

Генетическая модификация и маркировка клеточных линий

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Северо-Западный медицинский учебный центр последипломного образования, Санкт-Петербург

Резюме. Несмотря на большие достижения в изучении биологии стволовых клеток, темных пятен по-прежнему остается немало. Решить данную проблему помогают методы генетической модификации, которые могут быть использованы для отслеживания линий различных клеток, в первую очередь стволовых. Рассмотрены различные методы биотехнологических исследований, позволяющие оценить варианты внедрения новых генов в клетки и даже целые организмы, а также методы контроля их экспрессии во времени и пространстве, их активацию, дифференцировку и снижение функциональной активности, экспрессию нескольких целевых генов. Описаны варианты с мультицистронными векторами, кодирующими несколько белков. Охарактеризованы варианты внедрения генов с использованием плазмид, электропорации, их недостатки и преимущества. Перспективным и наиболее безопасным является ретровирусный вектор с использованием лентивирусных переносчиков, способных генерировать дополнительные копии самого себя, что является очень важным в сфере безопасности биотехнологии. Для получения вирусного вектора используется линия упаковочных клеток, обычно 293Т-клетки. Охарактеризованы перспективы использования аденовирусного и аденоассоциированного векторов. Достижением современных биотехнологических методов является система коротких палиндромных повторов, расположенных группами, являющаяся уникальным инструментом редактирования генома. В основе этой системы лежит процесс вырезания последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты, являющихся постоянными и поддерживающимися клетками независимо от последующих делений или изменения состояния. Система позволяет генетикам и медицинским исследователям редактировать части генома путем удаления, добавления или изменения последовательных участков дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Важной проблемой биотехнологических методов являются способы контроля экспрессии трансгенов. Сегодня достаточно эффективным является управление экспрессией с помощью фактора, присутствующего в самом векторе доставки гена и активного только в определенном типе клеток. Для регулирования экспрессии трансгена используется эндонуклеаза бактериофага P1, которая разрезает дезоксирибонуклеиновую кислоту только на конкретных участках. Данная система внедрена как в эукариотических, так и в прокариотических системах.

Ключевые слова: стволовая клетка, факторы транскрипции, гены, фенотип, клеточная дифференцировка, модификации, мутации, хромосома, плазмиды, нуклеиновые кислоты, транслокация.

Генетическая модификация имеет центральное значение для большей части современных биомедицинских исследований. Известны основные методы внедрения новых генов в клетки и даже целые организмы, а также методы контроля их экспрессии во времени и пространстве, то есть во время активации, дифференцировки и снижения их функциональной активности. Понятно, что методы генетической модификации могут быть использованы для отслеживания линий различных клеток, но предметом особого интереса, конечно, является биология стволовых клеток (СК) [3, 14].

В биотехнологии часто требуется осуществить одновременную экспрессию нескольких целевых генов. С этой целью активно разрабатываются мультицистронные векторы, кодирующие несколько белков. Наиболее часто в коммерчески доступных векторах такого типа используют различные варианты внутреннего сайта посадки рибосом (BCIP) вируса энцефаломиокардита (internal site of the ribosome – RSD) virus encephalomyocarditis (*IRES EMCV*). Однако многие исследователи считают более перспективным использование бицистронных векторов на основе последовательностей, кодирующих саморасщепляющиеся 2А-пептиды [12, 18].

Другой перспективный подход создания мультицистронных векторов основан на использовании в гибридных

белках 2А-пептидов или цис-регуляторных элементов (cisacting hydrolase element – CHYSEL), регулирующих транскрипцию соседних генов. Эти пептиды кодируются 2А- последовательностями, разделяющими структурные и неструктурные гены в геноме многих пикорнавирусов, и имеют размер около 20 аминокислотных остатков. Их N-концевые аминокислотные участки сильно различаются у разных представителей пикорнавирусов, однако на С-конце у всех 2А- пептидов содержится консервативный фрагмент Asn – Pro – Gly – Pro (аспарагин – пролин – глицин – пролин), необходимый для процессинга 2А-пептида. Этот процесс происходит котрансляционно и состоит в том, что пептидная связь между С-концевыми остатками Gly- и Pro-2А пептида не образуется. В результате этого с одной рамки считывания (РС) образуется два разных белковых продукта с примерным соотношением 1:1, при этом первый белок несет около 19 дополнительных аминокислотных остатков на С-конце, а второй – остаток Pro на N-конце [19, 24].

Высокий уровень коэкспрессии трансгенов, возможность коэкспрессии трех и более цистронов и небольшой размер 2А-последовательностей открывают широкие перспективы использования на их основе цистронных векторов. Однако векторам на основе 2А-последовательностей свойственны и некоторые недостатки. Процессинг 2А-пептидов происходит не со

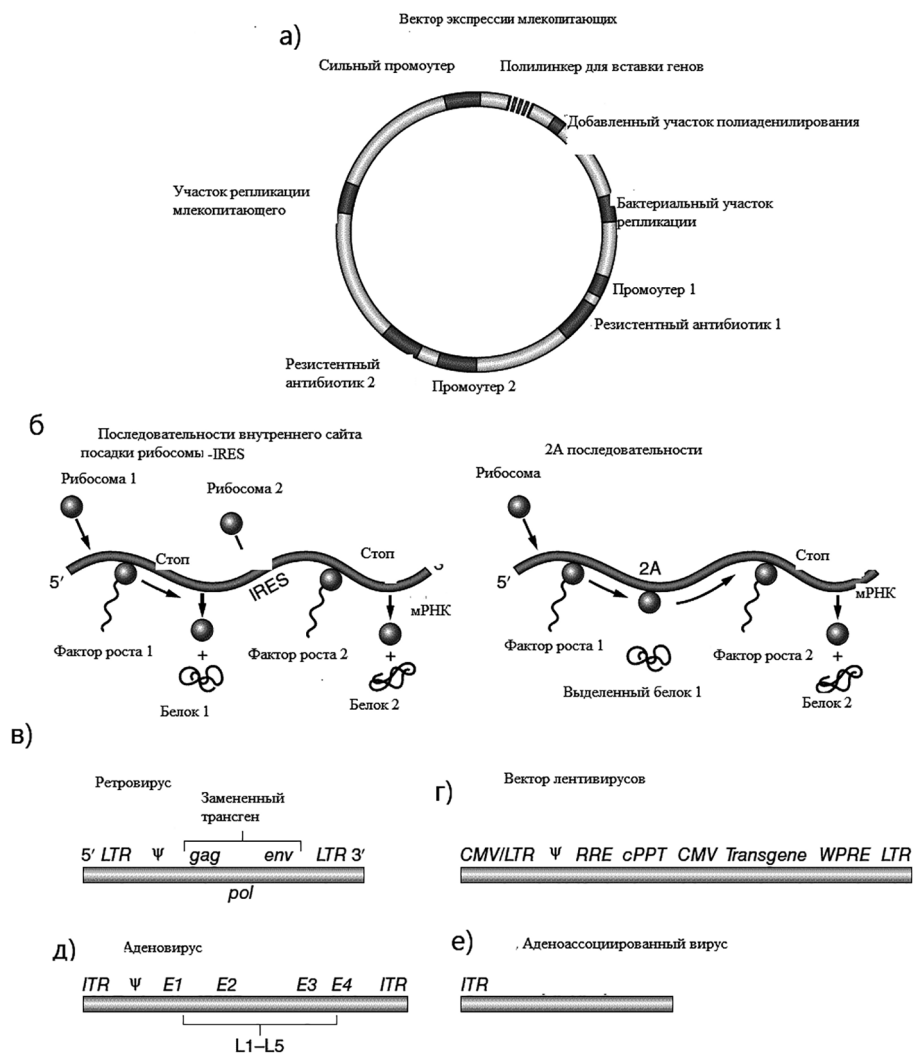


Рис. 1. Схема строения бицистронных векторов на ВСПР и 2A- последовательностей: а – экспрессия плазмид млекопитающих; б – внутренний участок посадки рибосом и 2A-последовательности; в – геном ретровируса. LTR – long terminal repeat (длинные концевые повторы). В векторе гены *gag* (капсидный белок), *pol* (обратная транскриптаза) и *env* (оболочечный белок) заменяются интересующим геном; г – вектор лентивирусов. RRE – Rep response element (элемент ответа), cPPT – polypurine region (область полипурина), CMV – promoter for gene of interest (промотор гена «интереса»), WPRE – enhancer sequence (усиливающие последовательности); д – ITR – inverted terminal repeat (инвертированные терминальные повторы), E1–4 are early expressed genes (ранняя экспрессия генов, L1–5 are late genes (поздняя экспрессия генов). В векторе первого поколения ген E1, необходимый для репликации, заменяется вставкой; е – геном AAV. Повтор ITR. Два гена вектора заменяются геном «интереса»

сто процентной эффективностью, поэтому в клетках образуется небольшое количество нерасщепленной фракции двух белков. Кроме того, в некоторых случаях отмечается значительное увеличение количества нерасщепленных фракций при внедрении в последовательности аминокислот транспортных сигналов в эндоплазматическом ретикулуме. Эффективность расщепления повышается при использовании линкерной последовательности Gly – Ser – Gly (глицин – серотонин – глицин) или Ser – Gly – Ser – Gly на N-конце 2A-пептида. Внедрение такого линкера позволяет уменьшить влияние последовательности предшествующего белка на процессинг 2A-пептида [21, 25].

Гены, введенные в клетки или организмы, часто называют трансгенами. Внедрение генов в клетки культуры

тканей относительно просто. Интересующий исследователей ген должен быть клонирован в вектор экспрессии млекопитающих (рис. 1). Это плазмида, содержащая мощный биопротекторный потенциал млекопитающих, таких как цитомегаловирус (ЦМВ), рядом с несколькими участками клонирования, где интересующий ген внедряется. Ниже участков клонирования находятся дополнительные последовательности вируса полиомиелита от вируса SV40. Это добавляет к вирусу полиомиелита переписанную матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК), полученную из трансгена, что стабилизирует мРНК и позволяет переносить ее в цитоплазму. Представленная плазмида подготовлена для встраивания в бактериальную клетку; чтобы это было возможным,

плазмида содержит репликации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с локусом бактериальной антибиотикорезистентности [9, 22].

Бактерии, содержащие плазмиды, выращиваются в присутствии выбранного антибиотика. Лизированные бактерии и их плазмиды подвергаются очистке с помощью фирменного комплекта. Это позволяет получить образцы чистой плазмидной ДНК, которые и могут быть введены в соответствующие клетки. Процесс введения ДНК называется трансфекцией и обычно осуществляется с помощью трансфекционного реагента, который является положительно заряженным липидом, связывающимся с ДНК и генерирующим микроскопические частицы, попадающие в клетку путем контакта с плазматической мембраной. Оказавшись внутри меченого участка, ДНК необходимо найти свой путь в ядро для того, чтобы быть экспрессированной. Затем она транскрибируется в мРНК, как эндогенные гены, а мРНК экспортируется в цитоплазму, где она переводится в белок [10, 17].

Экспрессия трансгена выявляется путем окрашивания антител, или промотированием белкового продукта, или же включением другого гена в ту же плазмиду, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein – GFP). Большинство экспериментов трансфекции дают транзиторную, а не постоянную экспрессию, потому что плазмидная ДНК не интегрируется в хромосомную ДНК клетки и в конечном итоге становится деградированной или разрушенной ростом клеток. Тем не менее можно получить и постоянные трансфекты, выбрав для интеграции ДНК с помощью антибиотикорезистентного гена плазмид другого млекопитающего. Это часто бывает выгодно, чтобы иметь возможность получить более одного белка из той же конструкции ДНК. Например, коэкспрессия флуоресцентного белка указывает, какие клетки на самом деле представляют трансген. Обычно это достигается путем кодирования их в одном блоке транскрипции. В одном из методов две последовательности разделены внутренней рибосомной последовательностью (IRES), которая позволяет рибосомам начать перевод второго полипептида независимо от стоп-кодона в конце первого полипептида. Второй широко используемый метод заключается в использовании последовательности 2А-вируса болезни Ньюкасла. В этом методе трансген переводится в длинный полипептид, который затем саморасплетается в два компонента последовательностей 2А. В благоприятных условиях клеточные линии установленных культур тканей имеют высокие уровни трансфекции и экспрессии, но для первичных клеточных линий, полученных от животных или от людей, они, как правило, гораздо ниже. Поэтому трансфекция плазмид в клеточные ткани животных не является эффективной и практически не используется [5, 11].

Альтернативным методом введения генов является их доставка с помощью электрического тока – электропорация. Электрическое воздействие (империаль) формирует небольшое отверстие в мембране клетки, через которое вводится ДНК. Отверстия запечатываются, но при этом электропорация может повредить другие клетки. Обыч-

но электропорация используется для клеток, которые не могут быть трансфицированы, или для эмбрионов. Гораздо чаще используются вирусы для доставки генов внутрь клетки. Этот процесс называется трансдукцией. Вирусные векторы обычно дают более высокий процент трансдукции клеток, так как они имеют специализированные системы для проникновения в клетку. Для этого используется достаточно большое количество вирусов. Чаще всего это простые РНК-вирусы, кодирующие всего три белка: обратную транскриптазу (pol), капсидный белок (gag) и оболочечный белок (env). Последовательности кодируются в окружении длинных терминальных повторов (LTRs), которые являются и промоутером, и индуктором последовательностей для транскрипции копии ДНК вирусной РНК. Вирусная частица содержит две копии РНК плюс обратную транскриптазу, капсидные белки, окруженные цитоплазмой клетки хозяина. Оболочечный белок встраивается в мембрану клетки хозяина. В зависимости от специфичности оболочечных белков вирусная частица может инфицировать клетку, вводя свою РНК, которая транскрибируется в ДНК вируса. Полученная одноцепочечная ДНК преобразуется в двухцепочечную ДНК и интегрируется в геном клетки хозяина. Такая ретровирусная интеграция ДНК обычно происходит в область генома клетки, в которой активны эндогенные гены. После интеграции вирусная ДНК становится провирусом. Он функционирует как нормальный ген генерации новых мРНК, копируя себя с помощью 5'LTR в качестве промоутера. В ретровирусном векторе ген «интереса» иногда сопровождается собственным промоутером и клонируется между LTRs, заменяя gag, pol и env гены вируса. Ретровирусы могут принимать вставки размером до 8 кб [13, 18, 21].

Поскольку в ретровирусах отсутствуют ключевые компоненты для репликации, ретровирусный вектор не может генерировать дополнительные копии самого себя, что является очень важным в сфере безопасности биотехнологических исследований. Для получения вирусного вектора используется линия упаковочных клеток, обычно 293Т-клетки (293Т-клетки используются для производства вирусов или наработки белков). Для того чтобы их можно было культивировать бесконечно, клетки нуждаются в иммортализации (получение стабильной, способной к неограниченному размножению («бессмертной») клеточной линии из клеток с ограниченным временем жизни в культуре). Это было осуществлено с помощью инфицирования их аденовирусами пятого серотипа. После отбора большого количества клонов был найден тот, кто стал прародителем клеточной линии – 293Т-клетки, – у производных клеток почек эмбриона человека 293 (Human Embryonic Kidney – HEK293), которые содержат ген SV40 T, позволяющий реплицировать плазмиды, постоянно синтезирующие вирусные белки E1A и E1B, что и дает клеткам бессмертие, а также изменяет метаболизм клетки [4, 8]. Позднее HEK293 были трансфицированы еще и Т-антигеном SV-40 вируса. Этот белок сам по себе может иммортализировать клетки, но в случае с уже бессмертными HEK293 он добавил возможность эпизодической репликации любых

плазмид, содержащих сайт инициации репликации, ориджин репликации (origin of replication) – участок в молекуле ДНК, на котором иницируется ее синтез – Ori-репликон SV40. В результате плазмиды сами мультиплицируются в клетках и выход рекомбинантных белков будет на порядок выше. Поэтому этот вид клеток часто используют для получения рекомбинантных ретровирусов [5, 20]. В эти клетки трансфицируются три различных плазмиды, кодирующие следующие компоненты: 1) вирусный вектор, включая LTRs, ген «интереса» и последовательность, кодирующую мембранный поверхностный белок, под контролем; 2) плазмиду кодирования генов *gag* и *pol* для сборки белков капсида и синтеза ДНК; 3) плазмиду, кодирующую оболочечные белки. Это, как правило, не оригинальные ретровирусные оболочечные белки. Вместо них используется G-белок вируса везикулярного стоматита (Vesicular Stomatitis Virus – VSV-G), который может контаминировать большинство типов клеток. После того, как три плазмиды были введены в линию упаковочных клеток, они будут дополнять друг друга, а клетки выделяют вирусные частицы, содержащие дефектный геном РНК внутри мембранной оболочки плазмы, содержащей белок VSV-G [16, 24].

После инфицирования, или, точнее, трансдукции клеток-мишеней, векторная РНК становится обратной транскрибированной, двухцепочечной и часто интегрированной в геном. Ген интереса транскрибируется из 5' LTR или от собственного промотора, если это было включено в конструкцию, для производства мРНК, которая транспортируется в цитоплазму, а затем переводится в белок. Однако через некоторое время экспрессия генов от интегрированных ретровирусов может быть снижена метилированием ДНК и другими эпигенетическими изменениями в месте интеграции. Несколько более сложным типом ретровирусов, подходящих для доставки генов, являются лентивирусы (см. рис. 1). Они отличаются от других ретровирусов наличием еще трех генов, способных преобразовывать неделящиеся, а также делящиеся клетки [18, 25].

Лентивирусные переносчики, основанные на вирусе иммунодефицита человека (ВИЧ), обычно имеют различные дополнительные функции безопасности, чтобы ограничить вероятность сборки компетентного вируса путем рекомбинации во время процесса сборки. Так, отбор антибиотиков млекопитающих осуществляется с помощью встроенного вектора, позволяющего отбирать клетки, которые успешно интегрировали его в геном и были резистентны к ВИЧ. Аденовирус имеет двухцепочечную ДНК с широким диапазоном хостов и способностью инфицировать как реплицирующие, так и нереплицирующие клетки [2, 18].

Аденовирусные векторы основаны на серотипе 5 аденовируса человека (см. рис. 1). Они относительно легко готовятся при высоком титре и часто дают хорошие результаты как в клеточных линиях, так и в организме животных, хотя высокая иммуногенность и ограничивает их использование *in vivo*. Аденовирус не интегрируется в геном и поэтому используется для генерации преходящей экспрессии высокого уровня.

Как и ретровирусы, он может включать частицы до 8 кб. Поскольку большой размер вируса затрудняет манипуляцию *in vitro*, аденовирусные векторы готовятся путем рекомбинации бактерий между каркасом векторной плазмиды, которой не хватает гена E1, необходимого для репликации, и перемещающейся плазмидой, содержащей ген «интереса». В результате репликации дефектный вектор внедряется в линии оболочечных клеток HEK293, который и восполняет недостающие функции гена E1. Частицы вируса выделяются в питательную среду и могут быть сконцентрированы хлоридом цезия в ультрацентрифуге или с помощью фирменного комплекта очистки. Аденовирус попадает в клетки-мишени через коксаки-аденовирусный рецептор (Coxsackie and Adenovirus Receptor – CAR), который широко представлен в различных тканях млекопитающих [5, 10].

Другим вектором может быть одноцепочечный ДНК, содержащий аденоассоциированный вирус (AAV), отличающийся от аденовируса меньшей иммуногенностью, и поэтому его предпочтительнее использовать в генной терапии. Как и ретровирусы, он используется в дефектной форме репликации путем клонирования гена «интереса» в вирусный скелет и трансформации их в клеточную линию вместе с дополнительными плазмидами, кодирующими другие необходимые функции. Основным недостатком AAV является то, что его вместимость чужеродных частиц ограничена примерно 4,5 кб. Вирус дикого типа AAV интегрируется в геном хозяина на определенном участке под названием сайт интеграции аденоассоциированного вируса 1 (Adeno-associated virus integration site – AAVS1). Однако векторы доставки генов на основе AAV обычно не интегрируются в геном хозяина, а сохраняются в качестве долгосрочной перспективы, как и автономно реплицирующие элементы (эписомы) в ядре клетки [1, 14].

Существуют различные способы контроля экспрессии трансгенов. Самое простое – управлять экспрессией с помощью промотора, присутствующего в самом векторе доставки гена, который активен только в определенном типе клеток. Например, промотор трансферрина активен только в гепатоцитах, а промотор сердечного актина активен только в сердечных и скелетных мышечных клетках. Тем не менее специфичность промотора не обязательно гарантируется, если среда сайта вставки сильно отличается от эндогенного локуса, поэтому ее необходимо проверять в каждом конкретном случае [7, 15].

Очень важно иметь возможность регулировать время деятельности введенного гена. Существуют различные варианты контроля. Наиболее популярный основан на опероне тетрациклина *E. coli*, который был значительно изменен для возможности его использования в системах млекопитающих (рис. 2а). Внешним регулятором является тетрациклин – аналог доксициклина, который может быть добавлен в питательную среду для культур клеток или в питьевую воду для лабораторных животных. Два компонента ДНК должны быть введены в клетки или животным: ген «интереса», контролируемый промотором, называемый «тетрациклиновый элемент от-

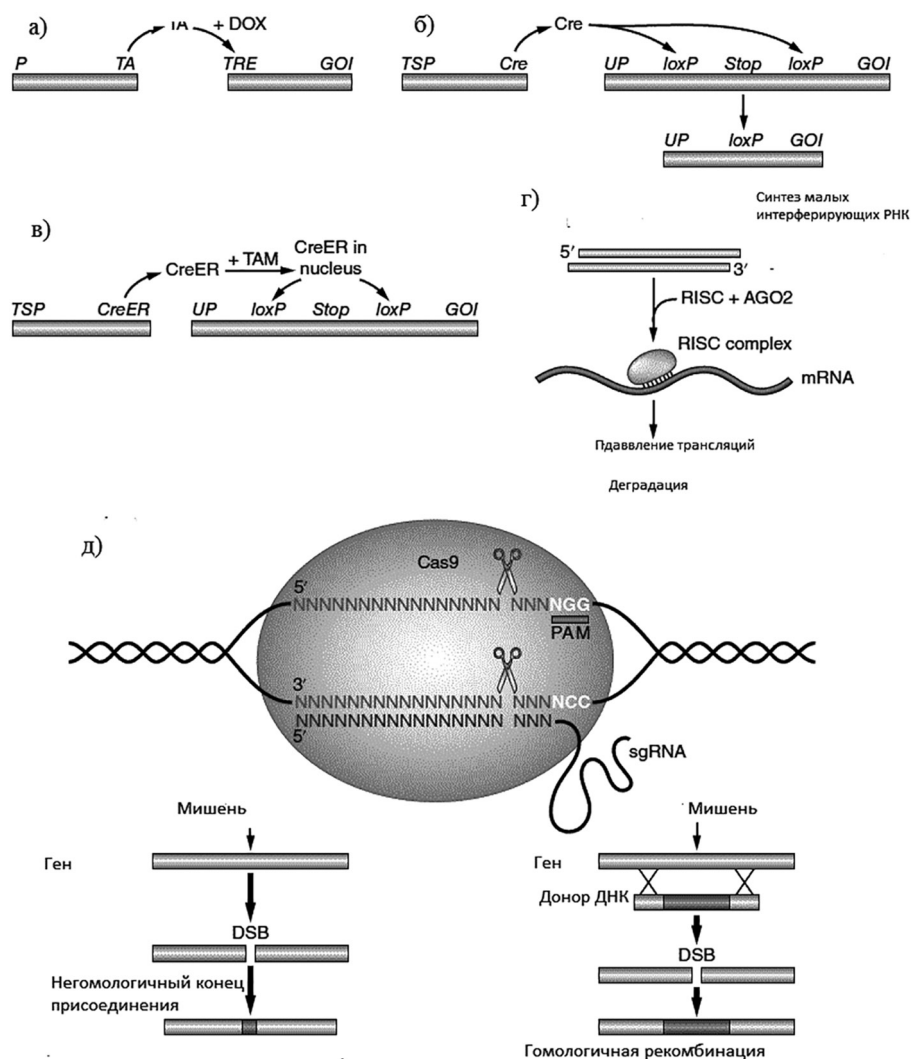


Рис. 2. Варианты транскрипции: а — P — промотор; TA — тетрациклиновый активатор; DOX — доксициклин; TRE — элемент реакции Tet; GOI — ген «интереса»; б — TSP — тканевый промотор; UP — убиквитарный промотор; в — TAM — тамоксифен; г — RISC РНК индуцированный подавляющий комплекс; AGO2 — Argonaute 2 (эндонуклеаза, белковый комплекс); д — CRISPR-Cas9. PAM — смежный мотив протосканера, sgRNA — одноцепочечная РНК, DSB — двухцепочечный разрыв; Non-homologous end joining (NHEJ) — нехомологичный конец присоединения; homologous recombination (HR) — гомологичная рекомбинация

вета» (Tet Response Element – TRE), и ген белка, который регулирует экспрессию в сочетании с доксициклином [18, 24].

Этот регуляторный белок, являющийся активатором TRE, значительно изменен по сравнению с оригинальными белками *E. coli*. В индуцируемой системе добавление доксициклина в клетки активирует элемент TRE, приводящий к активированию транскрипции гена «интереса». В течение нескольких лет TRE-система была улучшена и в настоящее время является самой популярной из доступных индуцирующих систем. Важной составляющей системы является эндонуклеаза бактериофага P1, которая разрезает ДНК только на конкретных участках, называемых loxP-сайтами (локус кроссинговера в фаге P1). Он используется для регулирования экспрессии трансгена [23, 25].

Ген «интереса» контролируется мощным промотором с возможностью ингибирования экспрессии на участках loxP-сайтов. Ингибирование последовательностей осуществляется транскрипционным стоп-сигналом. Когда промотор специфической ткани активен, образуется Cre-фермент (рекомбинация Cre-Lox — технология, используемая для удаления, вставок, транслокаций и инверсий на определенных участках ДНК клеток). Это позволяет модификациям ДНК быть направленными на определенный тип клеток или быть вызванными конкретным внешним стимулом. Эта технология внедрена как в эукариотических, так и в прокариотических системах. Фрагменты ДНК являются метками loxP, указывающими белку Cre место, в котором необходимо разрезать ДНК. Фрагменты loxP можно встроить в хромосому одной мыши и в другое место той

же хромосомы другой мыши. Потомки, рождающиеся в результате их скрещивания, будут иметь два фрагмента loxP в одной хромосоме, а фермент Cre будет вырезать участок хромосомы между двумя метками loxP [20, 22]. Мышей с поврежденной таким образом хромосомой скрещивают с нормальными животными, в результате чего с вероятностью 10% появляются особи, в геноме которых желаемая последовательность ДНК удалена или продублирована. Это позволяет оценить последствия такой мутации и выявить роль, выполняемую изучаемым фрагментом ДНК в организме. При нахождении участков loxP-сайтов они вырезаются, таким образом осуществляется представление гена интереса (см. рис. 26). Ключевой особенностью ранее описанной CRISPR-системы (также известной как «CRISPR-Cas9», от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, расположенные группами, являющейся уникальным инструментом редактирования генома) является то, что она основана на вырезании последовательностей ДНК, которые являются постоянными и будут поддерживаться клетками независимо от последующих делений или изменения состояния. Система позволяет генетикам и медицинским исследователям редактировать части генома путем удаления, добавления или изменения последовательных участков ДНК. Более того, CRISPR быстрее, дешевле и точнее, чем все предыдущие известные методы редактирования ДНК и имеет широкий спектр потенциальных применений [6, 9, 11, 16, 21].

На данный момент технология CRISPR является самым простым, универсальным и точным методом генетической манипуляции. Система CRISPR-Cas9 состоит из двух ключевых молекул, которые осуществляют изменение (мутацию) в ДНК. Это фермент, называемый «Cas9», данная молекула CRISPR действует как пара «молекулярных ножниц». Cas9 может вырезать нити ДНК в определенном месте генома, чтобы затем можно было добавить или удалить фрагменты ДНК. Вторая молекула – часть гидовой РНК (гРНК), которая состоит из небольшого фрагмента последовательностей РНК (длиной около 20 оснований), расположенного в более длинном участке ДНК. Этот участок связывается с ДНК и РНК для «направления» Cas9 в правую часть генома [9, 16].

Дальнейший уровень регулирования обеспечивается с помощью модифицированной сайт-специфической рекомбиназной системы (cyclic recombinase – Cre) (CreER), которая включает в себя гормон связывания домена рецептора эстрогена (ER). Как и некоторые другие рецепторы ядерных гормонов, ER связывается с белком HSP90 и, как правило, изолируется в цитоплазме. В результате ER может мигрировать в ядро, где он связывает ДНК и функционирует как транскрипционный фактор. Обычно он локализуется в цитоплазме, но, когда добавляется подходящий аналог эстрогена (обычно тамоксифен или 5-гидрокситамоксифен), он мигрирует в ядро и может вырезать любые участки loxP-сайтов ДНК (см. рис. 2в). Система CreER широко используется для отслеживания клеточной линии стволовых клеток, специфичных для тканей [11, 21].

Система CreER стала стандартным методом отслеживания линии клеток у млекопитающих. Ее различные варианты могут быть использованы либо для оценки развития, либо для клонального анализа. В сущности метод дает постоянный маркер клеткам, которые имеют определенный активный промотор. Если такие клетки образуют когерентный участок ткани, как это часто бывает в раннем эмбрионе, то маркировка отражает карту развития для мечения, показывая, где участок заканчивается и какие типы клеток он производит. При клональном анализе отдельные клоны могут быть визуализированы, если помечены несколько клеток. Для того чтобы это было более надежно, лучше всего использовать гены «knock-ins». Для достижения этой цели в качестве метки могут использоваться флуоресцентный белок (GFP) или фермент «галактозидаза», легко обнаруживаемые гистохимическим методом. Маркировочный ген белка контролируется промотором Rosa 26, чья нормальная функция заключается в том, чтобы управлять экспрессией транспортной РНК [21, 25].

В настоящее время существует доступный набор линий мышей-репортеров (мыши, которые отмечают клетки, экспрессирующие фермент в любой момент времени, используются для отслеживания клонов и для характеристики вновь сгенерированных мышей, экспрессирующих рекомбиназу из выбранного промотора), которые имеют различные гены, помещенные в сайт локуса Rosa26. Между промотором и областью кодирования находится транскрипционная стоп-последовательность, окруженная сайтами loxP. Фермент CreER вырабатывается клетками, в которых активен его промотор, дозированная маркировка животных осуществляется тамоксифеном (или 5-гидрокситамоксифеном). Это активирует CreER, позволяет вырезать стоп-последовательности и способствует транскрипции репортера. Поскольку конечным результатом является модификация ДНК, она является постоянной и маркировка поддерживается независимо от последующих делений или дифференциации клеток. Доля маркированных клеток зависит от общей дозы тамоксифена, и, как правило, необходимы несколько инъекций тамоксифена, чтобы получить полную маркировку всех клеток. Низкая разовая доза позволяет маркировать лишь небольшую часть клеток, и, пока меченые клетки хорошо дифференцируются, возможно проводить клональный анализ [18, 26]. Применительно к СК он позволяет выявить область ткани, содержащей хотя одну СК. Более сложные версии клональной маркировки связаны с одновременным мечением нескольких клонов разными цветами. Эти методы общеизвестны как методы «Brainbow». Они зависят от использования вариантов loxP-сайта таким образом, что альтернативные вырезания могут происходить в локусе репортера, в итоге приводящего к экспрессии различных цветных белков в зависимости от конкретного вырезания. Метод маркировки линии CreER имеет огромное значение в исследованиях СК. Но, как и у других методов, у него есть свои недостатки. Самый большой заключается в том, что он абсолютно зависит от стабильности промотора [20, 23].

Однако система, в которой используется тамоксифен, достаточно часто имеет побочные эффекты. Так, контроль транскрипции Cre осуществляется только в присутствии доксициклина с помощью системы Tet On. Поэтому очень важна альтернативная система Cre, которая похожа по своим свойствам, но получена от мушки дрозофилы. Это сайт-специфическая рекомбинационная система, кодируемая 2-микронной дрожжевой плазмидой, встречающейся во многих дрожжевых штаммах *Saccharomyces cerevisiae* (flippase recognition target – FRT) FLP/FRT; FLP-белок – член интегрального семейства рекомбиназ, участвующий в контроле копийности 2-микронной дрожжевой плазмиды). FLP-рекомбиназа режет специальные участки FRT. Система FLP/FRT может использоваться в качестве индуцируемой формы FLP, активируемой при лечении тамоксифеном, ингибируя активность гена. Методы введения генов в клетки могут быть использованы для ингибирования конкретных клеточных элементов. Так можно гиперэкспрессировать ген, который кодирует ингибирующий белок. Кроме того, могут быть разработаны и конкретные ингибиторы [6, 8, 10, 13].

Например, транскрипционные факторы обычно содержат связывающий домен ДНК, который блокирует определенные участки в геноме, и домен-эффектор, который активирует или подавляет транскрипцию. Конструкция, не имеющая связывающей области ДНК, часто выступает в качестве доминирующего отрицательного ингибитора, приводящего к секвестированию нормальных кофакторов, необходимых эндогенным факторам для транскрипции. В результате могут образовываться непродуктивные димеры с эндогенным фактором, что часто используется для конкретных экспериментов ингибирования РНК-интерференции (см. рис. 2г). Это основано на использовании эндогенных механизмов для обработки двухцепочечной РНК (dsRNA). После введения в клетки dsRNA расщепляется на 21–23 фрагмента пар оснований, которые включены в подавляющий (связывающий, раскручивающий) комплекс и, если получается совершенное сочетание, расщепляют РНК, содержащую дополнительные последовательности. Длинные молекулы dsRNA могут быть использованы для экспериментов ингибирования генов у беспозвоночных животных и растений, но это не подходит для млекопитающих и других позвоночных, поскольку способствует синтезу интерферонов, блокирующих транскрипцию в целом. Для клеток млекопитающих обычно получают короткие dsRNA, называемые siRNA. Путем химического синтеза их вводят в клетки путем трансфекции. Поскольку молекулы siRNA малы, они часто дают очень высокую эффективность трансфекции по сравнению с плазмидами. В результате экспрессия гена может быть ингибирована в большинстве клеток. dsRNA также может быть закодирована в плазмидах ДНК или вирусах доставки генов, как правило, в виде двух инвертированных комплементарных дополнительных последовательностей, которые в результате самосборки путем гибридизации формируют структуру двойной шпильки, называемой shRNA [9, 16, 21, 22].

В таких векторах экспрессия РНК может регулироваться системами Tet или Cre, обеспечивая дополнительную гибкость в контроле доставки. До тех пор, пока ДНК-мишень содержит последовательности NGG (N – любое азотистое основание, G – гуанин) в 3' конце участка направляющей РНК-гомологии (протосказер смежного мотива или PAM), Cas9 осуществляет двойной разрыв ДНК. Это восстанавливается эндогенным процессом, называемым нехомологичным соединением конца, который скорее всего приведет к небольшим вставкам или удалениям на участке, вызывая мутации РС и инактивацию гена. При наличии экзогенной гомогенной последовательности ДНК существует вероятность того, что двухцепочечный разрыв спровоцирует рекомбинацию, которая создаст модифицированную ДНК, включающую экзогенную последовательность [22, 25].

Это составляет в целом простую и надежную систему для того, чтобы произвести направленные изменения в геномной ДНК. Для этого необходимо ввести в клетки новую последовательность ДНК и две экспрессированные плазмиды, одну кодирующую Cas9, а другую – направляющую РНК под контролем промотора pol-III, который является промотором, пригодным для транскрипции небольших некодирующих РНК (нкРНК – это молекула РНК, которая не переводится в белок). Последовательность ДНК, из которой транскрибируется функциональная нкРНК, часто называют геном РНК. К многочисленным и функционально важным типам нкРНК относятся трансферные РНК (тРНК) и рибосомальные РНК (рРНК), а также малые РНК. Благодаря высокой эффективности CRISPRCas9 можно изменить как материнские, так и отцовские копии гена в клетке. Это означает, что «нокауту» специфических генов клеточных линий не хватает конкретной функции гена, которая может быть относительно легко осуществлена. Кроме того, можно ориентироваться на несколько локусов одновременно, которые могут быть важны в будущем для коррекции генетических заболеваний [1, 3, 7].

В последние десятилетия трансгенные мыши имеют огромное значение в биологии СК, а также во многих других областях биомедицинской науки. Они сыграли большую роль в изучении механизмов эволюции, а также предоставили возможность для создания моделей мышей широкого спектра заболеваний человека, а также для оказания помощи в исследованиях в области патологии и терапии. Термин «трансгенный» первоначально относился к линиям мышей, несущим дополнительный ген, введенный экспериментатором, сам ген известен как трансген. Однако термин «трансгенные» используется в настоящее время в отношении различных типов генетической модификации, включая нокауты (специфические инактивации генов), условные нокауты, генный нокдаун (специфическая замена генов, генная инженерия с использованием замены информационных последовательностей ДНК в генетическом локусе) и так далее [11, 15, 22].

Таким образом, несмотря на значительные достижения методов выявления и идентификации стволовых клеток среди них идеального пока нет. Каждый из представленных методов имеет свои недостатки, не позволяющие считать идентифицированные клетки – стволовыми.

Литература

1. Владимирская, Е.Б. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Е.Б. Владимирская, О.А. Майорова, С.А. Румянцев. – М.: Медицина и здоровье, 2007. – 392 с.
2. Москалев, А.В. Общая иммунология с основами клинической иммунологии / А.В. Москалев, В.Б. Сбойчаков, А.С. Рудой. – М.: Гэотар-Медиа, 2015. – 351 с.
3. Москалев, А.В. Аутоиммунные заболевания. Диагностика и лечение / А.В. Москалев [и др.]. – М.: Гэотар-Медиа, 2017. – 218 с.
4. Ярилин, А. А. Иммунология / А.А. Ярилин. – М.: Гэотар-Медиа, 2010. – 957 с.
5. Abbas, A.K. Cellular and Molecular Immunology. – 9-th edition / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai. – Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 2018. – 565 p.
6. Bhaya, D. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation / D. Bhaya [et al.] // Annu. Rev. Genet. – 2011. – Vol. 45. – P. 273–297.
7. Cai, L. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization / L. Cai [et al.] // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 3234–3243.
8. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8. – P. 315–317.
9. Hilton, I.B. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9 – based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers / I.B. Hilton [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2015. – Vol. 33. – P. 510–517.
10. Jeon, E.S. Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells via activation of JNK / E.S. Jeon [et al.] // J. Lipid Res. – 2006. – Vol. 47. – P. 653–664.
11. Gilbert, L.A. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes / L.A. Gilbert [et al.] // Cell. – 2013. – Vol. 154. – P. 442–451.
12. Kern, S.E. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue / S.E. Kern [et al.] // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24. – P. 1294–1301.
13. Lee, J. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions / J. Lee [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 341. – P. 882–888.
14. Li, B. Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction / B. Li [et al.] // Coron Artery Dis. – 2007. – Vol. 18. – P. 221–227.
15. Lipinski, M.J. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials / M.J. Lipinski [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 50. – P. 1761–1767.
16. McDonald, J.I. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation / J.I. McDonald [et al.] // Biol. Open. – 2016. – Vol. 5. – P. 866–874.
17. Miyahara, Y. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara [et al.] // Nat Med. – 2006. – Vol. 12, № 4. – P. 459–465.
18. Olson, K. Contemporary clinical immunology and serology / K. Olson, E. De Nardin. – New Jersey: Upper Saddle River, 2013. – 439 p.
19. Rose, N.R. The autoimmune diseases. – fifth edition / N.R. Rose, I.R. Mackay. – Philadelphia, 2018. – 1265 p.
20. Schaffler, A. Concise review: Adipose Tissue derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies / A. Schaffler, C. Buchler // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 818–827.
21. Sternberg, S.H. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 / S.H. Sternberg // Nature. – 2014. – Vol. 507. – P. 62–67.
22. Thakore, P.I. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements / P.I. Thakore [et al.] // Nat. Methods. – 2015. – Vol. 12. – P. 1143–1149.
23. Wu, Y. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis / Y. Wu [et al.] // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 2648–2659.
24. Zabriskie, J.B. Essential clinical immunology / J.B. Zabriskie – N. Y., 2009. – 362 p.
25. Zetsche, B. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system / B. Zetsche [et al.] // Cell. – 2016. – Vol. 163. – P. 759–771.

A.V. Moskalev, B.Yu. Gumilevskiy, A.V. Apchel, V.N. Tsygan

Genetic updating and marks of cellular lines

Abstract. Despite great advances in the biology of stem cells, there are still many dark spots. Genetic modification techniques, which can be used to track the lines of different cells, primarily stem cells, help to solve this problem. Various methods of biotechnology research are considered, allowing to evaluate the options of introducing new genes into cells and even whole organisms, as well as methods of controlling their expression in time and space, their activation, differentiation and decrease in functional activity, expression of several target genes. Options with multi-cystron vectors encoding several proteins are described. Options for introducing genes using plasmids, electroporation of their disadvantages and advantages are characterized. The most promising and the safest is a retroviral vector using lentivirus vectors capable of generating additional copies of itself, which is very important in the field of biotechnology security. A line of packing cells, usually 293T cells, is used to produce a viral vector. Prospects for the use of adenovirus and adenoassociated vectors are characterized. The achievement of modern biotechnology methods is the system of short palindrome repetitions located in groups, which is a unique tool for genome editing. At the heart of this system is the process of cutting out sequences of deoxyribonucleic acid, which are permanent and which are supported by cells regardless of subsequent divisions or changes in condition. The system allows geneticists and medical researchers to edit parts of the genome by removing, adding or modifying successive sites of deoxyribonucleic acid. An important problem with biotechnology methods is how to control the expression of transgenes. Today, it is quite effective to control expression with a factor present in the gene delivery vector itself and which is only active in a certain type of cell. Endonuclease bacteriophage P1 is used to regulate transgene expression, which cuts deoxyribonucleic acid only at specific sites. This system is introduced in both eukaryotic and prokaryotic systems.

Key words: stem cells, transcriptional factors, genes, phenotype, cellular differentiation, modification, mutation, chromosome, plasmids, nucleic acids, translocation.

Контактный телефон: 8-921-989-17-42; e-mail: vmeda-nio@mil.ru