IgY имеет ряд преимуществ по сравнению с IgG:

- Не инвазивный способ получения материала для выделения IgY (желток отложенных яиц),
- Более низкое перекрестное реагирование с белками млекопитающих по сравнению с IgG,
- Более высокий иммунный ответ на ряд антигенов,
- В желтке накапливаются исключительно IgY (IgA и IgM отсутствуют)
- При этом, содержание IgY в желтке сравнимо с таковым для IgG в сыворотке крови млекопитающих.

Недостатки:

- В случае IgG можно напрямую использовать сыворотку, IgY необходимо очистить.
- Более сложные способы очистки (не способность связываться с белками А или G).

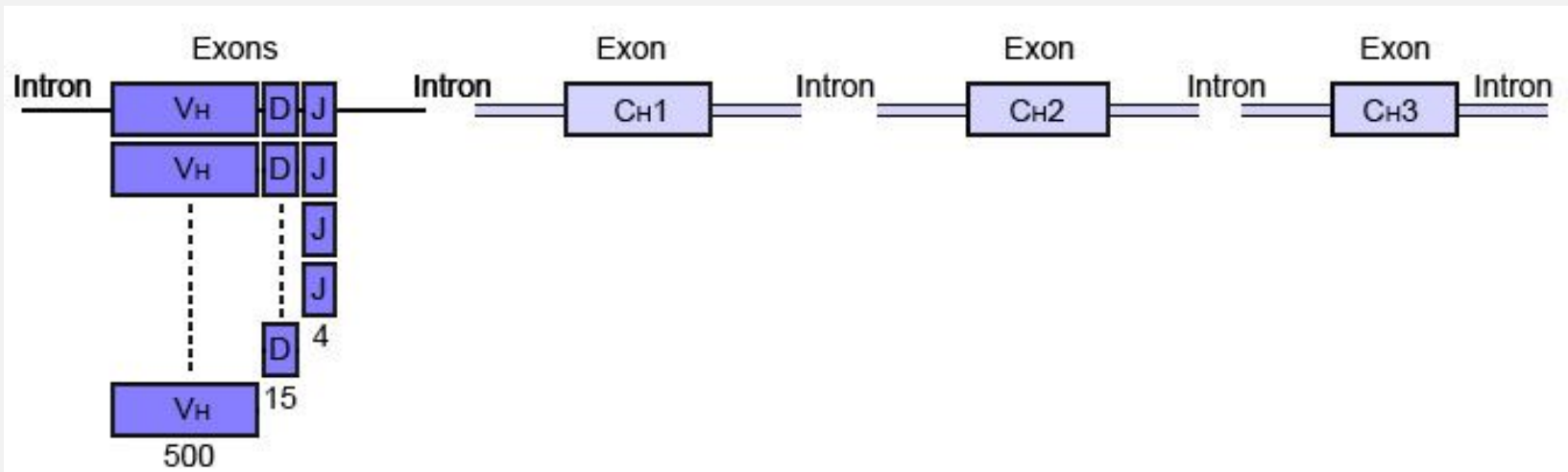
Трансгенная курица - константные домены IgY заменены на аналогичные области IgG человека.

- Удобный источник иммуноглобулинов,
- Более простой способ их очистки,
- Возможность использования иммуноглобулинов на человеке.

Гены иммуноглобулинов млекопитающих

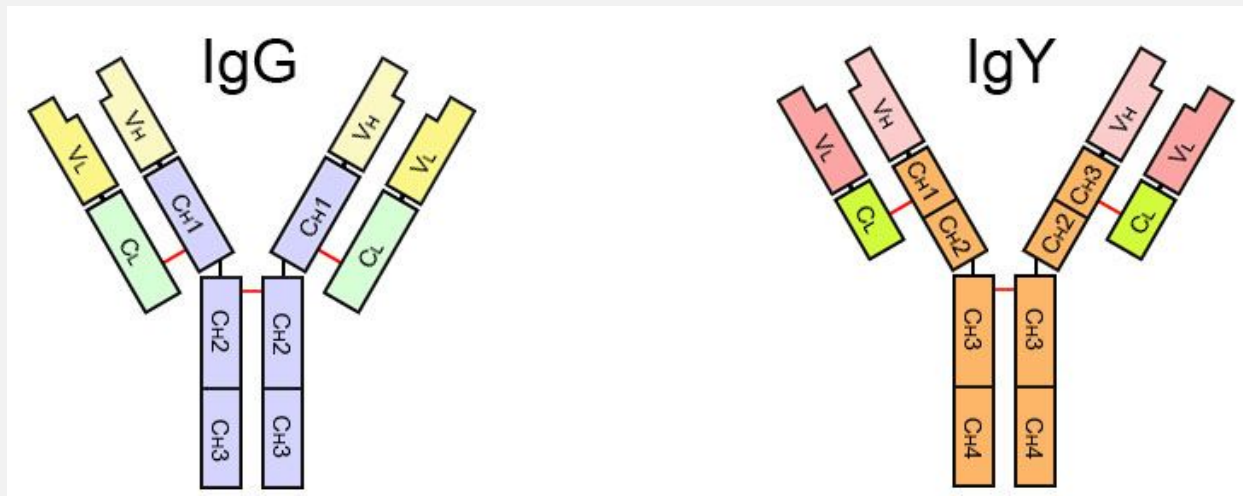
- Легкие цепи (IgL) - группы сцепления для к- и **A**-типов
- Тяжелые цепи (IgH) - группа сцепления одного типа
- Каждая группа сцепления имеет V-гены и C-гены
- Легкие цепи к-типа - три группы генов:
 - 1) 250 V_k-генов,
 - 2) 5 J-мини-генов
 - 3) Один C_k-ген кодирует константный домен легкой к-цепи.

- Вариабельные V-домены тяжелых цепей (IgH) кодируются тремя генными сегментами: V (более 500 генов), D (15 генов) и J (4 гена).
- Константные области тяжелых цепей кодируются несколькими C-генами. У человека 10 C-генов, у мышей 8.
- Различные C-гены ответственны за кодирование классов и подклассов иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgD, IgE, IgM).

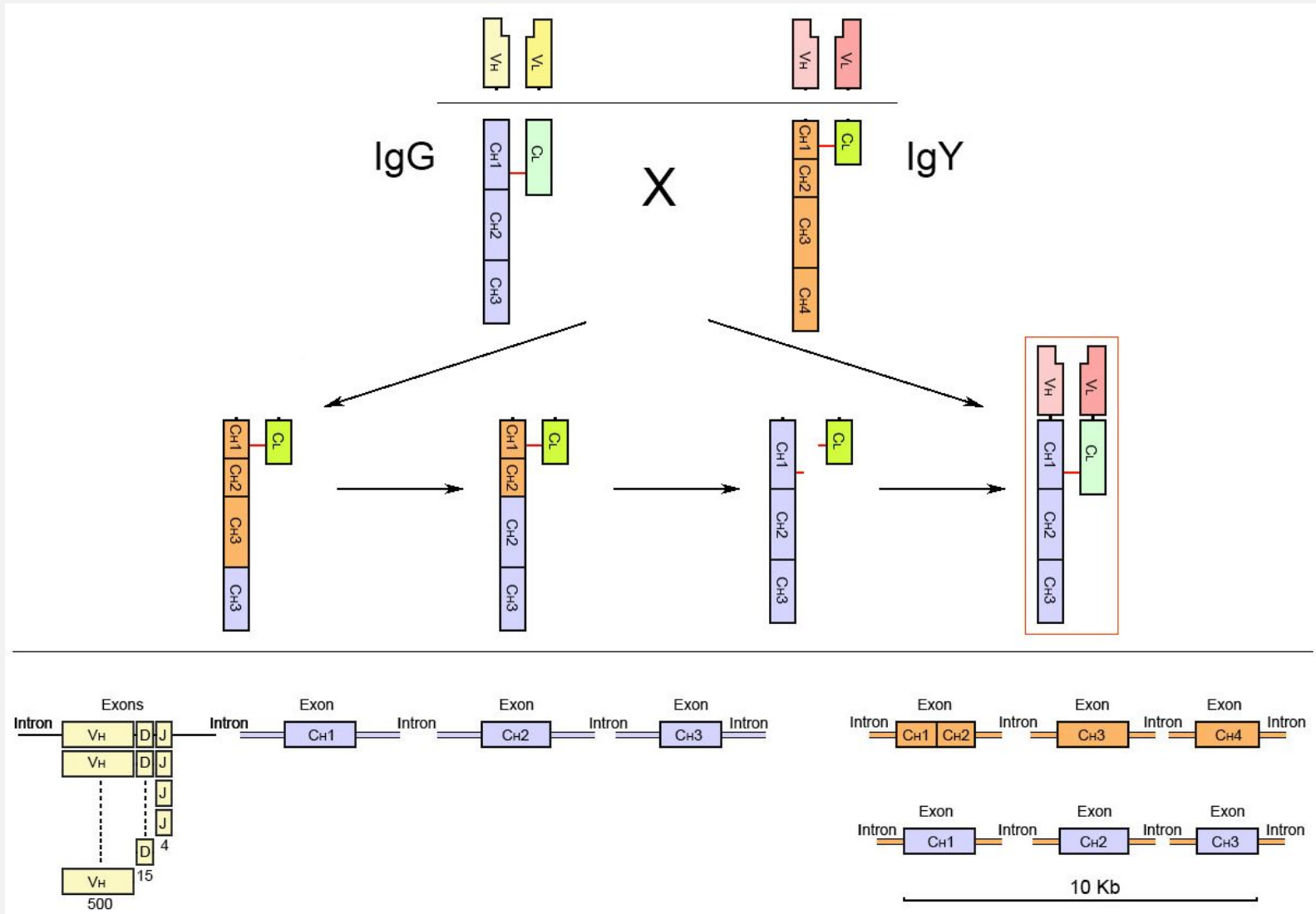


Гены IgY курицы

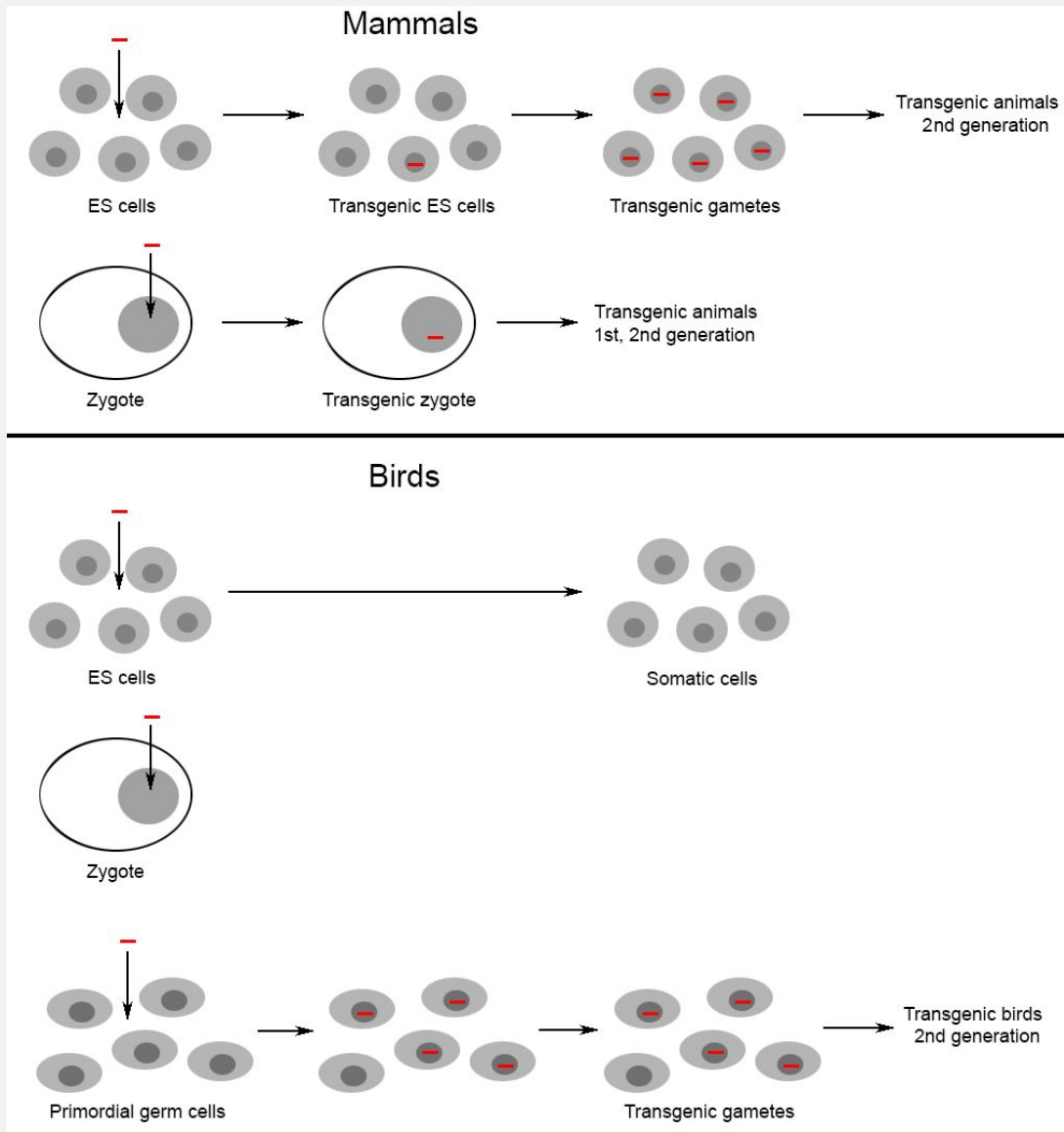
- Константная С-область тяжелой цепи IgG человека содержит 3 тандемных домена CH1, CH2, CH3,
- Константная С-область тяжелой цепи IgY курицы содержит 4 тандемных домена CH1, CH2, CH3, CH4
- Домены CH1 и CH2 IgY курицы кодируются одним экзоном.
- Домены CH3 и CH4 IgY курицы имеют высокую гомологию с доменами CH2 и CH3 IgG человека.



Стратегия получения трансгенной курицы, производящей химерные IgY/IgG антитела.



Стратегия получения трансгенной курицы, производящей химерные IgY/IgG антитела.



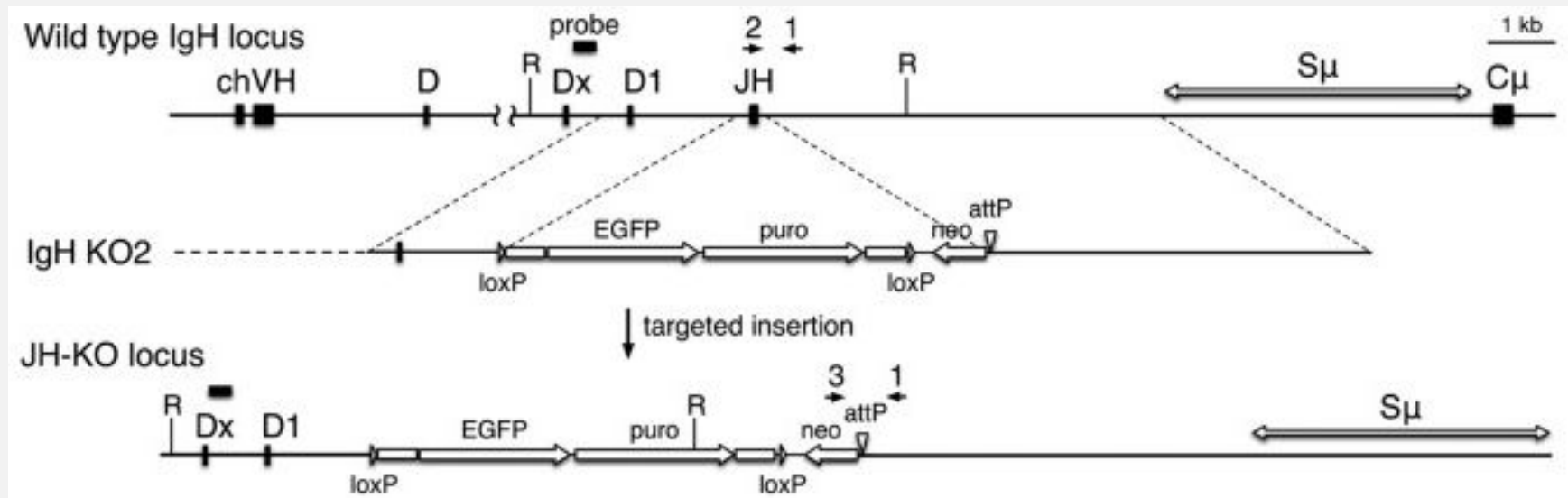
Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки - основа получения трансгенных мышей и других млекопитающих.

У курицы ЭС клетки развиваются только в соматические линии клеток, не могут давать половые клетки.

Однако выделенные из эмбрионов курицы примордиальные клетки (primordial germ cells, PGCs) можно культивировать в среде, проводить их трансфекцию чужеродной ДНК с последующей селекцией, имплантировать их назад в эмбрион, где они могут заселять развивающиеся гонады и приводить к получению истинных трансгенных куриц в следующем поколении.

Примордиальные клетки выделяют из крови мужских эмбрионов на стадиях 13-15 (Hamburger-Hamilton), культивируют, трансфицируют и вводят в кровотоки реципиентным эмбрионам на тех же стадиях - 13-15.

Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. Schusser et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, **110**(50): 20170–20175.



Primordial germ cells were derived from blood collected at stages 13–15 (Hamburger-Hamilton) from a male embryo and cultured in KO-DMEM containing 40% (vol/vol) Buffalo rat liver (BRL) cell conditioned medium, 7.5% (vol/vol) FBS, 2.5% (vol/vol) chicken serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 1× nonessential amino acids, and 0.1 mM β -mercapto-ethanol and supplemented with 6 ng/mL recombinant mouse stem cell factor and 4 ng/mL recombinant human fibroblast growth factor basic (R&D Systems) on a feeder layer of irradiated BRL cells.

5×10^6 cells were suspended in 100 μ l of AmaxaV buffer with 20 μ g linearized DNA and transfected as previously described. Each transfection was plated on a full 48w plate. Puromycin selection (0.5 μ g/mL) was started 3–5 d after transfection. Puromycin-resistant clones were expanded for genotyping and injection.

Recipient embryos were incubated until stages 13–15 (Hamburger-Hamilton) and transferred to a collection dish. After injection of 3,000 JH-KO PGCs into the vasculature, the embryos were transferred to a surrogate shell and incubated until hatch.

Спасибо за внимание!

