

Лекция 5

Таргетинг генов

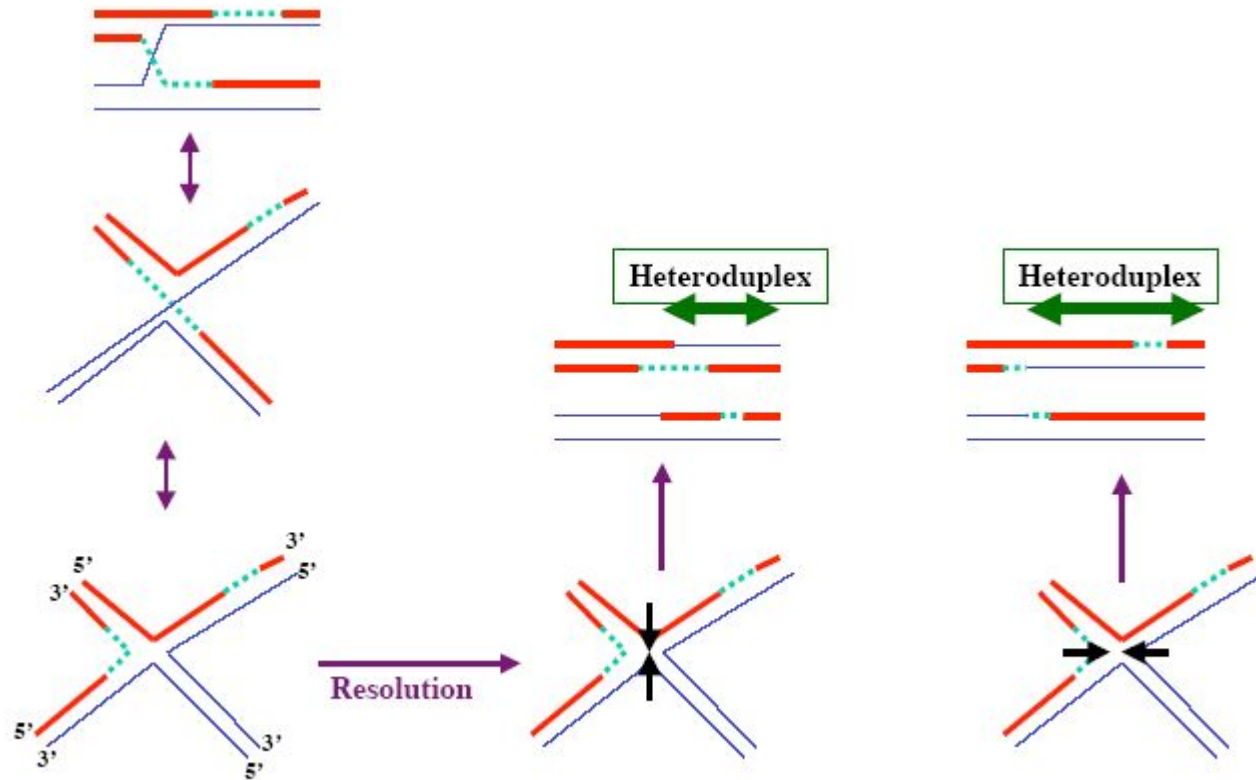
Гомологичная рекомбинация

1. Осуществляется через образование структуры Холидея.
2. В этом участвуют разнообразные ферменты:
 - комплекс топоизомераз,
 - комплекс эндонуклеаз,
 - рекомбиназа,
 - резольваза.
3. Частота ГР составляет для разных участков хромосом от 10^{-3} до 10^{-7} .

Структура Холидея:

(однонитевые разрывы в гомологичных хромосомах, вытеснение и замещение нити, миграция разрыва)

817



**Хронологическая справка о
направленный переносе генов через
механизм гомологичной рекомбинации**

Б. Бринстер – 1987 г. (500 животных)

**М. Капекки, О. Смитис и М. Эванс – 1989 г. (создание
метода, Нобелевская премия 2007 года «за разработку
принципов введения специфических генных
модификаций посредством эмбриональных стволовых
клеток»).**

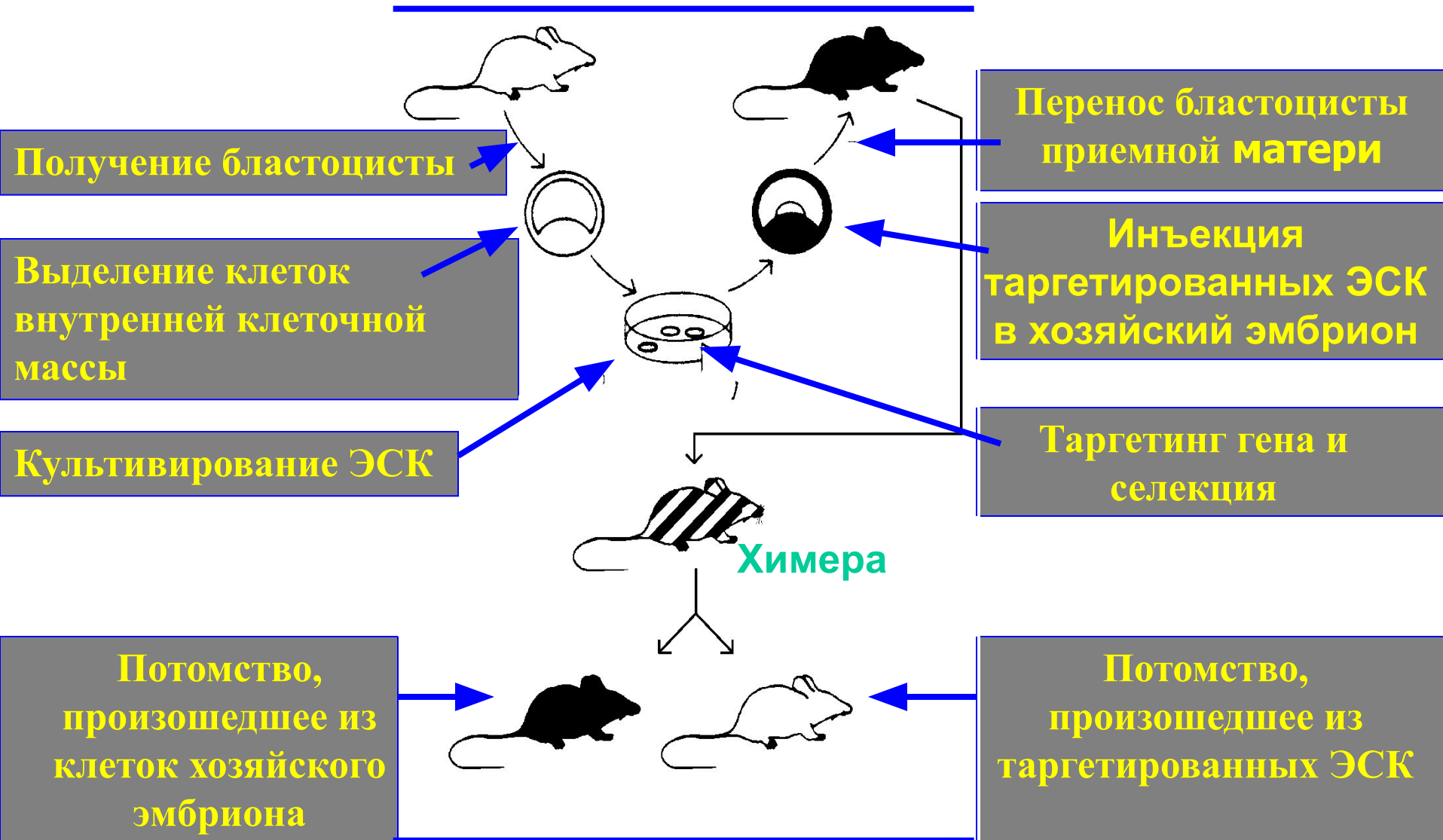
**2007 г. - Международный консорциум по нокаутным
мышам (в 2015 - 10 500 генов из 21 000).**

2016 г. – 70 000 публикаций в PubMed

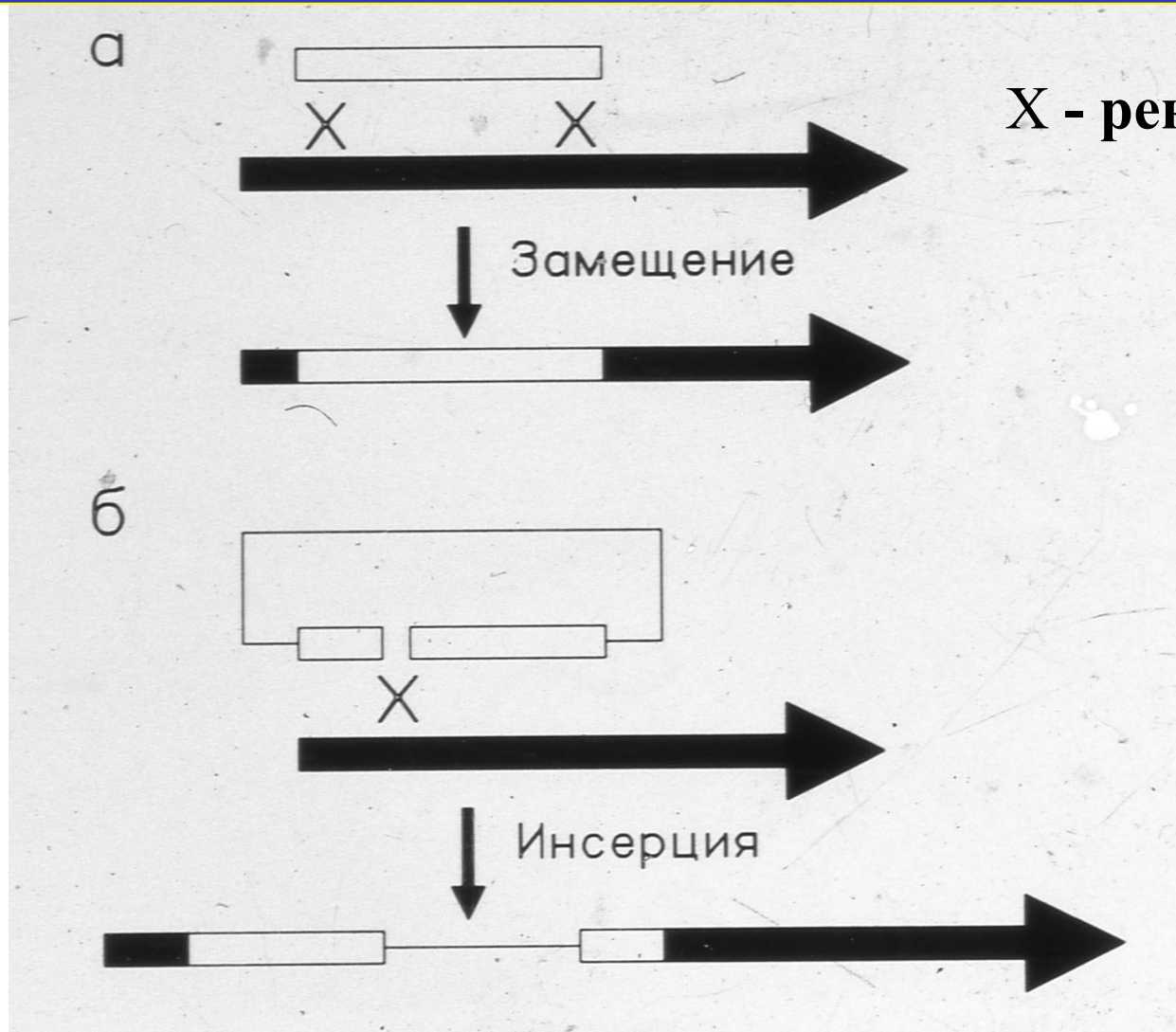
Основные свойства ЭС клеток

- **плюрипотентность (тотипотентность)**
- **неограниченный пролиферативный потенциал с сохранением исходного фенотипа**
- **сохранение нормального хромосомного набора.**
- **способность участвовать в образовании химер.**

Схема получения трансгенных мышей с таргетированным геном

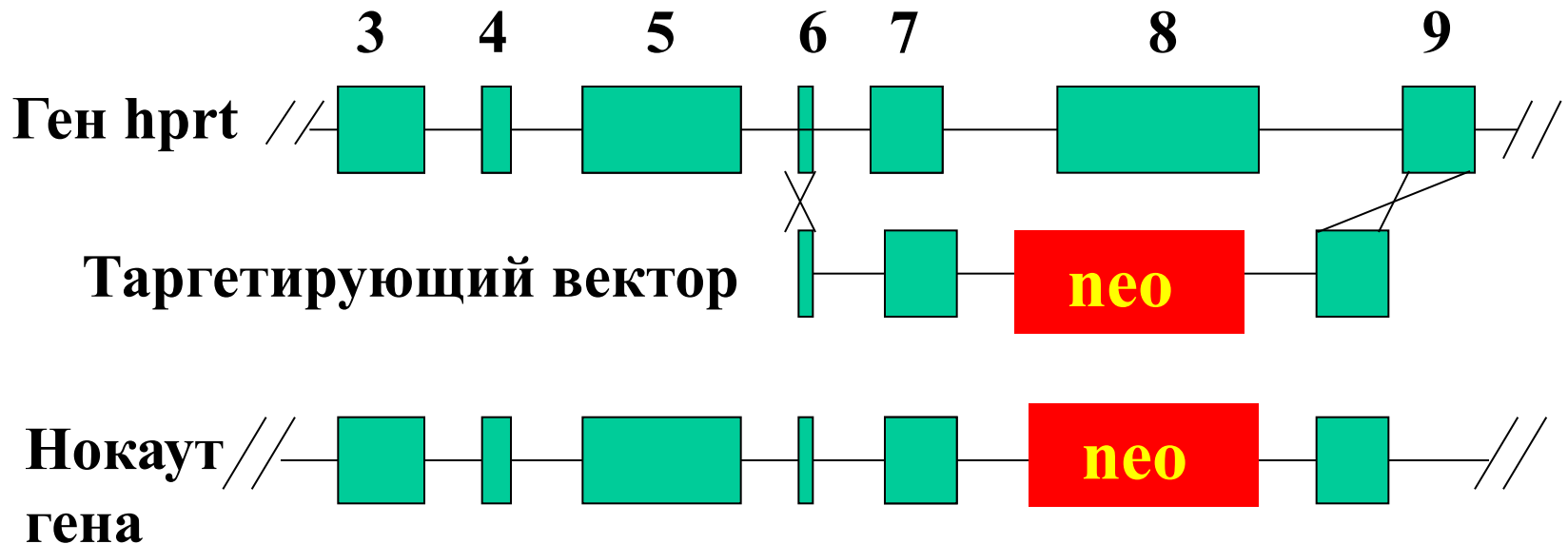


Два типа векторов используемых для гомологичной рекомбинации



X - рекомбинация

Нокаут селективируемого гена гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (hprt)

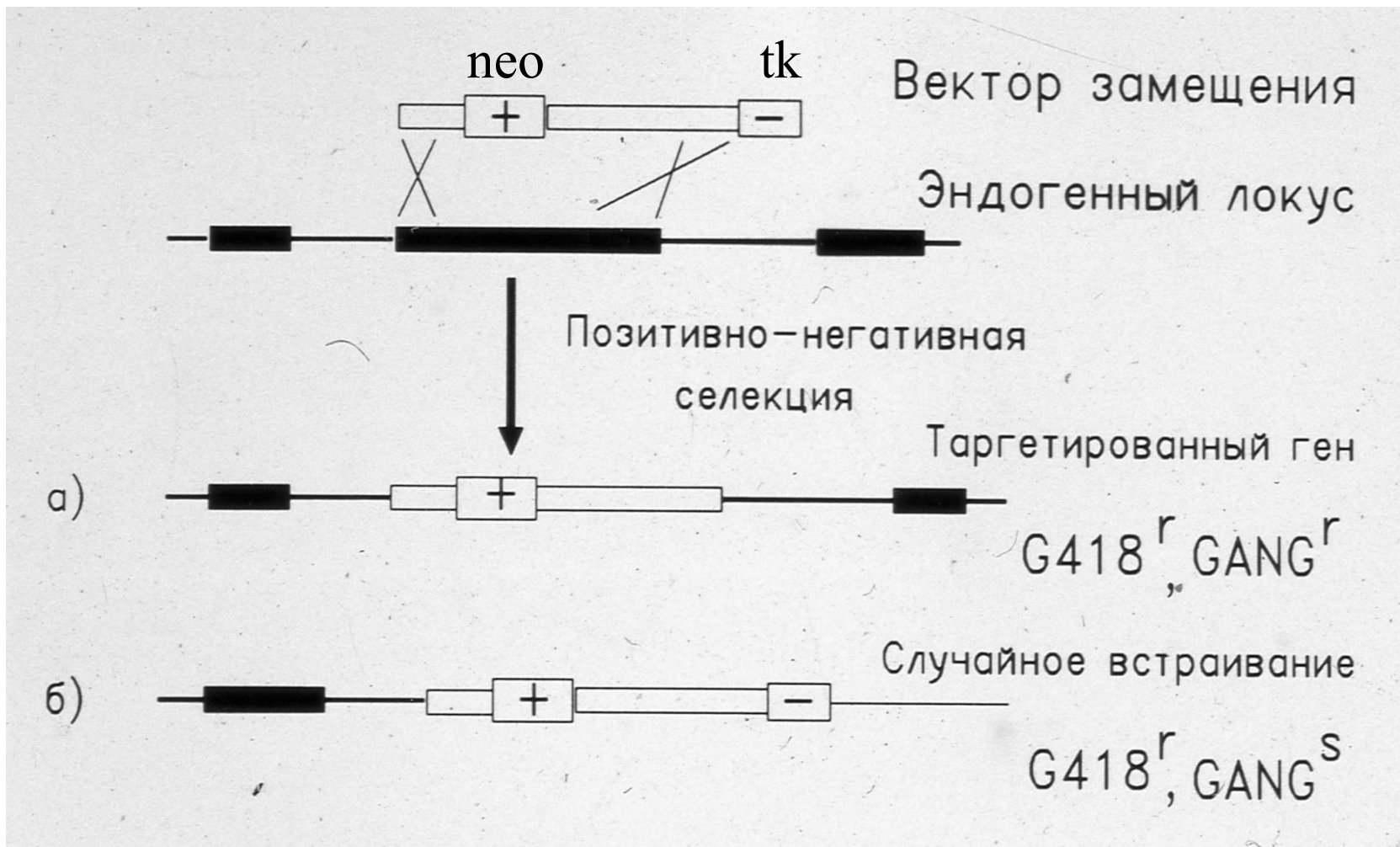


Селекция:

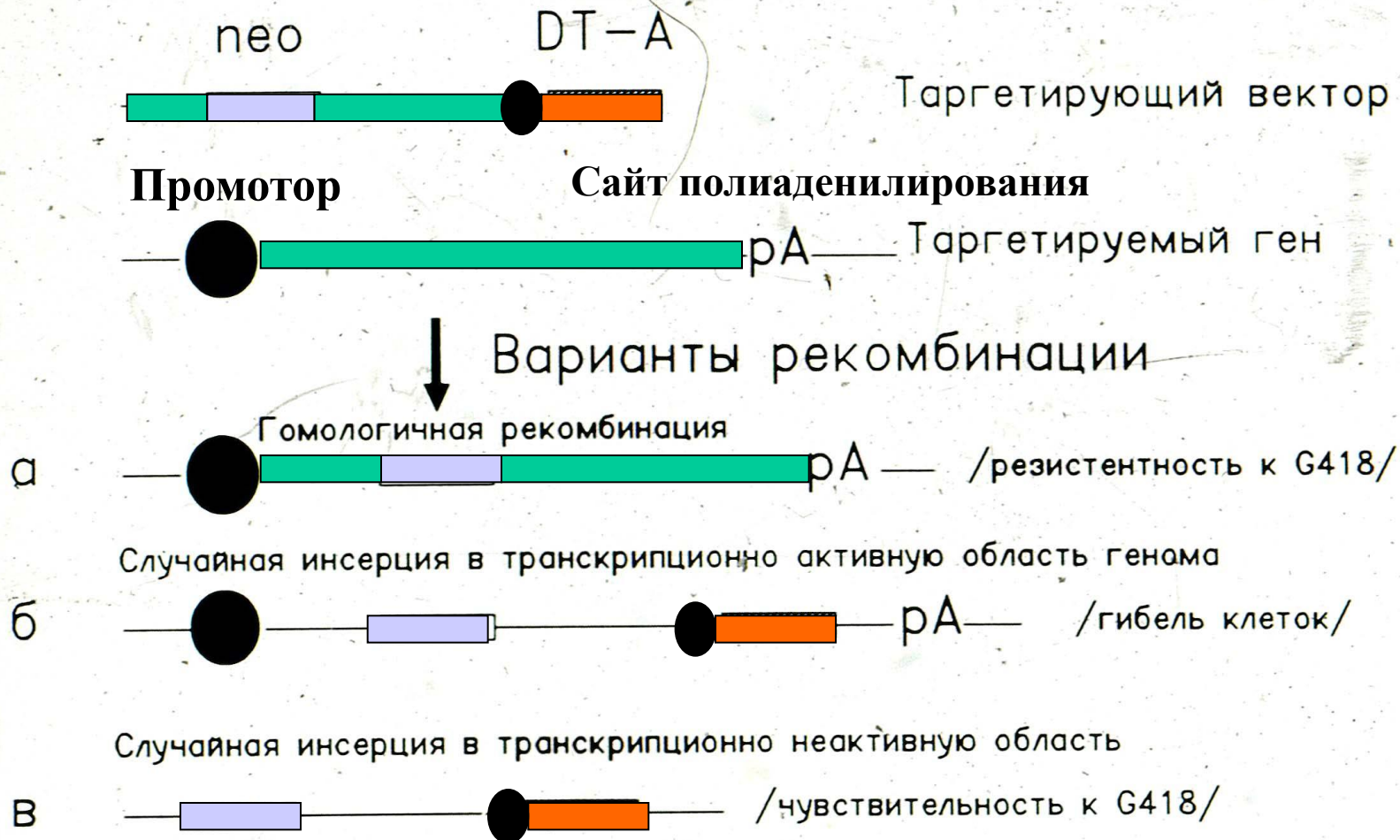
$Hprt^-$ - резистентность к б-тиогуанину,

Neo^+ - резистентность к антибиотику G418

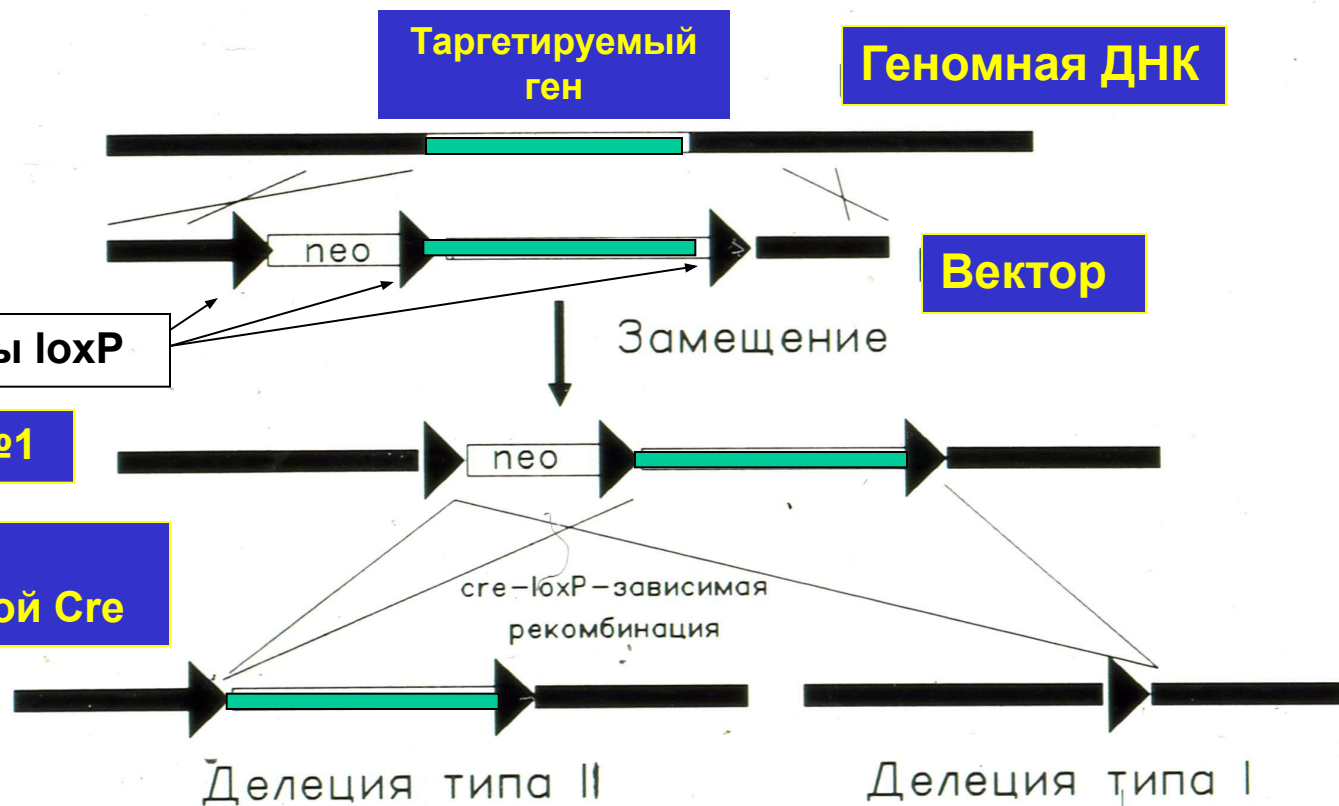
Позитивно-негативная селекция таргетированного неселектируемого гена



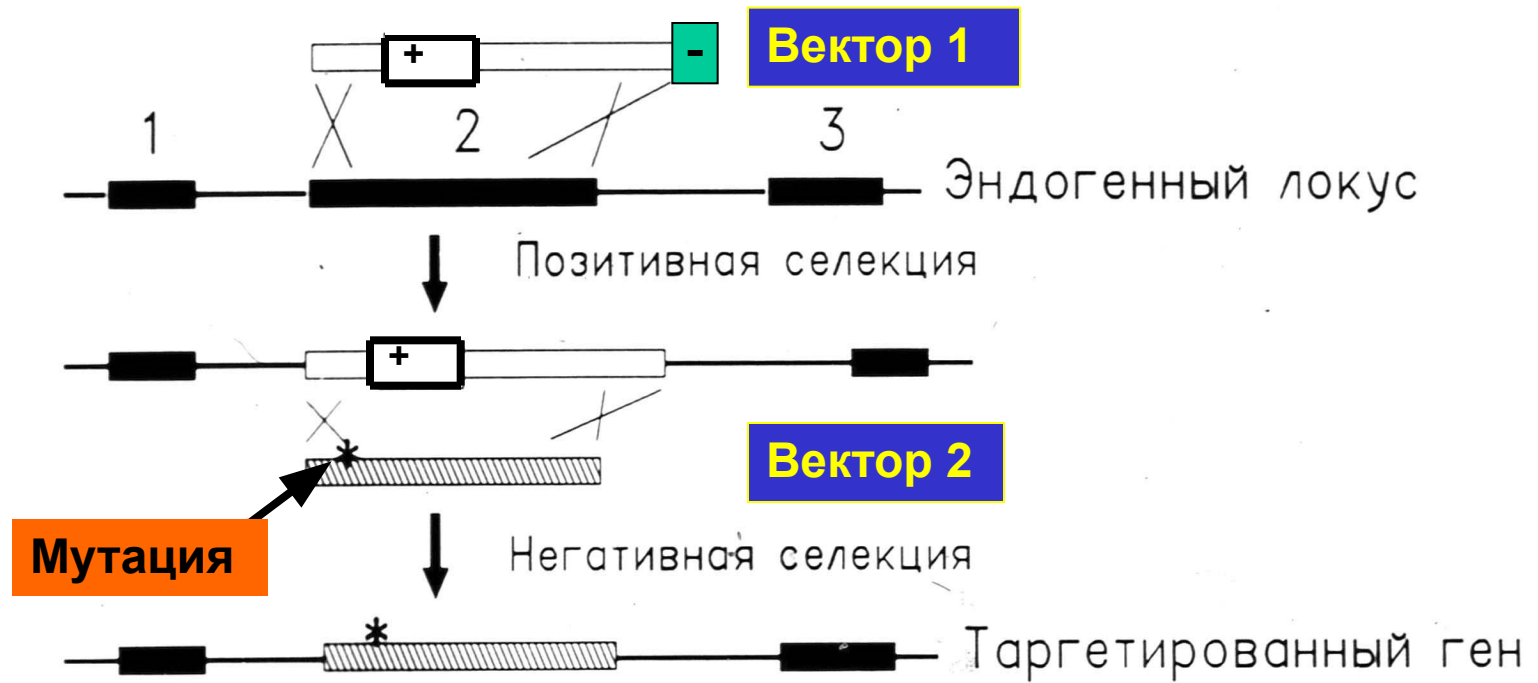
Генный нокаут с использованием для негативной селекции гена дефтерийного токсина



Кондиционный нокаут (система Cre-loxP бактериофага P1)



Нокин гена (knock-in)



Функции генов, установленные с помощью их нокаута

Ген	Физиологическая функция
CNTF (ciliary neurotrophic factor)	Предотвращение дегенерации моторных нейронов
TNFR1 (рецептор TNF)	Участие в неспецифической иммунности
c-jun	гепатогенез
Миогенин	Обеспечивает развитие скелетных мышц
N-myc	Морфогенез легких
p56 ^{lck}	Участие в развитии тимоцитов.

Выявление генов, препятствующих развитию лимфомогенеза, с помощью генного нокаута

Knockout gene	Function of protein	Type of lymphoma	References
p53	Transcriptional factor	B- and T cell	Ward et al., 1999
E2A	Transcriptional factor	T cell	Yan et al., 1997
N-ras	Small GTPase	T cell	Diaz et al., 2002
RARalpha	Retinoic acid receptor	B- and T cell	Haidar et al., 2000
pms2	DNA mismatch repair	T cell	Qin et al., 1999
snf5	Transcriptional factor	T cell	Roberts et al., 2002
PTEN	Lipid phosphatase	T cell	Suzuki et., 2001
atm	Phosphatidylinositol 3-kinase	T cell	Xu et al., 1996
msh2	Mismatch repair protein	T cell	Zhang et al., 2002
msh6	Mismatch repair protein	T cell	de Wind et al., 1999
53BR1p53 binding protein		T cell	Ward et al., 2003
IFN-gamma	Interferon gamma, cytokine	Disseminated	Street et al., 2002
NBS1	Involved in the Nijmegen breakage syndrome, DSB repair	T cell	Kang et al., 2002
ku70	DNA-dependent protein kinase	T cell	Gu et al., 1997
ku80	DNA-dependent protein kinase	T cell	Lim et al., 2000
bad	Proapoptotic proteins	DLBCL	Ranger et al., 2003
SLP-65	Adaptor protein	pre-B cell	Flemming et al., 2003
p18(INK4c)	Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4c	T cell	Kovalev et al., 2001
p19(INK4a)	Inhibitor of cyclin-dependent	B- and T cell	Kamijo et al., 1999

Синергизм между «классическими» трангенами и нокаутированными генами в усилении развития лимфом

Transgene	Knocked-out gene	Type of lymphoma	References
<i>CK2α</i>	<i>p53(-/-)</i>	B cell	Xu et al., 1999
<i>E6E7</i>	<i>p53(+/-)</i>	T cell	Li et al., 1998
<i>pi3k</i>	<i>p53(-/-)</i>	T cell	Borlado et al., 2000
<i>cyclin K</i>	<i>p53(-/-)</i>	T cell	Verschuren et al., 2002
<i>bax</i>	<i>p53(-/-)</i>	T cell	Knudson et al., 2001
<i>c-myc</i>	<i>p53(-/-)</i>	T cell	Elson et al., 1995
<i>c-myc</i>	<i>p27(Kip1)(-/-)</i>	T cell	Martins, Berns, 2002
<i>c-myc</i>	<i>Fas/Apo-1(-/-)</i>	B- and T cells	Zornig et al., 1995b
<i>c-myc</i>	<i>INK4a/ARF(-/-)</i>	B cell	Schmitt et al., 1999
<i>c-myc</i>	<i>ARF(-/-)</i>	pre B and B cells	Eischen et al., 1999
<i>c-myc</i>	<i>Rb(-/-)</i>	B cell	Schmitt et al., 1999
<i>N-ras</i>	<i>NF1(+/-)</i>	B- and T cells	Mangues et al., 1998
<i>cyclin E</i>	<i>p27(Kip-1)(-/-)</i>	T cell	Geisen et al., 2003
<i>baff</i>	<i>TNF(-/-)</i>	B cell	Batten et al., 2004

Синергизм между действием генов в лимфоогенезе, установленный на основе анализа дважды и трижды нокаутированных мышей

Knocked-out genes	Type of lymphoma	References
<i>ku70(-/-) p53(-/-)</i>	Pro-B cell	Difilippantonio et al., 2002
<i>ku80(-/-) p53(-/-)</i>	Pro-B cell	Lim et al., 2000
<i>ku80(-/-) p53(-/-), RAD54(-/-)</i>	Pro-B cell, thymic	Difilippantonio et al., 2002
<i>H2AX(-/-) p53(-/-)</i>	T cell	Bassing et al., 2003
<i>brca1(delta11/delta11) p53(-/-)</i>	T cell	Bachelier et al., 2003
<i>fasL(-/-) p53 (+/-)</i>	B and T cells	Embree-Ku and Boekelheide, 2002
<i>wt1(+/-) p53(-/-)</i>	T cell	Menke et al., 2002
<i>decorin(-/-) p53(-/-)</i>	T cell	Iozzo et al., 1999
<i>E2A(-/-) Id1(-/-)</i>	T cell	Yan et al., 1997
<i>E2A(+/-) RAG1(-/-)</i>	T cell	Engel, Murre, 2002
<i>E2A(-/-) TCRβ(-/-)</i>	T cell	Engel, Murre, 2002
<i>PARP(-/-) DNA-PK(-/-)</i>	T-cell	Morrison et al., 1997
<i>mgmt(-/-) mlh1(-/-)</i>	T cell	Kawate et al., 2000

Обнаружение генов, участвующих в раннем развитии, с помощью нокаута генов

Нокаутированный ген	Аномалии развития
Гамма-субъединица ламинина клеток	Остановка развития на стадии формирования экстраэмбриональной энтодермы из-за дефекта миграции
Brachyury	Ранняя гибель зародышей из-за блока развития мезодермы
GATA-4 GATA-3	Остановка развитие энтодермы Гибель на 11-12 день от блока
SCL	гематопоза в печени Гибель на 9.5 день из-за блока
Flt мешка	желточного кроветворения Блокирование развития желточного
FGF-4	Гибель сразу после имплантации из-за блока развития клеток трофэктодермы

Через нокаут генов – к новым функциям

Было известно:

Белок TAS1R3 принимает участие в работе вкусовых рецепторов, а белок GNAT3 нужен для передачи сигналов вкусовых рецепторов в нервную систему. Однако эти белки находили в яичках и сперме. Зачем они там?

Что показало исследование нокаутных мышей?

Нокаутные мыши не могли размножаться, поскольку их сперматозоиды были деформированными и не могли двигаться.

Новая функция у известных белков.

Примеры изучения вирусного патогенеза с помощью нокаута генов

Вирус лейкоза мышей

Мыши дикого типа – синдром иммунодефицита

Нокаут-мыши по гену интерлейкина 4 – синдрома нет.

Вывод: интерлейкин 4 способствует развитию иммунодефицита, вызываемого вирусом.

Вирус LDV

Мыши дикого типа – вирус-специфический иммунный ответ

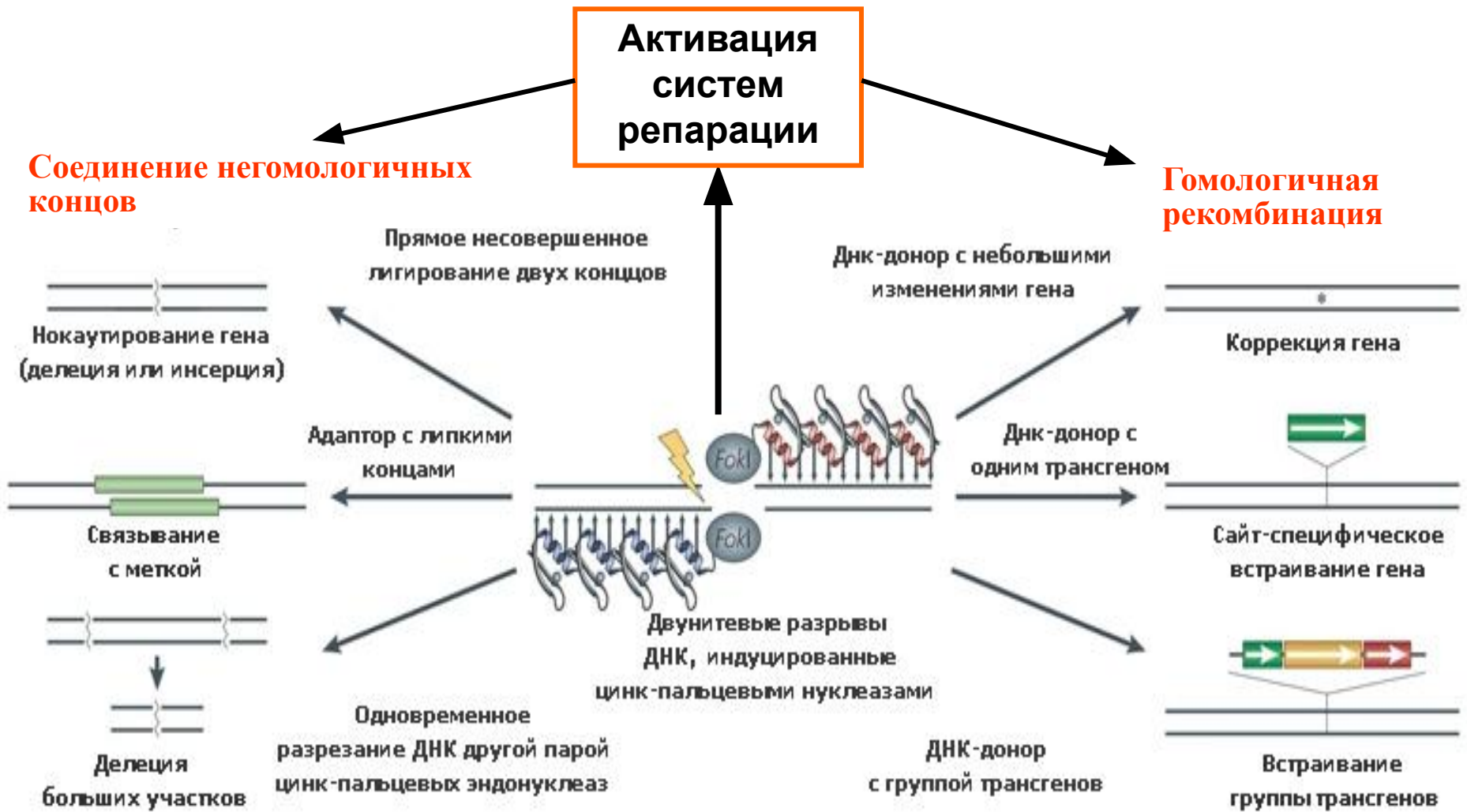
Нокаут-мыши по гену гамма-интерферона 4 – сохранение вирус-специфического иммунного ответа.

Вывод: гамма-интерферон не участвует в формировании иммунного ответа.

Таргетинг генов без ЭСК – прямо в зиготе (редактирование генома)

- **2009 г. – белки с «цинковыми пальцами»**
- **2011 г. – бактериальные белки TALEN**
- **2013 г. - CRISPR/Cas9**

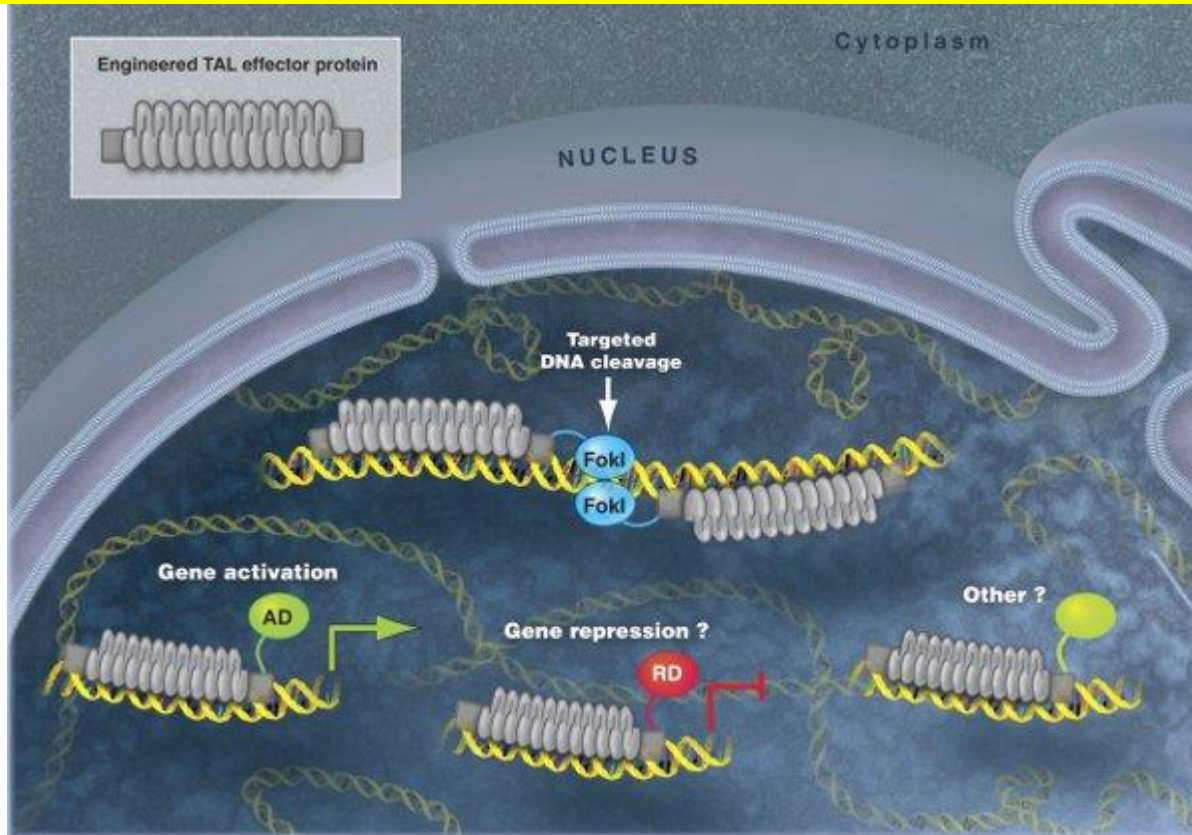
Редактирование генома на основе «цинковых пальцев»



Редактирование генома на основе TALENs

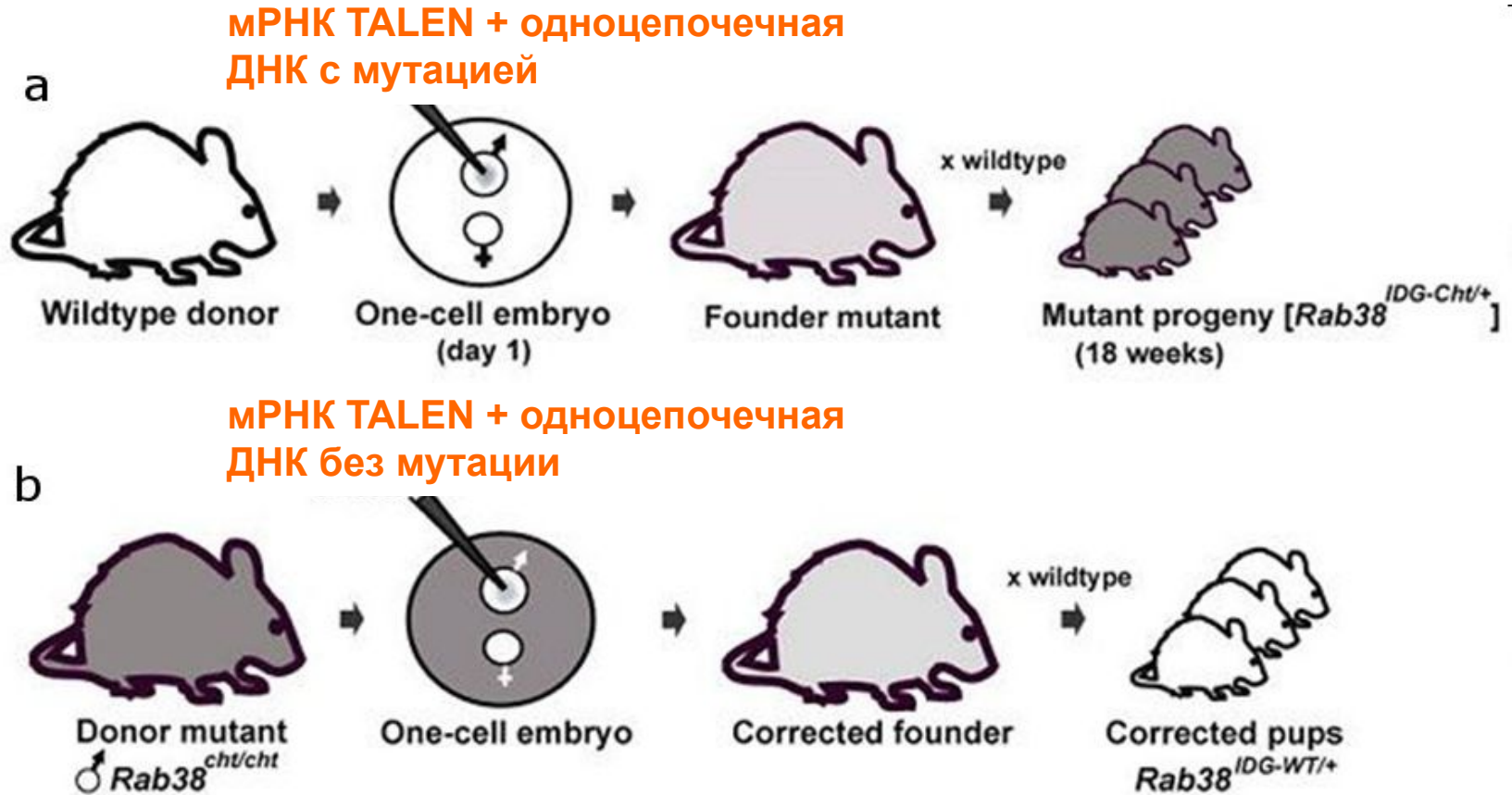
(Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) – белки из бактерий рода *Xanthomonas*, соединенные с нуклеазой FokI).

Схема работы и области применения TAL-белков



AD-активирующий домен **RD**- репрессирующий домен

Замена в белке RAB38 одной аминокислоты (глицина на валин)



Внесение мутации *chocolate* в геном мыши дикого типа (а) и исправление мутантного фенотипа (б). мРНК TALEN вводят в одноклеточный эмбрион вместе с одноцепочечной ДНК, которая служит матрицей для рекомбинации. Нуклеаза вводит разрыв в одном из ядер (материнское или отцовское), разрыв репарируется путем рекомбинации с одноцепочечной ДНК. Полученная мышь является основателем мутантной линии $Rab38^{cht}$, либо основателем «исправленной» линии ($Rab38^{WT}$).

CRISPR (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* —

короткие палиндромные —

короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами — особые локусы —

короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами —

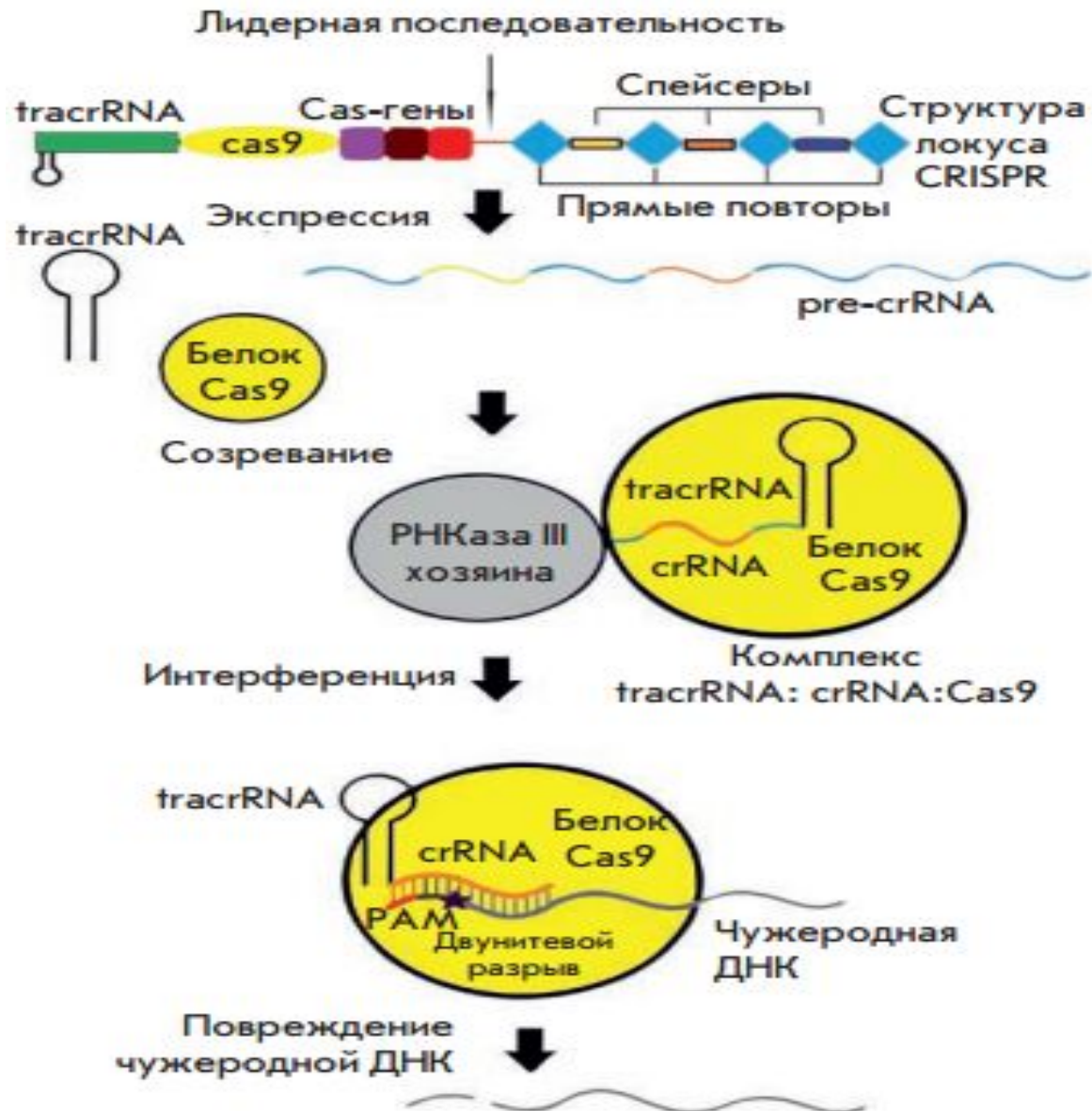
особые локусы бактерий —

короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами —

особые локусы бактерий и архей —

короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами —

Механизм действия CRISPR/Cas9 в клетках бактерий



CRISPR/Cas9 для редактирования генома

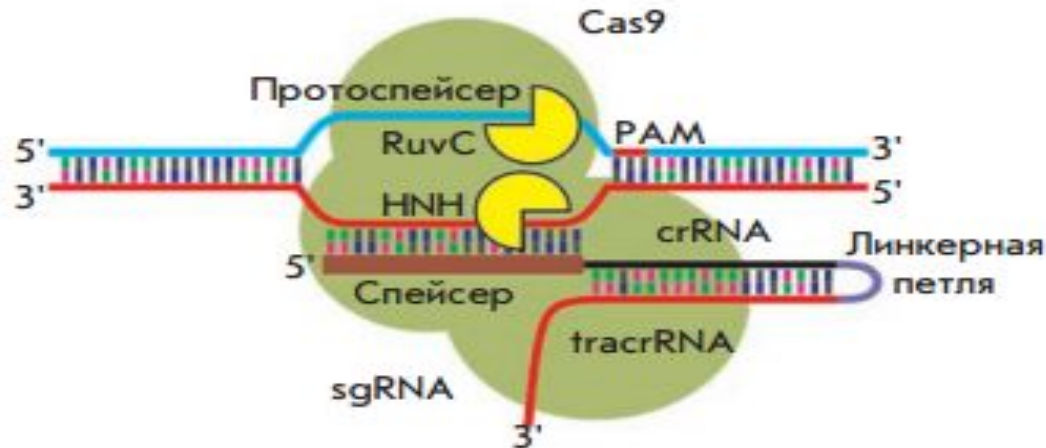
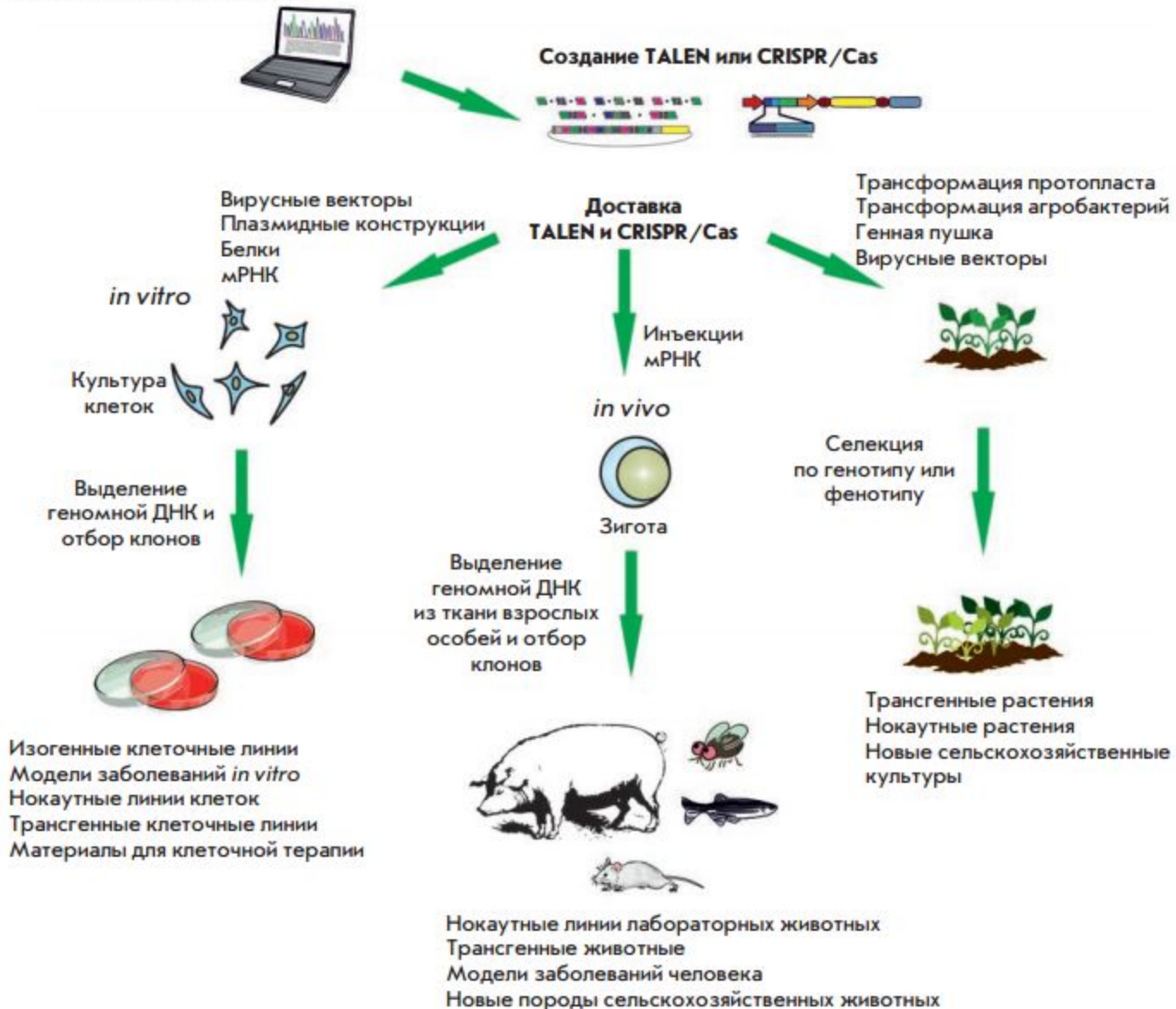


Рис. 5. Единая химерная sgRNA для внесения двухцепочечных разрывов в целевых локусах. Комплекс sgRNA и Cas9 способен вносить двухцепочечные разрывы в выбранных сайтах ДНК. SgRNA – искусственно созданная конструкция, представляющая собой объединенные в одну молекулу РНК элементы системы CRISPR/Cas9: crRNA и tracrRNA. Протоспейсер – сайт, который узнает система CRISPR/Cas9. Спейсер – последовательность в составе sgRNA, которая отвечает за связывание целевого сайта по принципу комплементарного взаимодействия. RuvC и HNH – каталитические домены, которые вносят разрывы в цепи ДНК в целевом сайте. PAM – короткий мотив (NGG в случае CRISPR/Cas9), наличие которого с 3'-конца протоспейсера обязательно для внесения разрыва

Общая схема стратегии применения систем TALEN и CRISPR/Cas в геномной инженерии

Биоинформатический анализ



Впервые в мире технологию CRISPR/Cas9 для модификации эмбрионов человека применили исследователи из Университета Сунь Ятсена в Гуанджоу. Их статья в журнале *Protein & Cell* вышла апреле 2015 года. В качестве исходного материала исследователи использовали 86 оплодотворенных яйцеклеток, из которых 71 выжила после процедуры. Как оказалось, Cas9 нашел и внес разрыв в нужном месте ДНК только в половине случаев, при этом только в четырех случаях этот разрыв был успешно заменен «правильной» последовательностью.

Авторы статьи были удивлены низкой эффективностью процедуры, которая обычно хорошо работает на модели животных.

Достижения метода

Осуществлена коррекция локуса CFTR (муковисцидозный регулятор трансмембранной проводимости) в культивируемых интестинальных стволовых клетках, полученных от больных муковисцидозом.

Этот подход позволяет получать так называемые органоиды – функциональные многоклеточные образования с исправленным геномом, аутологичные по отношению к донору клеток, которые могут быть введены обратно в организм больного.

Это направление открывает большие перспективы для клеточной терапии заболеваний человека.

Хромосомная инженерия

- **1) Создание искусственных хромосом**
- **2) Генно-инженерная модификация естественных хромосом**
- **3) Технология микроклеток**

Искусственная хромосома

Содержит три основных элемента:

- 1) концевые участки (теломеры),**
- 2) центромеру,**
- 3) точки инициации репликации.**

Дополнительно – ген устойчивости к антибиотику G418.

Функционирует в клетках автономно.

Подходы к конструированию искусственных и модификации естественных хромосом

1) Самосборка *in vitro* (в трансфецированных клетках) из цис-функциональных последовательностей:

- большие ансамбли альфа-сателлитной ДНК (центромеры),
- теломеры,
- геномная ДНК.

2) Модификация нормальных хромосом путем контролируемой редукции (минихромосомы):

- инсерции крупных фрагментов теломерной ДНК – индукция локальных разрывов,
- использование рекомбинационной системы Cre/loxP