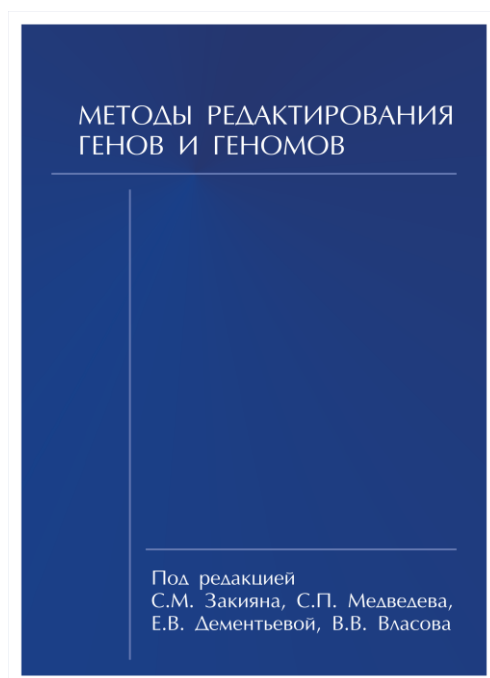


Методы редактирования генов и геномов

под редакцией С.М. Закияна, С.П. Медведева, Е.В. Дементьевой, В.В. Власова



Содержание

Глава 1

Биоинформатические методы и инструменты для выбора целевых сайтов редактирования геномов и предсказания нецелевой активности нуклеаз

Коваленко В.Р., Вяткин Ю.В.

Всего за несколько лет редактирование генома с помощью CRISPR-систем изменило подход к различным биологическим вопросам, популярность и потенциал этих инструментов продолжают расти: появляются новые эффекторы, более эффективные, более удобные для доставки в клетку, разнообразные, открывающие кроме редактирования массу иных применений, таких как активация транскрипции, создание тест-систем и других. К сожалению, редактирование генома неразрывно сопряжено с редактированием нецелевых сайтов, которые отличаются от целевой последовательности всего несколькими нуклеотидами, что приводит к нежелательным мутациям и хромосомным перестройкам. Чтобы решить эту проблему, исследователям необходимы подходящие инструменты для обнаружения потенциальных нецелевых сайтов.

Среди доступных инструментов работы с направляющими РНК существует два основных класса: те, которые позволяют исследователям найти экспериментально подтвержденные направляющие РНК, и те, которые предсказывают потенциальные CRISPR-мишени в предлагаемой последовательности. Среди второй группы инструментов встречаются как классические – для подбора одной направляющей РНК для одного сайта; так и инструменты, позволяющие подобрать парные направляющие РНК для крупных делеций; инструменты поиска направляющих РНК с помощью методов машинного обучения; и такие, которые позволяют изучать нецелевую активность методами *in vitro*.

Глава 2

Простой и быстрый способ детекции и количественного анализа геномных мутаций методом рестрикции негомологичных дуплексов ДНК

Гущин Д.Ю.

Использование программируемых нуклеаз, в особенности системы CRISPR, для редактирования геномов стало широко используемым методом современной биологии, биотехнологии и биомедицины. Хотя значительные усилия были посвящены развитию численных методов оценки возможной эффективности используемых sgRNA и crRNA в системе CRISPR, цинковых и TALE нуклеаз, метод прямого картирования активности нуклеаз остается наиболее достоверным подходом при анализе эффективности выбранных средств редактирования конкретного генома. Нами был разработан метод количественной оценки введенных мутаций, используя Surveyor эндонуклеазу, чувствительную к наличию непарных оснований и шпилек в двуцепочечной ДНК. Была также продемонстрирована возможность использования эндонуклеазы-1 из бактериофага T7 (T7E1) в этом подходе. Здесь представлен простой протокол для количественного определения эффективности редактирования генома, подходящий для использования любого из этих ферментов, с добавлением некоторых нововведений. Этот метод позволяет оценить сравнительную эффективность большого набора sgRNA или ZFN/TALEN в течение одного рабочего дня и не требует наличия специальных приборов за исключением ПЦР-амплификатора, простого электрофорезного оборудования и системы для гель-документации. Метод прост в исполнении и сравним по скорости и наглядности результата с методом определения полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP).

Глава 3

Высокопроизводительная сборка плазмидных CRISPR/Cas систем с помощью гомологичной рекомбинации в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*

Карнов Д.С., Карнов В.Л.

В настоящее время революционный молекулярный инструмент – система CRISPR/Cas – успешно применен в редактировании генома всех модельных организмов. Однако для некоторых не модельных организмов, в основном микроорганизмов, имеющих важное значение как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях, еще не созданы генетические конструкции, кодирующие системы CRISPR/Cas. Примером может служить *Debaryomyces hansenii* – это непатогенные осмо- и галотолерантные дрожжи класса *Saccharomycetes*, используемые в исследованиях молекулярных механизмов гало- и осмо- и галотолерантности, а также в пищевой промышленности и биотехнологии. Плазмидные конструкции систем CRISPR/Cas состоят из множества фрагментов, что делает очень сложной задачу их получения классическими методами молекулярного клонирования, поэтому целесообразно использование методов высокопроизводительного молекулярного клонирования. В данной главе будет рассмотрено получение генетической конструкции, кодирующей все компоненты системы CRISPR/SpyCas9 из *Streptococcus pyogenes* и адаптированной к экспрессии в *D. hansenii*, с помощью технологии рекомбинационного клонирования в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

Глава 4

Редактирование генома дрожжей *D. hansenii*

Карнов Д.С.

Debaryomyces hansenii – это непатогенные осмо- и галотолерантные дрожжи класса *Saccharomycetes*, часто выделяемые из морской воды и других сред обитания с высокой соленостью. В фундаментальных исследованиях *D. hansenii* служат моделью при изучении молекулярных механизмов гало- и осмотолерантности, а в биотехнологии имеют большое значение в пищевой промышленности как компонент стартовых культур при изготовлении колбасных изделий и сыров. В настоящее время отсутствуют какие-либо эффективные молекулярные инструменты для манипуляции с геномом *D. hansenii*, что серьезно ограничивает его фундаментальные исследования и реализацию биотехнологического потенциала. Возможными причинами отсутствия этих инструментов служат нестандартный генетический код этих дрожжей и слабая активность систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК. В данной главе будет рассмотрено редактирование генома *D. hansenii* на примере нокаута ключевого гена биосинтеза аденина *DhADE2* с использованием плазмидной конструкции, кодирующей все компоненты системы CRISPR/Cas9 и адаптированной к экспрессии в *D. hansenii*.

Глава 5

Доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 в геном суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana*

Пермякова Н.В., Сидорчук Ю.В., Маренкова Т.В., Загорская А.А., Дейнеко Е.В.

Суспензионные культуры растительных клеток хорошо зарекомендовали себя как удобные платформы наработки биофармацевтических белков. Тем не менее они имеют ряд недостатков, связанных с посттрансляционными модификациями белков, нежелательными вторичными метаболитами, а также недостаточно высоким выходом рекомбинантных белков. Целевое редактирование генома при помощи системы CRISPR/Cas9 является перспективной технологией, успешно опробованной на разных видах растений, но практически не применяющейся для модификации генома суспензионных растительных клеток. В нашем протоколе подробно описаны этапы создания генно-инженерных конструкций для редактирования целевых генов, доставки созданных конструкций в клетки суспензионной культуры при помощи агробактериальной или биобаллистической трансформации, а также описаны способы селективного отбора клеток с событиями редактирования для создания на их основе клеточных моноклональных линий. Таким образом, данный протокол можно использовать для целевого редактирования генома клеток *A. thaliana* в суспензионной культуре и создания на ее основе клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков.

Глава 6

Изоляция протопластов *Solanum tuberosum* и *Solanum verrucosum* и их PEG-опосредованная трансформация

Егорова А.А., Иванова К.А., Герасимова С.В.

Протопласты являются удобной моделью для различных фундаментальных и прикладных исследований в области молекулярной биологии, физиологии и биотехнологии растений. В частности, изоляция и трансформация протопластов применяются в целях тестирования различных генноинженерных систем в растительных клетках, а также для последующего получения растений с модифицированными геномами и соматических гибридов. Данный протокол разработан для выделения протопластов из мезофилла листьев двух видов картофеля (*Solanum tuberosum* и *Solanum verrucosum*) и их последующей PEG-опосредованной трансформации плазмидной ДНК. Протокол позволяет выделять

протопласты как из растений, выращенных в климатической камере, так и выращенных *in vitro*. Используя описанный метод, можно оценивать эффективность различных генетических конструкций *in vivo*, например, плазмид, несущих репортерные гены или систему РНК-направленных нуклеаз для модификации геномов. В качестве демонстрации эффективности данного метода была использована репортерная конструкция, несущая ген флуоресцентного белка mCherry. При использовании данного протокола из 1 грамма листьев растений выделяется примерно один миллион живых протопластов. Эффективность трансформации вектором mCherry – около 50-70%.

Глава 7

Подходы к эффективному редактированию генома регенерирующего свободноживущего плоского червя *Macrostomum lignano*

Вударски Я., Устьянцев К.В., Березиков Е.В.

Исследование животных, способных восстанавливать поврежденные части тела, служит важной основой для формирования современных подходов к регенеративной медицине. Регенерирующие свободноживущие плоские черви – одни из наиболее информативных модельных организмов для изучения механизмов регуляции стволовых клеток и их дифференцировки в различные ткани и органы, а также регенерации. Долгое время основным сдерживающим фактором прогресса в исследовании плоских червей являлось отсутствие способа получения стабильных трансгенных линий и, как следствие, трудности развития у них технологий геномного редактирования. В данной главе мы приводим детальный протокол получения трансгенных линий базального свободноживущего плоского червя *Macrostomum lignano* с помощью методов (1) случайной интеграции ДНК, (2) доставки с помощью транспозонной системы *piggyBac* и (3) внесения целенаправленных встроек (нокинов) с помощью системы CRISPR/Cas9.

Глава 8

Применение CRISPR/Cas9 для получения в геноме *Drosophila melanogaster* направленных делеций и введения сайта интеграции из системы attP/attB фага ΦC31

Андреенков О.В., Волкова Е.И., Демаков С.А.

В данной главе приведены протоколы для получения направленной делеции гена, а также использования гомологичной рекомбинации для замены части гена на attP-сайт интеграции в геноме *Drosophila melanogaster* с помощью системы CRISPR/Cas9. Получение нокаута по гену рассматривается на примере гена *Mes4*. Введение attP сайта рассмотрено на примере 5'-регуляторной области гена *Notch*.

Глава 9

Получение направленных делеций в геноме *Drosophila melanogaster* с помощью системы CRISPR/Cas9

Романов С.Е.

Особенности биологии и развитые генетические инструменты сделали *Drosophila melanogaster* незаменимым объектом для изучения роли генов в развитии организма. Одним из основных подходов к исследованию функции генов является получение делеционных мутантов. Однако, несмотря на большое количество доступных методик, направленный мутагенез дрозофилы до недавнего времени представлял из себя

длительную и трудоемкую задачу. С появлением системы CRISPR/Cas9 редактирование генома дрозофилы превратилось в рутинную процедуру. Здесь будет описано, как применить систему CRISPR/Cas9 для создания крупных делеций от нескольких тысяч до десятков тысяч п.н. Делеция целевого локуса может быть получена путем инъекции нескольких плазмид, кодирующих синтетические направляющие РНК под контролем промотора *U6*, в трансгенные эмбрионы, способные нарабатывать белок Cas9 специфически в клетках зародышевого пути и содержащие вставку транспозона внутри целевого локуса.

Глава 10

Редактирование генома *Drosophila melanogaster* с помощью системы CRISPR/Cas

Максименко О.Г., Георгиев П.Г.

Система редактирования геномов, основанная на CRISPR/Cas9, стала мощным инструментом для проведения функциональных геномных исследований и была адаптирована для применения во многих организмах, включая дрозофилу. В данной главе будут рассмотрены подходы эффективных стратегий внесения направленных изменений в геном дрозофилы как при помощи стандартного использования системы CRISPR/Cas9, так и путем ее сочетания с рекомбиназо-опосредованным обменом кассет (RMCE). Также будет описана модификация этого подхода для эффективного бесшовного редактирования генома.

Глава 11

Получение направляющих РНК (sgRNA), пригодных для проведения микроинъекций в пронуклеус зиготы для создания трансгенных мышей

Шепелев М.В.

Стремительное развитие технологий геномного редактирования, прежде всего системы CRISPR/Cas9, позволило существенно повысить эффективность создания трансгенных мышей с таргетной модификацией генома с помощью классической технологии микроинъекций в пронуклеус зиготы. Для успешного редактирования генома необходимы компоненты системы CRISPR/Cas9: нуклеаза Cas9 и направляющая РНК (single guide РНК, sgRNA), которая за счет комплементарного связывания с геномной ДНК определяет место внесения разрыва нуклеазой Cas9. В данной главе приведены протоколы, позволяющие получить молекулы sgRNA, пригодные для проведения микроинъекций в пронуклеус зиготы для создания трансгенных мышей

Глава 12

Использование CRISPR/Cas9 нуклеаз для производства трансгенных мышей

Скрябин Б.В., Рождественский Т.С.

Модификация геномов живых организмов является важной задачей современной биологии и медицины. В последние годы значительный прогресс в этой области был сделан благодаря появлению новых технологий прямого модифицирования генов на стадии стволовых клеток, зародышевых (герминативных) клеток и оплодотворенных яйцеклеток. В основном это относится к технологиям создания последовательность-специфичных программируемых нуклеаз: 1) ZFN (Zinc-Finger Nucleases), 2)TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и 3) рибонуклеопротеиновый комплекс CRISPR/Cas9. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, короткие

палиндромные повторы, расположенные кластерами) кодируют РНК, взаимодействующие с эндонуклеазой Cas9. Молекула РНК по принципу комплементарности распознает участок ДНК и определяет направленное расщепление нуклеотидной цепи нуклеазой Cas9. Минимальный «искусственный» комплекс CRISPR/Cas9 состоит из молекулы РНК (направляющей РНК или gRNA) и белка Cas9 – ДНК эндонуклеазы. Система редактирования генома CRISPR/Cas9 произвела революционный прорыв в научном мире. Это быстрая, дешевая и эффективная система редактирования ДНК, имеющая широкий спектр потенциальных приложений.

Наша группа занимается производством трансгенных и генно-модифицированных животных – TRAnsgenic animal and genetic engineering Models (TRAM) при медицинском факультете университета г. Мюнстер (Германия). Она работает с 1996 г., и основной ее задачей является создание генетически модифицированных линий нокаутных/трансгенных мышей для медицинских исследований. В работе мы используем разные технологии как классические, связанные с использованием мышинных стволовых клеток, так и новые, позволяющие напрямую модифицировать геномную ДНК оплодотворенных яйцеклеток посредством микроинъекций в них программируемых эндонуклеаз. Последние несколько лет мы активно используем систему CRISPR/Cas9, поскольку она позволяет быстро и относительно недорого создавать новые нокаутные/трансгенные линии. TRAM осуществляет полный технологический цикл: от биоинформатического анализа и дизайна геномной модификации *in silico* до получения и полной характеристики гетерозиготных мышей. В данной работе представлены основные этапы и протоколы, связанные с производством этих животных.

Глава 13

Получение делеций в геноме с использованием системы CRISPR/Cas9 на примере фибробластов крысы

Давлетшина Г.И., Шерстюк В.В.

Система редактирования CRISPR/Cas9 произвела революцию в генной инженерии, позволив за меньшие сроки редактировать генетический код живых организмов. Собрать систему для редактирования целевого участка в геноме, используя систему CRISPR/Cas9, возможно за 14 дней, а общее время для получения генетически модифицированных линий клеток не превышает и двух месяцев. При помощи системы CRISPR/Cas9 возможно получение различных вариантов нокаута: белок-кодирующие гены можно нокаутировать путем сдвига рамки считывания, удаления промотора гена, но в некоторых случаях необходимо удаление всего участка ДНК, в котором закодированы исследуемые молекулы. В данном протоколе мы описываем, как собрать систему CRISPR/Cas9 для получения делеции целевого участка в геноме и при помощи нее получить субклонированную культуру клеток с делецией на примере фибробластов крысы. Данный подход является универсальным для работы с различными культурами клеток, учитывая условия их культивирования, и может быть применен для получения как коротких, так и длинных делеций.

Глава 14

Аллель-специфичное редактирование геномов с помощью CRISPR/Cas9 на примере редактирования паралогичных генов *Avp* и *Oxt* крыс линии Brattleboro

Немудрый А.А.

Редактирование геномов с помощью CRISPR/Cas9 позволяет направленно вносить двуцепочечные разрывы в любые последовательности генома клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. В результате репарации клеткой такого разрыва может произойти либо нокаут целевого гена, либо замена поврежденного участка по матрице гомологичной молекулы ДНК. Узнавание целевого сайта системой CRISPR/Cas9 происходит по принципу комплементарности – при гибридизации sgRNA и целевого сайта генома. При использовании системы CRISPR/Cas9 существуют риски нежелательных нецелевых эффектов, в сайтах с нуклеотидной последовательностью, близкой к целевой. Рациональный дизайн sgRNA и оценка нецелевой активности с помощью секвенирования следующего поколения в большинстве случаев позволяют выбрать наиболее «безопасный» сайт для действия CRISPR/Cas9. Но как быть, если нужно редактировать только один аллель гена, например, в случае гетерозиготных мутаций, приводящих к заболеванию? Или если у целевого гена есть паралоги с близкой последовательностью? Как в таком случае соблюсти главную заповедь Гиппократа и избежать нецелевых эффектов в «здоровых» аллелях? В данной методической главе мы рассмотрим, какие решения данной проблемы предлагает современная наука, и расскажем, как их применить на практике на примере паралогичных генов *Aur* и *Oxt* крыс линии Brattleboro.

Глава 15

«Выключение» генов в клеточных линиях с анеуплоидным кариотипом

Карагяур М.Н., Дыйканов Д.Т., Васильев П.А., Рысенкова К.Д., Александрушкина Н.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Рубцов Ю.П., Шмакова А.А., Евсеева М.Н., Балацкий А.В., Семин Е.В., Ростовцева А.И., Скрыбина М.Н., Макаревич П.И.

Клеточные линии представляют собой удобные модели для изучения сложных биологических систем, однако большинство из них (например, HEK293, NIH/3T3, Neuro2a, HepG2) является анеуплоидными. Любая клетка в такой популяции имеет индивидуальную «дозу» каждой из хромосом и различное число потенциально целевых аллелей (обычно от 0 до 6), что делает их чрезвычайно гетерогенными как по геному, так и по фенотипу и практически исключает возможность использования потомства отдельных клонов для изучения сложных клеточных процессов.

Данный протокол ориентирован на получение популяций анеуплоидных клеток с подавленной экспрессией целевых генов. Повторная модификация генома линейных клеток по нашим данным увеличивает эффективность «выключения» целевых генов и практически не влияет на точность геномной модификации. Клетки полученной популяции являются настолько же гетерогенными, как и клетки исходной популяции, а эффекты, обусловленные различной «дозой» генов в отдельных клетках (т.н. «клональный эффект»), нивелируются. Работоспособность данного протокола была неоднократно подтверждена получением клеточных линий (HeLa, NIH/3T3, Neuro2a, HepG2, HaCaT) с подавленной экспрессией широкого спектра белков (транскрипционных факторов, рецепторов и ферментов).

Глава 16

Внесение протяженных трактов тринуклеотидных повторов в геном человека для моделирования болезни Хантингтона *in vitro*

Малахова А.А., Маланханова Т.Б., Сорокин М.А.

При изучении нейродегенеративных заболеваний исследователи сталкиваются со следующими проблемами: ограниченная доступность материала и позднее начало клинического проявления. Клеточные модели наследственных заболеваний позволяют

решить вышеупомянутые проблемы, предоставляя хорошую возможность для изучения молекулярных механизмов развития патологии *in vitro*. Новые подходы для редактирования генома дают возможность создавать изогенные пары клеточных линий, обеспечивая адекватный контроль для исследований. В данной главе описано применение технологии CRISPR/Cas9 для внесения в геном клеток человека динамической мутации – экспансии тандемных тринуклеотидных повторов CAG, вызывающей наследственное нейродегенеративное заболевание – болезнь Хантингтона.

Глава 17

Создание линий клеток HEK293A, несущих трансген программируемой нуклеазы AsCpf1 (Cas12a) с управляемой транскрипцией

Коваленко В.Р.

В настоящее время активно проводится поиск альтернативных CRISPR-систем, тестирование CRISPR-ассоциированных нуклеаз с новыми свойствами, разрабатываются протоколы более эффективной доставки компонентов системы в клетку. Для выявления особенностей работы новых систем редактирования, подбора направляющих РНК необходимы такие модели, которые позволяли бы стабилизировать условия, в которых проводится эксперимент. Например, тестировать направляющие РНК в клетках такой линии, которая бы стабильно экспрессировала CRISPR-ассоциированную нуклеазу. В данной статье описан протокол получения клеток линии HEK293A, несущих доксициклин-управляемый трансген нуклеазы AsCpf1 (Cas12a).

Глава 18

Нокаут генов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека при помощи системы CRISPR/Cas9 и отбор клонов при помощи различных методов скрининга

Дашинимаев Э.Б., Артюхов А.С., Мещерякова Н.В., Василенко Ю.С., Гольцова А.С., Щепетов Д.М., Чичерин И.В., Воротеляк Е.А., Васильев А.В.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека являются удобным и перспективным ресурсом клеток, поскольку ИПСК можно дифференцировать практически во все типы стволовых и прогениторных клеток взрослого организма. Данное свойство можно использовать в различных областях регенеративной медицины и фундаментальной клеточной биологии. В связи с бурным развитием систем редактирования генома, а именно CRISPR/Cas9, стали актуальны методы нокаутирования различных генов в культурах клеток, в том числе и в ИПСК. Так, например, нокаут различных генов в ИПСК поможет выявить роль этих генов в процессах развития и дифференцировки. Однако, учитывая особенности культивирования ИПСК *in vitro*, например, обычно низкую эффективность трансфекции, крайне низкую способность к клонированию малым разведением, а также их свойство расти в плотных колониях, получение отдельных клонированных линий ИПСК с нужной мутацией представляет собой определенную проблему. В данной статье мы постарались суммировать несколько методов (электропорация, клеточный сортирование, скрининг клонов, в т.ч. при помощи цифрового капельного ПЦР) в один протокол получения линий ИПСК с нокаутированными генами.

Глава 19

Получение делеции *INT6/EIF3E* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9

Живень М.К., Смирнова А.М., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Захарова И.С.

Фактор, индуцируемый при гипоксии 2 альфа ($HIF2\alpha$), участвует в адаптации клеток к гипоксическим условиям с помощью регуляции генов, вовлеченных в процессы метаболизма, пролиферации, клеточной миграции. Кроме того, $HIF2\alpha$ индуцирует спектр ангиогенных транскрипционных факторов, которые участвуют в формировании сосудов не только в эмбриональном развитии, но и в постнатальном периоде. Было показано, что $HIF2\alpha$ играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности и пролиферации в эмбриональных стволовых клетках человека в условиях гипоксии.

Основным ингибитором в нормоксических условиях $HIF2\alpha$ является субъединица E эукариотического фактора инициации трансляции (*INT6/EIF3E*). Нокаут *INT6/EIF3E* способствует активации и стабилизации ядерного $HIF2\alpha$ в условиях нормоксии. Вследствие нокаута клетка приобретает псевдогипоксический фенотип, что существенно влияет на функциональные и морфологические свойства плюрипотентных клеток. Использование системы CRISPR/Cas9 открывает широкие возможности для редактирования генома и регуляции экспрессии генов. С помощью данной системы можно создать клеточные линии с нокаутом по определенному гену. Целью нашего исследования является получение линий ИПСК с нокаутным *INT6/EIF3E* и стабилизация $HIF2\alpha$ в нормоксических условиях.

Глава 20

Создание трансгенных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, предназначенных для изучения молекулярно-генетических механизмов патогенеза болезни Паркинсона

Шарипова Д.В., Байрамова Э.М., Коваленко В.Р., Закиян С.М., Медведев С.П.

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Развитие заболевания связано с гибелью нейронов, в основном черной субстанции головного мозга, которые продуцируют нейромедиатор дофамин. Недостаточность дофамина вызывает целый набор тяжелых симптомов, среди которых брадикинезия, ригидность мышц и тремор, что приводит к инвалидизации пациентов. Клиническая и генетическая гетерогенность заболевания приводит к большим трудностям при разработке эффективных лекарственных средств против болезни Паркинсона. Для обеспечения устойчивого развития технологий поиска перспективных лекарственных препаратов против БП необходимо создавать модельные системы, которые бы учитывали персональные особенности геномов пациентов и в то же время позволяли проводить исследования на релевантных типах клеток, в случае БП на дофаминергических нейронах. В данной главе описана методика создания системы для доксициклин-индуцируемой экспрессии трансгенов, предназначенных для исследования молекулярно-генетических механизмов патогенеза болезни Паркинсона, в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках.

Глава 21

Внесение трансгенов в *safe-harbor* локус *AAVSI* генома индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов

Устьянцева Е.И.

Редактирование генома с использованием технологии CRISPR/Cas9 в последние годы стало особенно популярным в различных областях исследований: от изучения фундаментальных биологических процессов до генной терапии. Направленное редактирование генома стволовых клеток особенно интересно, поскольку последние могут служить источником как для клеточной терапии, так и для моделирования различных заболеваний. Известно, что технически редактирование генома стволовых клеток представляет собой непростую задачу: низкая эффективность доставки компонентов CRISPR/Cas9 в клетки, низкая выживаемость и, как следствие, общая невысокая эффективность редактирования. В данной главе мы приводим протокол эффективного получения трансгенных линий ИПСК, содержащих протяженные встройки в локусе *AAVS1*, с помощью CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов, а также описываем процедуру подготовки донорных плазмид, позволяющую увеличить вероятность встройки целевой последовательности в геном.

Глава 22

Селекция отредактированных клеток методом SORTS

Мазуров Д.В.

Выделение и верификация клеток с нокаутом и другими модификациями генов занимает существенное время в процедуре редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9. Наиболее часто используют клонирование или интеграцию маркерных генов на основе флуоресценции или устойчивости к антибиотикам. Первый подход является затратным по времени, а второй – еще и по стоимости, так как под каждый ген необходимо конструировать донорный вектор. Мы разработали простой и эффективный протокол под названием SORTS (Surface Oligopeptide knockin for Rapid Target Selection), позволяющий методом FACS-сортировки быстро выделять клетки с нокаутом и прочими модификациями генома. SORTS особенно полезен в случае нокаута по внутриклеточному или секретируемому белку, когда отсортировать живые клетки по поверхностному маркеру не представляется возможным. В основе метода лежит биаллельный нокин эпитопных тагов HA и Flag, доставляемых на внешнюю мембрану клетки в контексте короткого GPI-белка CD52. Общая длина кодирующей и терминирующей частей трансгена не превышает 250 п.н., что позволяет включать плечи гомологии размером ~100 нуклеотидов в состав синтетических олигонуклеотидов и быстро генерировать под каждый ген донорную ДНК методом ПЦР. Вся процедура получения целевых отредактированных клеток, включая конструирование направляющих РНК, ПЦР-амплификацию донора, нокин, окрашивание и сортировку клеток занимает не более 2-х недель.

Глава 23

Применение библиотеки нокаутов GeCKO для идентификации моноклональных антител и изучения ретровирусов человека

Зотова А.А., Мазуров Д.В.

Полногеномные функциональные скрининги направлены на поиск и характеристику новых клеточных факторов, вовлеченных в тот или иной процесс. С появлением технологии CRISPR/Cas9, где нуклеаза направляется к месту таргетирования ДНК с помощью направляющей РНК, стало возможным создание на их основе библиотек и проведение скрининговых тестов. В 2014 г. была описана одна из таких библиотек –

библиотека нокаутов GeCKO (genome-scale CRISPR knockout), содержащая более 100 тысяч специфических последовательностей направляющих РНК для нокаутирования практически всех (18080) активно транскрибируемых генов. В данной главе описаны принципы отбора клеток библиотеки GeCKO в разных вариантах скрининга, а также показано применение библиотеки для идентификации мишени неизвестного антитела и поиска факторов, вовлеченных в репликацию ретровирусов. Начиная с получения библиотеки, скрининг занимает 6-8 недель, включая обработку данных и верификацию результатов.

Глава 24

***In vitro* синтез sgRNA для систем геномного редактирования CRISPR/Cas9**

Журавлев Е.С., Матвеева А.М., Степанов Г.А.

На сегодняшний день система CRISPR/Cas9 представляет наиболее эффективный и распространенный инструмент решения задач в области геномного редактирования.

Существует несколько стратегий реализации технологии CRISPR/Cas9. Одна из стратегий предполагает использование предформированных каталитически активных рибонуклеопротеидных комплексов белка Cas9 с направляющими РНК. В большинстве применений целевое действие нуклеазы Cas9 обеспечивают химически или ферментативно синтезированные химерные sgRNA, содержащие в своей структуре функциональные последовательности crRNA и tracrRNA. Применение синтетических sgRNA позволяет включать в структуру молекулы модифицированные компоненты, корректирующие различные свойства sgRNA.

В этом протоколе описаны материалы и процедуры, необходимые для ферментативного синтеза как немодифицированных sgRNA, так и модифицированных аналогов, обладающих сниженным иммуностимулирующим и цитотоксическим действием за счет включения в их структуру природных модифицированных мономеров: псевдоуридина (Ψ) и 5-метилцитидина (m5C). Аналогичный протокол может быть применен для корректировки свойств направляющих РНК других систем редактирования генома.

Глава 25

Получение модифицированных ДНК-субстратов для исследования механизма действия нуклеаз геномного редактирования

Вохтанцев И.П., Ендуткин А.В., Кулишова Л.М., Торгашева Н.А., Дианов Г.Л., Жарков Д.О.

Представлен протокол получения плазмидных субстратов, содержащих модифицированные нуклеотидные звенья в строго определенных позициях. Протокол оптимизирован для получения субстратов, использованных для изучения механизма действия РНК-адресуемой нуклеазы Cas9, но может быть использован в любых системах, где необходима точная модификация плазмидной ДНК неканоническими нуклеотидами.

Глава 26

Получение рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов для редактирования генома

Прокофьев А.В., Юрлова Е.В., Андреева Е.Д., Стуканёв В., Голомидов И.М., Аббат А.В., Гершович П.М.

Исследования последних лет показывают, что рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы (rAAV) могут быть эффективно использованы не только как средство доставки генов, но и как инструмент для генетического редактирования. Получение препаратов rAAV в лабораторном формате по-прежнему остается нетривиальной задачей и требует проведения значительных оптимизаций для получения rAAV нужных титров в культуре клеток-продуцентов, достижения желаемых выходов очистки rAAV препаратов, а также необходимого уровня точности методов титрования rAAV. В этой главе мы описываем протоколы, необходимые для получения rAAV в лабораторном формате, а также рассказываем об особенностях титрования препаратов на основе rAAV.