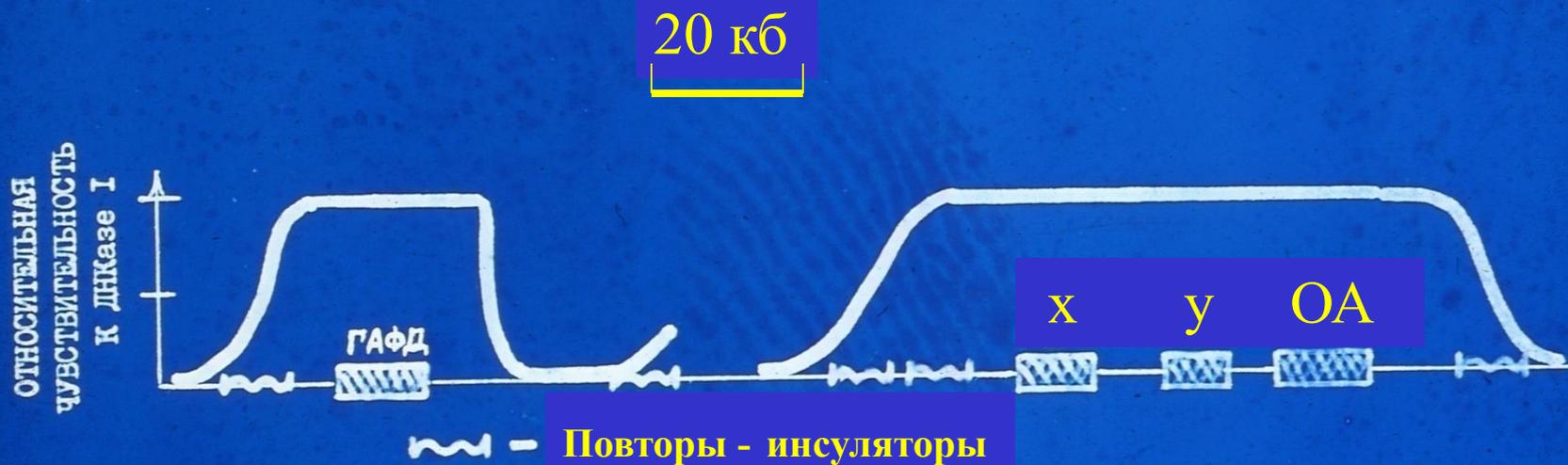


# Лекция 4

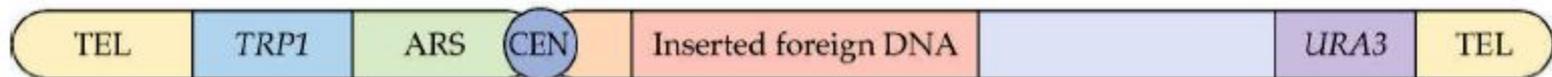
# **Экспрессия трансгенов**

# Структура домена хроматина, содержащего ген овальбумина (ОА) и координированно экспрессирующиеся с ним гены (Х и Y)



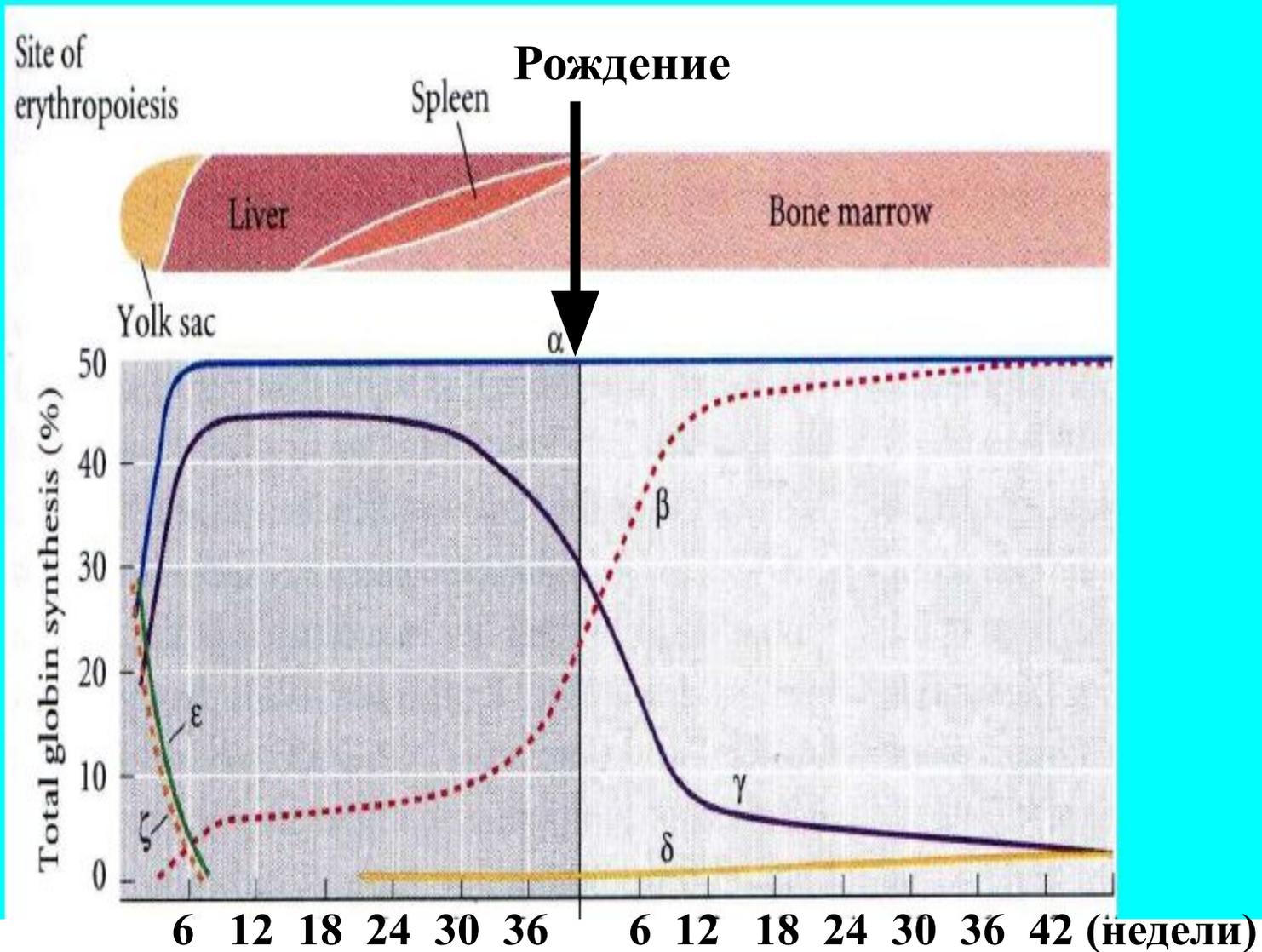
# Искусственная хромосома дрожжей

## Yeast Artificial Chromosomes YAC

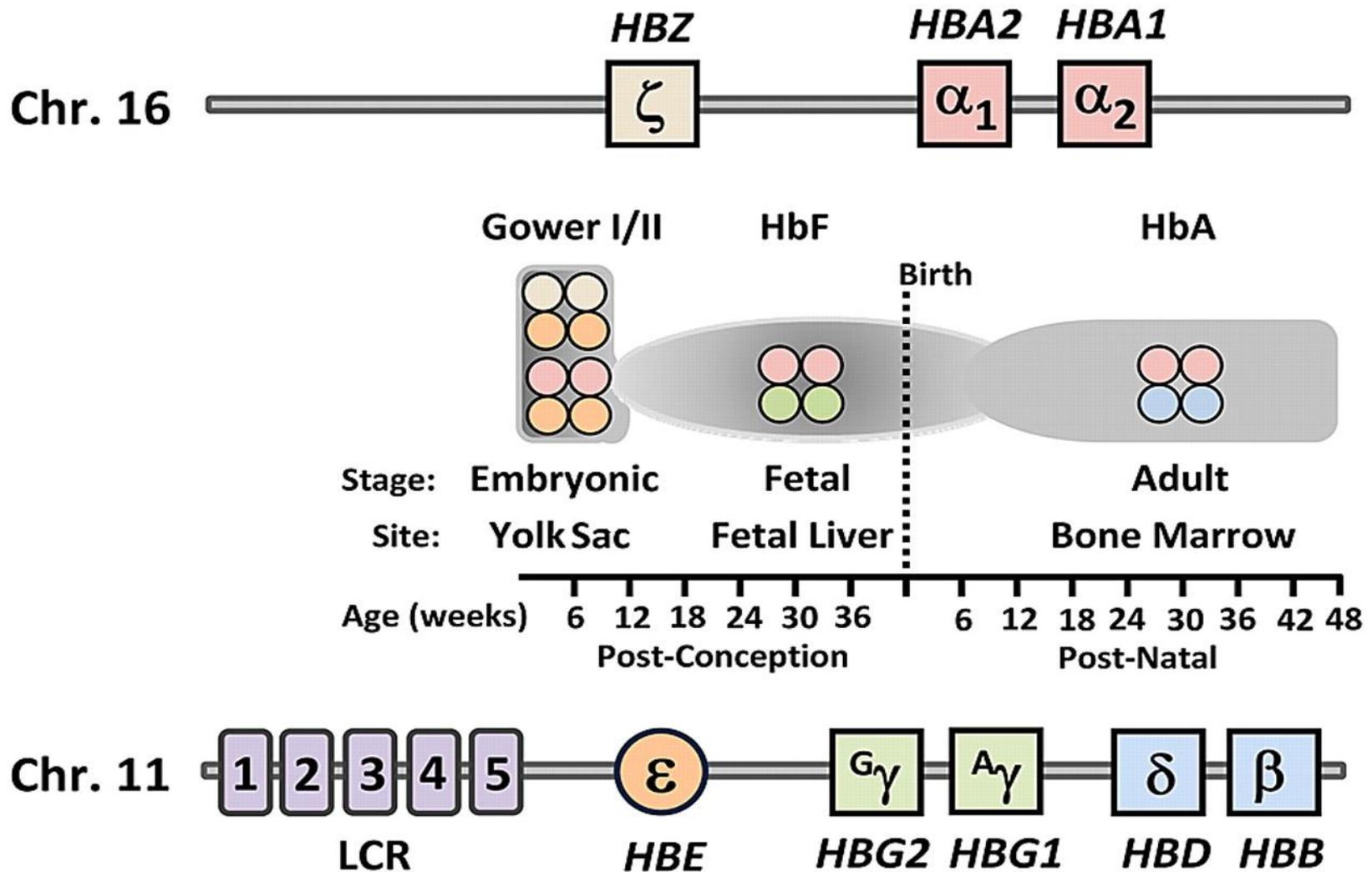


<u>Vector</u>	<u>insert size</u>	<u>Host</u>
YAC:	100-1000kb	yeast
BAC:	80-300kb	bacterium
Cosmid:	20-50 kb	bacterium
Lamda:	10-20kb	bacterium
Plasmid:	0.2-15kb	bacterium

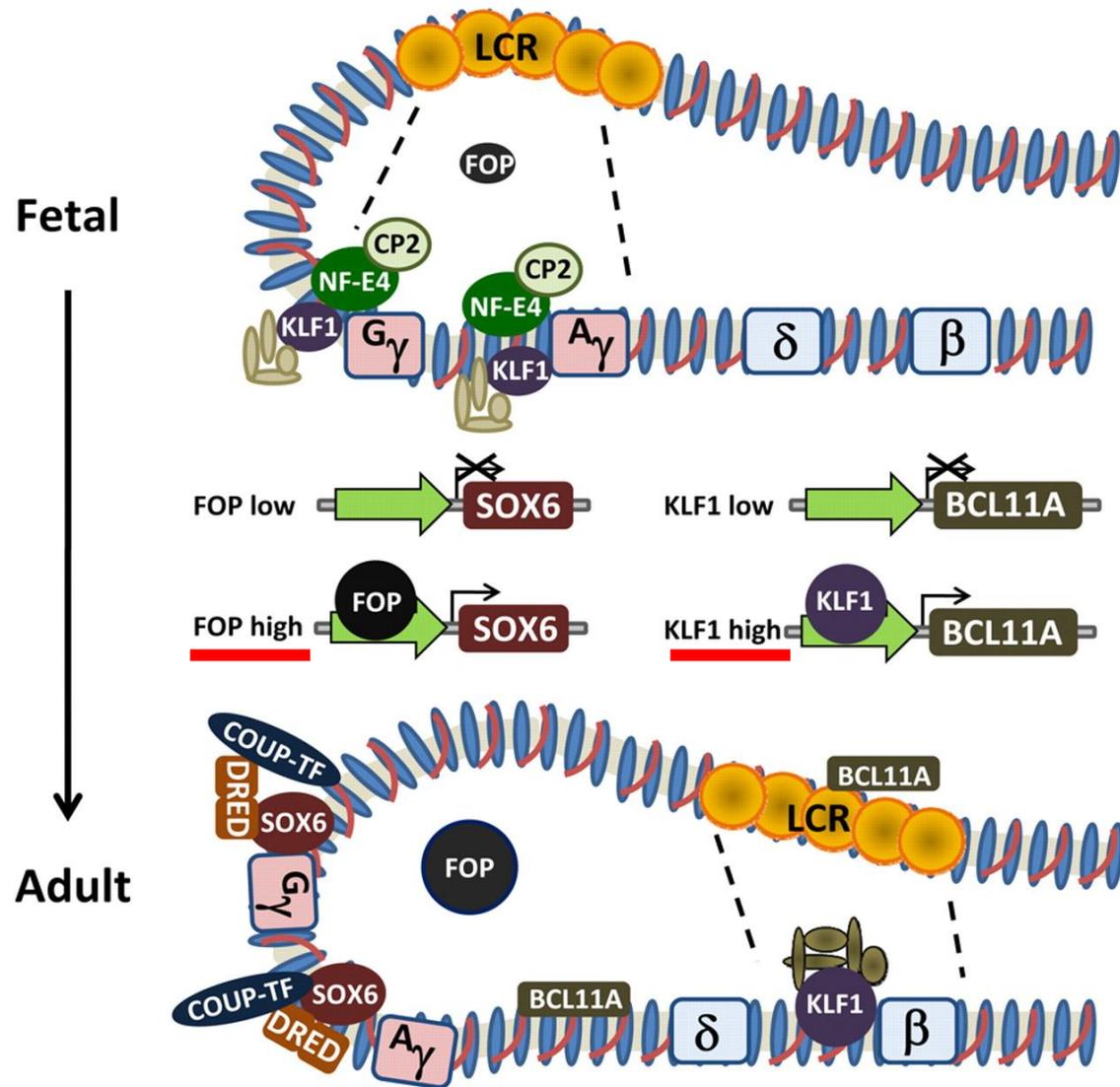
# Изменение типов полипептидных цепей глобинов в молекуле гемоглобина в зависимости от локализации эритропоэза в пре- и постнатальном развитии человека



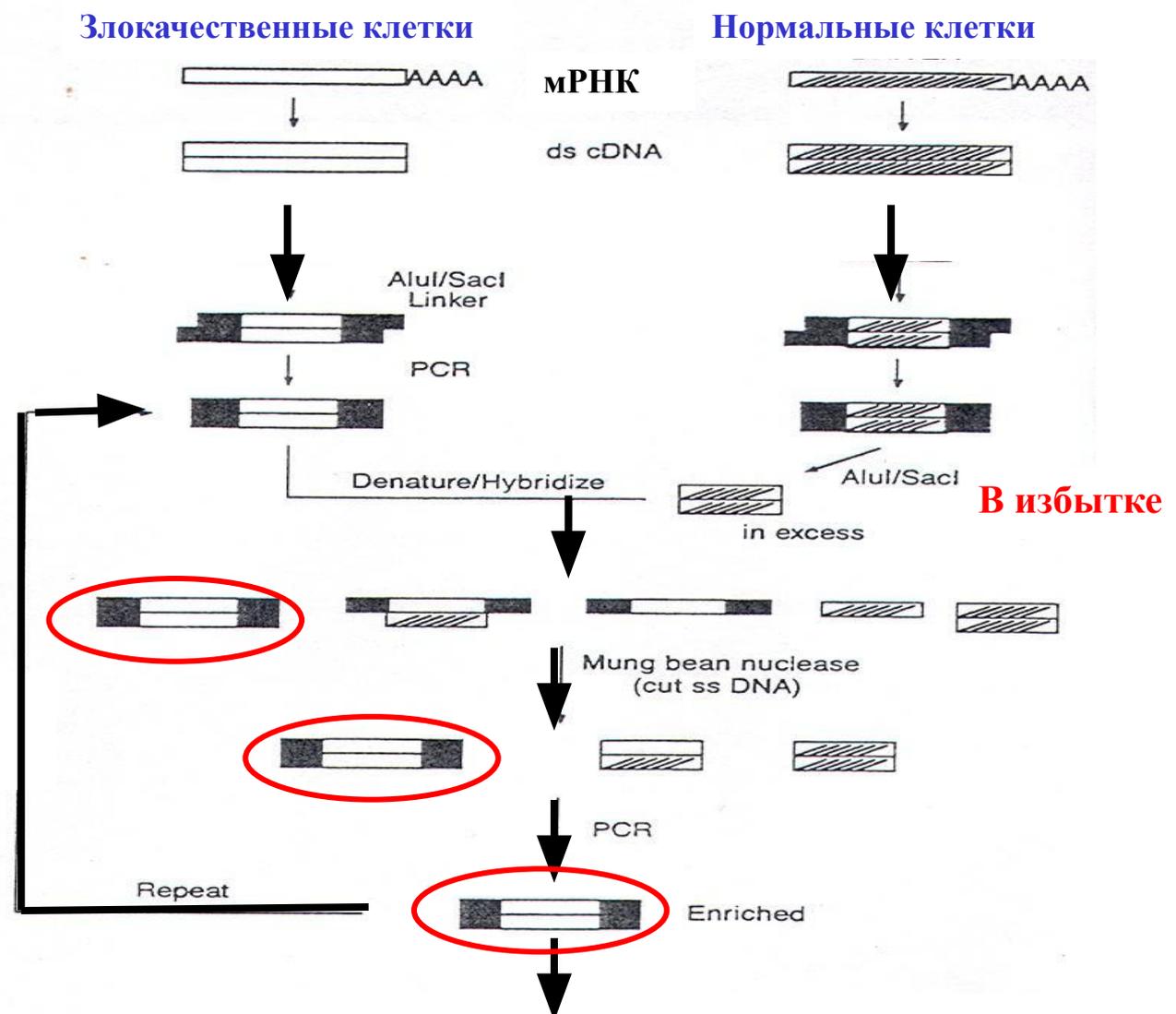
# Структура кластеров глобиновых генов человека



# Schematic of hemoglobin switching model based on looping and interaction of the LCR with the individual $\beta$ -globin gene promoters.



# Вариант метода вычитающей гибридации

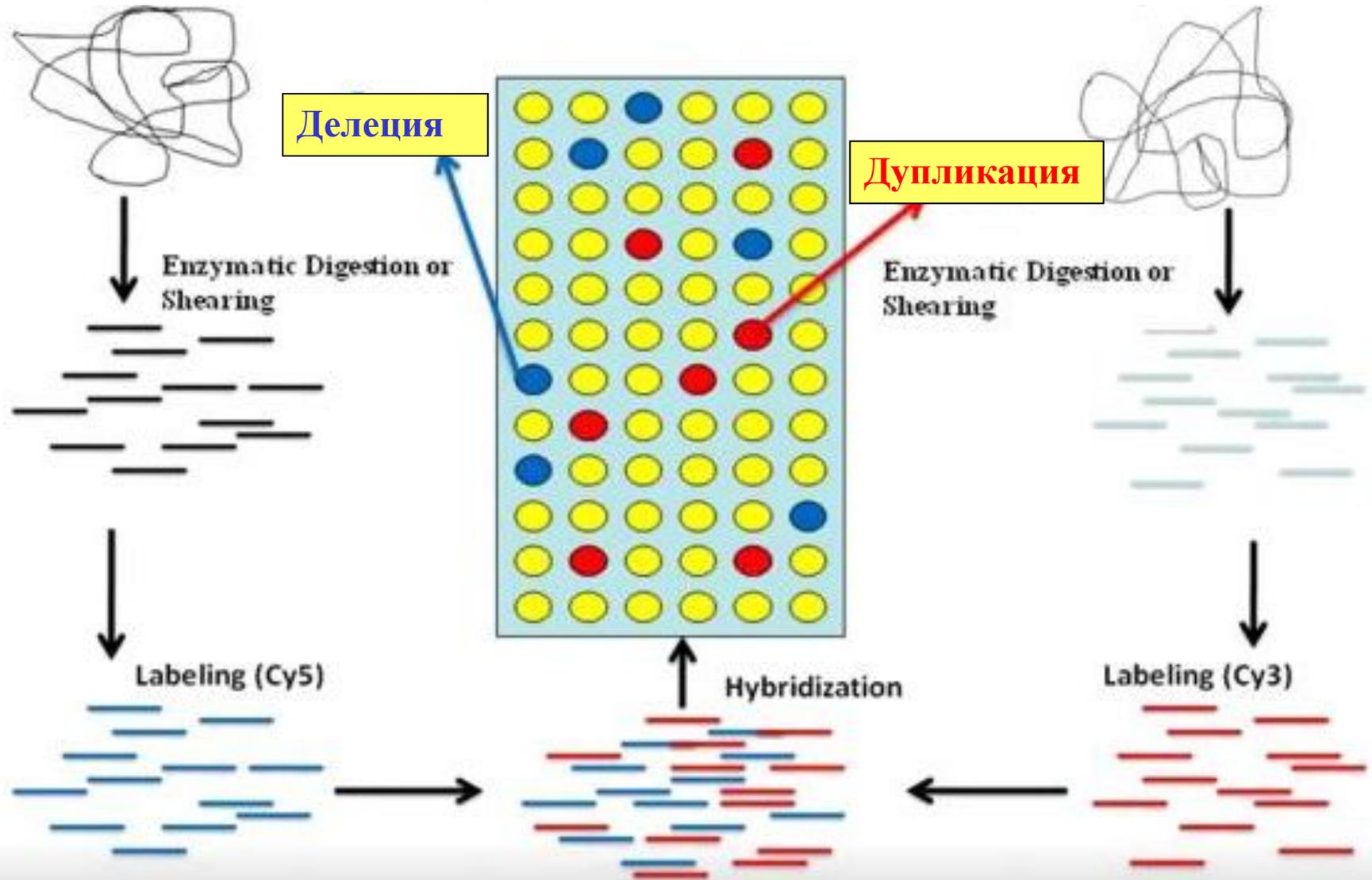


Клонирование и анализ (трансгеноз)

# Array CGH (Comparative Genomic Hybridization technology).

Контрольная ДНК

Исследуемая ДНК



## **От хромосомных перестроек - к механизмам злокачественного перерождения через трансгеноз**

- Транслокация хромосом  $t(9;22)$  у человека при **лимфобластической лейкемии** –
- обнаружение слитых генов **Bcr/Abl** –
- получение трансгенных мышей с такой конструкцией под контролем МТ-промотора –
- возникновение у них **лимфобластической лейкемии**

## Влияние экспрессии онкогенов на канцерогенез у трансгенных мышей

ТРАНСГЕНЫ		ЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕОПЛАЗИЙ И ИХ ХАРАКТЕР
ПРОМОТОР	КОДИРУЮЩАЯ ОБЛАСТЬ	
Генов ранней обл. папова- вируса JC человека	Онкоген вируса JC	Нервная ткань (нейро- бластомы)
Генов ранней обл. папова- вируса BK человека	Онкоген вируса BK	Эпителиальные ткани (карцинома печени, опухоли почек)
Вируса папилломы быка	ДНК вируса папилломы	Фибропапилломы кожи
Генов ранней обл. папова- вируса SV40 обезьяны	Ген Т-антигена SV40	Нервная ткань (папило- мы сплетения сосудистой оболочки)
Гена металлотионеина мышь	Ген Т-антигена SV40	- // -
Гена кислого белка молока мышь	Онкоген Ha-ras	Молочная железа (опу- холи)
LTR MMTV	Онкоген c-myc	- // -
Гена иммуноглобулина мышь	Онкоген c-myc	Лимфоидные ткани (лимфомы)
Гена инсулина мышь	Ген Т-антигена SV40	Панкреатическая железа

# Клеточные гены, ускоряющие развитие лимфомы у трансгенных мышей

Transgene (promoter-gene)	Function of protein	Type of lymphoma	References
<i>Eμ-c-myc</i>	Transcription factor, multifunctional oncoprotein	B cell	Adams et al., 1985
<i>CD2-c-myc</i>	Transcription factor, multifunctional oncoprotein	T-cell	Webster et al., 1997
<i>Eμ-N-myc</i>	Transcription factor, multifunctional oncoprotein	B cell	Sheppard et al., 1998
<i>lck-bcl2</i>	Oncoprotein blocking programmed cell death	T cell	Linette et al., 1995
<i>vav-bcl2</i>	Oncoprotein blocking programmed cell death	B cell, FL	Egle et al., 2003
<i>lck-bax</i>	Protein promoting apoptosis	B cell	Luke et al., 2003
<i>MMTV-N-ras</i>	Transmembrane oncoprotein	B- and T cells	Mangues et al., 1996
<i>Eμ-pim1</i>	Serine/threonine kinase	T cell	Breuer et al., 1989b
<i>Eμ-pim2</i>	Serine/threonine kinase	T cell	Allen et al., 1997
<i>mdm2*</i>	E3 ubiquitin ligase	T cell	Jones et al., 1998

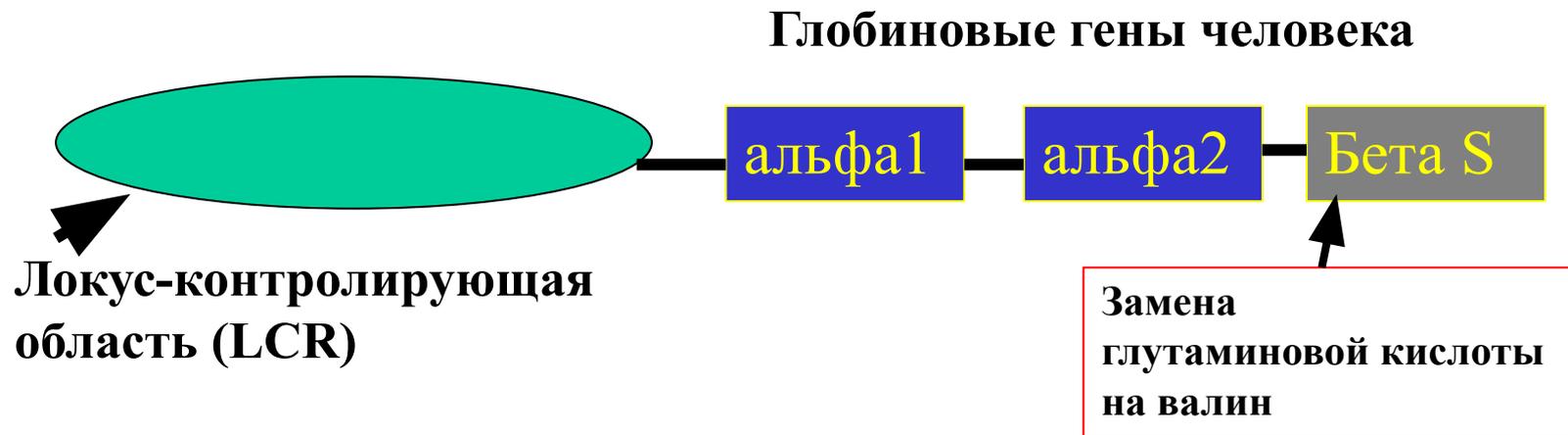
## Синергизм трансгенов в лимфомогенезе у двойных трансгенных мышей

Transgene	Synergistic gene	Type of lymphoma	References
<i>c-myc</i>	<i>v-abl</i>	Pre-B cell	Adams, Cory, 1991
<i>c-myc</i>	<i>pim1</i>	Pre-B cell	Verbeek et al., 1991
<i>c-myc</i>	<i>pim2</i>	T cell	Allen et al., 1997
<i>c-myc</i>	<i>N-ras</i>	Pro-B, pre-B cell	Adams, Cory, 1991
<i>c-myc</i>	<i>bcl2</i>	B cell	Marin et al., 1995
<i>c-myc</i>	<i>cbfal</i>	B cell	Vaillant et al., 1999
<i>c-myc</i>	<i>EBNA-1</i>	B cell	Drotar et al., 2003
<i>c-myc</i>	<i>runx-2</i>	T cell	Cameron et al., 2003
<i>c-myc</i>	<i>cyclin D</i>	pre-B and B cells	Lovec et al., 1994
<i>c-myc</i>	<i>CKII<math>\alpha</math></i>	lymphocytic leukemia	Seldin, Leder, 1995
<i>L-myc</i>	<i>cyclin D</i>	pre-B and B cells	Lovec et al., 1994
<i>L-myc</i>	<i>bcl2</i>	B- and T cells	Zornig et al., 1995a
<i>L-myc</i>	<i>gfi1</i>	T cell	Schmidt et al., 1998
<i>N-myc</i>	<i>pim1</i>	T-cell	Moroy et al., 1991
<i>N-myc</i>	<i>bcl2</i>	B- and T-cells	Zornig et al., 1995a
<i>ras</i>	<i>cyclin E</i>	T cell	Karsunky et al., 1999
<i>N-ras</i>	<i>skp2</i>	T cell	Latres et al., 2001

# Детектирование синергичных в лимфоогенезе генов с помощью инсерций провирусов у трансгенных мышей

Transgene	Synergistic gene	Type of lymphoma	References
<i>c-myc</i>	<i>bmi1, pim1</i>	Pre-B cell	Haupt et al., 1991;
<i>c-myc</i>	<i>p53</i>	B-cell	Elson et al., 1995
<i>c-myc</i>	<i>til1</i>	T cell	Stewart et al., 1997
<i>c-myc</i>	<i>v-myb</i>	T cell	Davies et al., 1999
<i>c-myc</i>	<i>runx1</i>	T cell	Wotton et al., 2002
<i>c-myc</i>	<i>runx2</i>	T cell	Baxter et al., 2001
<i>c-myc</i>	<i>frat1</i>	T cell	Scheijen et al., 1997
<i>c-myc</i>	<i>bmi1, gfi1</i>	T cell	Scheijen et al., 1997
<i>c-myc</i>	<i>notch1</i>	T cell	Girard et al., 1996
<i>c-myc</i>	<i>syndecan4</i>	T cell	Renard et al., 1998
<i>c-myc</i>	<i>E2A</i>	T cell	Mikkers et al., 2002a
<i>c-myc, pim1</i>	<i>bmi1</i>	B- and T cell	Alkema et al., 1997
<i>c-myc, pim1</i>	<i>gfi1, pal1</i>	T cell	Scheijen et al., 1997
<i>L-myc</i>	<i>gfi1, pal1</i>	T cell	Schmidt et al., 1996
<i>N-myc</i>	<i>runx2</i>	T cell	Blyth et al., 2001
<i>N-ras</i>	<i>N-myc</i>	T cell	Haupt et al., 1992
<i>pim1</i>	<i>gfi1, pal1</i>	T cell	Schmidt et al., 1996

# 1. Моделирование серповидноклеточной анемии у трансгенных мышей



# 2. Моделирование болезни Альцгеймера у трансгенных мышей

Тройная трансгенная мышь, содержащая мутантные гены пресенилина, аполипопротеина и белка tau. Протективный эффект гуманина.

# Некоторые другие проблемы, решаемые с помощью трансгеноза.

## 1. Токсикогенетика развития.

Генетическая замена микрохирургии – ген дифтерийного токсина А с промотором гена эластина – уничтожение поджелудочной железы.

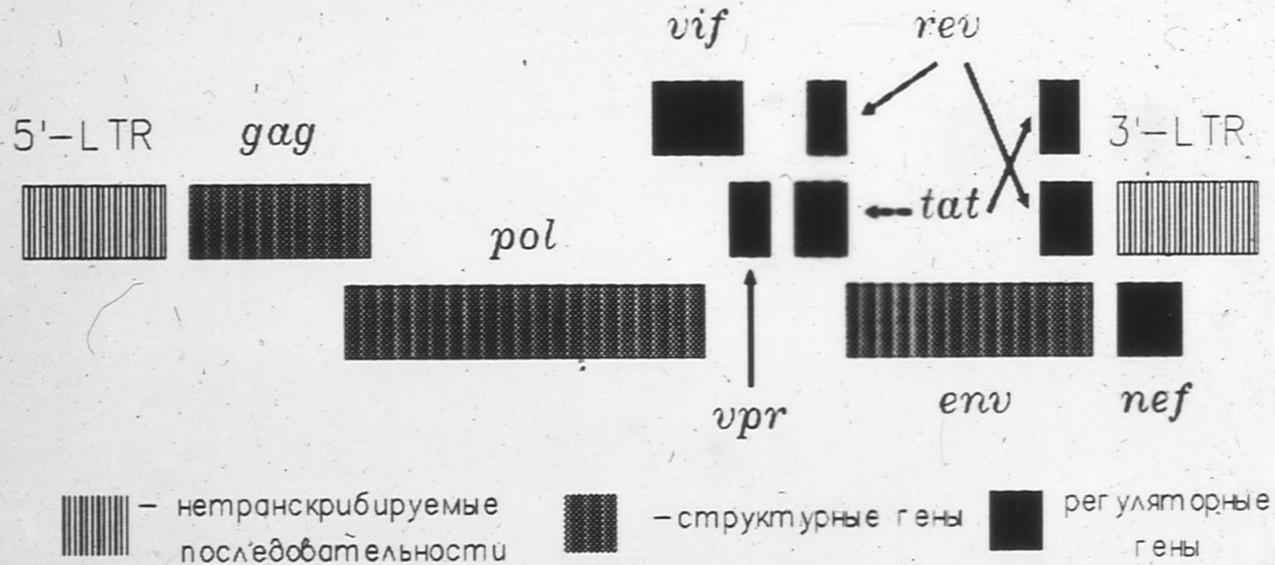
## 2. Трансген – хромосомный маркер.

Ген трансферрина кур в инактивированной X-хромосоме работает.

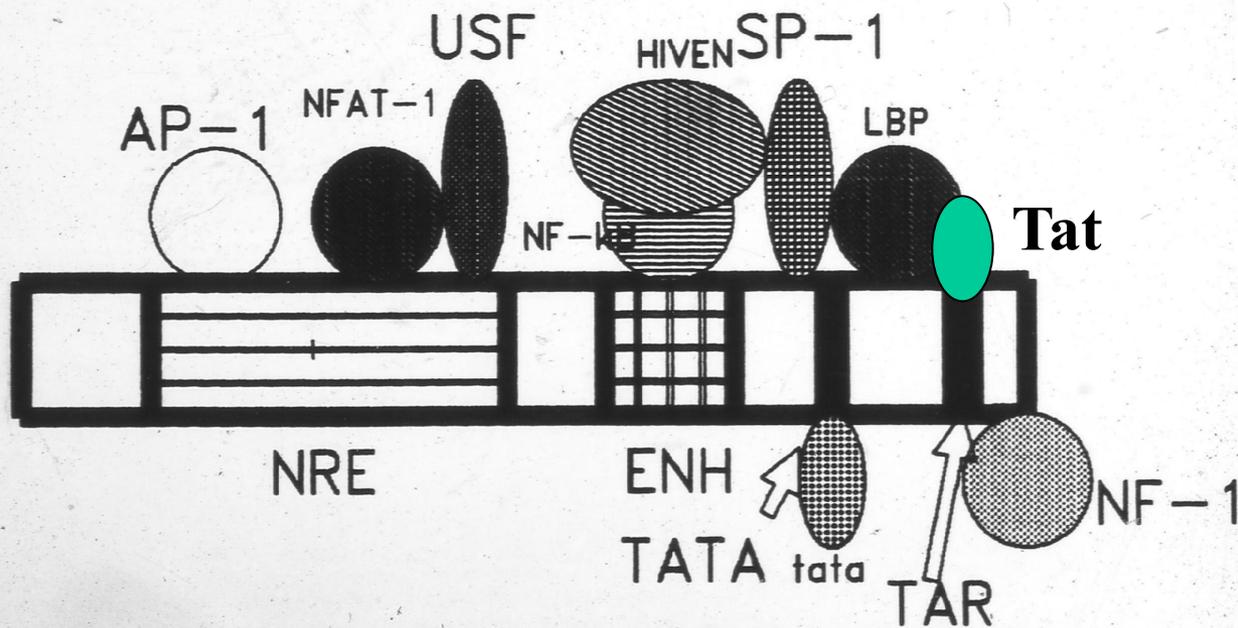
## 3. Исследование вирусного патогенеза – функциональная анатомия.

Трансгенные мыши с генами tat и nef ВИЧ.

# Структура генома ВИЧ-1



# Взаимодействие регуляторных белков с LTR ВИЧ-1

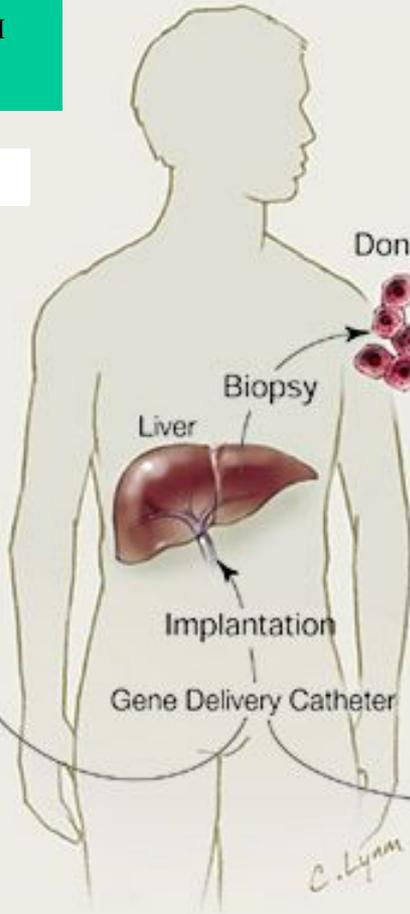
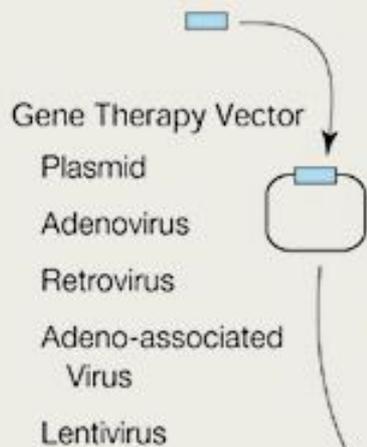


# ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

# Генная терапия

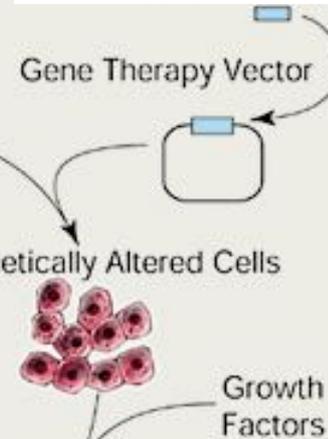
## Генная терапия in vivo

Терапевтический ген



## Генная терапия ex vivo

Терапевтический ген



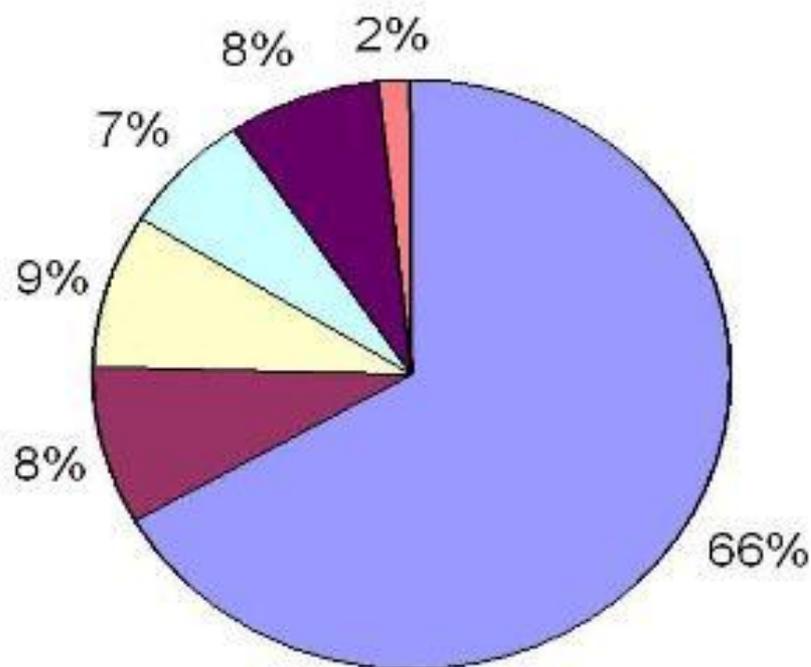
Размножение клеток in vitro

*C. Lynn*

# Что надо для успеха?

- **Выбор потенциально терапевтического гена (моногенные заболевания, вирусные и бактериальные инфекции)**
- **Выбор вектора (адено-ассоциированные вирусы, аденовирусы, ретровирусы, включая лентивирусы)**
- **Разработка средств доставки гена (нетравматические, адресные, предотвращение попадания в системный кровоток)**

# Клинические испытания по генной терапии (2010 г.)



- Онкологические заболевания
- Моногенные заболевания
- Сосудистые заболевания
- Инфекционные заболевания
- Другие заболевания
- Исследования на здоровых людях

# Генная терапия некоторых заболеваний человека

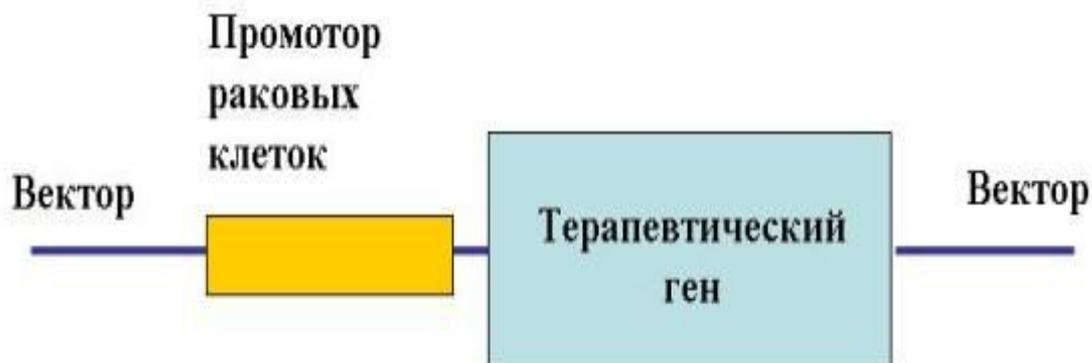
<b>Заболевание</b>	<b>Вектор</b>	<b>Ген</b>
<b>Болезнь Паркинсона</b>	<b>RV</b>	<b>декарбоксилаза глутаминовой кислоты</b>
<b>Гемофилия</b>	<b>AAV</b>	<b>фактор IX</b>
<b>Грануломатоз</b>	<b>RV</b>	<b>GP91</b>
<b>Острый иммунодефицит</b>	<b>RV</b>	<b>рецептор интерлейкина 2</b>
<b>Дефицит орнитинтранскарбамилазы</b>	<b>Ad</b>	<b>cDNA OTC</b>
<b>Врождённый амавроз Лебера</b>	<b>RV</b>	<b>RPE65</b>
<b>Ишемия нижних конечностей</b>	<b>Ad</b>	<b>ангиогенин, VEGF</b>

# Типы генов, используемых при генной терапии



- Antigen 20.3% (n=266)
- Cytokine 18.9% (n=247)
- Tumor suppressor 12% (n=157)
- Growth factor 8.2% (n=107)
- Suicide 8.2% (n=107)
- Deficiency 7.9% (n=103)
- Receptor 5.1% (n=67)
- Marker 4.1% (n=54)
- Replication inhibitor 3.7% (n=48)
- Other categories 8.6% (n=115)
- Unknown 2.9% (n=38)

## Три компонента генно-терапевтической системы

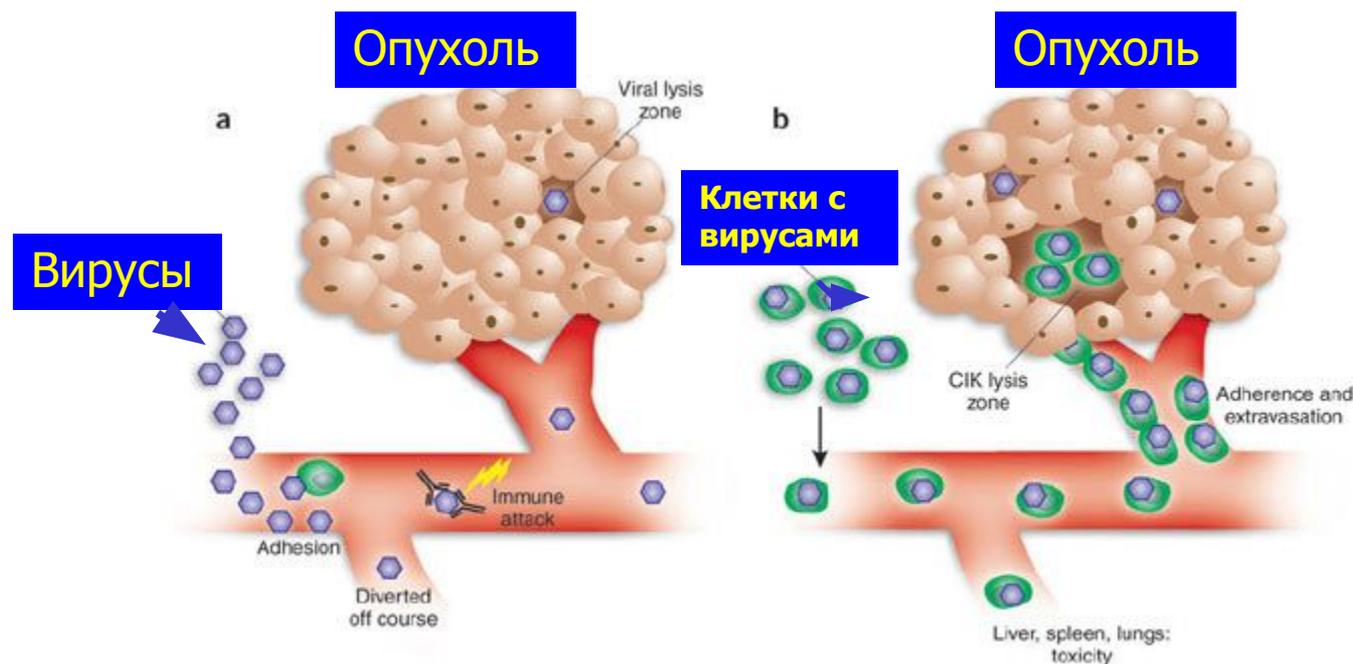


Вектор, способный осуществлять доставку и экспрессию терапевтического гена в максимально возможное число разнообразных опухолей (векторная часть представлена синим).

Транскрипционный промотор, способный селективно экспрессировать терапевтические гены только в опухолевых, но не в нормальных клетках (представлен оранжевым).

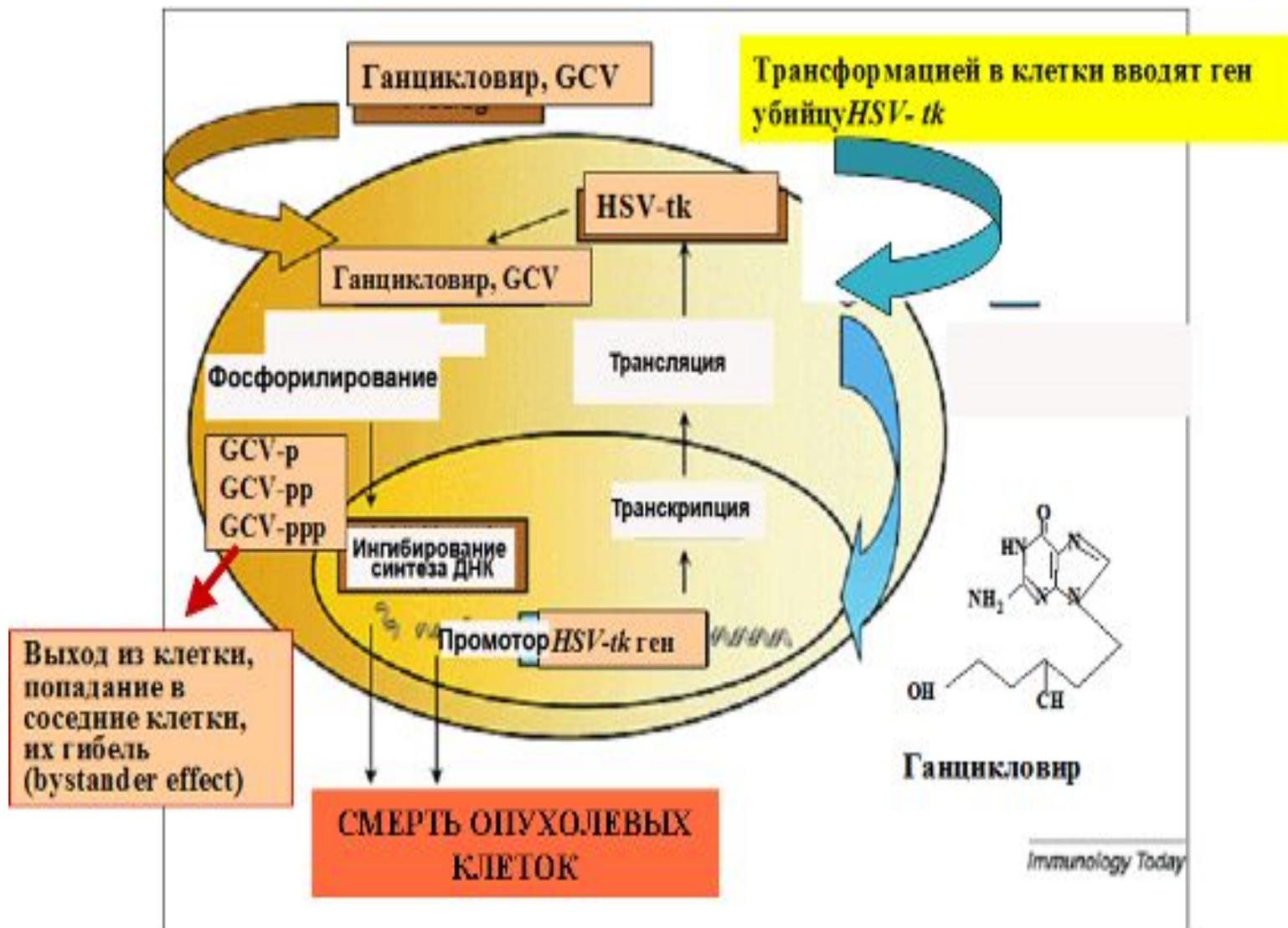
Терапевтический ген, способный поставлять необходимый продукт в раковую опухоль или наоборот подавлять экспрессию нежелательного продукта в раковой опухоли (представлен голубым).

# Генная терапия опухолей с использованием клеток иммунной системы, нагруженных рекомбинантными онколитическими вирусами



Вирус болезни Ньюкасла, рекомбинантные аденовирусы, реовирусы, вирус простого герпеса

# Принцип использования для терапии рака гена-убийцы (фермент тимидинкиназа вируса простого герпеса, HSV-tk)

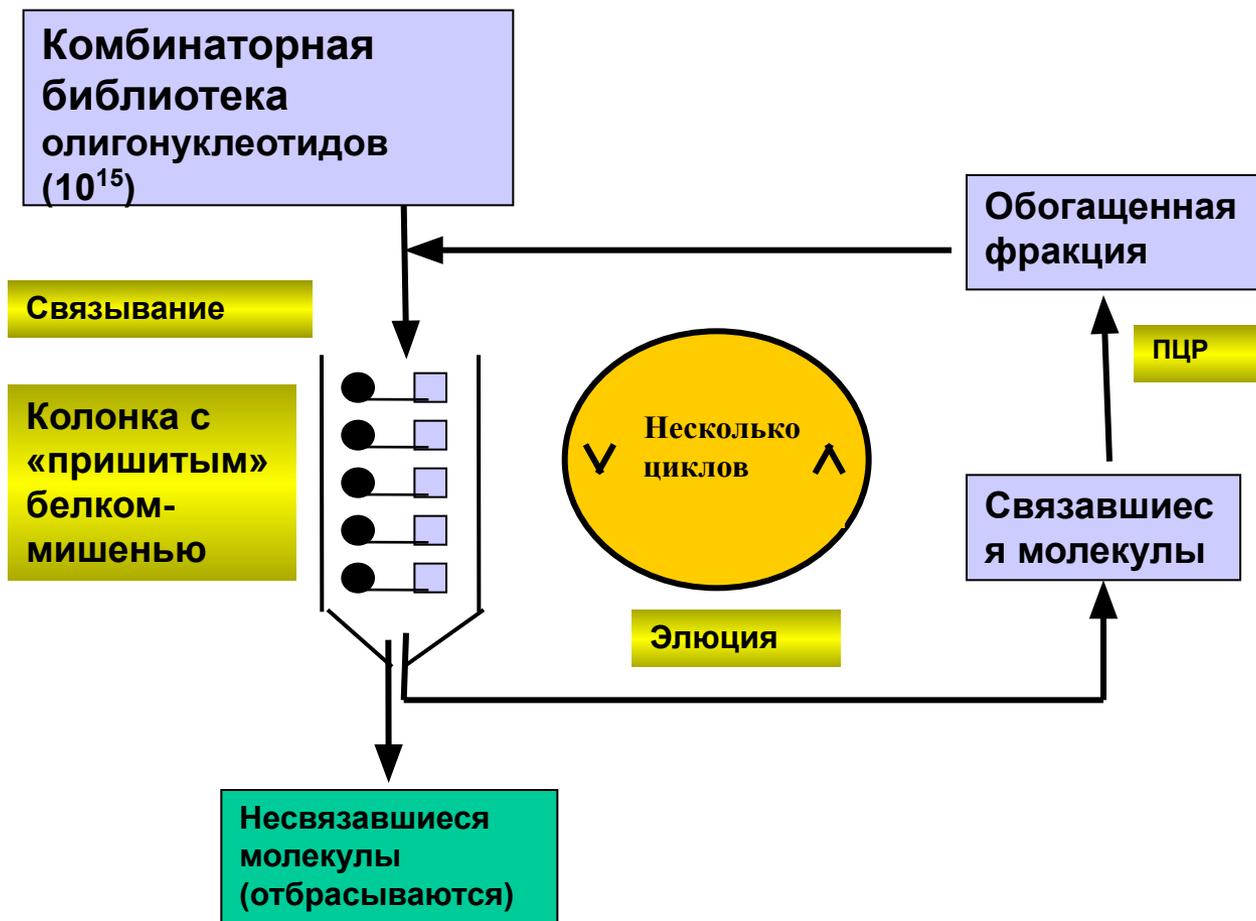


**Направленное подавление работы  
гена в клетках достигается с  
помощью:**

---

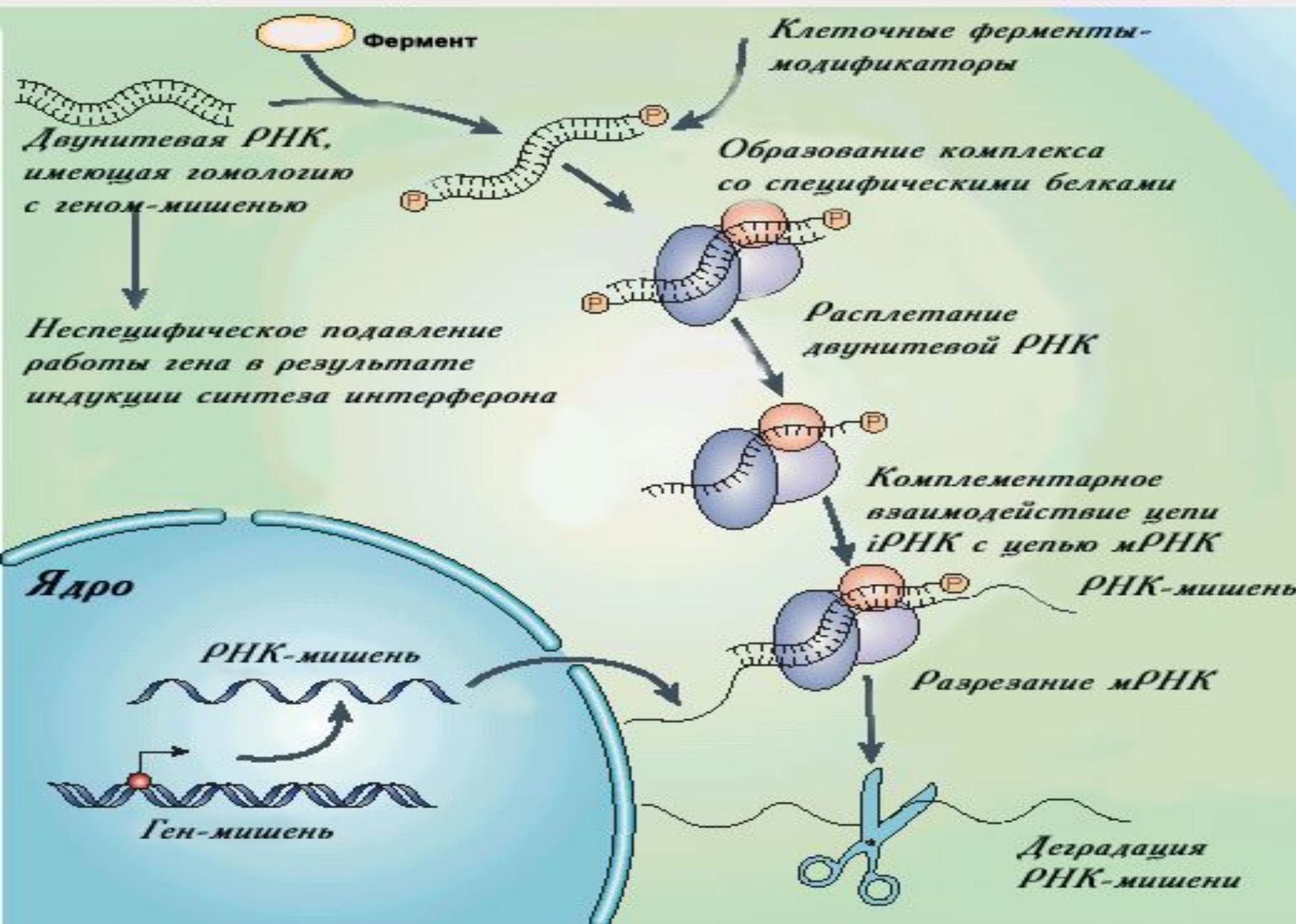
- 1) Антисмысловых РНК**
- 2) Рибозимов**
- 3) РНК- и ДНК-аптамеров**
- 4) Белковых аптамеров**
- 5) РНК-интерференции**
- 6) Нокаута гена**

# Схема получения ДНК-аптамеров



**SELEX (англ. *s*ystematic evolution of *l*igands by *e*xponential enrichment – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении)**

# Схема подавления работы гена с помощью РНК-интерференции



# **Основные механизмы РНК-интерференции**

- 1. Разрезание мРНК**
- 2. Блокировка трансляции мРНК**
- 3. Подавление транскрипции за счет изменения структуры хроматина**



**белки семейства Аргонавт**

# **Первые успехи генной терапии**

**1990 г. – ген аденозиндезаминазы в аденовирусе (наследственный иммунодефицит) (Андерсон, США).**

**2003 г. – в Китае впервые разрешили применение препарата генной терапии (гендицин) для лечения эпидермоидного рака ( Гендицин - аденовирус содержащий ген p53 ).**

**2012 г. - Европейское медицинское агентство (ЕМА) впервые разрешило регистрацию на территории Евросоюза препарата, предназначенного для генной терапии моногенного заболевания - дефицита липопротеинлипазы (AAV и ген липопротеинлипазы).**

# Перспективы генно-клеточной терапии

- **Стволовые нейрональные клетки, экспрессирующие VEGF, - при инсульте**
- **Эмбриональные стволовые клетки, экспрессирующие VEGF и L1CAM, – при боковом амиотрофическом склерозе**
- **Мезенхимные стволовые клетки, экспрессирующие сурвивин, - при инсульте**
- **Гематопозитические стволовые клетки, экспрессирующие аденозиндеаминазу, - при остром комбинированном иммунодефиците.**
- **Редактирование ДНК с помощью CRISPR/Cas**

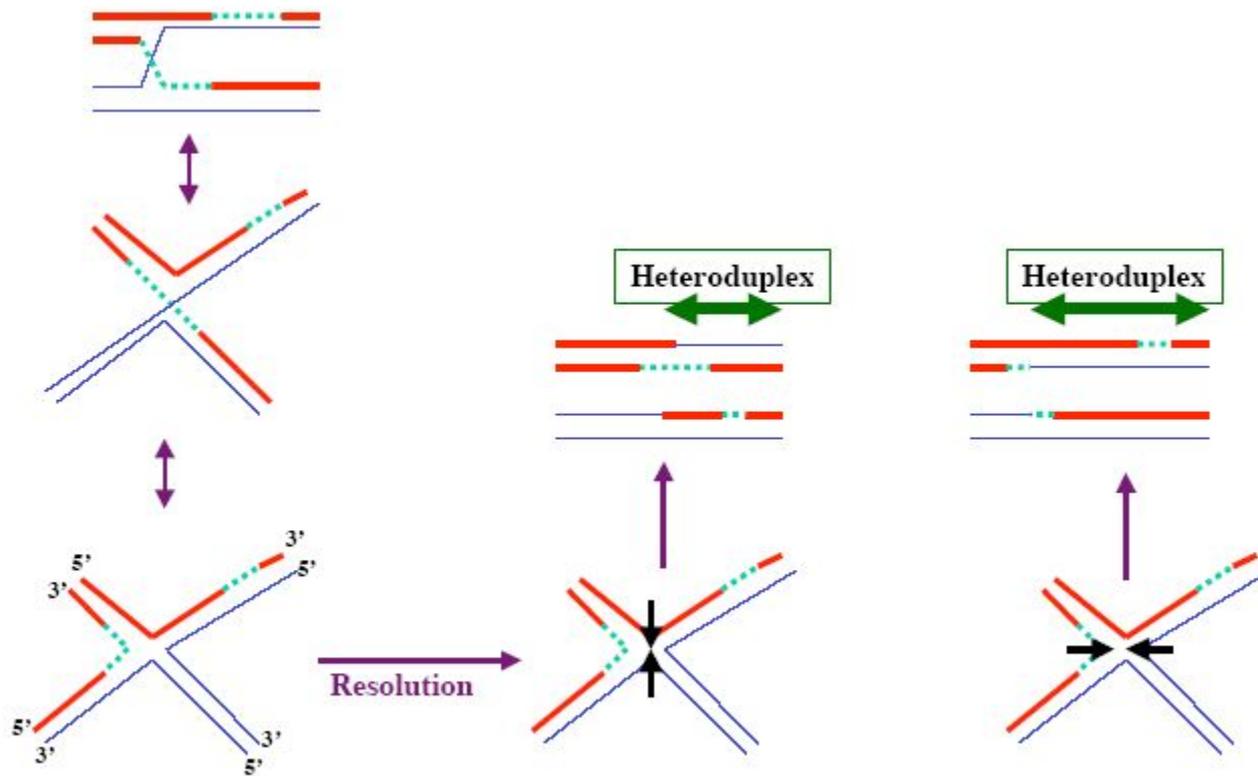
# Таргетинг генов

# 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: двойной разрыв в гомологичных хромосомах

319



# **Хронологическая справка об использовании механизма гомологичной рекомбинации**

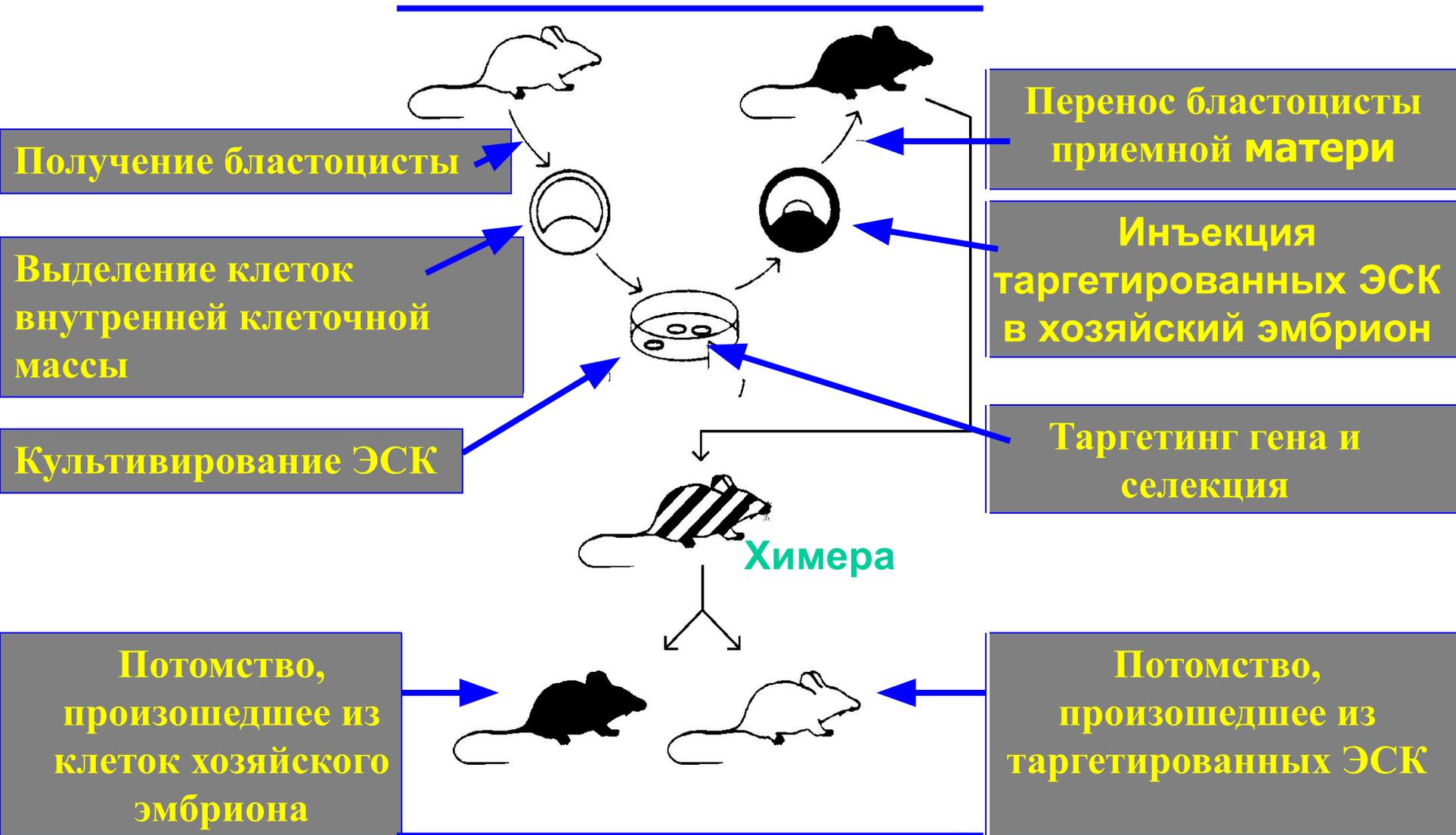
**Б. Бринстер – 1987 г. (500 животных)**

**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»).**

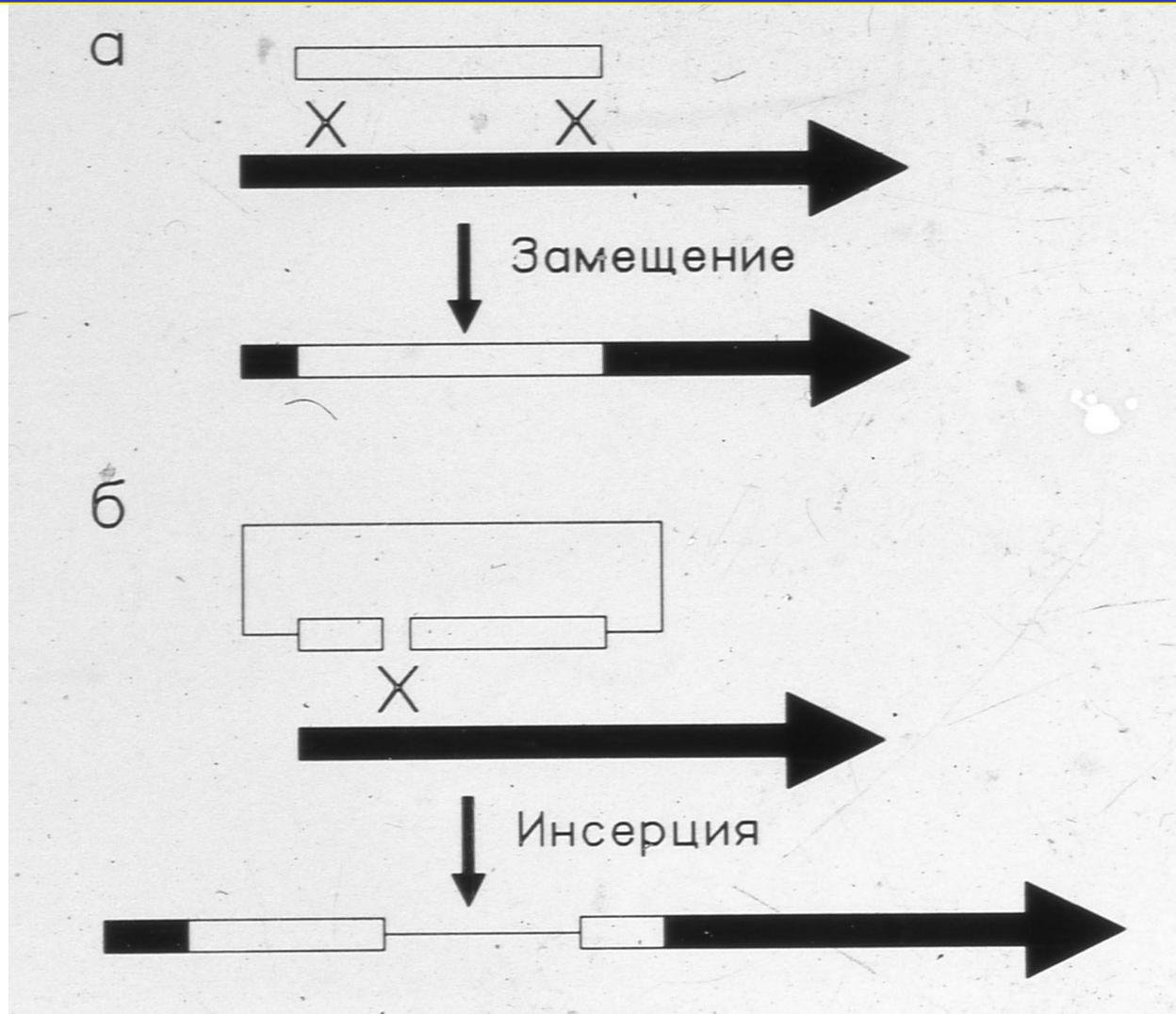
**2007 г. - Международный консорциум по нокаутным мышам (в 2015 - 10 500 генов из 21 000).**

**2016 г. – 70 000 публикаций в PubMed**

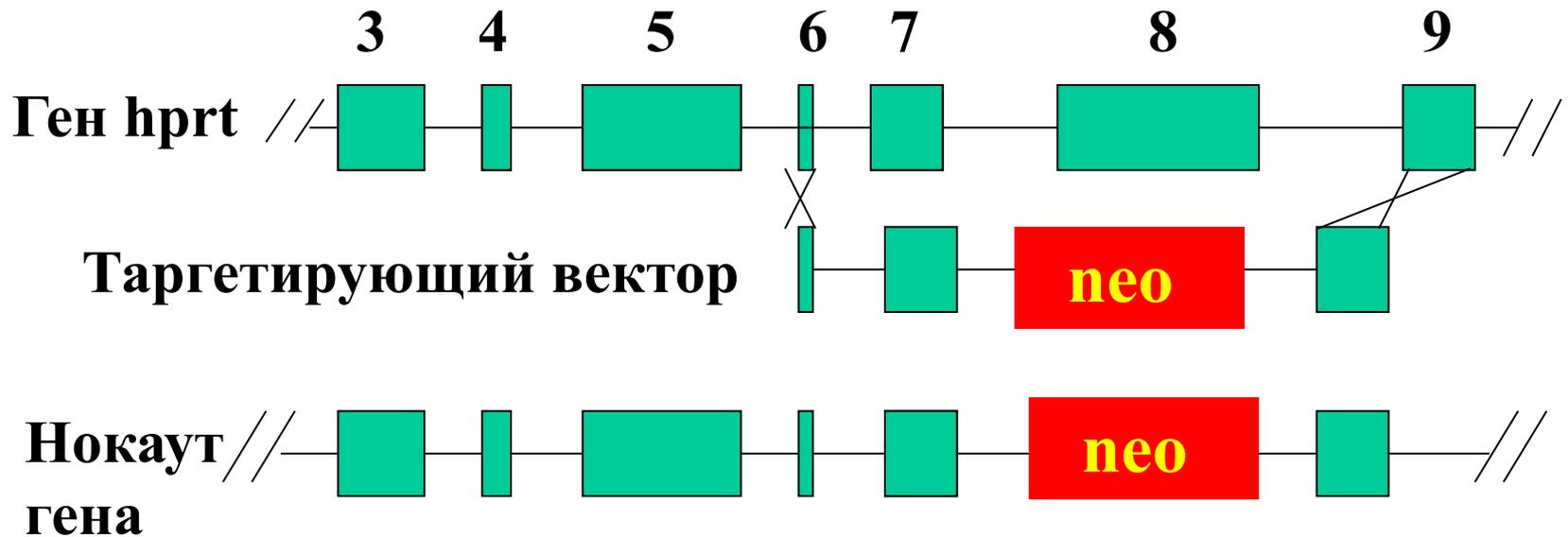
# Схема получения трансгенных мышей с таргетированным геном



# Два типа векторов используемых для гомологичной рекомбинации



# Нокаут селективируемого гена гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (hprt)

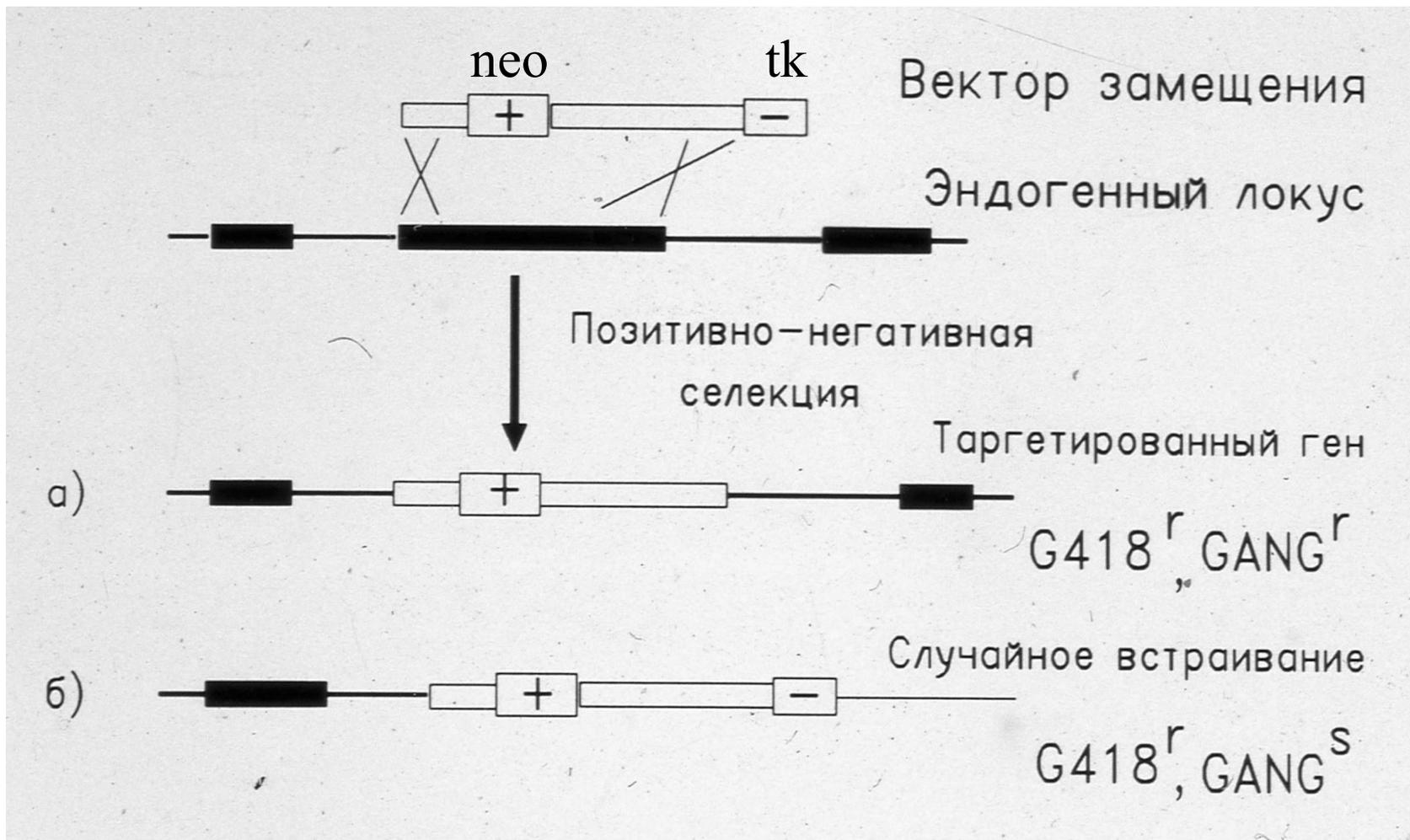


**Селекция:**

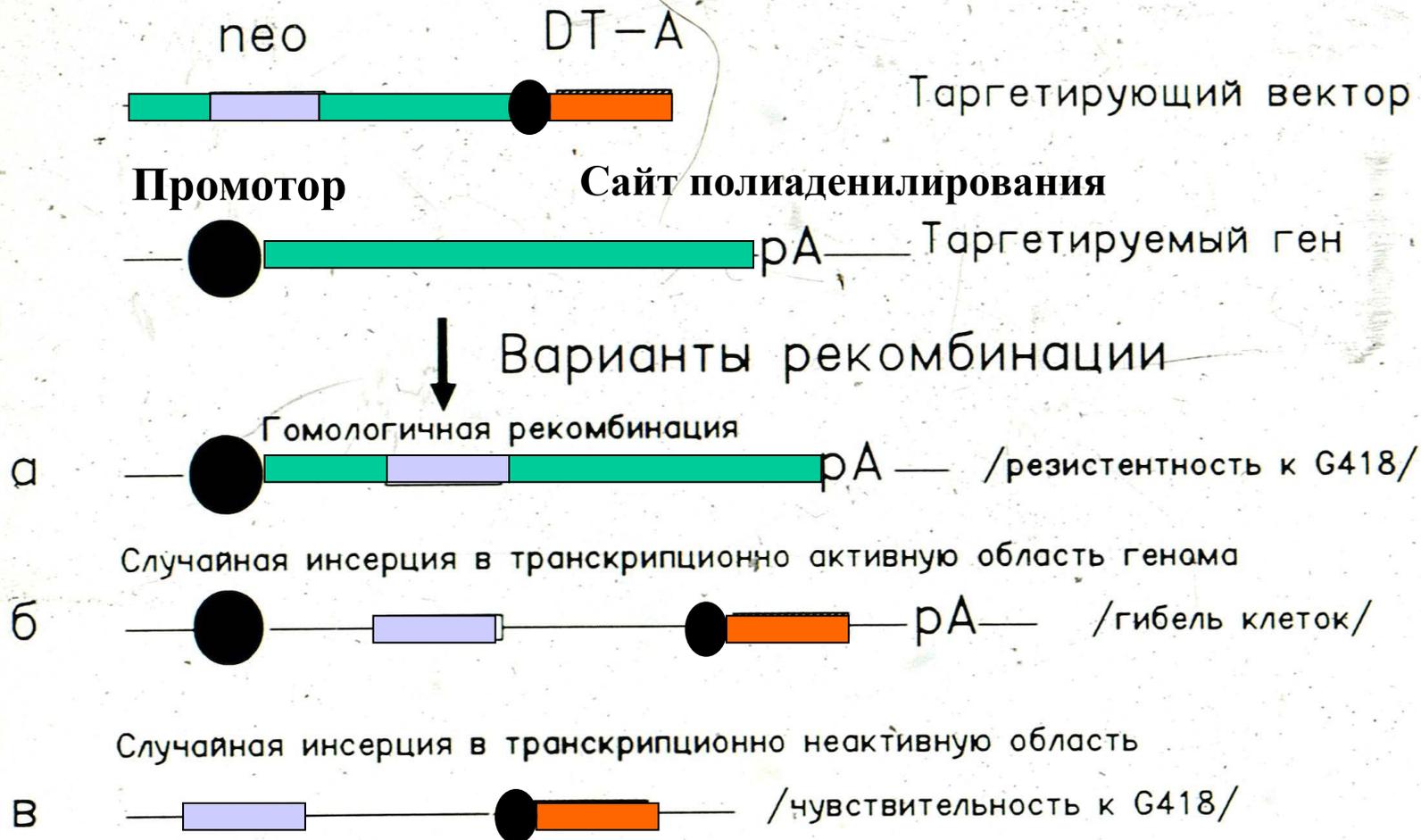
$Hprt^-$  - резистентность к 6-тиогуанину,

$Neo^+$  - резистентность к G418

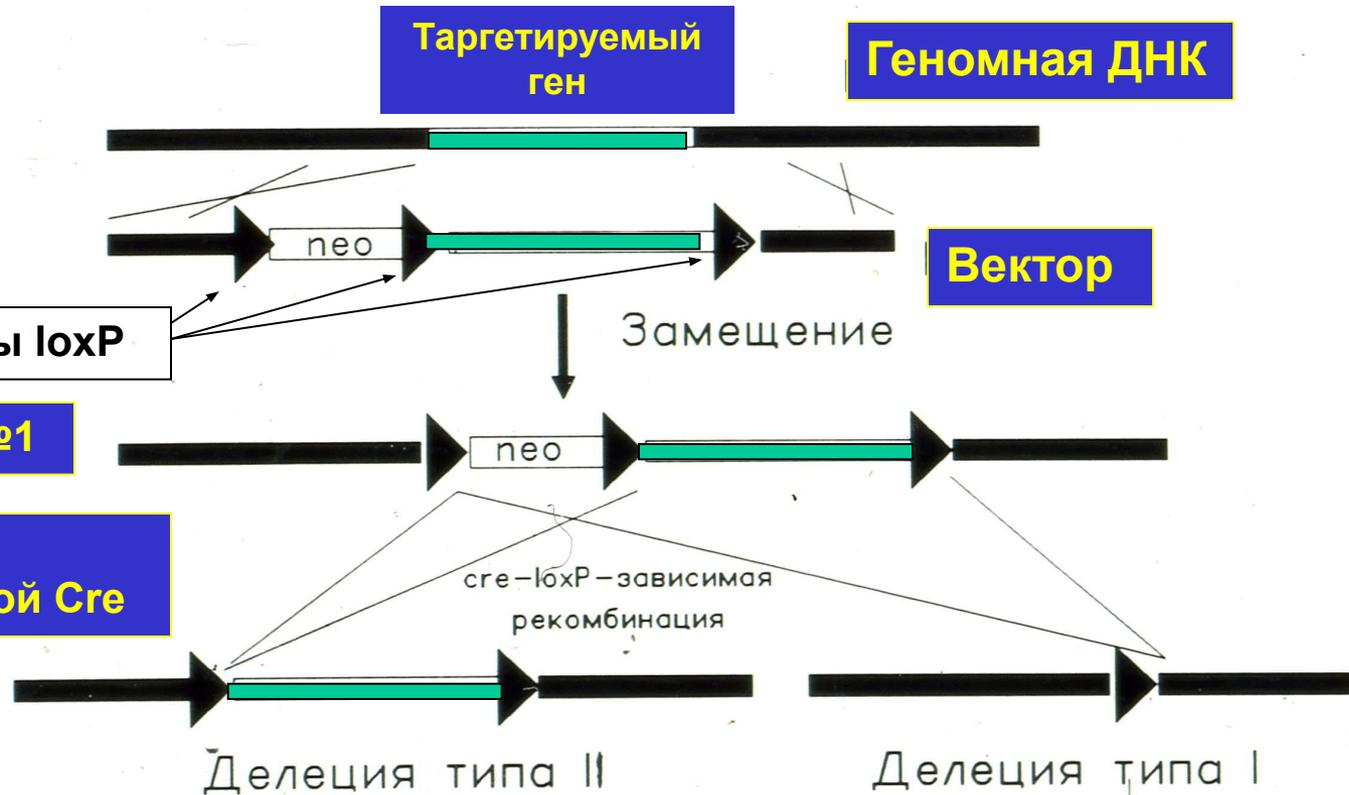
# Позитивно-негативная селекция таргетированного неселектируемого гена



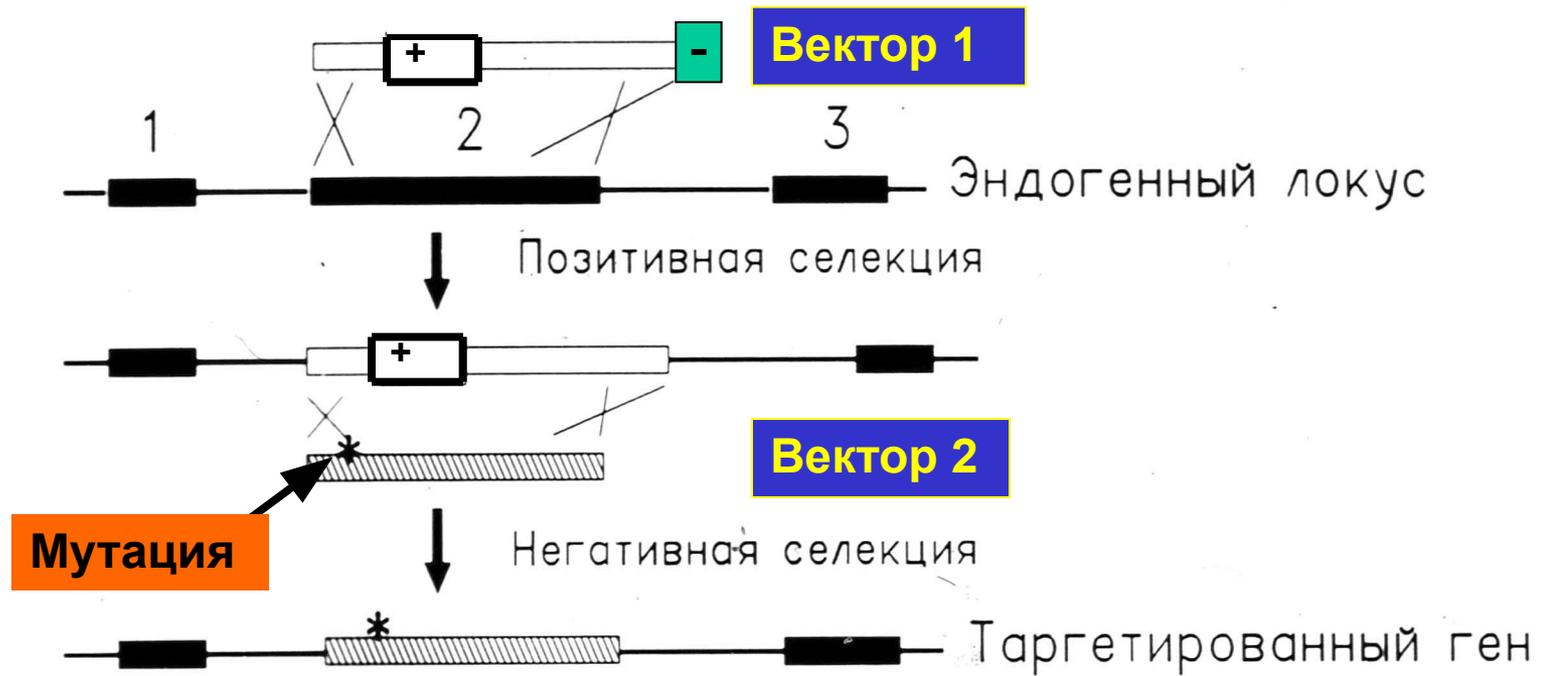
# Генный нокаут с использованием для негативной селекции гена дефтерийного токсина



# 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 <sup>lck</sup>	Участие в развитии тимоцитов.

## Выявление генов, препятствующих развитию лимфомогенеза, с помощью генного нокаута

Knockout gene	Function of protein	Type of lymphoma	References
<b>p53</b>	Transcriptional factor	B- and T cell	Ward et al., 1999
<b>E2A</b>	Transcriptional factor	T cell	Yan et al., 1997
<b>N-ras</b>	Small GTPase	T cell	Diaz et al., 2002
<b>RARalpha</b>	Retinoic acid receptor	B- and T cell	Haidar et al., 2000
<b>pms2</b>	DNA mismatch repair	T cell	Qin et al., 1999
<b>snf5</b>	Transcriptional factor	T cell	Roberts et al., 2002
<b>PTEN</b>	Lipid phosphatase	T cell	Suzuki et., 2001
<b>atm</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase	T cell	Xu et al., 1996
<b>msh2</b>	Mismatch repair protein	T cell	Zhang et al., 2002
<b>msh6</b>	Mismatch repair protein	T cell	de Wind et al., 1999
<b>53BR1p53 binding protein</b>		T cell	Ward et al., 2003
<b>IFN-gamma</b>	Interferon gamma, cytokine	Disseminated	Street et al., 2002
<b>NBS1</b>	Involved in the Nijmegen breakage syndrome, DSB repair	T cell	Kang et al., 2002
<b>ku70</b>	DNA-dependent protein kinase	T cell	Gu et al., 1997
<b>ku80</b>	DNA-dependent protein kinase	T cell	Lim et al., 2000
<b>bad</b>	Proapoptotic proteins	DLBCL	Ranger et al., 2003
<b>SLP-65</b>	Adaptor protein	pre-B cell	Flemming et al., 2003
<b>p18(INK4c)</b>	Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4c	T cell	Kovalev et al., 2001
<b>p19(INK4a)</b>	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	Остановка развитие энтодермы
GATA-3 гематоза в фетальной печени	Гибель на 11-12 день гестации от блока
SCL	Гибель на 9.5 день из-за блока желточного кроветворения
Flt мешка	Блокирование развития желточного
FGF-4	Остановка в развитии и гибель сразу после имплантации из-за блока
развития клеток трофэктодермы	

# 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.

# 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?**

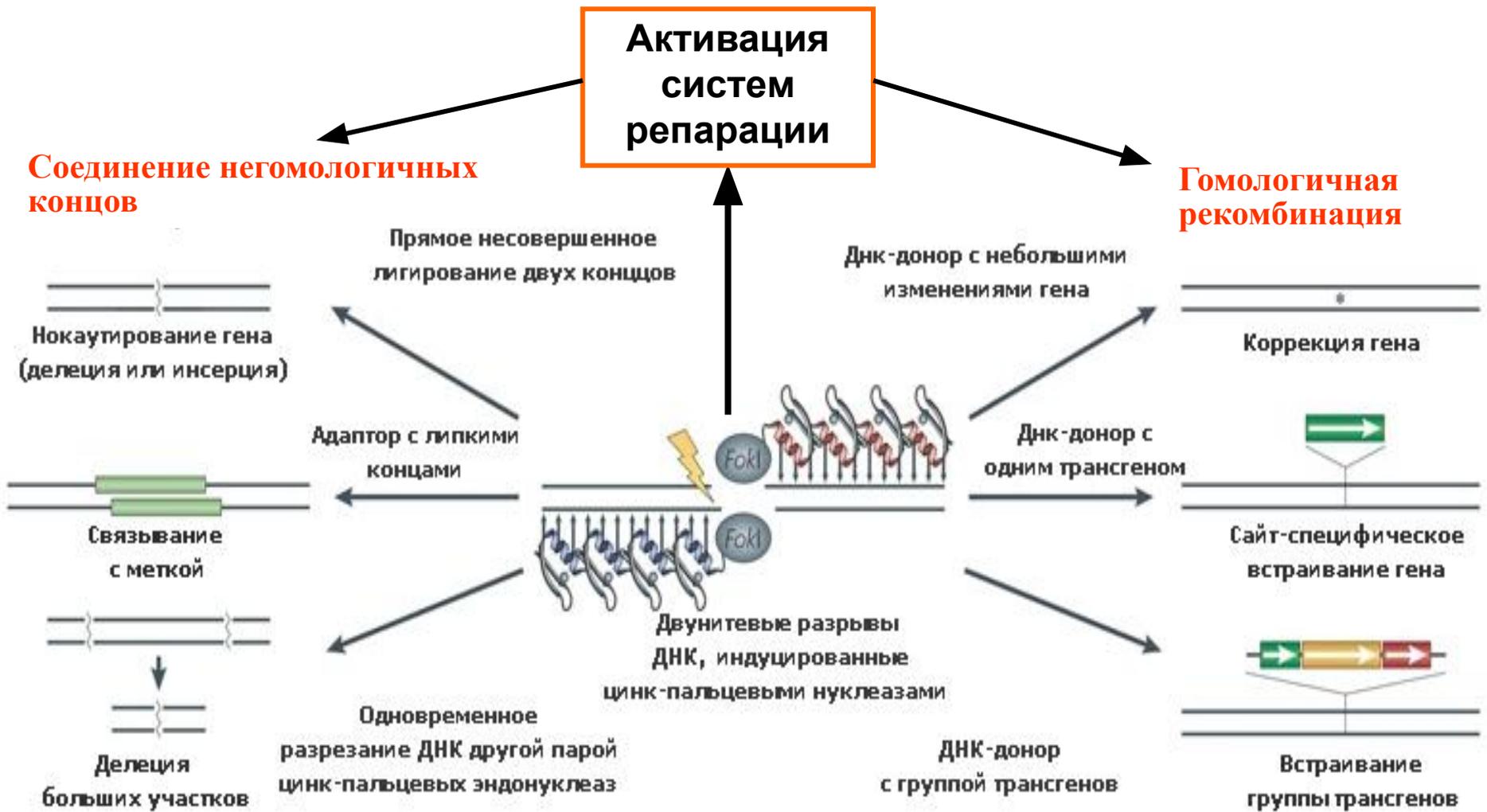
Нокаутные мыши не могли размножаться, поскольку их сперматозоиды были деформированными и не могли двигаться.

**Новая функция у известных белков.**

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

- 2009 г. – белки с «цинковыми пальцами»
- 2011 г. – бактериальные белки TALEN
- 2012 г. – CRISPR/Cas

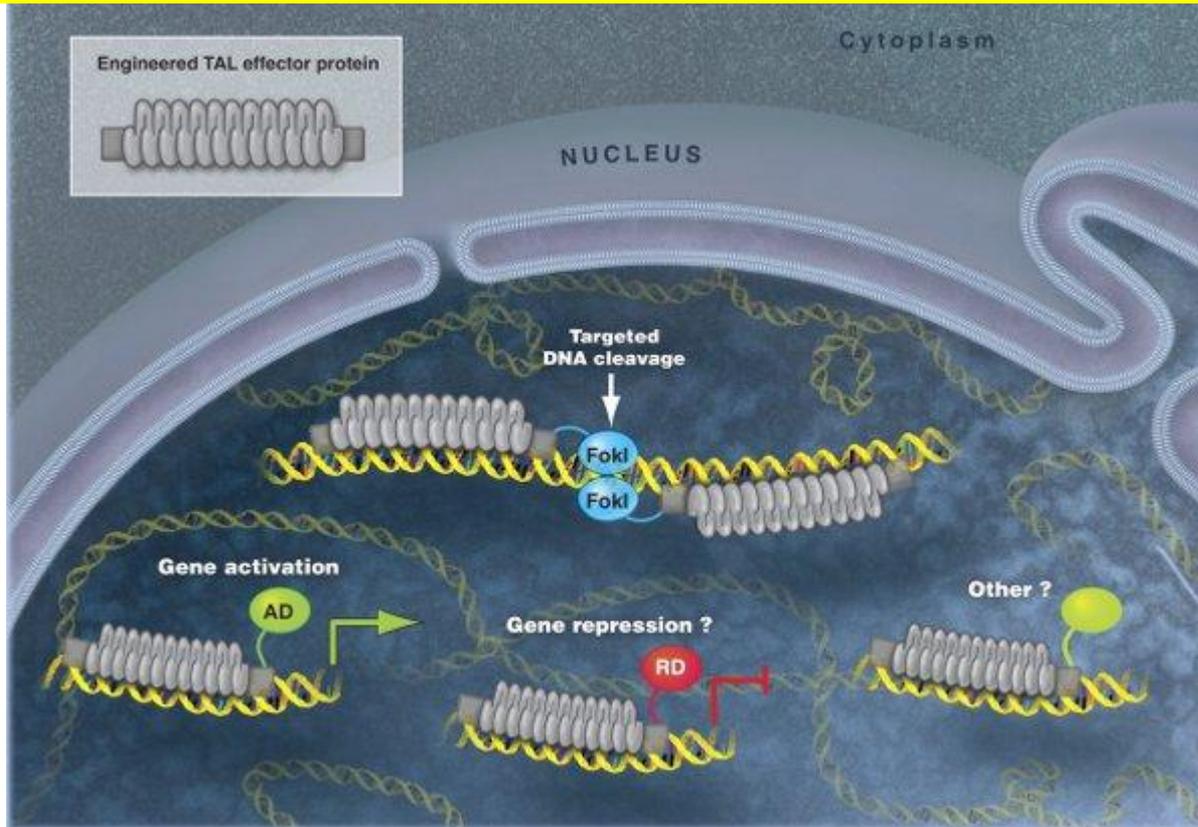
# Редактирование генома на основе «цинковых пальцев»



# Редактирование генома на основе TALENs

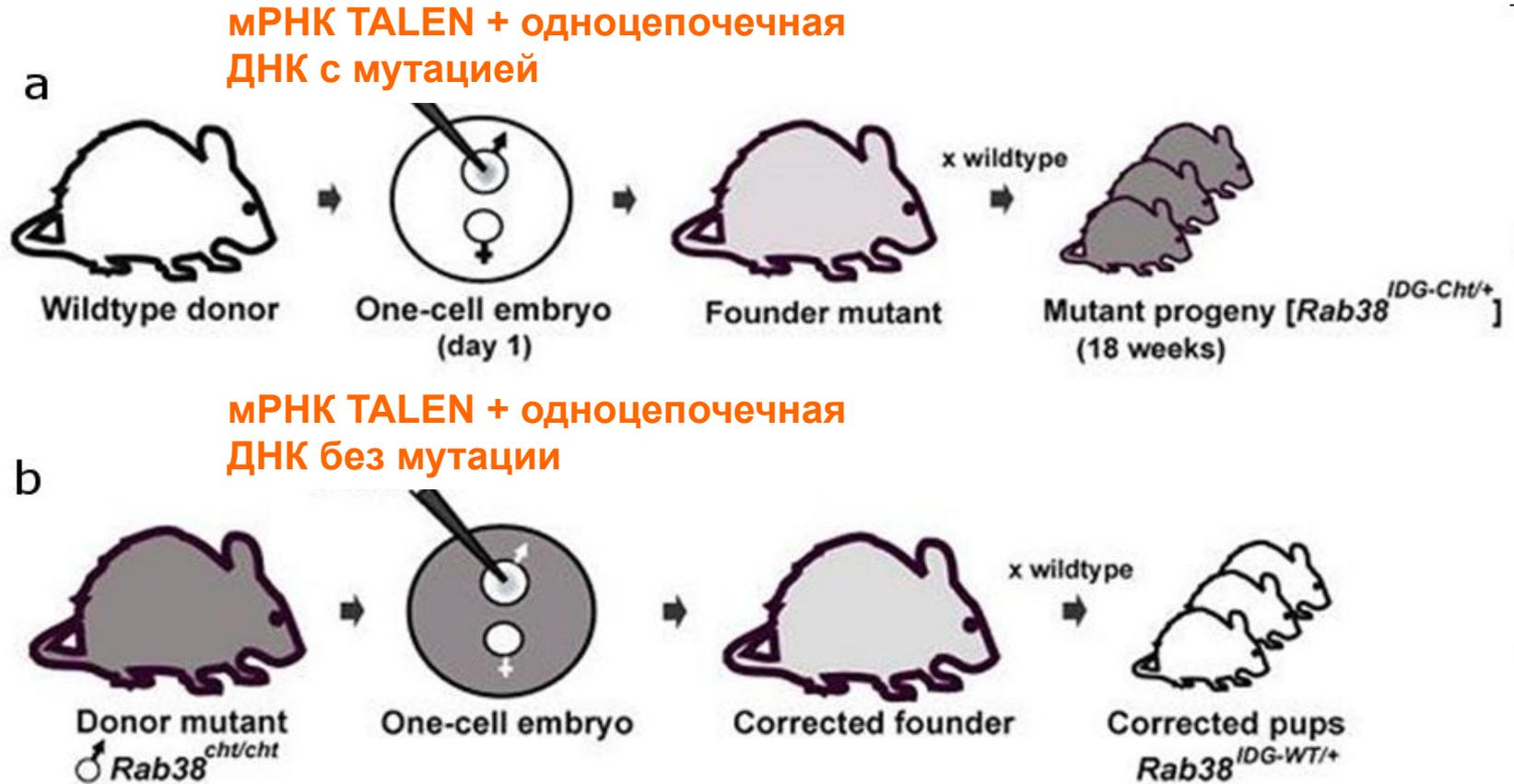
(Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) – белки из бактерий рода *Xanthomonas*, соединенные с нуклеазой FokI).

## 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

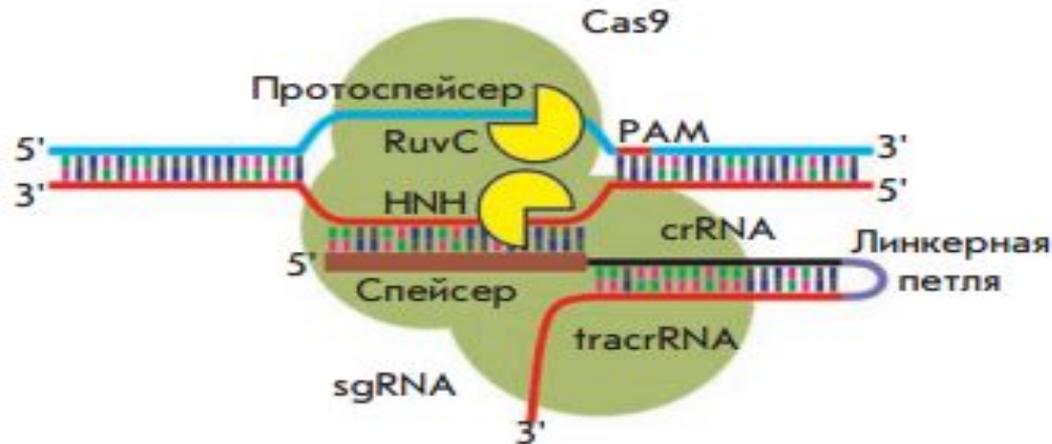
расположенные группами —

особые локусы бактерий и архей —

короткие палиндромные повторы, регулярно

расположенные группами —

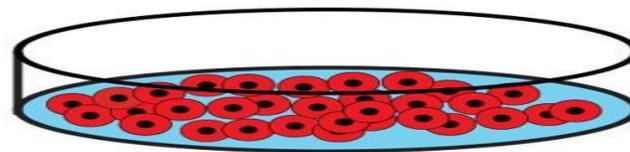
## CRISPR/Cas9 для редактирования генома



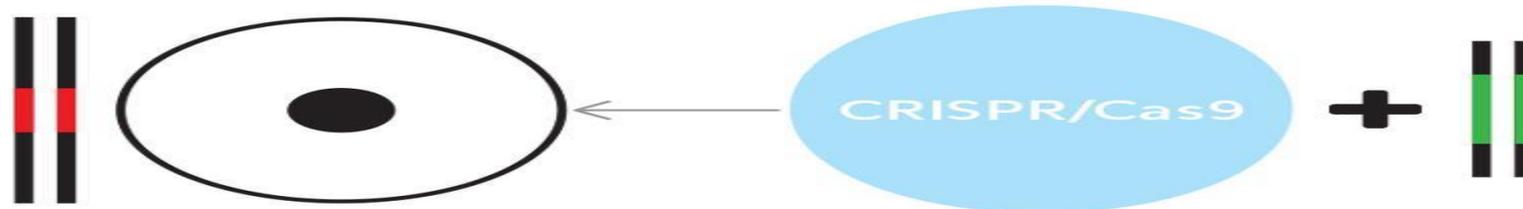
**Рис. 5.** Единая химерная sgRNA для внесения двухцепочечных разрывов в целевых локусах. Комплекс sgRNA и Cas9 способен вносить двухцепочечные разрывы в выбранных сайтах ДНК. SgRNA – искусственно созданная конструкция, представляющая собой объединенные в одну молекулу РНК элементы системы CRISPR/Cas9: 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

# Редактирование гена бета-талассемии в эмбрионе человека

- 1 Оплодотворённые яйцеклетки с дефектным геном гемоглобина культивируют вне организма.



- 2 В клетки вносят систему CRISPR/Cas9 и образец ДНК с исправленным фрагментом гена гемоглобина.



- 3 CRISPR/Cas9 разрезает дефектный ген гемоглобина в хромосоме яйцеклетки.



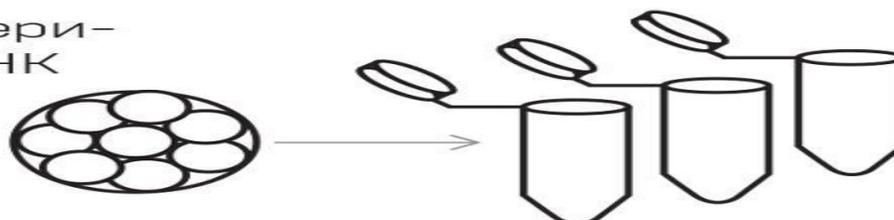
- 4 Система репарации ДНК клетки восстанавливает ген по образцу.



- 5 Яйцеклетка делится, развиваясь до эмбриона из 8 клеток.



- 6 Через 48 часов эксперимент прекращают, ДНК эмбрионов анализируют.



**Впервые в мире технологию CRISPR/Cas9 для модификации эмбрионов человека применили исследователи из Китая в 2015 г.**

**Использовали 86 оплодотворенных яйцеклеток, из которых 71 выжила после процедуры. 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.**

# 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

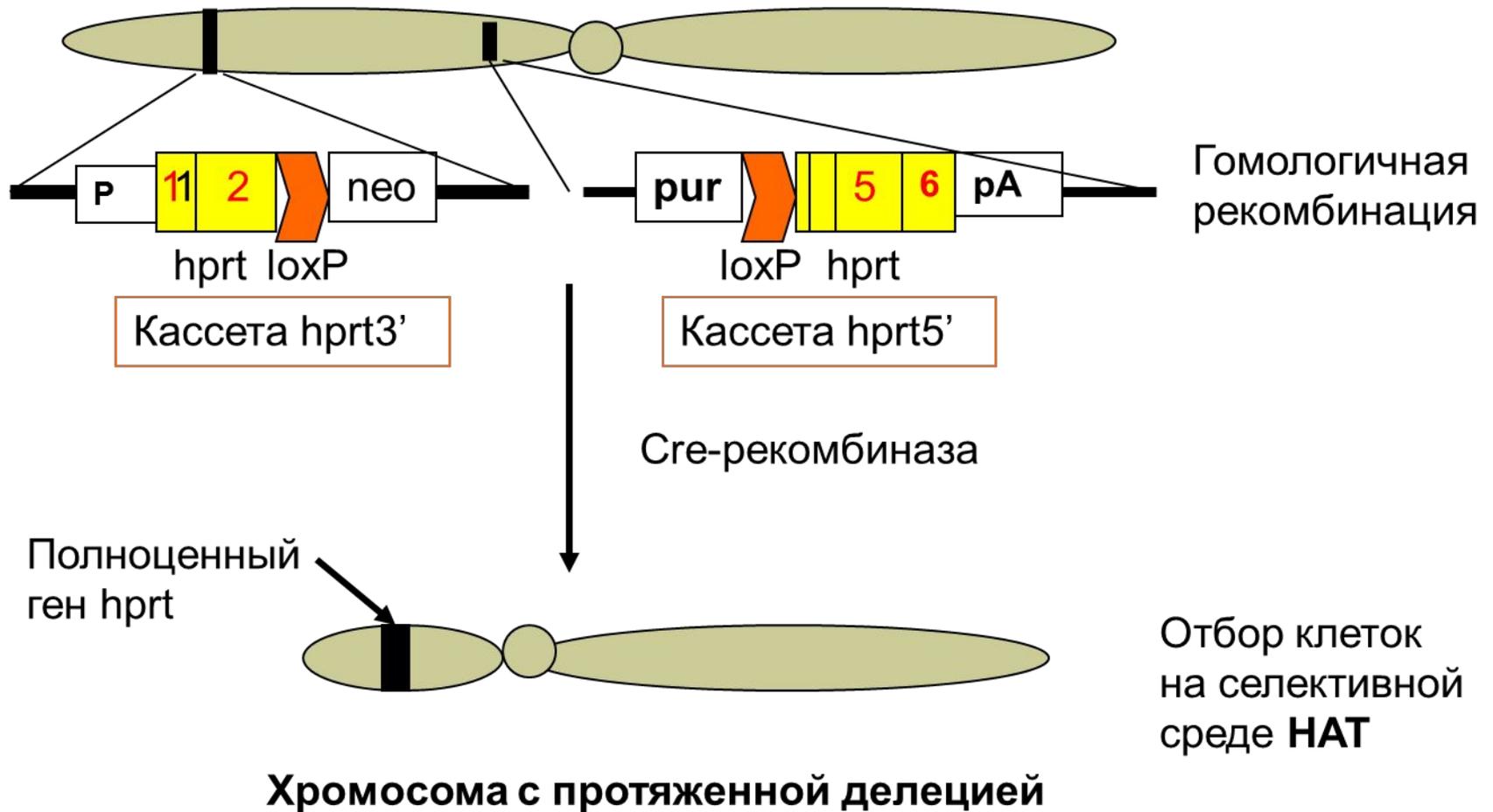
1) Самосборка *in vitro* (в трансфицированных клетках) из цис-функциональных последовательностей:

- 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

# Хромосомная инженерия



# Миниклетки – технология получения трансхромосомных животных

