

ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КРОЛИКИ – БИОМОДЕЛИ И ПРОДУЦЕНТЫ

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

*Всероссийский научно-исследовательский институт
физиологии, биохимии и питания животных – филиал
ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».*

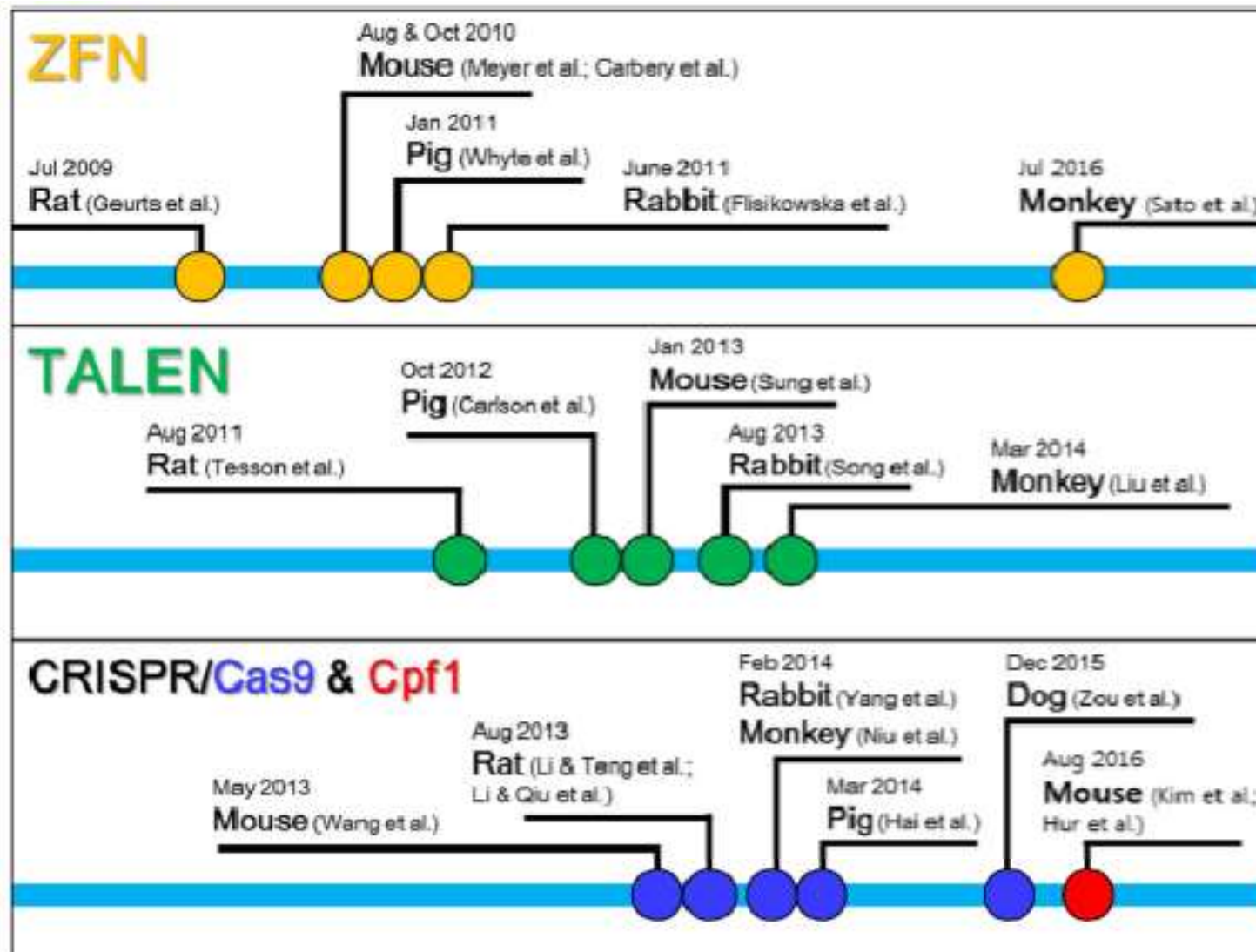
В биомедицинских исследованиях при моделировании заболеваний человека, как правило, применяют мышей, в том числе генетически модифицированных с использованием как традиционных технологий трансгенеза, так и новых методов геномного редактирования.

Во многих случаях кролик является более подходящей моделью. Получение большого разнообразия трансгенных кроликов, с нокаутом целевых генов длительное время сдерживалось из-за низкой эффективности клеточных технологий применительно к их эмбриональным и соматическим клеткам.

С появлением эндонуклеазных методов редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9, методом микроинъекции зигот с высокой эффективностью было получено множество генно-модифицированных кроликов для биомедицинских исследований, биомоделирования заболеваний человека.

Хронология применения нуклеазных технологий на лабораторных животных.

(Lee JG et al., 2018)



Кролики, нокаутные по одному гену

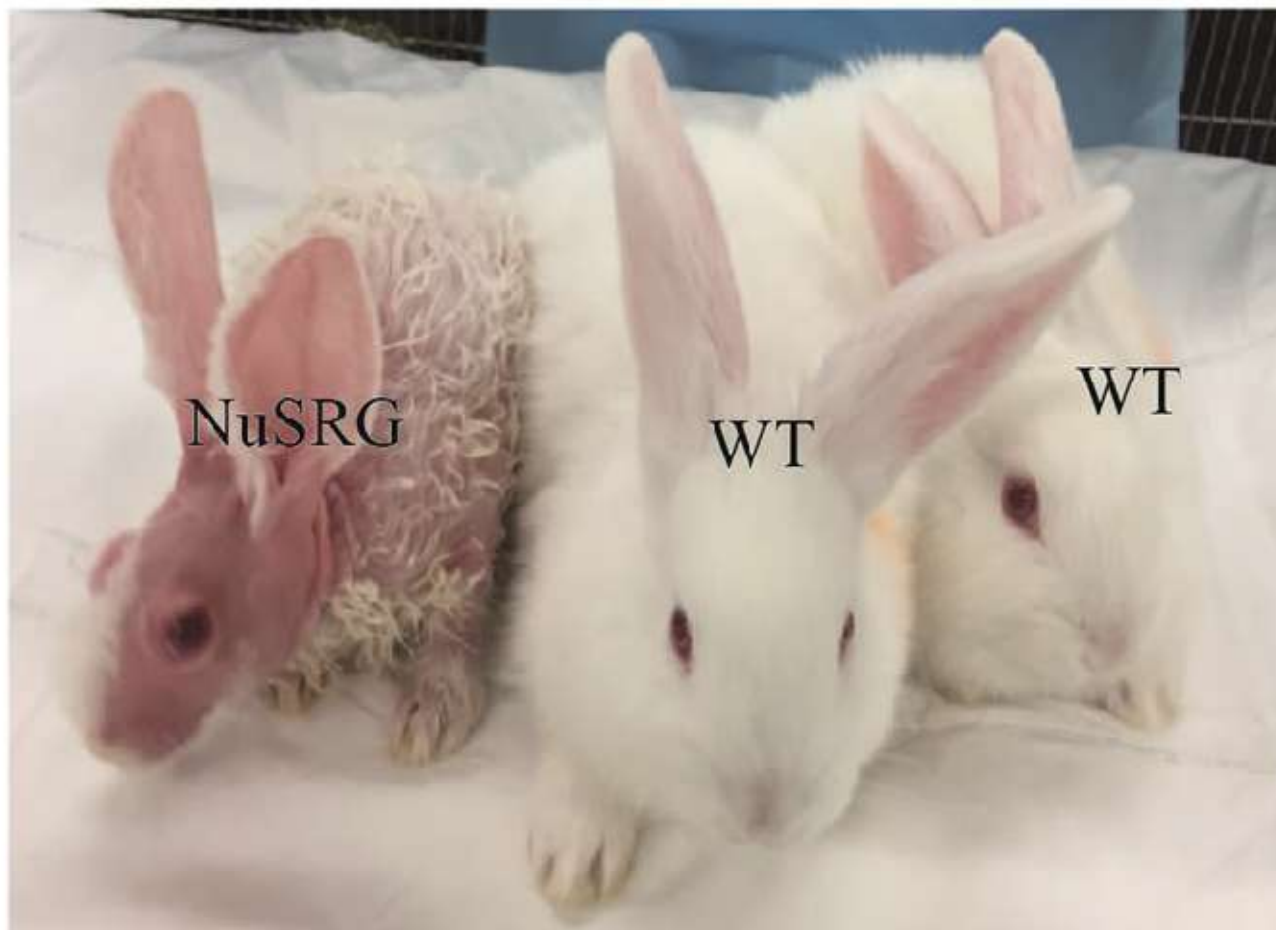
Ген-мишень	Функция гена, модель	Конц. НК, нг/мкл mRNA Cas9/ sgRNA/ кол-во sgRNA	Живые крольчата/ всего крольчат/ подсажено эмбр./ МИ эмбрионов	Биаллельны/ ГМ крольч./ всего крольчат	Ссылки
APOE	липидный обмен, атеросклероз	150 /6	12/?/94/?	10/10/12	Yang D, et al., 2014
CD36		150 /6	13/?/54/?	4/11/13	
LDLR		150 /6	28/?/93/?	0/9/28	
RyR2	аритмия сердца	150 /6	15/?/60/?	1/8/15	
		Итого:	68/?/301/?	15/38/68	
LDLR (Ex7)	Рецептор ЛПНП	49/13 sgRNA1	3/3 /12/14	3/3/3	Lu R et al., 2018
		49/13 sgRNA2	4/10/79/82	10/10/10	
GJA8 (Ex1)	катаракта	180/40/2	11/11/110/?	0/11/11	Yuan L, et al., 2016
CRYAA (Ex2)	αА-кристаллин	180/40/2	19/?/85/?	15/19/19	Yuan L, et al., 2017
TYR (Ex 1)	тирозиназа	pX330 - 5	9/?/67/77	1/2/9	Honda A, et al., 2015
TYR (Ex3, Δ105)	окраска шерсти	100/25/2	17/?/169/ ?	1(Δ105)/15/17	Song Y, et al., 2016
TYR (3'utr, Δ330)		100/25/2	4/?/84/92	3KO/4	Song Y, et al., 2017

Кролики, нокаутные по одному гену (продолжение)

Ген-мишень	Функция гена, модель	Конц. НК, нг/мкл mRNA Cas9/ sgRNA/ кол-во sgRNA	Живые крольчата/ всего крольчат/ подсажено эмбр./ МИ эмбрионов	Биаллельны/ ГМ крольч./ всего крольчат	Ссылки
MSTN (Ex1)	миостатин	180/40/2	20/?/158/?	6/16/20	Lv Q, et al., 2016
MSTN (Ex1-Ex3, Δ≈4600)	гипермышечный фенотип	200/20+20/2	3/5/56/80	24/34 (19-gRNA1, 18-gRNA2, 13-gRNA1+ gRNA2; 2-Δ4600b)	Guo et al., 2016
		100/20+20/2	29/32/194/218		
DMD (Ex51)	мышеч. дистрофия Дюшенна	200/50/2	33/?/128/?	22/26/33	Sui T, et al., 2018
FBN1 (Ex 65)	фибриллин-1, синдром Марфана	200/30/ 2	28/?/197/?	26/28/28	Chen M et al., 2018
PHEX (Ex1)	X-связанная гипофосфатемия, рахит	200/40/2	26/?/131/?	11/19/26	Sui T, et al., 2016 Ch
LMNA (Ex3)	синдром преждевр. старения	200/50/2	32/?/126/? (3 рец.)	29/30/32	Sui T, et al., 2019
Il2rg	Рецептор IL2	200/20	8/?/66/?	3/8/8	Yan Q, et al., 2014
Tiki1	Один из белков эмб-за и дифф-ки	200/20	5/?/30/?	3/5/5	
FOXN1	Иммунодефицит: развитие и функции лимфоцитов	150/6	21/?/76/? (3 реципиентки, подсаживали смесь эмбрионов)	?/4/20 эмбр	Song J, et al., 2017
RAG2		150/6		?/3/18 эмбр	
IL2RG		150/6		?/10/20 эмбр	
PRKDC		150/6		?/3/18 эмбр	
PAX4 (Ex3-Ex5, Δ≈1200)	сахарный диабет	180/40/2	22/?/210/?	15/19/22	Xu Y. et al., 2018

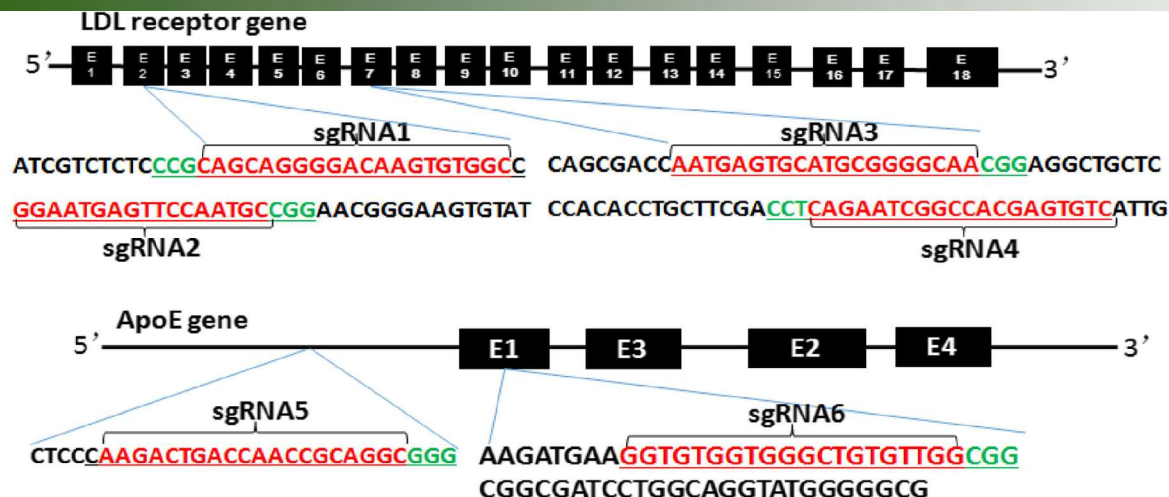
Кролики, нокаутные по нескольким генам одновременно

Гены-мишени	Функция гена, модель	Конц. НК, нг/мкл mRNA Cas9/ sgRNA/ кол-во sgRNA	Живые крольчата/ всего крольчат/ подсажено эмбр./ МИ эмбрионов	ГМ крольчата (пояснение)	Ссылки
<i>Il2rg</i>+<i>RAG1</i>	Иммунодефицит	200/20+20	5/?/67/?	2 <i>IL2RG^b</i> ; 5 <i>RAG1^b</i>	Yan Q, et al., 2014
<i>FOXN1</i>(Ex3)+<i>PRKDC</i>(Ex1)+<i>IL2RG</i>(Ex1) +<i>RAG1</i>(Ex1) +<i>RAG2</i>(Ex1)	Иммунодефицит	150/6	5/?/45/? (2 рецип.)	1 (<i>FOXN1^s</i> , <i>PRKDC^s</i> , <i>RAG1^s</i>); 1(<i>IL2RG^s</i> , <i>RAG1^s</i>); 1(<i>IL2RG^s</i>); 1 (<i>PRKDC^s</i> , <i>RAG1^s</i>); 1 (<i>FOXN1^s</i> , <i>PRKDC^s</i> , <i>IL2RG^b</i> , <i>RAG1^b</i>)	Song J, et al., 2017* (фото)
<i>RAG1</i>(Ex1) +<i>RAG2</i>(Ex1)		150 / 6	3/15 (1 рец.)	1 (<i>RAG1^b/RAG2^b</i>)/3KO	
<i>FUT1</i>+<i>FUT2</i> +<i>SEC1</i> G1, G2 – общие	Фукозилтрансферазы	200/50	31/?/181/?	8/31 (<i>FUT1</i> -4, <i>FUT2</i> -4, <i>SEC1</i> -6: 1- по трем генам)	Liu H, et al., 2018
<i>LDLR</i> (Ex2(G1, G2) - Ex7(G3, G4) Δ≈2800 <i>ApoE</i> (5'utr (G5), Ex1 (G6))	Рецептор ЛПНП, аполипопротеин: гиперхолестеремия, атеросклероз	40/13 (G2+G4+G5)	4/10/96/?	1(Δ≈2800, б/а)/3 KO <i>LDLR</i> /4	Yuan T et al., 2019 ** (фото)
		40/13 (G1+G3+G6)	2/3/109/?	0/2 KO (<i>LDLR</i> -Ex2 б/а; apoE-Ex1 б/а)/2	
		40/13 (G1+G2+G3+G4)	1/5/140/?	1(Δ≈2800, б/а)	



NuSRG – кролик ($FOXN1^s$, $PRKDC^s$, $IL2RG^b$, $RAG1^b$) и его ровесники дикого типа (WT)

* Song J, et al., 2017 Production of immunodeficient rabbits by multiplex embryo transfer and multiplex gene targeting. Sci Rep. 2017 Sep 22;7(1):12202. doi: 10.1038/s41598-017-12201-0.



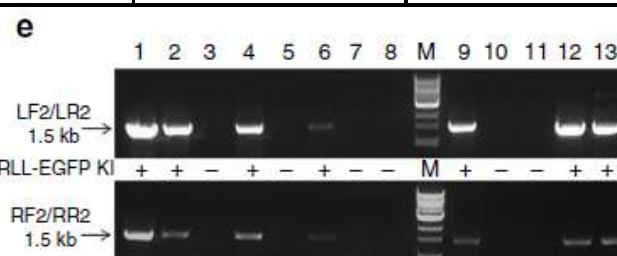
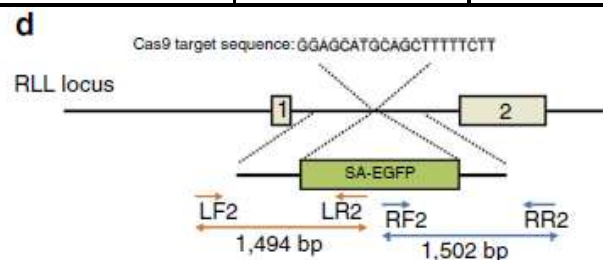
**** Yuan T, et al. Generation of hyperlipidemic rabbit models using multiple sgRNAs targeted CRISPR/Cas9 gene editing system. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):69.**

China Japan

Microinjected sgRNA	sgRNA 2,4,5	sgRNA 1,3,6	sgRNA 1,2,3,4	Total
No. of embryos collected	113	137	179	429
No. of embryos injected	96	109	140	345
No. of recipients	5	5	6	16
No. of gestations	3	3	4	10
No. of pups born	10	3	5	18
No. of live pups	4	2	1	7
No. of mutant pups	3	2	1	6
No. of pups with large fragment deletion	1	0	1	2
Rate of pregnancy	60.0%(3/5)	60.0%(3/5)	6.7%(4/6)	62.5%(10/16)
Rate of mutations	75.0%(3/4)	100.0%(2/2)	100.0%(1/1)	85.7%(6/7)

Получения Knock-in (KI) кроликов

Ген-мишень	Конц. НК, нг/мкл mRNA Cas9/ sgRNA/ дополн. компонент	ДНК-вставка, нг/мкл	МИ	KI крольчата /крольчата с инделями/ всего крольчат/ транспл.эмбрион ов	Ссылка
ROSA26-like locus (RLL) (<i>Int1</i>)	100/6	0.5-kb 5'HA, 0.7-kb 3'HA: 2-kb EGFP expression cassette/ 100	CP	3/29/43/373	* Song J, et al., 2016
	100/6 / 7,5(RS-1)			10/18/38/146	
ROSA26 (<i>Int1</i>)	150/6 / 7,5(RS-1)	0.5-kb 5'HA, 0.7-kb 3'HA: Cre reporter knock in - tdTomato, iEGFP/100	CP	7/?/20/100	Yang D, Song J, et al ., 2016
ATP7B (Ex8) Модель гепатоцеребральн ой дистрофии (болезнь Вильсона)	20 / 10/ 2	ssODNs: 46-b 5'HA, 46-b 3'HA - точечные мутации с заменой 2 АК/ 50mM	МИ CP: через 19 ч	2/7 KO /14/62	Jiang W, et al., 2018
			через 14 ч после ХГч обработки доноров	9/5 KO /17/56	



* Song J, et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. Nat Commun 2016; 7: 10548.

Молочная железа животного - биореактор для продукции рекомбинантных белков

Генно-модифицированные организмы становятся неотъемлемыми компонентами не только научных и биомедицинских исследований, но и **АПК**.

Применение в генной инженерии эндонуклеазных технологий ZFN, TALEN и особенно CRISPR/Cas9 – эффективный метод изменения состава молока с/х животных замещением генов эндогенных молочных белков с целью улучшения потребительских качеств молока, для использования **молочной железы животного как биореактора для продукции рекомбинантных белков**.

Трансгенные с/х животные, в том числе кролики, перспективны в качестве биореакторов для продукции рекомбинантных белков фармакологического назначения с молоком или кровью.

Кролик, как одно из самых маленьких с/х животных, не только хорошая модель для испытания и отработки новых геномных технологий, но и легко возобновляемый продуктивный источник ценных рекомбинантных белков в экспериментальном и промышленном масштабе.

Кролики могут найти применение для производства с молоком фармакологических белков, не требуемых в больших количествах: рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы человека (Pharming BV) для лечения пациентов с наследственным ангионевротическим отеком из молока ТГ кроликов разрешен к применению.

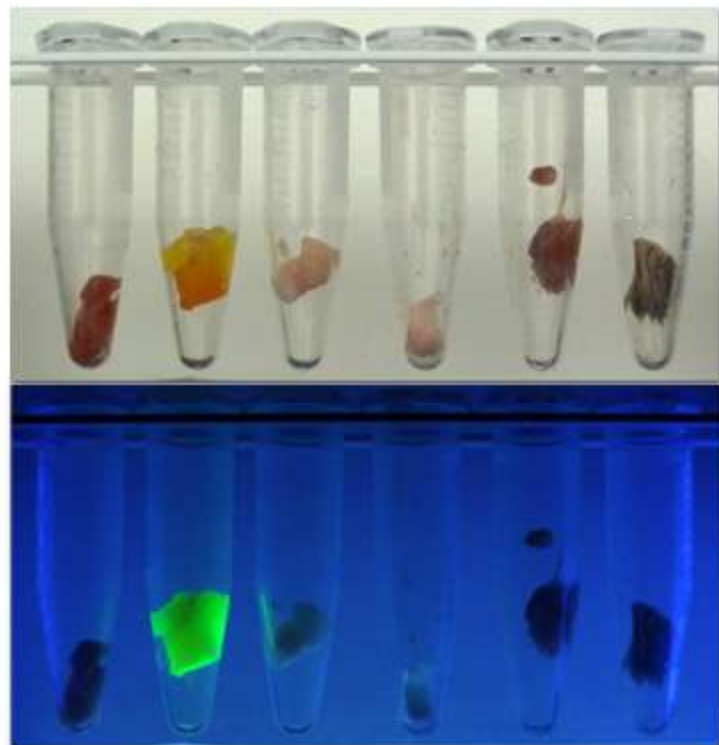
Несмотря на успехи зарубежных, особенно китайских, генетиков в создании кроликов, генно-редактированных с использованием CRISPR/Cas9 технологии, такие работы в России практически отсутствуют.

Сотрудниками нашего института были созданы генетические конструкции и классическим трансгенезом методом микроинъекции зигот были получены кролики, в молоке которых содержались белки человека: лактоферрин и гранулоцит-колониестимулирующий фактор.

Содержание белка в молоке кроликов значительно выше, чем в коровьем (14% против 5%). Доля **кислого сывороточного протеина** составляет около 15 г/л, что делает **ген WAP** перспективным кандидатом для замены геном биологически активного белка при использовании технологии **CRISPR/Cas9**.



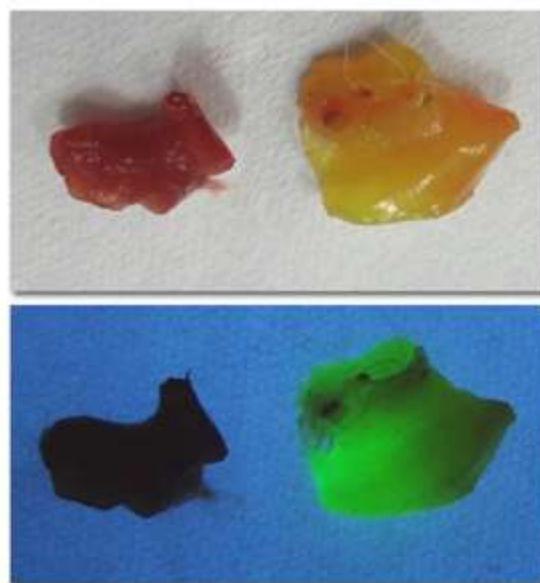
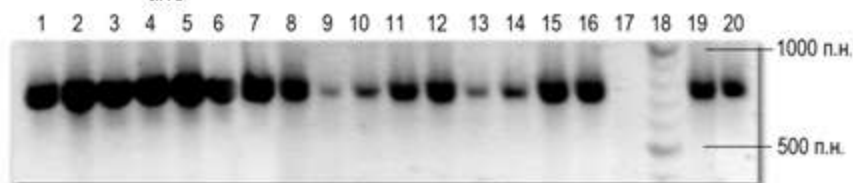
Экспрессия зеленого флуоресцентного белка в органах и тканях трансгенной крольчихи



Слева направо: кишечник,
«зелёная» мышечная ткань,
соединительная ткань, ушной
хрящ, желудок, ухо

ПЦР-анализ гена EGFP:

Дор.1-16 – органы и ткани, 17 – K-; 18
– маркер молекулярных масс; 19 – K+;
20 – K_{инг}



«Красное» и
«зеленое» мясо в
видимом и
ультрафиолетов
ом свете

Разделанная тушка трансгенной крольчихи

**Внутренняя сторона
шкурки**



**Внешняя сторона
задней и передней
частей тушки**



**Внутренняя сторона
задней части тушки**



Сывороточный Кислый Протеин (Whey acidic protein - WAP) был впервые обнаружен в молоке мыши, позднее - в молоке крысы, кролика, свиньи, верблюда, валлаби, опоссума, ехидны и утконоса. У людей и жвачных животных ген WAP - псевдоген.

WAP функционирует как ингибитор протеиназы, участвует в терминальной дифференцировке в молочной железе, обладает антибактериальной активностью.

MW WAP составляет 14-30 КДА (вариации могут быть обусловлены различиями в гликозилировании).

Стратегия модификации гена WAP (для CRISPR/Cas9)

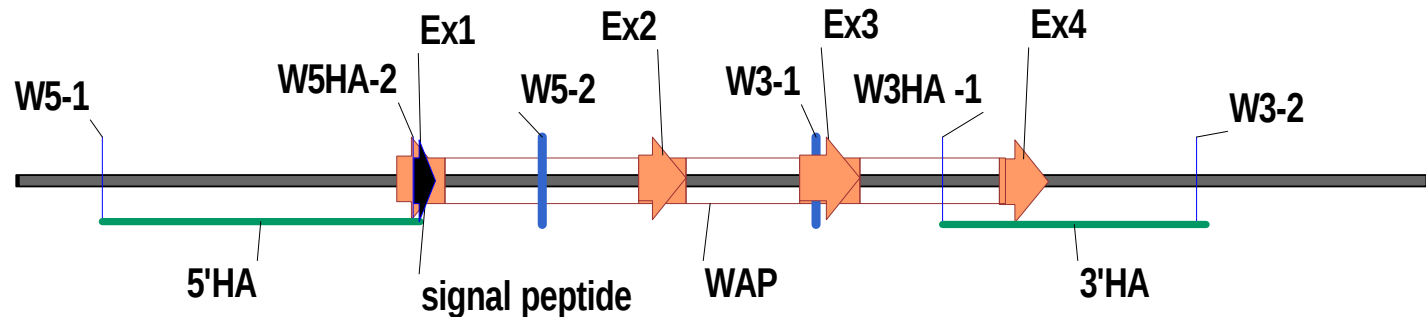
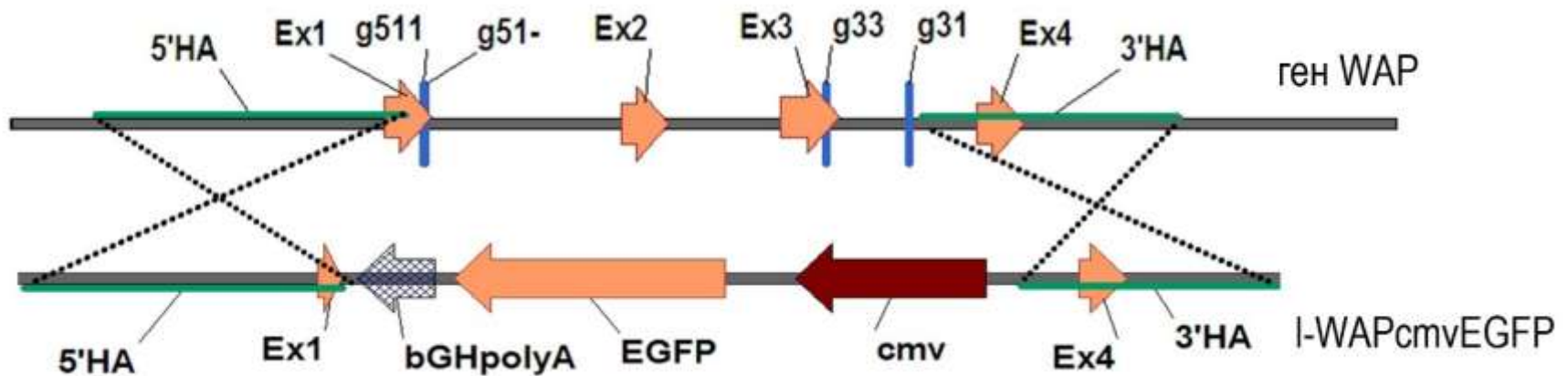


Схема выбора плечей гомологии гена *rbWAP* для создания ДНК-матрицы. 5'HA размером 840 п.н. включает в себя некодирующую часть 1-го экзона и 15 п.н. последовательности сигнального пептида. 3'HA размером 697 п.н. содержит фрагмент 3-го интрона и 4-й экзон (14 кодирующих из 130 п.н.). Указаны сайты связывания используемых праймеров.

Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции WAPcmvEGFP с геном WAP



Примечание. G511, g51-, g31, g33 – мишени НРНК; 5'HA и 3'HA - плечи гомологии; показаны структурные элементы гена и конструкции.

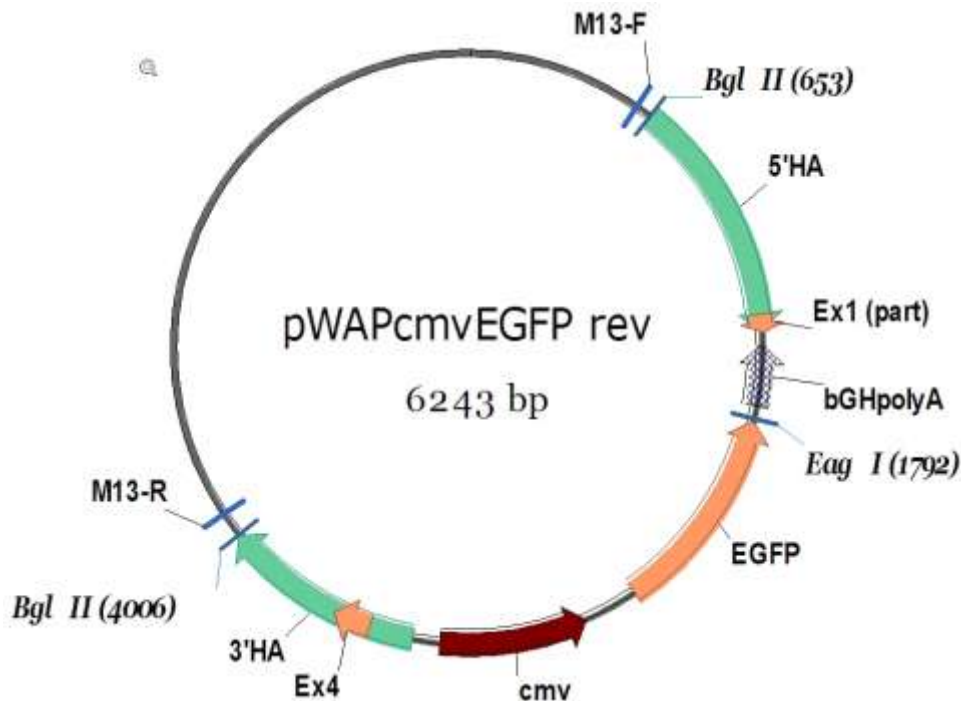
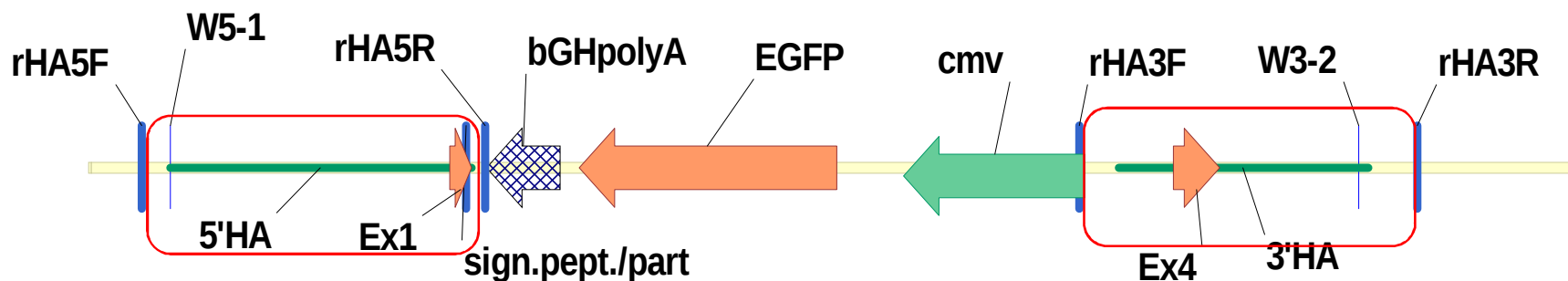


Схема плазмиды **pWAPcmvEGFP**, содержащей **cmvEGFP-bGHpolyA**, **5'rbWAP** (5'HA) и **3'rbWAP** (3'HA) плечи гомологии к гену **rbWAP**. Указаны основные элементы конструкции, сайты рестрикции.

Для получения компонентов CRISPR/Cas9 в плазмидной форме использовали плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230).

Олигонуклеотиды для создания компонентов CRISPR/Cas9 системы

Обозначение	5'-3' последовательность	Назначение
G51-F	CACCG <u>cctac</u> ctggagcgatgaatt	pX330-51
G51-R	AAAC aattcatcgctccaggtagg <u>C</u>	
G511F	CACCG ccccccaaattcatcgctcc	pX330-511
G511R	AAAC ggagcgatgaatttgggggc	
G31F	CACCG <u>tatcg</u> gaggagtcgaaggtt	pX330-31
G31R	AAAC aaccttcgactcctccgata <u>C</u>	
G33R	AAAC gatagcgcatggcgcagcgg <u>C</u>	pX330-33
G33F	CACCG <u>ccgct</u> gcgccatgcgctatc	



rbWAPcmvEGFPprev - HDR
4152 bp

Таблица 3. ПЦР-анализ возможной HDR

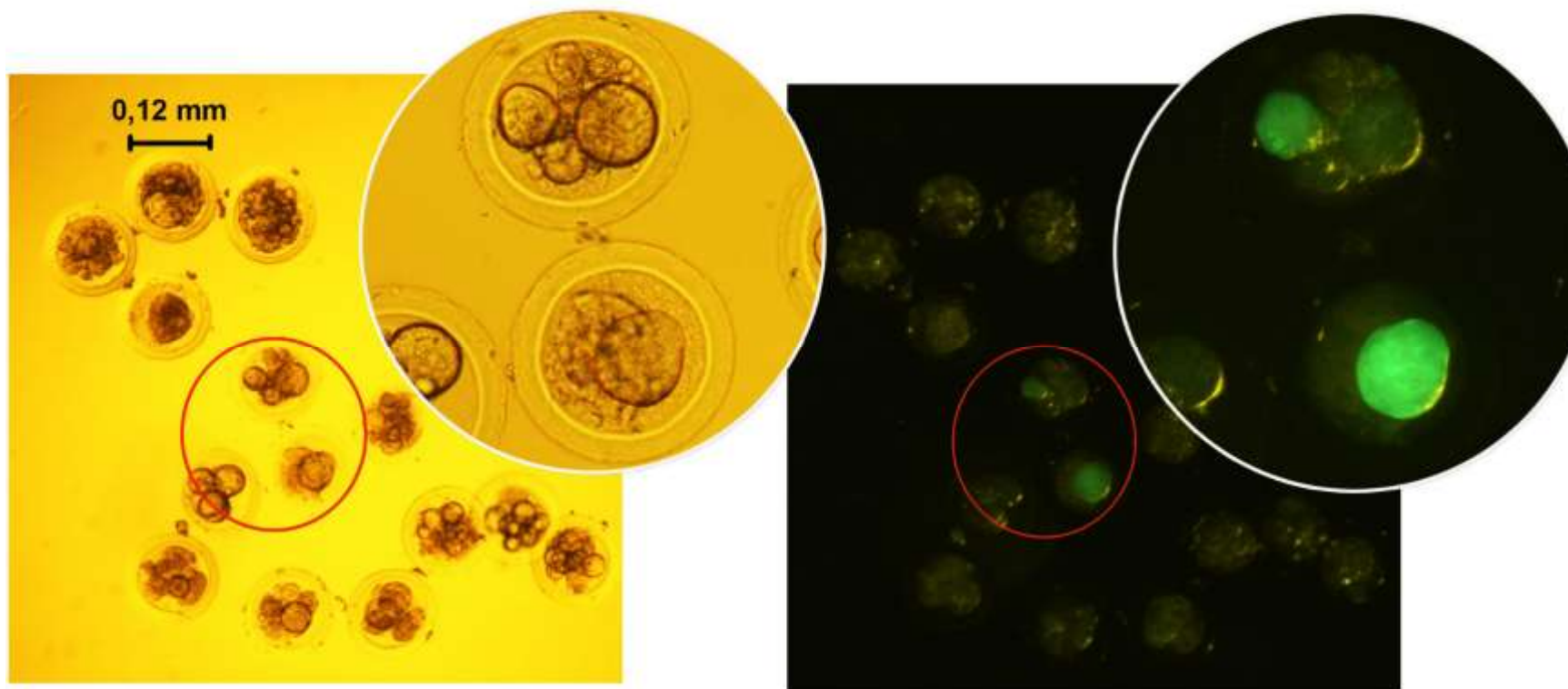
Пара праймеров	ПЦР-амплификат, п.н.	
	WT	ГМ животное, эмбрион (модификация)
rHA5F/rHA5R	-	5'HA для HDR (с учетом обратной ориентации cmvEGFP) 981
rHA3F/rHA3R	-	3'HA для HDR (с учетом обратной ориентации cmvEGFP) 968

ПЦР-анализ возможных NHEJ модификаций гена *rbWAP*, полученных с использованием компонентов CRISPR/Cas9 системы

Пара	ПЦР-амплификат, п.н.		Примечания
	WT	ГМЖ (модификация)	
P51R/P51F	99	<99 ($\Delta G51^-$; $\Delta G511$; $\Delta G51^-/G511$)	ПААГ
P31R/P31F	94	<94 ($\Delta G31$)	ПААГ
P33R/P33F	103	<103 ($\Delta G33$)	ПААГ
P33R/P31F	331	≤ 331 ($\Delta G31$, $\Delta G33$) ≈ 100 ($\Delta G31/G33$)	АГ
P51R/P31F	1420	≈ 100 для $\Delta G511(G51^-)/G31$; ≈ 300 для $\Delta G511(G51^-)/G33$	АГ
W5-1/W3-2	2937	≈ 1600 для $\Delta G511(G51^-)/G31$; ≈ 1800 для $\Delta G511(G51^-)/G33$	АГ
P51R/W5-2	355	≤ 355 ($\Delta G51^-$, $\Delta G511$)	АГ

Праймеры для ПЦР-анализа модификаций гена *rbWAP*

Обозначение	5'-3' последовательность	Положение, назначение
P51F	Gagtgaggaaggcagctgg	1-й интрон начало
P51R	tctcatcagcctggccct	1-й экзон
P31F	ggaatatgcaggccacagct	3-й интрон
P31R	gatctgagaggagtgacgc	3-й интрон
P33F	gggagggctcaggacacata	3-й интрон начало
P33R	tgtgccaacgacatcgagtg	
rHA5F	Tgtggaacccacaaggaacg	5'utr < 5'HA, для HDR
rHA5R	Atagcaggcatgctggggat	3' конец bGH polyA для HDR
rHA3F	Cgtaagtatatgtaacgcggaactcc	5' конец cmv для HDR
rHA3R	Ccatgacctagctgctctccatta	3'utr > 3'HA, для HDR



Эмбрионы кролика, культивированные 5 суток после микроинъекции в пронуклеус компонентов CRISPR/Cas9 системы – плазмид рХ330 и генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену WAP кролика и ген зеленого флуоресцентного белка, при использовании CRISPR/Cas9 технологии.
Фотографии сделаны в видимом (слева) и в синем свете (справа).

Спасибо за внимание!