

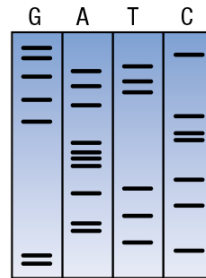


Современные подходы к редактированию генома

Александр Александрович Худяков
к.б.н., м.н.с. НИЛ Молекулярной кардиологии
Института молекулярной биологии и генетики
ФГБУ СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова

Этапы развития генетики и геномики

Разработка метода секвенирования



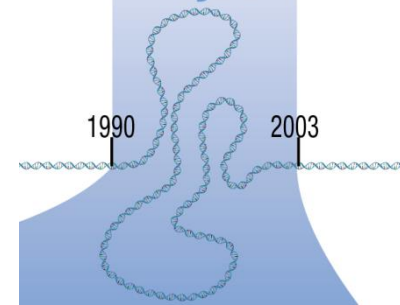
Frederick Sanger,
Allan Maxam
and Walter Gilbert
develop DNA-sequencing
methods

1977



Секвенирование геномов

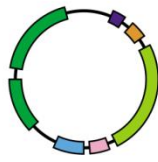
Human
Genome
Project



Открытие функции и структуры ДНК,
расшифровка генетического кода,
молекулярное клонирование



U	C	A	G
Phe Leu	Ser	Tyr stop stop	Cys stop Trp
Leu	Pro	His Gln	Arg
Ile Met	Thr	Asn Lys	Ser Arg
Val	Ala	Asp Glu	Gly



Oswald Avery, Colin MacLeod
and Maclyn McCarty
demonstrate that DNA
is the
hereditary material

1944

James Watson and
Francis Crick
describe the
double-helical
structure of DNA

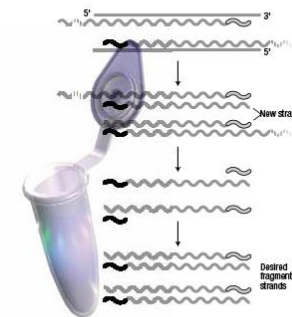
1953

Marshall Nirenberg,
Har Gobind Khorana and
Robert Holley determine
the genetic code

1966

Stanley Cohen and
Herbert Boyer
develop
recombinant
DNA technology

1972



The polymerase
chain reaction (PCR) is invented

1985



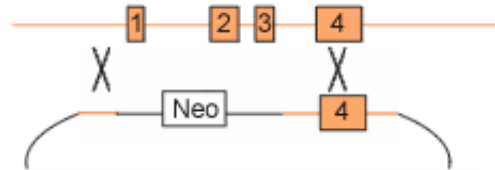
Изобретение полимеразной цепной реакции

Технология генного нокаута

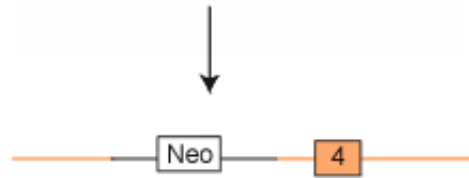
Точечное выключение гена

ДНК мыши

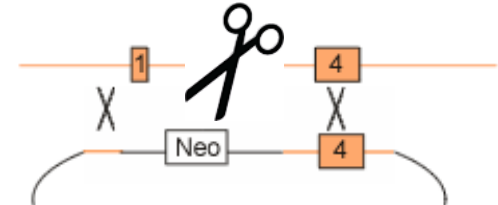
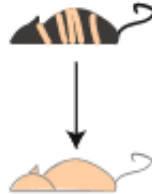
Вектор



Результат
рекомбинации



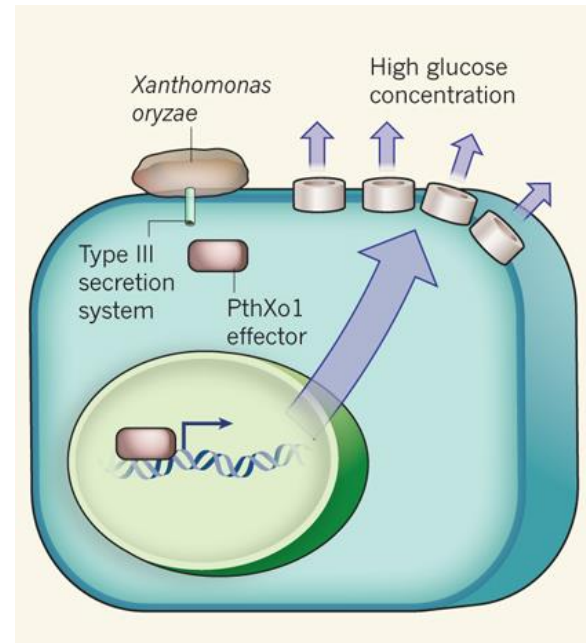
Получение нокаутных
мышей



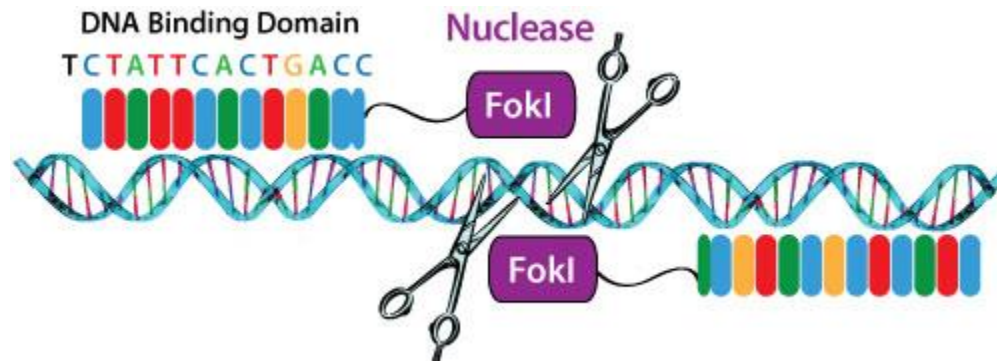
Эндонуклеаза FokI

TALEN

Transcription activator-like effector nuclease



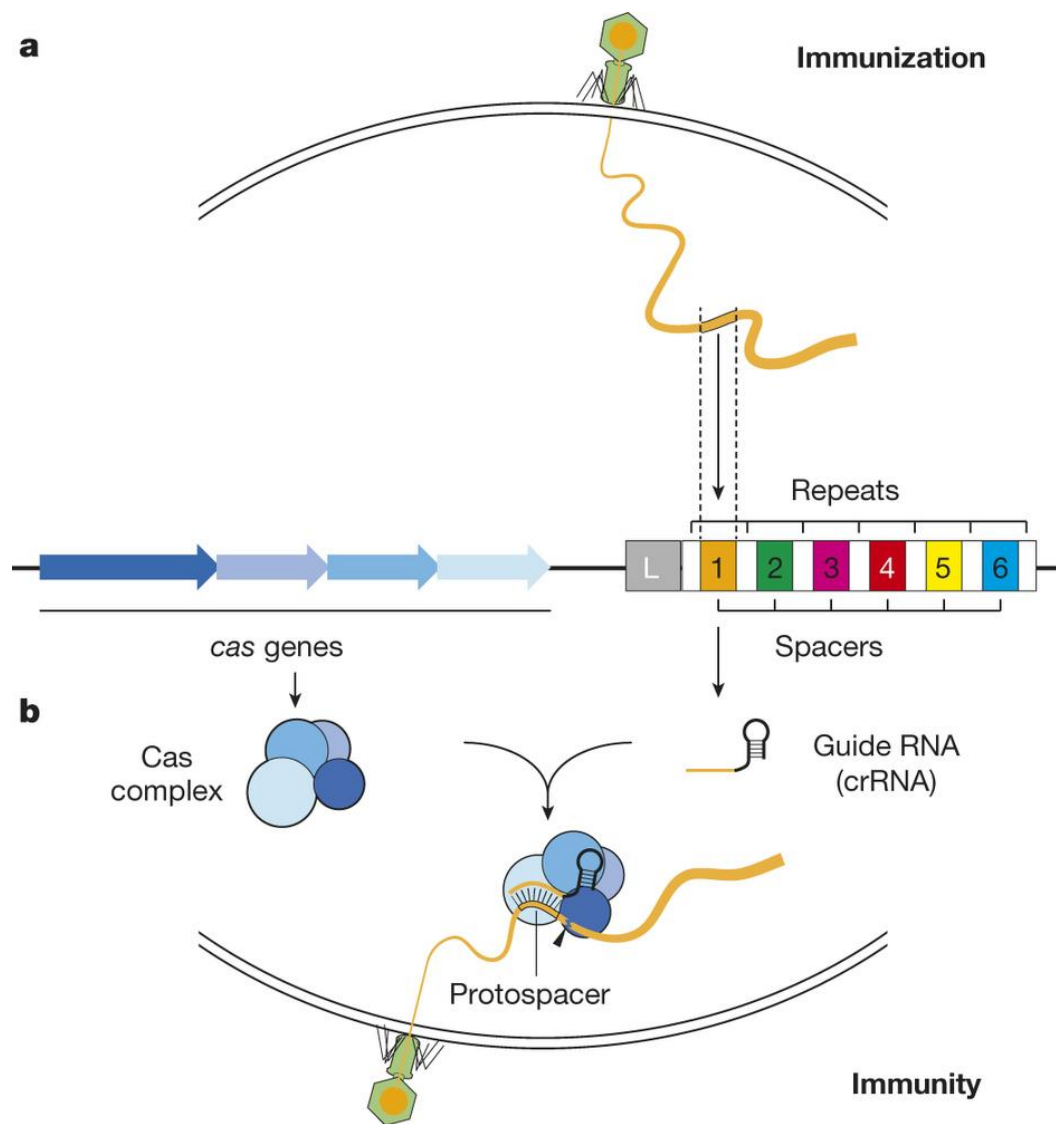
Talbot, 2010



Система CRISPR

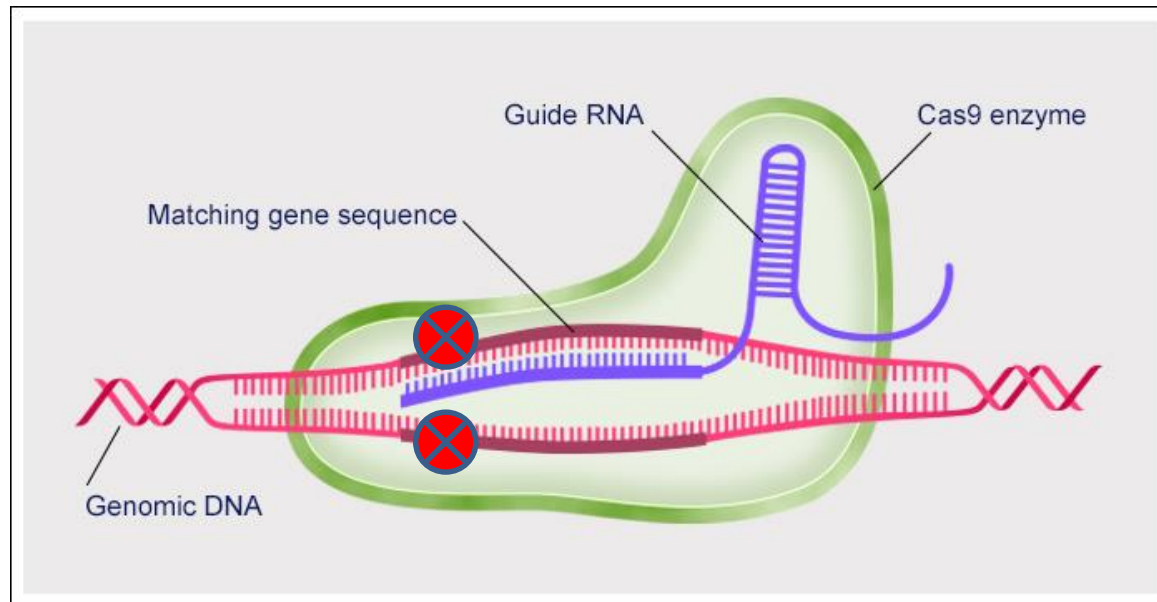
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

1987 г. – открытие
2013 г. – первое
применение для
редактирования
генома



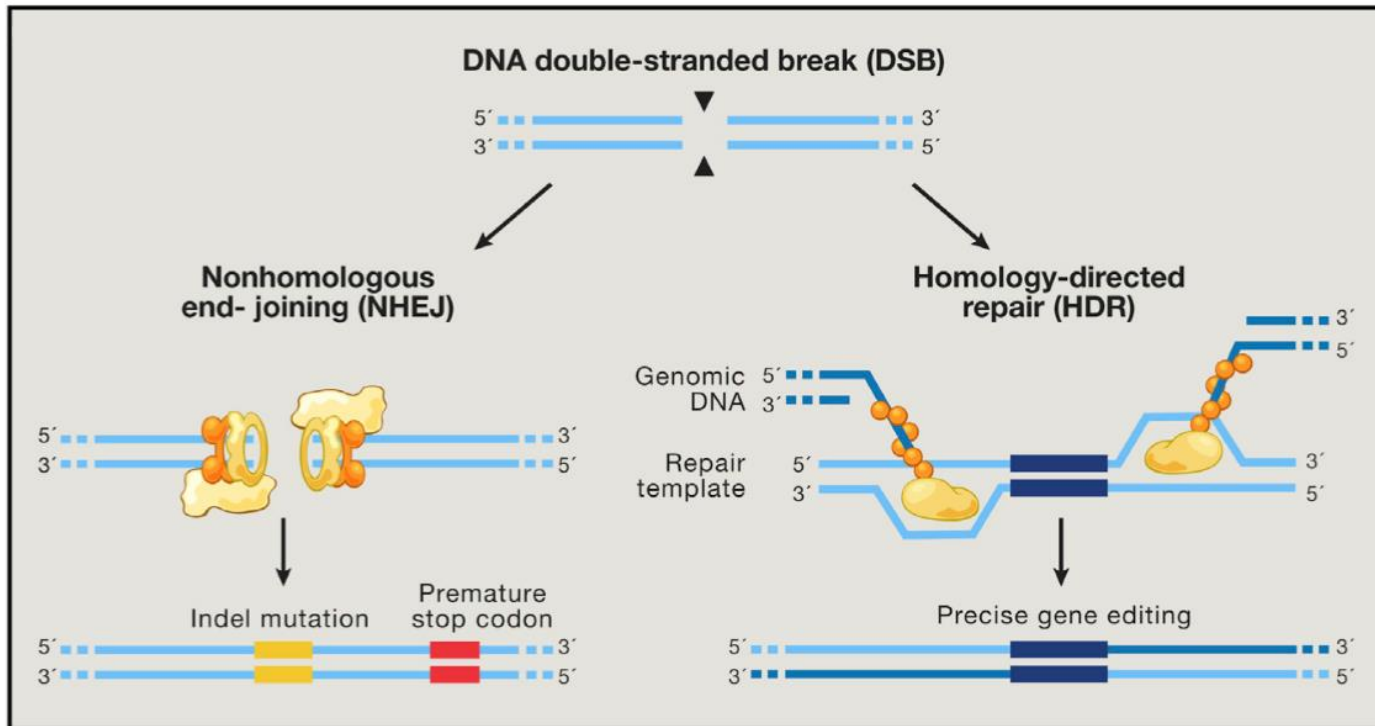
Геномное редактирование с помощью CRISPR/Cas9

Создание двуцепочечного разрыва ДНК



Геномное редактирование с помощью CRISPR/Cas9

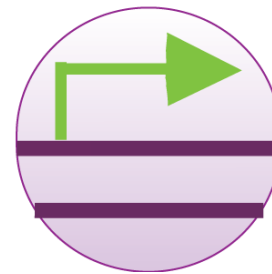
Восстановление двуцепочечного разрыва ДНК



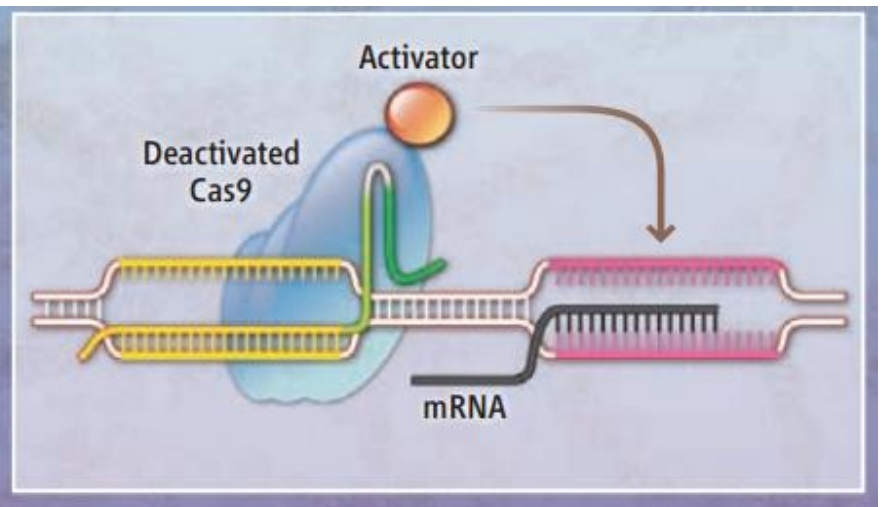
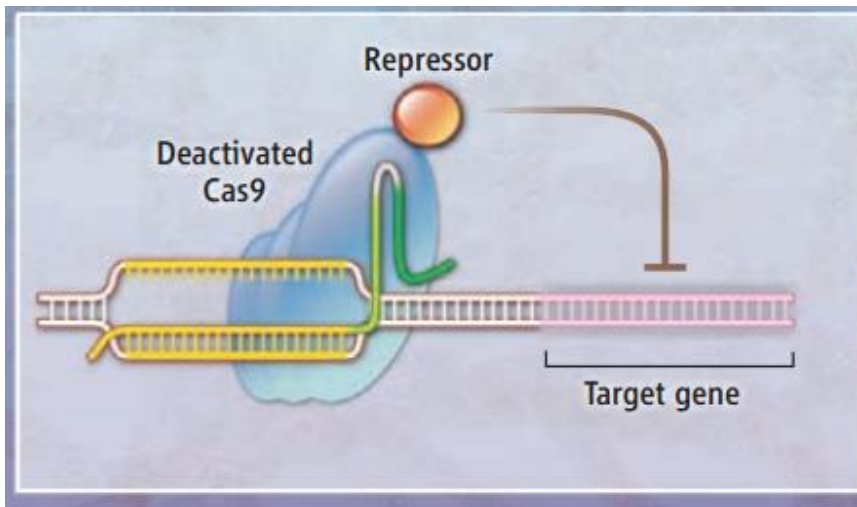
Эпигенетический контроль экспрессии



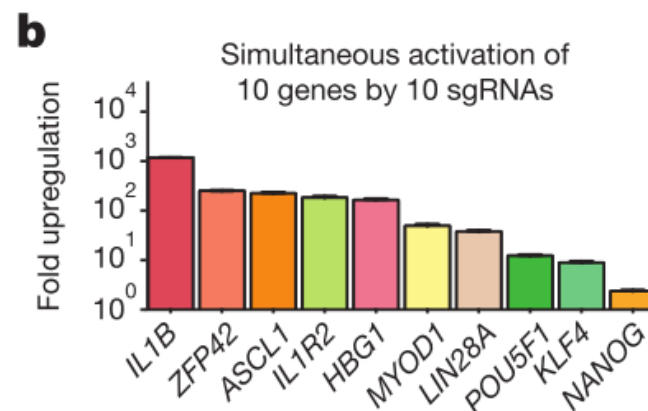
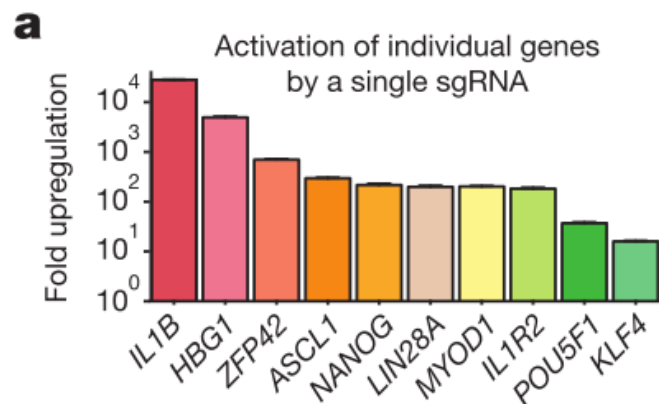
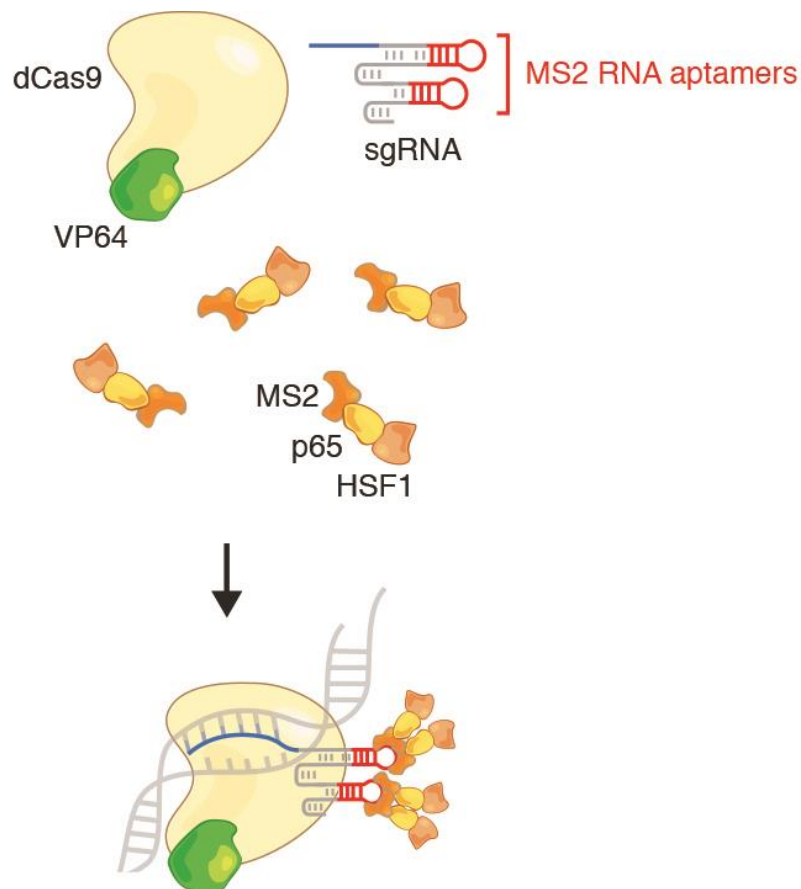
Ингибирование экспрессии генов



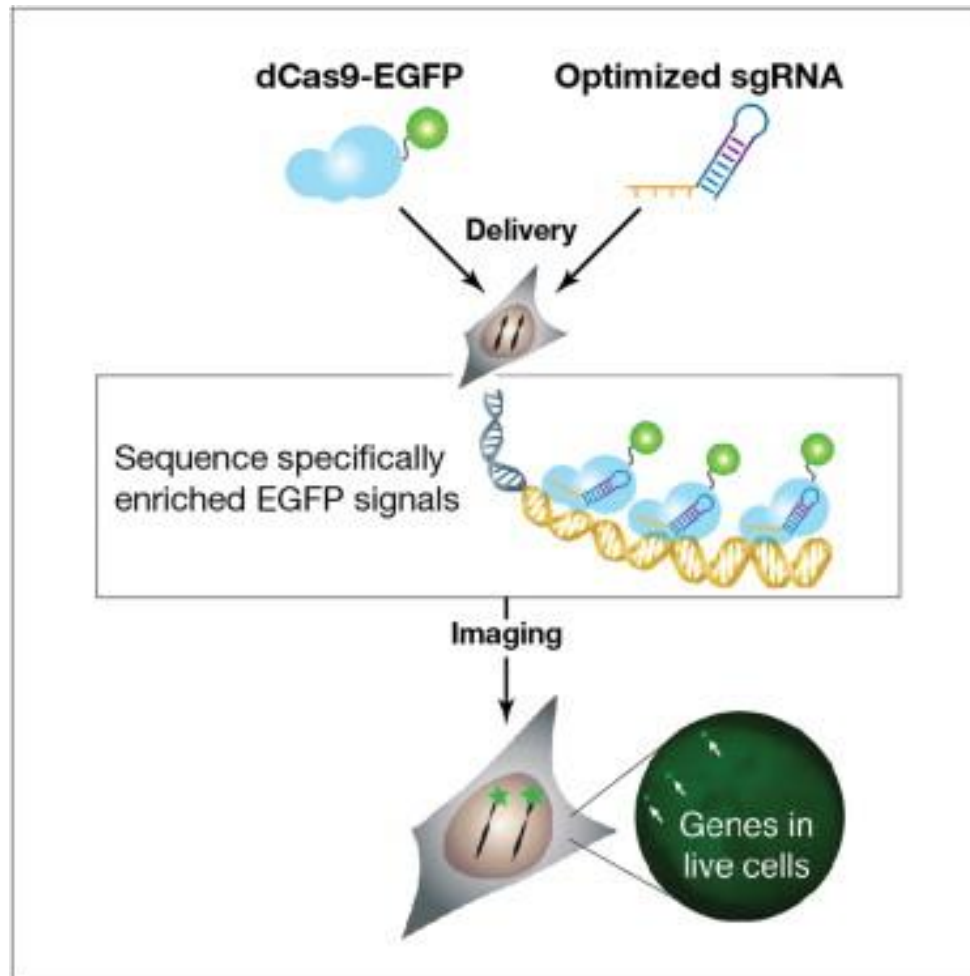
Активация экспрессии генов



Активация транскрипции определённых генов



Визуализация генетических локусов



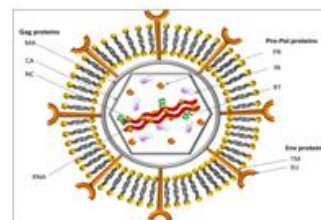
Высокопроизводительный скрининг генома



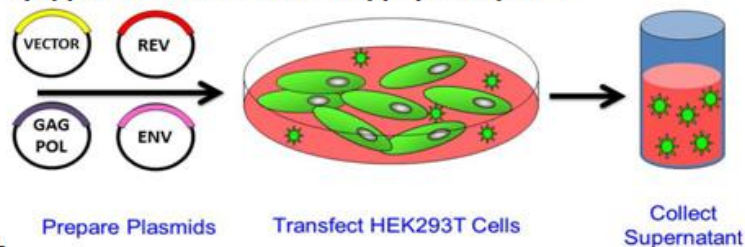


Создание химерного антигенного рецептора (CAR) для терапии онкогематологических заболеваний

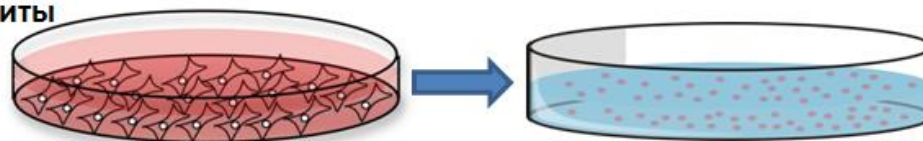
1. Проведен дизайн и синтез генетических конструкций для получения вируса несущего Химерный антигенный рецептор



2. Получен вирусный вектор для генетической модификации Т-лимфоцитов



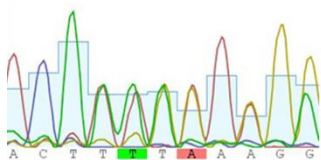
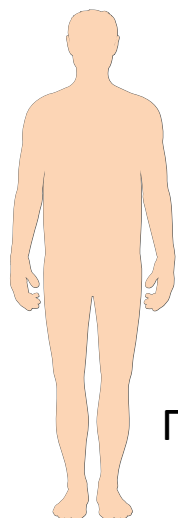
3. Получены генетически-модифицированные Т-лимфоциты



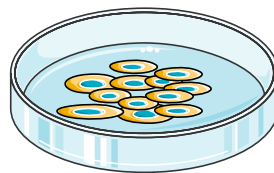
4. Ведутся работы по проверке специфичности цитотоксичности генетически модифицированных лимфоцитов



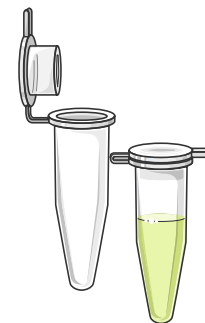
Модель аритмогенной кардиомиопатии (ARVC)



Пациент-носитель
мутации

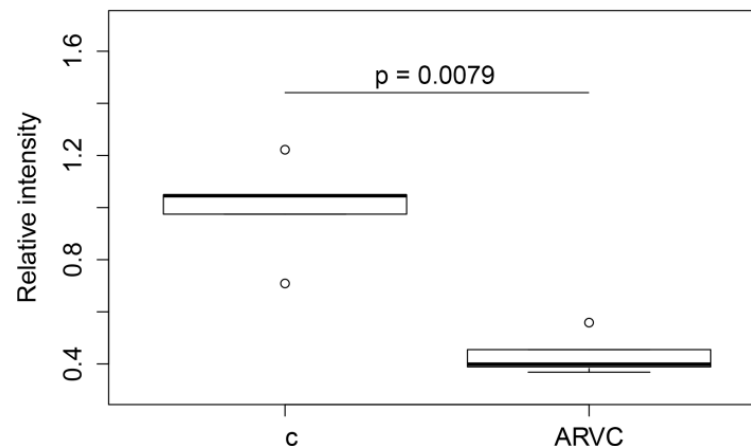
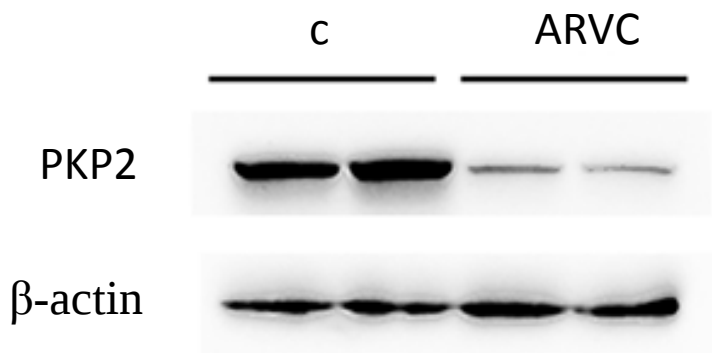


Клеточная культура



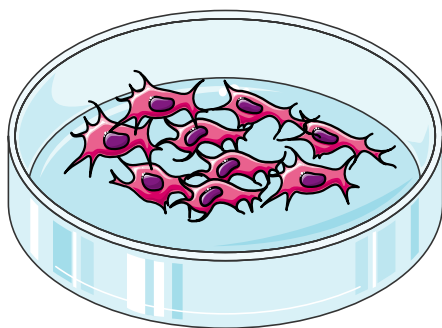
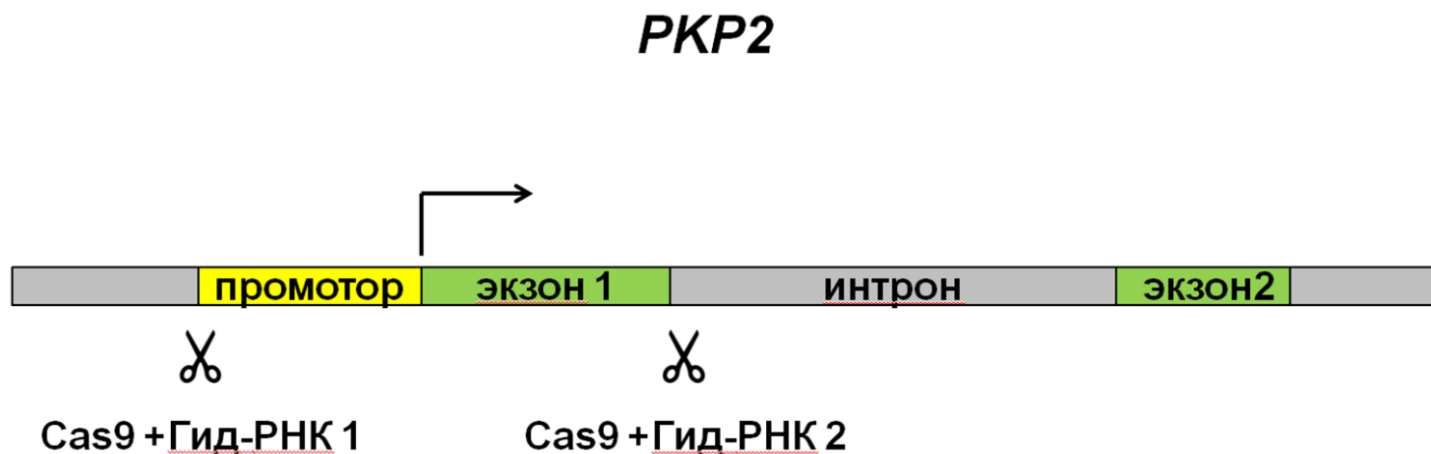
Анализ экспрессии генов

Сниженный уровень белка плакофиллина-2 (PKP2) в клетках пациента



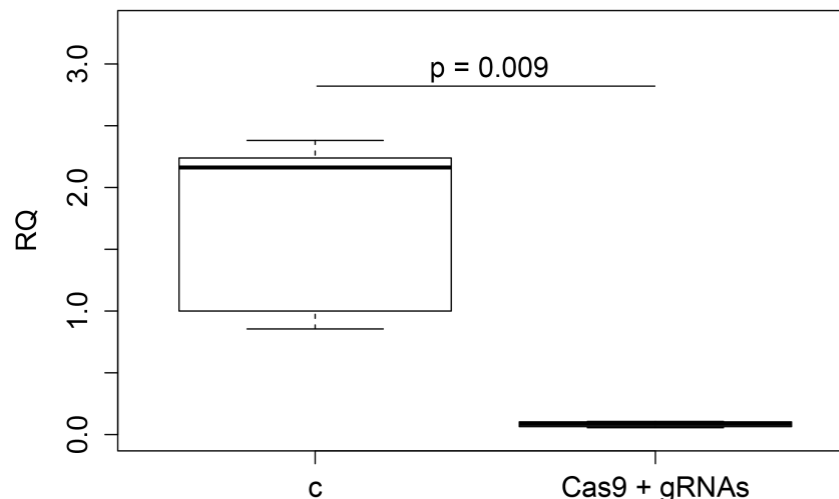


Нокдаун гена *PKP2* с помощью системы CRISPR/Cas9



Культура клеток

Экспрессия *PKP2*





Модель десминовых миопатий

Muscle isolation

Muscle digestion

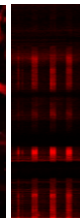
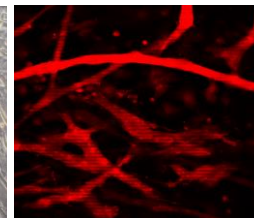
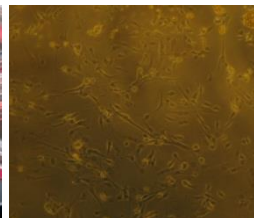
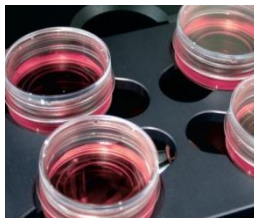
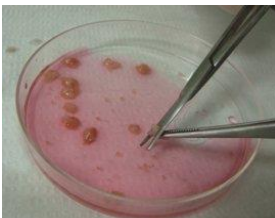
Satellite cells isolation

Cells plating

Cells cultivation

Primary myotubes

Calcium measurement



Collagenase treatment
90min

Cells isolation
2h

LV transduction
30min

Cells proliferation
7days

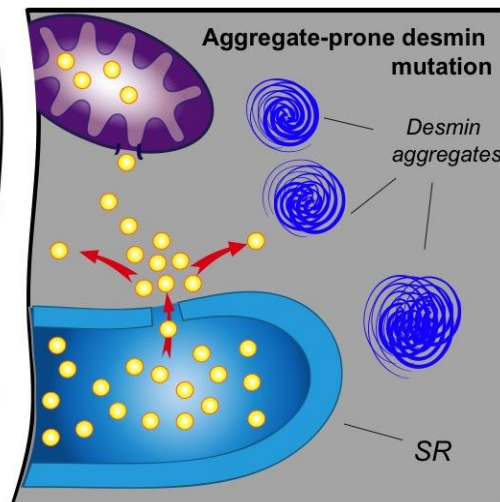
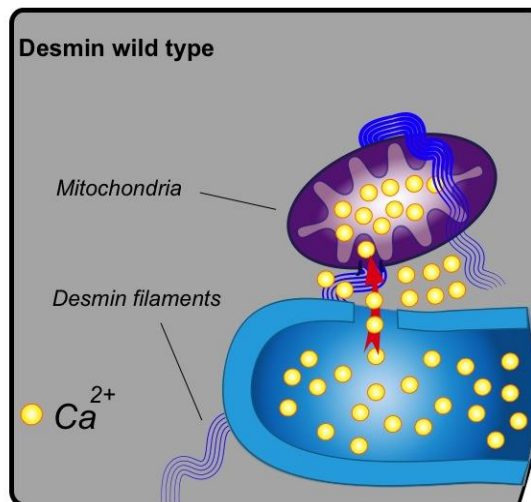
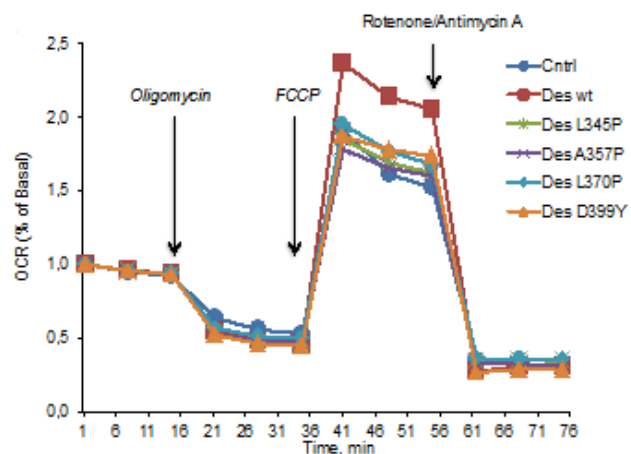
Cells differentiation
7days

Loading with a dye 30min

Measurement

Снижение максимального дыхания

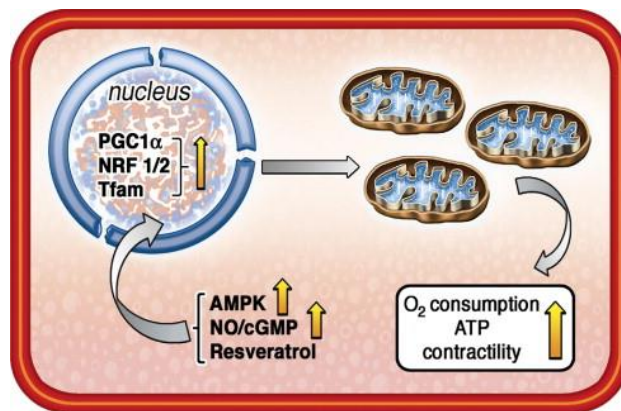
Нарушение функций митохондрий



Smolina et al., 2014

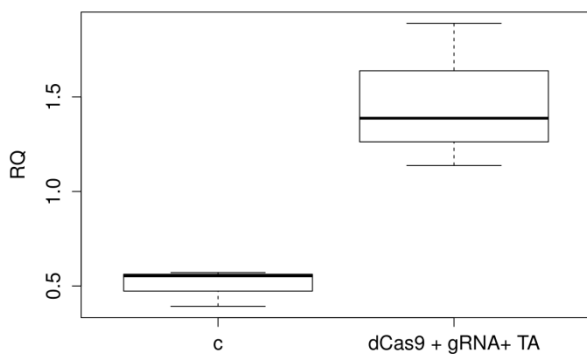


Восстановлении функции митохондрий с помощью активаторов транскрипции на основе CRISPR/dCas9

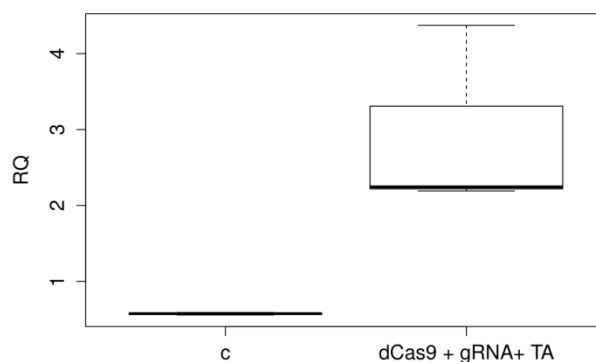


Активация экспрессии генов, регулирующих биогенез митохондрий

TFAM



PPARGC1A



NRF1

