(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192430 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.11

(22) Дата подачи заявки
2020.03.03

(51) Int. Cl. ***A01K 67/027*** (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) ПТИЦЫ С ОТРЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

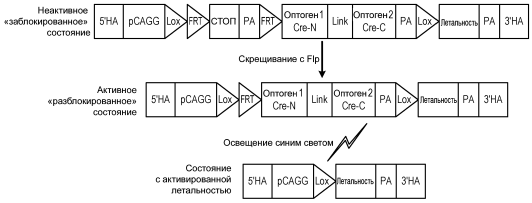
(31) **62/814,162**
(32) **2019.03.05**
(33) **US**
(86) **PCT/IL2020/050242**
(87) **WO 2020/178822 2020.09.10**

(71) Заявитель:
ТЕ СТЕЙТ ОФ ИЗРАЭЛ, МИНИСТРИ ОФ ЭГРИКАЛЧЕР ЭНД РУРАЛ ДИВЕЛОПМЕНТ, ЭГРИКАЛЧАРАЛ РИСЁРЧ ОРГАНАЙЗЕЙШН (АРО) (ВОЛКАНИ СЕНТЕР) (IL)

(72) Изобретатель:
Синнамон Юваль, Бен-Таль Коэн Энбаль (IL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В настоящем описании предлагаются экзогенные полинуклеотидные кассеты для создания химерных клеток птиц и химерных птиц. Полинуклеотидные кассеты можно использовать для создания условно-летального фенотипа у эмбрионов самцов птиц. В одном воплощении настоящее изобретение обеспечивает способы уничтожения мужских куриных эмбрионов in-ovo.



202192430 A1

202192430 A1

ПТИЦЫ С ОТРЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

Заявление о перечне последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание с ссылкой в полном объеме. Копия ASCII, созданная 24 февраля 2020 года, называется P-585110-PC_ST25.txt и имеет размер 355,8 КБ.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее раскрытие относится к агентам редактирования ДНК и их применению при получении клеток и птиц с отредактированной ДНК. Настоящее раскрытие дополнительно относится к способам придания фенотипа условно-летального характера мужским эмбрионам в яйцах птиц, подвергнутых редактированию ДНК.

Предшествующий уровень техники

Система определения пола ZW - это хромосомная система, которая определяет пол потомства у птиц, некоторых рыб и ракообразных, некоторых насекомых и некоторых рептилий. Буквы Z и W используются, чтобы отличить эту систему от системы определения пола XY. В системе ZW яйцеклетка определяет пол потомства. Самцы относятся к гомогаметному полу (ZZ), а самки - к гетерогаметному полу (ZW). Z-хромосома больше и имеет больше генов, как и X-хромосома в системе XY.

Ранняя идентификация и разделение пола являются важными аспектами всех коммерческих применений птиц, в частности, в индустрии яиц. Для бройлеров и индеек разделение по полу позволяет лучше приспособить схемы содержания и кормления в соответствии с различными потребностями обоих полов. Практически во всех коммерческих инкубаториях используется разделение стада по признаку пола. Цыплята-самцы, имеющие меньшую коммерческую ценность, забиваются в инкубатории, а цыплята-самки используются для производства яиц.

В настоящее время доступны три способа определения пола птицы. Пол суточных цыплят может быть определен либо путем идентификации ануса/клоаки, либо с помощью способов определения оперения. В качестве альтернативы, цыплята мужского и женского пола могут выращиваться вместе до тех пор, пока не станут очевидными вторичные гендерные характеристики, после чего цыплята могут быть разделены по полу. Определение ануса/клоаки зависит от внешнего вида анатомических структур, связанных с полом. Определение по оперению основано на характеристиках пера, которые различаются у цыплят-самцов и самок, например, паттерне окраски пуха, и на быстрой/медленной скорости роста перьев на крыльях. Третий способ основан на появлении естественных вторичных

гендерных характеристик, например, у самцов гребешки и бородки становятся больше, чем у самок.

Определение пола по анусу/клоаке суточных цыплят сложно и дорого. Определение пола птицы требует высококвалифицированного персонала. Хотя типирование по перьям проще в выполнении, его недостатком является то, что он ограничивается конкретными представителями генетического скрещивания птиц. Гендерное типирование по вторичным гендерным характеристикам - самый простой способ для выполнения, но его недостаток состоит в том, что птицы обоих полов должны выращиваться вместе в течение первых недель после вылупления, что из-за стоимости корма и соображений конверсии корма может быть для инкубатория дороже, чем типирование по анусу/клоаке.

Самое главное, что только в США и Европе ежегодно разными способами уничтожается почти миллиард цыплят-самцов. Это не только экономическая проблема, но и все больше становится этической проблемой.

В области коммерческих инкубаториев существует потребность в высокопроизводительных способах предотвращения получения цыплят-самцов, предпочтительно даже на стадии яйца, что позволяет избежать проблем, связанных с жизнеспособными цыплятами-самцами.

Сущность изобретения

В данном документе предлагается технология, которая включает композиции и способы, для уничтожения мужских эмбрионов эмбрионов in ovo. Такие композиции и способы полезны, поскольку они позволяют специалисту в области размножения птиц, например фермеру, смещать естественное соотношение 1: 1 между потомством самцов и самок в пользу более коммерчески пригодного потомства самок.

В одном воплощении в данном документе предлагается агент для редактирования ДНК, содержащий полинуклеотидную кассету, имеющую состав 5'-LHA (левое плечо для гомологичного спаривания)-OIE (оптогенетически индуцируемый элемент)-LIE (элемент, индуцирующий летальность)-RHA (правое плечо для гомологичного спаривания)-3' или формулой 5'-LHA-LIE-OIE-RHA-3', где (i) LHA включает первую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы; (ii) OIE включает первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; (iii) LIE включает третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, который функционально связан с активностью индуктор-активируемого сайт-специфичного фермента рекомбиназы; и (iv) RHA включает четвертую нуклеотидную

последовательность, которая по существу гомологична второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы.

В некоторых воплощениях один или оба из LHA и RHA по существу гомологичны соответствующей нуклеотидной последовательности, расположенной в открыто транскрибируемой области на Z-хромосоме птицы. Например, открыто транскрибируемая область может располагаться в локусе нуклеотидсвязывающего белка 1-Z с гистидиновыми триадами (HINT1Z) на Z-хромосоме птицы или ниже него.

В некоторых воплощениях активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы может представлять собой Cre-рекомбиназу (Cre) (SEQ ID NO: 113) или Mag (SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 65). В некоторых воплощениях экспрессия фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы индуцируется индуктором. В определенных воплощениях индуктор представляет собой электромагнитную энергию. Например, индуктором может быть синий свет с длиной волны 450–485 нм.

В некоторых воплощениях активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы, включает нефункциональные пептидные фрагменты активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы, которые объединяются с образованием активного фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы в присутствии индуктора.

В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, может быть токсином, проапоптотическим белком, ингибитором сигнального пути Wingless/Integrated (Wnt), антагонистом костного морфогенетического белка (BMP), антагонистом фактора роста фибробластов (FGF), каспазой 3 дикого типа, конститутивно активной каспазой 3, Noggin или индуцирующим летальность фрагментом любого из вышеуказанных белков.

В одном воплощении агент для редактирования ДНК, раскрытый в данном документе, включает (i) LHA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 105, (ii) OIE, содержащий последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательность SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с

последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью e из SEQ ID NO: 107, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 107, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, (iii) LIE, содержащий последовательность SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 96, или SEQ ID NO: 98, и (iv) RHA, содержащий последовательность SEQ ID NO: 106.

В некоторых воплощениях раскрытые в данном документе полинуклеотидные кассеты могут быть применены к птице, такой как курица, индейка, утка, гусь, перепел, фазан или страус.

В другом воплощении настоящее изобретение также относится к птичьим клеткам, которые содержат полинуклеотидные кассеты, раскрытые в данном документе. В другом воплощении предложена химерная птица, содержащая клетки птицы, которые содержат полинуклеотидные кассеты, раскрытые в данном документе.

Кроме того, в другом аспекте предусмотрены способы применения агента для редактирования ДНК, раскрытого в данном документе, для создания химерной птицы. В некоторых воплощениях способы включают стадии контакта клеток птицы с экзогенными полинуклеотидными кассетами, раскрытыми в данном документе, с получением, таким образом, клеток птицы с отредактированным геномом, с последующим переносом этих клеток птицы с отредактированным геномом в эмбрионы птиц-реципиентов. Кроме того, в другом аспекте представлены химерные птицы, полученные указанными выше способами.

Кроме того, в другом аспекте предложен способ индукции летальности у мужских эмбрионов птиц, включающий стадии введения агента для редактирования ДНК, описанного в данном документе, в популяцию птичьих клеток, с получением тем самым клеток птицы с отредактированным геномом; перенос этих клеток птицы с отредактированным геномом в эмбрионы птиц-реципиентов; и воздействие на эмбрионы индуктора, который вызывает экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого агентом для редактирования ДНК, тем самым вызывая летальность у эмбрионов самцов птиц.

В другом воплощении агент для редактирования ДНК, раскрытый в данном документе, дополнительно включает элемент блокировки, вставленный ниже промотора в OIE, но выше последовательности, кодирующей индуктор-активируемую сайт-

специфическую рекомбиназу. Элемент блокировки включает нуклеотидные последовательности (элемент STOP), которые предотвращают транскрипцию активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы, кодируемой OIE. В одном воплощении элемент STOP фланкируется двумя сайтами FRT. В одном воплощении каждый из агентов для редактирования ДНК, имеющих последовательность одной из SEQ ID NO: 120-127, включает элемент блокировки. Кроме того, в другом аспекте предоставляется способ использования агента для редактирования ДНК, который включает элемент блокировки, для создания химерной птицы.

В другом воплощении предлагается способ применения агента для редактирования ДНК, который включает элемент блокировки, для индукции летального исхода у мужского эмбриона птицы, способ включает следующие стадии: введение такого агента для редактирования ДНК популяции клеток птицы, с получением таким образом клеток птицы с отредактированным геномом; перенос этих клеток птицы с отредактированным геномом в эмбрионы птиц-реципиентов; и воздействие на эмбрионы агента, который удаляет элемент STOP из агента для редактирования ДНК, тем самым вызывая экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого агентом для редактирования ДНК, и вызывая летальность у мужских эмбрионов птицы.

Если не указано иное, все технические и/или научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится аспект или воплощение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут использоваться на практике или при тестировании воплощений аспекта, примерные способы и/или материалы описаны ниже. В случае конфликта описание патента, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, методы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Краткое описание чертежей

Некоторые воплощения описаны в данном документе только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые чертежи. Обращаясь теперь к конкретным подробным чертежам, следует подчеркнуть, что детали, показанные в качестве примера и в целях иллюстративного обсуждения определенных воплощений. В этом отношении описание чертежей делает очевидным для специалистов в данной области техники, как воплощения могут быть реализованы на практике.

Предмет, рассматриваемый в данном документе, особо выделен и четко заявлен в заключительной части описания. Однако воплощения, как по организации, так и по способу работы, вместе с их объектами, особенностями и преимуществами, могут быть лучше всего

поняты при обращении к нижеследующему подробному описанию при чтении с прилагаемыми чертежами, среди которых:

Фиг. 1 представляет собой рисунок, иллюстрирующий вариант создания оптогенетической индуцибельной линии кур, из которой вылупляются только куры-несушки. При скрещивании петуха дикого типа (ZZ) с генетически модифицированной курицей (ZW) все фертильные яйца самок будут нести хромосомы ZW дикого типа. Все оплодотворенные яйца самцов будут нести хромосомы ZZ, в которых генетически модифицированная Z получена из генома генетически модифицированной курицы. При освещении фертильных яиц синим светом оптогенетическая система на этой генетически модифицированной хромосоме активируется и активирует механизм гибели, который приведет к ранней эмбриональной смертности самцов вскоре после откладки яиц. Самки, на которых не повлияет синий свет, вылупятся, вырастут и будут нести бесплодные яйца для пищевых продуктов.

Фиг. 2 иллюстрирует воплощение стратегии контроля экспрессии гена посредством освещения синим светом. Создаются два гибридных белка: Cry2 с неактивным N-концевым Cre (Cry2-CreN-term) и CIBN, объединенный с неактивным C-концевым Cre (CIBN-Cre-C-term). Без освещения синим светом Cre неактивен. При освещении синим светом Cry2 и CIBN образуют комплекс, и две части Cre объединяются, образуя активный фермент Cre.

Фиг. 3 иллюстрирует пример плеч для гомологичного спаривания на Z-хромосоме. Изображена геномная область ниже локуса HINT1Z. Плечи 5' и 3' представляют собой HA-1 (левое плечо для гомологичного спаривания; LHA) и HA-2 (правое плечо для гомологичного спаривания; RHA), соответственно. Праймеры для амплификации плеч указаны полыми стрелками (FWD HA5 ’P1 и REV HA3’ P2). Между плечами для гомологичного спаривания на обеих цепях ДНК есть последовательности для CRISPR-Cas9 (незакрашенные прямоугольники, CRISPR Guide 1 и 3). Нижняя часть фиг. 3 подробно показывает область между двумя плечами для гомологичного спаривания. Проиллюстрирована последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1, включая фрагменты LHA-CRISPR-RHA.

Фиг. 4A-4C иллюстрируют различные воплощения векторов направленного воздействия или агентов для редактирования ДНК. Фиг. 4A показан нацеленный вектор, содержащий 3 основных элемента. Первое, 5' и 3' плеча для гомологичного спаривания (HA) для гомологичной рекомбинации (HR), фланкирующие всю экзогенную вставную кассету. Второй элемент - это светоиндуцируемая система - в данном случае Cry2-CreN и CIBN-Cre-C. Третий элемент - кассета генов летальности. В одном воплощении стратегии с одним нацеленным вектором за 5' HA следует промотор pGK, который управляет экспрессией

генов Cry2-CreN и CIBN-Cre-C, которые разделены самоотщепляющимся пептидом P2A. За этим элементом следует кассета экзогенного гена летальности, которая включает промотор pGK, за которым следует сайт LoxP-STOP-LoxP (LSL), за которым следует ген, индуцирующий летальность. За этой экзогенной кассетой следует 3' HA. При световой индукции Cry2-CreN и CIBN-Cre-C димеризуются с образованием активной формы Cre. Последний затем вырезает элемент LSL, тем самым обеспечивая экспрессию гена, вызывающего летальность, что приводит к гибели эмбрионов у всех эмбрионов, несущих этот вектор. Фиг. 4B показан альтернативный подход. Вместо применения элемента LSL используется стратегия переворачивания Dio-lox. Между сайтами Dio-Lox за GFP следует сайт полиаденилирования №1 (PA1), а за геном летальности следует другой сайт полиаденилирования №2 (PA2) в обратной ориентации. В этом случае перед световой активацией промотор pGK управляет экспрессией GFP. После световой активации кассета между сайтами Dio-Lox переворачивается, и ген летальности теперь находится в правильной ориентации для экспрессии, в то время как GFP теперь находится в обратной ориентации и больше не активен. На фиг. 4C показано еще одно воплощение. После активации Cre LSL удаляется и экспрессируются Cas9 и одиночная направляющая РНК (sgРНК). Это приводит к введению миссенс-мутации в кодирующую область важного гена (нацеленного на sgРНК), вызывая таким образом эмбриональную летальность.

Фиг. 5A-5F — получение и характеризация линии PGC. Фиг. 5A, культура первичных половых клеток (PGC); фиг. 5B, слева, экспрессия мРНК различных маркеров плюрипотентных и половых клеток, как указано. Справа - репрезентативная характеризация половой идентификации самок PGC (слева — два продукта ПЦР рибосомной S18 и W-хромосомы) и самцов PGC (справа — только рибосомная S18). Фиг. 5C, окрашивание PGC анти-SSEA1 антителами. Фиг. 5D — трансфекция PGC плазмидой pCAGG-GFP с использованием реагента Lipofectamine 2000. Фиг. 5E — трансфекция PGC плазмидой pCAGG-GFP с использованием электропорации. Фиг. 5F — гонады (яички) эмбриона, через 10 дней после трансплантации с помощью GFP-экспрессирующих культивируемых PGC.

Фиг. 6A-6C — создание сайтов sgРНК для CRISPR-опосредованного направленного воздействия. На фиг. 6A показан пример области генома на Z-хромосоме для потенциальных сайтов нацеливания CRISPR. На фиг. 6B показаны 12 верхних последовательностей sgРНК (направляющие №1-№12). Направляющие № 1 и № 3, которые частично перекрываются в противоположных ориентациях, были выбраны для дальнейших экспериментов. 3-нуклеотидные последовательности PAM не являются частью направляющих последовательностей, и последовательности PAM не включены в SEQ ID NO: 66-77. 10 лучших результатов поиска последовательностей, потенциально не являющихся мишенью

для направляющей №1, показаны на фиг. 6C. SEQ ID NO: 78-87 не включают 3-нуклеотидные последовательности PAM.

Фиг. 7A-7C — проверка активности CRISPR с помощью анализа эндонуклеаз. Фиг. 7A — положительный контроль эндонуклеазного анализа с использованием отожженного продукта ПЦР WT 320 п.о. и мутированного продукта в предполагаемом сайте расщепления CRISPR1 в указанных соотношениях. Фиг. 7B — эндонуклеазный анализ 12 колоний, трансфицированных плазмидой CRISPR1. Фиг. 7C — эндонуклеазный анализ 12 колоний, трансфицированных плазмидой CRISPR3. Расстояние между двумя спрогнозированными сайтами расщепления CRISPR1 и CRISPR3 составляет 12 пар оснований.

Фиг. 8A-8D — проверка активности CRISPR с помощью секвенирования ДНК. Фиг. 8A — хроматограмма ДНК геномной области дикого типа (WT) в предполагаемом сайте расщепления CRISPR1, показывающая нормальную последовательность в качестве отрицательного контроля. Фиг. 8B — последовательность смеси продуктов ПЦР дикого типа и искусственно мутированных продуктов, показывающая появление двойных пиков (стрелка) после спрогнозированного сайта расщепления, в качестве положительного контроля. Фиг. 8C — секвенирование отрицательной колонии показывает нормальную последовательность. Фиг. 8D — последовательность положительных колоний, показывающая появление двойных пиков после сайта расщепления CRISPR1 (стрелка).

Фиг. 9A-9F — создание нацеленного вектора для геномной интеграции в Z-хромосому. Фиг. 9A - геномную ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с праймерами P1 и P2, которые находятся в областях 5'HA и 3'HA (обозначены пунктирной линией), фланкируя область, содержащую сайт CRISPR. Фиг. 9B - продукт размером ~ 3 т.о., расположенный ниже локуса HINT1Z, был лигирован с челночным вектором pJet1.2. Эту плазмиду использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P3 и P4. Эти праймеры имеют выступающие последовательности удлинения (обозначенные фигурными скобками), которые соответствуют эквивалентным областям на фрагменте pCAGG-Neo-IRES-GFP. Фиг. 9C - линеаризованный продукт (вектор), содержащий два плеча гомологии, за исключением области, содержащей сайт CRISPR, фланкированной последовательностями, которые связывают концы кассеты pCAGG-Neo-IRES-GFP во время реакции Гибсона. Фиг. 9D - плазмиду pCAGG-Neo-IRES-GFP использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с праймерами P5 и P6. Эти праймеры содержат удлиненные выступающие последовательности (обозначенные фигурными скобками), которые соответствуют эквивалентным областям на краях плеч гомологии. Фиг. 9E - кассета линеаризованной вставки, фланкированная последовательностями, которые связывают концы плеч гомологии. Вектор и вставка были сшиты вместе реакцией сборки Гибсона для создания конечной

плазмиды нацеленного вектора, как показано на фиг. 9F.

Фиг. 10A-10D — котрансфекция нацеленного вектора и плазмид CRISPR в PGC. Фиг. 10A — котрансфекция, опосредованная липофекцией, в PGC с помощью плазмид нацеленного вектора CRISPR1 и HR. Фиг. 10B — через две недели после отбора G-418> 99% резистентных PGC были положительными по GFP. Фиг. 10C — через десять дней после инъекции таргетных PGC эмбриону-хозяину было обнаружено, что многочисленные клетки локализованы в гонадах (яичках). Фиг. 10D — гонады иссекали, иммуноокрашивали антителом против GFP и сканировали с использованием конфокального микроскопа (антитело GFP окрашивалось зеленым цветом, а ядра подвергали контрастному окрашиванию 4', 6 диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) синим цветом).

Фиг. 11A-11D — проверка интеграции HR в FACS сортированных PGC. Фиг. 11A — FACS-сортировка устойчивых к G-418 PGC. Гейтирование FACS было разработано для сортировки единичных (sin) GFP-положительных клеток, которые были отсортированы в виде пула или отдельных клеток в 96-луночном планшете. Фиг. 11B. Для ПЦР-анализа были созданы два набора праймеров для 5’ сайта интеграции (P7 и P8) и 3’ сайта интеграции (P9 и P10). Фиг. 11C — геномную ДНК, выделенную из объединенных клеток, использовали в качестве матрицы для ПЦР, а ДНК дикого типа служила отрицательным контролем. Прогнозируемые полосы 1,6 т.о. и 1,8 т.о. были доказательством правильной интеграции HR в 5’ и 3’ областях, соответственно. Фиг. 11D — геномная ДНК, выделенная из мужских и женских клеточных колоний, происходящих из одноклеточных FACS-сортированных PGC, была использована в качестве матрицы для ПЦР, а ДНК дикого типа служила отрицательным контролем. Прогнозируемые полосы 1,6 т.о. и 1,8 т.о. были доказательством правильной интеграции HR в 5’ и 3’ областях, соответственно.

Фиг. 12A-12D — саузерн-блот-анализ интеграции HR. Фиг. 12A - схематическое изображение ожидаемых продуктов расщепления BglII в Саузерн-блот-анализе для аллеля WT и аллеля, который подвергся интеграции HR. Зонды, используемые для сайтов интеграции 5’, 3’ и neo, отмечены короткими столбцами. Показан ожидаемый размер продукта после расщепления BglII для каждого ДНК-зонда. Фиг. 12B - получение Dig-меченных зондов с помощью ПЦР. Dig-меченные зонды (+) или немеченые (-), анализировали на агарозном геле. Обратите внимание, что Dig-меченные продукты смещены больше, чем их фактический размер, что подтверждает интеграцию Dig-меченных нуклеотидов. Указаны наборы праймеров, используемых для амплификации зондов. Фиг. 12C - Саузерн-блот-анализ с использованием зондов 5' и 3' на ДНК, экстрагированной из объединенных и чистых колоний PGC, полученных из самцов. ДНК дикого типа, выделенная из исходной линии перед HR, служила отрицательным контролем. Фиг. 12D -

Саузерн-блот-анализ с зондами 5' и Neo на PGC, полученных из самок. Одна полоса 7,5 т.о. видна в обоих случаях, что указывает на то, что произошла правильная HR и была интегрирована только одна копия нацеленного вектора.

Фиг. 13 — проверка оптогенетической системы в клетках HEK293, in vitro. Тройная трансфекция плазмидами pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-Cre-C и PB-RAGE-GFP. Через 24 часа после трансфекции клетки экспериментальной группы подвергали воздействию синего света в течение 15 секунд, в то время как контрольные клетки держали в темноте (верхний ряд). После освещения (нижний ряд) клетки дополнительно инкубировали в течение 24 часов. В этих клетках была очевидна экспрессия GFP, подтверждающая активацию фермента Cre при освещении синим светом.

Фиг. 14 — проверка оптогенетической системы in-ovo на куриных эмбрионах, инкубированных в течение 54-60 часов до электропорации. Тройная электропорация куриных эмбрионов с плазмидами pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и pB-RAGE-GFP. Через 12 часов после электропорации эмбрионы экспериментальной группы подвергались воздействию синего света in-ovo в течение 15 секунд, в то время как контрольные эмбрионы содержались в темноте (верхний ряд). После освещения (нижний ряд) эмбрионы из обеих групп инкубировали в течение дополнительных 12 часов. После инкубации клетки, экспрессирующие GFP, были четко видны в освещенной группе, что подтверждает активацию оптогенетической системы и фермента Cre при освещении синим светом куриных эмбрионов in-ovo.

Фиг. 15A-15F — конструирование вектора экспрессии одиночного оптогена под промотором CAGG. Фиг. 15A — плазмиды оптогенов pmCherry-CIBN-CreC и pmCherry-Cry2-CreN использовали в качестве матрицы для амплификации гибридных белков оптогенов с использованием праймеров P40-P41 и P42-P43, соответственно. Два продукта имеют общие перекрывающиеся последовательности в сайте P2A, который был введен в праймеры P41 и P42. Это позволило с помощью одноцикловой ПЦР с удлинением выступающих концов объединить два фрагмента (см. фиг. 15B) в один фрагмент, который был лигирован с челночным вектором pJet1.2, как показано на фиг. 15C. Используя праймеры P44 и P45, которые содержат хвосты с сайтами рестрикции SmaI и NheI, соответственно, продукт на фиг. 15D был сгенерирован. Этот продукт расщепляли с использованием соответствующих рестрикционных ферментов и лигировали с pCAGG-IRES-GFP (фиг. 15E), которая была расщеплена теми же ферментами, чтобы получить вектор, показанный на фиг. 15F.

Фиг. 16 — проверка активности плазмиды pCAGG-Optogene в клетках HEK293. Котрансфекция плазмидами pCAGG-Optogene и pB-RAGE-mCherry. Через двадцать четыре

часа после трансфекции, в то время как группу отрицательного контроля держали в темноте (верхний ряд), клетки экспериментальной группы подвергали в течение 15 секунд воздействию синего света (нижний ряд). После освещения (нижний ряд) клетки дополнительно инкубировали в течение 24 часов. В этих клетках была очевидна экспрессия mCherry (белые стрелки), подтверждающая активацию фермента Cre плазмидой pCAGG-Optogene при освещении синим светом.

Фиг. 17 — проверка стратегии с одним вектором с использованием плазмиды pCAGG-Optogenes in-ovo. Куриные эмбрионы на стадиях 14-16H и H были совместно электропорированы с плазмидами pCAGG-Optogenes и pB-RAGE-mCherry. Последняя плазмида служит репортерным геном для активности оптогенетической системы. Через двенадцать часов после электропорации эмбрионы экспериментальной группы (нижний ряд) подвергались в течение 15 секунд воздействию синего света in-ovo, в то время как контрольные эмбрионы содержались в темноте (верхний ряд). Эмбрионы дополнительно инкубировали в течение 12 часов. После инкубации клетки, экспрессирующие GFP, были четко видны в обеих группах, что указывает на успешную электропорацию, однако только в освещенной группе клетки, экспрессирующие mCherry, были очевидны, подтверждая активацию оптогенетической системы и фермента Cre при освещении синим светом куриных эмбрионов in-ovo.

Фиг. 18 — экспрессия DTA под промотором pGK ингибирует синтез белка in-ovo. Эмбрионы на стадиях 14-16 H&H подвергали электропорации с экспрессирующим вектором pGK-IRES-GFP (верхний ряд) или pGK-DTA-IRES-GFP (нижний ряд). Эмбрионы отрицательного контроля широко экспрессируют GFP (верхний ряд, стрелка), что указывает на нормальный синтез белка. Клетки, экспрессирующие DTA, не показывают экспрессии GFP (нижний ряд), что указывает на то, что синтез белка в этих эмбрионах подавлен. Представлены только GFP, только светлое поле и GFP, наложенные на изображения в светлом поле.

Фиг. 19A-19B — воплощения векторов направленного воздействия. В этих векторах активирующий фермент (например, Cre) отделен от кассеты летального гена. На фиг. 19A, активирующий фермент вставляется в геном курицы, а неактивная кассета летальности вставляется в Z-хромосому петуха, которая является гомозиготной по этому аллелю. В этом случае активация летальности у мужских эмбрионов осуществляется путем скрещивания двух трансгенных родителей без необходимости световой индукции. Cre у всех самцов удаляет LSL на материнской Z-хромосоме, тем самым позволяя экспрессировать ген летальности, в то время как женский эмбрион несет неактивную кассету летальности и, таким образом, не подвергаются воздействию. Фиг. 19B — в качестве альтернативы, на Z-

хромосому курицы направленно воздействует кассета переворачивания Dio-Lox, содержащая рекомбиназу FLP в правильном направлении, за которой следует ген летальности в обратной ориентации, управляемый промотором CAGG. Петух, снова становится гомозиготным по Z-хромосоме, на которую нацелена кассета CAGG-Cre, фланкированная сайтами FRT. При скрещивании этих двух мужские эмбрионы будут экспрессировать Cre, расположенный на отцовской Z-хромосоме, кассета Dio-Lox переворачивается, и ген летальности становится активным, что приводит к эмбриональной летальности мужского эмбриона. Зигота женского эмбриона от этого скрещивания включает материнский вклад фермента рекомбиназы FLP, который продуцируется во время оогенеза. Этот материнский белок удаляет кассету CAGG-Cre из Z-хромосомы, оставляя женский эмбрион живым только с FRT «шрамом» на Z-хромосоме.

Фиг. 20 — ОТ-ПЦР на кДНК из экстракта тотальной РНК из цельного свежеобразованного слоя бластодермы (B1) и PGC с праймерами для HINT1Z и GAPDH в качестве положительного контроля (праймеры GAPDH: прямой - (SEQ ID NO: 90); обратный - (SEQ ID NO: 91), 93 п.н.). Полосы с прогнозируемым размером 153 п.н. указывают на то, что в обоих образцах транскрибируется HINT1Z, расположенный на Z-хромосоме.

Фиг. 21 — принципиальная схема двух плазмид, содержащих модифицированную оптогенетическую систему (pCAGG-CIBN-Cre-C-P2A-Cry2-Cre-N и pCAGG-Cry2-Cre-N-P2A-CIBN-Cre-C).

Фиг. 22 — проверка оптогенетической системы в культивируемых клетках HEK293. Оптогенетическая плазмида pCAGG-CIBN-CreC-IRES-Cry2-CreN-IRES-GFP была котрансфицирована pB-RAGE-mCherry. Как и вектор PB-RAGE-GFP, описанный выше, pB-RAGE-mCherry включает последовательность множественных стоп-кодонов, фланкированную сайтами LoxP выше кодирующей области mCherry. После активации Cre стоп-кодоны удаляются, что позволяет экспрессировать mCherry. В то время как в клетках HEK293, котрансфицированных и хранящихся в темноте, не было mCherry-положительных клеток, в котрансфицированных клетках HEK293, которые подвергались воздействию синего света, многие клетки экспрессировали mCherry, что подтверждает, что стратегия pCAGG-Optogenes с использованием одиночного вектора сохраняет оптогенетические свойства системы.

Фиг. 23 — проверка оптогенетической системы с помощью электропорации в куриных эмбрионах. pCAGG-CIBN-IRES-Cry2, который также кодирует GFP, подвергали электропорации вместе с PB-RAGE-mCherry, который дает красную флуоресценцию в присутствии активной рекомбиназы Cre. При индукции синим светом Cry2-CreN и CIBN-CreC димеризуются, что обеспечивает активность Cre. Белыми кружками обозначены

области перекрывающейся флуоресценции.

Фиг. 24A-24B — индукция гибели клеток в PGC с использованием DTA (фиг. 24A) или каспазы 3 (фиг. 24B). Фиг. 24A — представлен эффект DTA на гибель клеток PGC. PGC трансфицировали контрольной 1 PGK-IRES-GFP, контрольной 2 pCAGG-GFP или PGK-DTA-IRES-GFP плазмидами pCAGG-GFP и инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов. Гибель клеток оценивали с помощью проточной цитометрии для определения GFP и PI. Результаты представляют соотношение между клетками GFP + PI и только GFP. Фиг. 24B — представлен эффект Casp на гибель клеток PGC. PGC трансфицировали контрольными плазмидами PGK-IRES-GFP, PGK-WT Caspase3-IRES-GFP или PGK-CA Caspase3-IRES-GFP и инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов перед анализом, как показано на фиг. 24A.

Фиг. 25 — схематическое изображение нацеленного вектора, содержащего все элементы, и активацию кассеты, вызывающей летальность, при освещении синим светом.

Фиг. 26A-26B — схематическое изображение векторов направленного воздействия, содержащих механизм «блокировки», как описано в Примере 3.

Фиг. 27A-27D — проверка векторов направленного воздействия в культивируемых клетках HEK293. Для проверки in vitro клетки HEK293 трансфицировали только TV4 (фиг. 27A), pCAGG-Cre (фиг. 27B) или плазмидами pCAGG-FlpO (фиг. 27C-27D). Клетки хранили в темноте (фиг. 27C) или подвергали воздействию синего света в течение 15 секунд через 24 часа после трансфекции (фиг. 27D). После освещения клетки дополнительно инкубировали в течение 24 часов.

Фиг. 28A-28D — проверка векторов направленного воздействия электропорацией в куриных эмбрионах. Куриным эмбрионам инъецировали плазмиды в нервную трубку и подвергали электропорации, как описано в данном документе. Белые линии обозначают дорсальную среднюю линию нервной трубки и зачатков конечностей для ориентации. Были протестированы четыре группы обработки: 1. экспрессия только TV4 (фиг. 28A), 2. совместная электропорация плазмид TV4 и pCAGG-Cre в качестве положительного контроля (фиг. 28B), 3. Совместная электропорация плазмид TV4 и pCAGG-FlpO. Клетки хранили в темноте (фиг. 28C), и 4. Воздействие синего света в течение 15 секунд после совместной электропорации плазмид TV4 и pCAGG-FlpO и дальнейшая инкубация в течение 12 часов (фиг. 28D).

Фиг. 29A-29B — светозависимая активность гена, вызывающего летальность, Noggin. Куриные эмбрионы подвергали электропорации в нервной трубке с помощью нацеливающего вектора TV1, плазмид pCAGG-FlpO и pCAGG-IRES-GFP. Вектор направленного воздействия TV1 включает кодирующую последовательность Noggin в качестве элемента, вызывающего летальный исход. Фиг. 29A показывает результаты без

световой индукции; верхний ряд, вид сверху; нижний ряд, правая боковая проекция. Фиг. 29B показывает результаты с индукцией синего света.

Фиг. 30A-30E — Noggin способен останавливать эмбриональное развитие на эмбриональной стадии бластодермы. Бластодермы обрабатывали экзогенным источником Noggin. Плазмиды pCAGG-Noggin-IRES-GFP или pCAGG-IRES-GFP (в качестве отрицательного контроля) трансфицировали в клетки HEK293. На фиг. 30A показано, что общий белок, экстрагированный из трансфицированных клеток, анализировали вестерн-блоттингом с анти-Noggin антителом и анти-α-тубулин-HRP антителом. Кондиционированную среду из контроля и клеток, экспрессирующих Noggin, инъецировали в свежеснесенные фертильные яйца, которые затем инкубировали в течение 24 часов (фиг. 30B-C) или 54 часов (фиг. 30D-E).

Фиг. 31A-31C — PGC, которые подверглись HR на Z-хромосоме с TV1, успешно колонизировали гонады у куриных эмбрионов. На фиг. 31A показана линия чистых женских PGC, которые подверглись HR с TV1 и экспрессировали GFP. На фиг. 31B показан вид эмбриона с вентральной стороны через 5 дней после инъекции PGC. PGC колонизировали половой тяж, который является зачатком гонад (фиг. 31B, стрелки). Цыплят-самок забивали на 10-й день после вылупления для анализа яичника. Фиг. 31C показан яичник (очерченный линией), содержащий многочисленные GFP-положительные PGC.

Следует принять во внимание, что для простоты и ясности иллюстрации элементы, показанные на фигурах, нарисованы необязательно с учетом масштаба. Например, для ясности размеры некоторых элементов могут быть увеличены по сравнению с другими элементами. Кроме того, в случае целесообразности, номера ссылок могут повторяться на фигурах для обозначения соответствующих или аналогичных элементов.

Подробное описание

В нижеследующем подробном описании изложены многочисленные конкретные детали, чтобы обеспечить полное понимание представленных в данном документе композиций и способов. Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее раскрытие может быть реализовано на практике без этих конкретных деталей. В других случаях хорошо известные способы, процедуры и компоненты не были описаны подробно, чтобы не затруднять понимание композиций и способов, представленных в данном документе.

Прежде чем подробно объяснять по меньшей мере одно воплощение изобретения, следует понимать, что изобретение не обязательно ограничивается в своем применении деталями, изложенными в нижеследующем описании или проиллюстрированными примерами. Изобретение охватывает другие воплощения или может быть осуществлено на

практике различными способами.

Термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеющий» и их конъюгаты охватывают «включая, без ограничения указанным».

Используемые в данном документе формы единственного числа включают отсылки к множественному числу, если контекст явно не указывает иное. Например, термин «соединение» или «по меньшей мере одно соединение» может включать множество соединений, включая их смеси.

В некоторых воплощениях термин «около» относится к отклонению в пределах 0,0001-5% от указанного числа или диапазона чисел. В некоторых воплощениях термин «около» относится к отклонению в пределах 1-10% от указанного числа или диапазона чисел. В некоторых воплощениях термин «около» относится к отклонению до 25% от указанного числа или диапазона чисел. В некоторых воплощениях термин «около» относится к ± 10%.

В этой заявке различные воплощения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое ограничение объема определенных воплощений. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающие поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3. до 6 и т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона.

Всякий раз, когда в данном документе указывается числовой диапазон, подразумевается, что он включает любое процитированное число (дробное или целое) в пределах указанного диапазона. Фразы «диапазон/диапазоны между» первым указанным числом и вторым указанным числом и «диапазон/диапазоны от» первого указанного числа «до» второго указанного числа используются в данном документе взаимозаменяемо и предназначены для включения первого и второго указанных чисел и все дробные и целые числа между ними.

В одном воплощении с помощью технологии, продуктов и способов, представленных в данном документе, создается порода кур, у которой вылупляются только самки-несушки, в то время как мужские эмбрионы перестают развиваться вскоре после оплодотворения. Таким образом отпадает необходимость отбраковки цыплят-самцов и сохраняется 50% ценного инкубационного пространства в инкубаториях. Важно отметить, что как самки, так и яйца, полученные с помощью описанных в данном документе способов, во всех аспектах

идентичны курицам-несушкам и пищевым яйцам, потребляемым в настоящее время населением.

Используемые в данном документе термины «птица» или «виды птиц» относятся к любому виду птиц, включая, без ограничения указанным, курицу, индейку, утку, гуся, перепела, фазана и страуса. В некоторых воплощениях птица является домашней птицей. В некоторых воплощениях птица представляет собой Gallus gallus. В некоторых воплощениях птица представляет собой домашний Gallus gallus. В некоторых воплощениях птица представляет собой Gallus gallus domesticus.

В некоторых воплощениях птица представляет собой самку. В некоторых воплощениях птица представляет собой самца. В некоторых воплощениях птица является бройлером. В некоторых воплощениях птица представляет собой курицу. В определенных воплощениях птица представляет собой несушку. В некоторых воплощениях птица представляет собой домашнюю курицу. В некоторых воплощениях птица представляет собой курицу-несушку Gallus gallus domesticus.

Используемый в данном документе термин «яйцо» относится к птичьему яйцу, которое включает жизнеспособную или живую птицу на стадии эмбрионального развития. В одном воплощении термин «яйцо» предназначен для обозначения оплодотворенного птичьего яйца. В одном воплощении яйцо представляет собой яйцо, содержащее птичий эмбрион, способный к нормальному эмбриогенезу.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Редактирование генома с использованием сконструированных эндонуклеаз относится к генетическому способу с использованием нуклеаз для разрезания и создания определенных двухцепочечных разрывов в желаемом(-ых) месте(-ах) в геноме (например, на Z-хромосоме птицы), которые затем восстанавливаются эндогенными клеточными процессами, такие как гомологичная репарация (HDR) и негомологичное соединение концов (NHEJ). NHEJ напрямую соединяет концы ДНК в двухцепочечном разрыве, в то время как HDR использует гомологичную последовательность в качестве матрицы для восстановления отсутствующей последовательности ДНК в точке разрыва. Чтобы внести специфические нуклеотидные модификации в геномную ДНК, во время HDR должна присутствовать матрица репарации ДНК, содержащая желаемую последовательность. Редактирование генома не может быть выполнено с использованием традиционных эндонуклеаз рестрикции, поскольку большинство рестрикционных ферментов распознают только несколько пар оснований в ДНК в качестве своей мишени, и очень высока вероятность того, что распознанная комбинация пар оснований будет найдена во многих местах генома, что приведет к множеству разрезов, без ограничения желаемым местом. Чтобы преодолеть эту проблему и

создать сайт-специфичные одно- или двухцепочечные разрывы, на сегодняшний день были открыты и биоинженерно сконструированы несколько различных классов нуклеаз. К ним относятся мегануклеазы, нуклеазы типа «цинковые пальцы» (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), и система CRISPR/Cas.

Мегануклеазы - обычно делятся на четыре семейства: семейство LAGLIDADG, семейство GIY-YIG, семейство His-Cys бокс и семейство HNH. Эти семейства характеризуются структурными мотивами, которые влияют на каталитическую активность и последовательность распознавания. Например, члены семейства LAGLIDADG характеризуются наличием одной или двух копий консервативного мотива LAGLIDADG. Четыре семейства мегануклеаз значительно отличаются друг от друга по консервативным структурным элементами и, следовательно, специфичности последовательности узнавания ДНК и каталитической активности. Мегануклеазы обычно встречаются у видов микробов и обладают уникальным свойством наличия очень длинных последовательностей распознавания (> 14 п.н.), что делает их естественно очень специфичными для разрезания в искомом месте. Это можно использовать для создания сайт-специфичных двухцепочечных разрывов при редактировании генома. Специалист в данной области может использовать эти природные мегануклеазы, однако количество таких природных мегануклеаз ограничено. Чтобы преодолеть эту проблему, были использованы способы мутагенеза и высокопроизводительного скрининга для создания вариантов мегануклеаз, распознающих уникальные последовательности. Например, были объединены различные мегануклеазы для создания гибридных ферментов, распознающих новую последовательность. Альтернативно, ДНК-взаимодействующие аминокислоты мегануклеазы могут быть изменены для создания мегануклеаз, специфичных к последовательности (например, патент США 8021867). Мегануклеазы могут быть созданы с использованием способов, описанных, например, в Certo, MT et al. Nature Methods (2012) 9:073-975; Пат. США № 8,304,222; 8,021,867; 8,119,381; 8,124,369; 8,129,134; 8,133,697; 8,143,015; 8,143,016; 8,148,098 или 8,163,514.

ZFN и TALEN – Было доказано, что два различных класса сконструированных нуклеаз, нуклеазы типа «цинковые пальцы» (ZFN) и нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), эффективны в создании целевых двухцепочечных разрывов. По сути, технология эндонуклеаз рестрикции ZFN и TALEN использует неспецифический фермент, расщепляющий ДНК, который связан со специфическим ДНК-связывающим доменом (либо серией доменов с цинковыми пальцами, либо повторов TALE, соответственно). Обычно выбирают рестрикционный фермент, сайт узнавания ДНК и сайт расщепления которого отделены друг от друга. Отщепляющая часть отделяется и затем связывается с ДНК-связывающим доменом, в результате чего получается

эндонуклеаза с очень высокой специфичностью к искомой последовательности. Примером рестрикционного фермента с такими свойствами является FokI. Кроме того, FokI имеет то преимущество, что для димеризации требуется нуклеазная активность, а это означает, что специфичность резко возрастает, поскольку каждый партнер нуклеазы распознает уникальную последовательность ДНК. Чтобы усилить этот эффект, были разработаны нуклеазы FokI, которые могут функционировать только как гетеродимеры и обладают повышенной каталитической активностью. Нуклеазы, функционирующие в качестве гетеродимера, исключают возможность нежелательной гомодимерной активности и, таким образом, повышают специфичность двухцепочечного разрыва.

Таким образом, например, ZFN и TALEN могут быть сконструированы как пары нуклеаз, причем каждый участник пары предназначен для связывания соседних последовательностей в целевом сайте. При транзиторной экспрессии в клетках нуклеазы связываются со своими сайтами-мишенями, и домены FokI гетеродимеризуются с образованием двухцепочечного разрыва. Восстановление этих двухцепочечных разрывов через путь негомологичного соединения концов (NHEJ) чаще всего приводит к вставкам-делециям, которые представляют собой небольшие делеции или небольшие вставки в последовательность. Поскольку каждая репарация, произведенная NHEJ, уникальна, использование одной пары нуклеаз может создать аллельную серию с рядом различных делеций в целевом сайте. Делеции обычно варьируются от нескольких пар оснований до нескольких сотен пар оснований в длину, но более крупные делеции были успешно созданы в культуре клеток с использованием двух пар нуклеаз одновременно (см., например, Carlson et al., 2012, Proc Natl Acad Sci U S A.; 109(43):17382-7; Lee et al., 2010, Trends Biotechnol.; 28(9):445-6). Кроме того, когда фрагмент ДНК, гомологичный целевой области, вводится вместе с парой нуклеаз, двухцепочечный разрыв можно репарировать посредством гомологически направленной репарации для создания специфических модификаций (см., например, Li et al., 2011, Nucleic Acids Res. 39(1):359-72; Miller et al., 2010, Nat Struct Mol Biol.17(9):1144-51; Urnov et al., 2005, Nature 435(7042):646-51).

Хотя нуклеазные части как ZFN, так и TALEN имеют сходные свойства, разница между этими сконструированными нуклеазами заключается в их пептиде, распознающем ДНК. ZFN полагаются на цинковые пальцы Cys2-His2, а TALEN - на TALE. Оба этих ДНК-распознающих пептидных домена обладают тем свойством, что они в природе встречаются в комбинациях в своих белках. Цинковые пальцы Cys2-His2 обычно встречаются в повторах, которые находятся на расстоянии 3 п.н., и обнаруживаются в различных комбинациях во множестве белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами. С другой стороны, TALE обнаруживаются в повторах с соотношением распознавания один к одному между

аминокислотами и распознанными парами нуклеотидов. Поскольку и «цинковые пальцы», и «TALE» находятся в повторяющихся паттернах, можно попробовать различные комбинации для создания самых разнообразных специфичных последовательностей. Подходы для создания сайт-специфичных эндонуклеаз на основе «цинковых пальцев» включают, например, модульную сборку (где «цинковые пальцы», коррелированные с триплетной последовательностью, присоединяются в ряд так, чтобы покрыть требуемую последовательность), OPEN (слабо-строгий отбор пептидных доменов против триплетных нуклеотидов с последующим путем высокочувствительного отбора комбинации пептидов по сравнению с конечной мишенью в бактериальных системах) и бактериального моногибридного скрининга библиотек с цинковыми пальцами, среди прочего.

Система CRISPR-Cas. Многие бактерии и археи содержат эндогенные адаптивные иммунные системы на основе РНК, которые могут разрушать нуклеиновые кислоты вторгающихся фагов и плазмид. Эти системы состоят из кластеров генов коротких палиндромных повторов (CRISPR) с регулярными промежутками, которые продуцируют компоненты РНК, и генов, связанных с CRISPR (Cas), которые кодируют белковые компоненты. РНК CRISPR (crRNA) содержат короткие участки гомологии с конкретными вирусами и плазмидами и действуют как проводники, которые направляют нуклеазы Cas на разложение комплементарных нуклеиновых кислот соответствующего патогена. Исследования системы CRISPR/Cas типа II Streptococcus pyogenes показали, что три компонента образуют комплекс РНК/белок и вместе достаточны для специфичной для последовательности нуклеазной активности: нуклеаза Cas9, crRNA, содержащая 20 пар оснований, гомологичных целевой последовательности и трансактивирующая crRNA (tracrRNA) (Jinek et al. Science (2012) 337: 816–821.). Далее было продемонстрировано, что синтетическая химерная направляющая РНК (gRNA), состоящая из гибрида crRNA и tracrRNA, может направлять Cas9 на расщепление ДНК-мишеней, которые комплементарны crRNA in vitro. Также было продемонстрировано, что временная экспрессия Cas9 в сочетании с синтетическими gRNA может быть использована для создания таргетных двухцепочечных разрывов у множества различных видов (например, Cho et al., 2013, Nat Biotechnol. 31(3):230-2; Cong et al., 2013, Science 339(6121):819-23; DiCarlo et al., 2013, Nucleic Acids Res. 41(7):4336-43; Hwang et al., 2013, Nat Biotechnol. 31(3):227-9; Jinek et al., 2013, Elife. 2013 Jan 29;2:e00471; Mali et al., 2013, Nat Methods. 10(10):957-63).

Известно, что система CRIPSR/Cas для редактирования генома включает два отдельных компонента: направляющую РНК (gRNA) и эндонуклеазу, например, Cas9. gRNA обычно представляет собой 20-нуклеотидную последовательность, кодирующую комбинацию целевой гомологичной последовательности (crRNA) и эндогенной

бактериальной РНК, которая связывает crRNA с нуклеазой Cas9 (tracrRNA) в одном химерном транскрипте. Комплекс gRNA/Cas9 рекрутируется в последовательность-мишень путем спаривания оснований между последовательностью gRNA и комплементарной геномной ДНК. Для успешного связывания Cas9 геномная целевая последовательность должна также содержать правильную последовательность Смежный мотив протоспейсера (PAM) сразу после целевой последовательности. Связывание комплекса gRNA/Cas9 локализует Cas9 в геномной последовательности-мишени, так что Cas9 может разрезать обе цепи ДНК, вызывая двухцепочечный разрыв. Как и в случае с ZFN и TALEN, двухцепочечные разрывы, продуцируемые CRISPR/Cas, могут подвергаться гомологичной рекомбинации или NHEJ. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas включает одиночную направляющую РНК (sgРНК) и белок Cas. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas включает комплекс из одиночной направляющей РНК (sgРНК) и белка Cas. В некоторых воплощениях Cas системы CRISPR/Cas включает единственный полипептид. В некоторых воплощениях Cas системы CRISPR/Cas представляет собой эндонуклеазу. В некоторых воплощениях CRISPR/Cas представляет собой CRISPR/Cas9.

Нуклеаза Cas9 имеет два функциональных домена: RuvC и HNH, каждый из которых разрезает разные цепи ДНК. Когда оба домена активны, Cas9 вызывает двухцепочечные разрывы в геномной ДНК. Существенным преимуществом CRISPR/Cas является то, что высокая эффективность этой системы в сочетании со способностью легко создавать синтетические gRNA позволяет одновременно воздействовать на несколько генов. Очевидная гибкость во взаимодействии спаривания оснований между последовательностью gRNA и целевой последовательностью геномной ДНК позволяет отсечь несовершенные совпадения с целевой последовательностью с помощью Cas9.

Модифицированные версии фермента Cas9, содержащие единственный неактивный каталитический домен, RuvC- или HNH-, называются «никазами». Имея только один активный домен нуклеазы, никаза Cas9 разрезает только одну цепь целевой ДНК, создавая однонитевой разрыв или «разрыв». Одноцепочечный разрыв или разрыв обычно быстро восстанавливается посредством пути HDR с использованием интактной комплементарной цепи ДНК в качестве матрицы. Однако два проксимальных, противоположных разрыва цепи, введенные никазой Cas9, рассматриваются как двухцепочечный разрыв в системе CRISPR, которая часто упоминается как «двойной одноцепочечный разрыв». Двойной одноцепочечный разрыв можно исправить с помощью NHEJ или HDR в зависимости от желаемого воздействия на генную мишень. Таким образом, если специфичность и снижение нецелевых эффектов имеют решающее значение, использование никазы Cas9 для создания двойного одноцепочечного разрыва путем конструирования двух gRNA с целевыми

последовательностями в непосредственной близости и на противоположных цепях геномной ДНК уменьшит нецелевой эффект, поскольку любая из gRNA сам по себе приведет к образованию трещин, которые не изменят геномную ДНК.

Модифицированные версии фермента Cas9, содержащие два неактивных каталитических домена (мертвый Cas9 или dCas9), не обладают нуклеазной активностью, но все же способны связываться с ДНК на основе специфичности gRNA. dCas9 можно использовать в качестве платформы для регуляторов транскрипции ДНК для активации или репрессии экспрессии генов путем слияния неактивного фермента с известными регуляторными доменами. Например, связывание одного dCas9 с целевой последовательностью в геномной ДНК может мешать транскрипции гена. В некоторых воплощениях CRISPR/Cas представляет собой CRISPR/dCas9.

Чтобы использовать систему CRISPR, как gRNA, так и Cas9 должны экспрессироваться в клетке-мишени. Вектор вставки может содержать обе кассеты на одной плазмиде, или кассеты экспрессируются из двух отдельных плазмид. Плазмиды CRISPR общедоступны, такие как плазмида px330 от Addgene. Кроме того, мРНК, кодирующая Cas9 и gRNA, может быть введена в клетки-мишени, а также рекомбинантный белок Cas9 в комплексе с gRNA (т.е. вставка комплекса RNP в клетку).

В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR/Cas класса 1. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas класса 1 включает мультисубъединичный комплекс crRNA-эффектор. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR – Cas типа I. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR/Cas типа III. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR – Cas типа IV.

В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR/Cas класса 2. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas класса 2 включает однокомпонентный эффекторный модуль crRNA. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR – Cas типа II. В некоторых воплощениях система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR/Cas типа V.

В некоторых воплощениях Cas в системе CRISPR/Cas Класса 2 может быть Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 или C2c3. Специалист в данной области поймет классификацию систем CRISPR/Cas, хорошо известную в данной области (например, Nat Rev Microbiol. 2017 March, 15(3): 169–182; Nat Rev Microbiol. 2015 November, 13(11): 722–736), и что эта классификация со временем развивается (Mol Cell. 2015 November 5, 60(3): 385–397). В некоторых воплощениях CRISPR/Cas представляет собой любую эндонуклеазу CRISPR-ассоциированного белка (CAS), известную в данной области.

Редактирование генома с использованием рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) основано на векторах rAAV, которые позволяют вставлять, удалять или заменять последовательности ДНК в геномах живых клеток млекопитающих. Геном rAAV представляет собой молекулу одноцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоты (оцДНК), воспринимаемой как положительно, так и отрицательно, длиной около 4,7 т.о. Эти вирусные векторы с одноцепочечной ДНК имеют высокие скорости трансдукции и обладают уникальным свойством стимулировать эндогенную гомологичную рекомбинацию в отсутствие разрывов двухцепочечной ДНК в геноме. Специалист в данной области может разработать вектор rAAV для нацеливания на желаемый геномный локус и выполнить как грубые, так и/или тонкие изменения эндогенного гена в клетке. Редактирование генома rAAV имеет то преимущество, что оно нацелено на единственный аллель и не приводит к каким-либо нецелевым геномным изменениям.

АГЕНТ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДНК

Описанная в данном документе технология обеспечивает в определенных аспектах и воплощениях агент для редактирования ДНК. Агент для редактирования ДНК может быть сконструирован с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалистам в данной области.

В одном воплощении агент для редактирования ДНК, раскрытый в данном документе, может содержаться в конструкции с одной нуклеиновой кислотой или в комбинации конструкций с нуклеиновой кислотой. В одном воплощении агент для редактирования ДНК включает по меньшей мере два ключевых элемента, описанных ниже:

Первый элемент представляет собой кассету с нуклеотидной последовательностью, которая предназначена для стабильной интеграции в специфическое расположение в геноме птицы. Первый элемент, будучи интегрированным в геном птицы, изменяет генотип птицы, но также, в определенных воплощениях и при определенных условиях, изменяет фенотип птицы. Измененный фенотип птицы по сравнению с фенотипом других птиц является целью технологии, представленной в данном документе. Вкратце и как подробно описано в воплощениях, представленных в данном документе, измененный фенотип полезен для предотвращения развития жизнеспособных цыплят-самцов из мужских эмбрионов. Эта профилактика может избавить фермеров и инкубаторий от значительного экономического бремени, а также избавить от необходимости умерщвлять жизнеспособных цыплят-самцов.

Второй элемент представляет собой первую и вторую целевые последовательности нуклеотидов, фланкирующие первый элемент. Второй элемент отвечает за определение места в геноме птицы, в которое стабильно интегрирован первый элемент. Случайная интеграция чужеродной ДНК в геном любого организма была бы вредоносной, если бы она

мешала генам, отвечающим за основные функции клетки. Альтернативно, случайная интеграция может быть несущественной, если чужеродная ДНК интегрируется с неактивным сегментом ДНК. Второй элемент выполняет важную функцию, направляя интеграцию первого элемента в определенный и заранее определенный участок ДНК птицы. В одном воплощении настоящего изобретения второй элемент направляет включение первого элемента в открыто транскрибируемые области Z-хромосомы птиц без какого-либо отрицательного воздействия на основные функции клеток.

Специалист в данной области поймет, что термин «агент для редактирования ДНК» обычно относится к любой молекуле, такой как нуклеотидная последовательность или фермент, которая способствует изменению генома организма, такого как птица. Изменение может быть добавлением к ДНК, например, за счет интеграции агента в ДНК, замены последовательности ДНК, например путем гомологичной рекомбинации или делеции ДНК.

В одном воплощении агент для редактирования ДНК может быть сконструирован в вирусном векторе (например, с использованием одного вектора или нескольких векторов). Такие векторы обычно используются для переноса генов и в генной терапии. Различные системы вирусных векторов имеют свои уникальные преимущества и недостатки. Вирусные векторы, которые можно использовать для интеграции первой нуклеотидной последовательности определенных воплощений в Z-хромосому птицы, включают, помимо прочего, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, альфавирусные векторы, вирусные векторы на основе простого герпеса, ретровирусные векторы или лентивирусные векторы.

Вирусная конструкция, такая как ретровирусная конструкция, включает по меньшей мере один промотор/энхансер транскрипции или локус-определяющий(ие) элемент(ы), или другие элементы, которые контролируют экспрессию гена с помощью таких средств, как альтернативный сплайсинг, экспорт ядерной РНК или посттрансляционная модификация мессенджера. Такие векторные конструкции также включают сигнал упаковки, длинные концевые повторы (LTR) или их части, а также сайты связывания праймеров с положительной и отрицательной цепью, подходящие для используемого вируса, если он уже не присутствует в вирусной конструкции. Кроме того, такая конструкция обычно включает сигнальную последовательность для секреции пептида из клетки-хозяина, в которую он помещен. В некоторых воплощениях сигнальная последовательность может быть сигнальной последовательностью млекопитающего. Необязательно, конструкция может также включать сигнал, который управляет полиаденилированием, а также один или несколько сайтов рестрикции и последовательность терминации трансляции. В качестве примера такие конструкции обычно включают 5'-LTR, сайт связывания тРНК, сигнал

упаковки, источник синтеза второй цепи ДНК и 3'-LTR или его часть. Можно использовать другие векторы, которые не являются вирусными, такие как катионные липиды, полилизин или дендримеры.

В одном воплощении в данном документе предлагается агент для редактирования ДНК, содержащий полинуклеотидную кассету, имеющую состав 5'-LHA (левое плечо для гомологичного спаривания)-OIE (оптогенетически индуцируемый элемент)-LIE (элемент, индуцирующий летальность)-RHA (правое плечо для гомологичного спаривания)-3' или формулой 5'-LHA-LIE-OIE-RHA-3', где (i) LHA включает первую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы; (ii) OIE включает первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; (iii) LIE включает третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, который функционально связан с активностью активируемого индуктором фермента сайт-специфичной рекомбиназы; и (iv) RHA включает четвертую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы.

Как будет очевидно специалистам в данной области, формула 5'-LHA-OIE-LIE-RHA-3 'или формула 5'-LHA-LIE-OIE-RHA-3' относятся к соответствующему положению любого элемент (например, LHA или OIE, или LIE или RHA) по отношению ко всем другим элементам в той же молекуле агента для редактирования ДНК. Терминология 5' и 3' хорошо принята и хорошо известна обычному специалисту в данной области.

В некоторых воплощениях полинуклеотидная кассета включает состав 5'-LHA-OIE-LIE-RHA-3 '. В некоторых воплощениях OIE находится выше по последовательности по отношению к LIE. В некоторых воплощениях первый промотор в OIE функционально связан со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей фермент индуктор-активируемой сайт-специфической рекомбиназы, и не связан далее функционально с третьей нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, способствующий летальности.

В некоторых воплощениях полинуклеотидная кассета включает состав 5'-LHA-LIE-OIE-RHA-3'. В некоторых воплощениях LIE находится выше OIE. В некоторых воплощениях первый промотор в OIE функционально связан со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей фермент индуктор-активируемой сайт-специфической рекомбиназы, и не связан далее функционально с третьей нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, способствующий летальности.

В некоторых воплощениях агент для редактирования ДНК включает состав 5'-LHA-

OIE-LIE-RHA-3', где (i) LHA включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, (ii) OIE включает набор последовательностей в SEQ ID NO: 101-103 или последовательностях, указанных в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 108, (iii) LIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92 или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, или последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96, или последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, (iv) RHA включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106 или (v) любую комбинацию (i), (ii), (iii) и (iv).

В некоторых воплощениях OIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 102. В некоторых воплощениях OIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101.

В некоторых воплощениях OIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 108. В некоторых воплощениях OIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 107.

В некоторых воплощениях (i) LHA включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, (ii) OIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:

107, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 108, который связан с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая является связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 107, который связан с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, (iii) LIE включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94 или последовательность, изложенная в SEQ ID NO: 96, или последовательность, указанная в SEQ ID NO: 98, соединенная с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 104, и (iv) RHA comp увеличивает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106.

В некоторых воплощениях агент для редактирования ДНК включает последовательность одной из SEQ ID NO: 120-127.

Агент для редактирования ДНК может кодировать репортерный белок, который легко обнаруживается либо по его присутствию, либо по активности, включая, помимо прочего, люциферазу, флуоресцентный белок (например, зеленый флуоресцентный белок), хлорамфениколацетилтрансферазу, бета-галактозидазу, секретируемую плацентарную щелочь фосфатаза, бета-лактамаза, гормон роста человека и другие секретируемые ферменты-репортеры. Обычно репортерный ген кодирует полипептид, который иначе не продуцируется клеткой-хозяином, который может быть обнаружен путем анализа клетки (клеток), например, прямым флуорометрическим, радиоизотопным или спектрофотометрическим анализом клетки (клеток) и обычно не требует уничтожения клетки для анализа сигнала. В некоторых воплощениях репортерный ген кодирует фермент, который вызывает изменение флуорометрических свойств клетки-хозяина, которое обнаруживается с помощью качественной, количественной или полуколичественной функции или активации транскрипции. Примеры ферментов включают эстеразы, β-лактамазы, фосфатазы, пероксидазы, протеазы (активатор тканевого плазминогена или урокиназа) и другие ферменты, функция которых может быть обнаружена соответствующими хромогенными или флуорогенными субстратами, известными специалистам в данной области или разработанными в будущем. Репортерный ген может сообщать об успешной интеграции конструкции в Z-хромосому.

В некоторых воплощениях агент для редактирования ДНК может содержать

нуклеотидную последовательность, кодирующую репортерный полипептид. В некоторых воплощениях репортерный полипептид может представлять собой белок зеленой флуоресценции (GFP) (SEQ ID NO: 115) или mCherry/RFP (SEQ ID NO: 119).

В некоторых воплощениях агент для редактирования ДНК дополнительно включает маркеры положительной и/или отрицательной селекции для эффективного отбора трансформированных клеток, которые претерпели событие гомологичной рекомбинации с конструкцией. Положительный отбор предоставляет средства для обогащения популяции клонов, которые приняли чужеродную ДНК. Неограничивающие примеры таких положительных маркеров включают глутамин синтетазу, дигидрофолатредуктазу (DHFR), маркеры, которые придают устойчивость к антибиотикам, такие как кассеты устойчивости к неомицину, гигромицину, пуромицину и бластицидину S. Маркеры отрицательного отбора необходимы для отбора против случайных интеграций и/или исключения последовательности маркеров (например, положительного маркера). Неограничивающие примеры таких негативных маркеров включают тимидинкиназу простого герпеса (HSV-TK), которая превращает ганцикловир (GCV) в цитотоксический нуклеозидный аналог, гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), дифтерийный токсин (DT) и аденинфосфорибозу (ARPтрансферазу).

В некоторых воплощениях кодоны, кодирующие белки агента для редактирования ДНК, представляют собой «оптимизированные» кодоны, т.е. кодоны - это те, которые часто появляются, например, в высокоэкспрессируемых генах у видов птиц, вместо тех кодонов, которые часто используются, например, вирус гриппа. Такое использование кодонов обеспечивает эффективную экспрессию белка в птичьих клетках. Паттерны частот использования кодонов в высокоэкспрессируемых генах многих видов известны в литературе (например, Nakamura et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24 (1): 214-5; McEwan et al., 1998, Biotechniques. 24 (1): 131-6, 138).

В некоторых воплощениях агент для редактирования ДНК может дополнительно включать в себя саморасщепляющиеся пептиды, такие как 2A, включая, без ограничения указанным, P2A, T2A, E2A (Wang et al., Scientific Report 5, Article 16273 (2015)) или последовательности участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

ЛЕВОЕ И ПРАВОЕ ПЛЕЧИ ДЛЯ ГОМОЛОГИЧНОГО СПАРИВАНИЯ

Принято считать, что размер плеч для гомологичного спаривания для HR должен быть пропорционален размеру вставки между плечами. Специалист в данной области легко определит и сконструирует плечо для гомологичного спаривания подходящей длины. В одном воплощении плечо для гомологичного спаривания может иметь длину всего 50 оснований. В некоторых воплощениях (i) длина левого плеча для гомологичного спаривания

(LHA) составляет от около 0,5 до около 5 тысяч оснований (т.о.); (ii) длина правого плеча для гомологичного спаривания (RHA) составляет от около 0,5 до около 5 т.о. или (iii) любое сочетание (i) и (ii). В некоторых воплощениях (i) длина LHA составляет около 1,5 т.о.; (ii) длина RHA составляет около 1,5 т.о. или (iii) любое сочетание (i) и (ii). В некоторых воплощениях LHR и/или RHA могут иметь длину всего 50 оснований.

В некоторых воплощениях длина LHA составляет от около 0,5 до около 5 тысяч оснований (т.о.). В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 0,5 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 1 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 1,5 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 2 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 2,5 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 3 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 3,5 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 4 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 4,5 т.о. В некоторых воплощениях длина LHA составляет около 5 т.о. В некоторых воплощениях LHR может составлять всего 50 оснований.

В некоторых воплощениях длина RHA составляет от около 0,5 до около 5 тысяч оснований (т.о.). В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 0,5 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 1 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 1,5 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 2 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 2,5 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 3 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 3,5 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 4 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 4,5 т.о. В некоторых воплощениях длина RHA составляет около 5 т.о. В некоторых воплощениях RHA может составлять всего 50 оснований.

В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 0,5 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 1 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 1,5 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 2 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 2,5 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 3 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 3,5 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 4 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 4,5 т.о. В некоторых воплощениях длина каждого из LHA и RHA составляет около 5 т.о. В некоторых

воплощениях LHR и RHA могут иметь длину всего 50 оснований.

В некоторых воплощениях длина каждого из левого и правого плеч для гомологичного спаривания достаточна для обеспечения специфической рекомбинации с хромосомной ДНК птицы. В одном воплощении LHA и/или RHA имеют длину по меньшей мере 500 нуклеотидов, например, от 500 до 3000 нуклеотидов. Обычно требуемый размер плеч для гомологичного спаривания LHA и/или RHA зависит от длины кассет, которые примыкают к этим плечам. Кассеты меньшего размера требуют более коротких плеч и наоборот. В одном воплощении плечо для гомологичного спаривания может быть таким коротким, что иметь длину всего 50 оснований.

В некоторых воплощениях (i) LHA по существу гомологична соответствующей первой нуклеотидной последовательности, расположенной в открытой транскрибируемой области хромосомы Z птицы; (ii) RHA по существу гомологична соответствующей второй нуклеотидной последовательности, расположенной в открыто транскрибируемой области на Z-хромосоме птицы; или (iii) одновременно (i) и (ii).

Как должно быть очевидно для специалистов в данной области, первая последовательность «по существу гомологична» второй последовательности, если первая последовательность и вторая последовательность сходны или идентичны по последовательности, при условии, что первая последовательность и вторая последовательность могут заменять друг друга посредством гомологичной рекомбинации. Способы тестирования и идентификации гомологичной рекомбинации хорошо известны в данной области.

В некоторых воплощениях существенная гомологичность (гомологичность по существу) означает по меньшей мере 50%-ную идентичность. В некоторых воплощениях существенная гомологичность означает по меньшей мере 60%-ную идентичность. В некоторых воплощениях существенная гомологичность означает по меньшей мере 70%-ную идентичность. В некоторых воплощениях изобретения существенная гомологичность означает по меньшей мере 80%-ную идентичность. В некоторых воплощениях изобретения существенная гомологичность означает по меньшей мере 90%-ную идентичность. В некоторых воплощениях изобретения существенная гомологичность означает по меньшей мере 95%-ную идентичность. В некоторых воплощениях изобретения существенная гомологичность означает по меньшей мере 99%-ную идентичность.

В некоторых воплощениях первая нуклеотидная последовательность в LHA на 50-100% идентична по последовательности первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых вариантах первая нуклеотидная последовательность в LHA идентична по последовательности на 80-100% первой

соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях первая нуклеотидная последовательность в LHA на 85-100% идентична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях первая нуклеотидная последовательность в LHA на 90-100% идентична по последовательности первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях первая нуклеотидная последовательность в LHA на 95-100% идентична по последовательности первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях первая нуклеотидная последовательность в LHA на 99-100% идентична по последовательности первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В определенных воплощениях следует отметить, что первая нуклеотидная последовательность в LHA на 100% идентична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме.

В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA на 50-100% идентична по последовательности второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA идентична по последовательности на 80-100% второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA на 85-100% идентична второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA на 90-100% идентична по последовательности второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA на 95-100% идентична по последовательности второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA на 99-100% идентична по последовательности второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме. В некоторых воплощениях четвертая нуклеотидная последовательность в RHA на 100% идентична по последовательности второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме.

В некоторых воплощениях LHA и/или RHA гомологичны или демонстрируют гомологию или примерно 70%-ную, 71%-ную, 72%-ную, 73%-ную, 74%-ную, 75%-ную, 76%-ную, 77%-ную, 78%-ную, 79%-ную, 80%-ную, 81%-ную, 82%-ную, 83%-ную, 84%-ную, 85%-ную, 86%-ную, 87%-ную, 88%-ную, 89%-ную, 90%-ную, 91%-ную, 92%-ную, 93%-ную, 94%-ную, 95%-ную, 96%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную или 100%-ную идентичность

по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности в целевых локусах в Z-хромосоме птицы, которая служит сайтом интеграции.

Специалисту в данной области техники понятно, что термин «открыто транскрибируемая область в хромосоме» обычно относится к областям хромосомы, которые включают гены, которые транскрибируются на уровне, достаточном для того, чтобы позволить легко транскрибировать и другие гены. Неограничивающими примерами открыто транскрибируемых областей являются области в непосредственной близости от генов домашнего хозяйства, которые хорошо транскрибируются в течение жизни клетки или организма. Другими неограничивающими примерами открыто транскрибируемых областей являются области между локусами (например, регуляторные элементы хроматина, некодирующая ДНК, «мусорная ДНК» и т. Д.). Неограничивающими примерами плохо транскрибируемых областей являются области на концах каждой хромосомы, называемые теломерами, которые не транскрибируются в течение жизни клетки или организма. В некоторых воплощениях открыто транскрибируемая область расположена рядом с геном Hint1Z на Z-хромосоме птицы или ниже него.

В одном воплощении LHA и/или RHA соответствуют геномной последовательности, которая присутствует на Z-хромосоме у птиц. В некоторых воплощениях геномная последовательность расположена рядом с геном, который является транскрипционно активным, или после него (например, рядом с геном Hint1Z или ниже его (GeneID: 395424)). Другой предполагаемой мишенью является Isl1 (Gene ID 369383), также находящийся на Z-хромосоме, который экспрессируется, начиная с ранних стадий эмбриогенеза. Фиг. 3 иллюстрирует воплощение, при котором плечи для гомологичного спаривания находятся на Z-хромосоме ниже гена Hint1Z.

Последовательности нацеливания LHA и/или RHA могут быть выбраны таким образом, чтобы последовательность нацеливания LHA и/или RHA специфически интегрировалась в Z-хромосому, а не в любую другую хромосому клетки, например, путем спонтанной гомологичной рекомбинации или путем гомологически направленной репарации (HDR). Гомологичная рекомбинация может происходить спонтанно. Кроме того, последовательность нацеливания LHA и/или RHA может быть выбрана в зависимости от того, какой способ используется для интеграции первой последовательности нацеливания в хромосому. Способы интеграции нуклеотидных последовательностей в хромосомы хорошо известны в данной области, включая нацеленную гомологичную рекомбинацию, сайт-специфические рекомбиназы и редактирование генома с помощью сконструированных нуклеаз (см., например, Menke D. Genesis (2013) 51: - 618; Capecchi, Science (1989) 244:1288-1292; Santiago et al., Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105:5809-5814; международные

патентные заявки № WO 2014085593, WO 2009071334 и WO 2011146121; патенты США № 8771945, 8586526, 6774279 и публикации патентных заявок США №№ 20030232410, 20050026157, 20060014264). Также можно использовать PB-транспозазы. Агенты для внесения изменений нуклеиновой кислоты в интересующий ген могут быть разработаны с помощью общедоступных ресурсов.

В некоторых воплощениях первый 5'-нуклеотид LHA соответствует положению 44914961 в Z-хромосоме. В некоторых воплощениях первая соответствующая нуклеотидная последовательность LHA расположена в Z-хромосоме, с положения 44914961 до положения 44916456.

В некоторых воплощениях первый 5'-нуклеотид LHA соответствует Z- хромосоме Gallus gallus, сборка GRCg6a, NC_006127.5, положение 44914961. В некоторых воплощениях первая соответствующая нуклеотидная последовательность LHA расположена в Z-хромосоме Gallus gallus, сборка GRCg6a, NC_006127.5, от положения 44914961 до положения 44916456.

В некоторых воплощениях первый 5'-нуклеотид RHA соответствует положению 44916480 в Z-хромосоме. В некоторых воплощениях вторая соответствующая нуклеотидная последовательность RHA расположена в Z-хромосоме, с положения 44916480 до положения 44918043.

В некоторых воплощениях первый 5'-нуклеотид RHA соответствует Z-хромосоме Gallus gallus, сборка GRCg6a, NC_006127.5, положение 44916480. В некоторых воплощениях вторая соответствующая нуклеотидная последовательность RHA расположена в хромосоме Z Gallus gallus, сборка GRCg6a, NC_006127.5, от положения 44916480 до положения 44918043.

В некоторых воплощениях (i) LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, или ее фрагмент, например, из по меньшей мере 50 или по меньшей мере 500 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105; (ii) RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, или ее фрагмент, например по меньшей мере 50 или по меньшей мере 500 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106; или (iii) одновременно (i) и (ii). В некоторых воплощениях (i) LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, или фрагмент из по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105; (ii) RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, или фрагмент из по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID

NO: 106; или (iii) одновременно (i) и (ii).

В некоторых воплощениях LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105. В некоторых воплощениях LHA включает по меньшей мере 50 или по меньшей мере 500 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105. В некоторых воплощениях LHA включает по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105. В некоторых воплощениях LHA включает 500 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105. В некоторых воплощениях LHA включает 1000 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105.

В некоторых воплощениях RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106. В некоторых воплощениях RHA включает по меньшей мере 50 или по меньшей мере 500 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106. В некоторых воплощениях RHA включает по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106. В некоторых воплощениях RHA включает 500 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106. В некоторых воплощениях RHA включает 1000 последовательных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106.

В некоторых воплощениях LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, или фрагмент по меньшей мере из 50 или по меньшей мере 500 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105; и RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, или фрагмент по меньшей мере из 50 или по меньшей мере 500 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106. В некоторых воплощениях LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, или фрагмент по меньшей мере из 1000 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 105; и RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, или фрагмент из по меньшей мере 1000 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106. В некоторых воплощениях LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105; и RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106.

ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИ ИНДУКЦИИРУЕМЫЙ ЭЛЕМЕНТ

Промотеры

Как будет очевидно специалистам в данной области, «промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью», в том числе, означает, что промотор участвует в транскрипции нуклеотидной последовательности, будучи в положении цис. Неограничивающим примером промотора, функционально связанного с нуклеотидной последовательностью, является первый промотор в OIE, который управляет транскрипцией нуклеотидной последовательности в OIE, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы.

В некоторых воплощениях первый промотор является конститутивным промотором у птиц. Как будет очевидно специалистам в данной области, «конститутивный промотор», в том числе, представляет собой промотор, который обеспечивает непрерывную транскрипцию связанной с ним нуклеотидной последовательности или гена.

В некоторых воплощениях первый промотор представляет собой промотор, индуцибельный у птиц. Как будет очевидно специалистам в данной области, «индуцибельный промотор» включает промотор, который предоставляет возможность временной транскрипции связанной с ним нуклеотидной последовательности или гена. В некоторых воплощениях временная транскрипция модулируется индуктором. В некоторых воплощениях индуктор является экзогенным по отношению к клетке птицы.

В некоторых воплощениях первый промотор может представлять собой pCAGG (SEQ ID NO: 100), pGK (SEQ ID NO: 109), pCMV (SEQ ID NO: 110), phSyn (SEQ ID NO: 111) или pEF1-a (SEQ ID NO: 112).

Активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа

В некоторых воплощениях активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы может представлять собой Cre-рекомбиназу (Cre) (SEQ ID NO: 113) или Mag (SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 65).

Согласно некоторым воплощениям, индуктор инициирует или увеличивает транскрипцию нуклеотидной последовательности, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы. В других воплощениях индуктор инициирует или увеличивает трансляцию мРНК, кодирующей сайт-специфическую рекомбиназу, активируемую индуктором. В других воплощениях индуктор инициирует или увеличивает активность фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы. Согласно некоторым воплощениям, индуктор инициирует или увеличивает образование функционального активируемого индуктором фермента сайт-специфической рекомбиназы путем образования комплекса нефункциональных фрагментов сайт-специфической

рекомбиназы друг с другом. Как будет очевидно для специалистов в данной области, множество нефункциональных фрагментов (пептидов) фермента, когда фермент встречается в природе в виде полипептида, могут совместно взаимодействовать с образованием функционального фермента, несмотря на то, что каждый фрагмент (пептид) не связан ковалентно с другими фрагментами (пептидами), как показано на фиг. 2. В некоторых воплощениях активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа, включает нефункциональные пептидные фрагменты активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы, которые объединяются в присутствии индуктора с образованием активного фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы.

Используемый в данном документе термин «индуцируемый» («индуцибельный») может охватывать все аспекты переключения, независимо от задействованного молекулярного механизма. Соответственно, переключатель может включать, без ограничения указанным, индуцируемые системы на основе антибиотиков, индуцируемые системы на основе электромагнитной энергии, индуцируемые системы на основе малых молекул, индуцируемые системы на основе ядерных рецепторов и индуцируемые системы на основе гормонов. В некоторых воплощениях переключатель представляет собой систему, индуцируемую светом, систему, индуцируемую тетрациклином (Tet)/DOX, систему, индуцируемую абсцизовой кислотой (ABA), систему репрессора/оператора на основе кумата, систему, индуцируемую 40HT/эстрогеном, систему на основе экдизона, индуцируемую систему FKBP12/FRAP (комплекс FKBP12-рапамицин). В некоторых примерах, в которых индуктор вводят в невылупившееся яйцо, индуктор может проникать через скорлупу яйца. В некоторых примерах индуктор не токсичен для женского эмбриона внутри яйца и не влияет на развитие женского эмбриона внутри яйца.

Используемый в данном документе термин «переключатель» относится к отдельному компоненту или набору компонентов, которые действуют скоординированным образом, чтобы повлиять на изменение, охватывая все аспекты биологической функции, такие как активация, репрессия, усиление или прекращение этой функции. В одном воплощении переключатели относятся к индуцибельным и/или репрессируемым системам, используемым в регуляции генов. В общем, индуцибельная система может быть отключена, если не присутствует какая-либо молекула или энергетическая форма (называемая индуктором), которая делает возможной экспрессию гена. Говорят, что молекула «вызывает экспрессию». То, как это происходит, зависит от механизмов контроля, а также от различий в типах клеток. Подавляемая система находится в состоянии отключения в случае присутствия какой-либо молекулы или формы энергии (называемых супрессорами), которая подавляет экспрессию гена. То, как это происходит, зависит от механизмов контроля, а также от

различий в типах клеток.

Примерные оптогенетические переключатели показаны на фиг. 4A-4C, каждый из которых использует светочувствительные димеризующиеся белковые домены криптохрома 2 (CRY2) и CIB1 из Arabidopsis thaliana и сайт-специфическую рекомбиназу в качестве эффекторной молекулы. CRY2 объединен в рамке считывания с одной половиной рекомбиназы Cre, тогда как CIB1 объединен в рамке считывания с другой половиной рекомбиназы Cre, то есть фермента расщепленной рекомбиназы. Таким образом, когда используется индуктор (синий свет), CRY2 и CIB1 гетеродимеризуются с образованием функциональной рекомбиназы Cre, которая способна осуществлять сайт-специфическую рекомбинацию.

В некоторых воплощениях экспрессия фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы индуцируется индуктором. В определенных воплощениях индуктор представляет собой электромагнитную энергию. В некоторых воплощениях электромагнитная энергия представляет собой видимый свет с длиной волны 380-740 нм или компонент видимого света. В некоторых воплощениях компонент видимого света представляет собой синий свет с длиной волны 450–485 нм.

В одном воплощении активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа, индуцируется с использованием электромагнитной энергии. Компонент видимого света может иметь длину волны в диапазоне 450-700 нм или 450-500 нм, то есть быть синим светом. Синий свет может иметь интенсивность не менее 0,2 мВт/см2 или не менее 4 мВт/см2. Компонент видимого света может иметь длину волны в диапазоне 620-700 нм, то есть быть красным светом. Предполагается одно или несколько применений видимого света в любом порядке и в любой комбинации. Видимый свет может подаваться в виде одного или нескольких непрерывных воздействий или в виде импульсов (пульсирующая доставка).

Примеры таких оптогенетических переключателей описаны в Muller et al., Biol Chem. 2015 Feb, 396(2):145-52. doi: 10.1515/hsz-2014-0199; Motta Mena et al., Nat Chem Biol. 2014 Mar, 10(3): 196–202; и WO 2014/018423.

Рекомбиназа Cre, полученная из бактериофага P1, и рекомбиназа Flp, полученная из дрожжевого Saccharomyces cerevisiae, представляют собой сайт-специфичные ДНК-рекомбиназы, каждая из которых распознает уникальную последовательность ДНК из 34 пар оснований (называемые «Lox» и «FRT», соответственно). Последовательности, фланкированные либо сайтами Lox, либо сайтами FRT, могут быть легко удалены посредством сайт-специфической рекомбинации при экспрессии рекомбиназы Cre или Flp, соответственно.

В некоторых воплощениях сайты узнавания рекомбиназы могут представлять собой

Lox511, Lox5171, Lox2272, m2, Lox71, Lox66, FRT, F1, F2, F3, F4, F5, FRT (LE), FRT (RE), attB, attP, attL или attR.

Например, последовательность Lox состоит из асимметричной спейсерной области из восьми пар оснований, фланкированной инвертированными повторами из 13 пар оснований. Cre рекомбинирует последовательность ДНК Lox из 34 пар оснований путем связывания с инвертированными повторами из 13 пар оснований и катализирует расщепление цепи и повторное лигирование внутри спейсерной области. Ступенчатые разрезы ДНК, сделанные Cre в спейсерной области, разделены 6 парами оснований, чтобы получить перекрывающуюся область, которая действует как датчик гомологии, чтобы гарантировать, что рекомбинируют только сайты рекомбинации, имеющие одинаковые перекрываемые области.

В некоторых воплощениях система сайт-специфической рекомбиназы используется после гомологичной рекомбинации для удаления из хромосомы птицы ДНК, например, кассеты отбора. Следует отметить, что рекомбиназы Cre и Flp оставляют Lox или FRT «шрам» из 34 пар оснований. Сайты Lox или FRT, которые остаются, обычно остаются в интроне или 3'-UTR модифицированного локуса, и эти сайты обычно не оказывают существенного влияния на функцию гена. Эта система также позволяет генерировать условно измененные аллели, которые могут быть инактивированы или активированы временным или тканеспецифическим образом.

Таким образом, рекомбинация Cre/Lox и Flp/FRT может включать введение вектора нацеливания с плечами для гомологичного спаривания со стороны 3' и 5', содержащими представляющую интерес мутацию, две последовательности Lox или FRT и, как правило, селективную кассету, помещенную между двумя последовательностями Lox или FRT. Применяется положительный отбор и идентифицируются гомологичные рекомбинанты, содержащие целевые мутации. Временная экспрессия Cre или Flp в сочетании с отрицательной селекцией приводит к удалению селективной кассеты и селекции клеток, в которых кассета была потеряна. Получившийся в результате аллель-мишень включает рубец из экзогенных последовательностей Lox или FRT.

В некоторых воплощениях индуктор представляет собой тепло, ультразвук, электромагнитную энергию или химическое вещество. В некоторых воплощениях индуктор доставляется в яйцо в процессе продуцирования яйца внутри птицы перед яйцекладкой.

В то время как нежелательные мужские эмбрионы могут свободно подвергаться воздействию дневного света (или, например, синего света), трансгенные клетки и организмы могут нуждаться в содержании в особых условиях, чтобы предотвратить нежелательную активацию оптогенетической системы, представленной в данном документе. Также

известно, что самки птиц имеют более высокую продуктивность при выращивании в условиях зеленого/красного света.

В некоторых воплощениях способы, представленные в данном документе, выполняются с использованием зеленого света. В некоторых воплощениях клетки и организмы, представленные в данном документе, находятся под зеленым светом. В некоторых воплощениях зеленый свет имеет длину волны 500–565 нм.

В некоторых воплощениях способы, представленные в данном документе, выполняются при использовании красного света. В некоторых воплощениях клетки и организмы, представленные в данном документе, находятся под красным светом. В некоторых воплощениях красный свет имеет длину волны 625-740 нм.

Предполагается несколько способов поставки энергии для активации, например, обеспечение энергии электрического поля и/или ультразвука, которые имеют аналогичный эффект. При необходимости пары белков переключателя могут быть изменены и/или модифицированы для достижения максимального эффекта при использовании другого источника энергии.

Энергию электрического поля можно доставлять, по существу, как описано в данной области, используя один или несколько электрических импульсов от около 1 В/см до около 10 кВ/см в условиях in vivo. Вместо импульсов или в дополнение к ним электрическое поле может доставляться непрерывно. Электрический импульс может применяться в течение от 1 до 500 миллисекунд или от 1 до 100 миллисекунд. Электрическое поле можно прикладывать непрерывно или импульсным образом в течение 5 минут. Используемый в данном документе термин «энергия электрического поля» - это электрическая энергия, воздействию которой подвергается клетка. В некоторых воплощениях электрическое поле имеет напряженность от около 1 В/см до около 10 кВ/см или более в условиях in vivo (см., например, WO 97/49450).

Используемый в данном документе термин «электрическое поле» включает один или несколько импульсов с переменной емкостью и напряжением и включает экспоненциальную и/или прямоугольную волну, и/или модулированную волну, и/или модулированную прямоугольную волну. Ссылки на электрические поля и электричество должны включать ссылку на наличие разности электрических потенциалов в окружающей среде элемента. Такая среда может быть создана посредством статического электричества, переменного тока (AC), постоянного тока (DC) и т.д., как известно в данной области техники. Электрическое поле может быть однородным, неоднородным или другим и может изменяться по силе и/или направлению в зависимости от времени.

Также возможно одно или несколько воздействий электрического поля, а также одно

или несколько воздействий ультразвука в любом порядке и в любой комбинации. Ультразвук и/или электрическое поле могут подаваться в виде одного или нескольких непрерывных воздействий или в виде импульсов (пульсирующая доставка).

ЭЛЕМЕНТ, ИНДУЦИРУЮЩИЙ ЛЕТАЛЬНОСТЬ

Как будет очевидно специалистам в данной области, «первый белок, функционально связанный с активностью второго белка» означает, что второй белок контролирует работу первого белка in trans. Неограничивающим примером первого белка, функционально связанного с активностью второго белка, является белок, способствующий летальности, кодируемый в LIE, который становится активным благодаря активности активируемого индуктором сайт-специфического фермента рекомбиназы, кодируемого в OIE. Термины «in cis» и «in trans» являются общепринятыми и понятными специалисту в данной области техники.

Поскольку активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы активирует белок, способствующий летальности, in trans, соответствующее положение OIE и LIE в одной и той же молекуле или в разных молекулах может быть различным в разных воплощениях. В некоторых воплощениях OIE и LIE находятся в одной и той же молекуле. В некоторых воплощениях OIE и LIE находятся в разных молекулах.

В некоторых воплощениях активирующий фермент (например, фермент рекомбиназа, такой как Cre) отделяют от кассеты гена летальности. В этом случае активирующий фермент вставляется в геном либо самца, либо самки птицы, а неактивная кассета летальности вставляется в Z-хромосому соответствующего пола птицы. В этом случае активация летальности у мужских эмбрионов осуществляется просто путем скрещивания двух трансгенных родителей. Фиг. 19A-19B представляют собой варианты векторов направленного воздействия, в которых активирующий фермент (например, Cre) отделен от кассеты летального гена.

В некоторых воплощениях LIE дополнительно включает второй промотор, функционально связанный с третьей нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок, способствующий летальности. В некоторых воплощениях второй промотор является конститутивным промотором у птиц. В некоторых воплощениях второй промотор представляет собой индуцибельный промотор у птиц. В некоторых воплощениях второй промотор может представлять собой pCAGG (SEQ ID NO: 100), pGK (SEQ ID NO: 109), pCMV (SEQ ID NO: 110), phSyn (SEQ ID NO: 111) или pEF1-a (SEQ ID NO: 112).

Белок, способствующий летальности

Используемый в данном документе термин «белок, способствующий летальности» относится к белку, который является летальным для птичьего эмбриона (например,

мужского эмбриона), таким образом предотвращая вылупление живого самца птицы из яйца.

В некоторых воплощениях индуцирующий летальность белок, который может мешать основным стадиям раннего эмбриогенеза, такой как N-кадгерин, и белки, которые мешают основным сигнальным путям, например, опосредованным костными морфогенетическими белками (BMP) или факторами роста фибробластов (FGF).

В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, может быть токсином, проапоптотическим белком, ингибитором сигнального пути Wingless/Integrated (Wnt), антагонистом костного морфогенетического белка (BMP), антагонистом фактора роста фибробластов (FGF), или его фрагмент, вызывающий летальный исход. В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, представляет собой токсин или его фрагмент, индуцирующий летальность. В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, представляет собой проапоптотический белок или его фрагмент, индуцирующий летальность. В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, является ингибитором сигнального пути Wnt или его фрагментом, вызывающим летальность. В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, представляет собой антагонист BMP или его фрагмент, индуцирующий летальность. В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, представляет собой антагонист FGF или его фрагмент, индуцирующий летальность. Как будет очевидно специалистам в данной области, «индуцирующий летальность фрагмент» молекулы представляет собой любой фрагмент молекулы, который достаточен для индукции летальности.

В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, может представлять собой дифтерийный токсин A (DTA) (SEQ ID NO: 93), каспазу 3 дикого типа (SEQ ID NO: 95), конститутивно активную каспазу 3 (SEQ ID NO: 97), или Noggin (SEQ ID NO: 99). В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, может представлять собой экзотоксин Pseudomonas (номер доступа в GenBank). ABU63124), дифтерийный токсин (номер доступа в GenBank). AAV70486) или рициновый токсин (номер доступа в GenBank). EEF27734). В некоторых воплощениях белок, индуцирующий летальность, может представлять собой интерлейкин 2 (номер доступа в GenBank). CAA00227), CD3 (учетный номер GenBank P07766), CD16 (учетный номер GenBank NP_000560.5), интерлейкин 4 (учетный номер GenBank NP_000580.1) или интерлейкин 10 (учетный номер GenBank). P22301).

В некоторых воплощениях летальность опосредована ферментом РНК-управляемой ДНК-эндонуклеазы. В некоторых воплощениях агент для редактирования ДНК дополнительно включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует направляющую РНК, нацеленную на важный ген птицы, причем эта нуклеотидная

последовательность функционально связана с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы. В некоторых воплощениях изобретения существенным геном может быть рецептор костного морфогенетического белка типа IA (BMPR1A, Gene ID: 396308), костный морфогенетический белок 2 (BMP2, Gene ID: 378779), костный морфогенетический белок 4 (BMP4, Gene ID: 396165) или рецептор 1 фактора роста фибробластов (FGFR1, Gene ID: 396516).

Как будет очевидно специалистам в данной области, «фермент РНК-управляемой ДНК-эндонуклеазы» включает фермент ДНК-эндонуклеазы, который раскручивает ДНК и ищет сайты, комплементарные направляющей молекуле РНК. В некоторых воплощениях молекула направляющей РНК включает нуклеотидную последовательность, указанную в одной из SEQ ID NO: 66-77.

ЭЛЕМЕНТ БЕЗОПАСНОЙ БЛОКИРОВКИ

В одном воплощении агент для редактирования ДНК, раскрытый в данном документе, может дополнительно содержать элемент «безопасной блокировки», который гарантирует, что механизм оптогенной летальности неактивен до тех пор, пока элемент безопасной блокировки не будет удален. Этот элемент по умолчанию делает неактивной оптогенно-летальную систему. Система оптогенной летальности станет активной только тогда, когда измененные геномом клетки подвергаются воздействию агента, который может удалить элемент безопасной блокировки из агента для редактирования ДНК. Этот механизм «безопасной блокировки» гарантирует, что, на протяжении всего процесса продуцирования, клетки, подвергшиеся HR, не нуждаются в защите от света, поскольку оптогенная система по существу неактивна.

В одном воплощении элемент безопасной блокировки вставлен ниже промотора в OIE, но выше последовательности, кодирующей индуктор-активируемую сайт-специфическую рекомбиназу. Элемент безопасной блокировки включает нуклеотидные последовательности (элемент STOP), которые предотвращают транскрипцию активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы, кодируемой OIE (см. фиг. 26A — неактивное «заблокированное» состояние). В одном воплощении элемент безопасной блокировки включает кодирующую белок последовательность, за которой следует сайт полиаденилирования. В других воплощениях любые другие последовательности, которые будут предотвращать транскрипцию нижестоящих кодирующих последовательностей, также могут использоваться в качестве элемента блокировки. В одном воплощении элемент безопасной блокировки обрамлен двумя площадками FRT. Таким образом, этот элемент безопасной блокировки может быть удален после экспрессии рекомбиназы Flp. После удаления элемента блокировки оптогены, закодированные в OIE, могут быть

транскрибированы и станут активными светозависимым образом (фиг. 26A — активное «разблокированное» состояние).

В другом воплощении элемент безопасной блокировки и последовательность, кодирующая индуктор-активируемую сайт-специфическую рекомбиназу, фланкированы последовательностями Lox (фиг. 26B — неактивное «заблокированное» состояние). После экспрессии рекомбиназы Cre элемент безопасной блокировки, а также последовательность, кодирующая индуктор-активированную сайт-специфичную рекомбиназу могут быть удалены, что обеспечивает экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого в LIE (фиг. 26B — состояние активации летальности).

ХИМЕРНЫЕ ЦЫПЛЯТА

Используемый в данном документе термин «химерный», «химера» или «химерный цыпленок» относится к птичьей клетке, которая включает агент для редактирования ДНК, раскрытый в данном документе, или птице, которая имеет клетки, содержащие агент для редактирования ДНК, раскрытый в данном документе. Следует также отметить, что эмбрионы химер или взрослые химерные птицы также могут называться «суррогатами»; следовательно, эти термины могут использоваться как синонимы. Репрезентативные примеры химерных клеток птиц включают, без ограничения указанным, примордиальные зародышевые клетки (PGC) птиц, такие как PGC гонад, PGC крови, PGC герминального серповидного отростка или гаметы, которые содержат агент для редактирования ДНК, описанный в данном документе. Репрезентативные примеры химерных птиц включают, без ограничения указанным, курицу, индейку, утку, гуся, перепела, фазана или страуса, клетки которых содержат описанный в данном документе агент для редактирования ДНК.

Используемый в данном документе термин «способ» относится к характеру действий, средствам, методам и процедурам для выполнения данной задачи, включая, без ограничения указанным, тот образ действий, те средства, методы и процедуры, которые либо известны, либо могут быть легко разработаны на основе известного образа действий, средств, методов и процедур практикующими химиками, фармакологами, биологическими, биохимическими и медицинскими специалистами.

В одном воплощении предлагается клетка птицы, содержащая экзогенную полинуклеотидную кассету, как раскрыто в данном документе, содержащую состав 5'-OIE-LIE-3' или состав 5'-LIE-OIE-3', где (i) OIE представляет собой оптогенетически-индуцируемый элемент, содержащий первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; и (ii) LIE представляет собой индуцирующий летальность элемент, содержащий третью нуклеотидную последовательность, кодирующую

белок, способствующий летальности, функционально связанный с активностью фермента индуктор-активируемой сайт-специфичной рекомбиназы. Кассета экзогенного полинуклеотида стабильно интегрирована в Z-хромосому клетки.

Кроме того, в другом аспекте предложена популяция клеток птицы, содержащая клетки птиц, которые содержат экзогенную полинуклеотидную кассету, как раскрыто в данном документе. Полинуклеотидная кассета включает состав 5'-OIE-LIE-3' или состав 5'-LIE-OIE-3', где (i) OIE представляет собой оптогенетически индуцируемый элемент, содержащий первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; и (ii) LIE представляет собой индуцирующий летальность элемент, содержащий третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, функционально связанный с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы. Кассета экзогенного полинуклеотида стабильно интегрирована в Z-хромосому клетки.

В некоторых воплощениях клетки птицы содержат экзогенную полинуклеотидную кассету, содержащую состав 5’-LHA-OIE-LIE-RHA-3 'или состав 5’-LHA-LIE-OIE-RHA-3', где (i) LHA представляет собой левое плечо для гомологичного спаривания, содержащее первую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы; (ii) OIE представляет собой оптогенетически индуцируемый элемент, содержащий первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; (iii) LIE представляет собой элемент, индуцирующий летальность, содержащий третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, функционально связанный с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы; и (iv) RHA представляет собой правое плечо для гомологичного спаривания, содержащее четвертую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы.

В некоторых воплощениях клетки птицы, содержащие экзогенную полинуклеотидную кассету, содержат примордиальные зародышевые клетки птицы (англ. primordial germ cells, PGC). В некоторых воплощениях PGC птицы могут быть PGC гонад, PGC крови или PGC зародышевого серповидного отростка.

В контексте настоящего описания термины «примордиальная зародышевая клетка» и «PGC» относятся к диплоидной клетке, которая присутствует в раннем эмбрионе и которая

может дифференцироваться/развиваться в гаплоидные гаметы (т.е. сперматозоиды и яйцеклетки) у взрослой птицы. PGC могут быть получены из бластодермы также на ранних стадиях развития.

Как известно специалистам в данной области, примордиальные зародышевые клетки могут быть выделены на разных стадиях развития и из различных участков развивающегося птичьего эмбриона, таких как, помимо прочего, половой тяж, развивающиеся гонады, кровь и зародышевое серповидный отросток (Chang et al., Cell Biol Int 21: 495-9, 1997; Chang et al., Cell Biol Int 19: 143-9, 1995; Allioli et al., Dev Biol 165: 30-7, 1994; Swift, Am J Physiol 15: 483-516; международная публикация PCT No. WO 99/06533). Половой тяж представляет собой часть развивающегося эмбриона, которая известна обычному специалисту в данной области (Strelchenko, Theriogenology 45: 130-141, 1996; Lavoir, J Reprod Dev 37: 413-424, 1994). Как правило, PGC могут быть позитивно окрашены реакцией с использованием шифф-йодной кислоты (PAS). У некоторых видов PGC могут быть идентифицированы с использованием антител против SSEA (одним заметным исключением являются индюки, PGC которых не презентируют антиген SSEA). В данной области известны различные методы выделения и очистки PGC, включая концентрирование PGC из крови с использованием центрифугирования в градиенте плотности фиколла (Yasuda et al., J Reprod Fertil 96: 521-528, 1992).

Выращивание PGC in-vitro возможно с использованием среды, содержащей куриную и бычью сыворотку, кондиционированную среду, питающие клетки и факторы роста, такие как FGF2 (van de Lavoir et al. 2006, Nature 441: 766–769. DOI: 10,1038/nature04831; Choi et al. 2010, PLoS ONE 5: e12968. doi:10.1371/journal.pone.0012968; MacDonald et al., 2010. PLoS ONE 5: e15518. DOI: 10.1371/journal.pone.0015518). Было показано, что питательная замещающая среда, содержащая факторы роста для активации сигнальных путей FGF, инсулина и TGF-β, может использоваться для размножения PGC (Whyte et al. 2015, Stem Cell Rep 5: 1171–1182. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.10.008).

Примордиальные зародышевые клетки (PGC) могут быть предоставлены и включены в состав для осуществления ныне раскрытого объекта изобретения с помощью любого подходящего метода и при желании могут храниться, замораживаться, культивироваться и т.п., перед применением, как описано. Например, примордиальные зародышевые клетки могут быть получены из донорных эмбрионов на соответствующей эмбриональной стадии. Под стадиями развития птиц в данном документе имеются в виду стадии, определенные с помощью одной из двух признанных в данной области систем стадий: системы Eyal-Giladi и Kochav (EG&K; Eyal-Giladi & Kochav, Dev Biol 49: 321-327, 1976), в которой римские цифры используются для обозначения препримитивных стадий развития и система стадий

Hamburger и Hamilton (H&H; Hamburger & Hamilton, J Morphol 88: 49-92, 1951), в которой используются арабские цифры для обозначения стадий после откладки. Если не указано иное, стадии, упомянутые в данном документе, являются стадиями в соответствии с промежуточной системой H&H. В некоторых воплощениях PGC получают из крови, выделенной из эмбрионов на стадии 14 (H&H). В некоторых воплощениях PGC получают из крови, выделенной из эмбрионов на стадии 15 (H&H). В некоторых воплощениях PGC получают из крови, выделенной из эмбрионов на стадии 16 (H&H).

В одном воплощении PGC могут быть выделены на стадии 4 или стадии зародышевого серповидного отростка в процессе стадии 30, при этом клетки собирают из крови, полового тяжа или гонад на более поздних стадиях. Первичные половые клетки, как правило, в два раза больше соматических клеток, и их легко различить и разделить по размеру. Мужские (или гомогаметные) примордиальные зародышевые клетки (ZZ) можно отличить от гетерогаметных первичных половых клеток (Zw) любым подходящим методом, таким как сбор половых клеток от конкретного донора и типирование других клеток от этого донора, собранные клетки относятся к тому же типу хромосомы, что и типизированные клетки.

Альтернативой применению PGC является прямая трансфекция сперматозоидов с использованием описанного в данном документе агента для редактирования ДНК (Cooper et al., 2016 Transgenic Res 26: 331–347, doi: 10.1007/s11248-016-0003-0).

В одном воплощении для получения химерных птиц из PGC, отредактированных in vitro, экзогенные отредактированные клетки инъецируют внутривенно в суррогатные эмбрионы-хозяева на стадии, когда их эндогенные PGC мигрируют к половому тяжу. «Донорные» PGC могут принадлежать к тому же виду, что и суррогатный эмбрион-хозяин, или к другому виду. Отредактированные «донорные» PGC должны оставаться жизнеспособными и в одном воплощении вытеснять эндогенные PGC, если они должны колонизировать формирующиеся гонады и передавать отредактированные хромосомы через зародышевую линию. Чтобы предоставить донорным PGC преимущество, количество эндогенных PGC может быть уменьшено с помощью химической или генетической абляции (Smith et al., 2015, Andrology 3: 1035-1049. doi:10.1111/andr.12107). Было показано, что воздействие эмульгированного бусульфана на бластодерму суррогатных эмбрионов увеличивает передачу донорных PGC через зародышевую линию до более чем 90%, хотя этот показатель значительно снижается, если PGC культивируются или криоконсервированы (Nakamura et al., 2008, Reprod Fertil Dev 20: 900 –907. doi:10.1071/ RD08138; Naito et al., 2015, Anim Reprod Sci. 153: 50–61. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.12.003). Другие способы искажения соотношения отредактированных PGC к нативным PGC описаны в заявке США

№ 2006/0095980.

В некоторых воплощениях генетически модифицированные PGC можно трансплантировать в половые железы взрослых, как известно в данной области (Trefil et al., 2017 Sci Rep, Oct 27;7(1):14246 doi: 10.1038/s41598-017-14475-w).

Генетически модифицированные клетки (например, PGC) могут быть включены в состав для введения другим птицам путем диссоциации клеток (например, путем механической диссоциации) и тщательного смешивания клеток с фармацевтически приемлемым носителем (например, фосфатно-солевым буферным раствором). В одном воплощении примордиальные зародышевые клетки представляют собой примордиальные зародышевые клетки гонад или примордиальные зародышевые клетки крови («гонада» или «кровь», относящиеся к ткани происхождения исходного эмбрионального донора). Вводимые примордиальные зародышевые клетки могут быть гетерогаметными (Zw) или гомогаметными (ZZ). В одном воплощении PGC можно вводить в физиологически приемлемом носителе при pH от около 6 до около 8 или 8,5 в подходящем количестве для достижения желаемого эффекта (например, от 100 до 30 000 PGC на эмбрион). PGC можно вводить без других ингредиентов или клеток, или другие клетки и ингредиенты можно вводить вместе с PGC.

Введение первичных половых клеток животному-реципиенту in-ovo можно проводить в любое подходящее время, когда PGC еще могут мигрировать в развивающиеся гонады. В одном воплощении введение проводят, начиная примерно от стадии IX в соответствии с системой стадий Eyal-Giladi и Kochav (EG&K) и заканчивая примерно стадией 30 в соответствии с системой стадирования эмбрионального развития Hamburger и Hamilton, или, в другом воплощении, на стадии 15. Таким образом, для цыплят время введения составляет 1, 2, 3 или 4 день эмбрионального развития, например, день 2–2,5. Введение обычно осуществляется путем инъекции в любое подходящее целевое место, такое как область, определяемая амнионом (включая эмбрион), желточным мешком и т.п. В одном воплощении клетки инъецируют в сам эмбрион (включая стенку тела эмбриона). В альтернативных воплощениях может использоваться внутрисосудистая или интрацеломическая инъекция в эмбрион. В других воплощениях инъекция выполняется в сердце. Способы настоящего раскрытого предмета изобретения могут быть осуществлены с предварительной стерилизацией птицы-реципиента in-ovo (например, химической обработкой с использованием бусульфана или гамма- или рентгеновским облучением). Используемый в данном документе термин «стерилизация» относится к частичной или полной неспособности продуцировать гаметы, полученные из эндогенных PGC. Когда донорские гаметы собираются у такого реципиента, они могут быть собраны в виде смеси с

гаметами донора и реципиента. Эту смесь можно использовать напрямую или смесь можно подвергнуть дальнейшей обработке для увеличения в ней доли донорных гамет.

Введение первичных зародышевых клеток in ovo можно проводить любым подходящим способом, вручную или в автоматическом режиме. В одном воплощении введение in ovo осуществляется путем инъекции. Механизм введения in-ovo не имеет решающего значения, но этот механизм не должен чрезмерно повредить ткани и органы эмбриона или окружающие его внеэмбриональные мембраны, так что обработка не приведет к чрезмерному снижению скорости вылупления. Для этой цели подходит шприц для подкожных инъекций с иглой калибра 18–26. Можно использовать заостренную стеклянную пипетку с отверстием диаметром около 20-50 микрон. В зависимости от точной стадии развития и положения эмбриона, игла диаметром один дюйм оканчивается либо в жидкости над цыпленком, либо в самом цыпленке. Перед введением иглы в оболочку можно пробить или просверлить пилотное отверстие, чтобы предотвратить повреждение или затупление иглы. При желании яйцо можно запечатать с помощью герметизирующего материала, по существу не проницаемого для бактерий, такого как воск или т.п., чтобы предотвратить последующее проникновение нежелательных бактерий. Предполагаем, что высокоскоростная инъекционная система для птичьих эмбрионов будет подходящей для практического применения раскрытого в настоящее время объекта изобретения. Все такие устройства, адаптированные для применения на практике раскрытых в данном документе способов, содержат инжектор, содержащий состав из первичных половых клеток, как описано в данном документе, причем инжектор располагают для инъекции в яйцо, переносимое устройством. Кроме того, может быть предусмотрено запечатывающее устройство, функционально соединенное с инъекционным устройством, для герметизации отверстия в яйце после инъекции. В другом воплощении вытянутую стеклянную микропипетку можно использовать для введения PGC в соответствующее место внутри яйца, например, непосредственно в кровоток, либо в вену, либо в артерию, либо непосредственно в сердце.

После инъекции в яйца модифицированных PGC, химерный эмбрион инкубируют до вылупления. В одном воплощении цыпленка доводят до половой зрелости, при этом химерная птица продуцирует гаметы, полученные из донорных PGC.

В некоторых воплощениях клетки птицы содержат птичьи гаметы. Гаметы (яйца или сперма) из химер (или из материала, который был непосредственно подвергнут генетической обработке, как описано в данном документе выше) затем используются для выращивания кур-основателей (F1). Методы молекулярной биологии, известные в данной области (например, ПЦР и/или саузерн-блоттинг), могут использоваться для подтверждения

передачи зародышевой линии. Куры F1 могут быть скрещены с получением гомозиготных самцов-носителей ZZ и самок-носителей (F2). Затем гаметы от кур-основателей F2 можно использовать для расширения племенных колоний. Колонии обычно выращивают до половой зрелости. Оплодотворенные яйца, полученные от этих стай, могут быть проверены на раннюю эмбриональную смертность самцов путем воздействия индуктора (например, синего света), который вызывает летальный фенотип. После индукции (например, при освещении синим светом) яйца инкубируют (например, в течение 8 дней) и проверяют (например, путем светового просвечивания) для выявления ранней эмбриональной смертности.

В одном воплощении предлагается способ создания химерной птицы, включающий введение популяции клеток птицы экзогенной полинуклеотидной кассеты, имеющей состав 5’-OIE-LIE-3 'или состав 5’-LIE-OIE-3', где (i) OIE представляет собой оптогенетически индуцируемый элемент, содержащий первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; и (ii) LIE представляет собой индуцирующий летальность элемент, содержащий третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, функционально связанный с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы. Кассета экзогенного полинуклеотида стабильно интегрирована в Z-хромосому клеток. Эти клетки с отредактированным геномом затем инъецируют в эмбрион птицы-реципиента.

В другом воплощении предлагается способ создания химерной птицы, включающий введение популяции клеток птицы экзогенной полинуклеотидной кассеты, имеющей состав 5’-LHA-OIE-LIE-RHA-3 'или состав 5’-LHA- LIE-OIE-RHA-3 ', где (i) LHA представляет собой левое плечо для гомологичного спаривания, содержащее первую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы; (ii) OIE представляет собой оптогенетически индуцируемый элемент, содержащий первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы; (iii) LIE представляет собой индуцирующий летальность элемент, содержащий третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, функционально связанный с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы; и (iv) RHA представляет собой правое плечо для гомологичного спаривания, содержащее четвертую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме

птицы. Кассета экзогенного полинуклеотида стабильно интегрирована в Z-хромосому клеток. Эти клетки с отредактированным геномом затем инъецируют в эмбрион птицы-реципиента.

В некоторых воплощениях способ дополнительно включает инкубацию эмбриона химерной птицы in-ovo до вылупления. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает выращивание химерной птицы до половой зрелости, при этом химерная птица продуцирует гаметы, полученные из введенных клеток.

В некоторых воплощениях клетки с отредактированным геномом вводят путем инъекции in ovo. В другом воплощении эмбрионы могут быть извлечены из яичной скорлупы, инъецированы «ex-ovo» и затем помещены обратно в суррогатную яичную скорлупу. В некоторых воплощениях вводимая популяция клеток происходит от того же вида птиц, что и эмбрион птицы-реципиента. В некоторых воплощениях вводимая популяция клеток происходит из вида птиц, отличающегося от вида эмбриона птицы-реципиента.

В другом воплощении химерная птица может быть получена путем инъекции PGC с отредактированные геномом в бластодерму. В общем, PGC с отредактированные геномом могут быть возвращены или инъецированы обратно туда, где расположены эндогенные PGC. В одном воплощении PGC с отредактированные геномом могут быть возвращены обратно в бластодерму. Альтернативно, PGC с отредактированные геномом могут быть возвращены обратно в зародышевый серповидный отросток, кровь, эмбриональные гонады или даже взрослые гонады.

В некоторых воплощениях популяция клеток птицы с измененным геномом вводится, когда эмбрион-реципиент находится, начиная примерно со стадии IX в соответствии с системой стадирования Eyal-Giladi и Kochav. В некоторых воплощениях популяцию клеток птицы вводят, когда эмбрион-реципиент находится примерно на стадии 30 в соответствии с системой стадирования Hamburger и Hamilton. В некоторых воплощениях популяцию клеток птицы вводят, когда эмбрион-реципиент находится примерно на стадии IX в соответствии с системой стадирования Eyal-Giladi и Kochav; и примерно на 30 стадии по системе стадирования Hamburger и Hamilton. В некоторых воплощениях популяцию клеток птицы вводят, когда эмбрион-реципиент находится на стадии, которая происходит после стадии 14 в соответствии с системой стадирования Hamburger и Hamilton.

В некоторых воплощениях отредактированная геномом популяция клеток птицы вводится после облучения эмбриона. В некоторых воплощениях облучение включает γ-облучение или облучение рентгеновскими лучами. В некоторых воплощениях облучение включает облучение гамма-излучением 600-800 рад. В некоторых воплощениях облучение

включает облучение излучением 600-800 рад. В некоторых воплощениях облучение включает облучение излучением 400-1000 рад. В определенных воплощениях облучение включает облучение излучением 200-1200 рад.

Кроме того, в другом аспекте предусмотрена химерная птица, которую можно получить описанными выше способами.

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

В одном воплощении предлагается способ создания клетки птицы, включающий стадию контакта клетки птицы с экзогенной полинуклеотидной кассетой, имеющей состав 5'-OIE-LIE-3 'или состав 5'- LIE-OIE-3', как описано в данном документе. Кассета экзогенного полинуклеотида стабильно интегрирована в Z-хромосому клеток. В другом воплощении способ включает стадию контакта клетки птицы с экзогенной полинуклеотидной кассетой, имеющей состав 5'-LHA-OIE-LIE-RHA-3 'или состав 5'-LHA-LIE-OIE-RHA-3', как описано в данном документе. Кассета экзогенного полинуклеотида стабильно интегрирована в Z-хромосому клеток.

В другом воплощении предлагается способ индукции летальности мужского эмбриона в оплодотворенном яйце птицы, включающий следующие стадии: введение агента для редактирования ДНК, описанного в данном документе, в популяцию птичьих клеток для создания редактируемых геномом птичьих клеток; перенос этих клеток птицы с отредактированным геномом на эмбрионы птиц-реципиентов; и воздействие на эмбрионы индуктора, который вызывает экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого агентом для редактирования ДНК, тем самым вызывая летальность мужского эмбриона в оплодотворенном яйце птицы. Выше были обсуждены различные элементы агента для редактирования ДНК, такие как оптогенетически-индуцируемый элемент, активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа, индуктор, белок, способствующий летальности, и т.д.

В одном воплощении агент для редактирования ДНК, используемый в указанном выше способе индукции летальности у мужского эмбриона, включает (i) LHA, содержащую последовательность SEQ ID NO: 105, (ii) OIE, содержащую последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 107, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с

последовательностью SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью из SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, (iii) LIE, содержащую последовательность SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 96, или S EQ ID NO: 98, и (iv) RHA, содержащую последовательность SEQ ID NO: 106.

В другом воплощении предлагается способ индукции летальности мужского эмбриона в оплодотворенном яйце птицы, включающий следующие стадии: введение популяции птичьих клеток агента для редактирования ДНК, содержащего элемент безопасной блокировки, как раскрыто в данном документе, тем самым генерируют клетки птицы с отредактированным геномом; перенос этих клеток птицы с отредактированным геномом в эмбрионы птиц-реципиентов; и воздействие на эмбрионы агента, который удаляет элемент STOP из элемента STOP, тем самым вызывая экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого агентом для редактирования ДНК, и вызывая летальность мужского эмбриона в оплодотворенном яйце птицы. Выше были обсуждены различные элементы агента для редактирования ДНК, такие как оптогенетически-индуцируемый элемент, активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа, индуктор, элемент безопасной блокировки, белок, способствующий летальности, и т.д. В одном воплощении агент для редактирования ДНК, используемый в указанном выше способе индукции летальности у мужского эмбриона, включает последовательность одной из SEQ ID NO: 120-127.

В одном воплощении для удаления элемента STOP из агента для редактирования ДНК требуется экспрессия Flp, когда элемент STOP фланкируется двумя сайтами FRT (см. Фиг. 26A, неактивное «заблокированное» состояние). В одном воплощении экспрессия Flp может осуществляться путем контакта клеток птицы с отредактированных геномом с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Flp (например, SEQ ID NO: 129 или SEQ ID NO: 131). После экспрессии рекомбиназы Flp элемент STOP, вставленный между промотором и последовательностью, кодирующей индуктор-активируемую сайт-специфическую рекомбиназу в OLE, удаляется, что обеспечивает экспрессию активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы (фиг. 26A — «незаблокированное» состояние). При дальнейшем воздействии индуктора (например, синего света) активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа будет активирована, что приведет к удалению OLE и экспрессии белка, способствующего летальности, кодируемого в LIE (фиг. 26A — состояние активации летальности).

В другом воплощении удаление элемента STOP может быть выполнено путем контакта клеток птицы с отредактированным геномом с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cre (например, SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 132). В одном

воплощении элемент безопасной блокировки и последовательность, кодирующая индуктор-активируемую сайт-специфическую рекомбиназу, фланкированы последовательностями Lox (фиг. 26B — неактивное «заблокированное» состояние). После экспрессии рекомбиназы Cre элемент безопасной блокировки, а также последовательность, кодирующая индуктор-активированную сайт-специфичную рекомбиназу удаляются, что обеспечивает экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого в LIE (фиг. 26B — состояние активации летальности).

В соответствии с принципами технологии, представленной в данном документе, стадия индукции летальности может быть осуществлена на любой стадии развития, например, вскоре после откладки яиц. Чем раньше наступит смерть, тем раньше умрет эмбрион. Таким образом, после этого достигается эмбриональная смертность. Если токсин или проапоптотический агент используется для индукции гибели эмбриона, эмбрион погибает вскоре после индукции. Если LIE основан на гене, который нарушает важный сигнальный путь, такой как BMP, например, путем экспрессии антагониста BMP4, Noggin, гибель клеток будет индуцироваться в момент времени развития, когда этот путь активен и необходим. Например, BMP активен на стадиях, включающих бластуляцию, гаструляцию, нейруляцию, органогенез. В некоторых воплощениях изобретения летальность индуцируется во время откладки яиц, и эмбрион умирает в течение около 36 часов после воздействия Noggin. Например, если оптогенетическая система активируется вскоре после откладки яиц (стадии X-XIII EG&K), эмбрион погибает на этой стадии. Эмбрионы мышей с нокаутом BMP4 умирают внутри матки от 6,5 дней после полового акта (dpc) до ~ 8,5-9 dpc, что эквивалентно первым 30-36 часам инкубации при развитии куриного эмбриона. В некоторых воплощениях летальность индуцируется в течение 21-дневного периода от оплодотворения до вылупления. В некоторых воплощениях летальность индуцируется более одного раза в течение 21 дня от оплодотворения до вылупления. В некоторых воплощениях летальность индуцируется в яйце до ранних стадий бластуляции, известных как стадии X-XIII EG&K (Eyal-Giladi and Kochav, 1976).

В некоторых воплощениях способ осуществляется in vivo. В некоторых воплощениях способ осуществляется ex vivo. В определенных воплощениях способ выполняется in-ovo. В некоторых воплощениях способ выполняется in vitro.

Понятно, что определенные особенности определенных воплощений, которые для ясности описаны в контексте отдельных воплощений, также могут быть предоставлены в комбинации в одном воплощении. И наоборот, различные признаки определенных воплощений, которые для краткости описаны в контексте одного воплощения, также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации или как

подходящие в любом другом описанном воплощении. Определенные признаки, описанные в контексте различных воплощений, не следует рассматривать как существенные особенности этих воплощений, если только воплощение не работает без этих элементов.

Различные воплощения и аспекты, описанные выше и заявленные в нижеследующем разделе формулы изобретения, находят экспериментальную поддержку в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

Далее ссылаемся на следующие примеры, которые вместе с приведенными выше описаниями иллюстрируют неограничивающим образом некоторые воплощения.

Обычно используемая в данном документе номенклатура и используемые лабораторные процедуры включают молекулярные, биохимические, микробиологические методы и методы рекомбинантной ДНК. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методологии, изложенные в Пат. США № 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступные иммуноанализы подробно описаны в патентной и научной литературе, см., например, Пат. США № 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); все они включены ссылкой, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Другие

общие ссылки представлены в этом документе. Считается, что описываемые в данном документе процедуры хорошо известны в данной области и предназначены для удобства читателя. Вся информация, содержащаяся в них, включена в данный документ ссылкой.

ПРИМЕР 1

Создание линии цыплят с модифицированным геномом - это многоступенчатый процесс. Конечный продукт представляет собой линию кур-несушек, полностью идентичную по содержанию генома несушке, которая используется сегодня в отрасли (см. фиг. 1).

В одном воплощении последовательность действий включает 5 основных стадий: (1) создание и культивирование линий примордиальных зародышевых клеток курицы (PGC); (2) модификацию генома в культивируемых PGC; (3) трансплантацию модифицированных PGC в эмбрионы и получение цыплят-химер, которые будут проверены на передачу по зародышевой линии и выявление потенциальных носителей-основателей; (4) разведение кур-основателей из генетического материала, полученного от химер; (5) размножение колоний кур-основателей до стад-основателей и повторная проверка передачи по зародышевой линии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуральная среда для PGC: Культуральная среда для PGC птиц состоит из среды DMEM (Gibco), не содержащей кальция, разбавленной водой до 250 мОсмоль/л, содержащей 12,0 мМ глюкозы, 2,0 мМ GlutaMax (Gibco), 1,2 мМ пирувата (Gibco), 1 × витамина MEM (Gibco), 1 × добавки B-27 (Gibco), 1 × NEAA (Gibco), 0,1 мМ β-меркаптоэтанола (Gibco), 1 × нуклеозидов (Biological industries), 0,2% овальбумина (Sigma), 0,1 мг/мл гепарина натрия (Sigma), CaCl2 0,15 мМ (Sigma), 1 × витамина MEM (Gibco), 1 × Pen/Strep (Biological industries), 0,2% куриной сыворотки (Sigma) в птичьей среде DMEM. Перед использованием были добавлены следующие факторы роста: человеческий активин A, 25 нг/мл (Peprotech); человеческий FGF2 4 нг/мл (R&D Biosystems), овотрансферин (5 мкг/мл) (Sigma). AkoDMEM относится к разбавленной среде, содержащей глюкозу, пируват и витамины.

Получение линии PGC: линии PGC получали путем помещения ~ 1,0–3,0 мкл крови, выделенной из эмбрионов на стадиях 14–16 (H&H), в 300 мкл среды в 48-луночный планшет. Среду меняли каждые 2 дня. Когда общее количество клеток достигло 1×10^5, общий объем среды меняли каждые 2 дня, и клетки размножали при $2\text{-}4 \times 10^5$ клеток/мл среды. Клетки замораживали в культуральной среде для PGC, содержащей 10% ДМСО, температуру постепенно снижали до -80°C, хранили в течение 1-3 дней и переносили в жидкий азот.

Определение пола и характеризация линии PGC: Каждая линия PGC была охарактеризована по половому признаку, экспрессии мРНК маркеров PGC и экспрессии

белка известного маркера PGCs SSEA14. ДНК донорского эмбриона была выделена и сохранена для дальнейшего применения. Для определения пола ДНК из 2-4 × 10^5 клеток PGC собирали, ресуспендировали в конечном буфере (102-T, Viagen), содержащем 100 мкг/мл протеиназы K (Sigma), и инкубировали при 55°C в течение 3 часов. Протеиназу K инактивировали при 85°C в течение 45 минут. ПЦР для определения пола выполняли с праймерами от W-хромосомы, которые нацелены на женские хромосомы (P17, P18) и рибосомные S18 (P19, P20) в качестве контроля. Для анализа экспрессии генов РНК очищали с использованием реагента TRIZOL, и 1 мкг РНК использовали для получения библиотеки кДНК с помощью реакции ПЦР с обратной транскрипцией (GoScript Reverse transcriptase, Promega). кДНК служила матрицей для ПЦР с использованием праймеров Dazl, Sox2, cPouV, Nanog, Klf4, cVH, P21-P22, P23-P24, P25-P26, P27-P28, P29-P30, P31-P32, соответственно.

Иммуногистохимия с использованием анти-0SSEA1 антитела: клетки собирали, фиксировали 4% PFA, блокировали 5% нормальной козьей сывороткой в 0,1% тритоне PBS и окрашивали при разведении 1: 100 антитела против SSEA1 (DSHB, банк гибридом) в блокирующем буфере в течение ночи. После промывки клеток в течение 30 минут PBS добавляли 0,1% вторичное антитело к тритону (Alexa Fluor 488, молекулярные зонды) на 1 час, клетки окрашивали DAPI (Sigma), помещали в среду для закрепления (Histomount, электронная микроскопия) и накрывали.

Трансфекция PGC, отбор и FACS-сортировка: Плазмидную трансфекцию PGC проводили с использованием липофекции или электропорации. Для липофекции использовали липофектамин 2000 в соответствии с протоколом производителя. 3-5 × 10^5 клеток высевали в 96-луночный планшет в AkoDMEM, содержащий NEAA, пируват, витамины, CaCl2 и факторы роста (активин A, hFGF и оватрансферин). 100 нг плазмиды и 0,25 мкл Lipofectamine 2000 (invitrogen) разводили отдельно в 20 мкл смеси OPTI-MEM, инкубировали в течение 20 минут и наносили пипеткой на клетки. Для электропорации от 3 × 10^5 до 1,5 × 10^6 клеток промывали в AkoDMEM и подвергали электропорации при 1000 В, 12 мс, 3 импульсах на электропораторе Neon (Invitrogen) и сразу же высевали в 96- или 48-луночный планшет, соответственно, в среду для PGC, не содержащую антибиотиков. Среду меняли через 1-3 часа. Селекцию с 25-100 мкг/мл G418 начинали 72 часа спустя и проводили в течение 2-4 недель. После отбора клетки были индивидуально выделены вручную или с помощью сортировки FACS. Для сортировки FACS клетки осторожно переносили пипеткой, и сортировали в культуральной среде для PGC. Положительные клетки GFP отсортировали с помощью FACS Aria II в новый 96-луночный планшет, по одной клетке на лунку или объединяли. (Анализ FACS выполнен с использованием проточного цитометра BD FACS Aria II (BD, США).

Получение плазмид

Клонирование плазмид CRISPR: последовательности CRISPR были созданы с использованием инструмента проектирования CRISPR, лаборатория Zhang, MIT. Плазмида px330-GFP (модифицированная из плазмиды Addgene # 42230) была разрезана с использованием рестрикционного фермента BbsI и служила нам в качестве основы для вставки сайта CRISPR с образованием sgРНК. Олигонуклеотиды для сайтов CRISPR sgРНК - CRISPR1, CRISPR3 (олигонуклеотиды P34-P35 и P36-P37, соответственно) денатурировали при 95°C в течение 30 секунд, медленно отжигали и лигировали с плазмидами, разрезанными BbsI, трансформировали в E. coli, очищали и проверяли последовательность, как описано (Cong L, et al., Science. 2013 Jan 3. 10.1126/science.1231143 PubMed 23287718).

Клонирование плазмиды pJet-HAs: геномную область ниже локуса HINT1Z на Z-хромосоме, содержащую как 5'HA, так и 3'HA, амплифицировали из ДНК PGC с праймерами P1 и P2 с использованием ПЦР (Kapa, Roche). Продукт ПЦР очищали и лигировали в плазмиду pJet1.2 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя.

Конструирование нацеленного вектора : Плазмиду pCAGG-IRES-Neo-GFP использовали в качестве матрицы для ПЦР с использованием праймеров P5-P6 для амплификации вставки pCAGG-IRES-Neo-GFP. Плазмиду pJet-HAs использовали в качестве матрицы для ПЦР с использованием праймеров P3-P4 для амплификации вектора, содержащего 5'HA и 3'HA. Реакцию сборки Гибсона проводили с очищенным вектором и вставкой продуктов ПЦР, используя 0,03 пм, 0,06 пм линеаризованного продукта, соответственно. Продукты реакции сборки Гибсона трансформировали в E.coli для получения плазмиды, последовательность которой проверяли.

Конструирование вектора pCAGG-Optogene: для создания вектора pCAGG-Optogene плазмиды оптогенов pmCherry-CIBN-CreC и pmCherry-Cry2-CreN11 использовали в качестве матрицы для амплификации оптогенов с использованием праймеров P40-P41 и P42-P43, которые дало продукции 1,3 т.о. и 2,1 т.о., соответственно. Эти два продукта имеют общие перекрывающиеся последовательности в сайте P2A, который был введен в праймеры P41 и P42. Одноцикловая ПЦР с удлинением выступающих концов была использована для объединения двух фрагментов в один продукт размером 3,5 т.о., который был очищен из агарозного геля. Этот продукт лигировали с челночным вектором pJet1.2, который использовали в качестве матрицы для ПЦР, с использованием праймеров P44 и P45, которые содержат хвосты с сайтами рестрикции SmaI и NheI, соответственно. Этот продукт гидролизовали с использованием соответствующих рестрикционных ферментов и использовали в качестве вставки для лигирования для лигирования с плазмидой pCAGG-IRES-GFP, расщепленной SmaI и NheI, которая служила вектором. Продукты лигирования

трансформировали в бактерии E. coli и верифицировали размноженную плазмиду с помощью секвенирования.

Конструирование вектора pGK-DTA-IRES-GFP: для создания pGK-DTA-IRES-GFP экспрессирующий вектор pSK BS-PGK-DTA использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P46 и P47, которые содержат последовательности расширения для XmaI и сайты рестрикции NheI, соответственно. Продукт размером 0,65 т.о. гидролизовали соответствующими ферментами и использовали в качестве вставки для лигирования с комплементарным сайтом XmaI-NheI в плазмиде pGK-IRES-GFP, которая служила вектором для лигирования. Продукты лигирования трансформировали в бактерии E.coli и верифицировали размноженную плазмиду с помощью секвенирования.

Электропорация in-ovo. Электропорация *in-ovo* проводилась, как было описано ранее. Оплодотворенные яйца инкубировали в течение 56-60 часов при 37,8°C, на яичной скорлупе создавали окна и инъецировали плазмидную ДНК в концентрации ~ 2 мкг/мкл, используя заостренную микропипетку с отверстием диаметром 10-15 мкм в нервную трубку. Три импульса 25 В, 30 мс были доставлены с использованием системы электропорации с прямоугольной волной ECM 830 (BTX). После электропорации яичную скорлупу закрывали парафильмом, и эмбрионы дополнительно инкубировали до анализа.

Эндонуклеазный анализ: PGC трансфицировали плазмидами CRISPR1 или CRISPR3 с использованием реагента Lipofectamine 2000. Спустя 48 часов отдельные GFP-положительные клетки выделяли в 96-луночный планшет и выращивали с образованием чистых колоний. Собирали ДНК, и область размером 350 п.н., фланкирующую сайты CRISPR, амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами P38-P39. Продукты ПЦР подвергаются денатурации при 95°C, медленно отжигаются и инкубируются с эндонуклеазой T7 в течение 1 часа при 37°C. Для калибровки и в качестве положительного контроля продукт ПЦР размером 350 п.н. был субклонирован в pJet1.2, а сайт CRISPR был мутирован с использованием сайт-направленного мутагенеза. Введенная мутация заменила последовательность WT ATACCAGATAACGTgCCTTATTTGGCCGTT (SEQ ID NO: 2) на ATACCAGATAACGTaatCCTTATTTGGCCGTT (SEQ ID NO: 3). Эта искусственная мутация служила положительным контролем как для анализа эндонуклеаз (фиг. 7A), так и для контрольного секвенирования (фиг. 8B).

Саузерн-блоттинг: Dig-мечение для генных зондов 5'HA, 3'HA и Neo получали с помощью ПЦР-амплификации (Longamp, NEB) с праймерами P13-P14, P15-P16 и P11-P12, соответственно, с использованием смеси DIG DNA labeling Mix (Roche). Пятнадцать мкг геномной ДНК гидролизовали в течение ночи при 37°C рестрикционным ферментом BglII. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 0,8% (масс./об.) агарозном геле (20 В, 12 ч) и

переносили на положительно заряженные нейлоновые мембраны (GE Healthcare). После переноса влажные мембраны сшивали с использованием УФ-света при 254 нм, в течение 3 минут с каждой стороны, затем промывали 2XSSC. Мембраны предварительно гибридизовали в течение 2 часов при 42°C с использованием гибридизационного раствора DIG Easy-Hyb (Roche). Зонды (50 нг/мл) денатурировали нагреванием до 95°C в течение 5 минут и сразу же погружали в лед. Денатурированные зонды добавляли к 10 мл теплого раствора DIG Easy-Hyb и гибридизовали в течение 12 часов при 42°C. Мембраны дважды промывали в течение 10 минут в 2XSSC, 0,1% SDS при комнатной температуре при перемешивании, а затем промывали 3 раза в течение 30 минут в 0,2XSSC, 0,1% SDS при 65°C при перемешивании. Дальнейшую промывку и блокирование проводили с помощью набора промывки DIG и блокирующего буфера (Roche) и в соответствии с их протоколом. Мечение DIG детектировали с использованием антитела против дигоксигенина-AP 1:10000 (Roche) с последующей реакцией хемилюминесценции с использованием реагента CDP-Star (Roche). Изображения были получены с использованием системы визуализации гелей G: BOX (Syngene).

Инъекция PGC в эмбрионы и окрашивание всего препарата: Свежеснесенные яйца инкубировали острым концом вверх в течение 58-62 часов при 37,8°C и влажности 55%. После инкубации в яичной скорлупе создавали окно размером 4-8 мм и в кровоток инъецировали 3000-8000 PGC с помощью заостренной микропипетки с отверстием ~30-40 мкм. Окно было покрыто мембраной из белого яйца и дополнительно заклеено лентой Parafilm (Parafilm) или Leukoplast (BSN medical GmbH). Эмбрионы инкубировали до вылупления. Некоторые гонады инъецированных эмбрионов были выделены и взяты для полного окрашивания GFP. Гонады фиксировали в 4% PFA, промывали в течение 2 ч PBS, блокированным 5% нормальной ослиной сывороткой в PBS 1% Triton и окрашивали в разведении 1:20 мышиным антителом против SSEA1 или кроличьим антителом против GFP 1: 500 (Abcam) в блокирующем буфере на ночь. После отмывки в течение 2 часов PBS 1% тритоном добавляли вторичное ослиное антитело против cy3 мыши 1: 500 (Jackson Immunoresearch Laboratories) или вторичное антитело alexa488 против кроличьих антител 1: 500 (Molecular Probes) в течение 3 часов в блокирующем буфере. Ткань окрашивали контрастно с помощью 4',6-диамидин-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma), и помещали в глицерин, и получали изображения с помощью конфокального микроскопа (Leica, TCS SPE, Wetzlar, Германия).

Последовательности праймеров P1-P32 перечислены в SEQ ID NO: 4-35, последовательности для праймеров P34-P47 перечислены в SEQ ID NO: 36-49.

Последовательности плазмид перечислены ниже:

1. pX330-GFP (SEQ ID NO: 50); 2. CRISPR1 (SEQ ID NO: 51); 3. CRISPR3 (SEQ ID NO: 52); 4. pJet-Has (SEQ ID NO: 53); 5. pCAGG-Neo-IRES-GFP (SEQ ID NO: 54); 6. Вектор направленного воздействия (SEQ ID NO: 55); 7. pmCherry-Cry2-CreN (SEQ ID NO: 56); 8. pmCherry-CIBN-CreC (SEQ ID NO: 57); 9. pB-RAGE-GFP (SEQ ID NO: 58); 10. pCAGG-IRES-GFP (SEQ ID NO: 59); 11. pCAGG-Optogenes (SEQ ID NO: 60); 12. pB-RAGE-mCherry (SEQ ID NO: 61); 13. pSK BS-PGK-DTA (SEQ ID NO: 62); 14. pGK-IRES-GFP (SEQ ID NO: 63); 15. pGK-DTA-IRES-GFP (SEQ ID NO: 64).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и характеризация линий PGC

Во время самых ранних стадий эмбрионального развития, вскоре после откладки яиц и до инициации гаструляции, PGC мигрируют ростральноо в область зародышевого серповидный отростка в передней части внеэмбрионального слоя мезодермы. Считается, что эта миграция «защищает» PGC от процессов дифференцировки, как это делают соматические клетки. Только после образования Area Opaca Vasculosa, крови и сердцебиения, через около 2,5 дня инкубации (стадия 14-17 H&H), клетки возвращаются к эмбриону через кровоток и колонизируют половой тяж, который даст начало гонадам. На этих стадиях с помощью микропипетки с диаметром отверстия ~ 40-60 мкм было собрано 1-3 мкл крови из сосудистой системы эмбрионов и перенесено в лунку, содержащую культуральную среду PGC, в 48-луночном планшете. Культуральная среда PGC позволяет быстро делить PGC (20-24 часа клеточного цикла), сохраняя при этом их недифференцированное состояние в условиях отсутствия фидера. После 2-3 недель культивирования клетки крови деградировали и исчезли. Еще через 1-2 недели культивированные PGC стали конфлуентными (фиг. 5A). Эти клетки можно в дальнейшем выращивать для модификации генов или можно успешно замораживать и размораживать для последних модификаций. Куриные PGC в культуре были подробно охарактеризованы в литературе с использованием морфологических особенностей, паттернов экспрессии белков и мРНК и, наконец, их способности к миграции в направлении гонад при инъецировании обратно в сосудистую сеть эмбриона-реципиента соответствующей стадии. Эти характеристики были исследованы на полученных культурах клеток PGC, чтобы показать, что они сохраняют хорошо установленные характеристики PGC. Морфологически PGC представляют собой большие, слегка гранулированные клетки диаметром около 15-20 мкм, содержащие большие ядра. PGC являются тотипотентными клетками, поэтому они экспрессируют плюрипотентные маркеры, такие как cPouV, SOX2, KLF4 и Nanog, и два уникальных маркера половых клеток - cVH и DAZL. Из каждой линии PGC ДНК экстрагировали для определения пола с использованием праймеров для рибосомы S18 (P19-

P20, размер продукта 256 п.н.) в качестве положительного контроля и праймеров для W-хромосомы (P17-P18, размер продукта 415 п.н.) для идентификации самок (фиг. 5B). Кроме того, PGC экспрессируют мембранный антиген SSEA-1 4 (фиг. 5C).

От несушек и бройлеров, как мужских, так и женских линий, было получено десять линий PGC. Трансфекцию плазмиды проводили с использованием реагента для катионно-липидной трансфекции Lipofectamine 2000, который взаимодействует с отрицательно заряженной ДНК, обеспечивая ее проникновение в клетку. Трансфекция плазмидой, кодирующей GFP (pCAGG-GFP), приводила к эффективности трансфекции около 15-20% (фиг. 5D). Кроме того, трансфекция PGC с использованием электропорации привела к повышению эффективности до 90% (фиг. 5E). Чтобы продемонстрировать, что культивируемые PGC успешно колонизируют гонады, GFP-экспрессирующие PGC инъецировали в кровоток на стадиях 14-16 H&H, и эмбрионы инкубировали в течение 10 дней. Эмбрионы препарировали, и в гонадах идентифицировали GFP-положительные клетки (фиг. 5F).

Создание мишеней CRISPR-Cas9 на Z-хромосоме

В одном воплощении редактирование ДНК в Z-хромосоме было выполнено с использованием CRISPR-Cas9 и процессов гомологичной рекомбинации. В то время как система CRISPR-Cas9 будет непосредственно разрезать ДНК в определенном участке Z-хромосомы, эндогенная система репарации, использующая процесс гомологичной рекомбинации, позволит целенаправленно вставить искомую ДНК в точное место. Для этой цели требуется конструирование нацеленной векторной плазмиды, которая включает плечи для гомологичного спаривания, соответствующие сайту вставки на Z-хромосоме. Был выбран сайт для встраивания ДНК на Z-хромосоме ниже кодирующего гена HINT1Z. Во многих исследованиях было показано, что использование системы CRISPR улучшает прямые вставки ДНК. Широко используемая для этой цели плазмида px330 включает сайт sgРНК и фермент Cas9. Сайт sgРНК включает уникальную последовательность, которая направляет фермент Cas9 к сайту-мишени и ведет к разрыву двухцепочечной ДНК (DSDB), нацеленному на конкретный геном. С помощью инструмента разработки CRISPR была идентифицирована уникальная последовательность sgРНК, как показано на фиг. 6A. 12 лучших направляющих в соответствии с их оценкой изображены на фиг. 6B. Последовательности направляющих с 1 по 12 перечислены в SEQ ID NO: 66-77.

Направляющие №1 и №3 были выбраны на основании обычного сходства вторичной структуры и использовались для проверки возможных нецелевых сайтов в геноме курицы, которые оценивались по степени несоответствия. 10 лучших результатов поиска последовательностей, потенциально не являющихся мишенью для направляющей №1,

показаны на фиг. 6C и SEQ ID NO: 78-87. Примечательно, что у шести последовательностей, не являющихся мишенью, есть 4 несовпадения, что подчеркивает специфичность этой направляющей.

Встраивание последовательности ДНК осуществляли путем разрезания модифицированной плазмиды px330, которая включает GFP в рамке считывания, слитый с с-концом Cas-9. Отожженные праймеры, содержащие последовательности sgРНК, лигировали с рестрикционным ферментом BbsI, как описано ранее (фиг. 6B). Продукты лигирования трансформировали в E.coli, плазмиды очищали и вставки sgРНК проверяли секвенированием.

Проверка активности системы CRISPR-Cas9

Путем выращивания PGC в культуральной среде без фидеров были получены чистые колонии, происходящие из отдельных клеток, что позволило охарактеризовать эффективность системы CRISPR-Cas9. Для этого PGC трансфицировали плазмидами pX330-GFP-CRISPR1 и pX330-GFP CRISPR3 и выращивали клональные колонии. Полную геномную ДНК экстрагировали из колоний, происходящих из отдельных клеток, экспрессирующих GFP. ДНК анализировали эндонуклеазным анализом и секвенировали. Для анализа на эндонуклеазу был разработан положительный контроль. Этот контроль представлял собой продукт ПЦР размером 320 пар оснований со вставленными мутациями в спрогнозированном сайте активности CRISPR-Cas9. Этот продукт смешивали с продуктом дикого типа (WT) аналогичной длины в различных соотношениях, 1:15, 1: 7, 1: 1 - мутированный: WT, соответственно, и отожженную смесь подвергали эндонуклеазной активности (фиг. 7A). Две короткие полосы с прогнозируемым размером 136 и 184 п.н. были четко видны при соотношении 1: 7 и 1: 1, что указывает на то, что анализ работает правильно. Аналогичным образом, тот же анализ был проведен на геномной ДНК, полученной из 12 колоний, трансфицированных плазмидами CRISPR1 и CRISPR3 (фиг. 7B, 7C). В 9 из 12 колоний наблюдался четкий дублет спрогнозированного размера. Это указывает на то, что плазмиды CRISPR1 и CRISPR3 эффективно генерируют DSDB в прогнозируемом сайте.

Для анализа секвенирования продукты ПЦР, которые использовали для анализа эндонуклеаз (фиг. 7A-7C), также были секвенированы (фиг. 8A-8D). Секвенирование отрицательного контроля WT выявило прогнозируемый сайт расщепления CRISPR1 (фиг. 8A). Секвенирование смеси WT и искусственно мутированного продукта в качестве положительного контроля выявило появление двойных пиков на хроматограмме ДНК сразу после спрогнозированного сайта расщепления (стрелка, фиг. 8B). Подобное секвенирование одной и той же области генома в трансфицированных колониях выявило как отрицательные

(фиг. 8C), так и положительные (стрелка, фиг. 8D) колонии, тогда как последние составляли> 70% случаев.

Создание нацеленного вектора для интеграции в геном

Чтобы продемонстрировать целевую геномную интеграцию с Z-хромосомой с использованием HR, был разработан нацеленный вектор (фиг. 9A-9F). Вектор включает промотор pCAGG, за которым следует ген отбора неомицина, внутренний сайт входа в рибосомы (IRES), GFP и сайт полиаденилирования бета-глобина кролика. Эта кассета была окружена плечами для гомологичного спаривания размером ~ 1,5 т.о. на концах 5' и 3', соответственно. Для создания этого вектора фрагмент ДНК размером ~ 3 т.о., содержащий оба плеча для гомологичного спаривания, амплифицировали с использованием праймеров P1 и P2 и лигировали в челночный вектор pjet1.2. Было обнаружено, что полное секвенирование этого фрагмента идентично последовательности генома курицы. Эту плазмиду pJet-HAs использовали в качестве матрицы для создания линеаризованного продукта ПЦР, содержащего два отдельных плеча для гомологичного спаривания, за исключением последовательности длиной 23 п.н. между ними, которая включает сайты sgРНК CRISPR. Амплификацию проводили с использованием праймеров P3 и P4, которые содержат последовательности на своем 5' конце, которые соответствуют краям кассеты pCAGG-Neo-IRES-GFP. Этот линейный продукт ПЦР называется «вектором». Плазмиду pCAGG-Neo-IRES-GFP использовали в качестве матрицы для создания линейного продукта ПЦР. Этот фрагмент амплифицировали с использованием праймеров P5 и P6, содержащих последовательности, которые соответствуют 3' и 5' концам 5'HA и 3'HA концов, соответственно. Этот продукт именуется «вставкой». Вектор и вставка были сшиты вместе с использованием реакции сборки Гибсона для создания окончательного нацеленного вектора.

Гомологичная рекомбинация с Z-хромосомой с использованием нацеленного вектора и плазмид CRISPR

Возможность получения чистых колоний PGC из одной клетки позволяет идентифицировать положительные колонии, в которые был правильно вставлен HR, с использованием таких способов, как ПЦР и саузерн-блоттинг. Для трансфекции PGC использовали липофекцию с эффективностью трансфекции 5-10% (фиг. 10A) или электропорацию с эффективностью > 40%. Трансфекцию проводили двумя плазмидами, нацеленным вектором и одной из двух плазмид CRISPR, описанных выше (CRISPR1 или CRISPR3). После трансфекции клетки оставляли для восстановления на 24 часа и переносили в среду, содержащую G-418, для отбора. После двух недель отбора выжили только устойчивые к G-418 клетки, из них> 99% были GFP-положительными (фиг. 10B). Чтобы убедиться, что клетки сохраняют свою способность колонизировать гонады, их

инъецировали в эмбрионы-хозяева, как описано выше на фиг. 1F (фиг. 10C). Гонады подвергали иммуноокрашиванию антителом против GFP, и колонизацию GFP-положительных клеток PGC в гонадах проверяли с помощью конфокального микроскопа (фиг. 10D).

G-418-устойчивые, GFP-положительные клетки состоят из потенциально гетерогенной популяции. Таким образом, чтобы проверить интеграцию HR и получить чистую гомогенную популяцию, отдельные GFP-положительные клетки разделяли с помощью сортировки FACS на 96-луночном планшете (фиг. 11A). Выращивали чистые колонии и экстрагировали геномную ДНК для ПЦР и саузерн-блоттинга. Параллельно объединенные GFP-положительные клетки были отсортированы с помощью метода анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Для ПЦР-анализа были сконструированы два набора праймеров. Первый - прямой P7 перед 5'HA и обратный P8 от промотора CAGG (размер продукта 1,6 т.о.), а второй - прямой P9 от сайта полиаденилирования бета-глобина кролика и обратный P10 ниже 3'HA (1,8 длина продукта kb, фиг.11B). Как в объединенных клетках (фиг. 11C), так и в чистых колониях (фиг. 11D) были обнаружены ожидаемые продукты для 5 ’и 3’, что указывает на то, что в этих клетках произошла правильная интеграция HR.

Для дополнительной проверки правильности интеграции HR, а также для подтверждения того, что только одна копия вектора нацеливания была интегрирована в геном, был проведен саузерн-блот-анализ. Были проанализированы две клеточные линии PGC от мужских и женских доноров. Примечательно, что женская линия имеет только одну копию Z-хромосомы. Были сконструированы три ДНК-зонда, меченных дигоксигенином (меченных dig) (см. фиг. 12A и фиг. 12B). Первые два зонда, амплифицированные с использованием праймеров P11 - P12 и P13 - P14, длиной 500 п.н. каждый, расположены выше и ниже 5' и 3' HA, соответственно. Третий зонд, амплифицированный с использованием праймеров P15 - P16, длиной 704 п.н., предназначен для обнаружения гена Neo внутри нацеленного вектора, таким образом, зонд позволяет подтвердить, что была интегрирована только одна копия вектора. Фермент рестрикции BglII использовали для расщепления геномной ДНК для анализа. Два сайта рестрикции, расположенные на расстоянии ~ 6,5 т.о. друг от друга, расположены на хромосоме WT, выше и ниже 5' и 3' зондов, соответственно. Дополнительный сайт BglII расположен в векторе, давая спрогнозированные фрагменты размером 7,5 т.о. и 3,3 т.о. для идентификации правильной интеграции HR. Результаты саузерн-блоттинга геномной ДНК, выделенной из мужской линии PGCs, выявили 2 полосы спрогнозированного размера: 6,5 т.о. для аллеля WT и 7,5 т.о. и 3,3 т.о. для аллеля, который претерпел правильную интеграцию HR, для 5' и 3' сайта,

соответственно. Это было подтверждено как для ДНК из объединенных клеток, так и для чистых колоний (фиг. 12C). Аналогичный анализ был проведен для женской клеточной линии PGC. В этом случае была обнаружена одна полоса прогнозируемого размера 7,5 т.о. для 5' сайта интеграции. Поскольку женский геном включает только одну копию Z-хромосомы, аллель WT (6.5 т.о.) обнаружен не был. Зондирование гена Neo выявило единственную полосу с предсказанным размером 7,5 т.о., подтверждая, что только одна копия нацеливающего вектора была интегрирована в геном (фиг. 12D).

Валидация оптогенетической системы в клетках HEK293 in-vitro и в куриных эмбрионах in-ovo.

Для проверки активности индуцибельной системы in vitro и на куриных эмбрионах in-ovo три плазмиды: pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и репортер PB-RAGE-GFP трансфицировали в клетки HEK293 (фиг. 13) и куриным эмбрионам (фиг. 14). Первые две оптогенетические плазмиды кодируют репортерный ген mCherry, что подтверждает успешную трансфекцию. Экспрессирующий вектор PB-RAGE-GFP включает последовательность множественных стоп-кодонов, фланкированную сайтами LoxP выше кодирующей области GFP. После активации Cre стоп-кодоны удаляются, что позволяет экспрессировать GFP. При этом в клетках HEK293 отрицательного контроля, которые подвергали тройной трансфекции и хранили в темноте, не было GFP-положительных клеток (фиг. 13, верхний ряд). В клетках, которые подвергались облучению синим светом, через 24 часа после трансфекции многие клетки экспрессировали GFP (фиг. 13, нижний ряд), подтверждая активацию оптогенетической системы в этих клетках.

Для проверки активности оптогенетической системы in-ovo была проведена тройная трансфекция плазмидами pmCherry-Cry2-CreN, pmCherry-CIBN-CreC и PB-RAGE-GFP путем электропорации в нервные трубки куриного эмбриона на стадии 16 H&H. Через 12 часов после электропорации эмбрионы экспериментальной группы подвергались 15-секундному освещению синим светом, в то время как эмбрионы отрицательного контроля содержались в темноте. Эмбрионы инкубировали в течение дополнительных 12 часов и проверяли на экспрессию GFP с помощью флуоресцентного стереоскопа (фиг. 14). В то время как у эмбрионов, которые хранились в темноте (фиг. 14, верхний ряд), экспрессировалась только mCherry, что подтверждает успешную электропорацию, у эмбрионов экспериментальной группы были четко видны GFP-положительные клетки (фиг. 9, нижний ряд), что подтверждает что индуцируемый светом Cre был активирован.

Оптогенные плазмиды pmCherry-Cry2-CreN и pmCherry-CIBN-CreC управляют экспрессией генов с использованием промотора CMV, что неблагоприятно для куриных клеток. Чтобы преодолеть это и объединить два вектора в один вектор, был разработан

плазмидный вектор, который управляет экспрессией CIBN-CreC и Cry2-CreN, связанный саморасщепляющимся пептидом P2A, за которым следует IREG-GFP, под промотором CAGG, который очень активен в куриных клетках. Синтез pCAGG-CIBN-CreC-P2A-Cry2-CreN-IRES-GFP был основан на модификации исходных оптогенных плазмид, описанных в Kennedy et al., 2010 (Nat Methods. 2010 December; 7(12): 973–975). Каждая из этих плазмид кодирует mCherry, за которой следует последовательность IRES либо с CIBN-CreC (укороченная форма CIB1, слитая с C-концом фермента Cre), либо с CRY2-CreN (криптохром 2, слитый с N-концом фермента Cre. Фиг. 15A). Целью следующего клонирования было соединение двух оптогенов слияния с саморасщепляющимся пептидом P2A под промотором CAGG, за которым следует IRES-GFP. С этой целью плазмиду CIBN-CreC использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P40 и P41, а плазмиду CRY2-CreN использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами P42 и P43 (фиг. 15A). В частности, праймеры P41 и P42, которые содержат сайт расщепления P2A, имеют общую перекрывающуюся последовательность, которая позволяет двум продуктам слиться с помощью одноцикловой ПЦР с удлинением выступа (фиг. 15B). Этот продукт, содержащий CIBN-CreC-P2A-CRY2-CreN, был лигирован с челночным вектором pJet1.2, и его последовательности были проверены (фиг. 15C). Эта плазмида служила матрицей для ПЦР с праймерами P44 и P45, которые добавляли к продукту сайты рестрикции SmaI и NheI на 5'- и 3'-концах, соответственно (фиг. 15D). Этот продукт гидролизовали рестрикционными ферментами и лигировали с плазмидой pCAGG-IRES-GFP, которую также разрезали с использованием тех же ферментов (фиг. 15E). Лигированный продукт (называемый в данном документе pCAGG-Optogenes) включал промотор CAGG, за которым следовал CIBN-CreC, саморасщепляющийся пептид P2A, Cry2-CreN, IRES, GFP и сайт полиаденилирования бета-глобина кролика, и был проверен секвенированием (фиг. 15F).

Для проверки активности вектора pCAGG-Optogene in vitro плазмиду, которая экспрессирует GFP в качестве репортера успешной трансфекции, котрансфицировали в клетки HEK293 с помощью pB-RAGE-mCherry. Подобно вектору PB-RAGE-GFP, описанному выше (фиг. 13), pB-RAGE-mCherry включал последовательность множественных стоп-кодонов, фланкированную сайтами LoxP выше кодирующей области mCherry. После активации Cre стоп-кодоны удаляются, что позволяет экспрессировать mCherry (фиг. 16). В то время как в клетках HEK293, котрансфицированых и хранящихся в темноте, mCherry-положительные клетки отсутствовали (фиг. 16, верхний ряд). В отличие от клеток, подвергшихся воздействию синего света, многие клетки экспрессировали mCherry (фиг. 16, нижний ряд), подтверждая, что одновекторная стратегия pCAGG-Optogenes сохраняет оптогенетические свойства системы.

Для проверки активности вектора pCAGG-Optogenes в живых куриных эмбрионах in-ovo плазмиду котрансфицировали путем электропорации куриным эмбрионам стадии 14-16 H&H вместе с pB-RAGE-mCherry. Через двенадцать часов после электропорации яйца группы отрицательного контроля хранили в темноте, в то время как эмбрионы экспериментальной группы подвергались воздействию синего света в течение 15 секунд (фиг. 17). Обе группы дополнительно инкубировали в течение 12 ч и исследовали под флуоресцентным стереоскопом. После инкубации обе группы показали высокий уровень экспрессии GFP, что указывает на успешную электропорацию. Однако только в группе, подвергшейся воздействию света (фиг. 17, нижний ряд), были идентифицированы mCherry-положительные экспрессирующие клетки, что указывает на то, что оптогенетическая система, использующая одновекторную стратегию pCAGG-Optogenes, была активирована на светоиндуцируемым способом.

Индукция летальности куриных эмбрионов

Чтобы продемонстрировать возможность вызова смертности с помощью токсина, кодирующую область DTA12, обычно используемую в качестве маркера отрицательной селекции, клонировали в экспрессирующий вектор, содержащий промотор pGK, за которым следует IRES GFP (pGK-IRES-GFP). Эта плазмида также служила отрицательным контролем. Кодирующая область DTA была клонирована выше последовательности IRES, давая начало pGK-DTA-IRES-GFP, которая при экспрессии в клетках ингибирует синтез белка, что приводит к гибели клеток.

Чтобы проверить эффекты экспрессии DTA в куриных эмбрионах, эмбрионы стадии 14-16 H&H подвергали электропорации либо с pGK-IRES-GFP, в качестве отрицательного контроля, либо с вектором pGK-DTA-IRES-GFP. Через двенадцать часов после электропорации эмбрионы анализировали на экспрессию GFP под флуоресцентным микроскопом (фиг. 18). В то время как в контрольных эмбрионах GFP широко экспрессировался в нервной трубке (фиг. 18), в эмбрионах, экспрессирующих DTA, экспрессия GFP не обнаруживалась, что указывает на то, что синтез белка в этих клетках блокирован.

ПРИМЕР 2

Целью описанных в данном документе экспериментов было введение кассеты, вызывающей летальность, в Z-хромосому PGCs мужского или женского происхождения. Конечной целью было получить кур с геномной вставкой в Z-хромосоме. Эта хромосома будет сегрегироваться только в мужские эмбрионы следующего поколения, которые при индукции синим светом активируют кассету, вызывающую летальность, таким образом, мужские эмбрионы погибнут на ранних стадиях эмбриогенеза.

Нацеленный вектор (англ. targeting vector, TV) кассеты AKA имеет 3 элемента, как описано в данном документе. Первый элемент - это «плечи для гомологичного спаривания». Второй элемент - это «оптогенетический индуцибельный элемент». Третий элемент - это «кассета, индуцирующая летальность». В одном воплощении два плеча для гомологичного спаривания размером ~ 1,5 т.о. расположены как на 5'-конце, так и на 3' конце TV. Это сделано так для того, чтобы направить гомологичную рекомбинацию (HR) ниже локуса HINT1Z, расположенного на Z-хромосоме. Этот сайт для HR был выбран из-за того, что ген HINT1Z транскрибируется в PGC, а также в целых бластодермах (это только что отложенные куриные эмбрионы). Все другие открыто транскрибируемые области Z-хромосомы также являются потенциально хорошими кандидатами для этой цели.

На фиг. 20 показана ОТ-ПЦР с использованием праймера FWD (SEQ ID NO: 88) и праймера REV (SEQ ID NO: 89) на кДНК из PGC и целых бластодерм. Прогнозируемый размер продукта 153 т.о.

Второй элемент - это «оптогенетический индуцибельный элемент». В одном воплощении оптогенетические системы основаны на белках, которые при определенных длинах волн света возбуждаются и изменяют конформацию, что позволяет им димеризоваться. Эти белки можно объединить с дополнительными белками, так что транскрипция целевого гена будет происходить только тогда, когда два оптогенетических белка димеризуются. Например, если первый белок объединен с доменом направленного воздействия на ДНК, таким как Gal4-BD (связывающий домен Gal4), а второй белок объединен с активатором транскрипции, таким как Gal4-AD (домен активации Gal4), возможно активировать нижестоящие гены. Точно так же домен репрессии можно использовать для репрессии генной экспрессии. Однако проблема с оптогенами заключается в том, что они обладают определенной базальной димеризацией и, следовательно, активацией генов, которая происходит независимо от световой индукции. Поиск правильного баланса между чувствительностью к индукции и базальной димеризацией является ключом к их использованию. Была использована модифицированная версия системы, разработанная Kennedy, M. J. et al. (Rapid blue-light mediated induction of protein interactions in living cells. Nat. Methods 7, 973–975, 2010). Исходными оптогенными плазмидами являются pmCherry-Cry2-CreN и pmCherry-CIBN-CreC, которые управляют экспрессией генов с использованием промотора CMV, что неблагоприятно для куриных клеток. Чтобы преодолеть это и объединить два вектора в один вектор, был разработан плазмидный вектор, использующий промотор CAGG, который очень активен в куриных клетках, для управления экспрессией CIBN-CreC и Cry2-CreN, которые связаны с последовательностью IRES, за которой следует IREG-GFP. Синтез pCAGG-CIBN-CreC-

IRES-Cry2-CreN-IRES-GFP был основан на модификации исходных плазмид с оптогенами, описанных в Kennedy et al., 2010 (Nat Methods. 2010, 7(12): 973–975). Целью клонирования было соединение двух гибридных оптогенов с IRES под промотором CAGG, за которым следует IRES-GFP. Конструирование аналогичной плазмиды, в которой порядок оптогенов, а именно Cry2-CreN, за которым следует CIBN-CreC, также было успешно выполнено и дало аналогичные результаты. Фиг. 21 показывает схематическое изображение описанных выше плазмид.

Для проверки активности вектора pCAGG-Optogene in vitro, плазмиду, которая экспрессирует GFP в качестве репортера для успешной трансфекции, котрансфицировали в клетки HEK293 с репортерной плазмидой pB-RAGE-mCherry. Эта плазмида включает элемент Lox-STOP-Lox (LSL, RAGE) между промотором pCAGG и репортерным геном mCherry. Таким образом, при котрансфекции с плазмидой с оптогеном при освещении синим светом и активации Cre, LSL удаляется и экспрессируется mCherry. В темноте, когда система неактивна, экспрессируется только репортерный GFP из плазмиды с оптогеном, как показано на фиг. 22.

Для проверки активности оптогенетической системы у живых куриных эмбрионов in-ovo оптогенетическую плазмиду и репортерную плазмиду pB-RAGE-mCherry совместно электропорировали в нервную трубку куриных эмбрионов, инкубированных в течение 56-60 часов. Смесь плазмидной ДНК инъецировали в просвет нервной трубки с помощью заостренной микропипетки и проводили электропорацию с использованием 2 вольфрамовых электродов, расположенных на расстоянии 3-5 мм друг от друга (Electroporator BTX830). Четыре импульса 30 В, 45 мс каждый, подавались с интервалом 745 мсек между каждым импульсом. После электропорации яйца закрывали и инкубировали в течение 12-18 часов. Затем, в то время как яйца в контрольной группе хранились в темноте, яйца в экспериментальной группе подвергались 1 мин. освещению синим светом через яичную скорлупу. Обе группы были помещены обратно в инкубатор еще на 12-18 часов перед анализом.

Как показано на фиг. 23, во всех экспериментальных группах репортер GFP был высоко и повсеместно экспрессирован во всех эмбрионах, что указывает на успешную электропорацию и экспрессию плазмид. В яйцах, которые хранились в темноте, не было экспрессии mCherry. Напротив, mCherry экспрессировалась в нервной трубке яиц, освещенных синим светом.

Улучшенная система CIBN-Cry2 может быть создана путем модификации Cry2. Эта модификация включает вставку мутации L348F в усеченный ген Cry2, который включает только первые 535 аминокислот - Cry2-Δ535-L348F, как опубликовано в Nature Chemical

Biology volume12, pages 425–430 (2016).

В качестве альтернативного подхода к оптогенетической системе CIBN-Cry2 для достижения тех же целей может использоваться другая концептуально аналогичная система. Эта система основана на системе MAGNET, в которой два оптогенетических белка - положительно заряженный P-Mag и отрицательно заряженный N-Mag димеризуются при освещении синим светом. Каждый из этих белков объединяются с неактивной частью фермента рекомбиназы Cre, и после димеризации двух оптогенов создается активная форма Cre (Nature Chemical Biology volume12, 1059–1064 2016).

Третий элемент - это «кассета, индуцирующая летальность». В одном воплощении кассета, индуцирующая летальность, включает ген (например, токсин), который вызывает раннюю гибель эмбриона посредством гибели клеток или серьезного вмешательства в молекулярный сигнальный путь, который требуется на ранних стадиях эмбриогенеза (например, BMP4). Например, это может быть достигнуто путем индукции запрограммированной гибели клеток (апоптоза) с помощью токсинов, таких как дифтерийный токсин A (DTA), путем экспрессии генов каспазы, таких как каспаза 3 или мутированной конститутивно-активной мутированной формы каспазы 3, или путем экспрессии белка-ингибитора BMP4 - Noggin. Нуклеотидная последовательность DTA представлена в SEQ ID NO: 92. Аминокислотная последовательность DTA представлена в SEQ ID NO: 93.

В одном воплощении нуклеотидная последовательность CDS Chicken Casp3 (WT) представлена в SEQ ID NO: 94. Аминокислотная последовательность CDS куриного Casp3 (WT) представлена в SEQ ID NO: 95.

В одном воплощении нуклеотидная последовательность для конститутивно активной (мутированной) формы Chicken Casp3 представлена в SEQ ID NO: 96. Аминокислотная последовательность конститутивно активной (мутированной) формы белка Chicken Casp3 представлена в SEQ ID NO: 97.

В одном воплощении нуклеотидная последовательность Noggin представлена в SEQ ID NO: 98. Аминокислотная последовательность Noggin представлена в SEQ ID NO: 99.

В некоторых воплощениях «кассета, индуцирующая летальность» основана на гене, который нарушает важный сигнальный путь. Чем раньше наступит смерть, тем раньше умрет эмбрион. В некоторых воплощениях основной сигнальный путь включает костный морфогенетический белок (BMP). В некоторых воплощениях BMP представляет собой BMP4. В некоторых воплощениях белок, способствующий летальности, является антагонистом BMP4. В некоторых воплощениях антагонист BMP4 представляет собой Noggin. В некоторых воплощениях экспрессия белка Noggin, способствующего летальности,

индуцируется на стадии развития, на которой путь BMP активен и необходим. В некоторых воплощениях путь BMP активен или индуцируется во время бластуляции, гаструляции, нейруляции или органогенеза. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется вскоре после откладки яиц (стадии X-XIII EG&K). В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется для индукции белка, способствующего летальности, на Стадии X. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется на Стадии XI. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется на стадии XII. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется на стадии XIII. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется в любой момент времени во время эмбрионального развития, начиная с оплодотворения и до вылупления. В некоторых воплощениях летальность индуцируется в течение 21-дневного периода от оплодотворения до вылупления. В некоторых воплощениях летальность наступает через 1 день после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 2 дня после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 3 дня после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 4 дня после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 5 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 6 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 7 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 8 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 9 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 10 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 11 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 12 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 13 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 14 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 15 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 16 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 17 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 18 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 19 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 20 дней после оплодотворения. В некоторых воплощениях летальность наступает через 21 день после оплодотворения. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после 30 часов инкубации. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после 31 часа

инкубации. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после до 32 часов инкубации. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после до 33 часов инкубации. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после до 34 часов инкубации. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после до 35 часов инкубации. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется во время развития куриного эмбриона после 36 часов инкубации. В некоторых воплощениях внутри птицы активируется оптогенетическая система. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется до образования яичной скорлупы, окружающей эмбрион. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется внутри птицы до образования яичной скорлупы, окружающей эмбрион. В некоторых воплощениях оптогенетическая система активируется путем прямого контакта эмбриона с индуктором. В некоторых воплощениях индуктор вставлен в яйцо. В некоторых воплощениях яичная скорлупа сначала открывается, по меньшей мере, частично, а затем индуктор вводится непосредственно в эмбрион.

Для подтверждения индукции клеточной гибели в куриных клетках DTA и две формы каспазы 3 были клонированы в экспрессирующих векторах с промоторами PGK (фосфоглицератокиназа) или CAGG, за которыми следуют IRES GFP, которые служат для подтверждения эффективности трансфекции. Промотор PGK слабее и медленнее, чем pCAGG в куриных эмбриональных клетках.

В одном воплощении созданными векторами были: PGK-DTA-IRES-GFP, pCAGG-DTA-IRES-GFP, PGK-CASP3-IRES-GFP, pCAGG-CASP3-IRES-GFP, PGK-mCASP3-IRES-GFP, pCAGG -mCASP3-IRES-GFP. Экспрессирующие векторы без генов, вызывающих летальность, использовали в качестве контролей (PGK-IRES-GFP и pCAGG-IRES-GFP).

Экспрессирующие векторы трансфицировали в PGC посредством электропорации, и клетки инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов перед анализом с использованием проточной цитометрии, которая выявляла положительно экспрессирующие клетки с помощью зеленого флуоресцентного белка (GFP) и мертвые клетки, которые были идентифицированы с использованием окрашивания пропидиум йодидом (PI). Нуклеотидная последовательность, кодирующая GFP, представлена в SEQ ID NO: 115.

Результаты, представленные на фиг. 24A-24B, демонстрируют долю мертвых клеток от общего числа GFP-положительных клеток.

В одном воплощении был сконструирован нацеленный вектор, объединяющий описанные выше три элемента в одну активную единицу, которая может быть интегрирована

в Z-хромосому. Как показано на фиг. 25, блок обрамлен 5’- и 3’-плечами для гомологичного спаривания. Промотор (pCAGG) управляет экспрессией двух единиц оптогенетической системы, разделенных последовательностью IRES. За оптогенетической системой следует последовательность полиаденилирования (PA). Кассета оптогенов фланкирована двумя сайтами LoxP. Оптогенетическая система может быть основана на CIBN-Cry2, MAGNET или любой другой системе, как описано выше. За вторым сайтом LoxP следует кодирующая последовательность, индуцирующая летальность, за которой следует вторая последовательность полиаденилирования. Поскольку эта вызывающая летальность кодирующая последовательность не имеет промотора, она неактивна до тех пор, пока не будет применено освещение синим светом, которое приводит к димеризации оптогенов и активации фермента Cre, который удаляет кассету оптогенов, фланкированную между сайтами LoxP. Это вырезание приводит к размещению последовательности, кодирующей летальность, непосредственно ниже промотора pCAGG, который управляет его экспрессией. Эта стратегия выигрывает от того, что основана на более короткой конструкции, поскольку она включает единственный промотор и не требует последовательности «STOP».

В одном воплощении нуклеотидная последовательность промотора pCAGG представлена в SEQ ID NO: 100. Нуклеотидная последовательность промотора pGK представлена в SEQ ID NO: 109. Нуклеотидная последовательность промотора pCMV представлена в SEQ ID NO: 110. Нуклеотидная последовательность промотора phSyn представлена в SEQ ID NO: 111. Нуклеотидная последовательность промотора pEF1-a представлена в SEQ ID NO: 112.

В одном воплощении нуклеотидная последовательность для Оптогена 1 - NLS-Cry2-Δ535-L348F-CreN (ак 19-104) представлена в SEQ ID NO: 101. Нуклеотидная последовательность для Оптогена 2 - CIBN (ак 1-170)-NLS-Cre-C (ак 106-343) представлена в SEQ ID NO: 102. Нуклеотидная последовательность Cre-рекомбиназы представлена в SEQ ID NO: 113. Нуклеотидная последовательность CreN (ак 19-104) представлена в SEQ ID NO: 117. Нуклеотидная последовательность CreC (ак 106-343) представлена в SEQ ID NO: 118.

В одном воплощении нуклеотидная последовательность для последовательности IRES представлена в SEQ ID NO: 103. Нуклеотидная последовательность для последовательности сайта полиаденилирования (бета-глобин кролика) представлена в SEQ ID NO: 104. Нуклеотидная последовательность для 5’-плеча для гомологичного спаривания (LHA) представлена в SEQ ID NO: 105. Нуклеотидная последовательность для 3’-плеча для гомологичного спаривания (RHA) представлена в SEQ ID NO: 106.

В одном воплощении, что касается системы MAGNET, следующие последовательности являются альтернативными оптогенами, которые можно использовать

вместо системы Cry2-CIBN. Например, нуклеотидная последовательность CreN (ак 18-59) _N-Mag_NLS представлена в SEQ ID NO: 107. Нуклеотидная последовательность NLS_P-Mag_Cre-C (ак 60-237) представлена в SEQ ID NO: 108.

В одном воплощении трансплантацию модифицированных PGC эмбрионам и получение химерных цыплят, которые будут проверены на передачу зародышевой линии, и потенциальных носителей-основателей, проводили следующим образом. После создания нацеленного вектора, линии PGC, которые произошли как от женских, так и от мужских эмбрионов, подверглись совместной электропорации плазмидой, кодирующей px330-all-in-one CRISPR-Cas9-GFP, и нацеленным вектором. Плазмида CRISPR создает двухцепочечный разрыв ДНК в спроектированном сайте хромосомы Z, тем самым облегчая гомологичную рекомбинацию вектора нацеливания. Плазмида CRISPR кодирует Cas9, объединенный в рамке считывания с GFP, что позволяет идентифицировать успешную трансфекцию. Через 24-72 часа после трансфекции положительные единичные клетки сортировали с помощью FACS на отдельные клетки в 96-луночном планшете и выращивали с образованием чистых колоний PGC, которые подвергали скринингу с помощью ПЦР и саузерн-блоттинга для идентификации колоний, которые подверглись надлежащей гомологичной рекомбинации.

Химерных цыплят получали следующим образом. Химерные цыплята являются средством преобразования генетически модифицированных PGC в функциональные гаметы. Для создания химер эмбрионам стадии 14-16 по H&H инъецировали PGC в кровоток (например, в сердце) в количестве > 3000 (обычно до 8000-100000). Эти клетки колонизировали эмбриональные гонады вместе с эндогенными PGC, поэтому их называют химерами. Эффективность передачи зародышевой линии, то есть способность трансформации генетически модифицированных PGC в функциональные PGC, зависит от нескольких факторов, включая соотношение между эндогенными и инъецированными PGC в гонаде. Чтобы уменьшить количество эндогенных PGC, свежеснесенные оплодотворенные яйца подвергают γ-облучению в дозе 600-800 рад. В некоторых воплощениях облучение включает облучение излучением 600-800 рад. В некоторых воплощениях облучение включает облучение излучением 400-1000 рад. В определенных воплощениях облучение включает облучение излучением 200-1200 рад.

Считается, что PGC более восприимчивы к γ-облучению, чем соматические клетки, или что после облучения PGCs менее компетентны к регенерации, чем соматические клетки. Таким образом, после облучения общее количество эндогенных PGC уменьшается. После облучения яйца обычно инкубировали до тех пор, пока эмбрионы не достигли стадии 14-16 по H&H, которая является адекватной для инъекции PGC. В качестве показателя эффективности облучения время инкубации, необходимое эмбрионам для достижения

стадий 14-16 по H&H, увеличивается примерно на 10 часов, и до 70% облученных эмбрионов не развиваются нормально и, таким образом, не используются для инъекции PGC. В зависимости от различных линий курицы, типа яичной скорлупы, ее толщины и цвета могут потребоваться разные условия облучения, и, таким образом, количество энергии требует калибровки. После инъекции яйца герметично закрывали и инкубировали до тех пор, пока не вылупятся химерные птенцы. Затем цыплят выращивали до половой зрелости, а у самцов собирали сперму для анализа передачи зародышевой линии с помощью полуколичественной ПЦР или ПЦР в реальном времени.

ПРИМЕР 3

В данном примере представлены векторы направленного воздействия, содержащие дополнительный элемент, который называется в данном документе элементом «безопасной блокировки». Этот элемент в основном блокирует оптогенно-летальную систему, поэтому по умолчанию система неактивна. Только при скрещивании с линией «разблокирования» оптогенно-летальная система могла бы активироваться. Этот элемент приносит пользу всей системе, лучше защищая породы, поскольку для активации необходимо использовать дополнительную «разблокирующую» линию. Это также гарантирует, что на протяжении всего производственного процесса клетки, подвергшиеся HR, не нуждаются в защите от света, поскольку оптогенная система по существу неактивна.

Настоящий пример раскрывает восемь векторов направленного воздействия «все-в-одном» и демонстрирует как in vitro, так и in vivo, что они работают так, как задумано. Данные также показывают, что оптогенная система MAGNET работает на куриных эмбрионах и способна активировать механизм, индуцирующий летальность. Система MAGNET описана выше. Более того, данные показывают, что Noggin, как ген, вызывающий эмбриональную летальность, останавливает эмбриональное развитие сразу после кладки яиц (в только что отложенных яйцах).

Раскрытые в данном документе восемь векторов направленного воздействия охватывают 8 комбинаторных вариантов 2 оптогенных систем (MAGNET и CIBN-Cry2) и 4 генов, индуцирующих летальность (DTA, Noggin, caCASP3 и mCherry, которые используются для процесса контроля и проверки). Нужно понимать, что mCherry как таковой не вызывает летального исхода и использовался для подтверждения действия других элементов.

Как обсуждалось выше, целью описанных в данном документе экспериментов является введение кассеты, вызывающей летальность, в Z-хромосому PGC мужского или женского происхождения. Конечная цель - получить кур с геномной вставкой на Z-хромосоме. Эта хромосома будет сегрегироваться только в мужские эмбрионы следующего

поколения, которые при индукции синим светом активируют кассету, вызывающую летальность, таким образом, мужские эмбрионы погибнут на ранних стадиях эмбриогенеза. Следовательно, из-за сегрегации половых хромосом самка-несушка не приобретает модифицированный генетический материал, так как она получает Z-хромосому дикого типа со стороны петуха-самца и W-хромосому дикого типа со стороны матери (см. фиг. 1). В этом примере векторы направленного воздействия содержат 4 элемента, как описано ниже (см. Примеры на фиг. 26).

Как показано на фиг. 26, первый элемент - это «плечи для гомологичного спаривания ». В одном воплощении два плеча для гомологичного спаривания размером ~ 1,5 т.о. расположены как на 5', так и на 3' концах вектора. Это разработано так для того, чтобы направить гомологичную рекомбинацию (HR) ниже локуса HINT1Z, расположенного на Z-хромосоме. Этот сайт для HR был выбран из-за того, что ген HINT1Z транскрибируется в PGC, а также в целых бластодермах (это только что отложенные куриные эмбрионы). Все другие открыто транскрибируемые области Z-хромосомы также являются потенциально хорошими кандидатами для этой цели.

Второй элемент - это механизм «блокировки», который гарантирует, что механизм оптогенной летальности неактивен до тех пор, пока кассета STOP не будет удалена. Кассета STOP фланкирована двумя сайтами FRT и расположена между промотором pCAGG и оптогенами, тем самым предотвращая экспрессию оптогенов. При скрещивании с линией, экспрессирующей Flp, как описано ниже, элемент STOP удаляется, позволяя оптогенам транскрибироваться и становиться активными светозависимым образом (фиг. 26A — активное «разблокированное» состояние). В этом примере элемент «безопасной блокировки» включает кодирующие последовательности для GFP, за которыми следует сайт полиаденилирования. Любые другие последовательности, которые будут препятствовать транскрипции нижестоящих элементов, также могут использоваться в качестве элемента «блокировки».

Третий элемент - это «оптогенетический индуцибельный элемент». Как обсуждалось выше, оптогенетические системы основаны на белках, которые при определенных длинах волн света будут возбуждаться и менять конформацию для димеризации со вторым специфическим белком. Примеры оптогенетических систем обсуждались выше.

В этом примере были протестированы и использованы две альтернативные оптогенные системы. Первая, система MAGNET, в которой два оптогенетических белка - положительно заряженный P-Mag и отрицательно заряженный N-Mag димеризуются при освещении синим светом. Последовательности, кодирующие сайт-специфический фермент рекомбиназы Mag, перечислены в SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 65. Каждый из этих белков

сливается с неактивной частью фермента рекомбиназы Cre, и при димеризации двух оптогенов создается активная форма Cre (см., например, Nature Chemical Biology volume12, 1059–1064 2016). В этом случае последовательности для самоотщепляющегося пептида P2A («Link» на фиг. 26) расположены между двумя оптогенами.

Вторая использованная оптогенная система - это улучшенная система CIBN (CreC)-Cry2 (CreN). В этом случае модификация включает вставку мутации L348F в усеченный ген Cry2, который включает только первые 535 аминокислот - Cry2-Δ535-L348F (см. Nature Chemical Biology 25 volume12, pages425–430 (2016). В одном воплощении линкер между двумя оптогенами представляет собой последовательность IRES («Link» на фиг. 26).

Четвертый элемент - это «кассета, индуцирующая летальность». В одном воплощении кассета, вызывающая летальность, включает ген, который способствует ранней гибели эмбриона посредством гибели клеток или серьезного вмешательства в молекулярный сигнальный путь, необходимый для ранних стадий эмбриогенеза, такой как BMP4. Как обсуждалось выше, примеры генов, вызывающих летальность, включают, без ограничения указанным, токсины, такие как дифтерийный токсин A (DTA), гены каспазы, такие как каспаза 3, или мутированная конститутивно-активная мутированная форма каспазы 3, или белок-ингибитор BMP4 - Noggin.

В таблице ниже перечислены характеристики этих восьми векторов направленного воздействия. В одном воплощении эти векторы были клонированы в плазмиду челночного вектора pJet1.2.

Вектор направленного воздействия	Оптогенная система	Линкер оптогенов	Ген летальности	SEQ ID NO.
TV1	Отрицательный MAGNET - Положительный MAGNET	P2A	Noggin	120
TV2	Отрицательный MAGNET - Положительный MAGNET	P2A	DTA	121
TV3	Отрицательный MAGNET - Положительный MAGNET	P2A	caCASP3	122
TV4	Отрицательный MAGNET - Положительный MAGNET	P2A	mCherry	123
TV5	[CIBN-CreC] - [Cry2-Δ535-L348F-CreN]	IRES	Noggin	124
TV6	[CIBN-CreC] - [Cry2-Δ535-L348F-CreN]	IRES	DTA	125
TV7	[CIBN-CreC] - [Cry2-Δ535-L348F-CreN]	IRES	caCASP3	126
TV8	[CIBN-CreC] - [Cry2-Δ535-L348F-CreN]	IRES	mCherry	127

Активность элементов в векторах направленного воздействия (TV) оценивали in vitro в клетках HEK293 (фиг. 27) и in-ovo в куриных эмбрионах (фиг. 28-29). Для проверки in vitro клетки HEK293 трансфицировали только TV4 (фиг. 27A), плазмидами pCAGG-Cre (SEQ ID NO: 128) (фиг. 27B) или pCAGG-FlpO (SEQ ID NO: 129). Последнее осуществляли в рамках двух обработок: одни держали в темноте (фиг. 27C), а другие подвергали воздействию синего света в течение 15 секунд через 24 часа после трансфекции. После освещения клетки дополнительно инкубировали в течение 24 часов (фиг. 27D).

При экспрессии отдельно, TV4, как и все другие TV, экспрессирует GFP, что указывает на активность состояния «безопасной блокировки» (фиг. 27A). При коэкспрессии с плазмидой pCAGG-Cre, кассеты «безопасной блокировки» и оптогены полностью удаляются (фиг. 26B; фиг. 27B), на что указывает потеря экспрессии GFP и начало экспрессии mCherry (в качестве суррогата гена, индуцирующего летальность). Этот результат подтверждает, что после удаления элементов «безопасной блокировки» и элемента оптогенов, индуцирующий летальность элемент становится активным. Когда TV4 коэкспрессировался с плазмидой pCAGG-FlpO, удалялся только элемент «блокировки», на что указывает потеря экспрессии GFP (фиг. 26A, фиг. 27C-D), и оптогенная система стала активной в зависимости от света. Когда клетки держали в темноте, не было активации оптогенной системы и экспрессии mCherry, что указывает на то, что кассета летальности не экспрессируется (фиг. 27C). Однако в тех же условиях, когда клетки освещаются, оптогенная система становилась активной и вырезалась (см. фиг. 26A), чтобы позволить экспрессироваться элементу летальности. На это указывает экспрессия mCherry, как показано на фиг. 27D.

Чтобы продемонстрировать активность элементов TV in vivo, куриным эмбрионам в нервную трубку инъецировали плазмиды и проводили электропорацию, как описано выше. На фиг. 28 белые линии обозначают дорсальную среднюю линию нервной трубки и зачатков конечностей для ориентации. Были протестированы четыре группы обработки: 1. экспрессия только TV4 (фиг. 28A), 2. совместная электропорация плазмид TV4 и pCAGG-Cre в качестве положительного контроля (фиг. 28B), 3. Совместная электропорация плазмид TV4 и pCAGG-FlpO, с содержанием в темноте (фиг. 28C), и 4. Воздействие синего света в течение 15 секунд после совместной электропорации плазмид TV4 и pCAGG-FlpO и дальнейшей инкубации в течение 12 часов (фиг. 28D).

При электропорации только TV4 экспрессируемый GFP указывает на неактивное состояние «блокировки», и mCherry не экспрессировался (фиг. 28A). При совместной экспрессии с плазмидой pCAGG-Cre кассеты «безопасной блокировки» и оптогены удаляются (фиг. 26B; фиг. 28B), таким образом, отсутствовала экспрессия GFP, но

экспрессировалась mCherry. Это служит положительным контролем для активации элементов, индуцирующих летальность. При совместной экспрессии TV4 с плазмидой pCAGG-FlpO удаляется только FRT-фланкированный элемент «блокировки», поэтому экспрессия GFP отсутствует (фиг. 28C-28D), но оптогенная система активировалась светозависимым образом. Экспрессия GFP отсутствовала, когда клетки хранили в темноте, что указывает на то, что оптогенная система была в активном состоянии, но mCherry не экспрессировался, т.е. кассета летальности была неактивной (фиг. 28C). Однако, когда эмбрионы освещали через 12 часов после электропорации, оптогенная система становилась активной и вырезалась, чтобы дать возможность экспрессироваться элементу летальности. На это указывает экспрессия mCherry, как показано на фиг. 28D.

Чтобы продемонстрировать активность гена Noggin, индуцирующего летальность светозависимым образом, TV1, который включает кодирующую последовательность Noggin в качестве элемента, вызывающего летальность, был подвергнут совместной электропорации с плазмидой pCAGG-FlpO в ростральную нервную трубку (на аксиальном уровне среднего и заднего мозга) куриных эмбрионов, инкубированных в течение 36 часов. На этой стадии клетки нервного валика отслаиваются от дорсальной нервной трубки BMP4-зависимым образом. Таким образом, прогнозируется, что ингибирование сигнального пути BMP4 эктопической экспрессией Noggin в дорсальной нервной трубке ингибирует расслоение клеток нервного гребня. Для визуализации клеток нервного гребня использовали антитела против HNK-1 для окрашивания маркера нервного гребня HNK-1.

На фиг. 29 показаны эмбрионы, в которые в нервную трубку электропорировали плазмиды TV1 (SEQ ID NO: 120), pCAGG-FlpO (SEQ ID NO: 129) и pCAGG-IRES-GFP (SEQ ID NO: 59). Последний добавляли в качестве положительного контроля, чтобы можно было контролировать трансфицированные клетки. Через двадцать четыре часа после трансфекции у эмбрионов, которые находились в темноте на протяжении всего эксперимента (фиг. 29A, верхний ряд, вид сверху, нижний ряд, вид справа сбоку), клетки нервного валика отслаивались и нормально мигрировали из дорсальной нервной трубки. Окрашивание по HNK-1 выявило паттерн экспрессии двухсторонней симметрии в спинной трубке как на правой, так и на левой нервных складках (самая задняя сторона нервной трубки, которая дает начало мигрирующим клеткам нервного валика), а также в мигрирующих клетках нервного валика (фиг. 29A, стрелка). Однако у эмбрионов, подвергшихся воздействию света через 12 часов после электропорации, клетки нервного валика не смогли отслоиться и мигрировать из трубки, а окрашивание по HNK-1 показало заметное снижение экспрессии в правой нервной складке - на стороне электропорации (фиг. 29B, стрелка). Таким образом, эти результаты показывают, что после удаления элемента «безопасной блокировки» из TV1,

экспрессия и активность Noggin регулируются оптогенной системой MAGNET светозависимым образом.

Чтобы продемонстрировать, что Noggin способен останавливать эмбриональное развитие, как только яйцо откладывается, на эмбриональной стадии бластодермы, бластодермы обрабатывали экзогенным источником Noggin in-ovo (фиг. 30). С этой целью плазмиды pCAGG-Noggin-IRES-GFP (SEQ ID NO: 130) или в качестве отрицательного контроля плазмиды pCAGG-IRES-GFP (SEQ ID NO: 59) трансфицировали в клетки HEK293. Для подтверждения экспрессии Noggin в трансфицированных клетках общий белок, экстрагированный из трансфицированных клеток, анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителом против Noggin (Abcam, ab16054, предполагаемый размер ~ 24 кДа) и антителом против α-тубилина-HRP (Abcam, ab40742, прогнозируемый размер ~ 55 кДа) в качестве контроля загрузки. Фиг. 30A показано, что хотя экспрессия Noggin отсутствовала в клетках, трансфицированных отрицательным контролем (CON), клетки, трансфицированные pCAGG-Noggin-IRES-GFP (NOG), продуцировали noggin. Предварительно окрашенный набор маркерных белков представлен в левой полосе (Thermo Scientific, PageRuler # 26617). Кондиционированную среду из контроля и клеток, экспрессирующих Noggin, инъецировали в свежеотложенные фертильные яйца, которые затем инкубировали в течение 24 или 54 часов, как показано на фиг. 30B-C и фиг. 30D-E, соответственно. Фиг. 30B-C показаны трехмерные модели обработанных эмбрионов с помощью эпископической микроскопии высокого разрешения (HREM). В то время как эмбрионы, использующиеся в качестве контроля (фиг. 30B), продолжали нормально развиваться и подвергались нормальной гаструляции, на что указывает образование первичной полосы (обозначено стрелками), эмбрионы, обработанные Noggin, не имели гаструляции и не имели очевидной первичной полоски, что указывает на то, что процесс эмбриогенеза практически остановился (фиг. 30C). Когда эмбрионы оставляли для дальнейшего развития в течение 54 часов инкубации (фиг. 30D-E), эмбрионы, использующиеся в качестве контроля, развивались нормально, подвергались нормальному процессу нейруляции и формировали бьющееся сердце (фиг. 30D), тогда как эмбрионы, обработанные Noggin, образовывали массу клеток без явных характеристик (фиг. 30E, стрелка).

В совокупности описанные выше результаты показывают, что стратегия молекулярного механизма действия, представленная на фиг. 26 работает, как и предполагалось, включая элементы «безопасной блокировки» и оптогенную систему MAGNET, которая активирует элемент, индуцирующий летальность, светозависимым способом. Кроме того, ингибирование сигнального пути BMP путем обработки бластодермы в свежеснесенных яйцах с помощью Noggin остановило прогрессирование эмбрионального

развития.

СОЗДАНИЕ ЧИСТЫХ ЛИНИЙ PGC, СОХРАНЯЮЩИХ ИНТЕГРИРОВАННЫЙ НАЦЕЛЕННЫЙ ВЕКТОР В Z-ХРОМОСОМЕ

В одном воплощении для создания PGC с целевой интеграцией в Z-хромосому использовали систему рибонуклеопротеидов (RNP) для доставки CRISPR/Cas9. Использование системы RNP дает преимущества, среди прочего, благодаря высокой эффективности, быстрому расщеплению ДНК и быстрой очистки комплексов RNP от трансфицированных клеток. Комплексы RNP состоят из рекомбинантных нуклеаз Cas9 или высокоточных Cas9 и смеси комплексов crRNA: tracrRNA. TracrRNA коммерчески доступны (IDT), а crRNA может быть изготовлена по индивидуальному заказу со специфической 20 нуклеотидной последовательностью, соответствующей искомому сайту расщепления на целевой геномной ДНК. В одном воплощении SEQ ID 66 и SEQ ID 68, раскрытые в данном документе, были использованы для синтеза двух олигонуклеотидов crRNA (см. фиг. 8).

Культуральная среда PGC и получение линий были описаны выше. Для электропорации PGC 5×10^5 клеток промывали в AkoDMEM, затем переносили в буфер «R» (буфер Neon, Invitrogen), содержащий 0,7 мкг плазмиды нацеленного вектора (в данном примере TV1), 1 мкМ усилителя электропорации Alt-R® cas9 (IDT) и комплексы RNP с конечной концентрацией 1,5 мкМ рекомбинантных нуклеазы Cas9 или высокоточной нуклеазы Cas9 (Alt-R® Sp Cas9 Nuclease или S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, соответственно; IDT) и 1,8 мкМ crRNA: tracrRNA (комплексы sgРНК, Custom Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA и Alt-R® tracrRNA; IDT).

Комплексы crRNA: tracrRNA получали путем нагревания олигонуклеотидов РНК до 95°C в течение 1 минуты и охлаждения до комнатной температуры. Смесь комплексов RNP (белок Cas9 + crRNA: tracrRNA) получали путем добавления рекомбинантных белков Cas9 или высокоточных нуклеаз Cas9 к комплексам crRNA: tracrRNA и инкубирования при комнатной температуре в течение 10-20 минут. Обычно считается, что высокоточная Cas9 вызывает меньше нецелевых воздействий.

Для электропорации 10 мкл буфера «R», содержащего комплексы RNP, реагент-усилитель электропорации и плазмиду нацеленного вектора, добавляли к осадку PGC, и смесь немедленно подвергали электропорации с помощью 3 импульсов 1000 В, длительностью 13 мс каждый, с использованием электропоратора Neon (Invitrogen). Затем клетки немедленно высевали в 48-луночный планшет в среду PGC, содержащую 1 мкМ SCR7-пиразина (sigma, SML1546). Среду меняли через 1-4 часа, и трансфицированным клеткам давали возможность восстановиться в течение 7-10 дней. SCR7-пиразин добавляли на 48 часов после электропорации. Трансфицированные клетки отдельно выделяли

сортировкой FACS. Для сортировки FACS клетки осторожно переносили пипеткой, и сортировали в культуральной среде для PGC. Одиночные GFP-положительные клетки были отсортированы с помощью сортировщика FACS Sony (Sony) на 96-луночный U-образный планшет. Отсортированные клетки выращивали в течение 2-3 недель до образования чистых колоний. Из этих колоний была извлечена полная геномная ДНК для анализа, заморожены и положительные колонии инъецированы суррогатным эмбрионам-хозяевам. ПЦР и Саузерн-блот-анализ, используемые для проверки правильности интеграции вектора нацеливания, были описаны выше (см., например, фиг. 15-16). Способы создания суррогатных цыплят-химер также были описаны выше.

На фиг. 31A показана линия чистых женских PGC, которые подверглись HR с TV1 и экспрессировали GFP. Клетки из этой колонии инъецировали суррогатным эмбрионам-хозяевам, которые инкубировали в течение 5 дней после трансплантации. На фиг. 31B показан вид эмбриона с вентральной стороны через 5 дней после инъекции PGC. На этой стадии PGC колонизировали половой тяж, который является зачатком гонад (фиг. 31B, стрелки). Другие инъецированные эмбрионы инкубировали до вылупления, и цыплят забивали на 10-й день после вылупления для анализа яичника. Фиг. 31C показан яичник (очерченный линией), содержащий многочисленные GFP-положительные PGC. Эти результаты показывают, что PGC, которые подверглись HR на Z-хромосоме с помощью TV1, успешно колонизируют гонады.

СОЗДАНИЕ «РАЗБЛОКИРУЮЩИХ» ЛИНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CRE ИЛИ FLPO

Линии трансгенных кур, экспрессирующие векторы-мишени TV1-8, будут иметь в своем геноме элемент «блокировки», следовательно, система оптогенной летальности будет неактивной. Чтобы удалить элемент «блокировки», который фланкирован сайтами FRT (см. фиг. 26A), эти линии необходимо скрестить с линиями кур, экспрессирующим FlpO. Для создания этой линии был создан нацеленный вектор, содержащий фермент FlpO, за которым следует IRES-GFP (TV-FlpO-IRES-GFP, SEQ ID NO: 131). В качестве положительного контроля и в качестве средства активации кассеты, вызывающей летальность, независимо от света, может использоваться Cre-экспрессирующая порода. В этом случае элемент «безопасной блокировки» и оптогенные элементы, которые фланкируются сайтами LoxP, удаляются, чтобы активировать элемент, индуцирующий летальность (см. Фиг. 26B). Для создания этой линии был создан нацеленный вектор, содержащий фермент Cre, за которым следует P2A-GFP (TV-Cre-P2A-GFP, SEQ ID NO: 132). Эти два нацеленные вектора имеют одинаковые плечи 5’ и 3’ для гомологичного спаривания, а также репортерный ген GFP и предназначены для интеграции в Z-хромосому, как описано выше для TV1-8.

Вышеупомянутые векторы направленного воздействия (TV-FlpO-IRES-GFP и TV-Cre-P2A-GFP) были использованы для создания PGC, которые вводили суррогатным химерным эмбрионам. Выше были описаны способы трансфекции PGC, FACS-анализа, проверки интеграции HR, инъекции эмбрионов и т.д.

В другом воплощении существует возможность использования рекомбинантных белков CRE или FlpO для удаления элемента «блокировки». В одном воплощении последовательности, кодирующие рекомбинантные белки, содержат последовательности для пептида TAT, который представляет собой пептид, проникающий в клетку, за которым следует последовательность ядерной локализации (NLS), за которой, в свою очередь, следуют последовательности, кодирующие ферменты Cre или FlpO, которые могут применяться для клеток или эмбрионов. Эти рекомбинантные белки эффективны в культивируемых клетках и коммерчески доступны. Считается, что эти рекомбинантные белки можно инъецировать эмбрионам или взрослым и потенциально активировать систему без необходимости создания трансгенных цыплят Cre/Flp и скрещивания. Доступ к куриному эмбриону через отверстие в скорлупе яйца позволяет осуществлять прямую инъекцию в кровоток или в непосредственной близости от эмбриона. Таким образом, в одном воплощении указанные выше рекомбинантные белки можно инъецировать непосредственно в эмбрион для удаления элемента «безопасной блокировки».

Хотя некоторые воплощения были описаны вместе с их конкретными воплощениями, очевидно, что многие альтернативы, модификации и вариации будут очевидны специалистам в данной области техники. Соответственно, предполагается, что охватываются все такие альтернативы, модификации и вариации, которые находятся в пределах сущности и широкого объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, полностью включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения в данное описание посредством ссылки. Кроме того, цитирование или идентификация любого источника в этой заявке не должны толковаться как признание того, что такая ссылка доступна в качестве предшествующего уровня техники для настоящего раскрытия. В той степени, в которой используются заголовки разделов, их не следует рассматривать как обязательные ограничения.

Хотя некоторые особенности аспектов или воплощений были проиллюстрированы и описаны в данном документе, многие модификации, замены, изменения и эквиваленты теперь будут очевидны для специалистов в данной области техники. Следовательно, следует понимать, что прилагаемая формула изобретения предназначена для охвата всех таких

модификаций и изменений, которые соответствуют истинному духу аспектов или воплощений, представленных в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент для редактирования ДНК, содержащий полинуклеотидную кассету, имеющую состав 5’-LHA (левое плечо для гомологичного спаривания)-OIE (оптогенетически индуцируемый элемент)-LIE (элемент, индуцирующий летальность)-RHA (правое плечо для гомологичного спаривания)-3 'или состав 5’-LHA-LIE-OIE-RHA-3', где

(i) LHA включает первую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична первой соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы;

(ii) OIE включает первый промотор, функционально связанный со второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы;

(iii) LIE включает третью нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, способствующий летальности, который функционально связан с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы; и

(iv) RHA включает четвертую нуклеотидную последовательность, которая по существу гомологична второй соответствующей нуклеотидной последовательности на Z-хромосоме птицы.

2. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что первая соответствующая нуклеотидная последовательность или вторая соответствующая нуклеотидная последовательность расположены в открытой транскрибируемой области Z-хромосомы.

3. Агент для редактирования ДНК по п. 2, отличающийся тем, что открыто транскрибируемая область расположена в или ниже локуса нуклеотидсвязывающего белка 1-Z с гистидиновыми триадами (HINT1Z) на Z-хромосоме птицы.

4. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что

(i) LHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, или ее фрагмент;

(ii) RHA включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106, или ее фрагмент; или

(iii) и (i), и (ii).

5. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что первый промотор выбран из группы, состоящей из pCAGG (SEQ ID NO: 100), pGK (SEQ ID NO: 109), pCMV (SEQ ID NO: 110), phSyn (SEQ ID NO: 111) и pEF1-a (SEQ ID NO: 112).

6. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы, включает рекомбиназу Cre или рекомбиназу Mag.

7. Агент для редактирования ДНК по п. 6, отличающийся тем, что активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы, кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 или SEQ ID NO: 65.

8. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что экспрессия фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы индуцируется индуктором.

9. Агент для редактирования ДНК по п. 8, отличающийся тем, что индуктором является электромагнитная энергия.

10. Агент для редактирования ДНК по п. 9, в котором электромагнитная энергия представляет собой видимый свет с длиной волны 380-740 нм.

11. Агент для редактирования ДНК по п. 10, отличающийся тем, что видимый свет представляет собой синий свет с длиной волны 450-485 нм.

12. Агент для редактирования ДНК по п. 8, отличающийся тем, что активируемый индуктором фермент сайт-специфической рекомбиназы, включает нефункциональные пептидные фрагменты фермента сайт-специфической рекомбиназы, активируемые индуктором, которые в присутствии индуктора объединяются с образованием активного фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы.

13. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что активируемая индуктором сайт-специфическая рекомбиназа, представляет собой фермент РНК-управляемую ДНК-эндонуклеазу.

14. Агент для редактирования ДНК по п. 13, отличающийся тем, что фермент РНК-управляемая ДНК-эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу CRISPR-ассоциированного белка (CAS).

15. Агент для редактирования ДНК по п. 13, отличающийся тем, что полинуклеотидная кассета дополнительно включает пятую нуклеотидную последовательность, которая кодирует направляющую РНК, нацеленную на существенный ген птицы, причем пятая нуклеотидная последовательность функционально связана с активностью фермента активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы.

16. Агент для редактирования ДНК по п. 15, отличающийся тем, что

существенный ген выбран из группы, состоящей из рецептора морфогенетического белка кости типа IA (BMPR1A), костного морфогенетического белка 2 (BMP2), костного морфогенетического белка 4 (BMP4) и рецептора 1 фактора роста фибробластов (FGFR1).

17. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что белок, способствующий летальности, выбран из группы, состоящей из токсина, проапоптотического белка, ингибитора пути передачи сигнала Wnt, антагониста BMP, антагониста FGF, каспазы 3 дикого типа, конститутивно активной каспазы 3, Noggin и его фрагмента, индуцирующего летальность.

18. Агент для редактирования ДНК по п. 17, отличающийся тем, что белок, индуцирующий летальность, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 99.

19. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

20. Агент для редактирования ДНК по п. 1, отличающийся тем, что

(i) LHA включает последовательность SEQ ID NO: 105,

(ii) OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 101, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или

OIE включает последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 107, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116,

(iii) LIE включает последовательность SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 96, или SEQ ID NO: 98, и

(iv) RHA включает последовательность SEQ ID NO: 106.

21. Популяция птичьих клеток, где птичьи клетки включают агент для редактирования ДНК по п. 1.

22. Популяция по п. 21, отличающаяся тем, что клетки представляют собой примордиальные зародышевые клетки (PGC) или птичьи гаметы.

23. Популяция по п. 22, отличающаяся тем, что PGC выбраны из группы, состоящей из PGC гонад, PGC крови и PGC зародышевого серповидного отростка.

24. Популяция по п. 21, отличающаяся тем, что птица выбрана из группы,

состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

25. Химерная птица, содержащая популяцию птичьих клеток по п. 21.

26. Химерная птица по п. 25, отличающаяся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

27. Способ создания химерной птицы, включающий следующие стадии:

введение агента для редактирования ДНК по п.1 в популяцию птичьих клеток с получением, таким образом, клеток птицы с отредактированным геномом; и

перенос клеток птицы с отредактированным геномом в эмбрионы птиц-реципиентов, с получением таким образом химерной птицы.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанная популяция птичьих клеток включает примордиальные зародышевые клетки (PGC).

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что PGC выбраны из группы, состоящей из PGC гонад, PGC крови и PGC зародышевого серповидного отростка.

31. Способ по п. 27, отличающийся тем, что клетки птицы переносят в эмбрионы птиц путем инъекции in-ovo или ex-ovo.

32. Способ индукции летальности мужского эмбриона птицы, включающий следующие стадии:

введение агента для редактирования ДНК по п. 1 в популяцию птичьих клеток, с получением таким образом клеток птицы с отредактированным геномом;

перенос клеток птицы с отредактированным геномом эмбрионам птиц-реципиентов; и

воздействие на эмбрионы индуктора, который вызывает экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого агентом для редактирования ДНК, тем самым вызывая летальность у мужских эмбрионов птицы.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что индуктором является синий свет с длиной волны 450-485 нм.

35. Способ по п. 32, отличающийся тем, что агент для редактирования ДНК включает

(i) LHA, имеющий последовательность SEQ ID NO: 105,

(ii) OIE, имеющий последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID

NO: 101, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, который связан с последовательностью SEQ ID NO: 102, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, или OIE, имеющей последовательность SEQ ID NO: 100, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 107, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 103, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 108, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 104, которая связана с последовательностью SEQ ID NO: 116,

(iii) LIE, имеющий последовательность SEQ ID NO: 92, или SEQ ID NO: 94, или SEQ ID NO: 96, или SEQ ID NO: 98, и

(iv) RHA, имеющий последовательность SEQ ID NO: 106.

36. Агент для редактирования ДНК по п. 1, дополнительно содержащий элемент безопасной блокировки, вставленный ниже промотора в OIE, но выше последовательности, кодирующей индуктор-активированную сайт-специфичную рекомбиназу, причем указанный элемент безопасной блокировки включает нуклеотидные последовательности (элемент STOP), которые предотвращают транскрипцию активируемой индуктором сайт-специфической рекомбиназы, кодируемой OIE.

37. Агент для редактирования ДНК по п. 36, отличающийся тем, что указанный элемент STOP фланкирован двумя сайтами FRT.

38. Агент для редактирования ДНК по п. 36, отличающийся тем, что агент для редактирования включает последовательность одной из SEQ ID NO: 120-127.

39. Популяция птичьих клеток, отличающаяся тем, что птичьи клетки содержат агент для редактирования ДНК по п. 36.

40. Популяция по п. 39, отличающаяся тем, что клетки представляют собой примордиальные зародышевые клетки (PGC) или птичьи гаметы.

41. Популяция по п. 40, отличающаяся тем, что PGC выбраны из группы, состоящей из PGC гонад, PGC крови и PGC зародышевого серповидного отростка.

42. Популяция по п. 39, отличающаяся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

43. Химерная птица, содержащая популяцию птичьих клеток по п. 39.

44. Химерная птица по п. 43, отличающаяся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

45. Способ создания химерной птицы, включающий следующие стадии:

введение агента для редактирования ДНК по п. 36 в популяцию птичьих клеток, с получением таким образом клеток птицы с отредактированным геномом; и

перенос клеток птицы с отредактированным геномом в эмбрионы птиц-реципиентов, с получением таким образом химерной птицы.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

47. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанная популяция птичьих клеток включает примордиальные зародышевые клетки (PGC).

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что PGC выбраны из группы, состоящей из PGC гонад, PGC крови и PGC зародышевого серповидного отростка.

49. Способ по п. 45, отличающийся тем, что клетки птицы переносят в эмбрионы птиц путем инъекции in ovo.

50. Способ индукции летальности мужского эмбриона птицы, включающий следующие стадии:

введение агента для редактирования ДНК по п. 36 в популяцию птичьих клеток, с получением таким образом клеток птицы с отредактированным геномом;

перенос клеток птицы с отредактированным геномом эмбрионам птиц-реципиентов; и

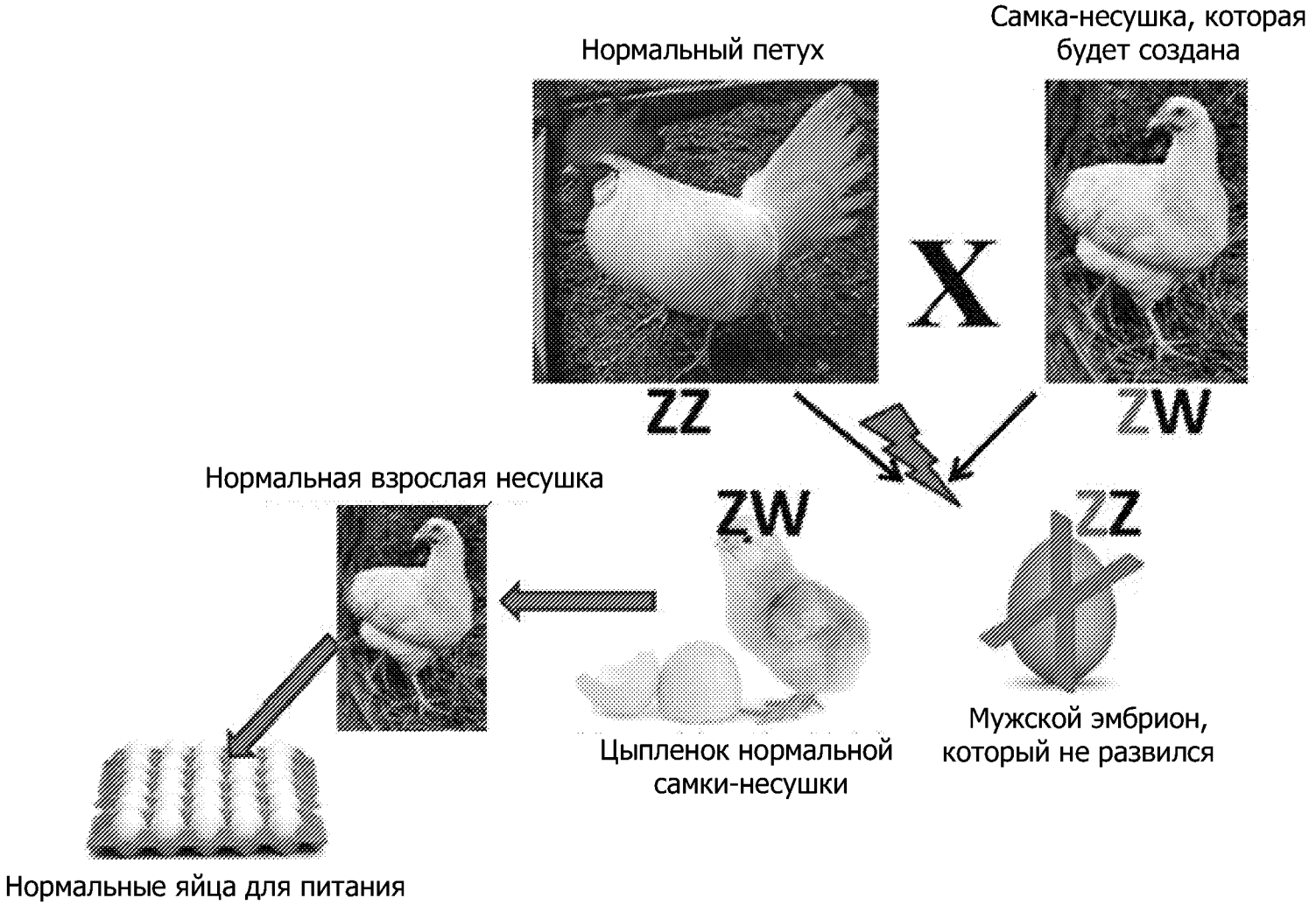
воздействие на эмбрионы агента, который удаляет элемент STOP из агента для редактирования ДНК, тем самым вызывая экспрессию белка, способствующего летальности, кодируемого агентом для редактирования ДНК, и вызывая летальность у мужских эмбрионов птицы.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что птица выбрана из группы, состоящей из курицы, индейки, утки, гуся, перепела, фазана и страуса.

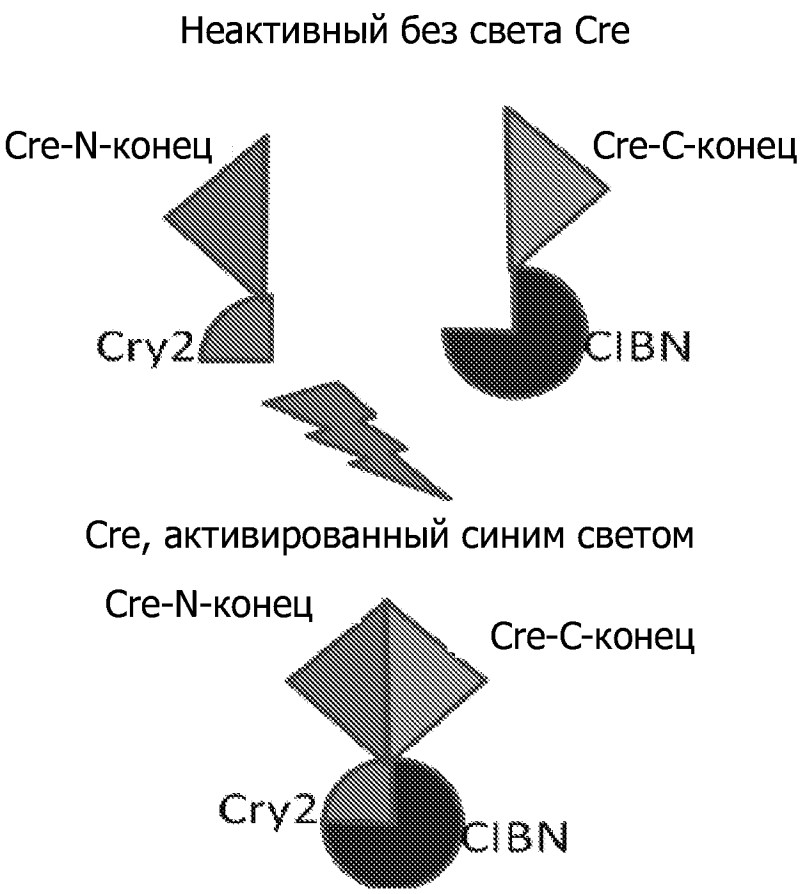
52. Способ по п. 50, отличающийся тем, что агент для редактирования ДНК включает последовательность одной из SEQ ID NO: 120-127.

53. Способ по п. 50, отличающийся тем, что агент представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок FlpO или белок Cre.

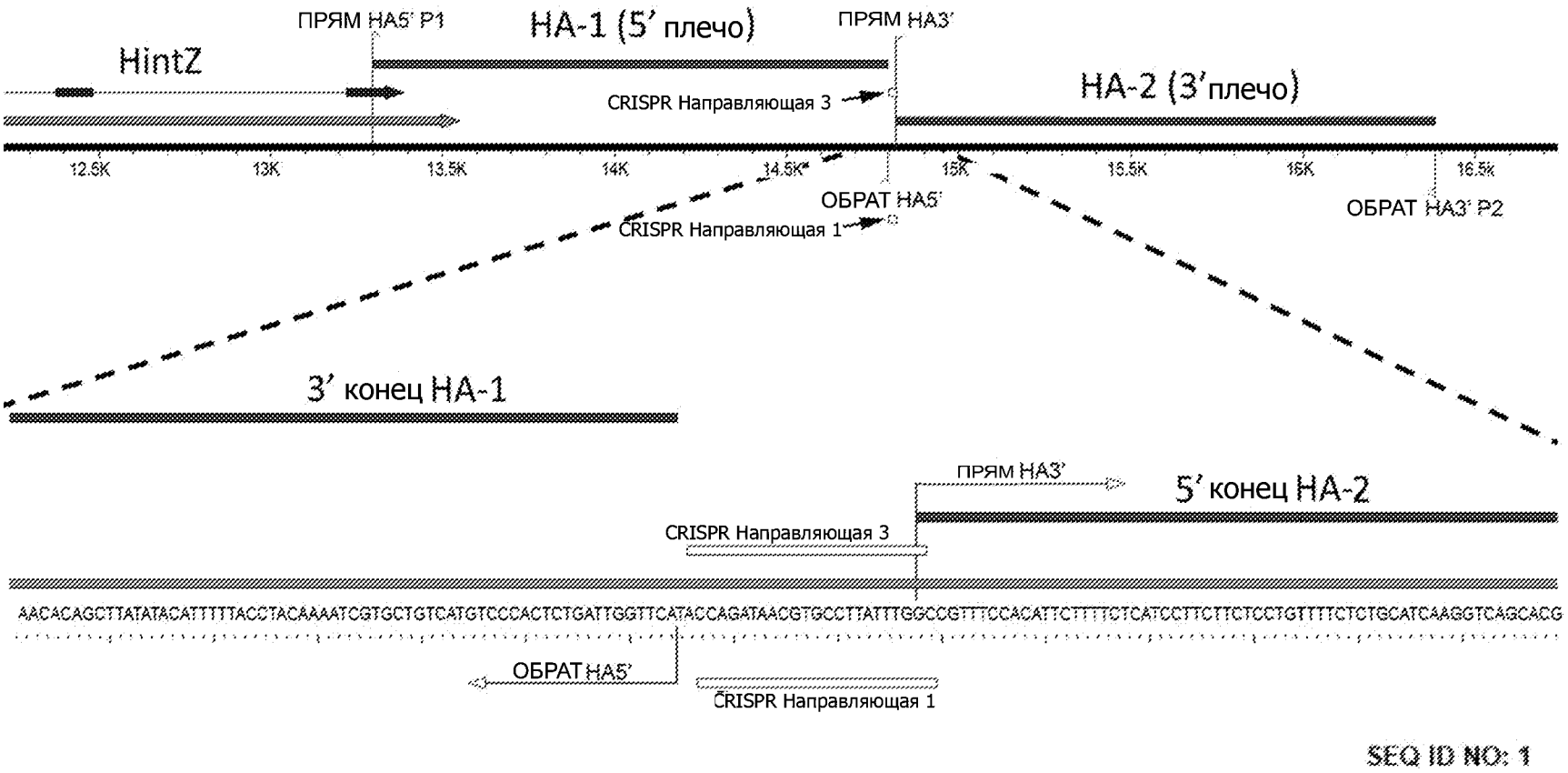
54. Способ по п. 50, отличающийся тем, что индукция летальности мужских эмбрионов дополнительно включает облучение эмбрионов синим светом с длиной волны 450-485 нм.


Нормальный петух
Самка-несушка, которая будет создана
X
ZZ
ZW
Нормальная взрослая несушка
ZW
ZZ
Цыпленок нормальной самки-несушки
Мужской эмбрион, который не развился
Нормальные яйца для питания

Фиг. 1

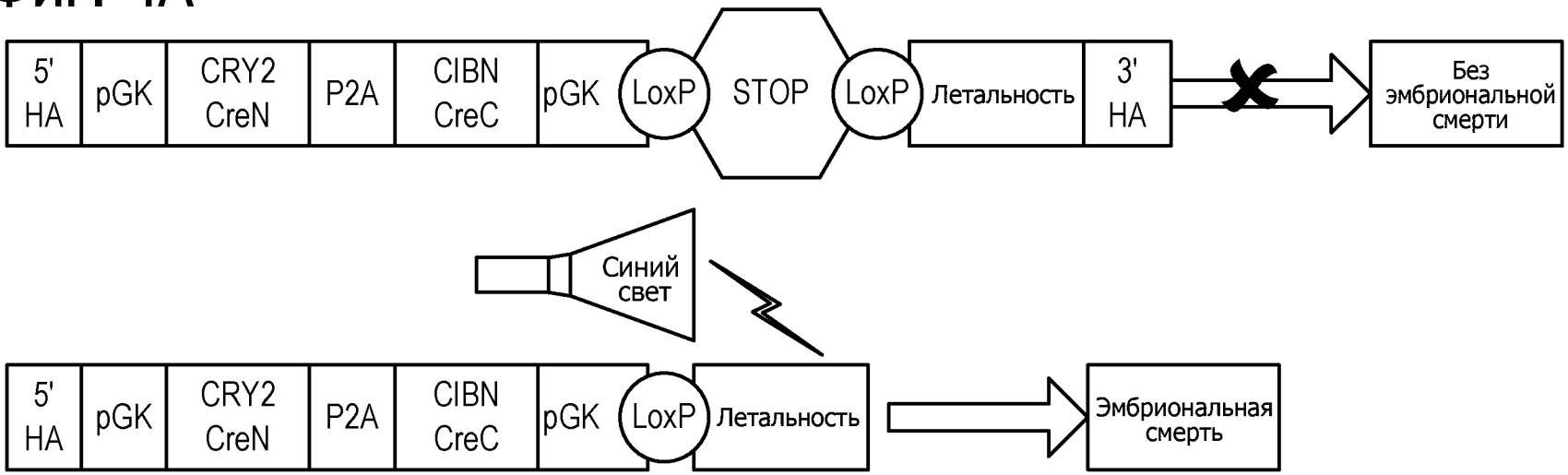

Неактивный без света Cre
Cre-N-конец
Cre-C-конец
Cry2
CIBN
Cre, активированный синим светом
Cre-N-конец
Cre-C-конец
Cry2
CIBN

Фиг. 2

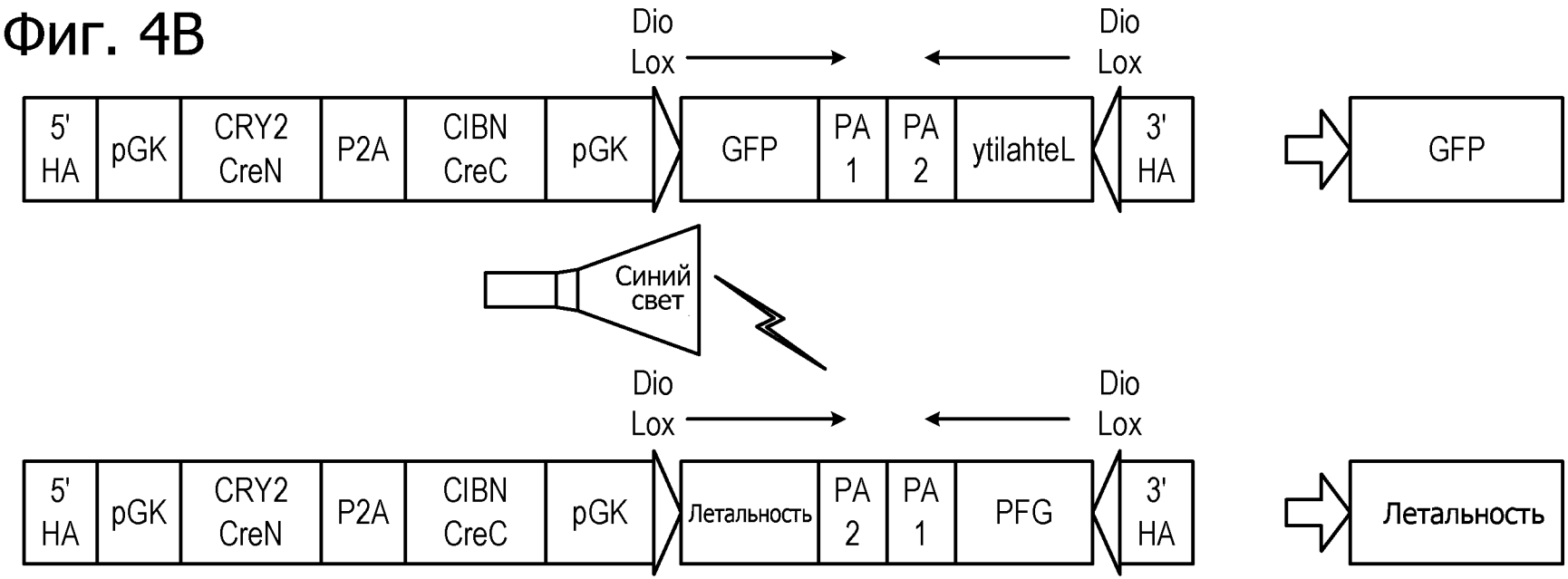

ПРЯМ HA5' P1
HA-1 (5' плечо)
ПРЯМ HA3'
HintZ
CRISPR Направляющая 3
HA-2 (3'плечо)
12.5K
13K
13.5K
14K
14.5K
15K
15.5K
16K
16.5k
ОБРАТ HA5'
ОБРАТ HA3' P2
CRISPR Направляющая 1
3' конец HA-1
ПРЯМ HA3'
5' конец HA-2
CRISPR Направляющая 3
AACACAGCTTATATACATTTTTACCTACAAAATCGTGCTGTCATGTCCCACTCTGATTGGTTCATACCAGATAACGTGCCTTATTTGGCCGTTTCCACATTCTTTTCTCATCCTTCTTCTCCTGTTTTCTCTGCATCAAGGTCAGCACG
ОБРАТ HA5'
CRISPR Направляющая 1
SEQ ID NO: 1

Фиг. 3

Фиг. 4A

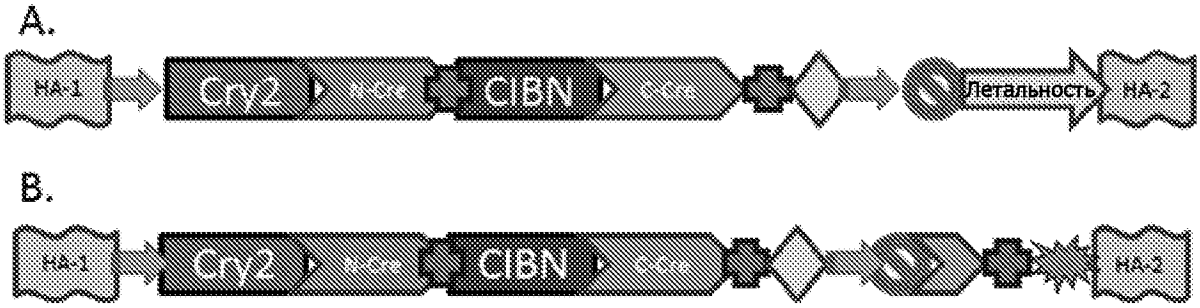

5' HA
pGK
CRY2 CreN
P2A
CIBN CreC
pGK
LoxP
STOP
LoxP
Летальность
3' HA
Без эмбриональной смерти
Синий свет
5' HA
pGK
CRY2 CreN
P2A
CIBN CreC
pGK
LoxP
Летальность
Эмбриональная смерть

Фиг. 4B

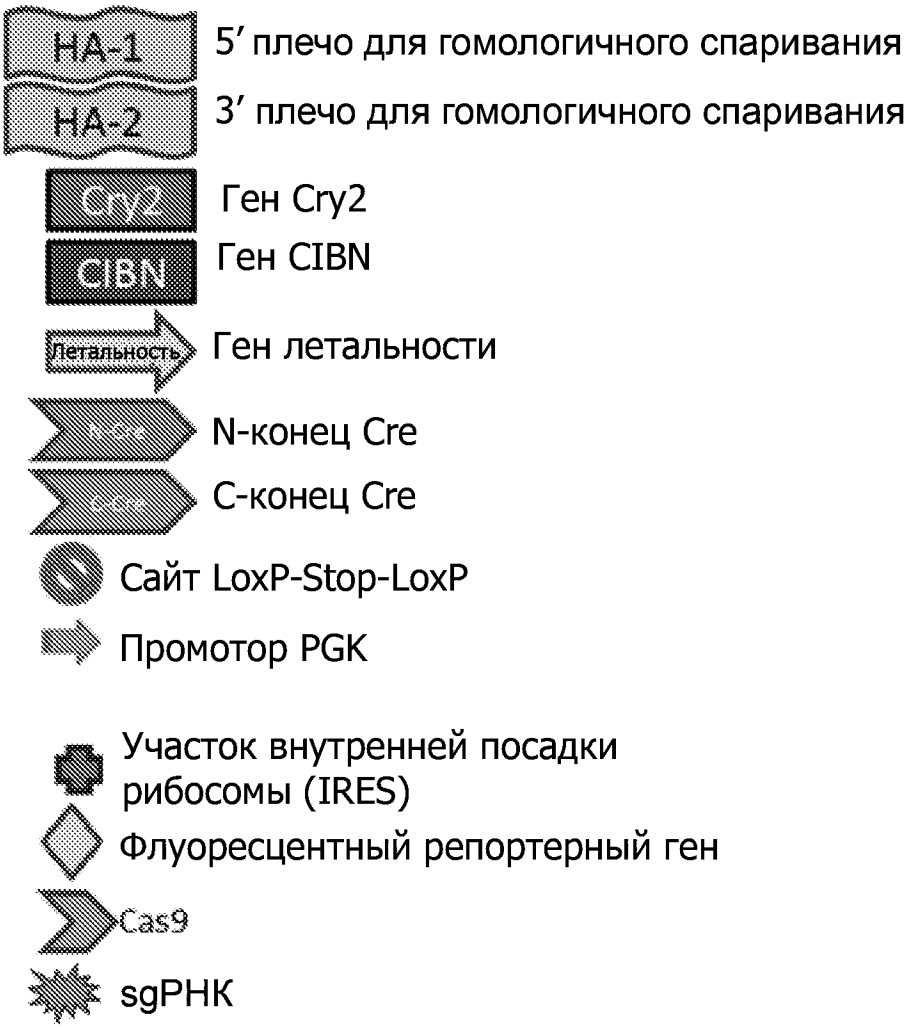

Dio Lox
Dio Lox
5' HA
pGK
CRY2 CreN
P2A
CIBN CreC
pGK
GFP
PA 1
PA 2
ytilahteL
3' HA
GFP
Синий свет
Dio Lox
Dio Lox
5' HA
pGK
CRY2 CreN
P2A
CIBN CreC
pGK
Летальность
PA 2
PA 1
PFG
3' HA
Летальность

Фиг. 4C

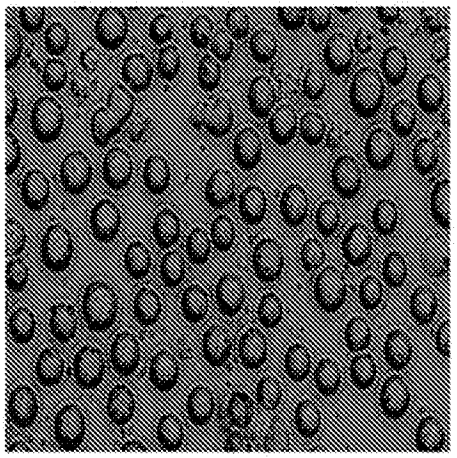
Нацеленные векторы:



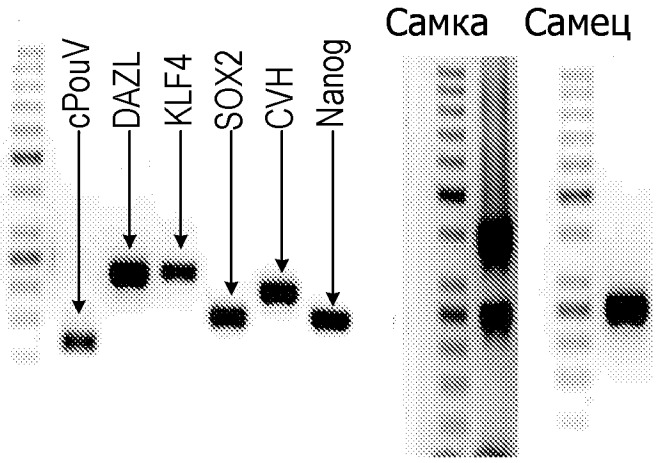
Элементы:



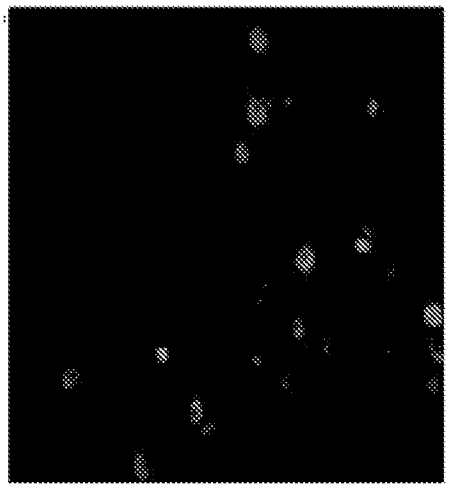
Фиг. 5A



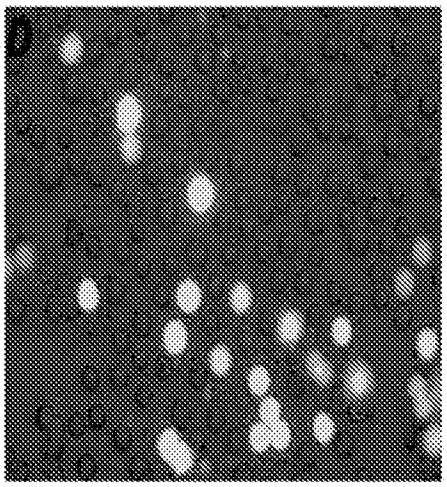
Фиг. 5B

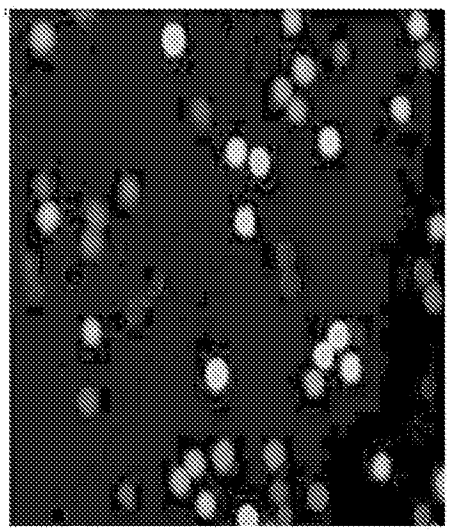


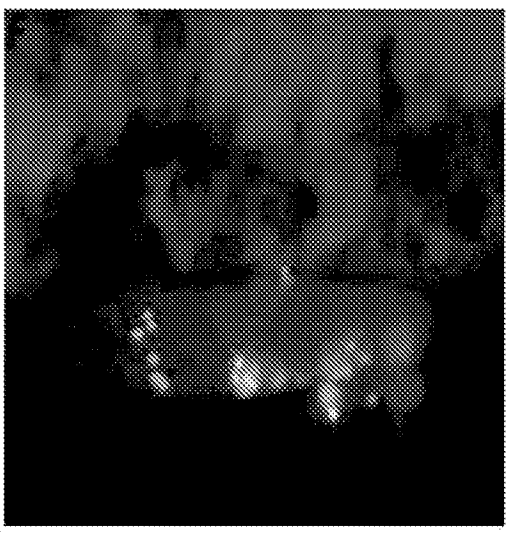
Фиг. 5C



Фиг. 5D

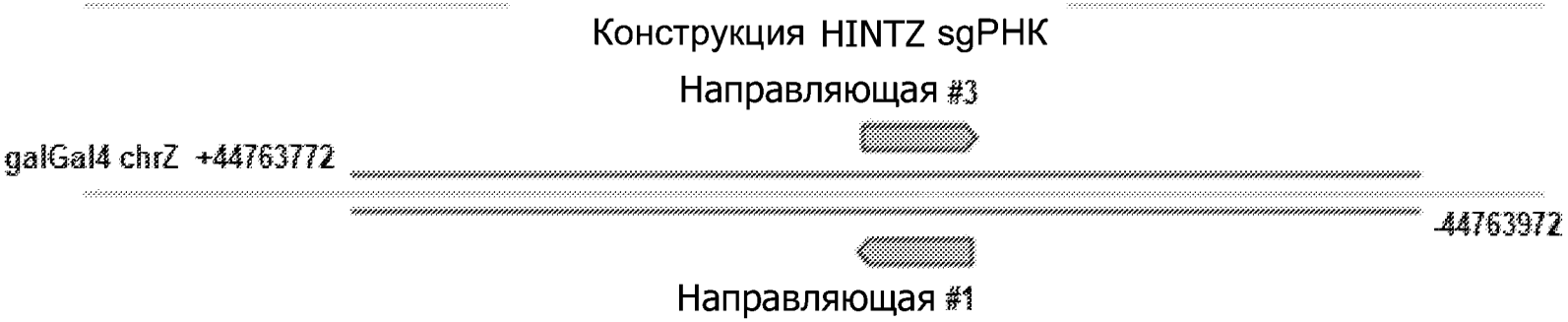






Фиг. 5E

Фиг. 5F


Конструкция HINTZ sgРНК
Направляющая #3
galGal4 chrZ +44763772
44763972
Направляющая #1

Фиг. 6A

Все направляющие

Оценивается по обратной вероятности нецелевого связывания

Направляющая #	Балл	Последовательность	PAM	SEQ ID NO:
Направляющая #1	92	GCCAAATAAG GCACGTTATC	TGG	66
Направляющая #2	87	AATGTGGAAA CGGCCAAATA	AGG	67
Направляющая #3	86	ACCAGATAAC GTGCCTTATT	TGG	68
Направляющая #4	84	ACATGACAGC ACGATTTTGT	AGG	69
Направляющая #5	84	CTGGTATGAA CCAATCAGAG	TGG	70
Направляющая #6	81	TGGTATGAAC CAATCAGAGT	GGG	71
Направляющая #7	77	GACCTTGATG CAGAGAAAAC	AGG	72
Направляющая #8	63	CTCCTGTTTT CTCTGCATCA	AGG	73
Направляющая #9	54	GCAGAGAAAA CAGGAGAAGA	AGG	74
Направляющая #10	52	AGAAGGATGA GAAAAGAATG	TGG	75
Направляющая #11	41	CTGTCATGTC CCACTCTGAT	TGG	76
Направляющая #12	38	ATGAGAAAAG AATGTGGAAA	CGG	77

Фиг. 6B

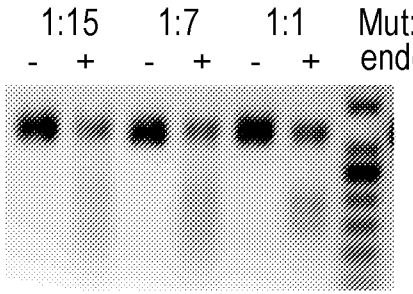
Анализ нецелевого связывания направляющей #1: GCCAAATAAGGCACGTTATC **PAM** - TGG
Балл качества: 92
Целевой локус: chrZ:-44763868

10 лучших геномных нецелевых сайтов

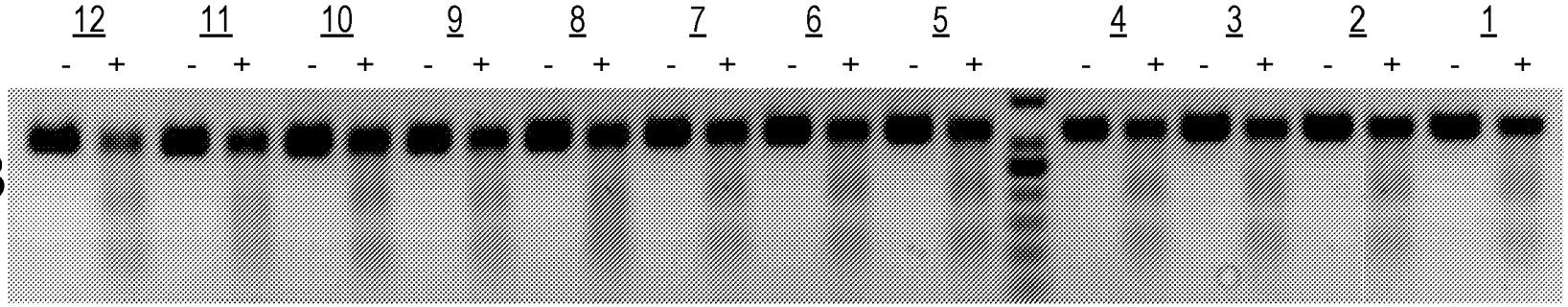
SEQ ID NO:	Последовательность	PAM	Балл	Несовпадения	UCSC	Локус
78	CCAACAGAAG GCACGTTATC	CAG	0.9	4MMs(1:3:5:7)		chr2:+3150554
79	TCAAAATAAA GTACGTTATC	TAG	0.7	4MMs(1:3:10:12)		chr3:+47694240
80	GGCATATAAA GCACGTTAT	CAG	0.6	4MMs(2:5:10:20)		chr5:+5997053
81	GCATAATAAT GTACGTTATC	TGG	0.6	4MMs(3:4:10:12)		chr5:-32615473
82	ACTAAATCAG GCACGTGATC	TGG	0.6	4MMs(1:3:8:17)		chr1:-120450563
83	GCTAAATTAA GCTCGTTATC	GGG	0.5	4MMs(3:8:10:13)		chr9:-2097883
84	GTCAAATGAG GCATGTTATC	AGG	0.4	3MMs(2:8:14)		chr1:+41801139
85	TTCAAATAAG CCACGTTATT	CAG	0.4	4MMs(1:2:11:20)		chr1:-85990782
86	GTCAAACAAG GCATGTTATC	AGG	0.3	3MMs(2:7:14)	NM_001285201	chr1:-41801985
87	CCCTAATAAA GCACGTTTTC	AGG	0.3	4MMs(1:4:10:18)		chr1:-46220994

Фиг. 6C

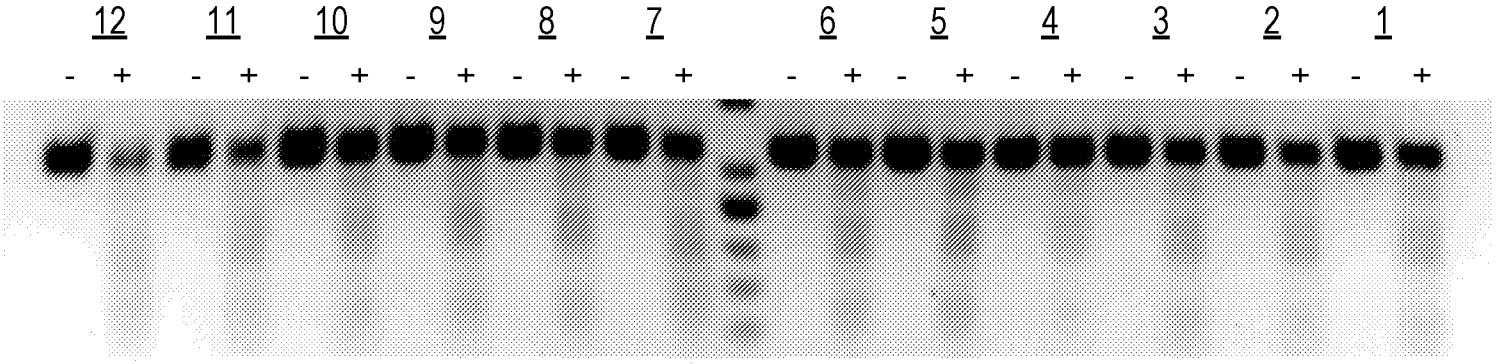
Фиг. 7A



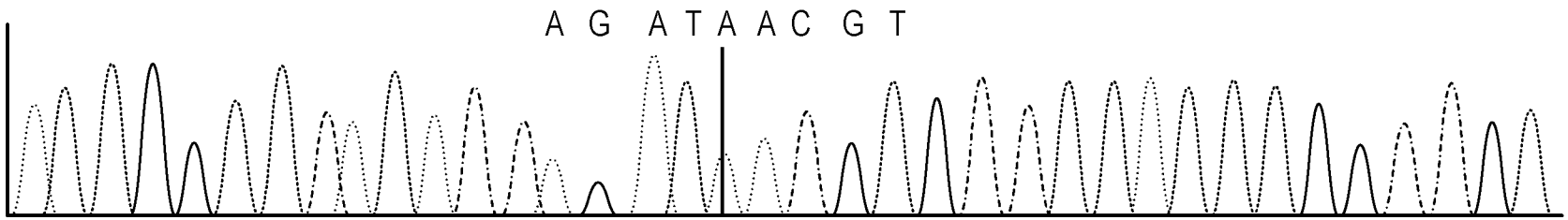
Фиг. 7B



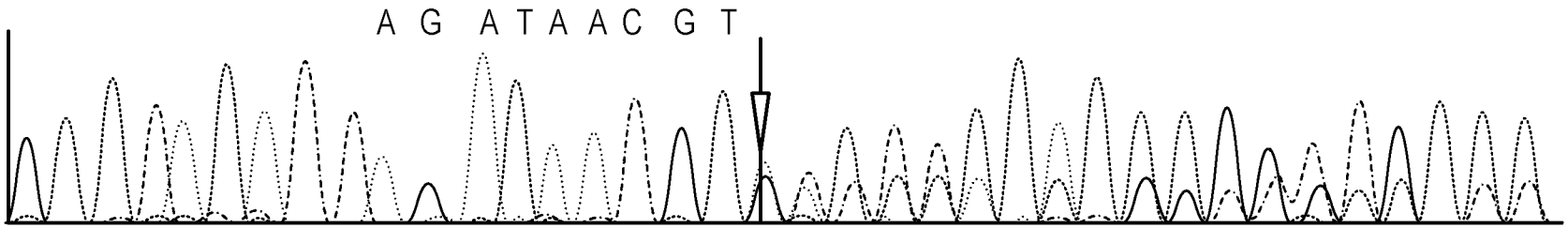
Фиг. 7C



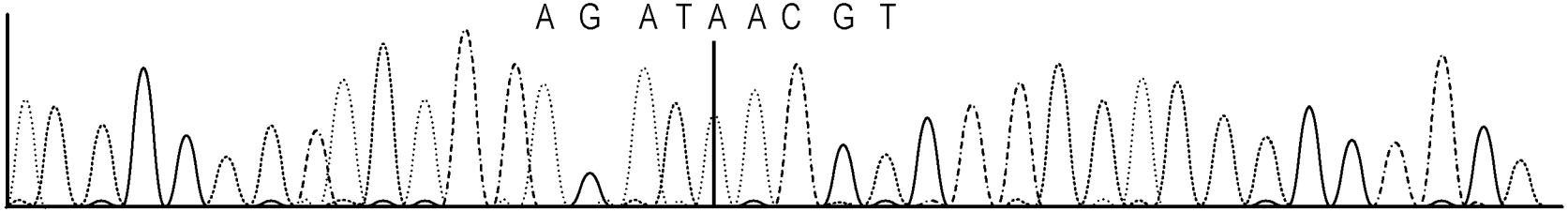
Фиг. 8A



Фиг. 8B

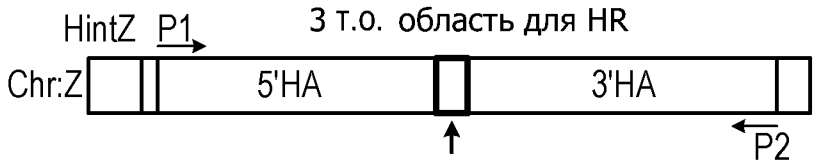


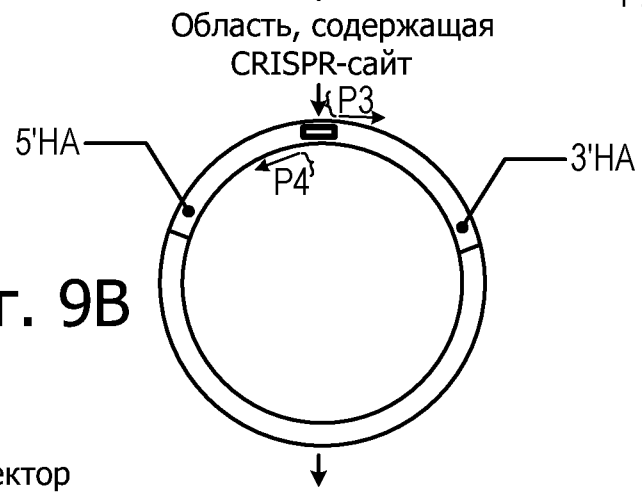
Фиг. 8C



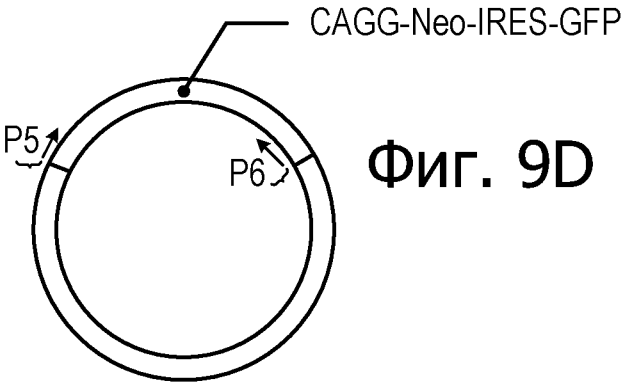
Фиг. 8D

Фиг. 9A



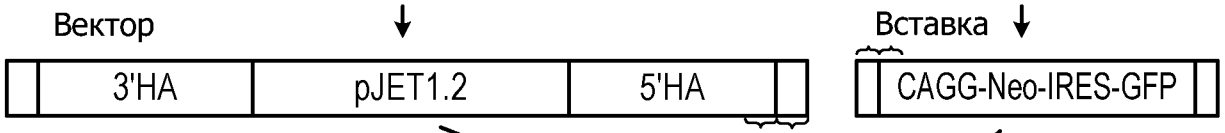


Фиг. 9B

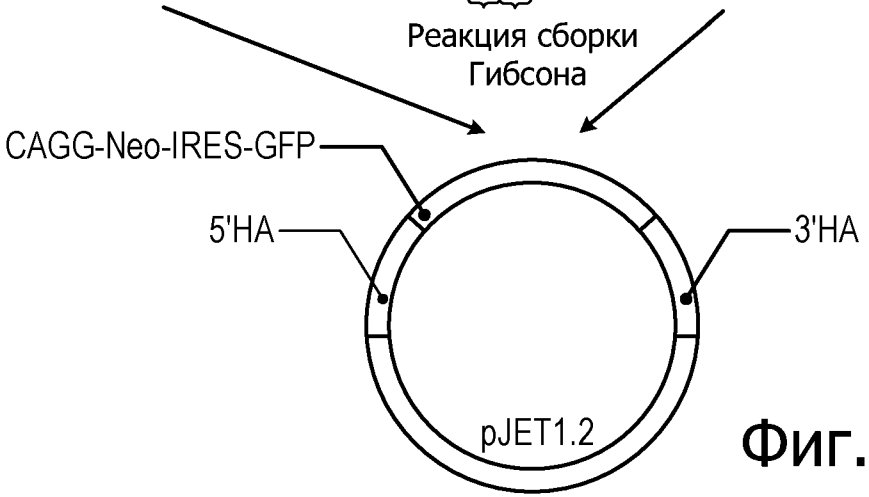


Фиг. 9D

Фиг. 9C

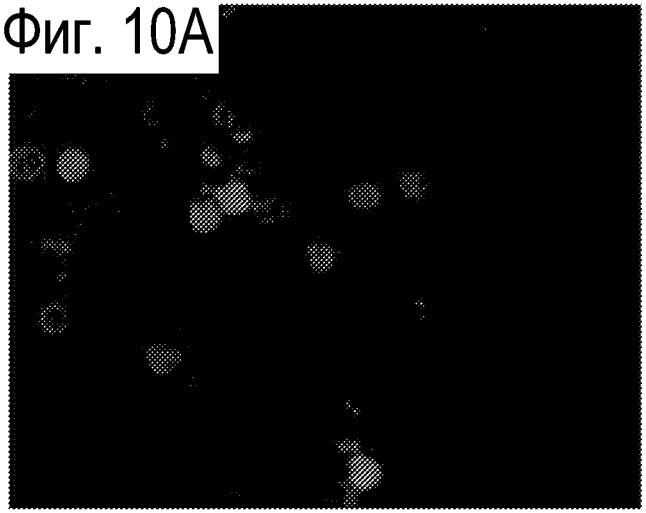


Фиг. 9E

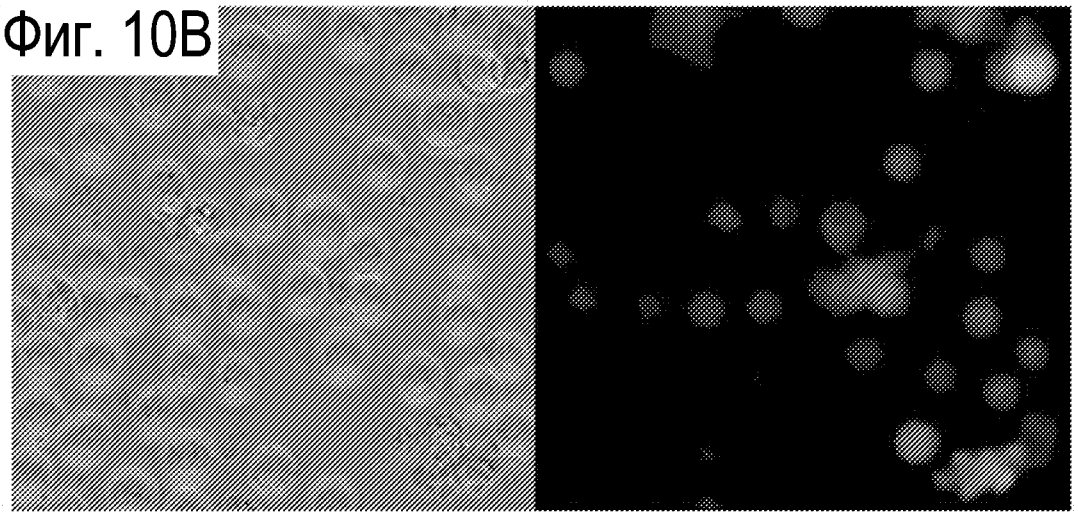


Фиг. 9F

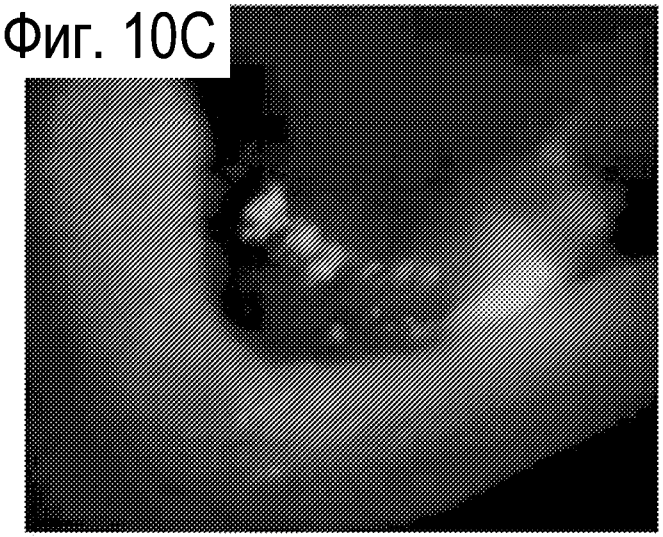
Фиг. 10A



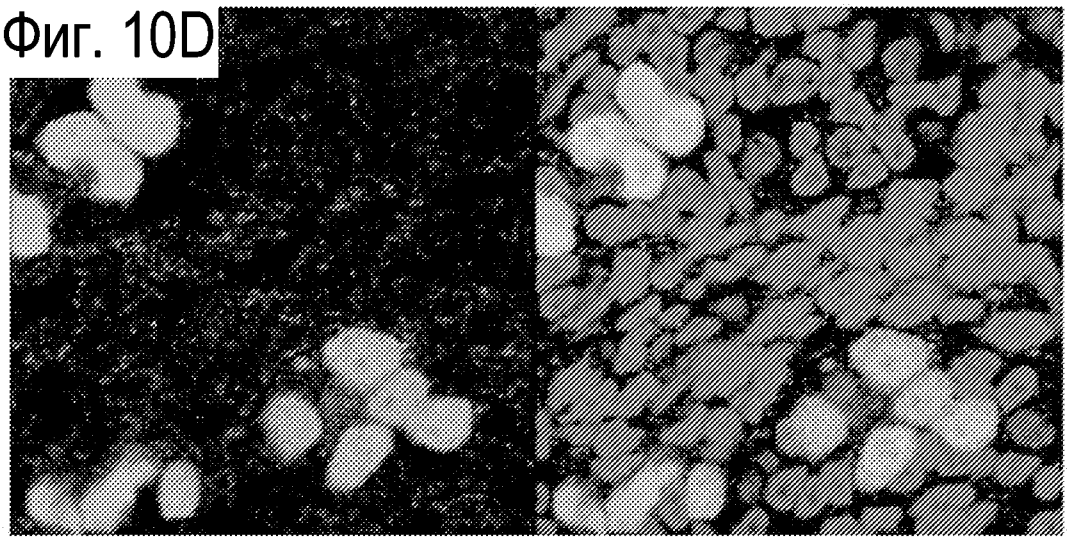
Фиг. 10B

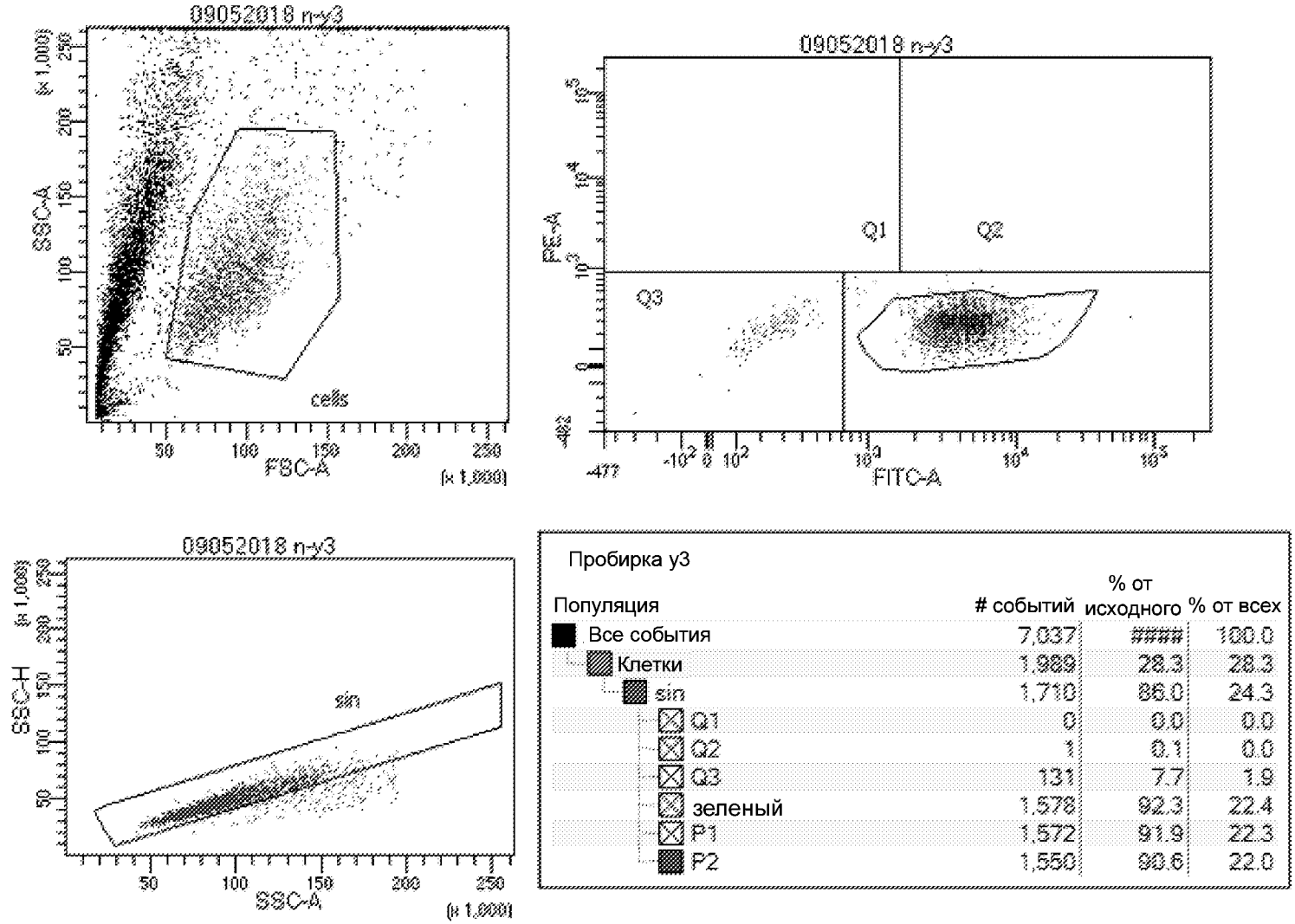


Фиг. 10C

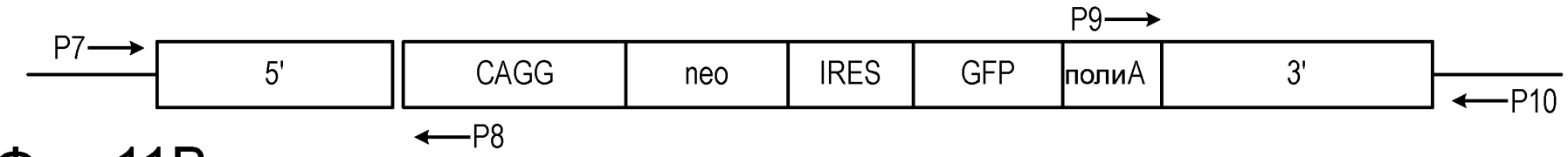


Фиг. 10D



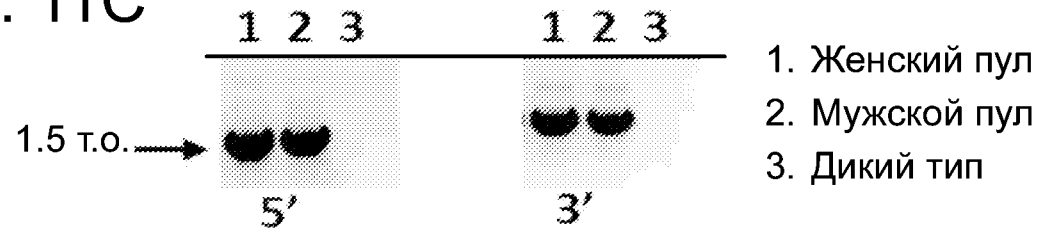

09052018 n-y3
SSC-A
FSC-A
cells
09052018 n-y3
Q1
Q2
Q3
PE-A
FITC-A
09052018 n-y3
SSC-H
SSC-A
sin
Пробирка y3
Популяция
событий
% от исходного
% от всех
Все события 7,037 #### 100.0
Клетки 1,989 28.3 28.3
sin 1,710 86.0 24.3
Q1 0 0.0 0.0
Q2 1 0.1 0.0
Q3 131 7.7 1.9
зеленый 1,578 92.3 22.4
P1 1,572 91.9 22.3
P2 1,550 90.6 22.0

Фиг. 11A

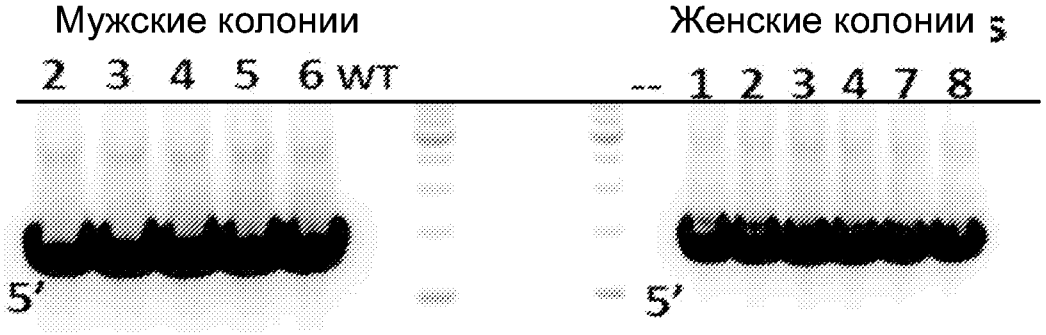


Фиг. 11B

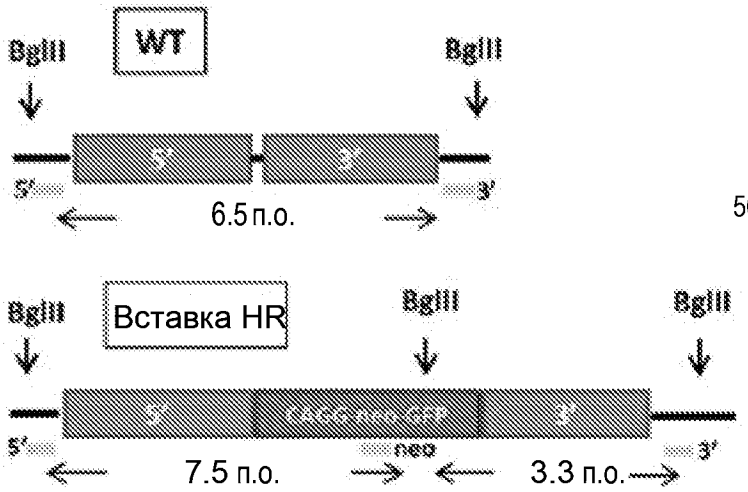
Фиг. 11C



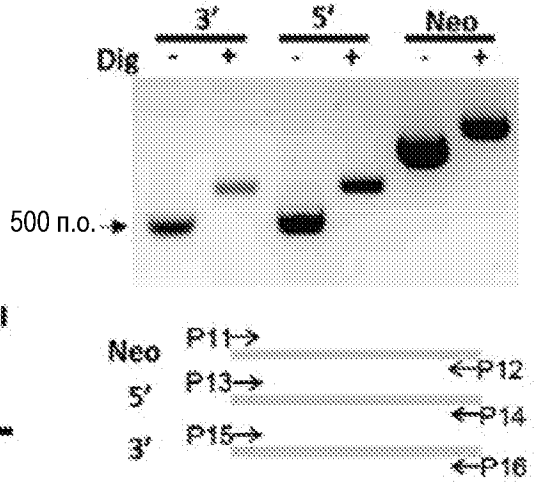
Фиг. 11D

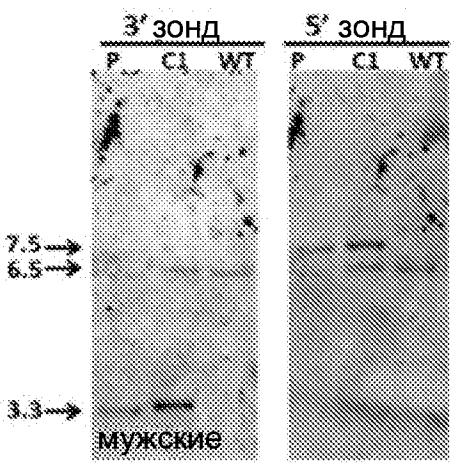


Фиг. 12A

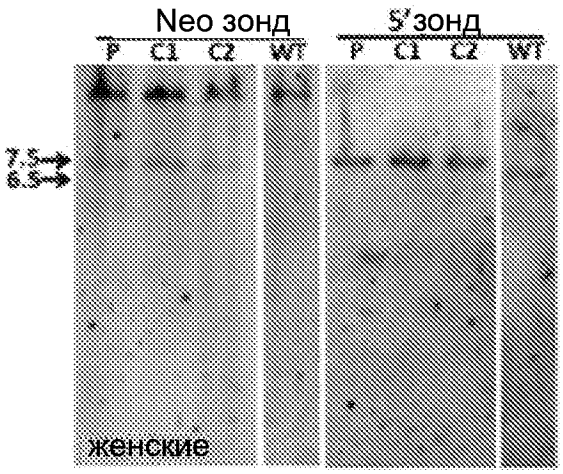


Фиг. 12B

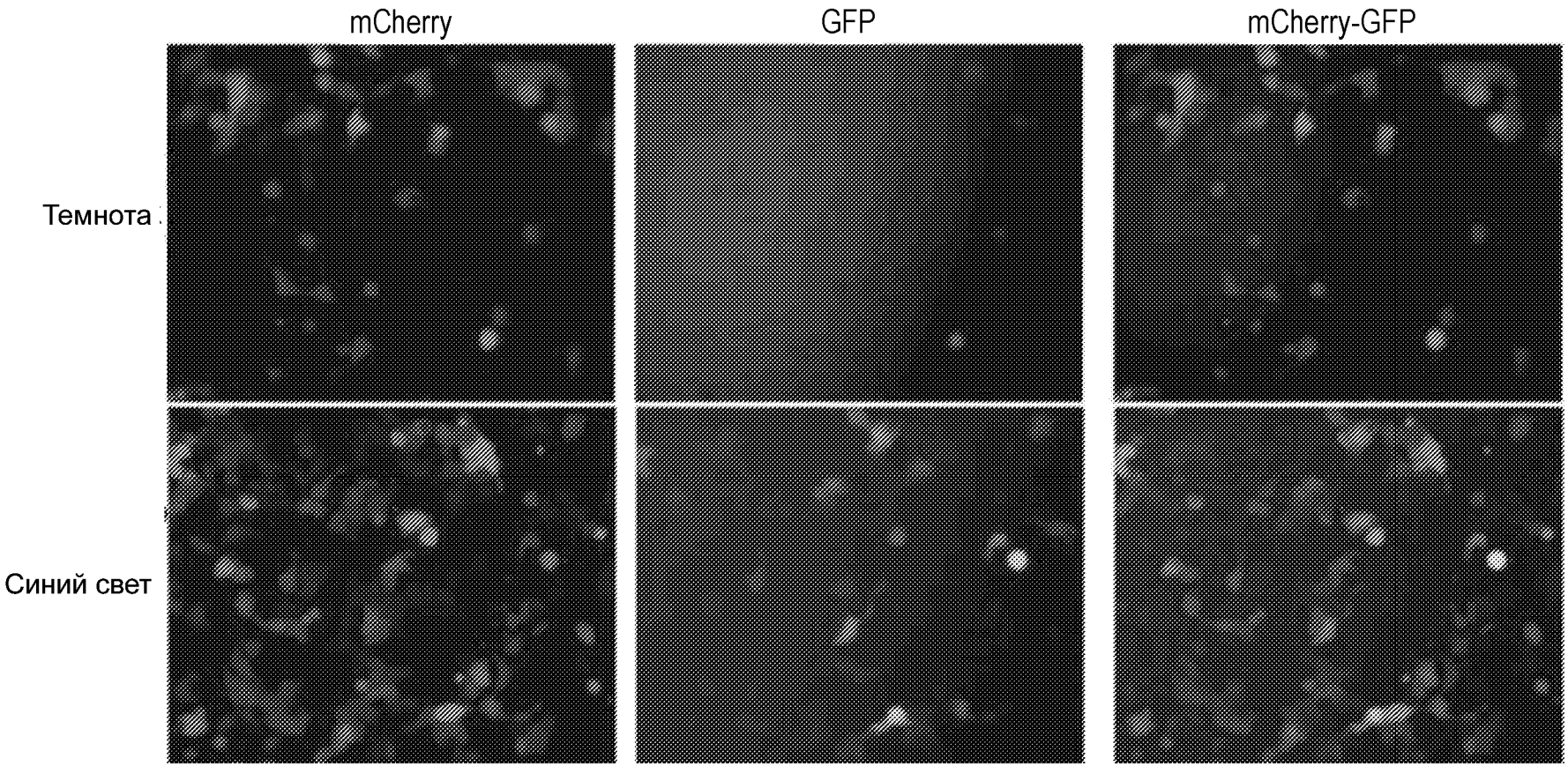




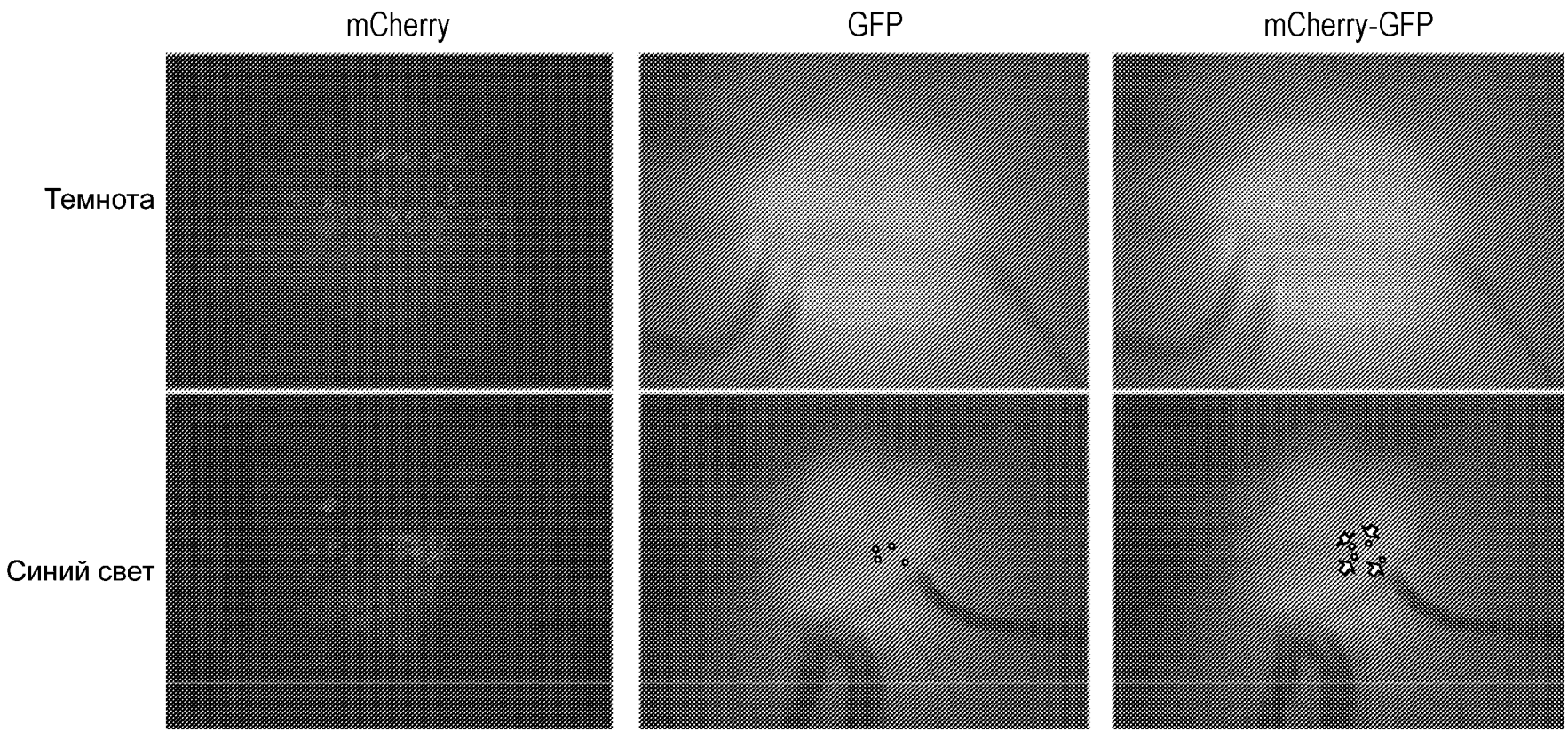
Фиг. 12C



Фиг. 12D

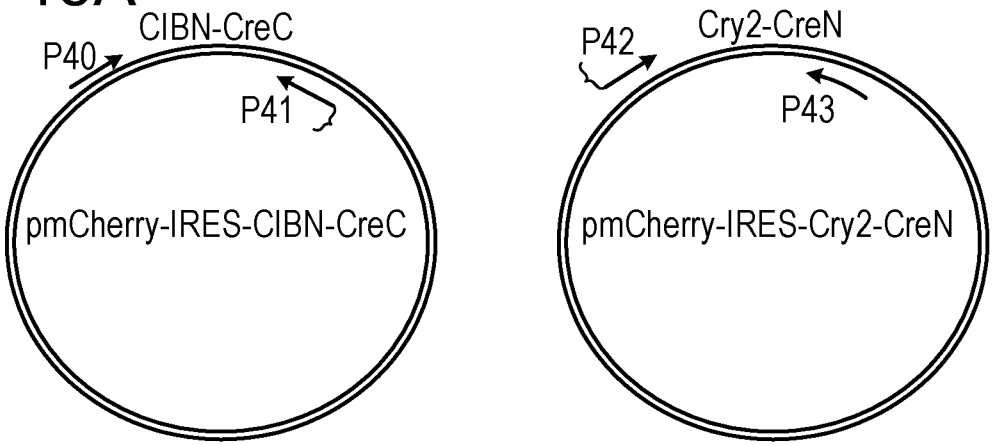


Фиг. 13

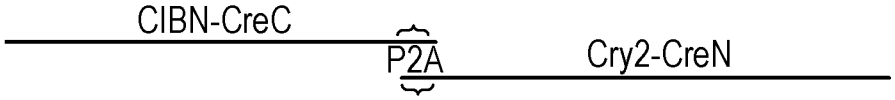


Фиг. 14

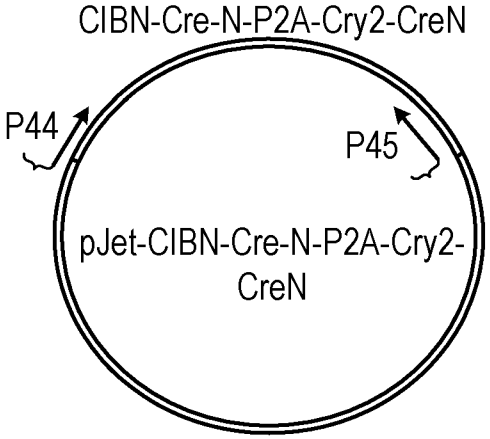
Фиг. 15A



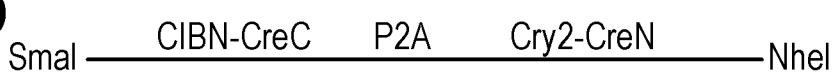
Фиг. 15B

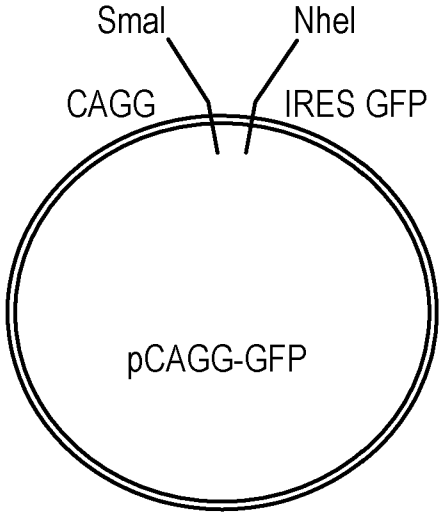


Фиг. 15C



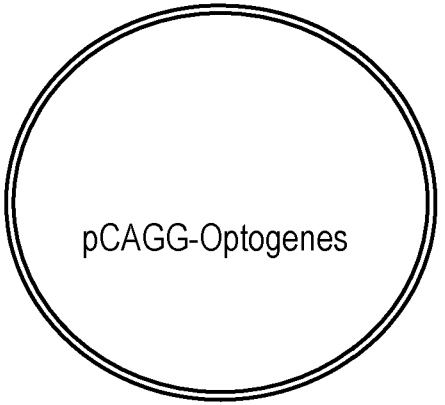
Фиг. 15D



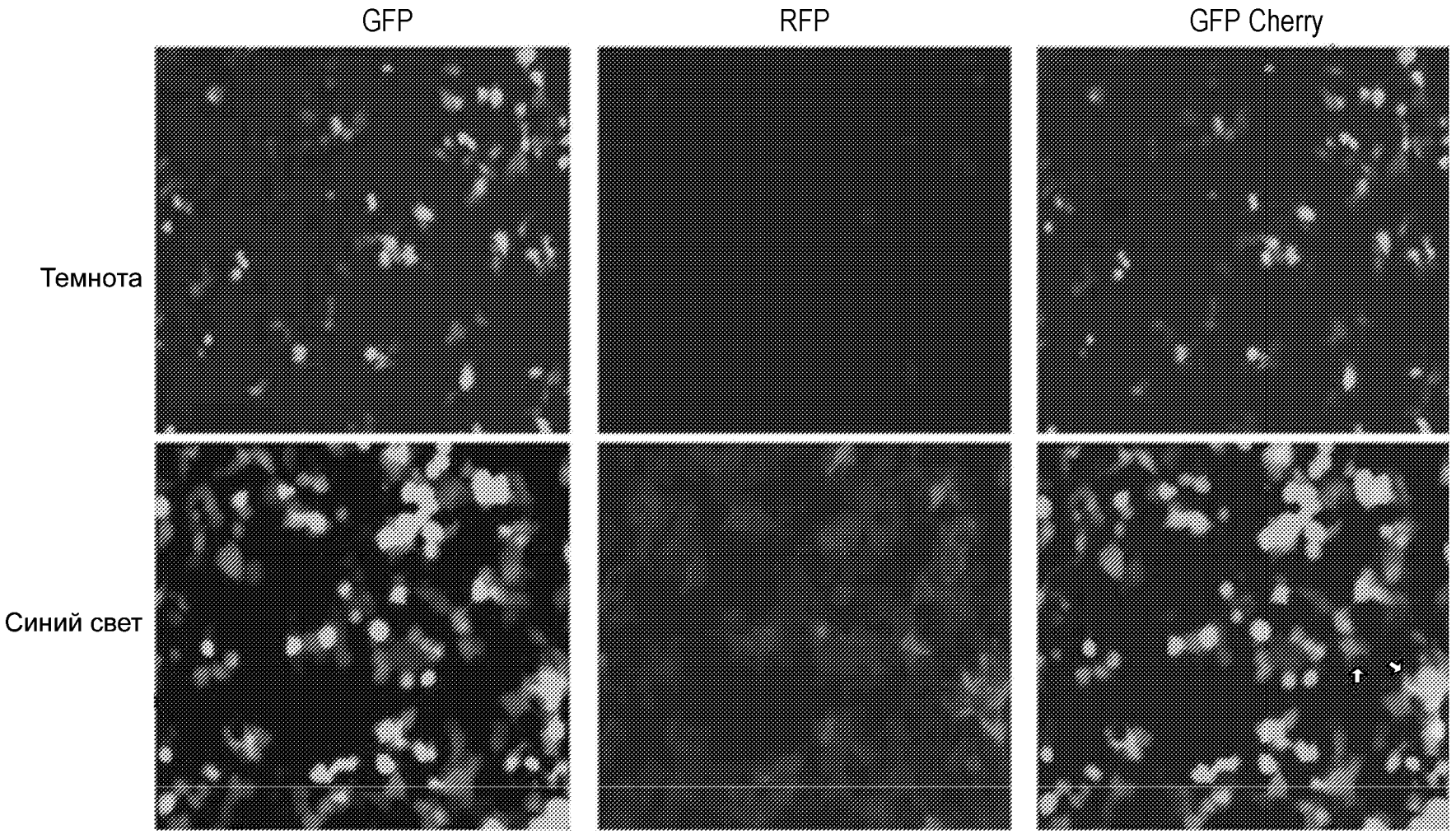


Фиг. 15E

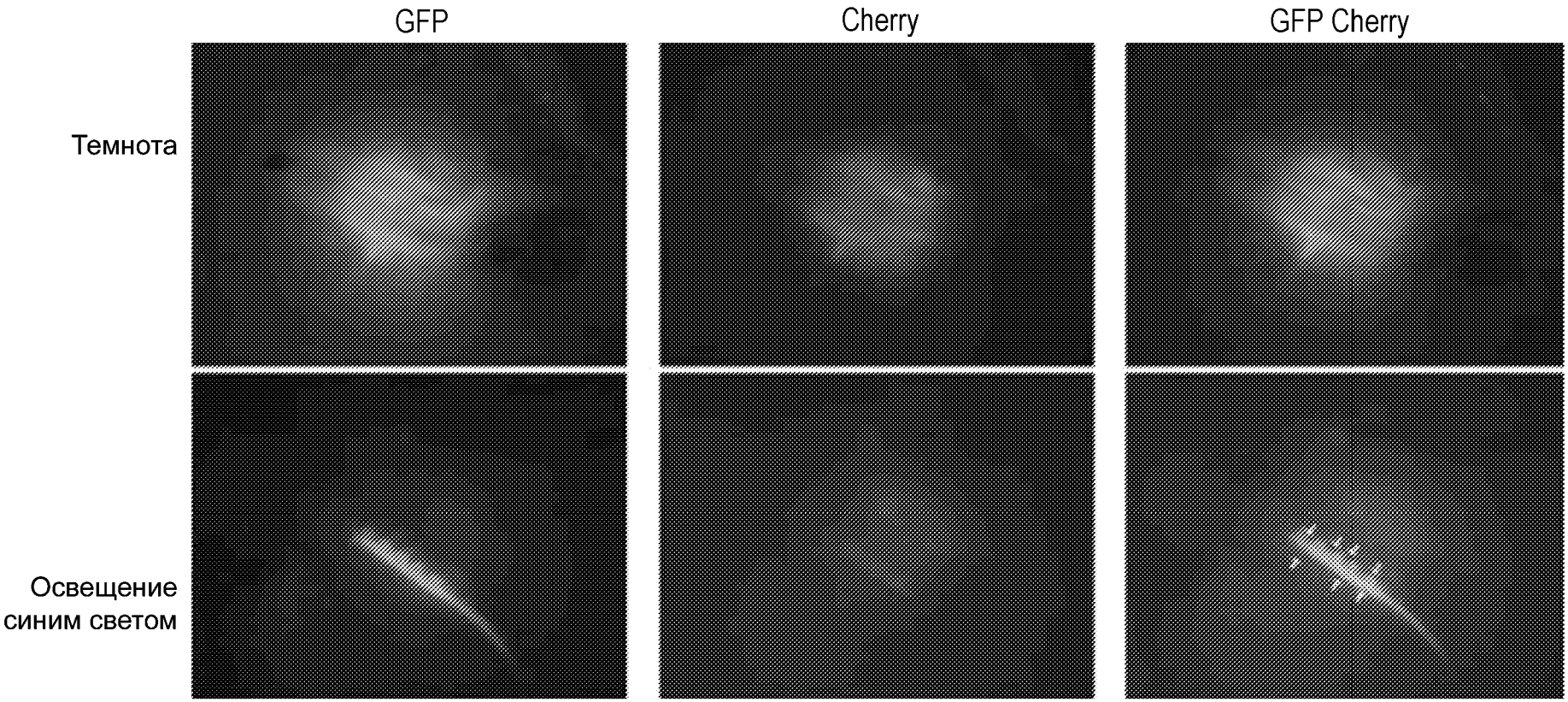
CAGGCIBN-CreCP2ACry2-CreN IRES GFP



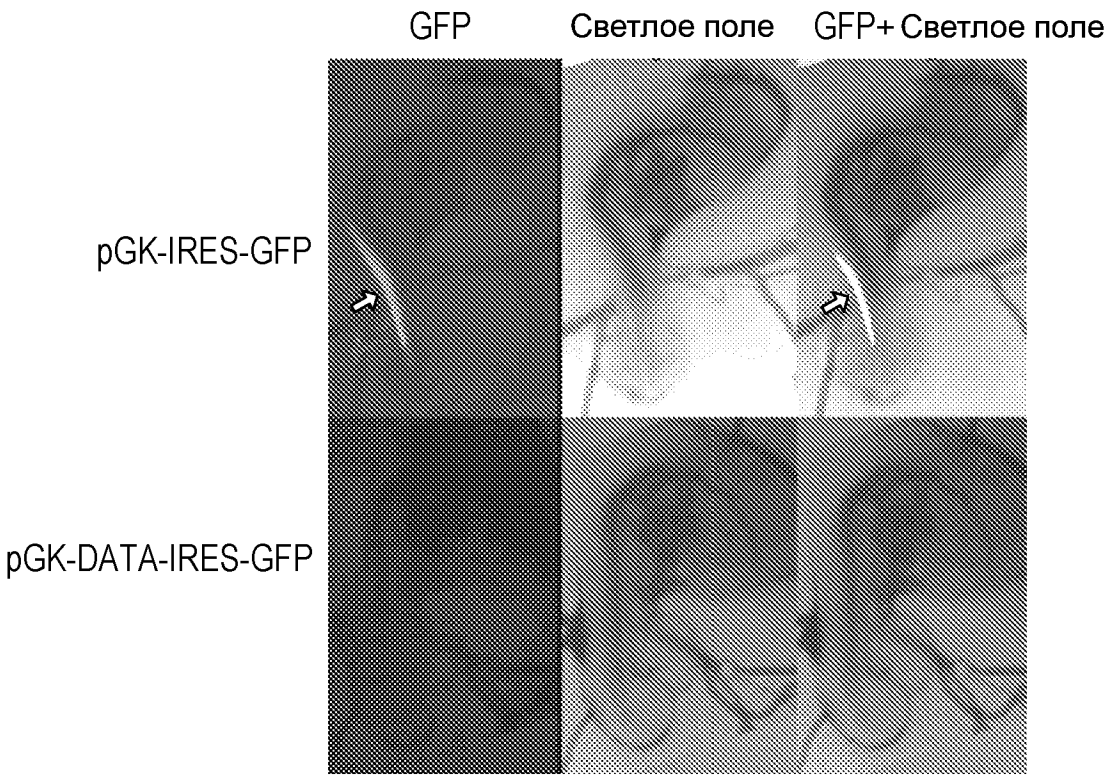
Фиг. 15F



Фиг. 16

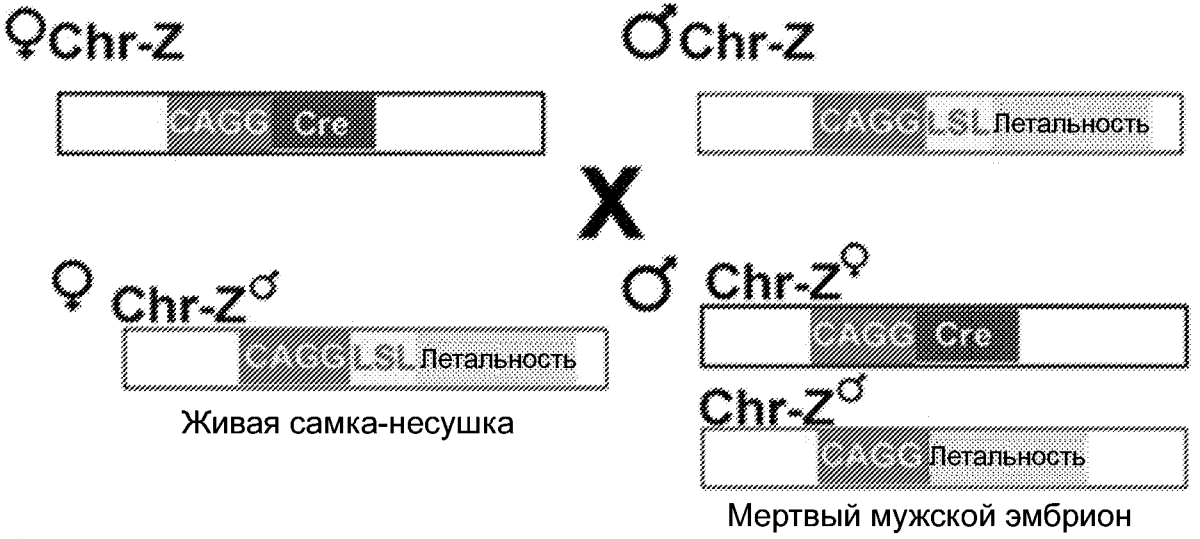


Фиг. 17

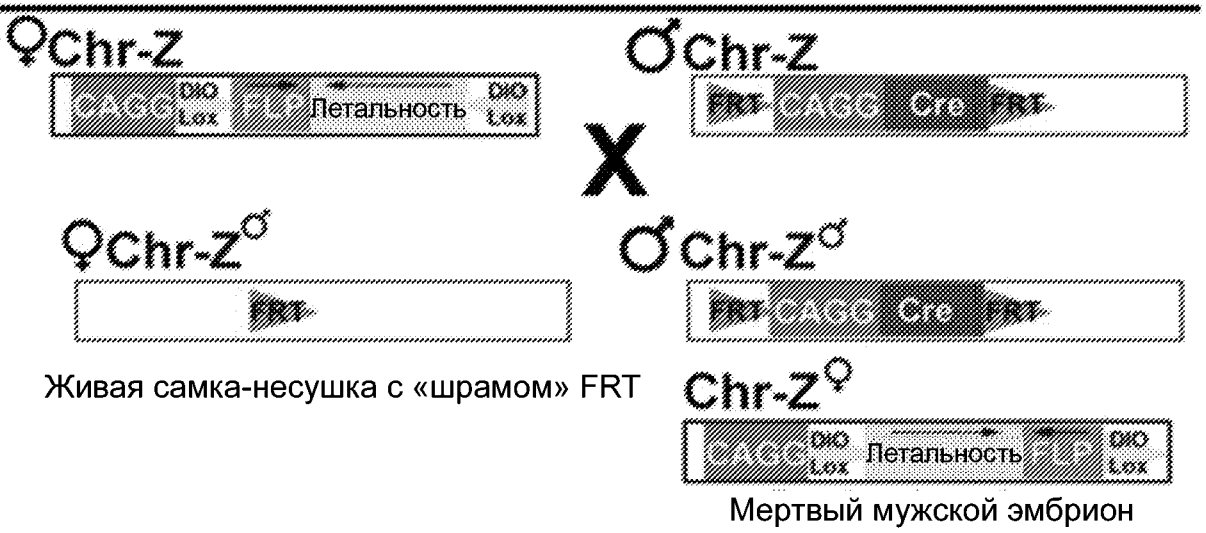

GFP
Светлое поле
GFP+ Светлое поле
pGK-IRES-GFP
pGK-DATA-IRES-GFP

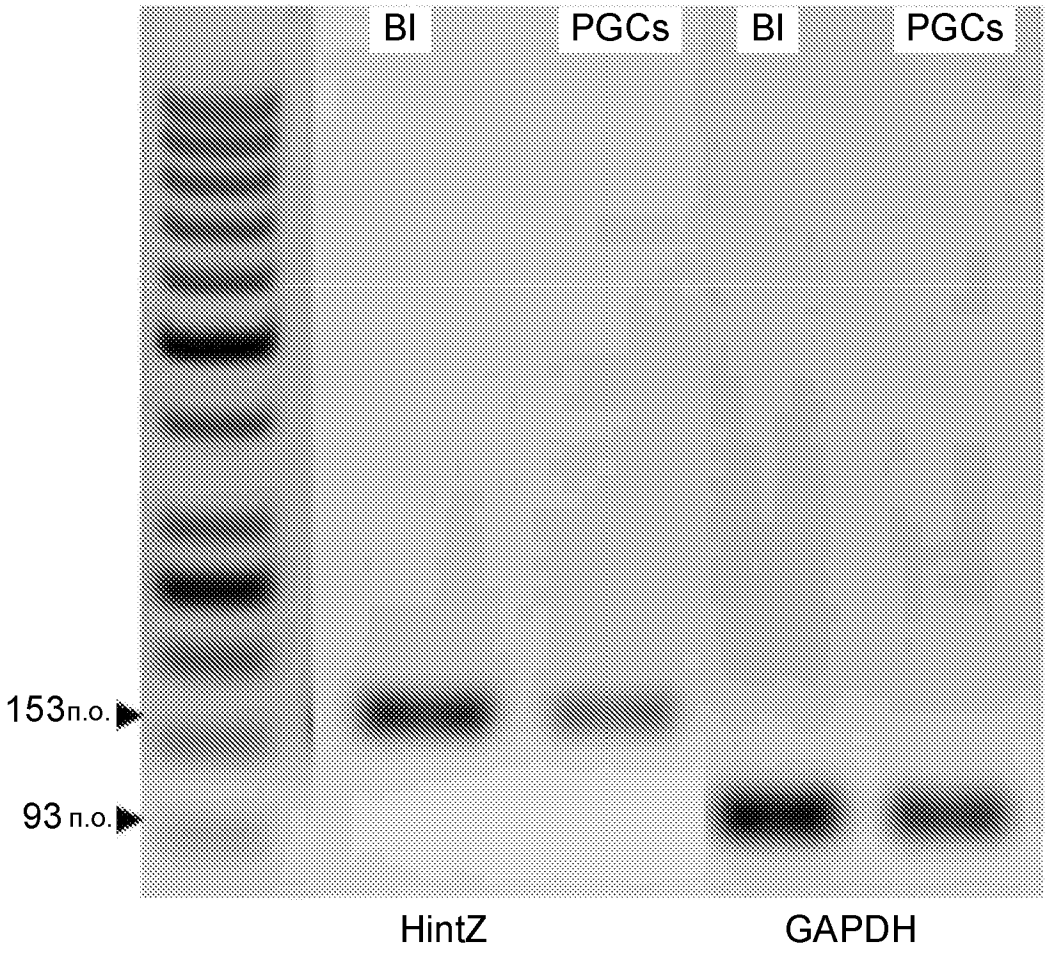
Фиг. 18

Фиг. 19A

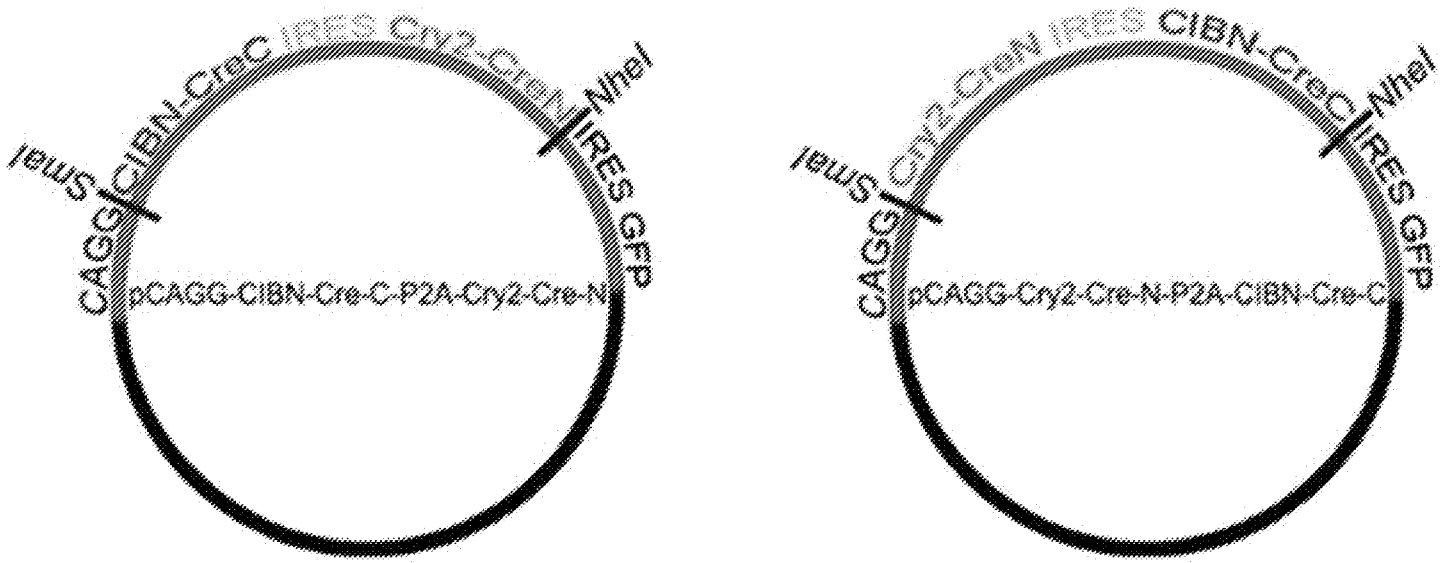


Фиг. 19B

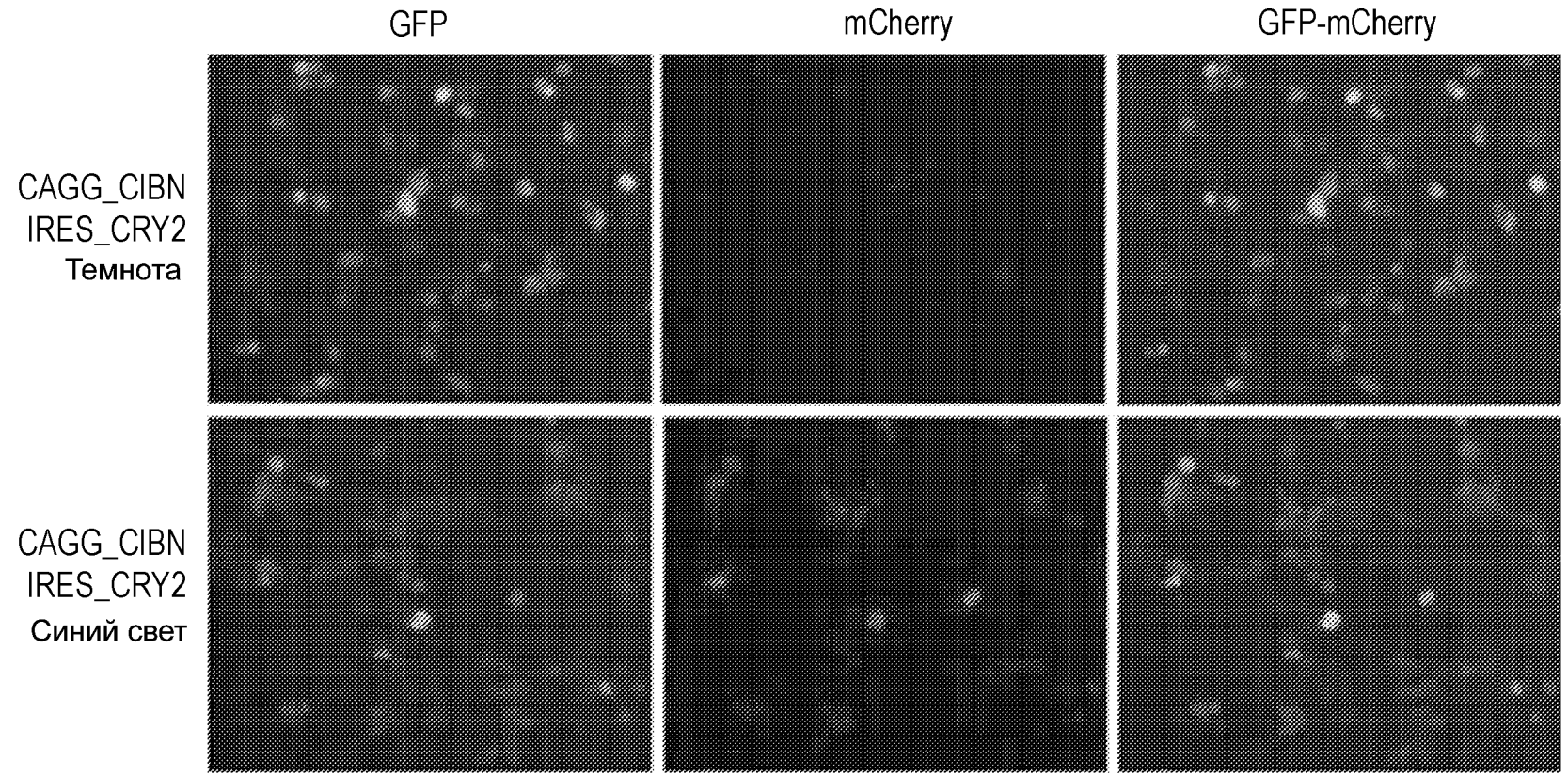




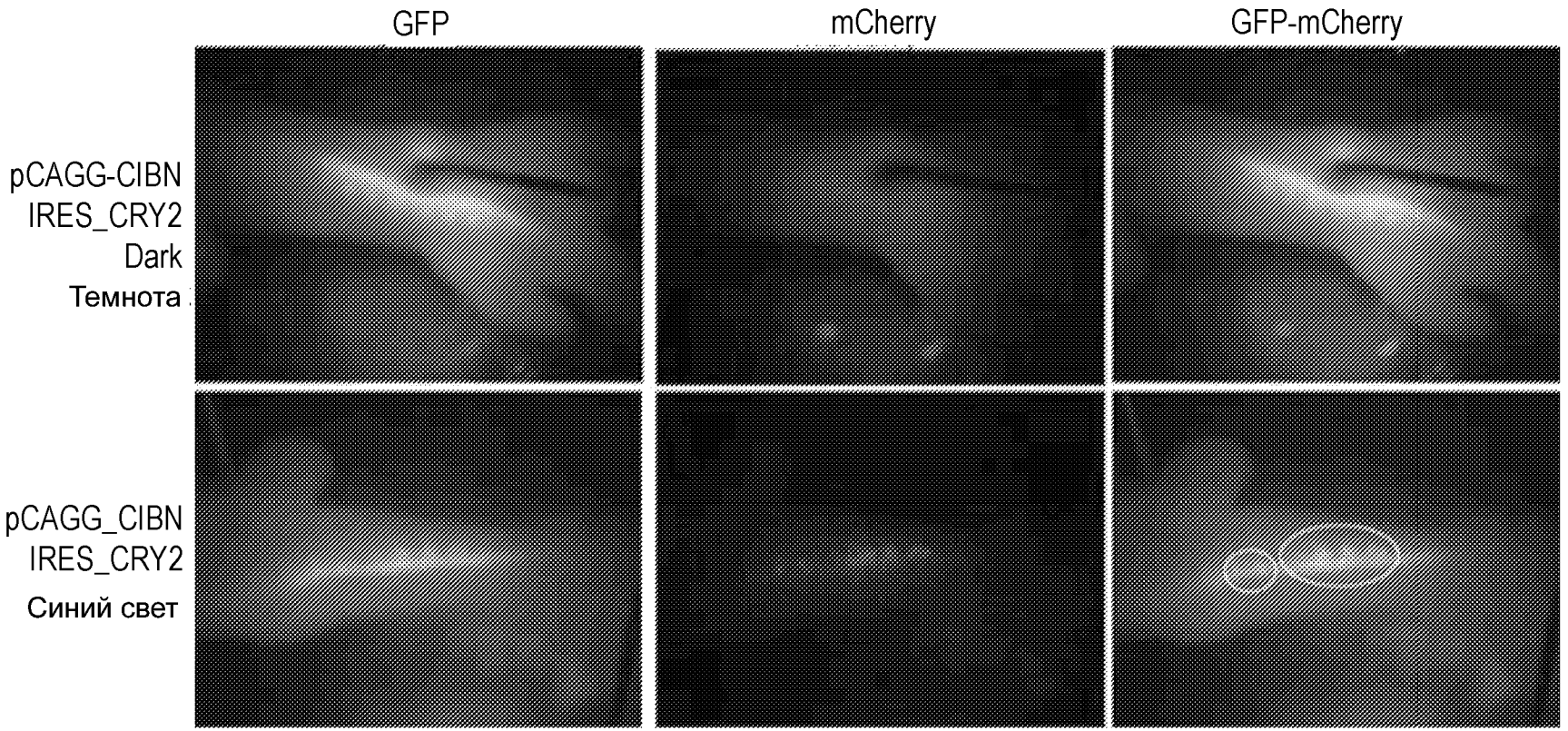
Фиг. 20


SmaI
CAGG
CIBN-CreC
IRES Cry2-CreN
NheI
IRES GFP
pCAGG-CIBN-Cre-C-P2A-Cry2-Cre-N
SmaI
CAGG
Cry2-CreN IRES CIBN-CreC
NheI
IRES GFP
pCAGG-Cry2-Cre-N-P2A-CIBN-Cre-C

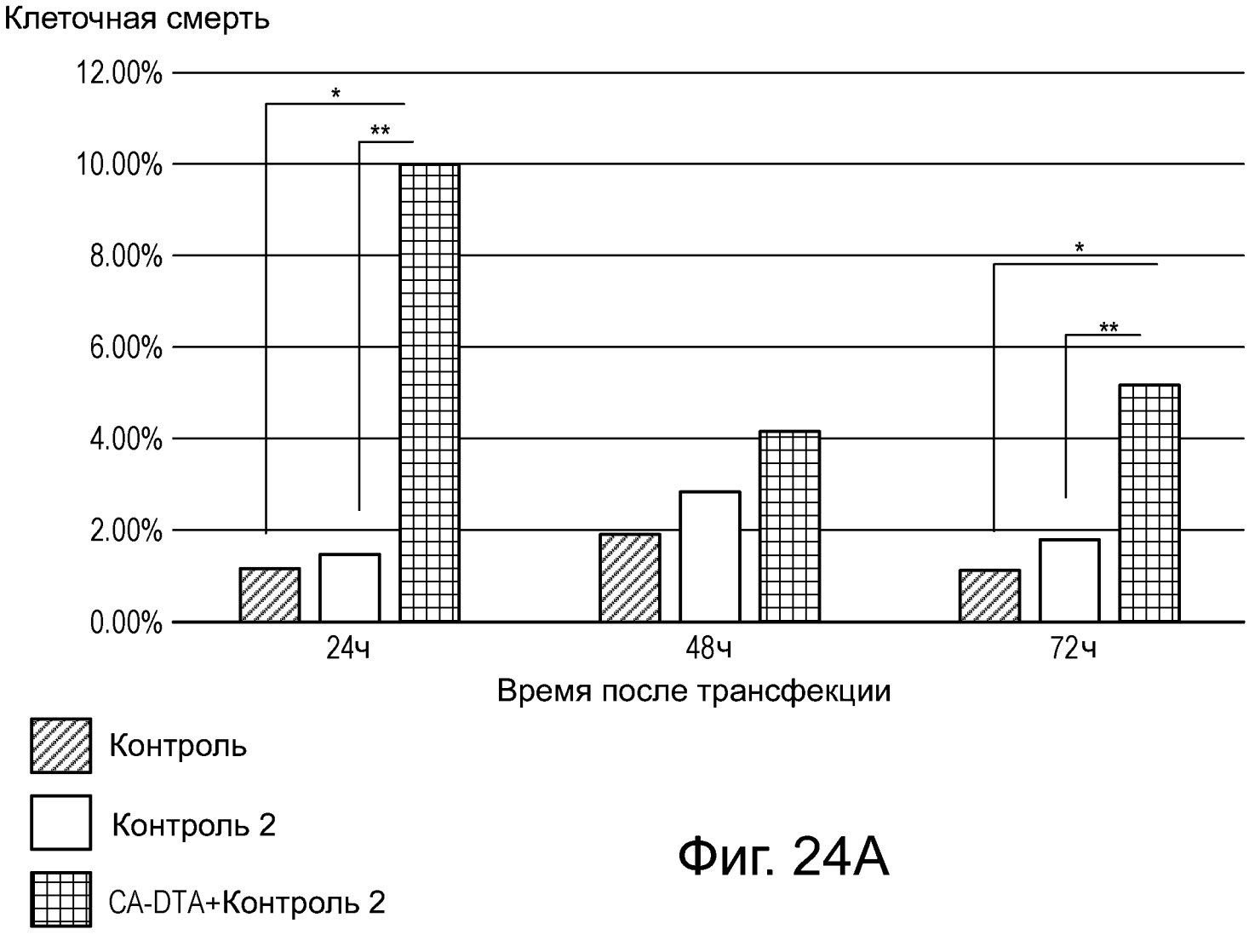
Фиг. 21


GFP
mCherry
GFP-mCherry
CAGG_CIBN
IRES_CRY2
Темнота
CAGG_CIBN
IRES_CRY2
Синий свет

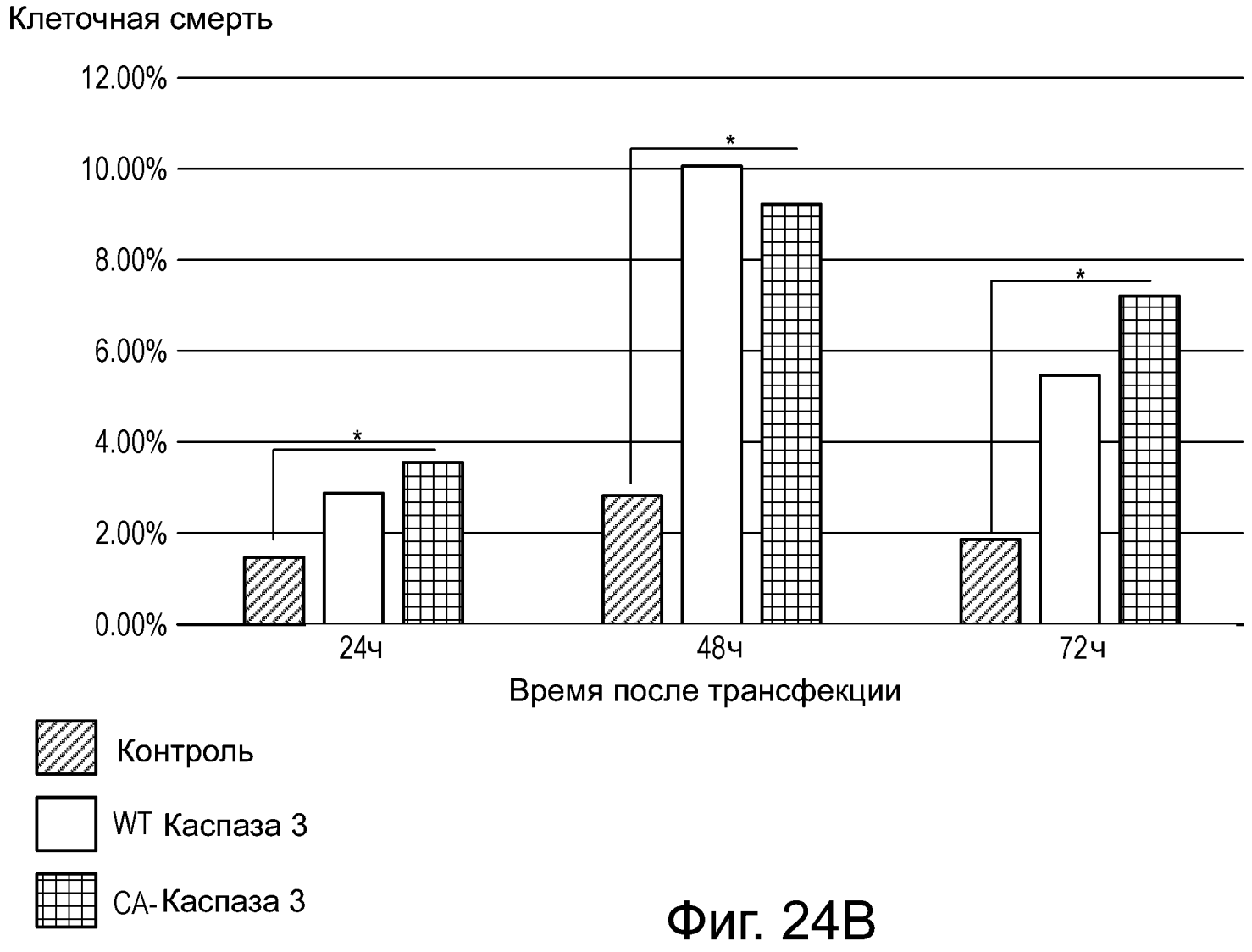
Фиг. 22


GFP
mCherry
GFP-mCherry
pCAGG-CIBN
IRES_CRY2
Dark
Темнота
pCAGG_CIBN
IRES_CRY2
Синий свет

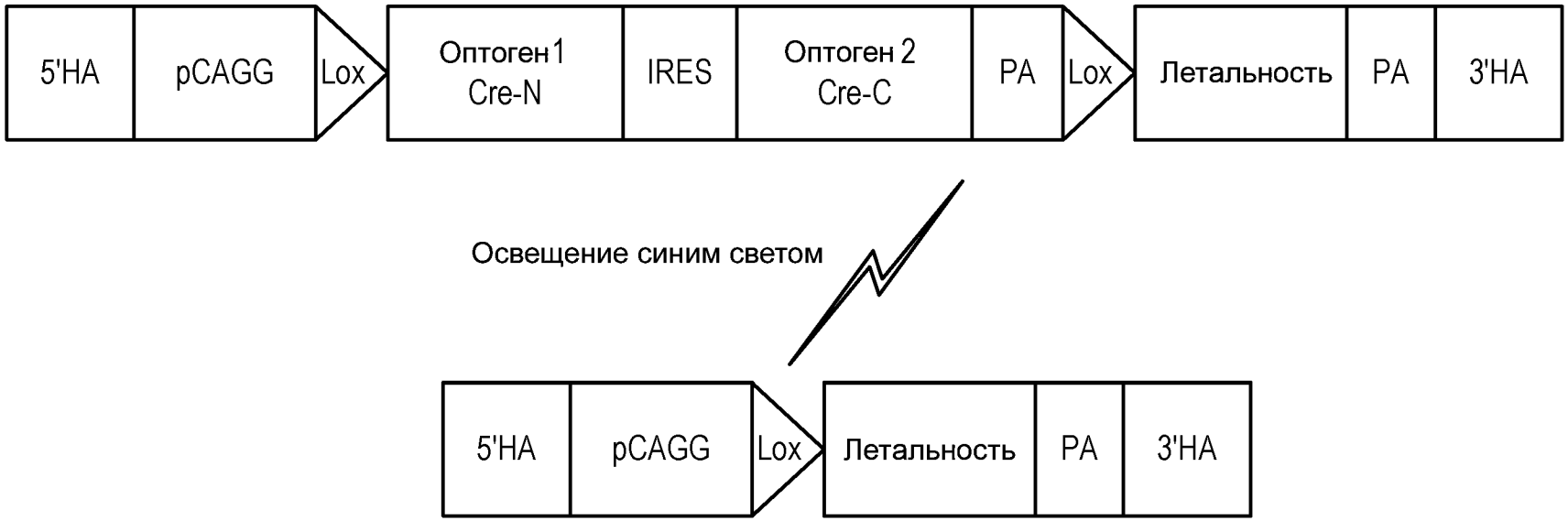
Фиг. 23


Клеточная смерть
12.00%
10.00%
8.00%
6.00%
4.00%
2.00%
0.00%
*
**
*
**
24ч
48ч
72ч
Время после трансфекции
Контроль
Контроль 2
CA-DTA+Контроль 2

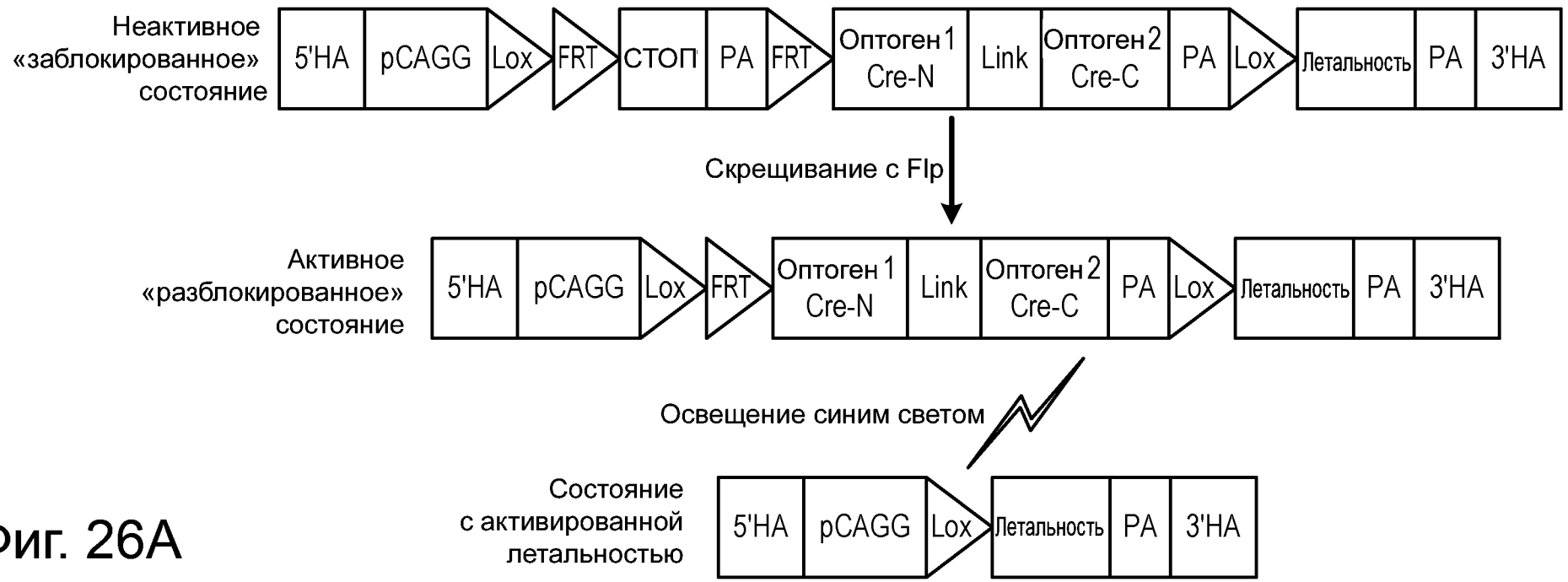
Фиг. 24A


Клеточная смерть
12.00%
10.00%
8.00%
6.00%
4.00%
2.00%
0.00%
*
*
*
24ч
48ч
72ч
Время после трансфекции
Контроль
WT Каспаза 3
CA-Каспаза 3

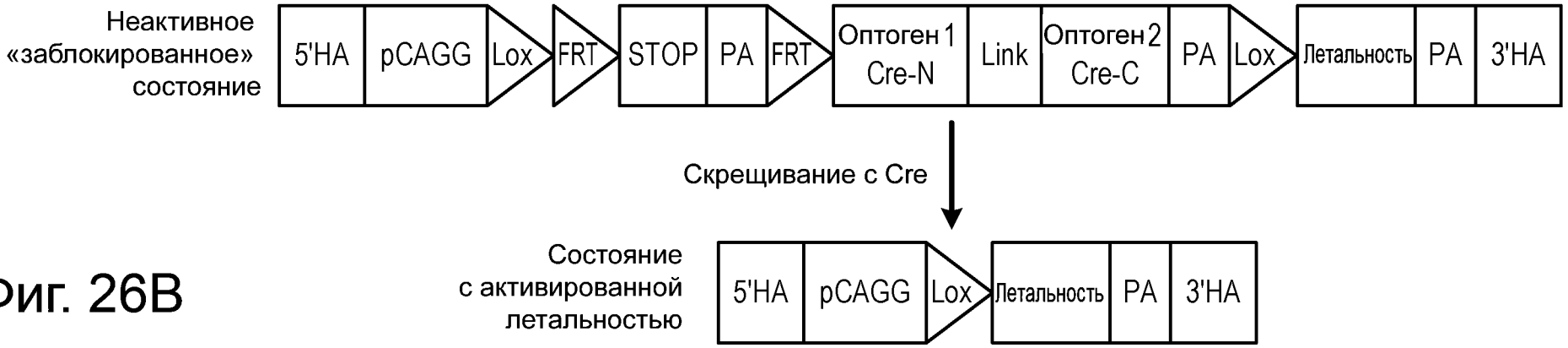
Фиг. 24B


5'HA
pCAGG
Lox
Оптоген 1
Cre-N
IRES
Оптоген 2
Cre-C
PA
Lox
Летальность
PA
3'HA
Освещение синим светом
5'HA
pCAGG
Lox
Летальность
PA
3'HA

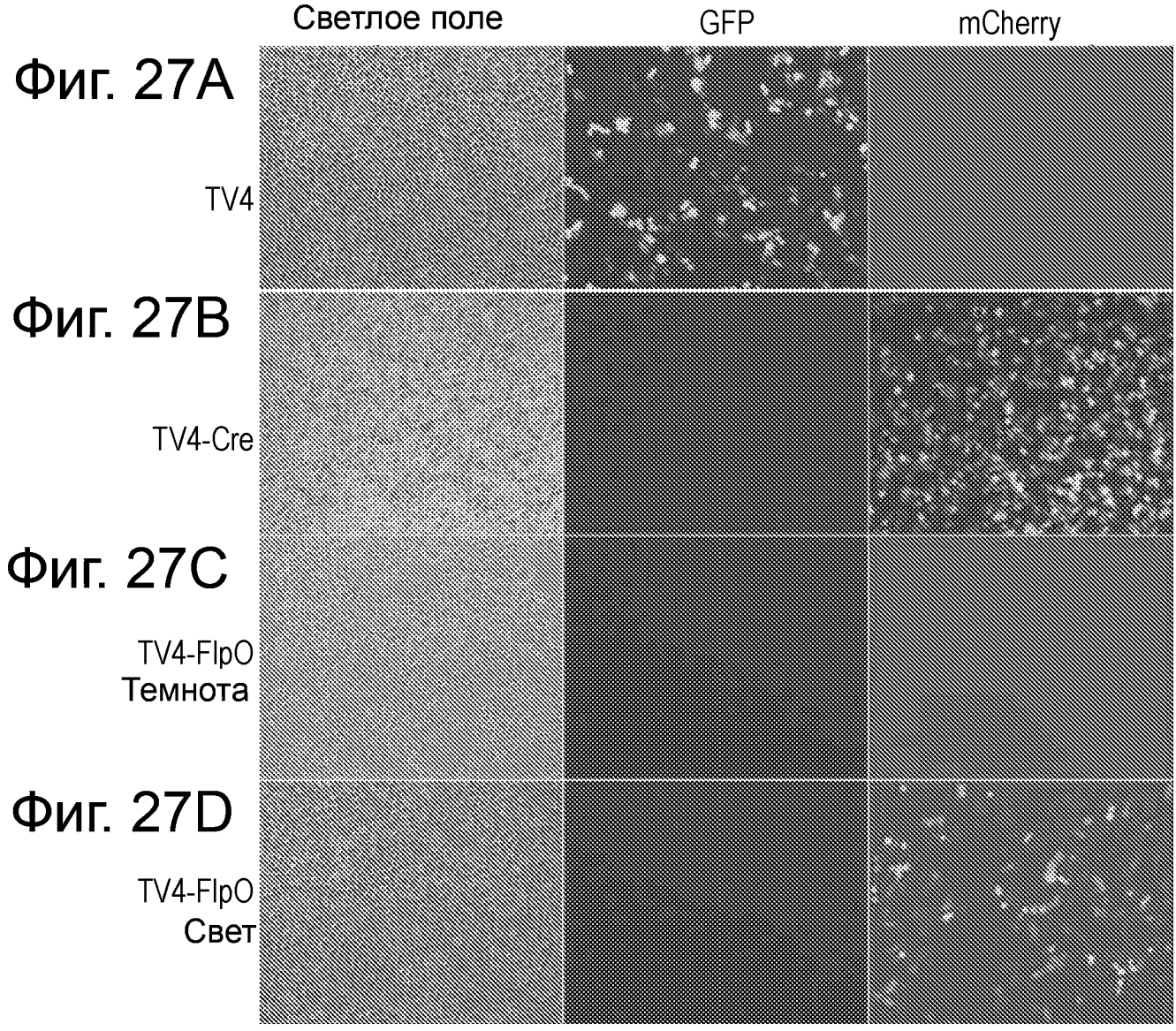
Фиг. 25



Фиг. 26A



Фиг. 26B

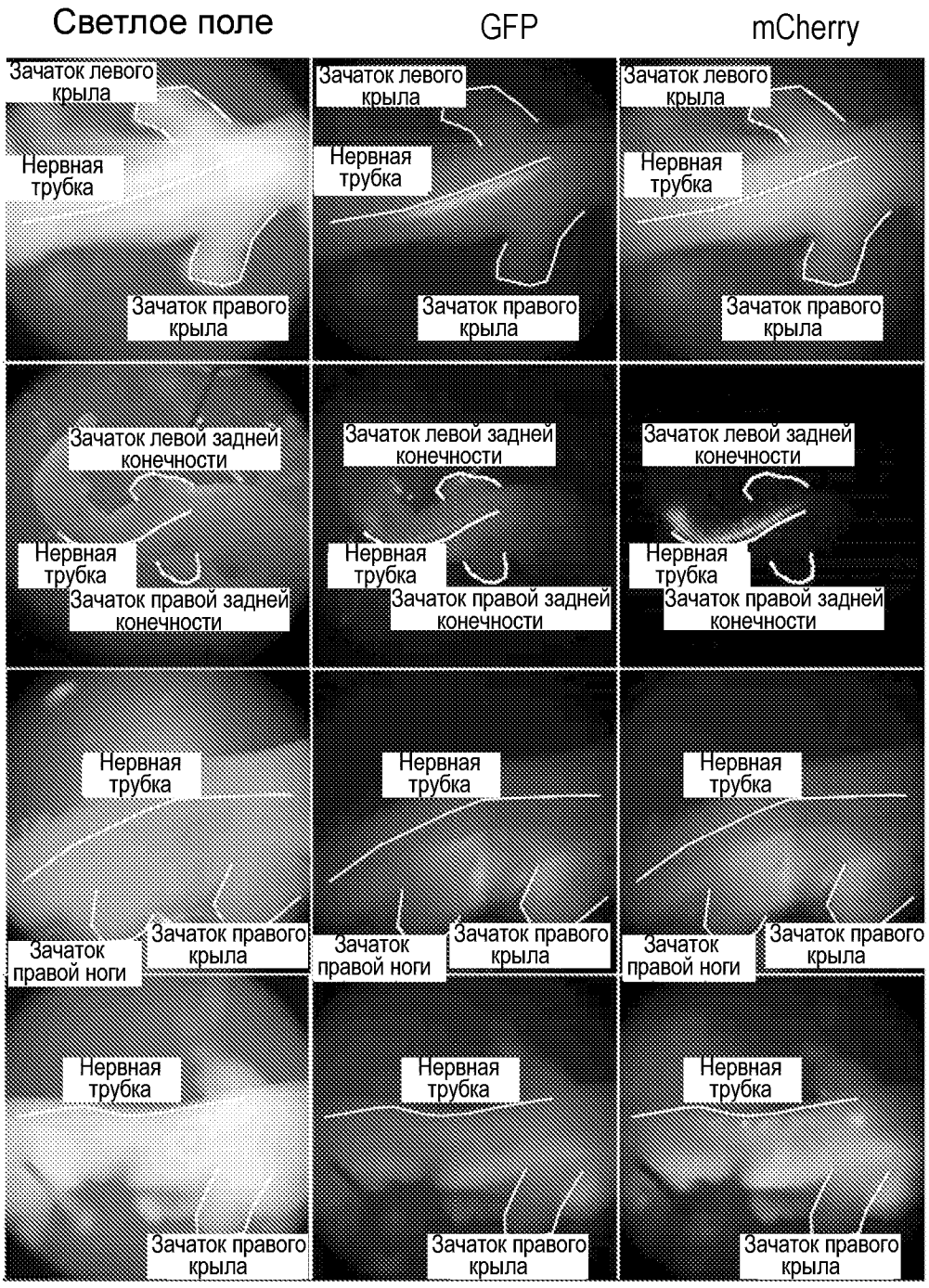

Светлое поле
GFP
mCherry
Фиг. 27A
TV4
Фиг. 27B
TV4-Cre
Фиг. 27C
TV4-FlpO
Темнота
Фиг. 27D
TV4-FlpO
Свет

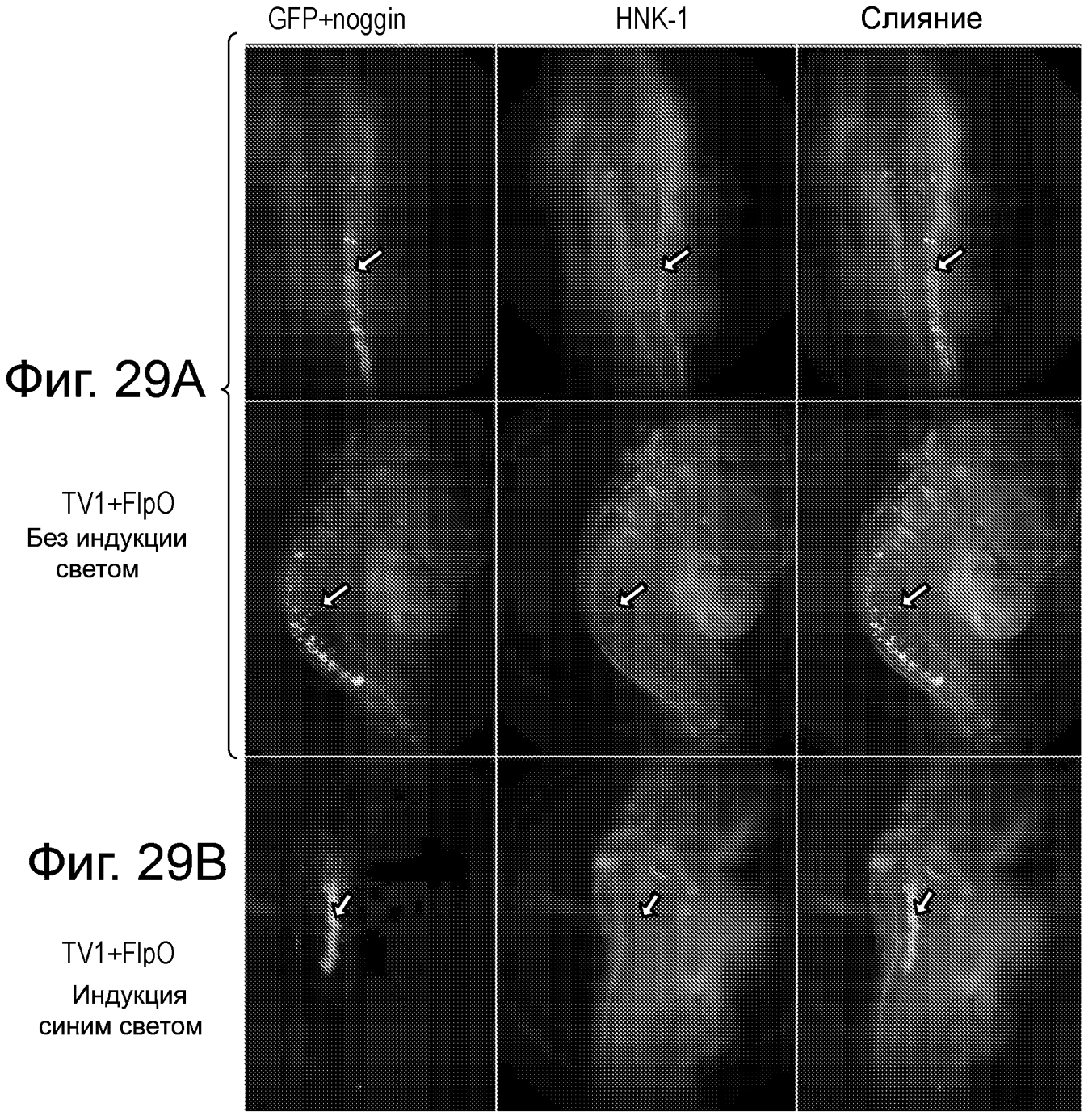
Фиг. 28A

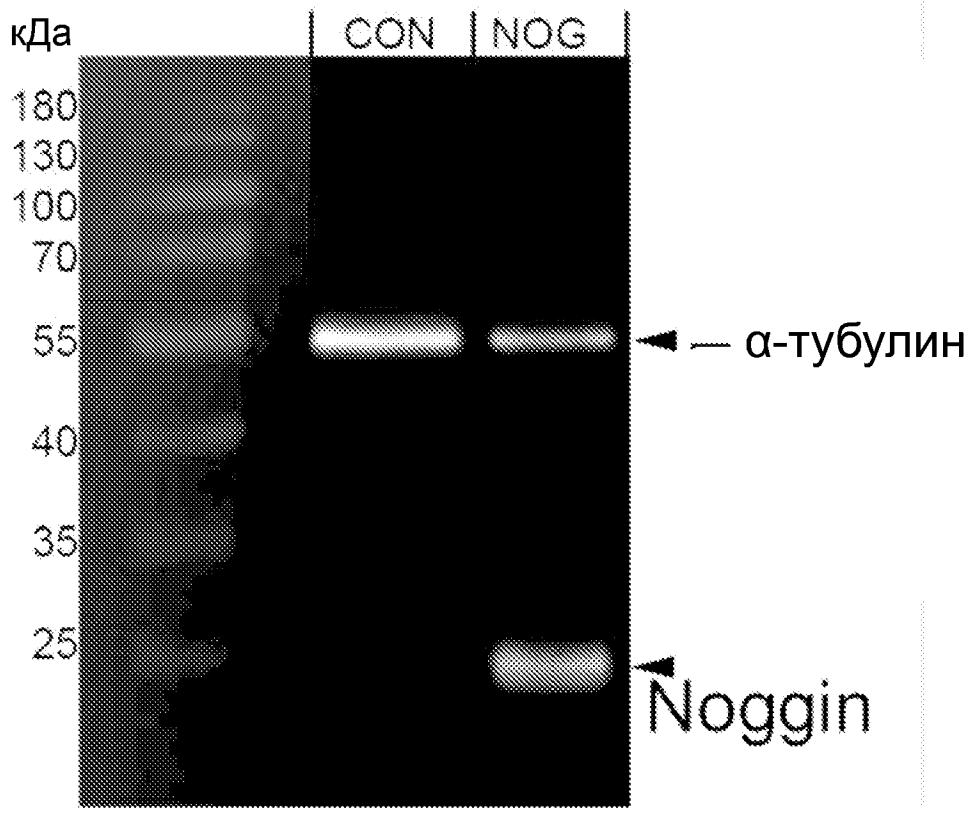
Фиг. 28B

Фиг. 28C

Фиг. 28D



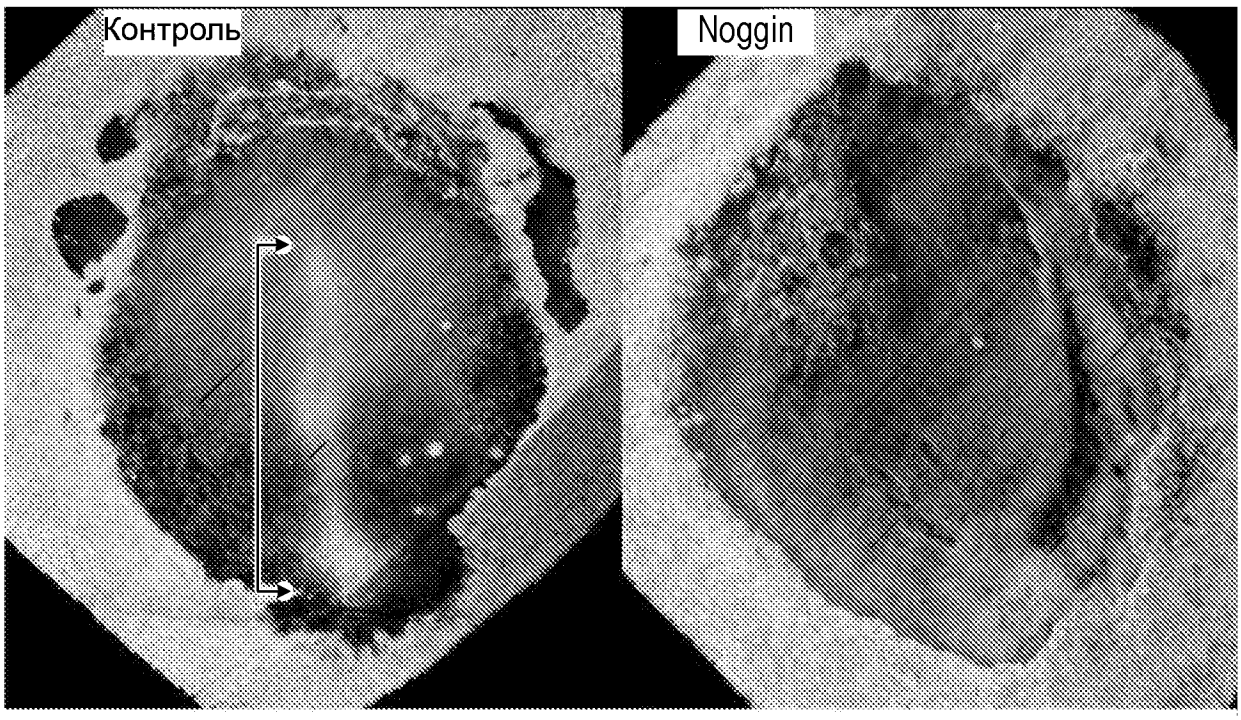

GFP+noggin
HNK-1
Слияние
Фиг. 29A
TV1+FlpO
Без индукции
светом
Фиг. 29B
TV1+FlpO
Индукция
синим светом



Фиг. 30A

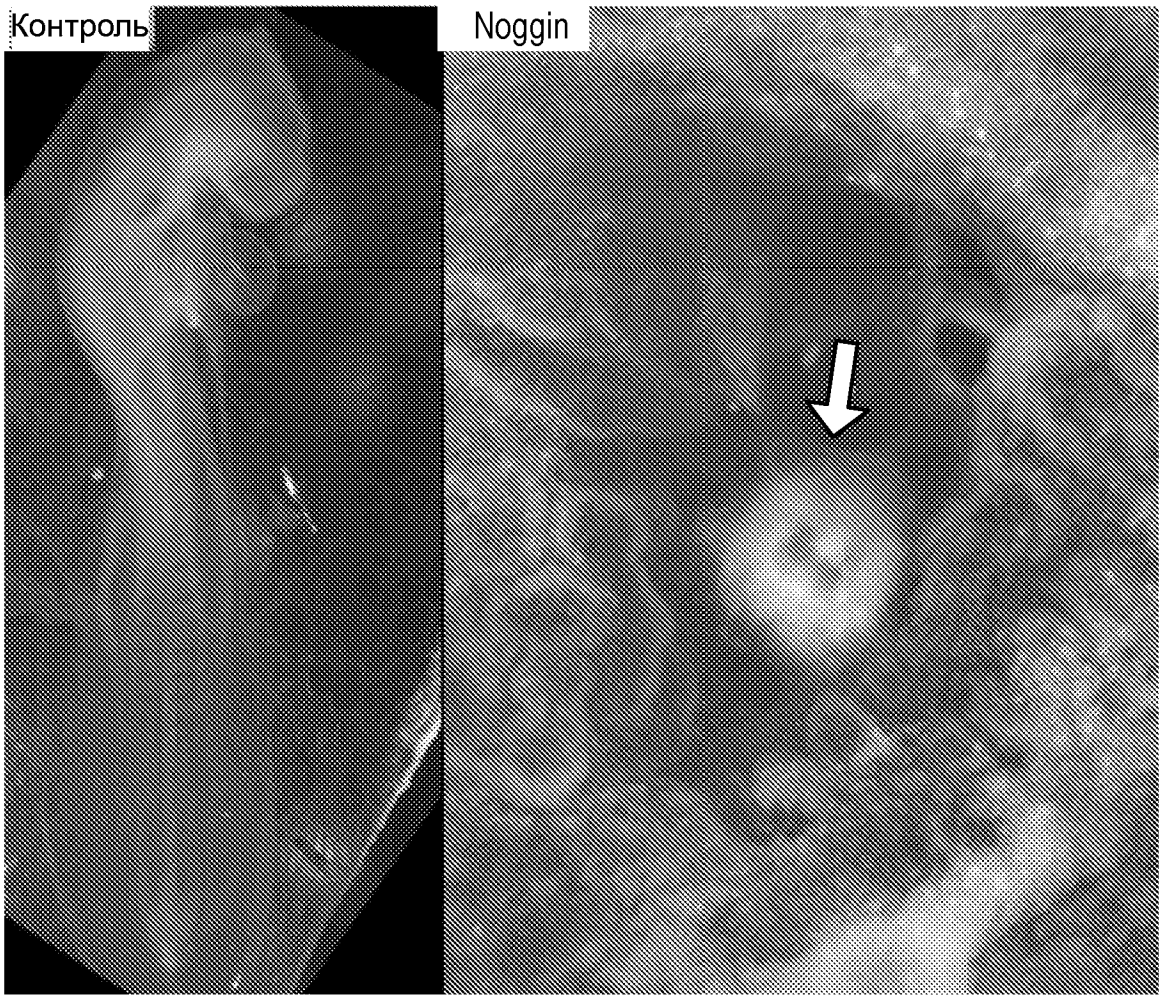
Фиг. 30B

Фиг. 30C

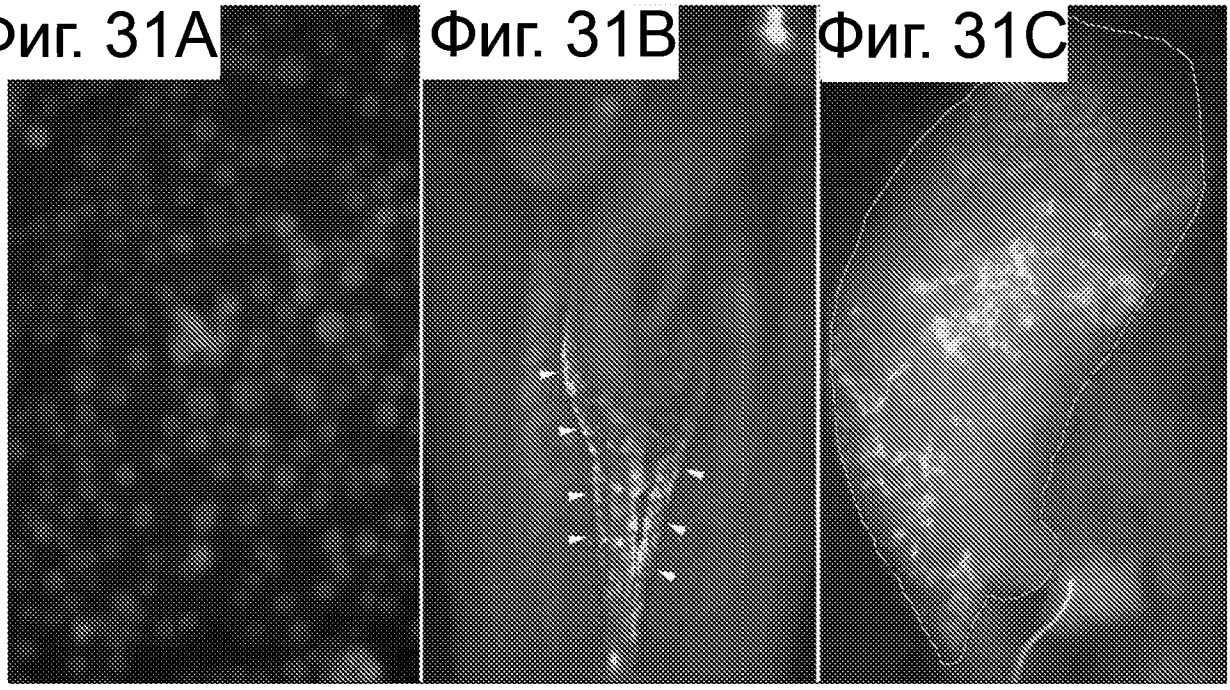


Фиг. 30D

Фиг. 30E



Фиг. 31A

Фиг. 31B

Фиг. 31C