

На правах рукописи

Немудрый Артем Александрович

**ИСПРАВЛЕНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ
АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА КРЫС ЛИНИИ
BRATTLEBORO *IN VITRO***

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) в лаборатории эпигенетики развития, г. Новосибирск.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией эпигенетики развития
ИЦиГ СО РАН
Закиян Сурен Минасович

Официальные оппоненты: **Лагарькова Мария Андреевна**
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией клеточной биологии
ФГБУ «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического
агентства», г. Москва
Белякин Степан Николаевич
кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией геномики
ФГБУН Институт молекулярной и клеточной
биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ведущее учреждение: ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090
тел/факс: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Наследственные заболевания, вызванные разного рода мутациями (точковые мутации в генах, хромосомные перестройки и т.д.), в настоящее время неизлечимы, поскольку их терапия сводится к устранению симптомов, не влияя на первопричину болезни (мутацию). В настоящее время, благодаря появлению системы CRISPR/Cas, стало возможным эффективное внесение модификаций в геном плюрипотентных стволовых клеток (Cong et al., 2013, Mali et al., 2013). Одна из современных концепций лечения наследственных заболеваний предполагает следующий подход: 1) получение соматических клеток пациента, 2) репрограммирование их к плюрипотентному состоянию, 3) исправление мутации, вызывающей заболевание, с помощью современных методов редактирования геномов, 4) трансплантация клеток с исправленным геномом обратно в организм пациента (Cox et al., 2015). Данная концепция предполагает использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) – стволовых клеток, которые могут быть получены практически из любых клеток пациента (клетки крови, клетки жировой ткани, фибробласты кожи) в результате репрограммирования (Okita et al., 2013, Takahashi et al., 2007). При дифференцировке из этого типа клеток возможно направленно получить любые типы клеток, из которых состоит взрослый организм. После трансплантации клетки с исправленной мутацией замещают поврежденные в результате патогенеза наследственного заболевания клетки и, соответственно, восполняют утраченные функции (Hanna et al., 2007).

Закономерным этапом перед внедрением подобных технологий является их доскональное изучение на модельных системах. Ряд вопросов, касающихся безопасности такого подхода, вопросов технического характера в настоящее время являются открытым. Именно это обуславливает потребность в адекватных модельных системах и проведении научных исследований с их использованием. В данной работе в качестве модельной системы для разработки терапии наследственных заболеваний с помощью редактирования геномов используются лабораторные крысы линии Brattleboro, гомозиготные носители мутантного аллеля *di* гена аргинин-вазопрессина. У гомозиготных носителей мутация вызывает наследственную форму несахарного гипоталамического диабета. Данная работа направлена на исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс Brattleboro *in vitro* с помощью новейших технологий редактирования генома.

Цель работы – создать систему для гомологичной рекомбинации в локусе гена аргинин-вазопрессина и получить клетки крыс линии Brattleboro с исправленной мутацией в гене аргинин-вазопрессина.

Задачи:

1. Создать набор генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9, для внесения двунитевых разрывов в различные участки локуса гена аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro.
2. Провести качественный анализ активности системы CRISPR/Cas9 в целевых сайтах гена аргинин-вазопрессина эмбриональных фибробластов крыс Brattleboro.

3. Провести анализ нецелевых эффектов в паралогичном гене окситоцина и определить с помощью биоинформатических методов потенциальные сайты нецелевого действия CRISPR/Cas9 в геноме.

4. Определить эффективность направленного внесения двунитевых разрывов в выбранном сайте гена аргинин-вазопрессина и спектр модификаций, возникающих при репарации данных разрывов, в эмбриональных фибробластах крыс линии Brattleboro.

5. С помощью гомологичной рекомбинации произвести исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина эмбриональных фибробластов крыс линии Brattleboro.

Научная новизна работы. В данной научно-исследовательской работе впервые предлагается использовать крыс лабораторной линии Brattleboro для изучения возможности терапии наследственных заболеваний с помощью редактирования геномов *ex vivo*. Впервые были получены эмбриональные фибробласты крыс линии Brattleboro с исправленной мутацией в гене аргинин-вазопрессина. Предложенная в данной работе линия крыс Brattleboro является адекватной моделью моногенного наследственного заболевания аутосомно-рецессивного типа. Моногенная природа заболевания в данном случае упрощает применение методов редактирования геномов для исправления мутации и позволяет на более «простом» объекте проводить исследования перед переходом к более сложным случаям при терапии мультигенных заболеваний. При этом заболевание, носителем которого являются крысы Brattleboro – несахарный диабет – связано с нарушением секреции гормона аргинин-вазопрессина в конкретном типе клеток – нейронах гипоталамуса. Дальнейшее использование этих животных позволит моделировать клеточную терапию заболевания, связанного с нарушением в нейронах определенного типа – это такие заболевания, как болезнь Гентингтона (нейроны стриатума), болезнь Паркинсона (нейроны черной субстанции) и другие.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Научные результаты и предложенные в данной работе подходы и стратегии могут быть применены в биомедицине при разработке технологий терапии наследственных заболеваний человека с помощью редактирования генома *ex vivo*. Проведение дальнейших работ на предложенном модельном объекте позволит определить: 1) возможна ли клеточная терапия наследственных заболеваний с использованием ИПСК с исправленным генотипом 2) возможна ли клеточная терапия заболеваний, связанных с гибелью нейронов в структурах головного мозга 3) всесторонне изучить весь процесс клеточной терапии на всех её этапах, разработать методики и подходы.

Основные положения работы, выносимые на защиту.

1. Система CRISPR/Cas9 направленно вносит модификации во второй экзон мутантного гена аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro, не вызывая при этом нецелевых эффектов в паралогичном гене окситоцина.

2. При репарации двуцепочечного разрыва, направленно внесенного системой CRISPR/Cas9, происходит исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro в результате гомологичной рекомбинации с донорным плазмидным вектором.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на научной конференции «Фундаментальные науки — медицине: Актуальные проблемы молекулярной медицины» (Новосибирск, 2013 г.), V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва 2013г.), I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013 г.), VI съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированных генетических симпозиумов (Ростов-на-Дону, 2014 г.), форуме форума «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 2016 г.), семинарах и отчетных сессиях ИЦиГ СО РАН. По материалам диссертации опубликованы три статьи в рецензируемых отечественных и зарубежном журналах из списка ВАК.

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Донорный плазмидный вектор для гомологичной рекомбинации в гене *Avr* был сконструирован к.б.н. С. П. Медведевым. Качественный анализ действия CRISPR/Cas в эмбриональных фибробластах и рестрикционный анализ проводился совместно с Т.Б. Маланхановой.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3-х глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 104 страницах, содержит 26 рисунков и 12 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Конструирование векторов для экспрессии системы CRISPR/Cas9

Плазмидные векторы pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid #42230) и pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n(D10A) (Addgene Plasmid #42335) были приобретены в депозитории Addgene. Последовательности спейсеров были клонированы в соответствующие векторы как описано ранее (Cong et al., 2013).

2. Получение культуры эмбриональных фибробластов крыс

Эмбриональные фибробласты получали из кожи 19-тидневных эмбрионов крыс. Кожу механически измельчали и помещали в 0,25% трипсин (Thermo Fisher Scientific, США) на 10 мин. при 37°C. Клетки осаждали при 300g, супернатант убирали. После промывки в фосфатном буфере (PBS) опять осаждали, затем полученный осадок ресуспендировали в культуральной среде (см. ниже) и помещали в культуральную посуду. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS, 1 mM L-глутамина, 50 ед./мл пенициллина, 50 ед./мл стрептомицина (Life Technologies, США). Для открепления клеток от поверхности культуральной посуды использовали аналог трипсина TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, США).

3. Селекция рекомбинантных клеток

Для позитивной селекции клеток, содержащих трансген *NeoR*, в культуральную среду добавляли антибиотик G418 (Santa Cruz Biotechnology, sc-29065) в финальной концентрации 250 мкг/мл в течение 7 суток. Для позитивной селекции клеток, экспрессирующих SpCas9, после трансфекции вектором pX330_CR7_Puro в культуральную среду добавляли антибиотик пурамицин (Santa Cruz Biotechnology, sc-108071) в концентрации 1,5 мкг/мл в течение 2 суток. Для негативной селекции клеток со случайной встройкой в геном донорного вектора pAvr-target8 в культуральную

среду добавляли ганцикловир (InvivoGen, sud-gcv) в концентрации 50 мкг/мл в течение 7 суток. После селекции эмбриональные фибробласты наращивали в культуральной среде с добавлением основного фактора роста фибробластов (FGF-basic, BioLegend, 710304).

4. Электропорация Электропорацию эмбриональных фибробластов крысы (10^6 клеток на образец) проводили с помощью набора Mouse/Rat Hepatocyte Nucleofector Kit (Lonza, VPL-1004) по протоколу производителя, используя программу Q-025. Для качественного анализа активности CRISPR/Cas9 использовали следующие комбинации плазмидных векторов: 1) 6 мкг pX330_CR7, 2) 6 мкг pX330_CR8, 3) 6 мкг pX330_CRN, 4) 3 мкг pX335_CR7 + 3 мкг pX335_CR8. Для количественного анализа активности системы CRISPR/Cas9 использовали 6 мкг плазмидного вектора pX330_CR7_Puro. В экспериментах по исправлению мутации с помощью гомологичной рекомбинации использовали 3 мкг pX330_CR7_Puro + 3 мкг pAvp-target8. Для определения эффективности электропорации использовали 2 мкг плазмидного вектора pmaxGFP (Lonza). После электропорации каждый образец высевали отдельно в одну лунку 6-луночного планшета (Thermo Fisher Scientific, США) в культуральную среду. Анализировали клетки через 2 суток. Эффективность трансфекции определяли через 2 суток в контрольных образцах с помощью проточной цитофлуориметрии, используя BD FACS Canto II (BD Biosciences, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Создание донорного вектора для гомологичной рекомбинации в локусе *Avp*

Для исправления мутации в гене *Avp* с помощью методов молекулярного клонирования был сконструирован плазмидный вектор pAvp-target8, содержащий два участка гомологичных целевому гену. В качестве основы был использован вектор p079 pPNT6 (Addgene #11072), содержащий элементы необходимые для позитивно-негативной селекции: 1) ген устойчивости к антибиотику неомицину (*NeoR*), 2) ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (*HSV-TK1*). Так называемые «плечи гомологии» были получены путем амплификации участков гена *Avp* помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК крыс контрольной линии WAG, которые являются гомозиготами по аллелю *Avp* дикого типа. Амплифицированные участки были клонированы в вектор p079 pPNT6, длина плеч гомологии составила ~3.2 т.п.н. и ~2.3 т.п.н., что, согласно литературным данным, является оптимальной длиной для прохождения гомологичной рекомбинации (Beumer et al., 2013).

В полученном векторе плечи гомологии фланкируют ген *NeoR*, таким образом при гомологичной рекомбинации этот ген будет встроен в локус *Avp*, и, соответственно, целевые клетки могут быть селектированы добавлением в среду антибиотика неомицина или его аналогов. Ген *HSV-TK1* расположен за пределами донорного участка, соответственно, при гомологичной рекомбинации попадать в геном не должен. При добавлении в культуральную среду ганцикловира будет проходить негативная селекция: клетки, в которых произошла случайная встройка вектора, будут погибать.

2. Выбор последовательностей протоспейсеров для действия CRISPR/Cas9 в локусе *Avr*

Для увеличения частоты гомологичной рекомбинации во втором экзоне гена *Avr* крыс линии Brattleboro на участке вблизи мутации (в пределах 100 нуклеотидов) были выявлены потенциальные протоспейсеры (содержащие с 3'-конца мотив PAM SpCas9 – NGG) CRISPR/Cas9. Всего в данной области гена обнаружено 18 потенциальных протоспейсеров для действия CRISPR/Cas9, состоящих из 20 нуклеотидов и содержащих на 3'-конце мотив –NGG (PAM SpCas9).

При внесении модификаций в ген аргинин-вазопрессина потенциальной мишенью нецелевого действия CRISPR/Cas9 в рамках предложенной нами модельной системы является ген гормона окситоцина (*Oxt*) – паралог целевого гена с практически идентичной последовательностью ДНК. Для предотвращения нецелевого эффекта в гене *Oxt* были разработаны три стратегии выбора сайтов действия CRISPR/Cas9, использующие различия между двумя генами (*Avr* и *Oxt*): 1) Использование самой мутации в качестве отличия между генами – спейсеры CR-7 и CR-8, 2) Выбор протоспейсера на негомологичном участке – в интроне гена *Avr* – спейсер CR-N, 3) Использование двух приказ Cas9 для внесения ДЦР.

Для внесения ДЦР в сайты CR-7, CR-8 и CR-N были сконструированы плазмидные векторы, кодирующие соответствующую sgРНК и нуклеазу Cas9 – pX330_CR-7, pX330_CR-8, pX330_CR-N. Также для снижения вероятности возникновения нецелевых эффектов, в том числе и в гене *Oxt*, были сконструированы парные векторы, кодирующие sgРНК и приказ Cas9n(D10A) – pX335_CR-7 и pX335_CR-8.

3 Сравнение активности CRISPR/Cas9 в выбранных сайтах гена *Avr*

3.1 Анализ с использованием эндонуклеазы I фага T7

Для определения способности элементов системы CRISPR/Cas9 вносить ДЦР в целевом сайте гена *Avr* проводили электропорацию сконструированных плазмидных векторов в эмбриональные фибробласты крыс линии Brattleboro с помощью электропорации. Эффективность электропорации составила ~95%. Через двое суток анализировали продукты ПЦР с помощью эндонуклеазы I фага T7. Мы обнаружили, что ДЦР происходят во всех целевых протоспейсерах, причем при использовании двух приказ также детектируются следы ДЦР. При этом следов ДЦР на участке второго экзона гена *Oxt* обнаружено не было, следовательно, все разработанные стратегии позволяют избежать нецелевого эффекта в паралогичном гене.

3.2 Рестрикционный анализ

В результате делеции во втором экзоне гена *Avr* крыс линии Brattleboro возникает сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *BcgI*. В результате этого анализа показано, что продукт ПЦР, полученный при использовании в качестве матрицы геномной ДНК опытных образцов, гидролизует не полностью. Следовательно, в опытных образцах пропадает сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *BcgI*, что возможно является результатом репарации ДЦР, которые вносит CRISPR/Cas9.

С помощью описанных выше методик было показано, что все разработанные стратегии по внесению ДЦР в ген *Avr* соответствуют поставленным условиям: система CRISPR/Cas9 вносит ДЦР в целевой ген *Avr*, не вызывая нецелевых разрывов в гене-паралоге *Oxt*.

4. Биоинформатический анализ потенциальных нецелевых эффектов

На основании проведенного биоинформатического анализа с использованием алгоритмов CasOT, Cas-OFFinder, CRISPR Design, COSMID, GT-SCAN были предсказаны потенциальные нецелевые сайты действия системы CRISPR/Cas9 с выбранными в рамках разработанных стратегий спейсерами CR-7, CR-8 и CR-N. На основании полученных в ходе анализа результатов для дальнейшего использования был выбран спейсер CR-7, поскольку согласно всем алгоритмам, за исключением Cas-OFFinder, предсказанная вероятность нецелевых эффектов ниже, чем для спейсеров CR-8 и CR-N.

5. Определение эффективности внесения двуцепочечных разрывов системой CRISPR/Cas9 в протоспейсер CR-7

Проводили электропорацию эмбриональных фибробластов линии RNFF1 вектором pX330_CR-7_Puro, после селекции устойчивые к пурамицину клетки наращивали, после чего выделяли геномную ДНК и проводили секвенирование целевого участка гена *Avr*. В результате проведенного биоинформатического анализа было показано, что средняя эффективность внесения модификаций целевого сайта в клетках, в которых экспрессировалась CRISPR/Cas9, составила 78,7% (Рисунок 1А). При этом в ~60% случаев происходит инсерция одного нуклеотида. Использованное программное обеспечение позволяет оценить вероятность инсерции нуклеотидов в случае инсерции +1 (Рисунок 1Б).

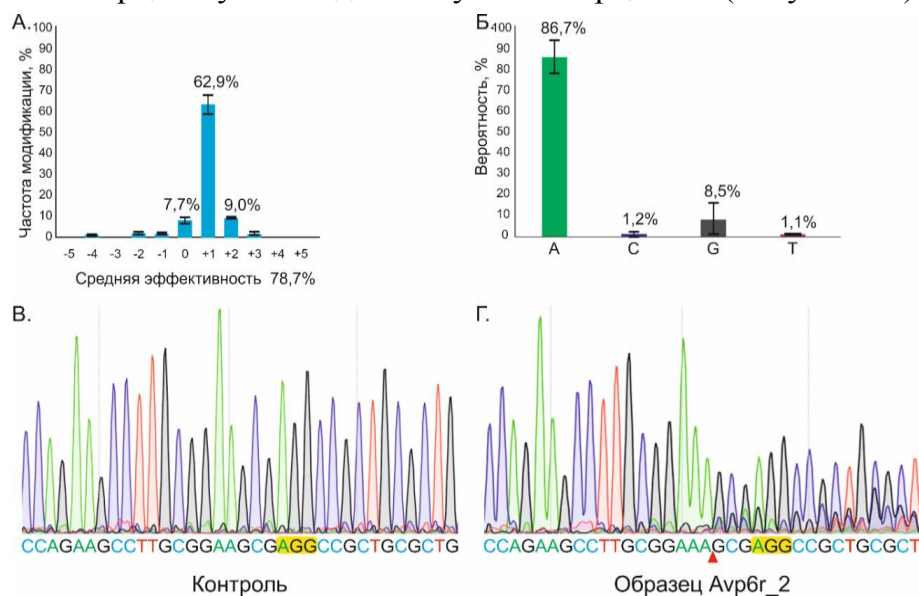


Рисунок 1. А. Анализ частоты мутаций в протоспейсере CR-7 при репарации ДЦР. По оси абсцисс указан размер делеции/инсерции. Б. Вероятность инсерции нуклеотидов. Указаны средние значения для всех образцов \pm стандартное отклонение. В. Секвенограмма контрольного образца. Г. Секвенограмма опытного образца. Красным указатель - место внесения ДЦР. Желтым обозначен PAM протоспейсера CR-7.

Показано, что в среднем 92,1% копий участка гена *Oxt* не содержат инсерций или делеций (Рисунок 2А). Выявленные инсерции +1 и +3 (1,8% и 2%) не являются статистически достоверными ($p > 0,1$ – по данным TIDE, Таблица 12) и, скорее всего, представляют собой «шум» на секвенограмме. Также между секвенограммами опытного и контрольного образцов не наблюдается значительных отличий (Рисунок 2Б, В). Таким образом, показано, что при использовании системы CRISPR/Cas9 со спейсером CR-7 достоверно не выявляются следы внесения ДЦР в паралогичном гене *Oxt*. Это говорит о том, что ДЦР в нецелевом сайте не происходит, либо их частота ниже детектируемого уровня использованного метода анализа.

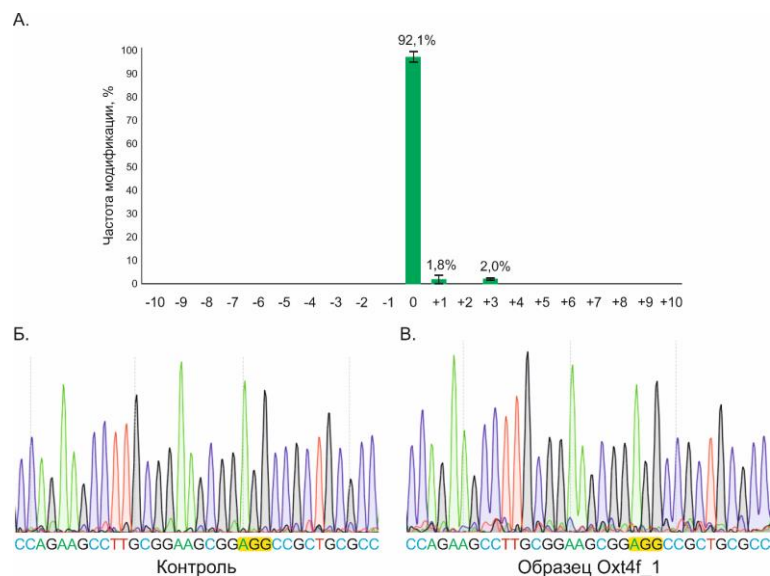


Рисунок 2. А. Анализ частоты модификаций целевой последовательности в результате репарации потенциальных ДЦР. По оси абсцисс указан размер делеции/инсерции. На графике указаны средние значения для всех образцов \pm стандартное отклонение, Б. Секвенограмма контрольного образца. В. Секвенограмма опытного образца. Желтым обозначен PAM.

6. Получение и анализ клональных линий

6.1 Позитивно-негативная селекция

Для получения клональных линий проводили электропорацию клеток линии RNFF1 (10^6 клеток/образец) смесью плазмидных векторов (Рисунок 3): 3 мкг pX330_CR-7_Puro + 3 мкг pAvr-target8. Клетки после электропорации пересевали на чашки Петри (диаметр 100 мм) в культуральную среду с добавлением активатора RAD51 7,6 мкМ RS-1 (R9782, Sigma Aldrich). На следующие сутки производили смену культуральной среды без добавления RS-1. Через 4 суток начинали позитивную селекцию – в течение 14 суток культивировали клетки в среде с добавлением 500 мкг/мл G418 – после этого этапа в результате селекции выживают целевые клетки NeoR+/HSV-TK1-, клетки со случайными встройками донорного вектора NeoR+/HSV-TK1+, а также клетки как с целевыми, так и случайными встройками одновременно.

После позитивной селекции, в течение 7 суток проводили негативную селекцию, добавления в культуральную среду ганцикловира до конечной

концентрации 250 мкМ – после этого этапа должны выживать только клетки NeoR+/HSV-TK1-. При этом часть колоний клеток, образовавшихся после позитивной селекции погибла, очевидно, погибшие колонии произошли из клеток, содержащих случайные встройки донорного вектора. После негативной селекции выжившие клетки культивировали в течение ~14 суток в среде с добавлением FGF-basic (BioLegend). Образовавшиеся из прошедших селекцию клеток колонии механически пересевали (стеклянным капилляром) в индивидуальную культуральную посуду для получения клональных клеточных линий. После механической пересадки колоний оставшиеся на исходной чашке Петри клетки открепляли и пересевали на культуральные флаконы (25см²) для получения смешанных суммарных популяций. Были получены две смешанные популяции (Рисунок 3) – RNFF1_t1 и RNFF1_t2. Полученные смешанные популяции были использованы для подбора условий ПЦР для выявления клонов, в геноме которых произошла рекомбинация в целевом локусе.

7.3 Анализ полученных клональных линий

В результате механической пересадки наиболее крупных колоний, прошедших позитивно-негативной селекции, для популяций RNFF1_t1 и RNFF1_t2 было получено 6 и 8 клональных линий, соответственно. Из полученных клональных линий была выделена геномная ДНК и проведен анализ с помощью ПЦР с использованием праймеров AVP_HR_L1F и AVP_HR_L1R. Соответствующий продукт был получен только для клонов RNFF1_t1.4 и RNFF1_t2.2 – в геноме этих клональных линий присутствует трансген *NeoR* в локусе гена *Avp*, что свидетельствует о произошедшей гомологичной рекомбинации с донорным вектором pAvp-target8 (Рисунок 4).

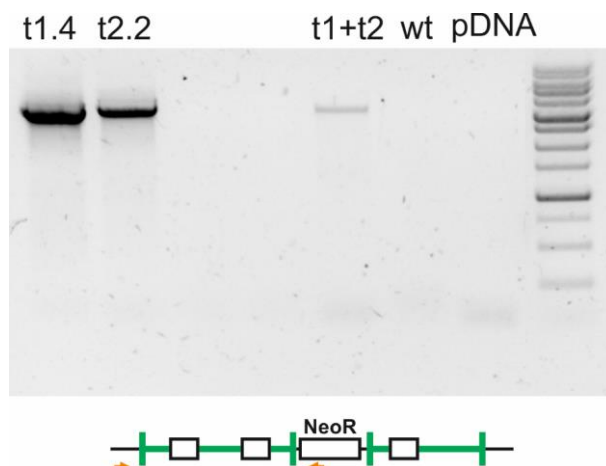


Рисунок 4. Выявление рекомбинантных клонов с помощью ПЦР. В качестве матрицы для ПЦР использовали: t1.4, t2.2 – геномную ДНК клонов RNFF1_t1.4 и RNFF1_t2.2, соответственно, t1+t2 – смесь геномной ДНК популяций RNFF1_t1 и RNFF1_t2, wt – геномная ДНК интактных фибробластов RNFF1, pDNA – донорный вектор pAvp-target8.

Чтобы определить произошло ли в данных клонах исправление мутации в гене *Avp*, продукты ПЦР очищали выделением из агарозного геля и проводили секвенирование по Сенгеру. При анализе результатов секвенирующих реакций было обнаружено, что в клоне RNFF1_t1.4 произошла делеция 205 п.н. Эти

данные согласуются с тем, что при анализе с помощью электрофореза в агарозном геле продукт ПЦР с использованием геномной ДНК RNFF1_t1.4 обладал большей электрофоретической подвижностью (масса продукта меньше), чем соответствующий продукт для клона RNFF1_t2.2 (Рисунок 4). Мы предполагаем, что в данном клоне уже после рекомбинации с донорным вектором в гене *Aur* система CRISPR/Cas9 повторно внесла ДЦР, который был репарирован с образованием делеции. Предположительно, данный разрыв был репарирован по механизму alt-EJ, при котором происходит образование выступающих одноцепочечных 3'-концов, которые могут гибридизоваться на участках микрогомологий (2-8 нуклеотидов), после чего происходит деградация выступающих концов, заполнение брешей и лигирование (McVey, Lee, 2008). В данном случае участком микрогомологии является последовательность 5'-GGG-3'. Данный клон в дальнейшей работе использован не был.

При анализе результатов секвенирующей реакции с использованием в качестве матрицы продукта ПЦР AVP_HR_L1F+AVP_HR_L1R для клона RNFF1_t2.2 обнаружено, что в результате гомологичной рекомбинации произошло исправление мутации в гене *Aur* (Рисунок 5Б). Для того, чтобы определить является ли данный клон гетеро- или гомозиготой по рекомбинантному аллелю была проведена ПЦР с использованием пары праймеров, лежащей в пределах плеч гомологии. Был получен продукт ПЦР, размер которого соответствовал последовательности, не содержащей трансгена *NeoR* (1124 п.н.). Соответственно, было показано, что клон RNFF1_t2.2 является гетерозиготой по рекомбинантному аллелю. Далее очищенный продукт ПЦР был секвенирован по Сенгеру (Рисунок 5В). Показано, что аллель, в котором не произошла гомологичная рекомбинация с донорным вектором, содержит инсерцию А – мутацию, которая по нашим данным возникает в большинстве случаев при репарации ДЦР, вносимых CRISPR/Cas9 в протоспейсере CR-7. Также было проведено секвенирование продукта ПЦР, полученного с использованием праймеров *Avr6f* и *Avr6g* (Рисунок 5Г), который амплифицируется с обоих аллелей. На секвенограмме видно, что интенсивность пиков, соответствующих разным аллелям одинакова, что говорит о равных долях обоих аллелей. Наконец, чтобы определить не произошло ли нецелевых разрывов в гене *Oxt*, участок данного локуса был амплифицирован с использованием праймеров *Oxt4f* и *Oxt4r*. Очищенный продукт ПЦР был использован в качестве матрицы для секвенирования по Сенгеру. Показано, что последовательность гена *Oxt* осталась интактной и не содержит следов возникновения ДЦР (Рисунок 6).

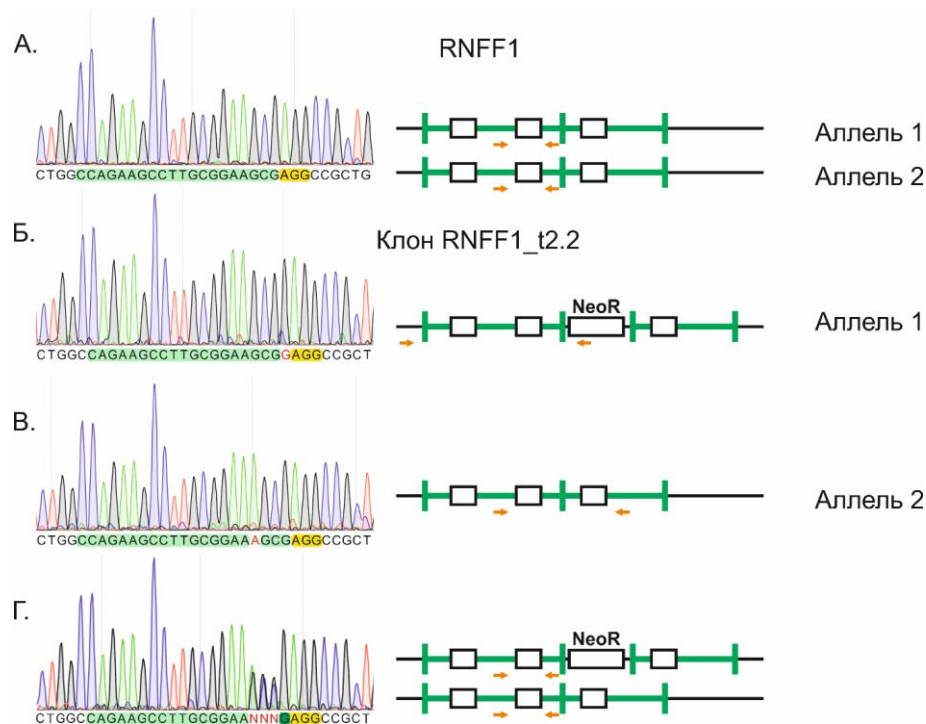


Рисунок 5. А. Секвенограмма контрольного образца интактных фибробластах RNFF1. Б. Результаты секвенирования по Сенгеру продукта ПЦР AVP_HR_L1F + AVP_HR_L1R – рекомбинантного аллеля. В. Результаты секвенирования по Сенгеру продукта ПЦР Avp_LF8 + Avp_RR1 – аллеля в котором не произошла рекомбинация. Г. Результаты секвенирования по Сенгеру продукта ПЦР Avpbf + Avpbr.

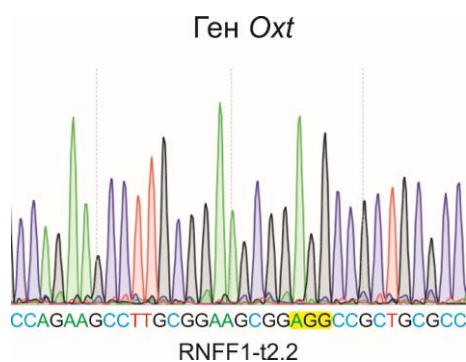


Рисунок 6. Результаты секвенирования по Сенгеру локуса *Oxt* в линии RNFF1_t2.2

Таким образом, был получен клон, содержащий один аллель гена *Avp* с исправленной в результате гомологичной рекомбинации мутацией *di* и аллель, содержащий мутацию, возникшую в результате репарации ДЦР. Однако, стоит отметить, что полученная нами мутация в гене *Avp* – инсерция А – приводит к восстановлению сдвинутой в результате делеции G у Brattleboro рамки считывания, что может привести к восстановлению нормального процессинга прогормона с образованием нейрофизина II. Стоит отметить, что данная мутация приводит к замене двух аминокислот: происходит замена полярного незаряженного (при pH=7) серина и неполярного глицина на положительно

заряженные лизин и аргинин, соответственно. Не ясно, как повлияют данные замены на структуру белка нейрофизина II и, что более важно, на его функцию, как белка переносчика аргинин-вазопрессина.

3.8 Обсуждение эффективности гомологичной рекомбинации

В результате проведенного эксперимента по получению клональных линий, в локусе *Avp* которых произошла гомологичная рекомбинация с донорным вектором, было получено всего два клон RNFF1_t1.4 и RNFF1_t2.2 – по одному клону с каждой популяции клеток, в которые была проведена электропорация. Исходя из литературных данных в нашей экспериментальной системе наблюдалась низкая частота гомологичной рекомбинации с донорным вектором. Второй факт, который вызывает ряд вопросов, – делеция 205 нуклеотидов в рекомбинантном аллеле клон RNFF1_t1.4. По-видимому, данная делеция возникла уже после рекомбинации, что говорит о том, что созданная система CRISPR/Cas9 способна вносить ДЦР в последовательность дикого типа. Для проверки этой гипотезы был использован выделенный и очищенный белок SpCas9 в комплексе с sgРНК, которая была получена с помощью реакции *in vitro* транскрипции, в которой в качестве матрицы был использован продукт ПЦР, содержащий последовательность sgРНК со спейсером CR-7 и с 5'-конца промотор T7 РНК-полимеразы. Белок SpCas9 инкубировали с sgРНК в реакционном буфере в течение 10 минут, после чего добавляли ДНК в молярном соотношении ДНК:комплекс = 1:100. В результате данного анализа было показано, что комплексы SpCas9:sgРНК_CR-7 в реакции *in vitro* способны гидролизовать линейризованный донорный вектор pAvp-target8 (Рисунок 7А, Б). В изначальном дизайне эксперимента мы исходили из гипотезы, что, так как в последовательности дикого типа гена *Avp* между PAM –AGG и протоспейсером CR-7 расположен G, разрезания такого сайта происходить не будет, потому что PAM не прилежит непосредственно к протоспейсеру (раздел 3.2, Рисунок 7В). Таким образом, предполагалось защитить донорный вектор от ДЦР, а также избежать нецелевых разрывов в гене *Oxt*. При анализе литературы, касающейся системы CRISPR/Cas9 и, в частности, белка SpCas9, было обнаружено, что для SpCas9 показано внесение разрывов в протоспейсеры с неканоничным PAM –NAG (Zhang et al., 2014). При анализе последовательности *Avp* дикого типа был обнаружен неканоничный PAM –GAG, непосредственно прилежащий к протоспейсеру CR7 (Рисунок 7В). При исследованиях неканоничного –NAG показано, что для него характерна сниженная примерно на порядок эффективность нокаута трансгена *GFP* в клетках HEK-293 по сравнению с каноничным –NGG (Zhang et al., 2014).

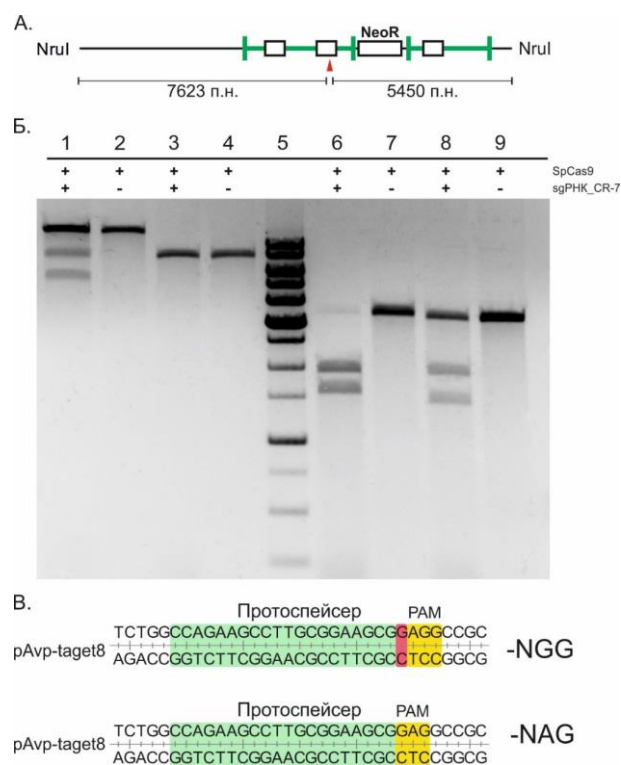


Рисунок 7. А. Схематичное изображение вектора pAvp-target8, линейризованного с помощью эндонуклеазы рестрикции *NruI*. Красный указатель – место предполагаемого разрыва. Б. Результаты *in vitro* реакции комплексов SpCas9:sgPHK и ДНК: 1-2 линейризованный с помощью *NruI* pAvp-target8; 3-4 Вектор pX552_Avp_Puro – отрицательный контроль; 5 – маркер молекулярного веса ДНК; 6-7 положительный контроль – линейризованный вектор pGEM-T Easy, в который был встроена целевая последовательность гена *Avp*, содержащая протоспейсер CR7; 8-9 линейризованный вектор pGEM-T Easy, в который был встроена последовательность гена *Oxt*. В. К протоспейсеру CR7 в векторе pAvp-target8 прилежит неканоничный PAM – NAG.

В качестве положительного контроля при проведении реакции *in vitro* комплексов SpCas9:sgPHK_CR7 использовали вектор pGEM-T Easy, в который был клонирован участок последовательности гена *Avp* крыс Brattleboro, содержащий протоспейсер CR_7 (встраивали продукт ПЦР с праймерами Avrbf и Avrbg). Стоит отметить, что в данном случае эффективность реакции была близка к 100% – вектор гидролизован практически полностью (Рисунок 7Б). Также происходит и гидролиз комплексами SpCas9:sgPHK_CR7 линейризованного вектора pGEM-T Easy, содержащего соответствующую последовательность гена *Oxt*, однако эффективность при этом заметно ниже (Рисунок 7Б). Этот факт согласуется с приведенными выше литературными данными о том, что эффективность внесения разрывов SpCas9 в протоспейсеры с неканоничным PAM –NAG существенно ниже таковой для каноничных сайтов.

Таким образом, факт делеции в клоне RNFF1_t1.4 и факт низкой эффективности гомологичной рекомбинации объясняется способностью созданной системы CRISPR/Cas9 вносить ДЦР в последовательность ДНК

дикого типа: в рекомбинированный аллель и в донорный вектор (Рисунок 7Б). Мы не наблюдали следов нецелевых разрывов в паралогичном гене *Oxt* эмбриональных фибробластов Brattleboro (Рисунок 6), однако показали способность комплексов SpCas9:sgPHK_CR7 в реакции *in vitro* вносить разрывы в последовательность этого гена, содержащую протоспейсер с неканоничным PAM –NAG (Рисунок 7Б,В). Это противоречие может быть объяснено следующими факторами: 1) сниженной эффективностью внесения ДЦР в сайты с неканоничным PAM, 2) в ряде работ показано, что состояние хроматина может оказывать влияние на эффективность CRISPR/Cas9 – неактивный хроматин препятствует внесению ДЦР комплексами sgPHK:Cas9 (Daer et al., 2017, Wu et al., 2014). Согласно данным о транскрипции гена *Oxt* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25504>), его экспрессия наблюдается только в клетках головного мозга и половых органов крыс, соответственно, в эмбриональных фибробластах крыс он репрессирован (предположительно, закрытый хроматин). Мы полагаем, что совокупное действие этих факторов снижает эффективность ДЦР в гене *Oxt* эмбриональных фибробластов Brattleboro, как минимум, ниже достоверно детектируемого нами уровня. В случае же клона RNFF1_t1.4 можно предположить, что, так как в результате гомологичной рекомбинации в локус попадает трансген *NeoR*, который экспрессируется под управлением конститутивного промотора PGK-1, состояние хроматина на данном участке становится открытым (более «доступен»), в следствие чего в локусе произошел повторный разрыв в протоспейсере с PAM – NAG.

Что касается низкой эффективности гомологичной рекомбинации, то она может быть объяснена внесением разрывов в донорный плазмидный вектор, который является более «доступным» (относительно закрытого хроматина в локусе *Oxt*). В проведенной нами реакции *in vitro* эффективность гидролиза комплексами sgPHK:Cas9 донорного вектора pAvp-target8 была невелика по сравнению с положительным контролем (Рисунок 7Б), однако, стоит отметить, что реакция проводилась в течение 60 минут и соотношение вектор:sgPHK:Cas9 составляло 1:100:100, в то время как в клетках после трансфекции, согласно данным литературы, экспрессия элементов системы CRISPR/Cas9 детектируется в течение минимум 72 часов (Kim et al., 2014), а также соотношение комплексов к вектору может быть на порядки выше. Линеаризованный в результате разрыва в протоспейсере CR-7 с неканоничным PAM плазмидный вектор pAvp-target8 не может выступать в качестве донорной молекулы для гомологичной рекомбинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные нами стратегии выбора спейсеров CRISPR/Cas9 позволяют направленно вносить модификации в целевые мутантные копии генов, не затрагивая при этом копии дикого типа. Такой подход может быть использован при исправлении мутаций или, наоборот, внесении мутаций (для моделирования заболеваний *in vitro*) в геном гетерозигот по целевому гену, либо в случае, когда целевой ген входит в семейство генов с близкими последовательностями.

Нами были получены две клональные линии, одна из которых содержит делецию в рекомбинированном аллеле *Avp*. В геноме линия RNFF1_t2.2

детектировано две различных модификации, которые являются результатами двух различных путей репарации ДЦР – гомологичной рекомбинации и с-NHEJ. В обоих аллелях данного клона при этом восстановлена рамка считывания. При использовании созданной нами системы для исправления мутации в гене *Avp* крыс Brattleboro мы наблюдали низкую частоту прохождения гомологичной рекомбинации. Было выяснено, что этот факт, а также факт делеции в рекомбинировавшем аллеле клона RNFF1_t1.4, может быть объяснен способностью SpCas9 вносить разрывы в протоспейсеры с неканоничными PAM, что не было учтено при дизайне эксперимента. Стоит отметить, что данный случай, например, обосновывает актуальность дальнейшего исследования механизмов действия системы CRISPR/Cas9 с целью усовершенствования её эффективности и специфичности.

Полученные нами эмбриональные фибробласты с исправленной мутацией в дальнейших работах будут репрограммированы к плюрипотентному состоянию – будут получены ИПСК крыс Brattleboro с исправленной мутацией. Эти клетки могут быть использованы для разработки клеточной терапии наследственных заболеваний, для исследований возможности восстановления нормального фенотипа в результате исправления мутации на генетическом уровне, в частности, фенотипа релевантных типов клеток для заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Создана система для проведения гомологичной рекомбинации в локусе гена аргинин-вазопрессина, состоящая из набора генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9, и донорной генетической конструкции.
2. Разработана стратегия, позволяющая эффективно вносить двуцепочечные разрывы во второй экзон гена аргинин-вазопрессина, не оказывая нецелевого эффекта в паралогичном гене окситоцина.
3. Репарация двуцепочечных разрывов в отсутствие донорной молекулой в целевом участке гена аргинин-вазопрессина преимущественно происходит с инсерцией аденина в точке разрыва, в результате чего происходит восстановление рамки считывания с заменой двух аминокислотных остатков.
4. В результате позитивно-негативной селекции фибробластов крыс линии Brattleboro, трансфицированных смесью донорных плазмид и CRISPR/Cas9, была получена клональная линия RNFF1_t2.2, в одном аллеле гена аргинин-вазопрессина которой произошла гомологичная рекомбинация, а во втором аллеле была восстановлена рамка считывания в результате инсерции аденина.
5. Причиной сниженной эффективности процесса гомологичной рекомбинации является способность созданной системы CRISPR/Cas9 вносить разрывы в донорный вектор из-за присутствия в нем неканонического PAM SpCas9 –NAG.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Немудрый А.А.**, Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas - инструменты открытий // Acta Naturae, Т. 6, № 3 (22), 2014, стр. 20-42
2. Vaskova E. A., Medvedev S. P., Sorokina A. E., **Nemudryy A. A.**, Elisaphenko E. A., Zakharova I. S., Shevchenko A. I., Kizilova E. A., Zhelezova A. I., Evshin I. S., Sharipov R. N., Minina J. M., Zhdanova N. S., Khegay, П, Kolpakov F. A., Sukhikh G. T., Pokushalov E. A., Karaskov A. M., Vlasov V. V., Ivanova L. N., Zakian S. M. Transcriptome Characteristics and X-Chromosome Inactivation Status in Cultured Rat Pluripotent Stem Cells // Stem Cells Dev. 2015. Vol. 24. P. 2912-2924.
3. **Немудрый А.А.**, Маланханова Т.Б., Малахова А.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Стратегии редактирования паралогичных генов с помощью CRISPR/CAS9 // Гены и Клетки 2016, Т. XI, №2, С. 87-94
4. **Немудрый А.А.**, Васькова А.А., Стекленева А.Е., Медведев С.П. Разработка технологии исправления генетических мутаций, обуславливающих развитие наследственных заболеваний // Сборник тезисов научной конференции «Фундаментальные науки — медицине: Актуальные проблемы молекулярной медицины», посвященной 10-летию Медицинского факультета НГУ 16-20 сентября 2013 г., с. 137-138
5. **Немудрый А.А.**, Стекленева А.Е., Медведев С.П., Васькова Е.А., Иванова Л.Н., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Применение систем TALEN и CRISPR/Cas9 для исправления генетических мутаций в плюрипотентных клетках крыс Brattleboro // Сборник тезисов V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина», 18-21 ноября 2013 г. – М.: МАКС Пресс. с. 51.
6. Васькова Е.А., Медведев С.П., Стекленева А.Е., **Немудрый А.А.**, Елисафенко Е.А., Евшин И.С., Шарипов Р.Н., Сайфутдинова С.Г., Шевченко А.И., Кизилова Е.А., Железова А.И., Иванова Л.Н., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Создание системы для исправления генетических мутаций на основе плюрипотентных клеток крыс линии Brattleboro // Материалы «I Национального конгресса по регенеративной медицине», 4-6 декабря 2013 г., г. Москва, с. 46-47.
7. **Немудрый А.А.**, Стекленева А.Е., Васькова Е.А., Медведев С.П., Иванова Л.Н., Закиян С.М. Исправление мутантного генотипа в клетках крыс линии Brattleboro с помощью современных методов геномной инженерии // VI СЪЕЗД ВАВИЛОВСКОГО ОБЩЕСТВА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ (ВОГиС) И АССОЦИИРОВАННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИМПОЗИУМЫ, г. Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014г., Тезисы докладов, с.68-69
8. **Немудрый А.А.**, Маланханова Т.Б., Васькова Е.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Редактирование последовательности гена *Aur* крыс линии Brattleboro с помощью системы CRISPR/Cas // Материалы форума «Биомедицина-2016», Новосибирск, 26 июня – 1 июля, 2016.

Подписано к печати 2017 г.

Формат бумаги 60×90 1/16 Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7

Тираж 110 экз. Заказ № 93

Отпечатано на полиграфической базе ИЦиГ СО РАН
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10