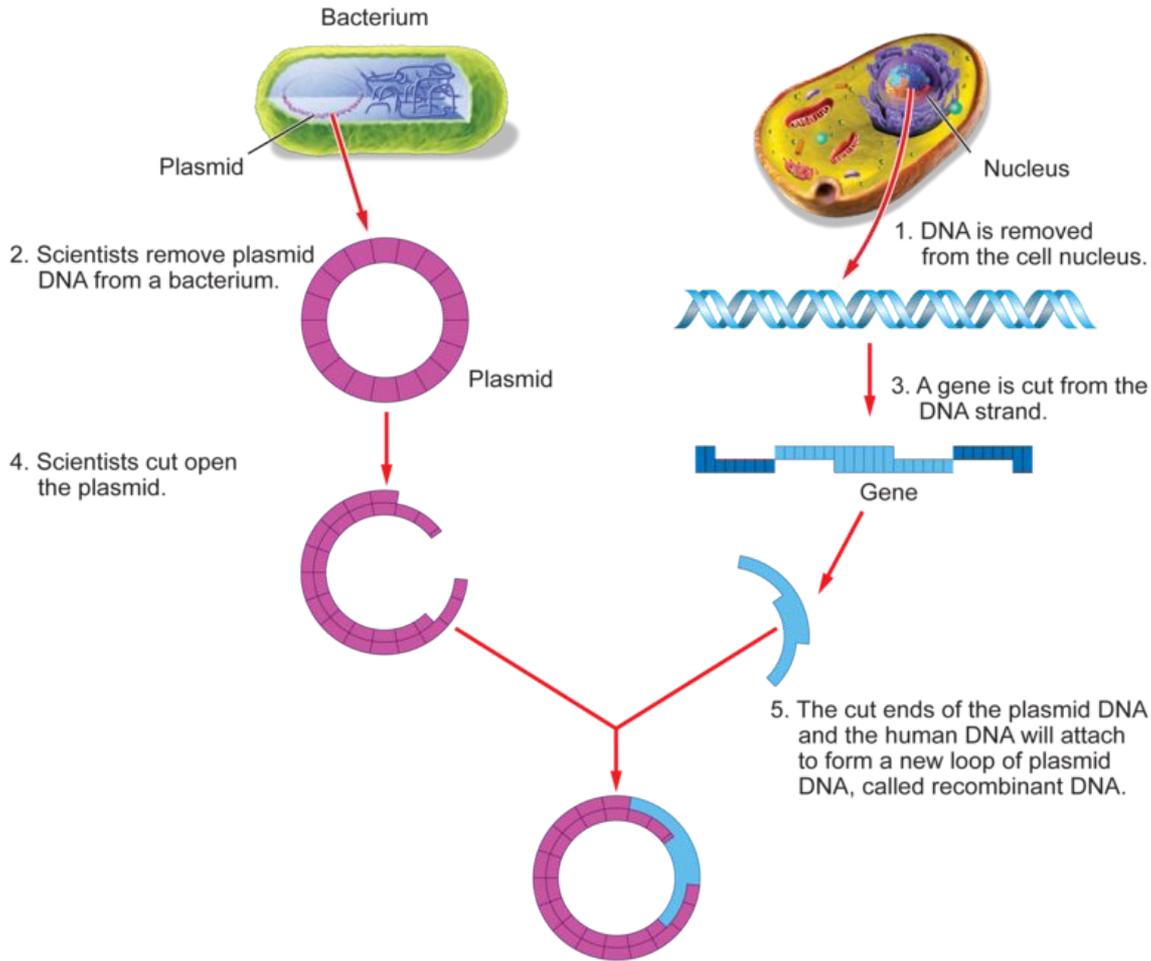


***Перспективы использования
систем редактирования генома в
области клеточных технологий***

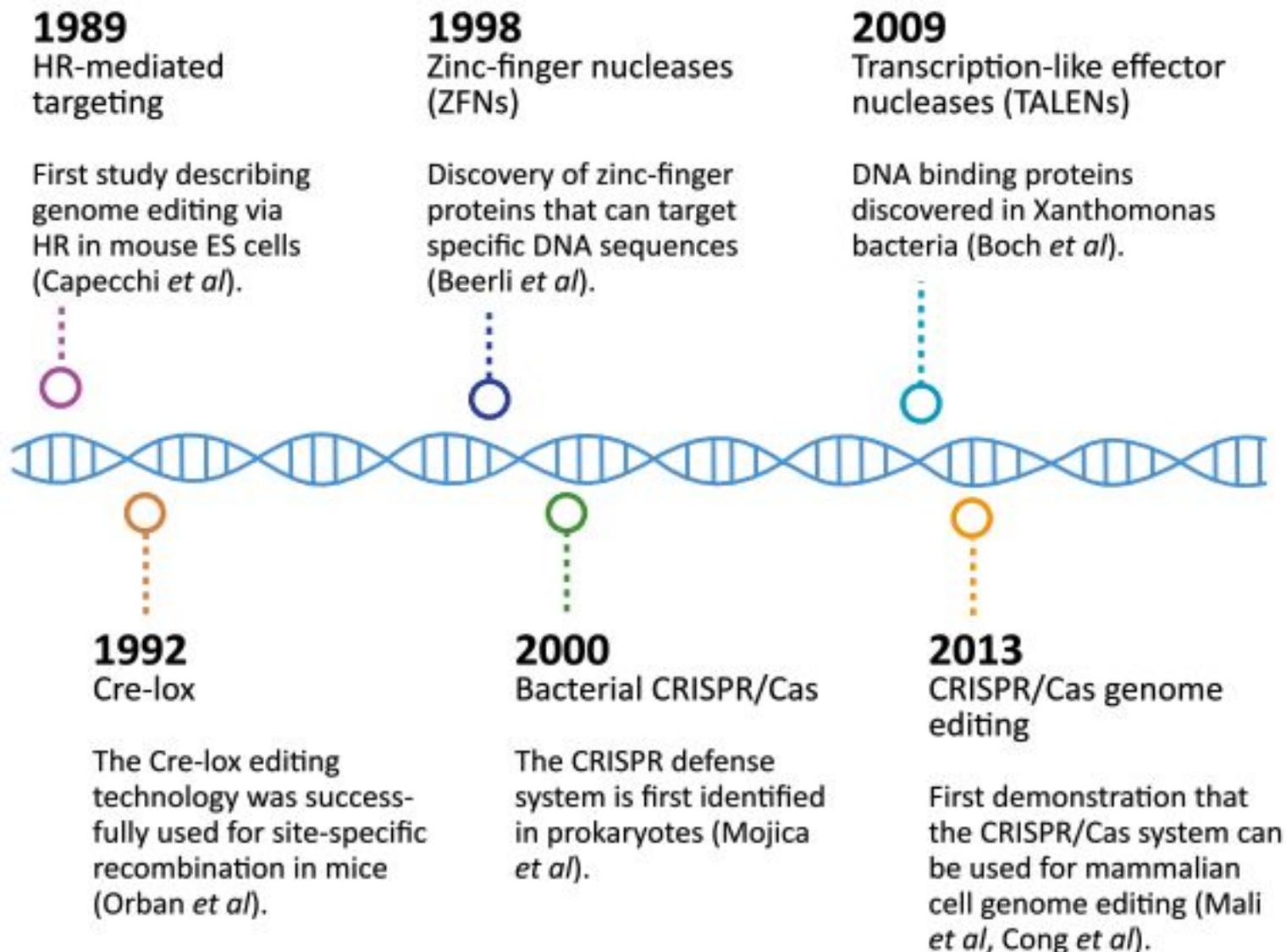
Микаелян А.С.

Генная инженерия



Первые работы по генной инженерии лаборатория П.Берга в 1972 году. Комбинирование и модифицирование генома с помощью рекомбинантной ДНК *e.colli* и бактериофага SV40.

Редактирование генома



Гомологичная рекомбинация

Homologous recombination is a repair mechanism for dsDNA breaks

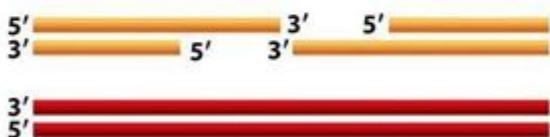
PAIRED
HOMOLOGOUS
CHROMOSOMES



DOUBLE-STRAND BREAK



NUCLEASE DIGESTS 3' ENDS



STRAND INVASION

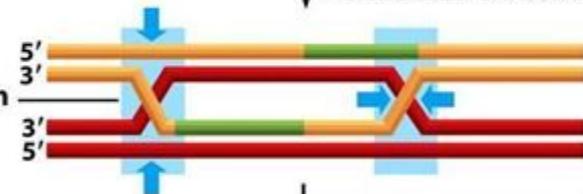


DNA SYNTHESIS

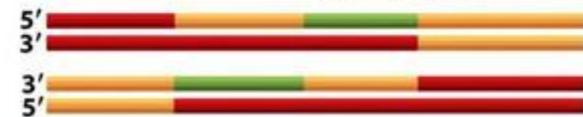


COMPLETION OF DNA SYNTHESIS
FOLLOWED BY DNA LIGATION

Holliday junction

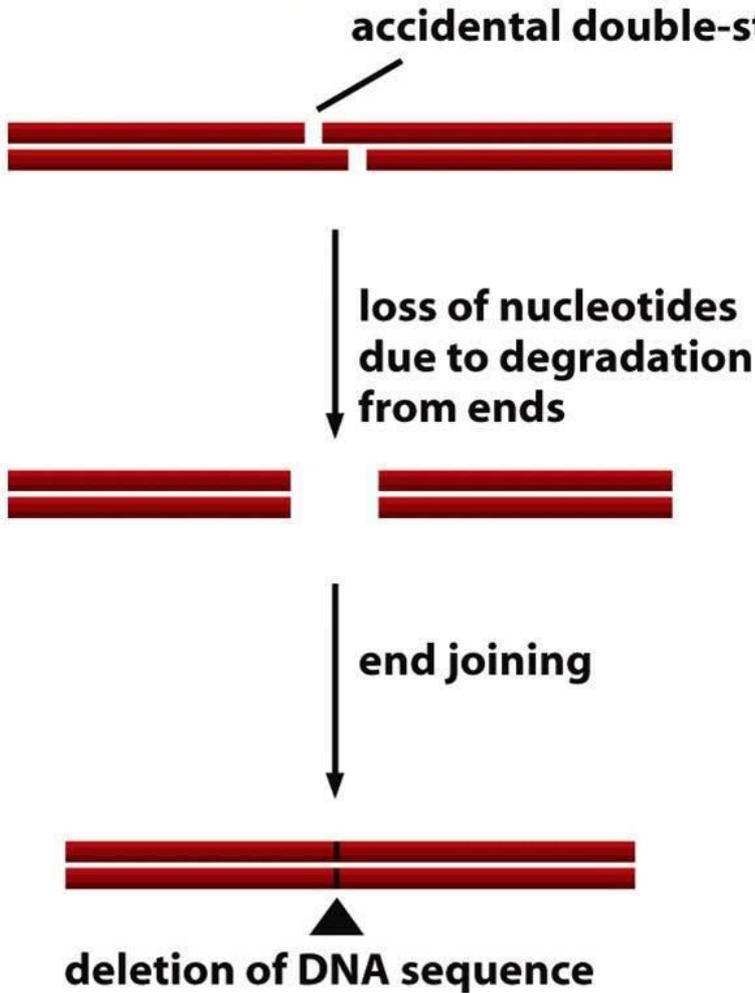


DNA STRANDS CUT AT ARROWS
AND LIGATED

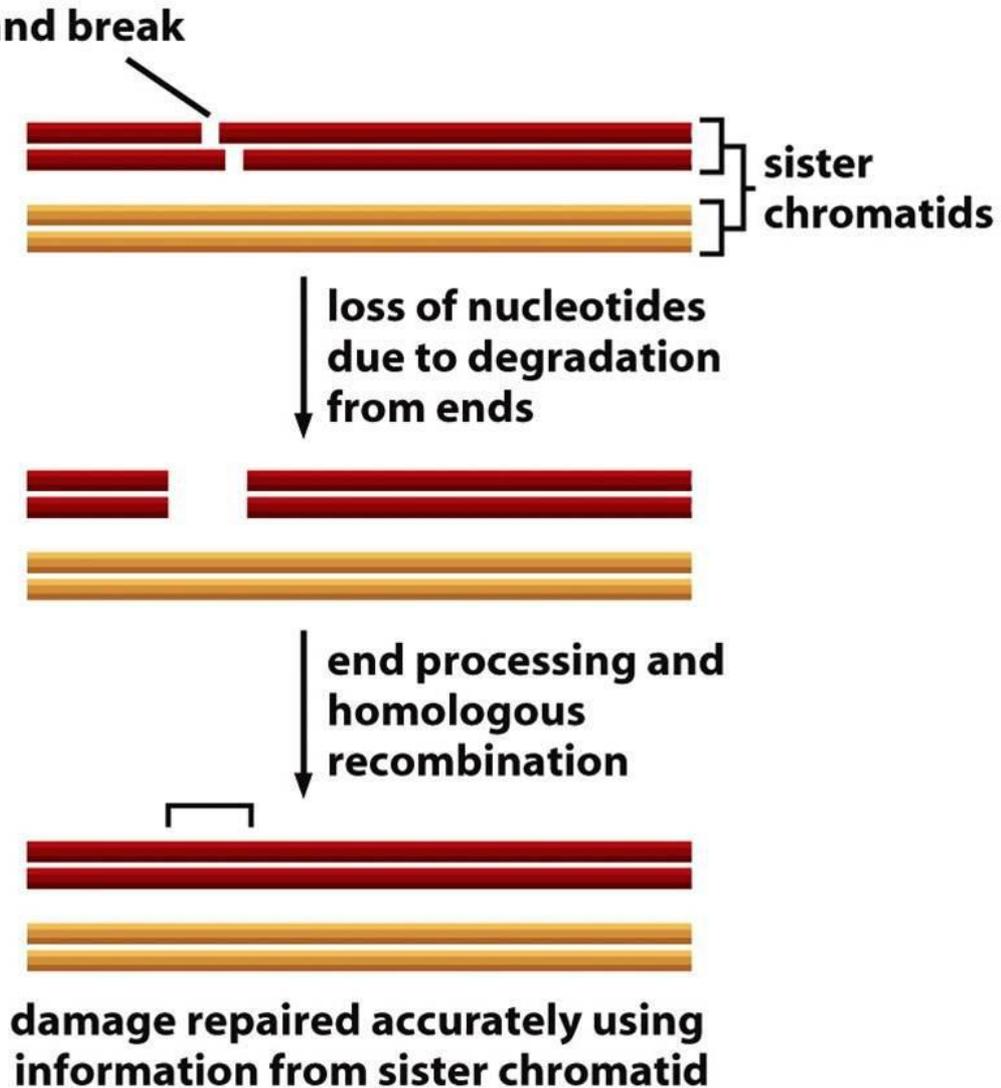


NET RESULT: CHROMOSOMES WITH CROSSOVER

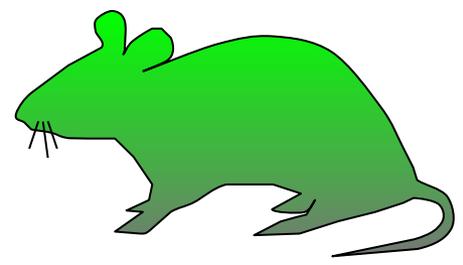
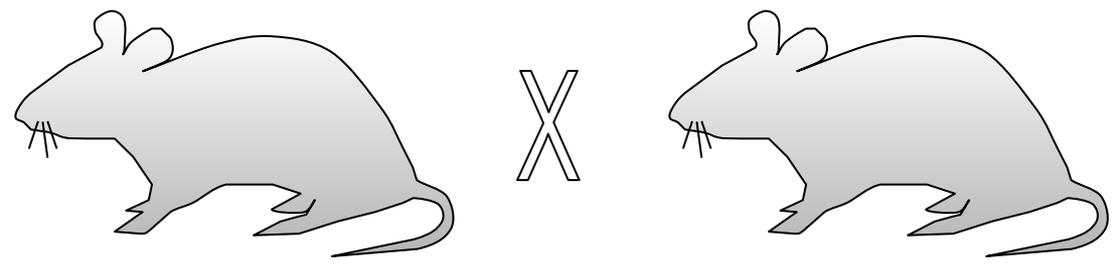
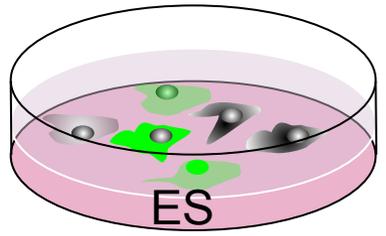
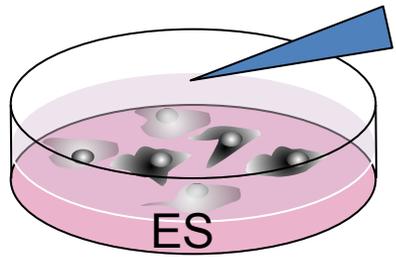
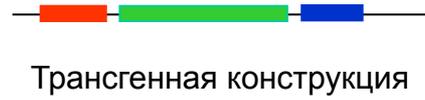
(A) NONHOMOLOGOUS END JOINING



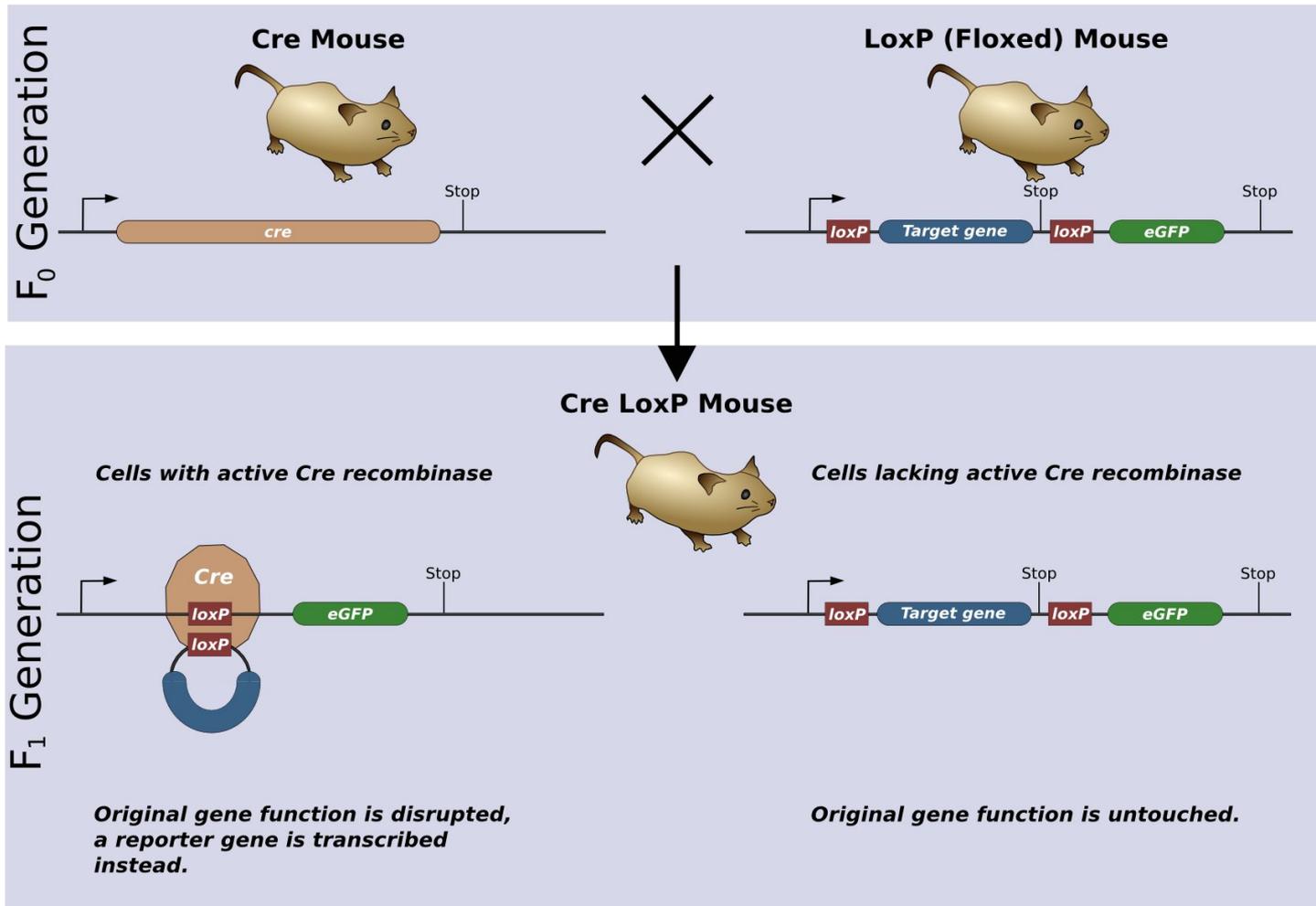
(B) HOMOLOGOUS RECOMBINATION



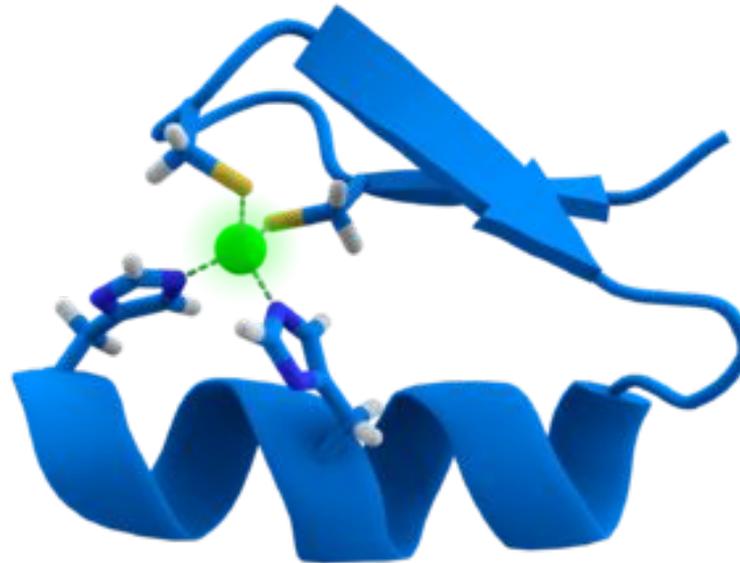
Метод получения трансгенных и нокаутных мышей



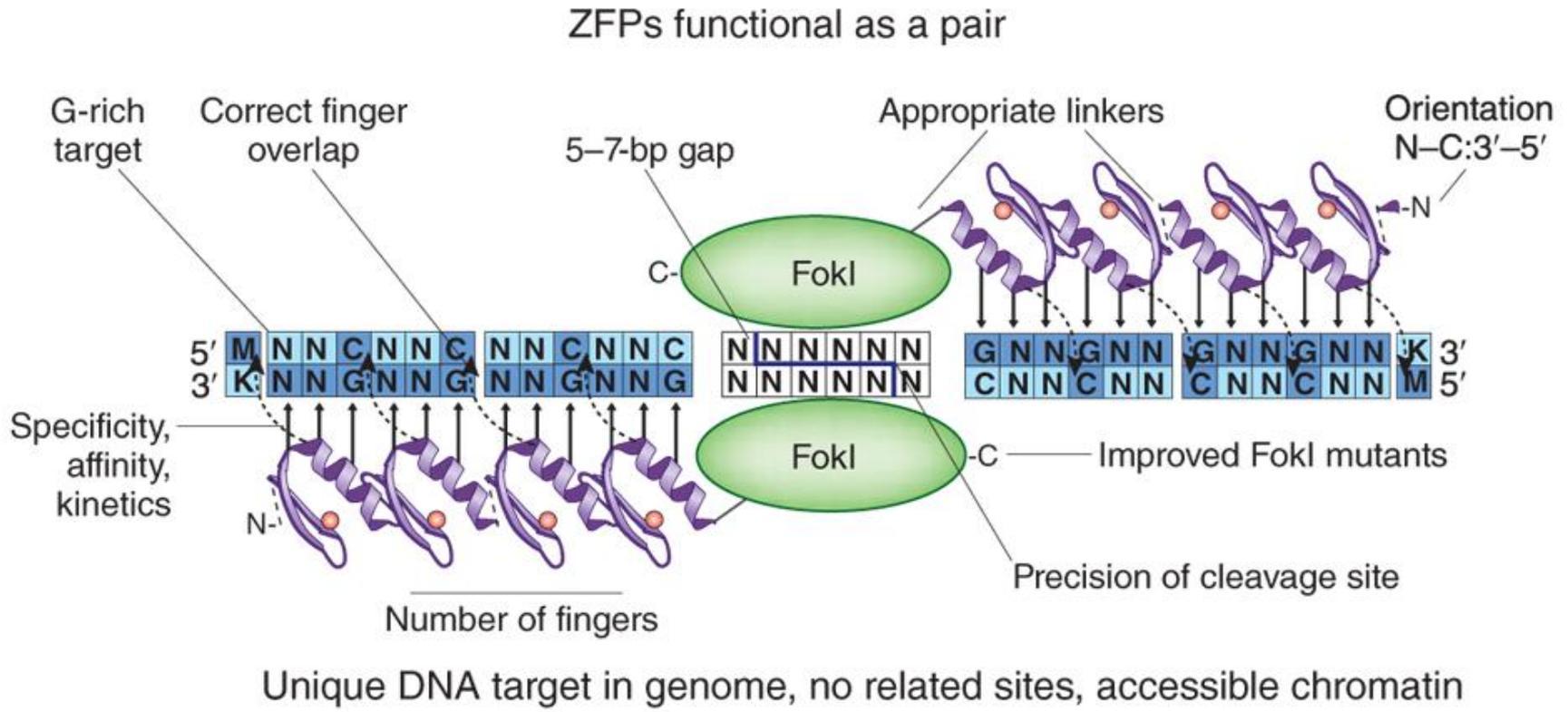
Cre-lox система рекомбинации



Zinc Finger технология

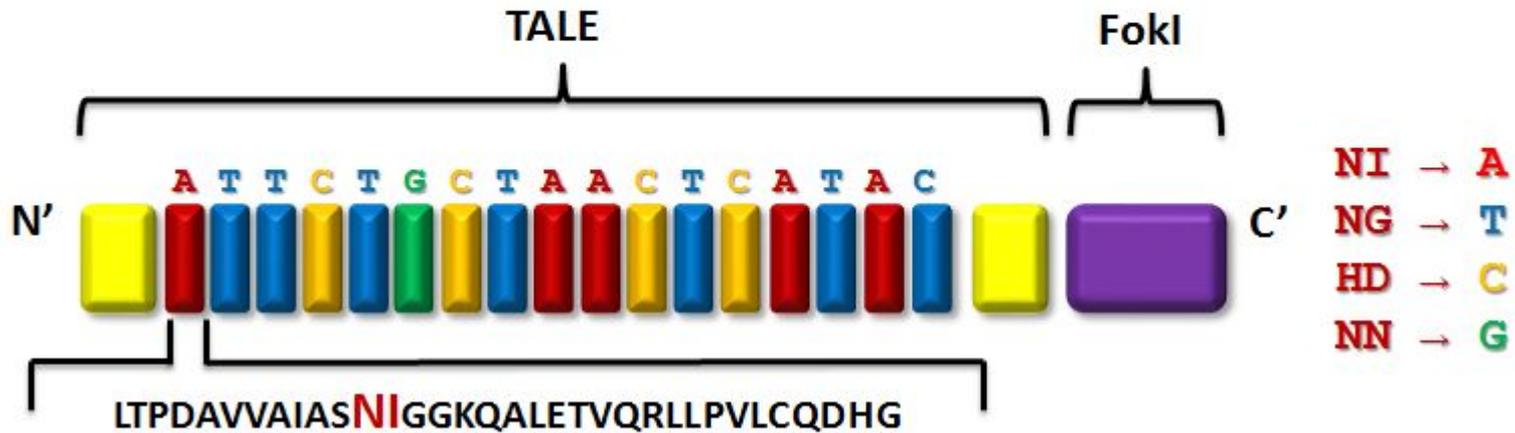


- **Цинковый палец** ([англ. zinc finger](#)) — тип [белковой](#) структуры, небольшой [белковый мотив](#), стабилизированный одним или двумя ионами [цинка](#), связанными [координационными связями](#) с аминокислотными остатками белка. Как правило, цинковый палец включает около 20 аминокислот, ион цинка связывает 2 [гистидина](#) и 2 [цистеина](#). Цинковые пальцы являются белковыми модулями, взаимодействующими с [ДНК](#), [РНК](#), другими белками или небольшими молекулами.
- Основными группами белков с цинковыми пальцами являются ДНК-связывающие [факторы транскрипции](#), а также искусственные [ферменты рестрикции](#), получаемые слиянием ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-разрезающим доменом нуклеазы. Домен цинкового пальца может быть спроектирован так, чтобы узнавать желаемую последовательность ДНК и связываться с ней.



Mark Isalan «Zinc-finger nucleases: how to play two good hands» , Nature Methods, 9, 32–34 (2012)

Структура TALE системы с FokI нуклеазой



1. ДНК связывающего домена

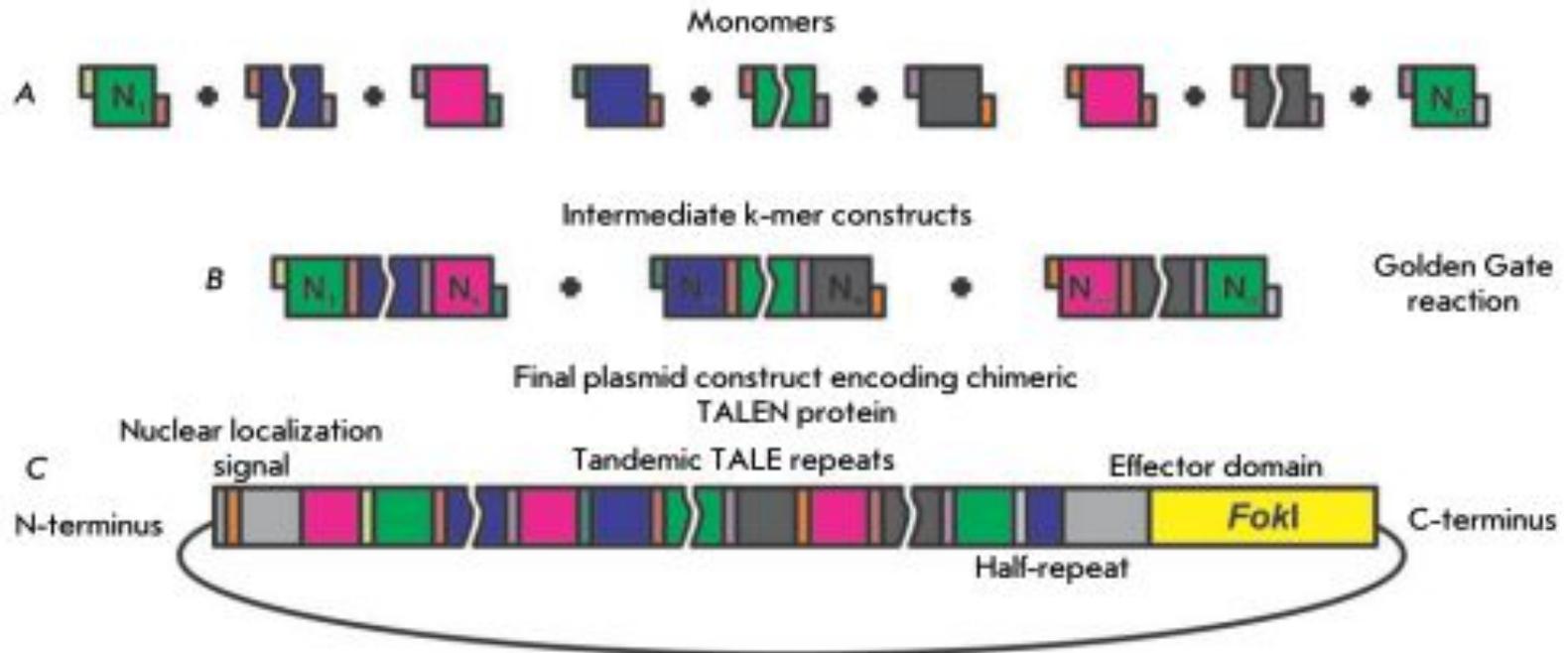
- ДНК-связывающий домен состоит из мономеров, каждый из которых связывает один нуклеотид. Мономеры тандемных повторов 34 аминокислотных остатков, два из которых расположены в положениях 12 и 13 позиции и высоко вариабельны и именно они несут специфичность для связывания с определенными нуклеотидами (RVD - Repeat Variable Diresidue). Могут связываться с несколькими нуклеотидами с различной эффективностью

2. Неспецифический домен расщепления ДНК – FokI эндонуклеаза.

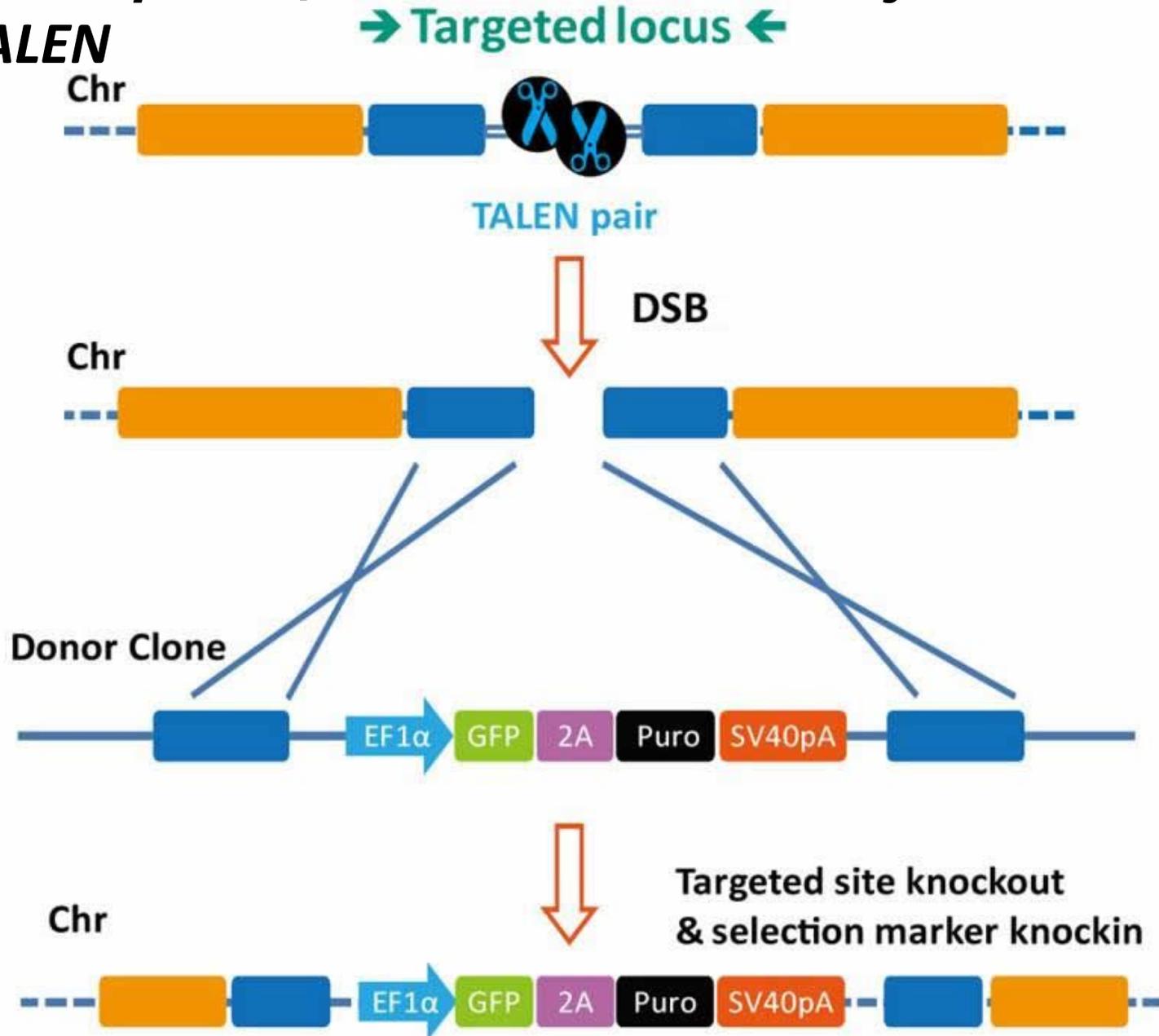
- FokI связывается с двухцепочечной ДНК ДНК-связывающим доменом в области узнавания 5'-GGATG-3'. Домен расщепление ДНК активируется и расщепляет ДНК.



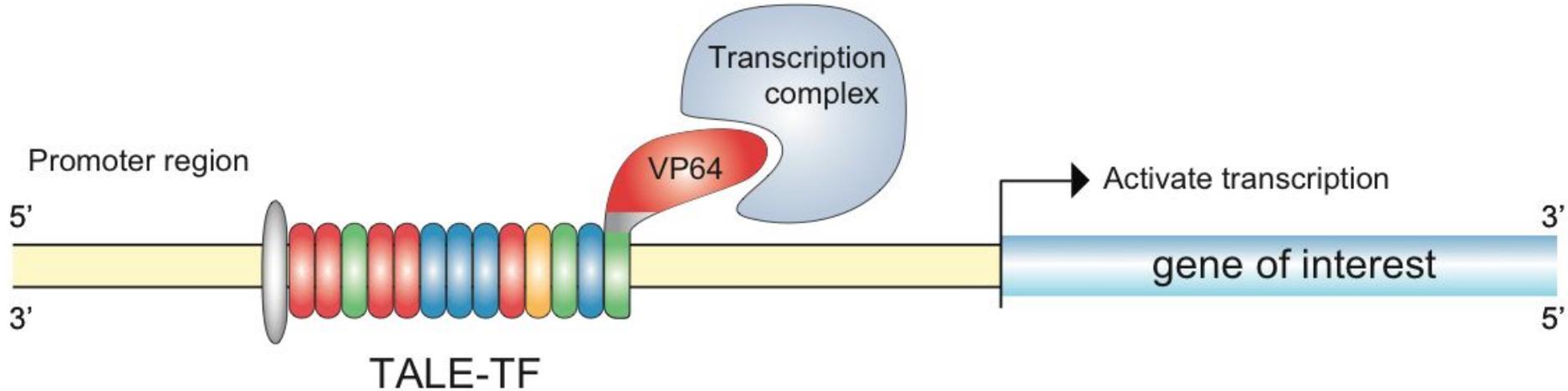
Создание Генетических конструкций TALEN



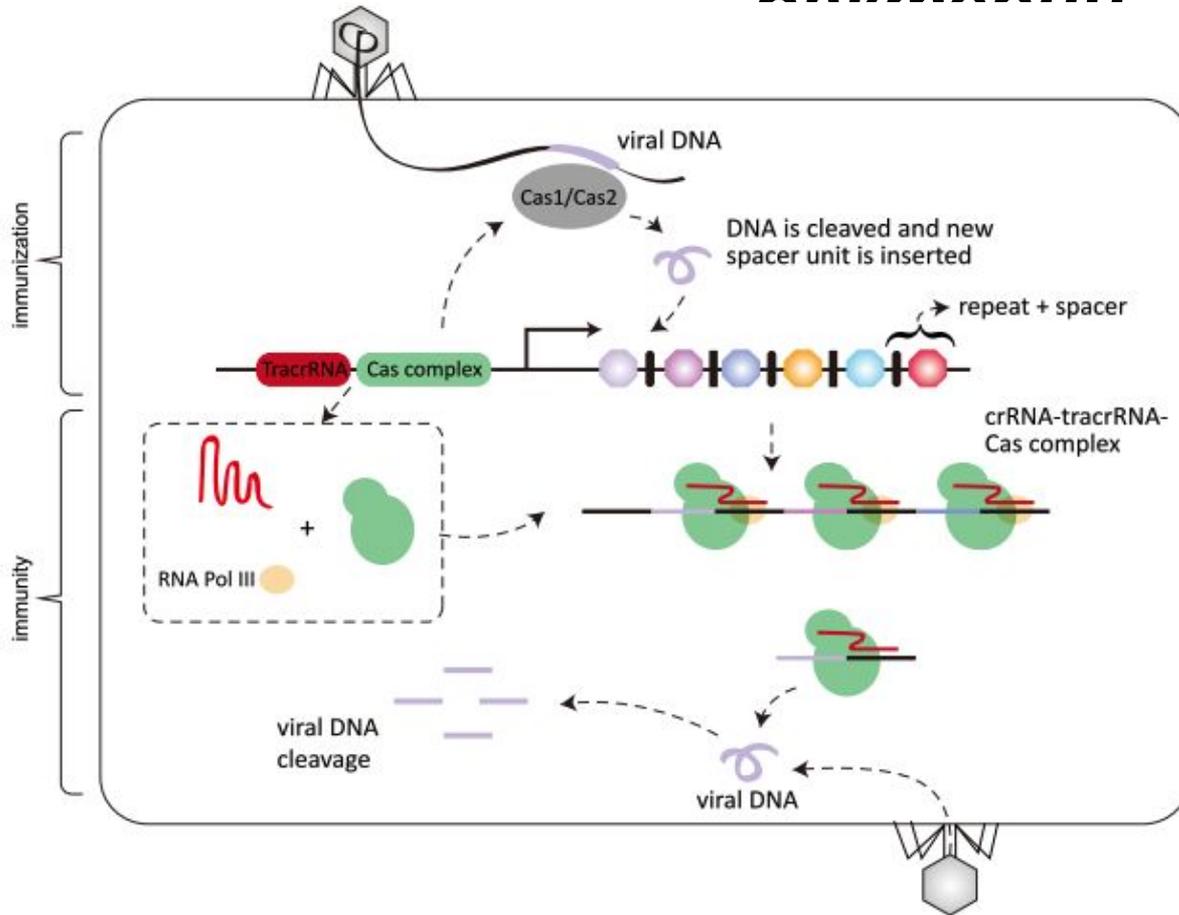
Модификации генома используя метод TALEN



Активация транскрипции



Механизм иммунной медиации CRISPR у бактерий



Состоит из двух фаз:
Иммунизация и иммунитет.

Иммунизация – CAS белки (Cas1 и Cas2) образуют комплекс для деградации чужеродной ДНК. Чужеродная ДНК включается в CRISPR locus как повторы разделенные блоками.

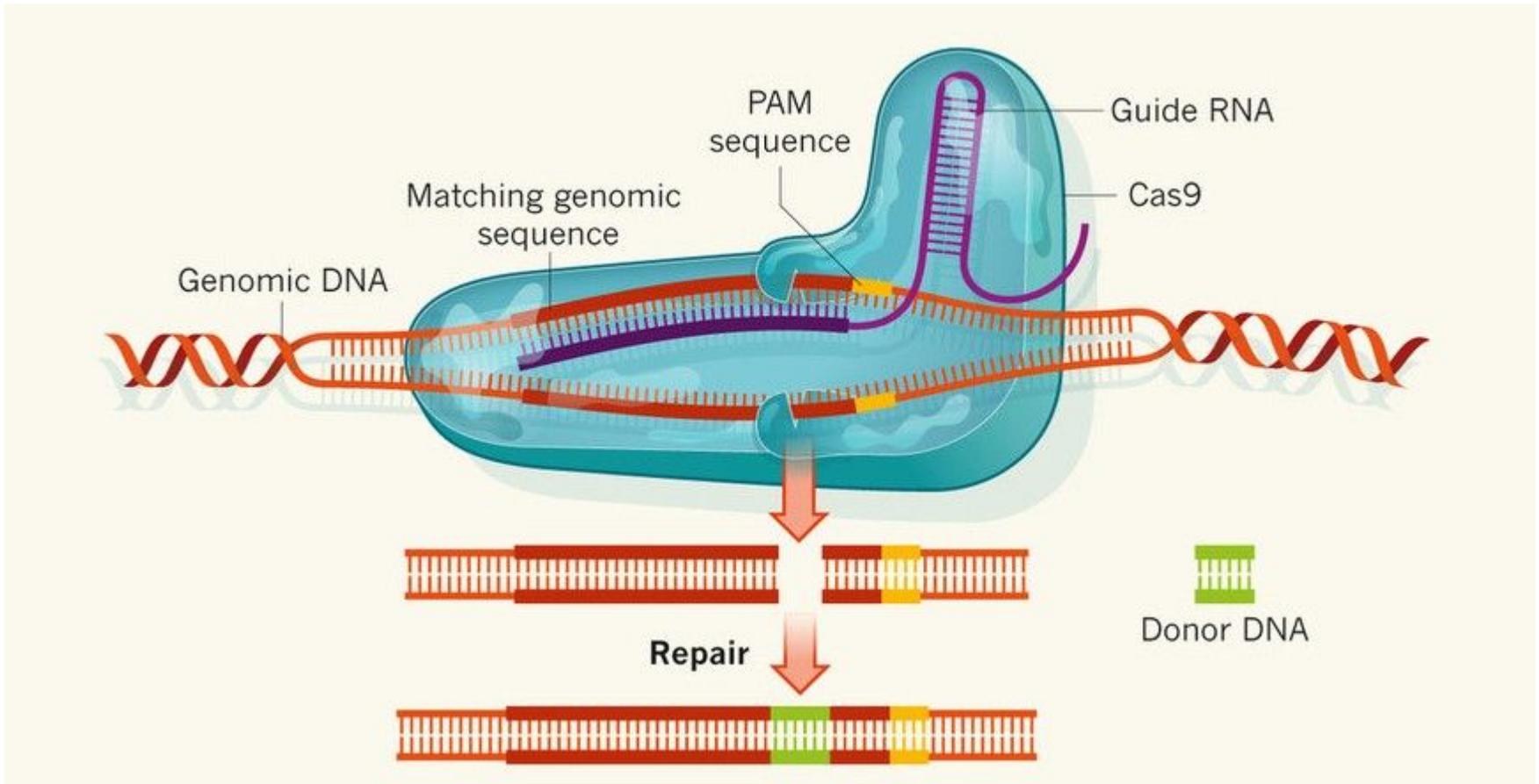
Иммунитет – после повторного инфицирования чужеродная ДНК в блоках расшифровывается для формирования CRISPR РНК (пре-crRNA).

Эндонуклеаза CAS9 и транс-активатор crRNA образуют комплекс crRNA и CAS9 при участии помощника tracrRNA. Зрелый комплекс crRNA-CAS9-tracrRNA образуется после расщепления РНК полимеразы.

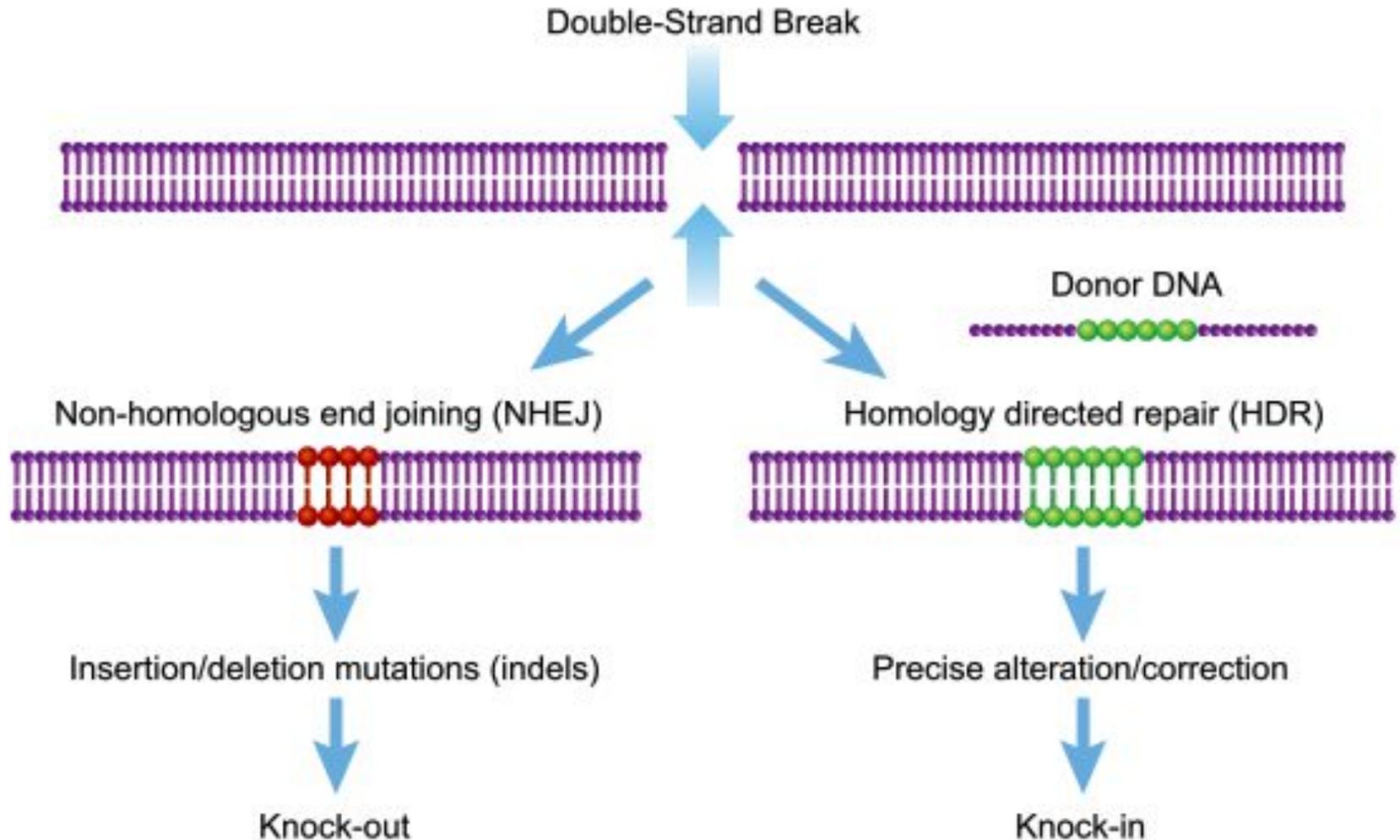
Система была впервые обнаружена в 1987 году группой Наката (Ишино др., 1987).

Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR

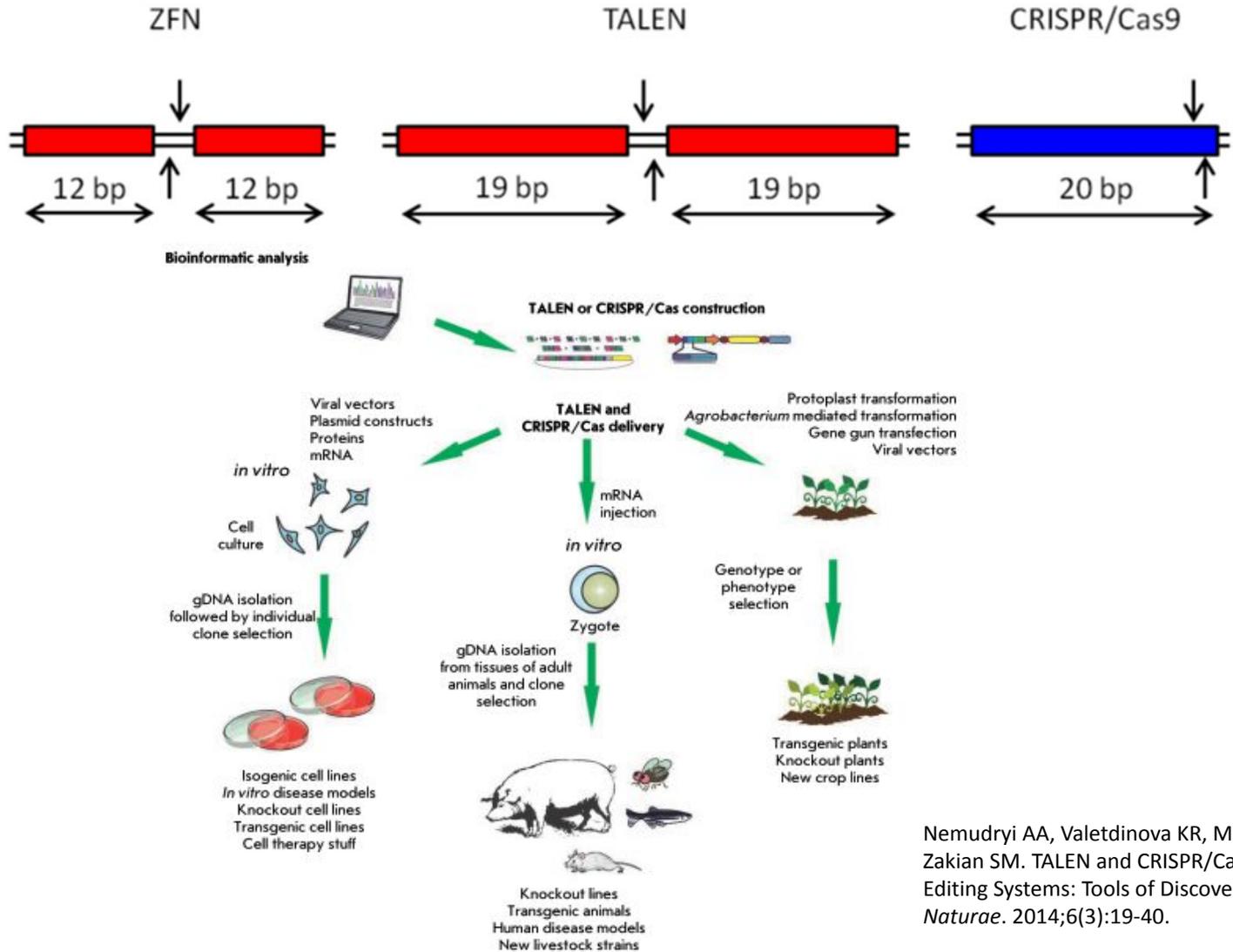
- CRISPR



Репарации ДНК путем целенаправленного редактирования генома



Редактирование генома



Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*. 2014;6(3):19-40.

	TALEN (transcription activator-like effector nucleases)	ZFN (zinc finger nucleases)	CRISPR/Cas
Target	Protein: DNA	Protein: DNA	(gRNA-Cas9): DNA
Construct	Proteins containing DNA-binding domains that recognize specific DNA sequences down to the base pair	Zinc finger DNA binding motifs in a $\beta\beta\alpha$ configuration, the α -helix recognizes 3 bp segments in DNA	20nt crRNA (CRISPR RNA) fused to a tracrRNA and Cas9 endonuclease that recognize specific sequences to the base pair
Design feasibility	Difficult: -Need a customized protein for each gene sequence -Low delivery efficiency		Easy: - all-in-one gRNA-Cas9 vector system - multigene editing is feasible
References	Moscou and Bogdanove, 2009 Boch <i>et al.</i> , 2009 Gaj <i>et al.</i> , 2013	Beerli <i>et al.</i> , 1998 Perez-Pinera <i>et al.</i> , 2012 Gaj <i>et al.</i> , 2013	Mali <i>et al.</i> , 2013 Cong <i>et al.</i> , 2013 Jiang <i>et al.</i> , 2015

Нужлеза	Объект	Ген	Назначение	Источники
TALEN	Клетки человека (<i>Homo sapiens</i>)	<i>ccr5, akt2, e17k, angptl3, apob, atgl, cborf106, celsr2, cfr, citta, foxo1, foxo3, gli1, glut4, hbb, hdac1, hdac2, hdac6, hmga2, hoxa13, hoxa9, hoxc13, hpri, il2rg, jak2, keras, line00116, maon, map2k4, mifm2, met, mlh1, msh2, mutp8, nyc, nycl1, nycn, nba, ncor1, ncor2, nrc5, nrf3, pdgfra, pdgfrb, phf8, plin1, pma2, ppp1r12c (sasus1), pich1, pten, raru, rblp5, recq4, ret, runx1, sdh8, sdhc, sdhd, setd1, sirb, smad2, sort1, sox2, kif4ss18, suz12, tfe3, tp53, trib1, tsc2, ttn, vhl, xpa, xpc, xpl1, alk, aprc, atm, axin2, bax, bc1b, bmp1a, brca1, brca2, cbx3, cbx8, cend1, cdc73, cdk4, cdh4, chd7, ctmb1, cyp1b, ddb2, ercc2, ewsr1, ezr1, ezr2, ezr3, fanca, fancc, fancf, fancy, fes, fgfr1, fh, flcn, flh4, mfn, oxu2, otd4, ptx3</i>	Нокаут, встройка	[67, 68, 70-72, 74, 92, 176-179, 180]
	Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>URA3, ADE2, LYS3</i>	Нокаут, встройка	[181]
	Нематода (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>ben-1, tex-1, zdc-2</i>	Нокаут	[182]
	Дроздофила (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>yellow, crhr1, ponzer1, bmd, cdh5, dip2a, elmo1, epas1b, fh, golden, gria3, hey2, hjf1ab, ikzf1, jak3, moesin, mycd, phf8, pp1cob, ryr1a, ryr2, sc85a, thar1, tnkh, th, fam46c, smad5</i>	Нокаут, встройка	[94, 183-187]
	Шелкопряд (<i>Bombyx mori</i>)	<i>blos2</i>	Нокаут	[188]
	Сверчок (<i>Grillus bimaculatus</i>)	<i>lac2</i>	Нокаут	[189]
	Шпорцевал лягушка (<i>Xenopus tropicalis</i>)	<i>ets1, foxd3, grp78/bip, hhex, noggin, ptfa/p48, sox9, vpp1</i>	Нокаут	[190]
	Мышь (<i>Mus musculus</i>)	<i>cborf72, fus, lepr, pak1p1, gpr35, rprm, fbxo6, smurf1, tmem74, usdr2b, deaf13, fam73a, mlhl, msn, rbb1, sepr1, rab38, sic2</i>	Нокаут, встройка	[179, 191-196]
	Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>bmpr2, lqM</i>	Нокаут	[197, 198]
	Свинья (<i>Sus scrofa</i>)	<i>amely, dmd, pdf8, ggtc, ghdrhdx, il2rg, idlr, rag2, rela (p65), sry</i>	Нокаут	[199]
	Корова (<i>Bos taurus</i>)	<i>acan, pdf8, ggtc, msn, prnp</i>	Нокаут	[179, 199]
	Арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>adh1</i>	Нокаут	[70]
	Табак (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	<i>surA, surB, hax3</i>	Нокаут, встройка	[156, 157]
Коротконозика (<i>Brachypodium distachyon</i>)	<i>aba1, csk2, coi1, hta1, rht, sbp, smc6, spl</i>	Нокаут	[154]	
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	<i>oscca7, pihxol, hsdh2, chx2, dept1, sfl1</i>	Нокаут	[153, 155]	
CRISPR/Cas	Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>CAN1, ADE2</i>	Нокаут, встройка	[200]
	Клетки человека (<i>Homo sapiens</i>)	<i>dnmt3b-tdTomato, pou5f1/oct4, emx1, dyrk1a, grin2b, egfp, ccr5, c4bpb, pvalb, azus, akt2, celsr2, citta, glut4, line00116, sort1, idlr</i>	Нокаут, встройка	[46, 51, 78, 80, 201, 202]
	Нематода (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	<i>dpy-11, unc-4, ben-1, unc-36, daf-2, kip-12, lab-1, egfp, dpy-11, lin-5, rol-1, dpy-3, unc-1, dpy-13, unc-119, hlp-12</i>	Нокаут, встройка	[119-124, 126]
	Дроздофила (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>yellow, white, rosy, cy14251 (k81), cy3708cy17629 (kl-3), light</i>	Нокаут, встройка	[130-133]
	Полосатый данио (<i>Danio rerio</i>)	<i>etsrp, gata5, etsrp, gsk3b, apoea, fh, fh1, th1, rgef, tia11, tph1a, drd3, egfp, tyr, gol, misfa, delx19, sema3fb, dre-mir-126a, dre-mir-126b, dre-mir-17a-1-dre-mir-92a-1, dre-mir-17a-2-dre-mir-92a-2, fgd5, enadarg00000070653, enadarg00000076787, psmf1, dre-mir-126a, dre-mir-17a-2, dre-mir-92a-2, tardbp, tarbdn, c13h8orf72</i>	Нокаут, встройка, хромосомные перестройки	[81, 82, 203-206]
	Лягушка (<i>Xenopus tropicalis</i>)	<i>tyr, six3</i>	Нокаут	[207]
	Свинья (<i>Sus scrofa</i>)	<i>gdfr, p65</i>	Нокаут, встройка	[208]
	Мышь (<i>Mus musculus</i>)	<i>tet1, tet2, tet3, sry, usy, rosa26, hpri, egfp, th, rheb, uhrf2</i>	Нокаут, встройка	[83, 144, 209, 210]
	Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>dnmt1, dnmt3a, dnmt3b, tet1, tet2, tet3, mc3r, mc4r</i>	Нокаут, встройка	[144, 145, 211]
	Арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>pds23, fls2, bri1, jaz1, gaj, chl, chl2, 5g13930</i>	Нокаут, встройка	[87, 88, 149]
	Табак (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	<i>pds</i>	Нокаут, встройка	[88, 89]
	Рис (<i>Oryza sativa</i>)	<i>osd, badh2, mrk2, 02g23823, roc5, spp, ysa, myb1, cao1, lazy1, sscet11, sscet14</i>	Нокаут, встройка	[86, 150, 152]
	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>mlo</i>	Нокаут	[86]

Немудрый А. А., Валетдинова К. Р.,
Медведев С. П., Закиян С. М.
«Системы редактирования геномов
TALEN и CRISPR/Cas инструменты
открытый» 2014, Acta Naturae