

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ. АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ЖИВОТНЫХ

Одилжонов Хожиакбар Зокиржон угли
Наманганский государственный университет
E-mail: hojiakbarodiljonov22@gmail.com

АННОТАЦИЯ

В данной статье описаны исследования, анализ исследований и анализ геномов животных в области молекулярной генетики.

Ключевые слова: ДНК, фрагменты, РНК, ген, фермент.

За последние несколько лет бурное развитие редактирования генома произвело революцию в исследованиях генома человека, что позволило исследователям лучше понять вклад продукта одного гена в заболевание организма. В 1970-х годах развитие генной инженерии (манипулирование ДНК или РНК) установило новый рубеж в редактировании генома. чтобы продемонстрировать исключительную полезность в различных областях, от фундаментальных исследований до прикладных биотехнологий и биомедицинских исследований. Редактирование генома может быть достигнуто *in vitro* или *in vivo* путем предоставления оборудования для редактирования *in situ*, которое эффективно добавляет, удаляет и «исправляет» гены, а также как и другие узконаправленные геномные модификации. Направленные изменения ДНК начинаются с образования индуцируемых нуклеазами двухцепочечных разрывов (DSB), что приводит к стимуляции высокоэффективных механизмов рекомбинации клеточной ДНК в клетках млекопитающих. Индуцированные нуклеазами DSB ДНК могут быть репарированы с помощью одного из двух основных механизмов, которые встречаются почти во всех типах клеток и организмов: репарация, направленная на гомологию (HDR), и негомологичное соединение концов (NHEJ), что приводит к целенаправленной интеграции или разрушению генов. соответственно. [1]

Исторически сложилось так, что гомологичная рекомбинация (HR), при которой неповрежденные гомологичные фрагменты ДНК используются в качестве матриц, была подходом к реализации целевого добавления, замены или инактивации генов; однако полезность HR сильно ограничена из-за его неэффективности в клетках млекопитающих и модельных организмах. После того, как было обнаружено, что DSB могут повышать частоту HDR на несколько

порядков, целевые нуклеазы были найдены в качестве альтернативного подхода к увеличению эффективности опосредованного HDR генетического изменения. После создания целевого DSB HDR может реконструировать расщепленную ДНК с использованием экзогенного аналога матрицы ДНК для последовательности сайта разрыва.

Этот механизм можно использовать для введения точных мутаций путем доставки правильно сконструированной репарационной матрицы непосредственно в клетки-мишени, таким образом, сайт-специфическим образом, что приводит к коррекции мутации или вставке новой последовательности. С другой стороны, репарация, опосредованная NHEJ, имеет тенденцию приводить к ошибкам, поскольку она приводит к эффективному образованию вставок или делеций генов (вставок) различной длины в сайте DSB, что в конечном итоге вызывает инактивацию гена. Если в кодирующей последовательности встречаются вставки, могут быть мутации со сдвигом рамки считывания, которые приведут к деградации мРНК или продукции нефункциональных усеченных белков в результате нонсенс-опосредованного распада. Этот подход и его применение считаются более простыми, чем методы, основанные на HR, потому что (а) нет необходимости в репарационной матрице и (б) тип клеток оказывает меньшее влияние на эффективность модификации (в отличие от HR, NHEJ может быть активен на протяжении всего клеточного цикла). ген или несколько генов, но вызывая мутации с потерей функции, это может привести к постоянной инактивации гена.[2]

На ранней стадии развития редактирования генома, чтобы индуцировать желаемые DSB в каждом конкретном участке ДНК-мишени, в центре внимания исследований была разработка различных нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN) или мегануклеаз. Эти нуклеазные системы требовали специальной компетентности для создания искусственных белков, состоящих из ДНК-связывающих доменов с настраиваемой последовательностью, каждый из которых был связан с неспецифической нуклеазой для расщепления мишени, предоставляя исследователям беспрецедентные инструменты для выполнения генетических манипуляций. Впоследствии появился новый класс флавобактерий. океанокоитес (FokI), полученный из бактериальных белков, называемых эффекторами, подобными активаторам транскрипции (TALE), пролил свет на новые возможности для точного редактирования генома. Программируемые нуклеазы на основе TALE могут расщеплять любую интересующую последовательность ДНК с относительно высокой частотой. Тем не менее, основными проблемами для подходов с эффекторными нуклеазами, подобными активаторам транскрипции (TALEN), являются разработка сложного

молекулярного клонирования для каждой новой ДНК-мишени и его низкая эффективность скрининга генома в успешно нацеленных клетках. Ассоциированная нуклеаза 9 (Cas9) представляет собой недавно открытую надежную платформу для редактирования генов, полученную из системы адаптивной иммунной защиты бактерий. Эта система может быть эффективно запрограммирована для модификации генома эукариотических клеток с помощью модуля расщепления ДНК под управлением РНК и имеет появились как потенциальная альтернатива ZFN и TALEN для индукции целевых генетических модификаций. С 2013 года, когда она была впервые применена в клетках млекопитающих в качестве инструмента для редактирования генома, универсальная технология CRISPR/Cas9 быстро расширяется для модуляции экспрессии генов, начиная от коррекции или изменения геномной последовательности и заканчивая эпигенетическими и транскрипционными процессами. модификации.

Онкогены и мутантные гены-супрессоры опухолей открывают выдающиеся возможности для использования подходов, модулирующих геном. Технология редактирования генома позволила осуществить важнейшие события направленного расщепления в различных фундаментальных исследованиях, начиная с первоначальных доказательств эффективности редактирования генов у эукариот и заканчивая недавними применениями в инженерии гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и Т-клетки, нацеленные на опухоль; эта технология установила новые концепции модификации генов и распространилась на пограничную область исследований рака.[3]

В качестве архетипической платформы для программируемого расщепления ДНК ZFN-опосредованное нацеливание было успешно применено для модификации многих генов в клетках человека и ряда модельных организмов, что открыло двери для разработки и применения технологий редактирования генома. Нарушение генов, вызванное ZFN, впервые было продемонстрировано в 1994 г., когда был сконструирован белок с тремя пальцами для специфического блокирования экспрессии человеческого онкогена BCR-ABL, который был трансформирован в клеточную линию мыши. После этого в исследовании использовали лимфобластную клетку человека. линия, полученная от пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), и специально разработанный ZFN был применен к этой клеточной линии для доставки сайт-специфических DSB в теломерную часть области кластера точки разрыва гена лейкоза смешанного происхождения (MLL), а также для анализа хромосомные перестройки, связанные с лейкемогенезом MLL посредством репарации ошибок DSB. Успешная целевая модуляция была также достигнута с

использованием сконструированных ZFN, которые способствовали разрушению генов β - и α -цепей эндогенных Т-клеточных рецепторов (TCR). Лимфоциты, обработанные ZFN, не имели поверхностной экспрессии CD3-TCR и размножались с увеличением интерлейкина-7 (IL-7) и IL-15.⁶⁵ Путем нацеливания на промоторную функцию длинного терминального повтора (LTR) вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (HTLV-1), новый терапевтический ZFN, специфически убивающий HTLV-1-инфицированные клетки в модели Т-клеточного лейкоза взрослых (ATL). [4]

Высокоспецифичные ZFN прерывали трансляцию белка BCR-ABL и индуцировали апоптоз в устойчивых к иматинибу клетках CML.⁶⁷ может быть достигнуто в соответствующих типах клеток с помощью специальных нуклеаз. Кроме того, использование HER2-позитивного проникающего в клетку пептида (CPP), конъюгированного с mTOR-специфическим ZFN млекопитающих, сделало локус mTOR нефункциональным и ингибировало соответствующие сигнальные пути рака, что дало представление о разработке новых молекулярных таргетных терапевтических средств для рака молочной железы (в частности) и других видов рака.⁶⁹ Более того, поскольку ген-супрессор опухоли p53 играет ключевую роль в предотвращении развития рака, стратегии редактирования генома для восстановления функции p53 дикого типа были исследованы. Дрожжевой одногибридный (Y1H) четырехпальцевый ZFN был разработан для замены мутантного p53 на p53 дикого типа в нескольких линиях раковых клеток (из глиобластомы, лейкемии и рака молочной железы) с помощью ZFN-индуцированного HR.⁷⁰ Хотя события HR были не особенно эффективны в этом случае, модификации в локусах p53 по-прежнему обеспечивают основу для дальнейшего исследования. В дополнение к модификации вирусных генов, связанных с онкогенезом, исследователи применили ZFN для оптимизации противоопухолевой терапии, опосредованной Т-клетками. Например, путем импорта химерного TCR, который содержит внеклеточный домен IL-13 (зетакин) и цитоплазматический домен CD3, в CD8 + Т-клетки, можно получить специфичные для глиобластомы цитолитические Т-лимфоциты (CTL). Для достижения этой цели Reik et al. нокаут глюкокортикоидного рецептора в модифицированных ЦТЛ с помощью ZFN. Следовательно, цитолитическая активность трансгенных ЦТЛ «зетакин» в отношении глиобластом сохранялась независимо от наличия лечения глюкокортикоидами. Эта технология недавно была эффективна для нокаута генов, связанных с транспортом глюкозы (MCT4 или BSG), в двух моделях гликолитических опухолей: аденокарциноме толстой кишки и глиобластоме.[5]

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ: (REFERENCES)

1. Abell CE, Dekkers JCM, Rothschild MF, Mabry JW, Stlader KJ (2014) Оценка общей стоимости реализации геномной селекции в многоуровневой системе свиноводства. Генетика, селекция, эволюция 46, 32. doi: 10.1186/1297-9686-46-32
2. Alyethodi RR, Singh U, Kumar S, Alex R, Deb R, Sengar GS, Raja TV, Prakash B (2018) T-ARMS PCR генотипирование SNP rs445709131 с использованием термостабильной полимеразы замещения цепи. BMC Research Notes 11, 132. doi: 10.1186/s13104-018-3236-6
3. Tavares KCS, Carneiro IS, Rios DB, Feltrin C, Ribeiro AKC, Gaudêncio Neto S, Martind LT, Aguiar LH, Lazzarotto CR, Calderón CEM, Lopes FEM, Teixeira LPR, Bertolini M, Bertolini LR (2015) Быстрый и простой метод для определения пола эмбрионов домашнего скота на основе полимеразной цепной реакции. Генетика и молекулярные исследования 15. doi:10.4238/gmr.15017476
4. Kristensen TN, Hoffmann AA, Pertoldi C, Stronen AV (2015) What can livestock breeders learn from conservation genetics and vice versa? Frontiers in Genetics 6, 38. doi:10.3389/fgene.2015.00038
5. Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. Reviews in Aquaculture 4, 108–118. doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01067.x