



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108884472 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201680084065.6

(22)申请日 2016.12.30

(30)优先权数据

62/287,197 2016.01.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/069442 2016.12.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/131926 EN 2017.08.03

(71)申请人 西达-赛奈医疗中心

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 约施华·布罗尼格

莫伊兹·丹尼尔鲍尔 金基范

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 董世豪 张淑珍

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

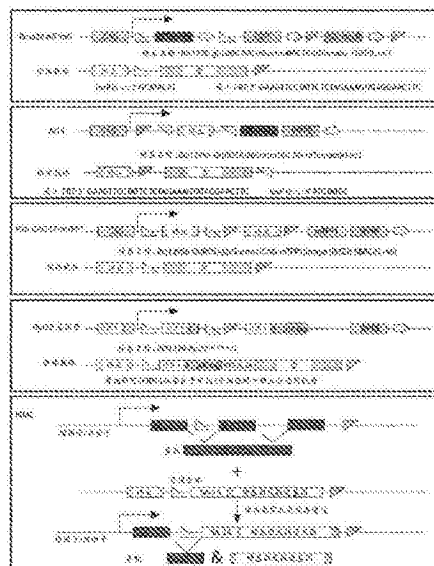
序列表5页 附图24页

(54)发明名称

用于体内双重组酶介导的盒式交换(dRMCE)的系统和方法及其疾病模型

(57)摘要

本文描述了用于体内双重组酶介导的盒式交换的供体载体和系统。还描述了用于转基因表达的一致、严格和简易研究的动物模型。进一步描述了使用这些动物模型筛选治疗药物的方法及治疗方法。



1. 一种系统,其包含:
无启动子的供体载体,其包含在转基因或RNA上游的多聚腺苷酸化信号或转录终止元件、所述转基因或RNA、及成对的重组酶识别位点;以及
一个表达载体,其包含两个编码对所述成对的重组酶识别位点特异的重组酶的基因;
或
两个表达载体,第一表达载体包含一个编码对所述成对的重组酶识别位点中的一个特异的第二重组酶的基因,而第二表达载体包含一个编码对所述成对的重组酶识别位点中的另一个特异的第二重组酶的基因。
2. 如权利要求1所述的系统,其中所述无启动子的供体载体进一步包含转录后调控元件。
3. 如权利要求1所述的系统,其中所述无启动子的供体载体还包含在所述转基因或RNA下游的多聚腺苷酸化信号。
4. 如权利要求1所述的系统,其中所述无启动子的供体载体包含:
PGK多聚腺苷酸化信号(pA);
三聚SV40pA;
所述转基因或RNA;
loxP和翻转酶识别靶标(FRT);
兔β球蛋白pA;及
土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。
5. 如权利要求1所述的系统,其中所述成对的重组酶识别位点为loxP和翻转酶识别靶标(FRT),且所述重组酶为cre和flp。
6. 如权利要求1所述的系统,其中所述RNA为siRNA。
7. 如权利要求1所述的系统,其中所述RNA为shRNA。
8. 如权利要求1所述的系统,其中所述RNA为sgRNA。
9. 如权利要求1所述的系统,其中所述转基因或所述RNA包含疾病相关突变。
10. 一种无启动子的供体载体,其包含:
在转基因或RNA上游的多聚腺苷酸化信号或转录终止元件;
所述转基因或RNA;及
成对的重组酶识别位点。
11. 如权利要求10所述的无启动子的供体载体,其还包含转录后调控元件。
12. 如权利要求10所述的无启动子的供体载体,其还包含在所述转基因或RNA下游的多聚腺苷酸化信号。
13. 如权利要求10所述的无启动子的供体载体,其包含:
PGK多聚腺苷酸化信号(pA);
三聚SV40pA;
转基因或RNA;
loxP和翻转酶识别靶标(FRT);
兔β球蛋白pA;及
土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

14. 一种非人动物模型,其包含如权利要求1所述的系统。
15. 如权利要求14所述的非人动物模型,其中双重组酶介导的盒式交换已经发生。
16. 如权利要求14所述的非人动物模型,其中所述动物为小鼠。
17. 一种产生如权利要求14所述的非人动物模型的方法,其包括:
提供如权利要求1所述的系统;
向所述非人动物施用所述系统;以及
使所述非人动物经历电穿孔。
18. 一种筛选药物候选物的方法,其包括:
提供如权利要求14所述的非人动物模型;
施用所述药物候选物;以及
评价所述药物候选物对所述非人动物模型的作用。
19. 一种治疗受试者的疾病或病状的方法,其包括:
提供包含如权利要求1所述的系统的细胞;及
向所述受试者施用所述细胞。
20. 如权利要求19所述的方法,其中所述细胞为干细胞。
21. 如权利要求19所述的方法,其中双重组酶介导的盒式交换已经在所述细胞中发生。

用于体内双重组酶介导的盒式交换 (dRMCE) 的系统和方法及其疾病模型

[0001] 背景

[0002] 本文中的所有出版物均以引用的方式并入,达到如同每个单独的出版物或专利申请被具体和单独地指明以引用的方式并入的程度。以下描述包括可对理解本发明有用的信息。这并不是承认,本文所提供的任何信息是现有技术或者与当前要求保护的发明相关,或者被明确地或含蓄地引用的任何出版物是现有技术。

[0003] 基因工程改造的小鼠模型 (GEMM),特别是能实现条件性体细胞嵌合的那些,已成为以时间和组织特异性方式进行反向遗传学的黄金标准。鉴于GEMM产生是一个费力的过程,许多替代性非GEMM模型,如电穿孔介导 (EP) 和病毒基因递送日益用作生成体细胞嵌合体的更快速手段,如肿瘤建模。两项技术可实际上靶向身体内的任何地方。除四环素调节的系统 (TRE) 和shRNA之外,EP近来已结合转座子,如piggyBac (PB-EP),使得能够在体内实现稳定的和可诱导的转基因作用及肿瘤生成。

[0004] 尽管提供了速度和灵活性,PB-EP和病毒方法还具有许多缺陷。病毒载体具有有限的有效负载,引发免疫应答且需要复杂的制备专门技能,并且PB-EP和病毒递送都受到不可预测的基因组整合模式、后续插入诱变及表观遗传学转基因沉默之累。对于功能获得 (GOF) 突变的询问来说最重要的是,两种非GEMM技术都产生克隆基因型/表型变异性,这常常是由转基因拷贝数变异 (CNV) 或染色体位置变异性引起,而GEMM确保在小鼠工程改造期间定量的恒定的基因剂量和接合性。因此,GOF蛋白功能的基于非GEMM的评价常常被诸如过度表达假象 (overexpression artifact)、非预期的细胞毒性及转录压制 (transcriptional squelching) 的这类超生理现象造成混乱。

[0005] 因此,在本领域中对于用于研究应用、疾病建模、药物筛选及疗法的这些类型的动物模型和工具仍有未满足的需要。

[0006] 附图简述

[0007] 在所参考的图中说明了示例性实施方案。希望本文所公开的实施方案和附图被认为是说明性的而不是限制性的。

[0008] 图1 (a-f) 示出了根据本发明的各种实施方案,杂合mTmG中的dRMCE在体内和体外生成三个重组谱系。a) Flp-Cre表达载体在dRMCE供体载体存在下催化Rosa26^{mTmG}等位基因上的Cre介导的切除或dRMCE,由此产生两种截然不同的重组产物。b) 杂合的Rosa26^{WT/mTmG} mNSC的核转染产生了三个可能的谱系:tdTomato+、EGFP+和TagBFP2+。c) 具有非重叠荧光色的代表性细胞的实时成像。比例尺:100 μ m。d) 用Flp-Cre表达载体与供体质粒的DNA混合物靶向P2杂合的Rosa26^{WT/mTmG}幼仔中的VZ/SVZ细胞的标准产后电穿孔方案。e) 产后EP重现了体外核转染实验并且到EP后2周时产生嗅觉神经发生和纹状体胶质发生。比例尺:100 μ m。f) 不同浓度的重组酶与供体质粒的DNA混合物在体内产生各种效率的MADR和Cre-切除重组反应,说明了体内dRMCE反应效率可被调节。

[0009] 图2 (a-g) 示出了根据本发明的各种实施方案,使用体内dRMCE的体细胞嵌合体的快速生成可用于自生肿瘤建模。a-b) 用Hras^{G12V}致癌基因在纯合的Rosa26^{mTmG} P2幼仔中的

产后EP产生两种不同的肿瘤类型(仅蓝色的Rosa26^{HrasG12V×2}和蓝色与绿色的Rosa26^{HrasG12V×1})。c) EP后3个月纯合的mTmG中的代表性肿瘤形成。仅蓝色的Rosa26^{HrasG12V×2}细胞占据比蓝色和绿色的Rosa26^{HrasG12V×1}更大的肿瘤部分。比例尺:2mm。d-e、j) 针对Nf1、Pten和Trp53的miR-E shRNA的供体构建体连接至TagBFP2报道基因,且代表性6月龄小鼠矢状切面显示TagBFP2+细胞为Pdgfra+。比例尺:200μm和20μm。f-g) 编码小儿神经胶质瘤突变的两种组合的两个供体构建体及在P50脑中的杂合的Rosa26^{WT/mTmG}中的后续增生。比例尺:2mm。i) 如通过qPCR所测量的,针对Nf1、Pten和Trp53的miR-E shRNA的供体构建体产生大约80% mRNA水平敲低效率。

[0010] 图3(a-d)描绘了根据本发明的各种实施方案,通过FACS分析在杂合的mTmG mNSC中dRMCE效率的测量以及在非克隆群水平下正确的蛋白质翻译的证实。a) 所采用的重组酶表达质粒的示意图。b) FACS分析表明在神经干细胞中的近似dRMCE效率,并且Flp-2A-Cre与Flp-IRES-Cre在它们的催化效率方面无明显差异。c) 分选的细胞表达Hras^{G12V},而不表达tdTomato或EGFP。比例尺:50μm。d) 蛋白质印迹表明来自非克隆聚集细胞的正常转基因产生及其在FACS阴性群中的缺乏。还观察到tdTomato表达的去除。

[0011] 图4(a-g)描绘了根据本发明的各种实施方案,可用于询问基因的过度表达和GOF突变的dRMCE相容性诱导型供体构建体。a) dRMCE相容性TRE质粒。b) 用a)中的质粒核转染杂合的mTmG mNSC,用嘌呤霉素处理并且转变为无色群。比例尺:10μm。c) 组成型地表达rtTA-V10-AU1的细胞系中的EGFP表达的诱导。比例尺:50μm。d) 在强力霉素处理后表达D111且具有整个群的均匀表达分布的TRE细胞系。比例尺:20μm。(e-g) 在生成4种不同的dRMCE供体质粒之后(全部都携带rtTA-V10-AU1且各自携带SM-FP-Flag、SM-FP-Myc、SM-FP-HA和SM-FP-V5),将携带单个Rosa26等位基因的杂合的mTmG mNSC用所有上述四种SM-FP变体质粒进行核转染,用嘌呤霉素处理且用强力霉素处理。SM-FP探针的诱导显示不存在SM-FP信号的重叠,证明每个细胞在Rosa26 CAG启动子控制下恰好有一个SM-FP变体,并且4种颜色的成比例的比率还显示4种SM-FP供体质粒各自以相似的效率重组。

[0012] 图5(a-c)描绘了根据本发明的各种实施方案,PCR筛选和蛋白质印迹分析证实了dRMCE介导的tdTomato盒切除及在Rosa26mTmG基因座处供体盒的整合。a) 经受在所位点处的PCR分析的质粒和等位基因的示意图。所用的引物列于表1中。b) PCR筛选分析揭示rtTA-V10-AU1盒正确地整合于对嘌呤霉素处理有抗性的细胞中的CAG启动子的下游。c) 来自图4c的细胞系的蛋白质印迹分析显示rtTA-V10-AU1的表达以及强力霉素诱导后EGFP的表达,并且还说明嘌呤霉素抗性细胞由Rosa26基因座而不是由任何其它非特异性整合体表达嘌呤霉素。

[0013] 图6(a-c)显示根据本发明的各种实施方案在VZ/SVZ中的体内dRMCE在EP(且后续去除膜-tdTomato表达)后2天可检测且在EP后2周是稳定的。a) 在EP后2天,细胞开始表达TagBFP2。比例尺:50μm;插图:10μm。b) EP后2周的胶质发生和放射状胶质细胞。箭头指示在VZ处的稀少的绿色和蓝色双阳性细胞。比例尺:100μm;插图:20μm。c) 一对TagBFP2+卫星神经胶质的高倍放大共焦图像,其对于tdTomato和EGFP呈阴性。比例尺:10μm。

[0014] 图7(a-c)示出了根据本发明的各种实施方案,Hras^{G12V}赋予了基因剂量依赖性差异表型。a) 在pBase介导的整合之后更亮的EGFP-Hras^{G12V}细胞表达磷酸化的Rb1。比例尺:200μm。b) 与图1C和图7C相关;比例尺:1mm。c) 来自b)的区域1和2的放大图像显示磷酸化的

Rb1表达大部分与仅蓝色的细胞相关。比例尺:50 μ m。

[0015] 图8(a-b)描绘了根据本发明的各种实施方案在纹状体中的Hras^{G12V}重组的mTmG细胞的检查。a) EP后两周显示经历Cre介导的tdTomato盒切除的EGFP+细胞与具有成功的dRMCE的HrasG12V+细胞之间明显的谱系分化。比例尺:100 μ m。b) 在EP混合物中低至10ng/ μ l的重组酶-表达载体可在体内催化dRMCE。比例尺:100 μ m。

[0016] 图9(a-b)描绘了根据本发明的各种实施方案用于体内dRMCE的对照电穿孔实验。a) 用hyPBase整合的EGFP报道基因加上各种供体载体和重组酶在VZ/SVZ中经过EP的细胞的谱系追踪到EP后2周时不显示任何增生。比例尺:100 μ m。b) 具有反向loxP取向的供体载体未能表达Hras^{G12V}且不产生增生。比例尺:100 μ m。图中的序列-上部序列loxP:ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT(SEQ ID NO:19);下部序列loxP:ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT(SEQ ID NO:20)。

[0017] 图10(a-e)描绘了根据本发明的各种实施方案通过qPCR的Nf1、Pten和Trp53mRNA的敲低及在神经元谱系中这些突变的休眠。a) 在EP后3个月,表达连接到TagBFP2报道基因的多miR-E的细胞主要是Pdgfra+OPC。比例尺:100 μ m。b) 在EP后6个月时稳定表达TagBFP2-多miR-E的嗅球神经元没有显示出异常转化的迹象。比例尺:200 μ m。c) 通过mRNA定量的多miR-E敲低效率。使用生物学重复。d-e) Nf1、Trp53和Pten的附加型Cas9介导的多重突变致使piggyBac转置的EGFP+细胞转化至定位于白质束附近的Olig2+肿瘤中。

[0018] 图11(a-j)描绘了根据本发明的各种实施方案通过体外和体内免疫组织化学进行的Pdgfra和V5标记的Trp53表达的证实。a) 在杂合的mTmG mNSC中dRMCE之后的转基因表达的体外评估显示核EGFP与Pdgfra、V5(Trp53R270H)和P53的共表达。注意到具有膜EGFP的受污染mG细胞的存在并且无tdTomato或转基因表达。比例尺:50 μ m。b) Trp53与核EGFP(H3f3a)共表达的证实。比例尺:50 μ m。c) MADR G34R/Pdgfra/Trp53与诱导Atrx的CRISPR/Cas9靶向的质粒的组合表达不加速肿瘤形成。d) Atrx在K27M肿瘤中的大多数EGFP+细胞中表达。EGFP+细胞的小亚组(黄色箭头)已丧失Atrx抗原性。e) EP后100天的G34R细胞表达Atrx。f) CRISPR/Cas9靶向造成经过EP的细胞中Atrx的高效损失。g) EP后120天皮质浸润的G34R肿瘤。注意到在肿瘤背侧的高Olig2表达,该表达在肿瘤腹侧于EGFP+增生方面有减弱(黄色箭头)。h) EP后120天的K27M肿瘤主要是皮质下的。i) 衍生自Nf1和Trp53的突变的Cas9介导的神经胶质瘤展现H3K27Me过度甲基化。i-1示出了在肿瘤边缘处的染色图案差异。j) 单克隆抗体证明H3f3a转基因的表达在整个Rosa26H3f3a-K27M/Pdgfra/Trp53肿瘤中是一致的。*-来自Cy5波长的通道伪彩色绿色以便于增强对比度。

[0019] 图12描绘了根据本发明的各种实施方案,易受体MADR或MADR MAX的替代报道基因小鼠,及所述方法向具有基因捕获等位基因的Ribotrap和IKMC贮库小鼠品系的扩展。现有基于CAG的报道基因小鼠,其在构造上类似于mTmG小鼠且与体内MADR相容以完成突变体谱系追踪研究或使用Ribotrap杂合子的正交RNA分离。另外,此方法可扩展至数千基因捕获小鼠,其例如侧接有围绕重要外显子的loxP和FRT。在这类基因座处的体内MADR能够实现1) 在基因座处的杂合/纯合裸细胞的谱系追踪,以及2) 用转基因交换所述基因座。图中的序列--上子图:loxP核心GCATACAT(SEQ ID NO:12);最小的FRT:GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTC(SEQ ID:13);第二子图:最小的FRT:GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTC(SEQ ID:13);loxP核心:ATAGTATGC(SEQ ID:14)。

[0020] 图13(a-c)描绘了根据本发明的各种实施方案在纹状体中的HrasG12V重组的mTmG细胞的检查。(A) EP后两周显示经历Cre介导的tdTomato盒切除的EGFP+细胞与具有成功的MADR的HrasG12V+细胞之间明显的谱系分化。比例尺:100 μ m。(B) 在EP混合物中低至10ng/ μ l的重组酶-表达载体可在体内催化MADR。比例尺:100 μ m。(C) 在pBase介导的整合之后更亮的EGFP-HrasG12V细胞表达磷酸化的Rb1。比例尺:200 μ m。

[0021] 图14(a-g)显示根据本发明的各种实施方案,利用在小儿GBM中观察到的频发突变成生的MADR神经胶质瘤模型产生与人亚型一致的表型并且对改变H3f3a PTM有了理解。A) 多个频发的小儿神经胶质瘤驱动突变的MADR的供体质粒的示意图。B) EP后100天在杂合mTmG中的代表性肿瘤形成。核EGFP+Rosa26H3f3a-K27M/Pdgfra/Trp53细胞形成大的纹状体肿瘤。插图B-1示出了显著皮质浸润的缺乏。C) 同窝出生仔畜Rosa26H3f3aG34R/Pdgfra/Trp53展现在纹状体中的神经胶质增生以及在梨状皮质内侧的腹侧前脑中的EGFP+细胞的小团块。D) Rosa26H3f3aG34R/Pdgfra/Trp53 EGFP+肿瘤细胞在H3K27处是低甲基化的。E) EGFP+肿瘤细胞展现相对于核心在肿瘤边缘处的可变的H3f3a的31位丝氨酸磷酸化。F-G) E) 中的区域的放大图像,该区域显示EGFP+核31位磷酸化的丝氨酸表达在肿瘤边缘处较高且在核心处减弱,但在核心中的总细胞密度是增加的。

[0022] 图15(a-h)显示根据本发明的各种实施方案,使用体内MADR并入的Cas9和PCR来源的sgRNA的体细胞嵌合体的快速生成允许神经胶质瘤内转分化的询问。A) TagBFP2-V5报道基因蛋白和SpCas9的MADR的质粒。B) 从肿瘤中纯化的tdTomato-/EGFP-神经胶质瘤细胞展现在Nf1和Trp53中的插入缺失(Indel)。图中的序列:Nf11外显子42AACTCCCTCGATGTGGCGGCTCATCTGCC(SEQ ID NO:15);AACTCCCTCGAATGTGGCGGCTCATCTGCC(SEQ ID NO:16);Trp53外显子2TCTCCTGGCTCAGAGGGAGCTCGAGGCTG(SEQ ID NO:17);TCTCnnnnnnAGAGGGAGCTCGAGGCTG(SEQ ID NO:18)。C) 具有经过共EP的PCR来源的sgRNA的TagBFP2-V5报道基因和Cas9的MADR插入产生通过3个重组谱系的基因标记可观察到的高级别神经胶质瘤。D) 神经胶质瘤细胞大部分为Olig2+,具有异质性的小袋(白色箭头)。E) 聚焦于由图15D中的白色箭头指示的区域的高倍放大的Olig2和tdTomato图像。F) 在来自图15E的大致相邻部分和区域中的CD44和tdTomato免疫染色,显示对于CD44间充质肿瘤标志物呈阳性。G) 脑的Pdgfrb免疫染色显示大多数周细胞为非肿瘤来源的(即tdTomato+;E1)。G2) 可在离散区域中观察到tdTomato-周细胞的团簇。G3-5) 来自G2及其后续放大图的单个z平面显示tdTomato和Pdgfrb的共定位的缺乏(箭头)。H) 脑周细胞的Des(又名结蛋白)免疫染色。H1) 不与tdTomato共定位的Des+周细胞的团簇。H2) 来自F1中所见的投影的单个z平面。*-来自Cy5波长的通道伪彩色绿色以便于增强对比度。

[0023] 图16(a-f)描绘了根据本发明的各种实施方案在MADR神经胶质瘤中的转分化的研究。A) 可发现V5+肿瘤来源的细胞群与肿瘤病灶区中的Tdtomato+血管系统并列。B) 具有大神经胶质瘤的MADR脑的Pecam免疫染色。C-D2) 可观察到稀少的tdTomato-/Pecam1+图,但不连接至血管系统。E) 在来自图F2的子图中的红色信号的过度曝光类似地表明tdTomato与Des之间的共定位的缺乏。F) 在肿瘤的大部分区域中的Des信号展现血管周围的图案并且即使当与血管没有明显关联时也与tdTomato共定位(白色箭头)。*-来自Cy5波长的通道伪彩色绿色以便于增强对比度。

[0024] 发明描述

[0025] 本文引用的所有参考文献以引用的方式整体并入,如同它们被充分阐述一样。除非另外定义,本文所用的技术和科学术语都具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第3版,修订版,J.Wiley&Sons (New York, NY 2006);及Sambrook和Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)为本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的通用指南。

[0026] 本领域技术人员将识别到与本文所描述的可以在本发明的实践中使用的那些方法和材料相似或等效的许多方法和材料。实际上,本发明决不限于所述的方法和材料。

[0027] 术语“控制元件”总的来说是指启动子区域、多聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调控结构域、复制起点、内部核糖体进入位点(“IRES”)、增强子等,它们在受体细胞中共同提供编码序列的复制、转录和翻译。不是所有的这些控制元件都需要始终存在,只要选定的编码序列在合适的宿主细胞中能够被复制、转录并翻译。

[0028] 术语“启动子区域”在本文中以其常规含义使用且指的是包括DNA调控序列的核苷酸区域,其中所述调控序列来源于能够结合RNA聚合酶并引发下游(3' -方向)编码序列的转录的基因。

[0029] “可操作地连接”是指元件的排列,其中将如此描述的组分进行配置以便执行它们通常的功能。因此,与编码序列可操作地连接的控制元件能够影响编码序列的表达。控制元件不一定与所述编码序列相邻,只要它们起到指导编码序列的表达的作用即可。因此,例如,间插的未翻译但转录的序列可存在于启动子序列与编码序列之间,并且仍可认为所述启动子序列“可操作地连接”于所述编码序列。

[0030] 随着无偏见鉴别将近300个频发的、推定的癌症驱动突变(其中许多为GOF致癌基因),有必要创建一个可为这些癌症驱动子建模的易处理的体内平台。对于肿瘤抑制因子中的功能丧失(LOF)突变,大规模的敲除(KO)小鼠群体现提供对相关GEMM的立即获取,但用多个KO为肿瘤建模则需要许多可独立重组的floxed等位基因,从而使得结果变复杂。鉴于此,基于CRISPR/Cas9的研究现已证明了在小鼠中体内诱导多个KO的能力。然而,对于GOF突变,还需要关于编写必需的GEMM的详尽目录的艰巨期望。

[0031] 关注非GEMM模型的CNV、位置变异性及插入诱变问题,我们寻求了一种可确保转染细胞之间的均匀基因剂量的方法且因此考察dRMCE(在本文中还可作为通过双重组酶介导的盒式交换的嵌合分析(MADR)而被讨论),其已作为一种有效的敲入方法被探究。常规地,此方法需要阳性整合体(通常是小鼠胚胎干细胞(mESC))的抗生素克隆选择和Southern探测。在适当的保护措施下,我们证明了使用具有重组细胞的明确的基因标记的现成的报道基因小鼠Rosa26mTmG(mTmG),可在体细胞中原位催化成功的dRMCE(图1a)。此外,我们证明了此系统在生成具有GOF和LOF突变(包括患者特异性癌症驱动突变)的混合物的嵌合体中的效用。作为用于肿瘤建模的非GEMM方法,此程序可用作以患者特异性方式进行临床前药物发现的一种优良快速管线。

[0032] Rosa26mTmG是广泛使用的报道基因品系,其组成型地表达膜tdTomato并且一旦发生Cre介导的tdTomato盒切除便转变成EGFP表达。为了适应mTmG中的dRMCE,我们利用了未用的蓝色荧光通道并且创建编码TagBFP2及TagBFP2标记的HrasG12V的无启动子供体质粒,

其侧接有loxP和FRT位点(图1d和图2a)。mTmG和TagBFP2质粒都含有最小的34-bp FRT,其难以完成Flp介导的整合。简言之,开放阅读框(ORF)之前有PGK多聚腺苷酸化信号(pA)和三聚的SV40pA,pA将优先从未整合的附加体和随机整合的整个质粒伪转录,已知伪转录与电化学转染一起发生。ORF之后有土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE),所述WPRE增加转基因表达和兔β球蛋白pA,所述兔β球蛋白pA有效终止转录(图1a)。我们生成杂合的Rosa26WT/mTmG小鼠(mTmGHet)且随后建立携带单个mTmG等位基因的小鼠神经干细胞系(mNSC)。具有TagBFP2供体质粒和Flp-Cre表达载体的dRMCE产生三个可能的结果,其中细胞保持tdTomato+或变绿或变蓝(图1b、c和图3a)。用TagBFP2或HrasG12V质粒进行核转染之后一周,FACS分析表明HrasG12V细胞的快速增殖以及mNSC中的dRMCE约1%的近似效率(图3b)。平均起来,5%的蓝色荧光阳性细胞保留绿色或红色荧光,这可由膜tdTomato的相对缓慢降解动力学来解释(图3b、c)。在培养分选的细胞又一周之后,我们进行了蛋白质印迹并且证实残余EGFP或tdTomato表达的不存在以及正确的HrasG12V表达,表明重组Rosa26基因座甚至在聚集的非克隆群水平下生成正确的多肽(图3d)。

[0033] 对GOF蛋白的评价通常在体外完成,但组成型转基因表达对于稳定的细胞系产生可为有害的。为了避免这个问题,有时采用诱导型遗传系统,如TRE。为了扩大单个等位基因mTmGHet mNSC的效用,我们旨在创建一种通过形成含有rtTA-V10和TRE-Bi元件的单个dRMCE相容质粒产生诱导型细胞系的管线(图4a)。随后,我们用嘌呤霉素选择生成无色TRE-Bi-EGFP细胞系并且证实标准体外dox处理的TRE的保真性(图4b、c)。我们还生成了用双顺反子TRE-Bi-D111/EGFP供体载体表达均匀水平的Notch配体D111的细胞系,因为我们已经注意到CNV在亚细胞分布中的变化(数据未示出;图4d)。使用仅表达嘌呤霉素的克隆中间质粒,我们还检查了通过PCR筛选在Rosa26基因座处的正确重组(图5a、b和表1)。在dRMCE之后,一旦dRMCE时tdTomato盒不再驻留于CAG-启动子的下游。然而,PCR筛选揭示在一些细胞中EGFP顺反子的持久性,但EGFP的表达由于上游多聚腺苷酸元件及与CAG-启动子的距离而减弱(图5b)。支持这一点,我们没有观察到EGFP自身荧光,且在仅用强力霉素处理下这些细胞的蛋白质印迹显示EGFP表达(图4b和图5c)。

[0034] 考虑到在TRE-Bi-EGFP细胞系中的嘌呤霉素选择之后EGFP表达的缺乏,我们推断我们可使用相似的Dox诱导型质粒来表达四种不同的“面条怪物(spaghetti monster)”荧光蛋白(SM_FP),由此允许通过它们的不同表位标签进行正交检测。我们使用具有多抗原性XFP的MADR(MADR MAX)以便凭经验评估每个细胞是否可表达每个质粒的一个以上拷贝(图2g)。具体来说,每个细胞超过这些高信噪比SM_FP探针的表达可通过免疫荧光法容易地检测。对数百个细胞的检查显示在嘌呤霉素选择和Dox添加之后SM_FP在实际上所有的细胞中存在(图4e)。然而,在较高放大率下,我们通过免疫荧光法没有观察到表达一个以上SM_FP的任何细胞(图4f),表明dRMCE方法介导转基因元件的单拷贝插入。

[0035] 通过提供更同源的、诱导型稳定的细胞系,此体外系统将有益于在来源于携带loxP和Frt的任何动物的各种原代细胞系中询问GOF蛋白功能。作为对此的原理验证且为了凭经验测试TRE-Bi元件(所述元件可潜在地被上游启动子或增强子激活)的3'顺反子的潜在渗漏的效用,我们还生成了用双顺反子TRE-Bi-D111/EGFP供体载体可诱导地表达Notch信号传导配体D111的细胞系(图4d)。值得注意的是,在无Dox的情况下,不存在容易检测的报道基因和极低水平的配体,但是当添加Dox时,所有细胞都以几乎相似的水平表达EGFP和

D111 (图4d)。(在Dox不存在下极少量的配体表达可与mNSC的内源性表达相当。)Notch信号传导是基因剂量敏感性的分子途径的一个实例,并且我们的管线可出于研究此途径之目的。

[0036] 表1.用于PCR筛选的引物

[0037]

			SEQ ID NO:
F1	GCAACGTGCTGGTTATTGTGC	mtmg-cagF	1
F2	CTCAATCCAGCGGACCTTCC	mtmg-wpreF	2
F3	AGCAAAGACCCCAACGAGAAG	EGFP-F	3
F4	TGTCTGGATCCCCATCAAGC	mtmg-sv40F	4
F5	ATGCCCTGGCTCACAAATAC	rb glob pA F	5
F6	ACACAGGCATAGAGTGTC	SV40pA-F	6
R1	GATGACGGCCATGTTGTTGTCC	mtmg-tdtomatoR2	7
R2	TTTAACAGAGAGAAGTTCGTGGC	pTV-R	8
R3	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	Rosa26-野生型-R	9
R4	CGAAAGGCCCGGAGATGAGGAAG	PGKpromR	10
R5	TGATCGCGCTTCTCGTTGGG	EGFP653CSseq	11

[0038] 为了研究体内dRMCE的适用性,我们用TagBFP2供体载体连同Flp-Cre表达载体通过EP引入产后mTmGHet幼仔的VZ/SVZ内层的神经干细胞/祖细胞中(图1d)。因此,我们注意到早在EP之后2天便沿着VZ出现了重组细胞,且这些细胞到2周时产生嗅球神经元和神经胶质(图1e和图6a-c)。TagBFP+卫星神经胶质的共聚焦分析显示在这些细胞中不存在tdTomato和EGFP表达(图6c)。我们注意到在VZ处的一些稀少的具有持久性EGFP表达的TagBFP2+细胞并且这些细胞可为具有缓慢的蛋白质加工动力学的室管膜谱系细胞(图6b)。所有四种用HrasG12V经过EP的纯合的mTmG快速地发展神经胶质瘤且在3-4个月内达到发病(图2a-c)。使用由CAG-启动子驱动的不同致癌基因,我们先前已显示HrasG12V的PB-EP产生100%穿透性神经胶质瘤。有趣的是,在我们的纯合的mTmG神经胶质瘤中,仅蓝色的细胞(Rosa26HrasG12V×2)比既表达蓝色也表达绿色的细胞(Rosa26HrasG12V×1)占据更大片的肿瘤剖面(图2b、c)。早先已显示HrasG12V拷贝数赋予表型差异,如生长和细胞凋亡率。使用PB-EP,我们还观察到较亮的EGFP标记的HrasG12V细胞与较暗的EGFP+细胞相比表达更多的磷酸化Rb1(pRb1)(图7a)。类似地,在用HrasG12V进行EP的mTmG中的大多数Rosa26HrasG12V×2细胞似乎表达pRb1,而Rosa26HrasG12V×1则不表达(图7b、c)。此数据表明致癌基因的拷贝数可显著地改变所得到的肿瘤群的概况的可能性,如早先使用GEMM所观察到的。

[0039] 然而,大多数TagBFP2+细胞到EP后2周时展现tdTomato不存在和EGFP的表达(图6C)。为了凭经验测试质粒浓度对体内重组效率的影响,针对重组细胞的高灵敏度检测,我们改变Flp-Cre重组酶表达质粒和MADR MAX报道基因质粒(即,表达具有十个HA-Tag的面条怪物报道基因质粒)的浓度(图1f)。因为MADR(及由此,MADR MAX)反应在理论上是不可逆的,所以我们在EP后2天检查脑。所有DNA混合物都含有非MADR的、组成型核TagBfp2报道基因。令人惊讶地,我们注意到当供体质粒浓度下降至10ng/μl时几乎接近100%的MADR MAX

效率和几乎为零的具有EGFP表达的Cre重组细胞(图1f)。一种可能的解释是增加供体质粒的浓度,且由此loxP和FRT重组位点也增加,将竞争重组酶。或者,如在转座酶时所见“过度产生抑制”机制是另一种可能性。所有后续电穿孔混合物含有0.5-1 μ g/ μ l的质粒,以便产生大致相等数量的EGFP细胞和MADR或MADR MAX细胞用于并排比较。

[0040] 在具有HrasG12V的mTmGHet中,我们看见了蓝色重组细胞(即,单拷贝HrasG12V)的致癌生长,而仅经历Cre重组的绿色兄弟细胞(sibling cells)(即无HrasG12V)则没有显示任何的异常生长(图8a)。这些绿色兄弟细胞可以类似于MADM22中的野生型细胞的方式用作有用的对照细胞群。MADM和MASTR容许突变体细胞的严格的、果蝇样解译,但视GOI的染色体位置而定需要从头GEMM生成。因为它的高增殖能力,与低至10ng/ μ l的重组酶表达载体混合的HrasG12V仍造成侵袭性、早期发作的肿瘤发生(图8b)。为了排除由来自随机整合的或非重组的附加体的表达所致的肿瘤形成,我们进行了一系列的对照电穿孔(图9)。首先,将与PB-EGFP质粒(其标记转导细胞的谱系)组合的供体HrasG12V(约5 μ g/ μ l)的浓缩混合物电穿孔至野生型CD1幼仔中,这不会造成异常生长、增生或肿瘤发生,无论是否存在Flp和Cre重组酶(图9a)。另外,我们将携带反向loxP的HrasG12V电穿孔至mTmG幼仔中并且通过免疫染色未能检测到任何蓝色重组细胞或增生,说明了dRMCE重组反应在体内的特异性(图9b)。当在EP后2周检查时,单独的HrasG12V供体质粒和Cre-重组酶的若干独立的EP未能产生肿瘤形成,表明Flp切除是用于有效的体内dRMCE反应的极其关键的步骤且Cre自身不足以进行持续的转基因整合(数据未示出)。由于Flp切除对于不可逆平衡的建立很关键,所以为了提高Flp切除的效率而用Flp0置换FlpE是本发明的另一实施方案。

[0041] MADM显示组合的Trp53-LOF和Nf1-LOF突变促进少突胶质细胞祖细胞(OPC)的癌前过度增殖。我们旨在使用我们的方法来模拟相似的发育现象。首先,我们创建了携带三个连续的、经证实的、基于miR-E的shRNA的供体构建体,所述shRNA靶向与TagBFP2表达相关联的Nf1、Pten和Trp53(图2d)。我们测试了此多miR-E构建体并且观察到mRNA水平敲低效率为约80%,与对miR-E的原始报告相当(图10b、c)。与MADM研究结果相符合,我们观察到TagBFP2+/Pdgfra+OPC的选择性过度生长,与以下的先前观察结果一致:基于Nf1和Trp53的LOF模型造成OPC驱动的增生(图2e和图10a)。我们还观察到三个miR-E在OB神经元中的表达没有消除它们的形态或表观细胞类型,这也符合先前的研究:细胞环境对于这些LOF突变的转化能力来说很重要,由此它们在神经元谱系细胞中变为休眠(图10b)。在EP后200天我们没有检测到任何恶性肿瘤,表明Trp53的完全消除可能是高度穿透性、早期发作的肿瘤发生所需的(图10c)。作为本发明的另外的实施方案,所述系统可通过创建携带spCas9的供体质粒并向其递送靶向肿瘤抑制因子的sgRNA而被修改。

[0042] 考虑到我们的MADR系统在体内独立地谱系追踪GOF和LOF细胞的多个群的能力,我们推测其可能适用于研究神经胶质的发育。使用MADM很好地证明了组合的Trp53-LOF和Nf1-LOF突变促进少突胶质细胞祖细胞(OPC)的癌前过度增殖。我们旨在使用我们的方法来模拟相似的发育现象。首先,我们创建了携带三个连续的、经证实的、基于miR-E的shRNA的供体构建体,所述shRNA靶向与TagBFP2表达相关联的Nf1、Pten和Trp53(图2H)。我们测试了此多miR-E构建体并且观察到mRNA水平敲低效率为约80%,与最初报告的效率相当(图2I)。与MADM研究结果相符合,我们观察到TagBFP2+/Pdgfra+OPC的选择性过度生长,与以下的先前观察结果一致:基于Nf1和Trp53的LOF模型造成OPC驱动的增生(图2J和图10a)。值得注意

的是,不含miR-E的兄弟EGFP+群产生主要是星形胶质细胞的定量较少的混合群体(图2J且数据未示出)。这些遗传学确定的(即EGFP+)兄弟细胞可在MADM GEMM系统中以类似于野生型细胞的方式用作有用的对照细胞群。(MADM和MASTR容许突变体细胞的严格的、果蝇样解译,但视GOI的染色体位置而定需要从头GEMM生成。我们还观察到三个miR-E的表达没有预防OB神经发生(图10B),这与我们先前使用Hras和Erbb2的研究结果相反,提示引起Ras/MAPK信号传导增强的GOF和LOF突变可造成细微不同的细胞命运改变。虽然有一小组动物,但在EP后200天我们没有检测到任何恶性肿瘤,表明任何一个、两个或所有的Nf1 P53和Pten的完全消除(而非敲低)可能是高度穿透性、早期发作的肿瘤发生所需的。作为此结果的确认,我们使用这些抑制因子的基于CRISPR/Cas9的敲除。显然,通过将针对Nf1、Trp53和Pten的sgRNA的组合进行EP并进行SpCas9和piggyBac介导的EGFP标记,我们注意到与GEMM神经胶质瘤模型、MADM神经胶质瘤模型和子宫内基于EP的CRISPR模型一致的白质相关的、高级别Olig2⁺肿瘤的形成(图10d-e)。尽管如此,我们的miR-E研究证明MADR在靶基因的单拷贝稳定敲低之后进行谱系追踪同时提供内部“对照”谱系(即EGFP+Cre重组细胞)的有效性。

[0043] 基于体内MADR产生局灶性神经胶质瘤模型

[0044] 病毒和EP肿瘤模型被越来越多地用于研究癌症在各种组织中的发育和进化方面,但对于各种基因递送方法存在问题。我们推断我们的方法能够最适于推定的癌症驱动基因的体内自生建模,且对于原理验证,选择Hras^{G12V},一种高度使用的活化致癌基因。在推定的单拷贝杂合小鼠中的生长动态的组织学分析表明与EGFP+群相比,Hras^{G12V}细胞快速地过度增殖(图13A)。另外,我们推断我们可能能够通过将mTmG小鼠培育为纯合型来区分杂合的与纯合的细胞群。具体来说,理论上在重组或插入之后能够得到四种可能性,且各自将具有遗传标志物的不同组合(图2B)。在P2EP之后,所有用Hras^{G12V}经过电穿孔的纯合的mTmG快速地发展神经胶质瘤且在3-4个月内达到最终发病(图2a;n=4)。(使用由CAG-启动子驱动的相关致癌基因,我们在先前已显示Hras^{G12V}的PB-EP产生100%穿透性神经胶质瘤。)在纯合的mTmG小鼠中,即使当使用10ng/ μ l的质粒时,MADR反应也是高效的(图13B)。有趣的是,在我们的纯合的mTmG神经胶质瘤中,仅蓝色的细胞(Rosa26^{HrasG12V \times 2})比既表达蓝色也表达绿色的细胞(Rosa26^{HrasG12V \times 1})占据更大片的肿瘤剖面(图2c、7b)。早先已显示Hras^{G12V}拷贝数赋予表型差异,如生长和细胞凋亡率。使用PB-EP,我们还观察到较亮的EGFP标记的Hras^{G12V}细胞与较暗的EGFP+细胞相比表达更多的磷酸化Rb1 (pRb1) (图13C)。类似地,在用Hras^{G12V}经过电穿孔的mTmG小鼠中的大多数推定纯合的Rosa26^{HrasG12V \times 2}细胞似乎表达pRb1,而半合子的Rosa26^{HrasG12V \times 1}则不表达(图7b-7c)。此数据表明致癌基因的拷贝数可显著地改变所得到的肿瘤群的概况的可能性,如早先使用GEMM所观察到的。

[0045] 就小鼠癌症模型来说目前未满足的需要为更高处理量的“个性化”肿瘤建模方法。随着最近涌现的对于癌症中的推定驱动突变的认识,需要可以组合方式在体内为这些突变快速并广泛建模的平台。例如,近来发现H3F3A、PDGFRA和TRP53在小儿神经胶质瘤中频发。有趣的是,H3F3A突变存在于两个残基(即K27和G34)中。值得注意的是,在H3F3A中携带K27M或G34R/V突变的所生成的患者肿瘤展现显著不同的转录物组以及临床表现。具体说来,患者K27M神经胶质瘤沿中线聚集并且比G34R/V神经胶质瘤更早出现,其大部分驻留在大脑半球中。尽管如此,两类H3F3A神经胶质瘤通常都携带TRP53突变并且可展现PDGFRA活化的突

变。为了在小鼠中对这些小儿肿瘤建模,我们生成了用于H3f3a突变(针对EGFP标记)、活化的Pdgrfa (D842V)和突变Trp53 (R270H)的共表达的盒(图14)。首先,我们通过免疫组织化学在体内和体外检查H3f3a、Pdgrfa和Trp53的适当表达,并且注意到所有蛋白质的同时表达(图11A-B)。然后,我们通过产后EP将这些质粒引入同窝出生仔畜中。重要的是,使电极移动以便对皮质和纹状体VZ进行EP,从而允许可能由两个祖细胞区形成肿瘤。吸引人地且似乎与这些肿瘤的临床表现一致,携带K27M的同窝出生仔畜展现到P100为止的中线神经胶质瘤(图14B),而经类似处理的携带G34R的同窝出生仔畜大多数展现弥漫性神经胶质增生和非常罕见的小肿瘤(图14C,箭头)。因为G34R突变常常在后半个编码序列中与ATRX突变一起存在,所以我们使用CRISPR/CAS9来引入模拟这些天然存在的突变的插入缺失。在表达SpCas9的质粒与靶向ATRX的sgRNA以及含G34R的共表达盒的共引入之后,根据在P100处的肿瘤形成的倾向,在G34R胶质细胞的表现中没有看到显然的变化(图11C)。(识别Atrx的c末端的早先证实的抗体显示>90%的K27M细胞和100%的G34R MADR细胞表达全长Atrx,而>95%的具有Atrx的CRISPR/Cas9靶向的G34R细胞未能显示Atrx抗体标记(图11D-E)。)特别地,在EP后120天时,观察到G34R肿瘤且尽管同样靶向纹状体VZ,但局限于皮质和下层胼胝体(且这些细胞中的一些同时增生;图11G)。有趣的是,01ig2信号在背侧区域中显著更突出,提示肿瘤与增生之间的细胞命运差异(图11G₁)。在此相同的120天时间点处,K27M肿瘤主要局限于皮质下结构,但可在白质束中观察到细胞,其中较深的皮质层中有较少量的细胞(图11H)。这些研究结果表明尽管有效的Pdgrfa和Trp53突变同时存在,但K27和G34残基足以显著地调节这些神经胶质瘤亚型发作的时间和位置。此外,体细胞Atrx突变似乎不是G34R肿瘤中的肿瘤形成的限速步骤。

[0046] 从机理上看,认为K27M突变造成此残基处的低甲基化。实际上,鉴于MADR谱系追踪肿瘤细胞的内在能力,我们能够证实通过K27Me抗体造成的K27M突变体细胞的低甲基化(图14D)。(这不仅仅是肿瘤生长的假象,因为Nf1/Trp53的CRISPR/Cas9介导的敲除造成过度甲基化的神经胶质瘤的形成(图11I)。)近来,发现位于K27与G34之间的31位丝氨酸的磷酸化(至此磷酸化Ser31)对于Trp53介导的细胞周期停滞很重要且这可能造成绕过非整倍性失效保护。再次使用我们谱系追踪肿瘤细胞的能力,我们注意到磷酸化Ser31的惊人模式,由此发现其在肿瘤边缘而不是核心处(图14E)。这通过高放大率共焦z堆叠而证实(图14F-G)。此外,针对H3f3a的单克隆抗体证实蛋白质的存在遍及整个肿瘤(图11J)。尽管此染色模式高度提示了在肿瘤播散中的潜在作用,但需要进一步的研究以探讨此磷酸化对于肿瘤动态在功能上是否很重要。总之,以肿瘤细胞自主方式在体内轻易且明确地观察这种翻译后变化的能力对于今后研究这些及其它癌症的疾病病理机制来说有很大的前景。

[0047] 谱系追踪CRISPR/Cas9诱导的MADR MAX神经胶质瘤模型揭示肿瘤向周细胞的转分化

[0048] 近来,已证实CRISPR/Cas9对于使用EP的体内基因的突变是高度有效的。然而,这些研究的缺点是谱系追踪修饰过的细胞的确定方式。为了解决这个问题,我们创建了一种含有SM_BFP2-P2a-SpCas9的供体质粒以便同时标记细胞并使细胞突变,使得能够在体内可靠追踪突变细胞(图15A)。考虑到用串联miR-E时的我们的上述研究结果以及Nf1、Trp53和Pten的Cas9介导的敲除,我们使用这些相同的经过PCR的sgRNA以靶向Nf1和Trp53。在经过EP的细胞中的成功靶向在肿瘤群gDNA中通过测序得以证实(图15B)。在大致5个月时,我们

观察到在经过EP的动物中的最终发病。病理分析产生多形性胶质母细胞瘤的诊断,这主要归因于肿瘤中坏死的存在。在免疫组织化学上,我们观察到肿瘤基本上无TdTomato标记的群,除血管系统之外(图15C-C₁)。在靠近原始靶位点预期驻留之处观察到小EGFP群(图15C、C₂;箭头)。然而,由MADR MAX SM_BFP-V5标记的细胞来划分肿瘤,这些细胞在半球上过度生长(图15C、C₃)。此体积中的大部分填充了Olig2⁺群,不过观察到缺乏信号的区域(图15;箭头;15E)。由于Olig2是原神经胶质瘤亚型的标志物,我们以及其他人在间充质进化之前观察到这点,所以通过针对间充质标志物CD44的染色来评估这是否可为肿瘤进化之处。特别地,发现CD44遍及整个肿瘤,但富集在此Olig2减少的区域中(图15E-F且数据未示出)。归因于TdTomato血管系统的突出以及SM_BFP-V5鉴别肿瘤细胞谱系的能力,V5标记的血管周围细胞的引人注目的群显得与其它群不同(图16A;箭头)。考虑到这些细胞的位置和形态以及我们在遗传上鉴别肿瘤细胞与具有遗传标志物的基质的能力,我们重新审视当前关于神经胶质瘤细胞的转分化的争论。具体来说,若干小组已指出神经胶质瘤细胞可转分化成内皮。这一点受到了以下研究结果的质疑:相反,转分化成周细胞。其它小组发现,尽管进行了大量研究工作,但这两方面都缺乏证据。在检查Pecam1(即,内皮细胞的真正标志物)与TdTomato的共定位时,我们注意到几乎所有Pecam1⁺细胞都被共标记,提示血管系统不是来源于肿瘤(图16B)。然而,我们注意到极其稀少的Pecam1⁺/TdTomato⁻信号,其中大部分似乎都是以小尺寸(<5 μ m)呈现的碎片且少量型态为正常内皮细胞的尺寸(图16C-D)。然而,没有发现血管相关的细胞且这些推定细胞的数量不适于系统研究(图16C-D)。相反,使用Pdgfrb和Des(又名结蛋白),其为充分证实的周细胞标志物,我们能够观察到在上述Olig2⁻/Cd44⁺位点中和周围的离散位置(在由图15D的箭头所示区域的大致相邻部分中),这些位点在TdTomato不存在下对任一细胞标志物展现阳性(图15G-H)。尽管有TdTomato的抗体扩增及TdTomato信号在这些区域中的人工过度暴露,我们还是没有观察到TdTomato和Des在一些周细胞中的共定位(图16E)。然而,在肿瘤的大部分区域(特别是Olig2富集区)中,发现这些周细胞标志物与TdTomato膜严格地共定位,提示此转分化不是遍及原神经亚型为主的区域(图16F)。因此,使用我们的新型自生模型,我们提供了关于肿瘤细胞局灶转分化为GBM中的周细胞的证据,该模型允许在体内明确基因标记多个群。这表明神经胶质瘤细胞向周细胞的转分化可与神经胶质瘤的异质进化有关,包括从原神经至间充质亚型。

[0049] 随着最近涌现的推定驱动突变,需要可以组合方式在体内为这些突变快速并广泛建模的平台。近来,发现H3f3a、Pdgfra和Trp53在小儿神经胶质瘤中频发。我们证明了携带这些突变的不同组合的两个供体质粒的EP造成P50的增殖性增生(图2f、g)。我们通过免疫组织化学在体内和体外检查H3f3a、Pdgfra和Trp53的表达(图2g和图11a、b)。

[0050] 我们证明了dRMCE介导的体细胞体内转基因作用是一种使用一个小鼠品系生成众多体细胞嵌合体的高度稳健的、有成本效益的方法。具体来说,近期已在体外利用dRMCE,但具有相对较低的插入效率,因此需要克隆细胞系的抗生素选择及用分子生物学方法(PCR、DNA印迹等)严格验证个别细胞系。在此我们证明了我们可通过精细的质粒设计、通过组成型质粒元件的滴定、以及通过利用“安全着陆位点”(例如,本文所述的各种实施方案的ROSA26基因座)用RMCE在体内完成大致90%的转基因表达。这允许对单或双拷贝转基因表达的一致、严格和便利的研究。比较起来,附加体和转座子介导的插入常常产生来自数十或数百拷贝的给定转基因的超生理表达。此外,附加体转基因更经常将在增殖谱系中稀释且

基于转座子的方法将在转座酶存在下引起盒“跳变”，从而潜在地破坏内源性基因功能，包括肿瘤抑制因子、细胞周期基因等。此外，通过使用mt/mg报道基因来描述重组酶事件、通过滴定质粒组成部分且通过使用多个供体质粒，可以追踪多个独立的谱系。

[0051] 我们证明了将肿瘤突变的两种广泛模式 (GOF/LOF) 灵活地组合的能力。此策略可与携带双重重组酶位点的任何现成GEMM (例如, Ai14、R26-CAG-LF-mTFP1和IKMC小鼠) 一起使用, 由此允许确定性评估在限定剂量下在体内的GOF和LOF蛋白质功能 (图12)。结合病毒载体及其它基因递送方法, 此策略还可扩展至其它器官, 如肺、乳腺及许多器官。

[0052] 我们的体内MADR效率实验表明稀释供体构建体的浓度也许能模拟基于单个底物的重组反应, 该反应在具有floxed基因座和Cre重组酶的双转基因GEMM中发生 (图1f)。我们证明了将肿瘤突变的两种广泛模式 (GOF/LOF) 迅速并灵活地组合的潜能。总而言之, 我们已引入了一项新技术, 该技术利用EP在小鼠中产生稳定的、限定拷贝数的体细胞嵌合。MADR的内在特征与使用其它方法在体内进行小鼠遗传操纵的现有方法相媲美 (表2)。接下来, 如果所要供体元件在尺寸上足够小, 那么可使用非整合的病毒载体, 由此扩增可被靶向的组织数量。

[0053] 表2.

[0054]

方法	GEMM	稀释EP	特定小号的EP	病毒	MADR
工程改造和克隆的时间	有效	每质粒约2周	每质粒约2周	>4-5周	每质粒约2周
拷贝数	每次注入1-2个	高度可变	高度可变	可变但可能小于EP	1-2个, 取决于受体的嵌合性
复杂度	对于条件性等位, 本例更为复杂	不必要	不必要	依赖于RCAS-Tva是必需的	每个质粒1个基因
基因组整合	基因组整合, 取决于基因座位置	倾向于随机和嵌合整合	倾向于随机和嵌合整合	倾向于随机和嵌合整合	总体稳定, 取决于基因座位置
有效负载	受到构建体的限制*	通常由质粒限制控制	通常由质粒限制控制	限于病毒基因组负载	通常由质粒限制控制*
克隆度	取决于模式调控元件	克隆度取决于电转取向	克隆度取决于电转取向	来自注射部位的单向扩散图案	克隆度取决于电转取向

*. 可利用BAC DNA

[0055] 新MADR EP工具包

[0056] 转座子如PB和Sleeping Beauty越来越多地与EP组合使用, 近年来若干报告利用这些技术, 以产生稳定的体细胞转基因物。转座子是极有吸引力的工具, 因为它们容许长期的发育研究以及体内肿瘤生成。我们的新方法克服了转座子系统的两个主要问题: 随机基因组插入和拷贝数变异性。Notch信号传导是基因剂量敏感性分子途径的一个关键例子。另外, 若干其它细胞命运决定因子已显示引起基于它们的表达水平的显著差异表型。例如, 在神经胶质祖细胞中的高Nfia表达有利于它们分化成星形胶质细胞, 而在变为少突胶质细胞的细胞中观察到低表达, 且在另一实例中, 更高的Fezf2表达通过上调Notch信号传导效应子诱导VZ/SVZ中的NSC休眠。我们的方法可用于在体内快速评估这种途径。使用此报告中所

示的单拷贝对比双拷贝的比较范例,可用天然的切片内 (intra-section) 对照细胞在一只小鼠中研究这样的核因子。与GEMM工程改造相比,我们的体内MADR是可扩展的且相对较便宜。此外,鉴于产后EP程序是快速的(每窝动物约35分钟)且无需侵入性手术,此方法可容易为许多实验室所用。

[0057] MADR扩展至现有GEMM

[0058] 此策略可与携带双重重组酶位点的任何现成GEMM(例如,Ai14、R26-CAG-LF-mTFP1、Ribotag和IKMC小鼠)一起使用,允许确定性评估在限定剂量下在体内的GOF和LOF蛋白质功能(图16)。存在数以千计的已携带在所关注的基因座周围的loxP和FRT位点的转基因小鼠。同Rosa26^{mTmG}一样,Ai14是另一种广泛采用的报道基因小鼠品系,其通常与表达重组酶的转基因小鼠杂交。通过适当地定向重组酶识别位点,如图16中所指出,可生成供体质粒以在Ai14小鼠中使用。Ribotag使用Cre重组将未标记的Rp122外显子4交换为HA标记的变体,以用于Cre表达限定的mRNA的亲亲和免疫沉淀。采用MADR,替代标签可与额外的元件一起插入以允许使用标签的连续免疫沉淀进行同步正交mRNA纯化。另外,可从剪接受体开始生成ORF,并且使用此构建体来研究在外来顺式调控环境下取代转基因的作用(图16)。同时,具有荧光报道基因的供体质粒可简单地被电穿孔(用Flp和Cre)以便实现在其中重要的基因座侧接有loxP和FRT位点的各种转基因小鼠中从焦点开始的谱系追踪,而无需表达Cre的小鼠。

[0059] 因为我们的方法需要两种不同的重组酶,所以还可用启动子的不同组合驱动这些重组酶的表达以限制重组的细胞类型。例如,此方法可通过使用细胞类型特异性Flp/Cre表达来比较和对比由离散的干细胞和祖细胞亚组产生的谱系的命运映射。最终,存在具有大负荷的细菌人工染色体(BAC)的体内MADR。可生成携带驱动荧光报道基因或重组酶(如vCre或sCRE)的表达的大块基因组片段的供体质粒,其中在每个末端添加loxP和FRT位点。接着,EP可将在有限稀释下的此大片段与携带vCre/sCre可激活的报道基因的额外质粒组合递送至基因组中。这类研究将能有效地实现如同GEMM一样的、更高阶的谱系追踪研究。

[0060] 下一代测序使我们对于在肿瘤发生中出现的基因组和转录组变化的理解呈指数级增长。然而,在继续生长的肿瘤中频发的体细胞突变的目录下,出现的问题是将促肿瘤驱动突变(driver mutation)与乘客突变(passenger mutation)相区分。另外,现在越来越认识到相似组织学分类的肿瘤可常常具有完全不同的遗传基础,它们产生显著不同的肿瘤表型(例如,K27M肿瘤对比G34R肿瘤)。GEMMS对于理解神经胶质瘤的发育很关键。具体说来,精妙的MADM方法提供了对于肿瘤细胞起源及潜在治疗的独特见解。我们示出了关于使用MADR作为小儿GBM的快速‘个性化’建模的平台的原则证据。通过将MADR GOF转基因作用与CRISPR/Cas9 LOF操作组合,小型实验室有可能产生为覆盖大多数肿瘤类型的突变谱(及由此可能的组合)所必需的质粒试剂。

[0061] 我们的研究结果因此将体内MADR确立为用于稳定嵌合体分析的稳健方法,即一种能够克服基于病毒、GEMM、EP和转座子方法中的许多内在缺点的方法。另外,此基因框架适合于用双重重组酶识别位点工程改造的数千种小鼠品系。因此,这些工具预示着允许在发育和疾病中基因功能的有效、更高处理量的研究。

[0062] 因此,本发明的各种实施方案至少部分地基于这些研究结果。

[0063] 供体载体

[0064] 本发明的各种实施方案提供了一种无启动子的供体载体,其包含:在转基因或RNA

上游的多聚腺苷酸化信号或转录终止元件;所述转基因或RNA;及成对的重组酶识别位点。

[0065] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含转录后调控元件。

[0066] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含在转基因或RNA下游的多聚腺苷酸化信号。

[0067] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体包含PGK多聚腺苷酸化信号(pA);三聚SV40pA;转基因或RNA;loxP;翻转酶识别靶标(FRT);土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE);及兔 β 球蛋白pA。

[0068] 本发明的各种实施方案提供了一种无启动子的供体载体,其包含:在转基因或RNA上游的转录终止元件;成对的重组酶识别位点;rtTA-V10;转基因或RNA;及TRE-Bi。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含转录后调控元件。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含编码嘌呤霉素的基因。

[0069] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体包含:在转基因或RNA上游的转录终止元件;loxP;rtTA-V10;转基因或RNA;TRE-Bi;及翻转酶识别靶标(FRT)。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含转录后调控元件。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含编码嘌呤霉素的基因。

[0070] 本发明的各种实施方案提供了一种无启动子的供体载体,其包含:在转基因或RNA上游的转录终止元件;成对的重组酶识别位点;rtTA-V10;转基因或RNA;及TRE-Bi-D111。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含转录后调控元件。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含编码嘌呤霉素的基因。

[0071] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体包含:在转基因或RNA上游的转录终止元件;loxP;rtTA-V10;转基因或RNA;TRE-Bi-D111;及翻转酶识别靶标(FRT)。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含编码嘌呤霉素的基因。

[0072] 成对的重组酶位点的取向是由转基因动物中的工程改造的基因座来确定(即,如果转基因将要在上游启动子的‘有义’方向上插入,那么重组酶位点恰好将模拟一对外部重组酶位点)。因此,在各种实施方案中,成对的重组酶识别位点是在正确的取向上。在各种实施方案中,loxP不在反向取向上。

[0073] 在各种实施方案中,成对的重组酶识别位点为loxP和翻转酶识别靶标(FRT),且重组酶为cre和flp。Flp的实例包括flpE和flpO。

[0074] 重组酶(和位点)的其它实例包括但不限于VCre(Vlox和衍生物)、SCre(Slox和衍生物)、Dre(Rox和衍生物)、及phiC31(attb)。

[0075] 在各种实施方案中,RNA为siRNA、shRNA或sgRNA。

[0076] 在各种实施方案中,转基因或RNA包含疾病相关突变。在各种实施方案中,转基因或RNA包含功能获得(GOF)突变。在各种实施方案中,转基因或RNA包含功能丧失(LOF)突变。

[0077] 转基因的实例包括但不限于致癌功能获得突变,包括Ras、H3f3a、Pdgfra、Trp53点突变、Idh1。RNA(shRNA和sgRNA)的实例包括但不限于肿瘤抑制因子靶标,如Trp53、Nf1、Atrx或Pten。

[0078] 转录后调控元件的实例包括但不限于乙型肝炎病毒转录后调控元件(HPRE)和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

[0079] 在各种实施方案中,上文和下文所述的无启动子的供体载体进一步包含编码抗生

素的基因。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含编码嘌呤霉素或真核替代物(卡那霉素、杀稻瘟菌素等)的基因。在各种实施方案中,上文和下文所述的无启动子的供体载体进一步包含编码强力霉素调控的反式激活蛋白或基于CRISPR/Cas的变体(例如SpCas9或Cpf1)的基因,以便在与sgRNA配对时用于DNA裂解、基因激活(Crispra)或基因抑制(Crispri)。

[0080] 在各种实施方案中,上文和下文所述的无启动子的供体载体进一步包含编码一种或多种面条怪物荧光蛋白(SM_FP)的基因。在各种实施方案中,所述一种或多种SM_FP是各自不同的SM_FP。在各种实施方案中,所述一种或多种SM_FP是四种不同的SM_FP。

[0081] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含编码一个或多个表位标签的基因。例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个表位标签。表位标签可为重复或不同的标签。在各种实施方案中,表位标签为HA标签、Myc标签、V5标签或Flag标签。

[0082] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体包含大负荷的细菌人工染色体(BAC)。

[0083] 系统

[0084] 本发明的各种实施方案提供了一种用于体内双重组酶介导的盒式交换的系统。

[0085] 在各种实施方案中,所述系统包含:如本文所公开的无启动子的供体载体;和一个表达载体,其包含编码对成对的重组酶识别位点特异的重组酶的两个基因。

[0086] 在各种实施方案中,所述系统包含:如本文所公开的无启动子的供体载体;和两个表达载体,第一表达载体包含编码对所述成对的重组酶识别位点中的一个特异的第一重组酶的第一基因,而第二表达载体包含编码对所述成对的重组酶识别位点中的另一个特异的第二重组酶的第二基因。

[0087] 在各种实施方案中,所述系统包含:无启动子的供体载体,其包含在转基因或RNA上游的多聚腺苷酸化信号或转录终止元件、转基因或RNA、及成对的重组酶识别位点;和一个表达载体,其包含编码对成对的重组酶识别位点特异的重组酶的两个基因。

[0088] 在各种实施方案中,所述系统包含:无启动子的供体载体,其包含在转基因或RNA上游的多聚腺苷酸化信号或转录终止元件、转基因或RNA、及成对的重组酶识别位点;和两个表达载体,第一表达载体包含编码对所述成对的重组酶识别位点中的一个特异的第一重组酶的第一基因,而第二表达载体包含编码对所述成对的重组酶识别位点中的另一个特异的第二重组酶的第二基因。

[0089] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含转录后调控元件。在各种实施方案中,无启动子的供体载体进一步包含在转基因或RNA下游的多聚腺苷酸化信号。

[0090] 在各种实施方案中,无启动子的供体载体包含:PGK多聚腺苷酸化信号(pA);三聚SV40pA;转基因或RNA;l_{ox}P;翻转酶识别靶标(FRT);兔β球蛋白pA;及土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

[0091] 成对的重组酶位点的取向是由转基因动物中的工程改造基因座来确定(即,如果转基因将要在上游启动子的‘有义’方向上插入,那么重组酶位点恰好将模拟一对外部重组酶位点)。因此,在各种实施方案中,成对的重组酶识别位点是在正确的取向上。在各种实施方案中,l_{ox}P不在反向取向上。

[0092] 在各种实施方案中,成对的重组酶识别位点为l_{ox}P和翻转酶识别靶标(FRT),且重组酶为cre和flp。Flp的实例包括flpE和flpO。

[0093] 重组酶(和位点)的其它实例包括但不限于VCre (Vlox和衍生物)、SCre (Slox和衍生物)、Dre (Rox和衍生物)、及phiC31 (attb)。

[0094] 在各种实施方案中, RNA为siRNA、shRNA或sgRNA。

[0095] 在各种实施方案中, 转基因或RNA包含疾病相关突变。在各种实施方案中, 转基因或RNA包含功能获得(GOF)突变。在各种实施方案中, 转基因或RNA包含功能丧失(LOF)突变。

[0096] 转基因的实例包括但不限于致癌功能获得突变, 包括Ras、H3f3a、Pdgfra、Trp53点突变、Idh1。RNA (shRNA和sgRNA) 的实例包括但不限于肿瘤抑制因子靶标, 如Trp53、Nf1、Atrx或Pten。

[0097] 转录后调控元件的实例包括但不限于乙型肝炎病毒转录后调控元件 (HPRE) 和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPRE)。

[0098] 在各种实施方案中, 上文和下文所述的无启动子的供体载体进一步包含编码抗生素的基因。在各种实施方案中, 无启动子的供体载体进一步包含编码嘌呤霉素或真核替代物(卡那霉素、杀稻瘟菌素等)的基因。在各种实施方案中, 上文和下文所述的无启动子的供体载体进一步包含编码强力霉素调控的反式激活蛋白或基于CRISPR/Cas的变体(例如SpCas9或Cpf1)的基因, 以便在与sgRNA配对时用于DNA裂解、基因激活(Crispra)或基因抑制(Crispri)。

[0099] 在各种实施方案中, 上文和下文所述的无启动子的供体载体进一步包含编码一种或多种面条怪物荧光蛋白(SM_FP)的基因。在各种实施方案中, 所述一种或多种SM_FP是各自不同的SM_FP。在各种实施方案中, 所述一种或多种SM_FP是四种不同的SM_FP。

[0100] 在各种实施方案中, 无启动子的供体载体进一步包含编码一个或多个表位标签的基因。例如, 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个表位标签。表位标签可为重复或不同的标签。在各种实施方案中, 表位标签为HA标签、Myc标签、V5标签或Flag标签。

[0101] 在各种实施方案中, 无启动子的供体载体包含大负荷的细菌人工染色体(BAC)。

[0102] 动物模型

[0103] 本发明的各种实施方案提供一种非人动物模型及产生所述非人动物模型的方法。所述动物模型可用于为癌症驱动突变(例如, 功能获得致癌基因)建模。

[0104] 在各种实施方案中, 生成非人动物模型包括提供用于双重重组酶介导的盒式交换的系统; 向非人动物施用所述用于双重重组酶介导的盒式交换的系统; 以及使非人动物经历电穿孔。

[0105] 所提供并用于生成非人动物模型的用于双重重组酶介导的盒式交换的系统是一种如本文所述用于本发明的双重重组酶介导的盒式交换的系统。

[0106] 在各种实施方案中, 所述方法进一步包括施用hypBase和/或报道基因质粒。

[0107] 可向其中需要测试的位置施用用于双重重组酶介导的盒式交换电穿孔的系统。例如, 对于研究脑的实验, 可将系统注射到侧脑中并且可在那个位置处进行电穿孔。在另一实例中, 对于研究脊髓的实验, 可将系统注射到例如脑脊液或脊髓中或附近, 并且可在脊髓处或附近进行电穿孔。

[0108] 在各种实施方案中, 非人动物模型包括一种如本文所公开用于双重重组酶介导的盒式交换的系统, 其中已发生双重重组酶介导的盒式交换。

[0109] 在各种实施方案中, 非人动物是小鼠。在其它实施方案中, 非人动物是大鼠、仓鼠、

沙鼠、猪、豚鼠、兔、猴(例如恒河猴)、狒狒、黑猩猩、绵羊或狗。在各种实施方案中,非人动物是基因工程改造的小鼠。在各种实施方案中,非人动物是具有成对的双重重组酶位点的基因工程改造的小鼠。在各种实施方案中,小鼠是Rosa26mTmG (mTmG)、Ai14、R26-CAG-LF-mTFP1或IKMC小鼠或具有相似的成对双重重组酶位点的小鼠。

[0110] 药物筛选

[0111] 本发明的各种实施方案提供了一种筛选药物候选物的方法,其包括:提供本发明的非人动物模型,施用所述药物候选物,以及评价所述药物候选物对所述非人动物模型的作用。

[0112] 在各种实施方案中,所述方法进一步包括当药物候选物对非人动物模型提供有利结果时选择所述药物候选物作为药物。在各种实施方案中,所述方法进一步包括当药物候选物对非人动物模型提供有利结果时证实所述药物候选物为药物。

[0113] “有利结果”可包括但不限于降低或减轻疾病病状的严重性、防止疾病病状恶化、治愈疾病病状和延长患者寿命或预期寿命。

[0114] 治疗方法

[0115] 本发明的各种实施方案提供了一种治疗受试者的疾病或病状的方法,其包括:提供包含本发明的用于双重重组酶介导的盒式交换的系统的细胞,及向所述受试者施用所述细胞。

[0116] 在各种实施方案中,所述细胞为干细胞。

[0117] 在各种实施方案中,双重重组酶介导的盒式交换在所述细胞中发生。

[0118] 向受试者施用所述细胞可通过适于所述疾病病状的施用途径来进行。“施用途径”可指的是本领域中已知的任何施用途径,包括但不限于气溶胶、经鼻、经口、经粘膜、经皮或胃肠外。“经皮”施用可使用局部霜剂或膏剂或借助于经皮贴剂完成。“胃肠外”是指一般与注射有关的施用途径,包括眶内、输注、动脉内、囊内、心内、皮内、肌内、腹膜内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、包膜下、皮下、经粘膜或经气管。经由胃肠外途径,组合物可呈供输注或注射之用的溶液或混悬液形式,或作为冻干粉剂。

[0119] 经由肠内途径,药物组合物可呈以下形式:片剂、凝胶胶囊、糖衣片剂、糖浆剂、混悬液、溶液、粉剂、颗粒剂、乳液、容许控制释放的微球或纳米球或脂质囊泡或聚合物囊泡。经由胃肠外途径,组合物可呈供输注或注射之用的溶液或混悬液形式。

[0120] 经由局部途径,基于根据本发明的化合物的药物组合物可被配制用于治疗皮肤和粘膜并且呈以下形式:膏剂、霜剂、乳汁液、油膏剂、粉剂、浸渍垫、溶液、凝胶、喷雾剂、洗剂或混悬液。它们还可呈微球或纳米球或脂质囊泡或聚合物囊泡或聚合物贴剂和水凝胶形式,以便容许控制释放。这些局部途径组合物可呈无水形式或含水形式,这取决于临床适应症。

[0121] 经由眼途径,它们可呈滴眼剂形式。

[0122] 在各种实施方案中,细胞通过移植来施用。治疗包括在如癌症、神经变性疾病、中风或癫痫的疾病中随着dRMCE事件使用移植细胞以递送生长因子、外泌体或肽疗法。

[0123] 在各种实施方案中,移植细胞,接着通过电穿孔或病毒转导后续靶向于dRMCE。

实施例

[0124] 提供以下实施例以更好地说明要求保护的发明,而不能将这些实施例解释为限制本发明的范围。就提到特定的材料而言,其仅用于说明的目的,而不是为了限制本发明。本领域技术人员无需施展创造能力即可开发等效的手段或反应物而不偏离本发明的范围。

[0125] 实施例1

[0126] 克隆

[0127] Flp-Cre构建体是由Y.Voziyanov慷慨提供且早先在dRMCE的情形下证实。我们的供体质粒来源于PGKneotpAlox2,使用In-Fusion技术(Clontech),与标准限制消化技术组合。FRT位点通过使两个寡聚物退火并将插入物注入PGKneotpAlox2中生成。其它供体质粒的下游生成通过移除现有的ORF并使用In-Fusion或连接添加新盒来完成。先前描述了PB-CAG-质粒。

[0128] 小鼠和电穿孔

[0129] Gt (ROSA) 26Sortm4 (ACTB-tdTomato, -EGFP) Luo/J小鼠是购自Jackson Laboratory。使mTmG与野生型CD1小鼠(Charles River)杂交以产生杂合小鼠。根据Cedars-Sinai Institutional Animal Care and Use Committee使用所有小鼠。如先前所述进行产后侧脑室EP。将P1-3幼仔置于冰上约5min。除非另外指出,所有DNA混合物含有于Tris-EDTA缓冲液中稀释的0.5-1 μ g/ μ l的Flp-Cre表达载体、供体质粒、hypBase或CAG-报道基因质粒。向混合物中添加固绿染料(10% v/v),将其注射到侧脑室中。Platinum Tweezertrodes由ECM 830系统(Harvard Apparatus)递送5个脉冲的120V(50ms;以950ms间隔)。应用SignaGel以增加导电性。使小鼠在热灯下变暖并送回其笼内。

[0130] 组织制备

[0131] 在麻醉之后,将小鼠脑分离并在4 $^{\circ}$ C下固定于4%PFA中过夜。将脑包埋入4%低熔点琼脂糖中并在振动切片机(Leica)上以70 μ m切片。

[0132] 免疫组织化学

[0133] 使用如先前所述的标准方法进行免疫组织化学。以1:500使用所有二抗(Jackson ImmunoResearch)。关于一抗的详情可见于表3中。

[0134] 表3. 研究中使用的抗体

[0135]

Abcam 13970	鸡抗EGFP	1:5000
Abcam 95038	山羊抗V5	1:1000
Active Motif	rb抗H3f3a pS31	1:500
Aves	鸡抗Myc	1:500
BD Pharmingen	大鼠抗PDGFR α	1:500
BD Pharmingen	Rt抗Pecam1	1:250
Calbiochem	绵羊抗p53	1:1000
Cell Signaling	rb抗H3K27Me	1:1000
Cell Signaling	rb抗Pdgfrb	1:500
Cell Signaling	rb抗des	1:500
Cell Signaling 3724	兔抗HA	1:2000
Cell Signaling 9308	兔抗pRb1	1:500

Clontech 9G9	小鼠抗tetR	1:1000
Clontech 9G9	rb抗dsred	1:1000
Daweo Cai (Univ of Mich)	兔抗dsRed	1:1000
Dawen Cai (Univ of Mich)	豚鼠抗mKate2	1:500
Invitrogen 46-0705	小鼠抗V5	1:1000
Kerafast	大鼠抗tdtomato	1:2000
R&D Systems	绵羊抗D111	1:500
R&D Systems	Gt抗Olig2	1:500
Revmab	rb抗H3f3a	1:100
Sigma	小鼠抗Flag	1:2500

[0136] 细胞培养和核转染

[0137] 将三个杂合P0 mTmG幼仔的脑解离以建立研究中使用的小鼠神经干细胞系。将细胞系如先前所述维持。使细胞生长于含有Neurobasal®-A Medium (Life Technologies 10888-022)的培养基中,其中补充有无维生素A的B-27 (Life Technologies 12587-010)、GlutaMAX (Life Technologies 35050)、抗生素-抗真菌剂 (Life Technologies 15240)、hEGFP (Sigma E9644)、肝素 (Sigma H3393)和bFGF (Millipore GF003)。使用Nucleofector 2b装置和小鼠神经干细胞试剂盒,根据制造商的推荐 (Lonza AG) 进行神经干细胞核转染。核转染混合物含有浓度等于10ng/μl的质粒。

[0138] 成像和加工

[0139] 在Nikon A1R倒置激光共焦显微镜上收集所有固定图像。在EVOS数字荧光倒置显微镜上获得mNSC的活动图像。关于全脑图像,使用Nikon Elements的自动缝合功能。然后将ND2文件导入ImageJ中以生成Z-投影图像,随后在Adobe Photoshop CS6中对其进行编辑。将Adobe Illustrator CS6用于最后的图产生。

[0140] 流式细胞术

[0141] 如先前所述收集细胞。将细胞在PBS中短暂冲洗,通过酶促解离suing Accutase (Millipore) 移除,以250g沉淀3min,并且再悬浮于培养基中。在Cedars-Sinai流式细胞术中,在Beckman Coulter MoFlo上完成FACS。

[0142] 蛋白质印迹

[0143] 将细胞沉淀再悬浮于Laemmli缓冲液中并且在95℃下沸腾5min。在ThermoScientific NanoDrop 2000上测量蛋白质浓度。在SDS-PAGE分离并转移到硝酸纤维素膜上之后,使用表3中列出的抗体检测蛋白质,于0.1%PBS-Tween中的5%牛乳中稀释。以1:15000使用所有二抗 (Li-corIRDye®)。通过Li-Cor Odyssey® CLX成像系统完成红外检测。

[0144] 强力霉素和嘌呤霉素施用

[0145] 将强力霉素 (Clontech 631311) 以100ng/ml的最终浓度添加至培养基中。以1μg/ml使用嘌呤霉素 (Clontech 631305)。

[0146] 多miR-E敲低效率定量

[0147] 我们先前已使用基于F1Ex的转基因表达,具体来说,Cre介导的EGFP盒的反向和激活 (F1Ex-EGFP)。为了测试我们的靶向Nf1、Pten和Trp53的多miR-E,我们制造了携带多个

miR-E的CAG驱动的基于F1Ex的构建体(F1Ex-多miR-E)。产后mNSC系通过解离CD1幼仔的脑来建立,用EGFP或F1Ex-多miR-E和Cre-重组酶载体感染。对荧光细胞进行分选并使其经受mRNA提取及使用针对Nf1、Pten和Trp53的qPCR探针的基于SYBR的Fluidigm BioMark动态阵列。

[0148] 体内MADR效率的定量

[0149] 对于每个条件,将两只幼仔用pCAG-TagBFP2-nls、pDonor-smFP-HA和Flp-2A-Cre电穿孔。在EP后两天采集脑,并且用HA-Tag抗体和EGFP染色来自各脑的两个非相邻切片。对于每个切片,随机地选择约25个BFP+细胞,对BFP+细胞中的HA+和EGFP+细胞计数。对各组的四个切片的比例求平均值。

[0150] U6-sgRNA片段的PCR生成

[0151] 将短反向引物和超聚体(ultramers)正向引物(IDT DNA)在PCR反应中组合并进行后续纯化以制得浓缩的sgRNA(Ran等人,2013)。将100ng的每个片段与质粒DNA组合用于EP。

[0152] 为鼠科肿瘤细胞中的插入缺失突变测序

[0153] 通过FACS获得纯的肿瘤细胞群并且分离(Qiagen DNeasy)基因组DNA。使用侧接有gRNA靶位点的引物,我们PCR扩增了预期含有针对NF1、Trp53和Pten的插入缺失突变的区域。使用Thermo Fisher Zero Blunt TOPO试剂盒topo克隆PCR扩增的片段并且将其转化到One Shot MAX Efficiency DH5-T1R细胞中。

[0154] 本发明的各种实施方案如上在发明详述中所述。虽然这些描述直接描述了以上实施方案,但应当理解,本领域技术人员可以针对这里所示出并描述的特定实施方案构思出修改和/或变化。落入本说明书范围内的任何这种修改或变化也被认为包括在其中。除非具体指出,否则本发明人的意图是将在说明书和权利要求书中的词和短语赋予对本应用领域中普通技术人员而言普通和惯用的含义。

[0155] 已经给出了本申请人在提交申请时所了解的本发明的各种实施方案的上述描述,并且这些描述旨在用于示例和说明的目的。本描述并非穷举性的,也并非要将本发明限制为所公开的确切形式,且根据上述教导,可能存在许多修改和变化。所述实施方案解释了本发明的原理及其实际应用,从而使得本领域的其他技术人员能以各种实施方案且适于预期具体用途的各种修改利用本发明。因此,希望不要将本发明局限于所公开的用于实施本发明的具体实施方案。

[0156] 虽然本发明的具体实施方案已被示出和描述,但是基于本文的教导,对本领域技术人员显而易见的是,在不偏离本发明及其更广泛方面下可以做出改变和修改,且因此,所附权利要求在其范围内包括所有这样的改变和修改,正如在本发明的真正精神和范围内。本领域技术人员应理解,本文一般使用的术语通常意为“开放式”术语(例如,应该将术语“包括(including)”理解为“包括但不限于”,应该将术语“具有”理解为“具有至少”,应该将术语“包括(includes)”理解为“包括但不限于”等)。

序列表

<110> 西达-赛奈医疗中心 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER)

BREUNIG, Joshua

DANIELPOUR, Moise

GI, Kim Bum

<120> 用于体内双重组酶介导的盒式交换 (dRMCE) 的系统和方法及其疾病模型

<130> 065472-000508W000

<150> 62/287,197

<151> 2016-01-26

<160> 20

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 1

gcaacgtgct ggttattgtg c 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 2

ctcaatccag cggaccttcc 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 3

agcaaagacc ccaacgagaa g 21

<210> 4

<211> 20

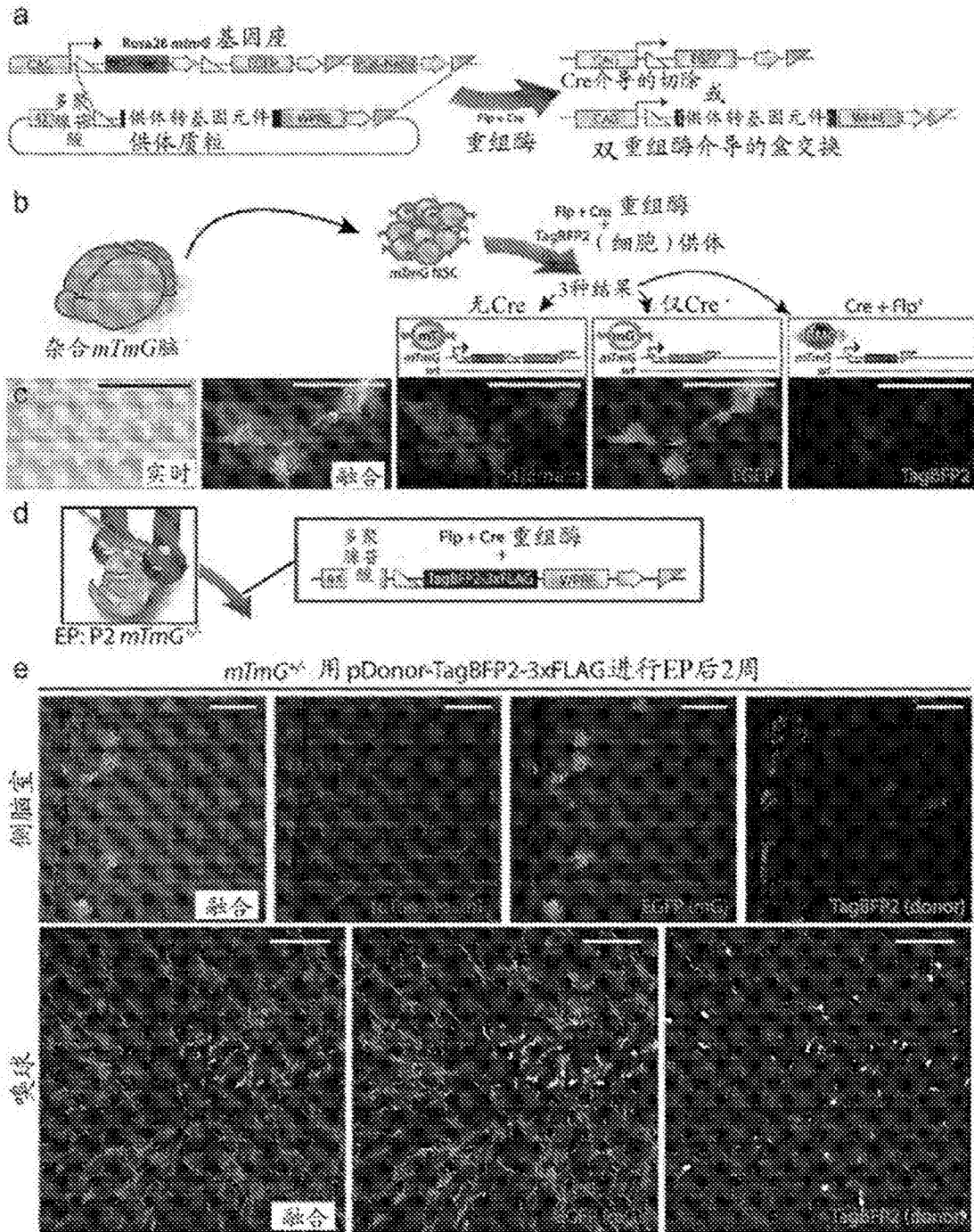
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 4
tgtctggatc cccatcaagc 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 5
atgccctggc tcacaaatac 20
<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 6
acacaggcat agagtgtc 18
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 7
gatgacggcc atgttgttgt cc 22
<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 8
tttaacagag agaagttcgt ggc 23
<210> 9
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 9
ggagcgggag aatggatat g 21
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 10
cgaaaggccc ggagatgagg aag 23
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 11
tgatcgcgct tctcgttggg 20
<210> 12
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 12
gcatacat 8
<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 13
gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttc 34
<210> 14

<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 14
atagtatgc 9
<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 15
aactccctcg atgtggcggc tcatctgccc 30
<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 16
aactccctcg aatgtggcgg ctcatctgcc c 31
<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 17
tctcctggct cagagggage tcgaggetg 29
<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> misc_feature

<222> (5) .. (11)
<223> n=other
<400> 18
tctcnnnnnn nagagggagc tcgaggctg 29
<210> 19
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 19
ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34
<210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 20
ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat 34



F

在体内基于EP的重组效率

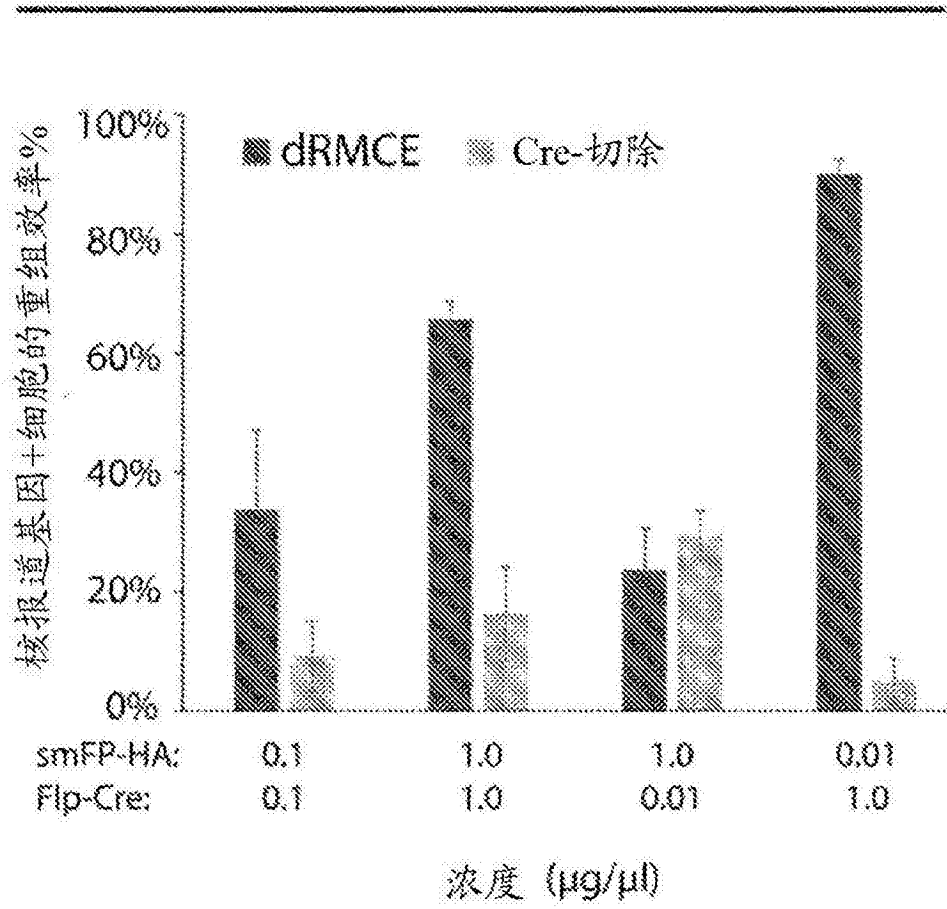


图1

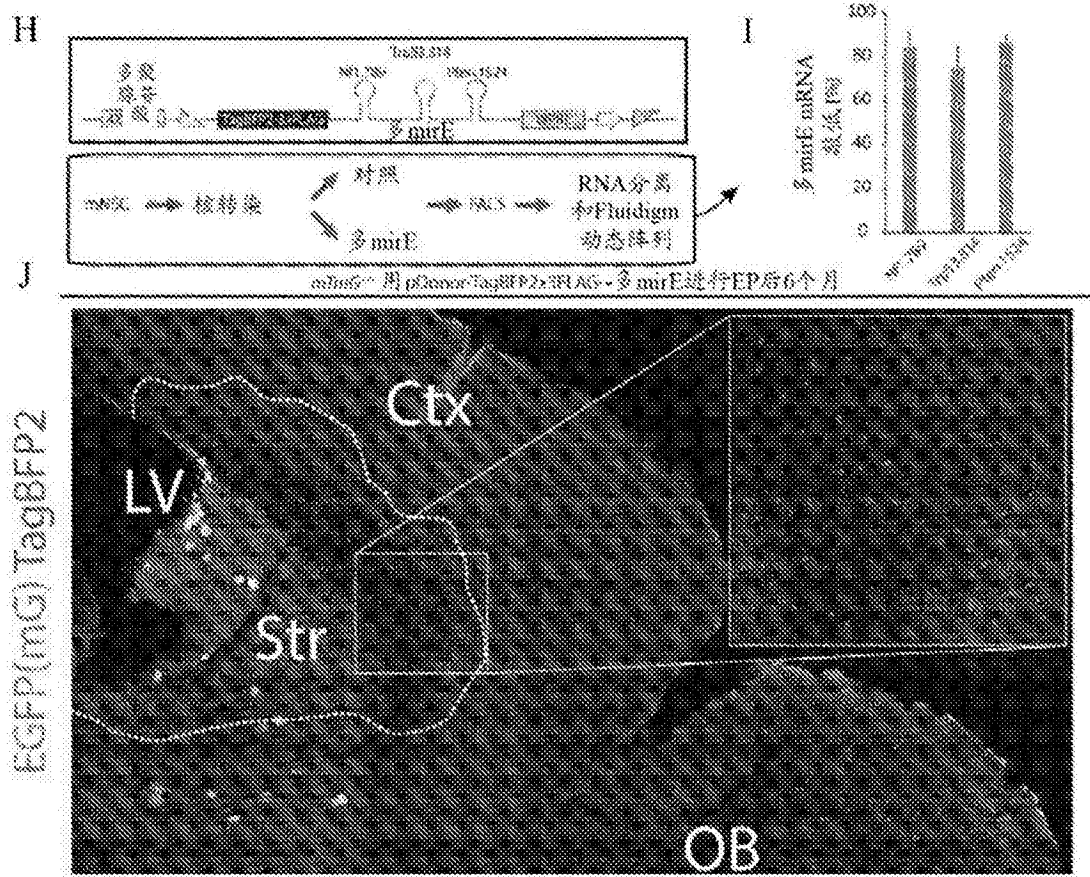


图2

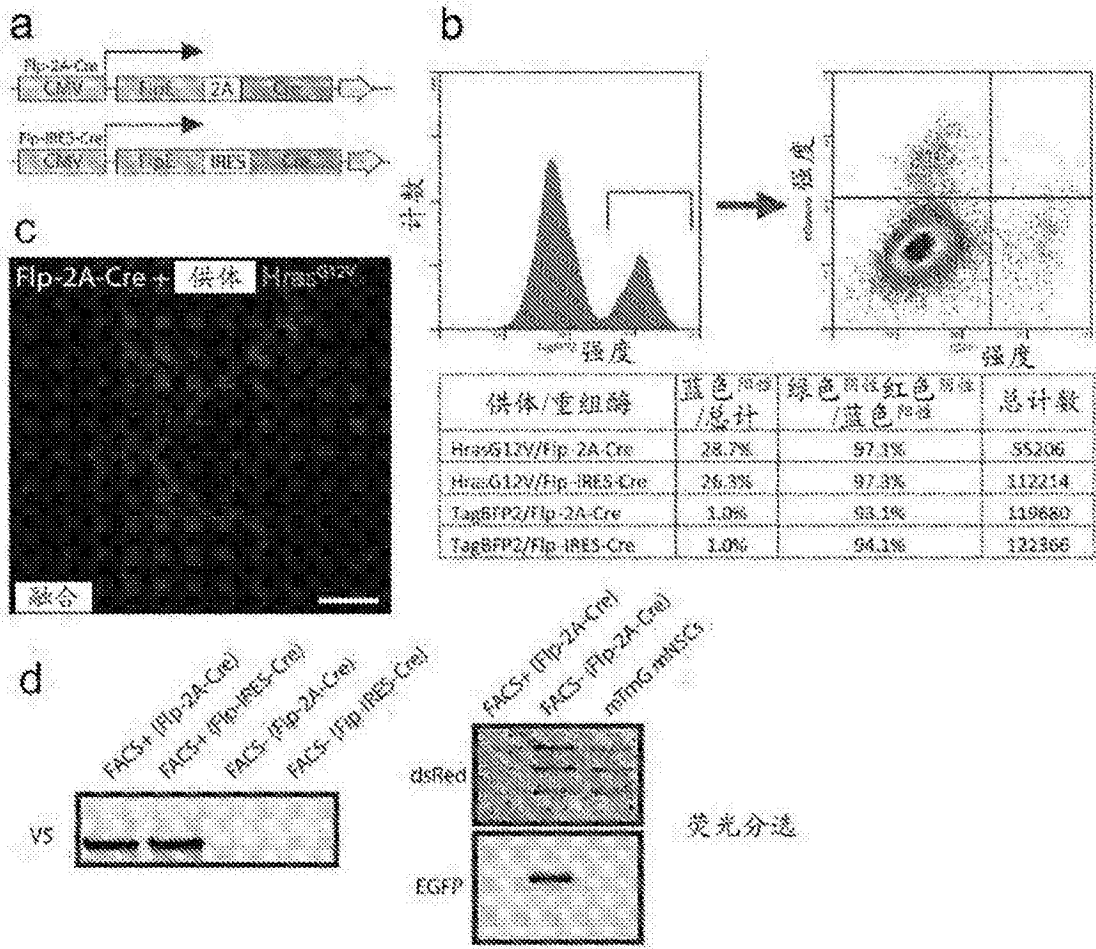
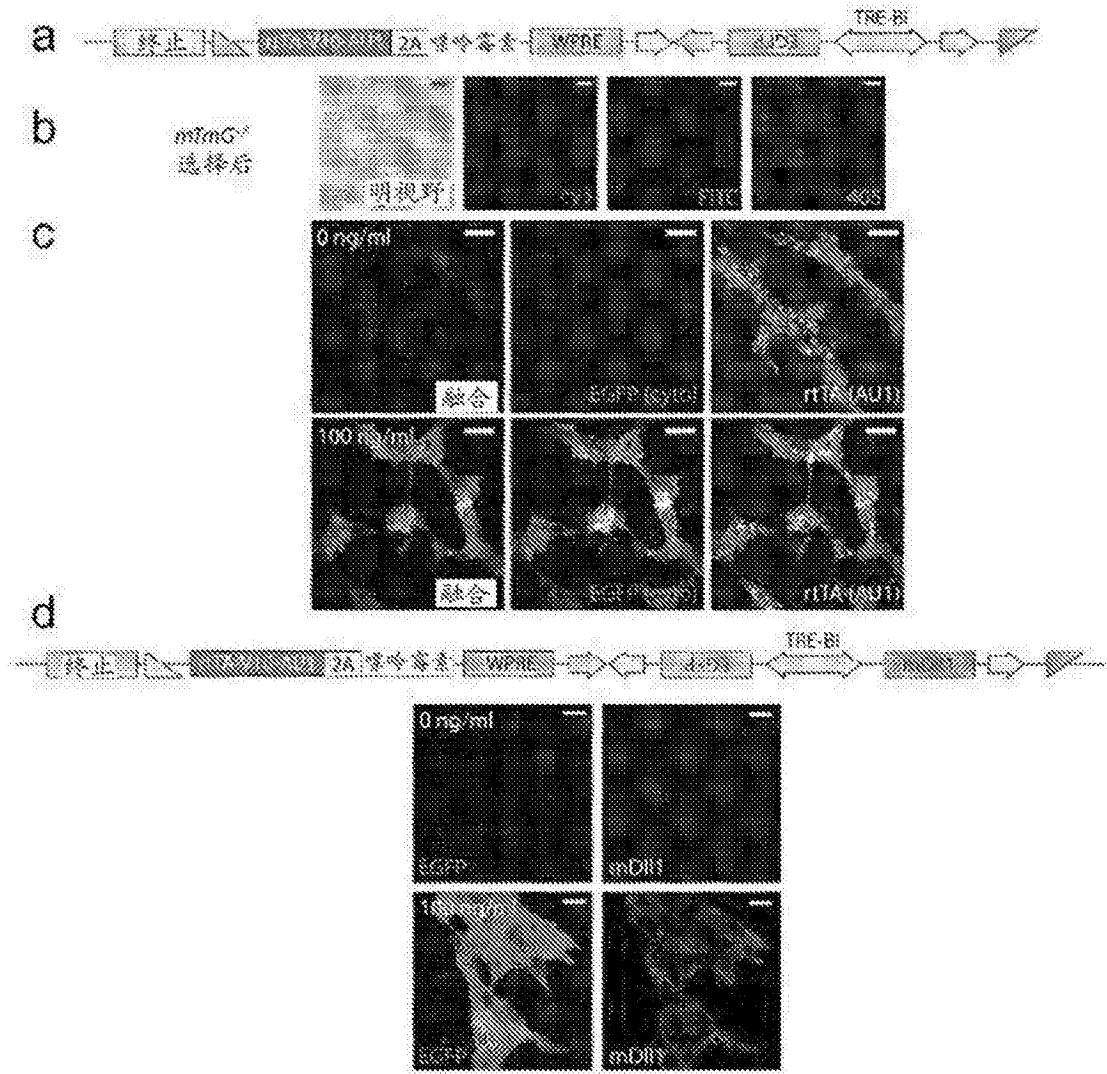


图3



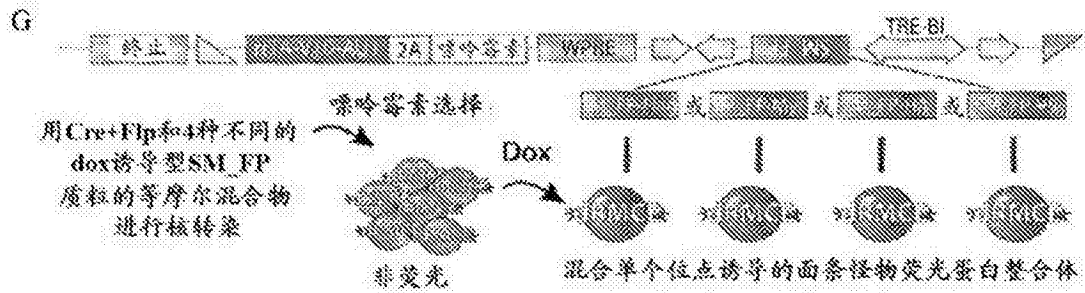
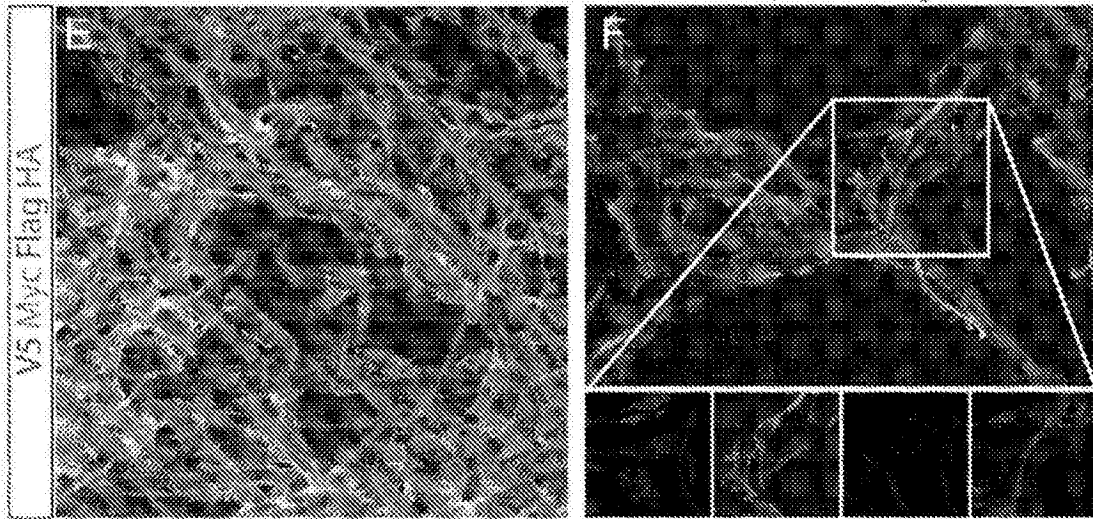


图4

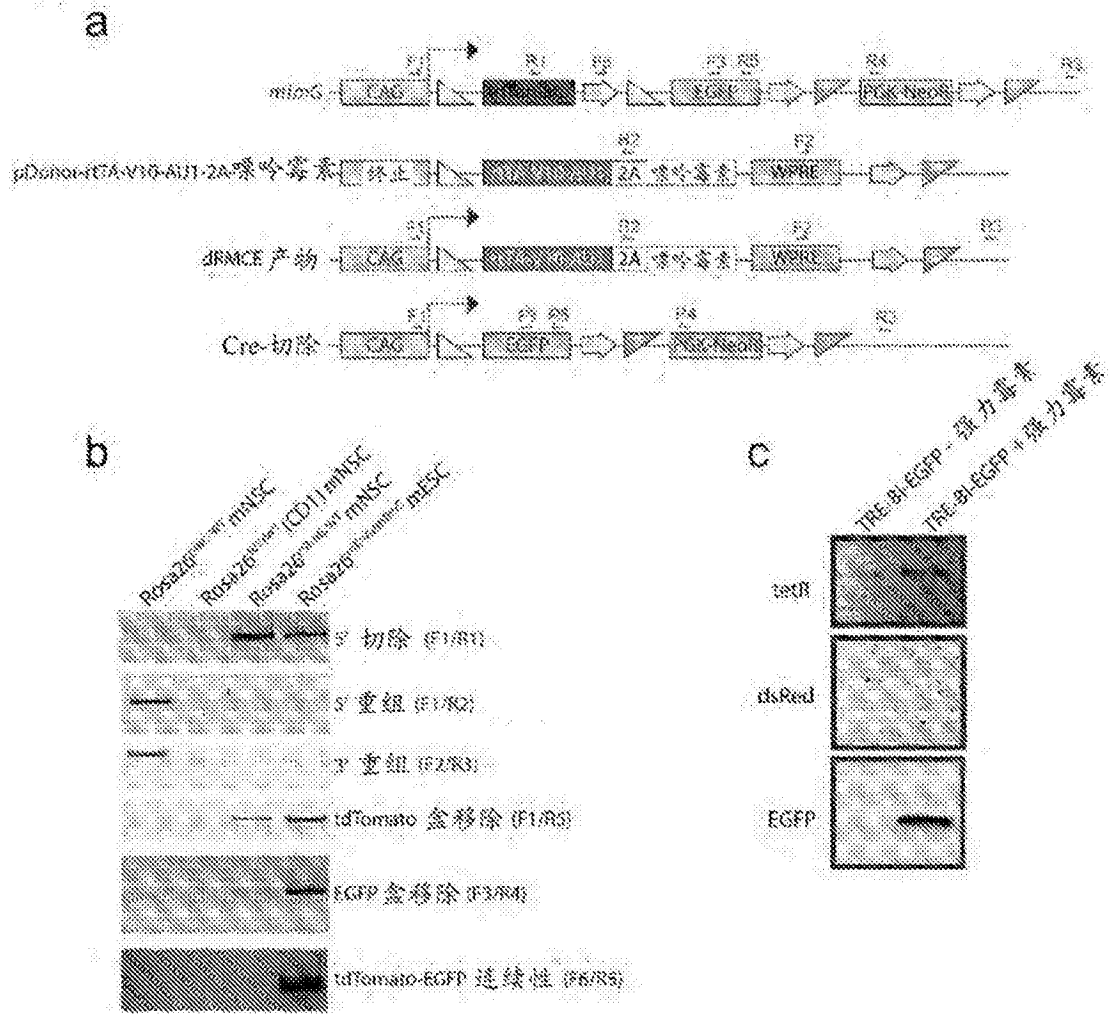


图5

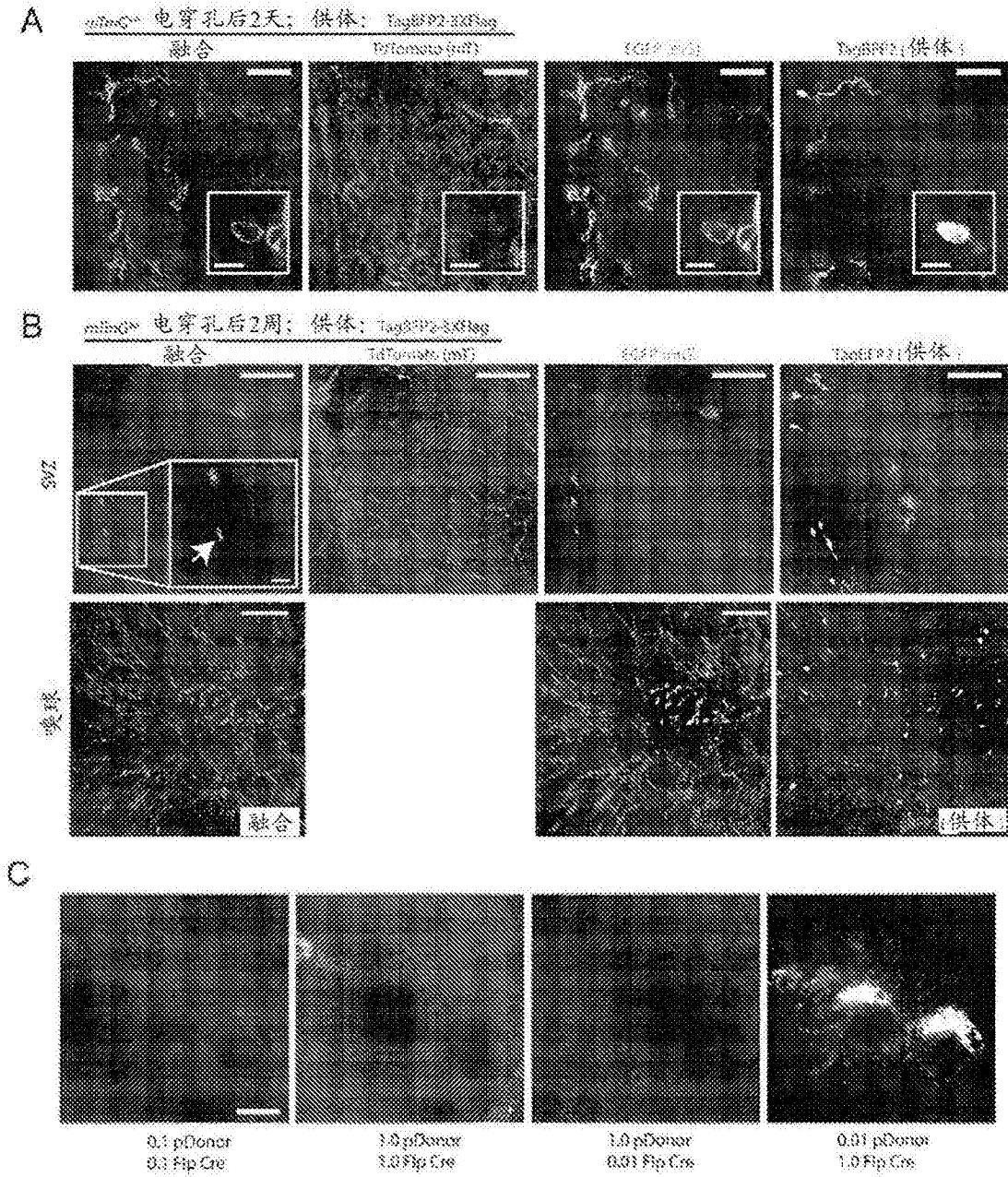


图6

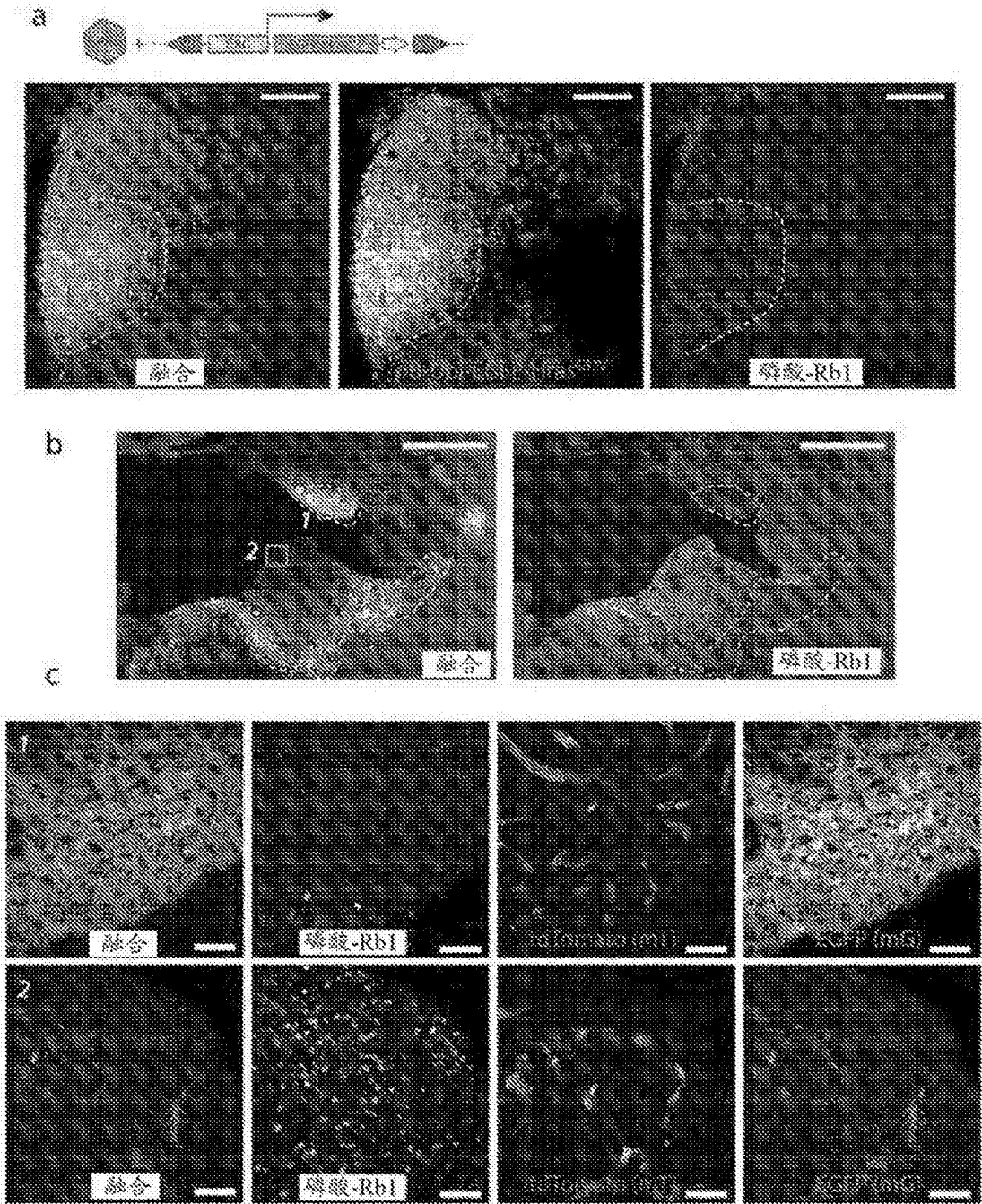


图7

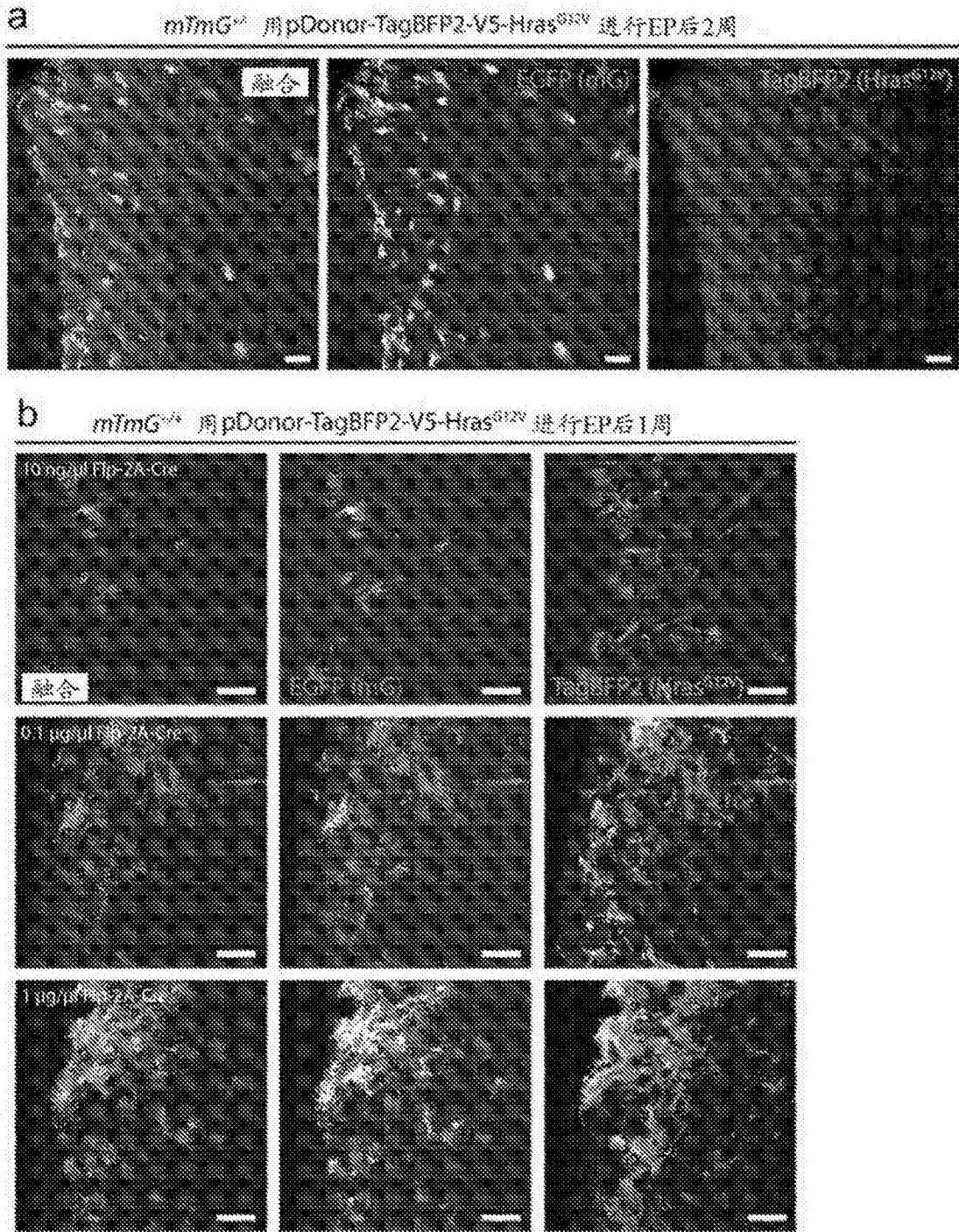


图8

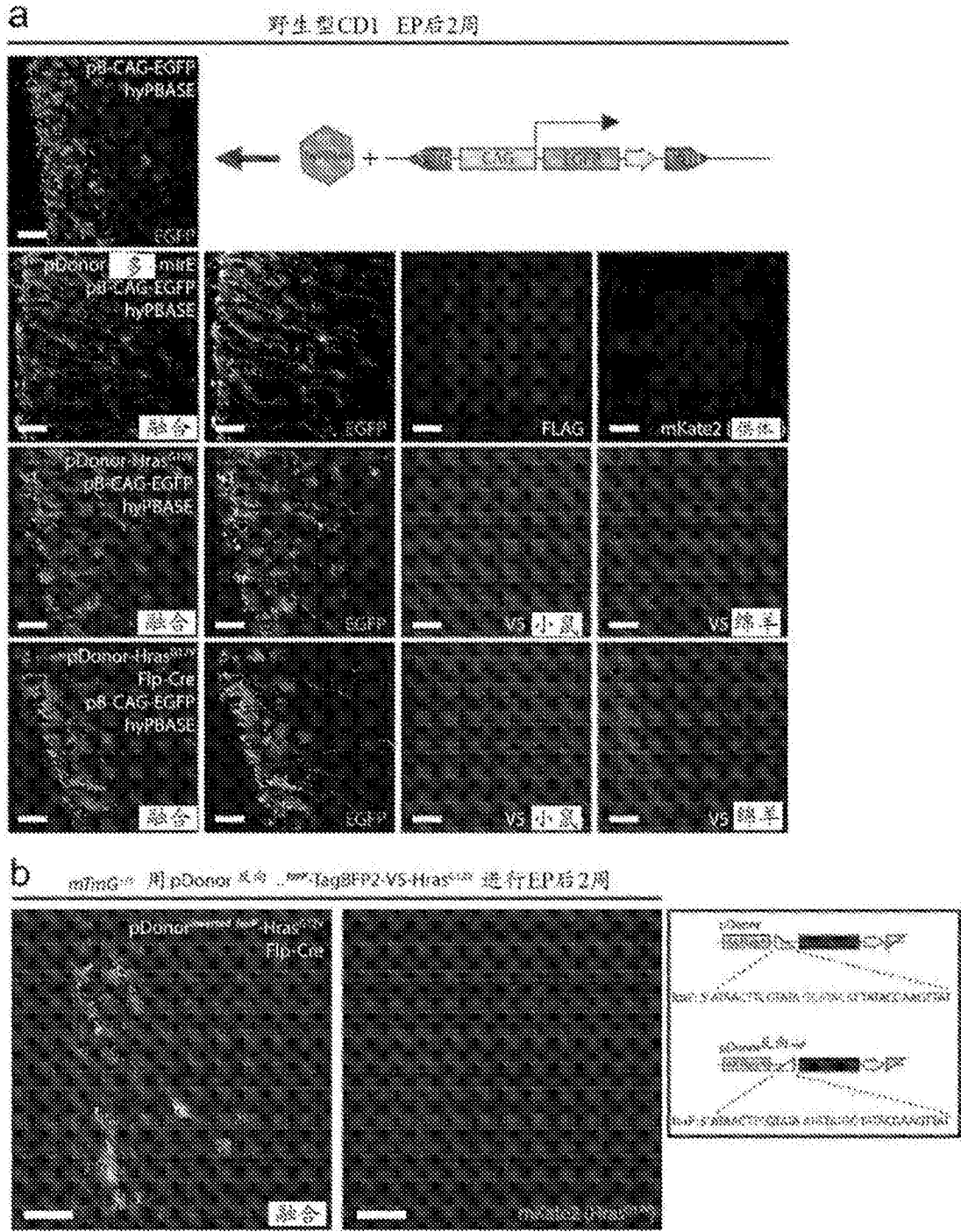
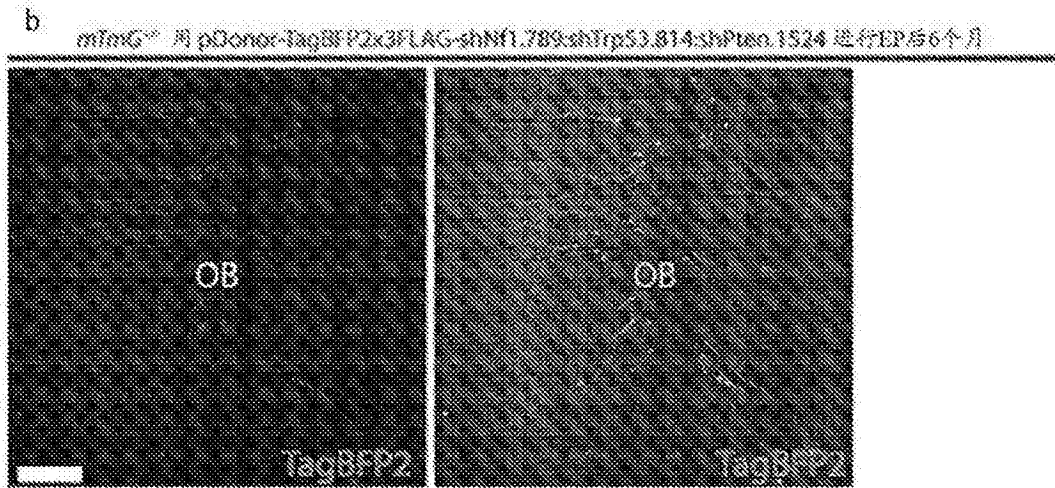
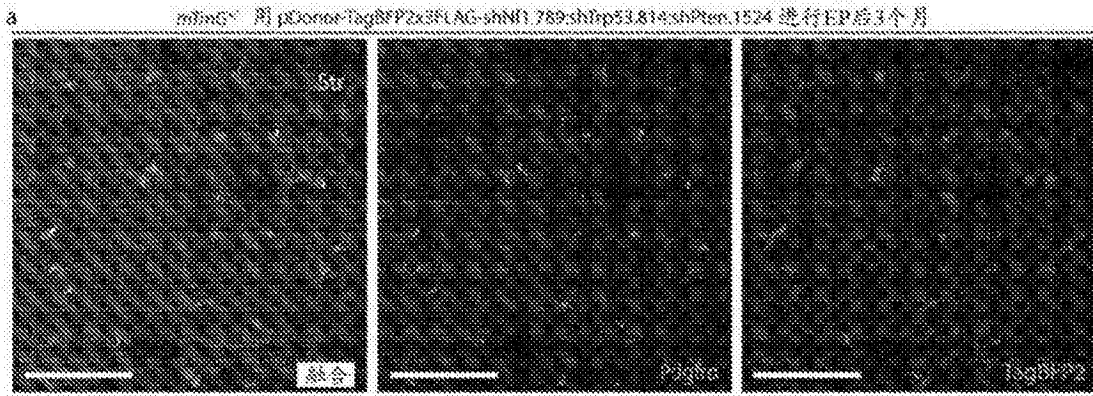
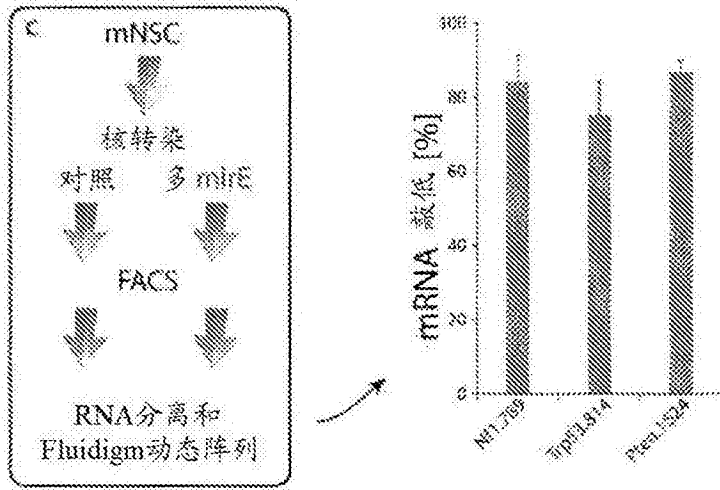


图9





野生型CD1用piggyBac-转置的EGFP报道基因及附加型Cas9+经过PCR的Nfl, Trp53和Pten sgRNA进行EP后2个月

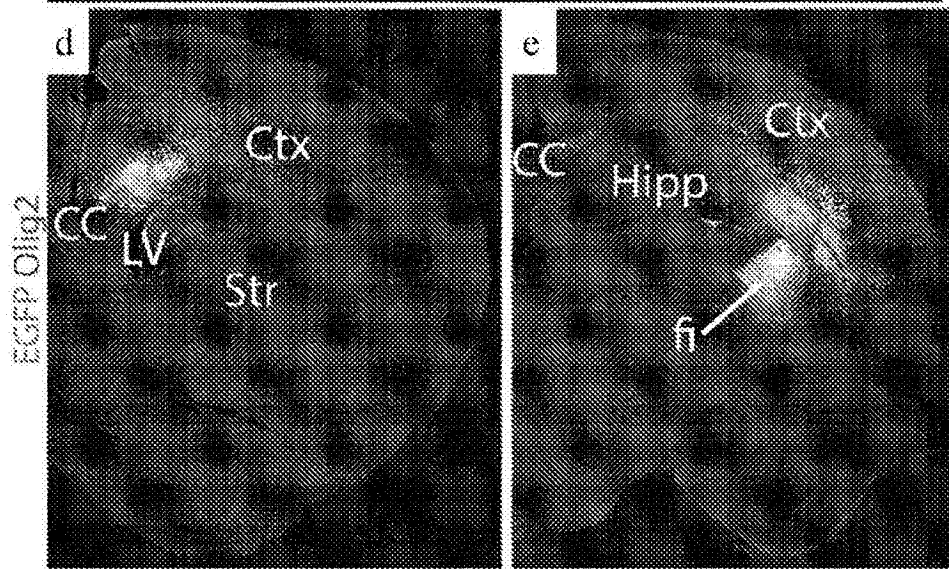
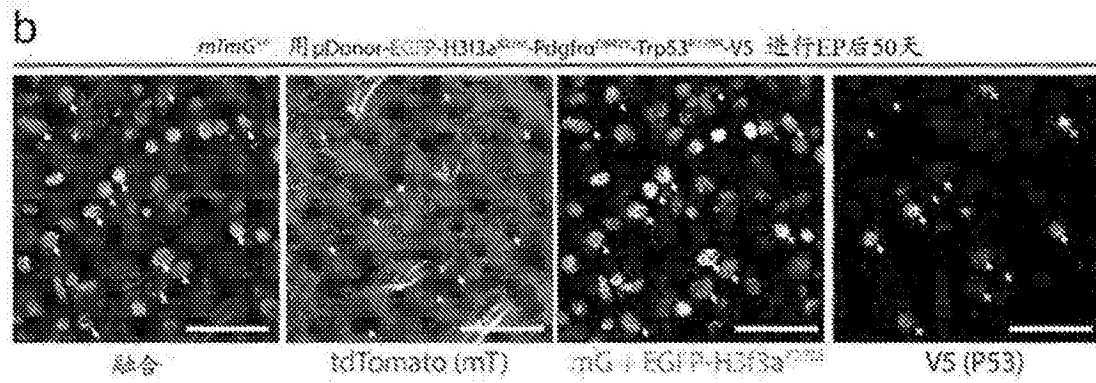
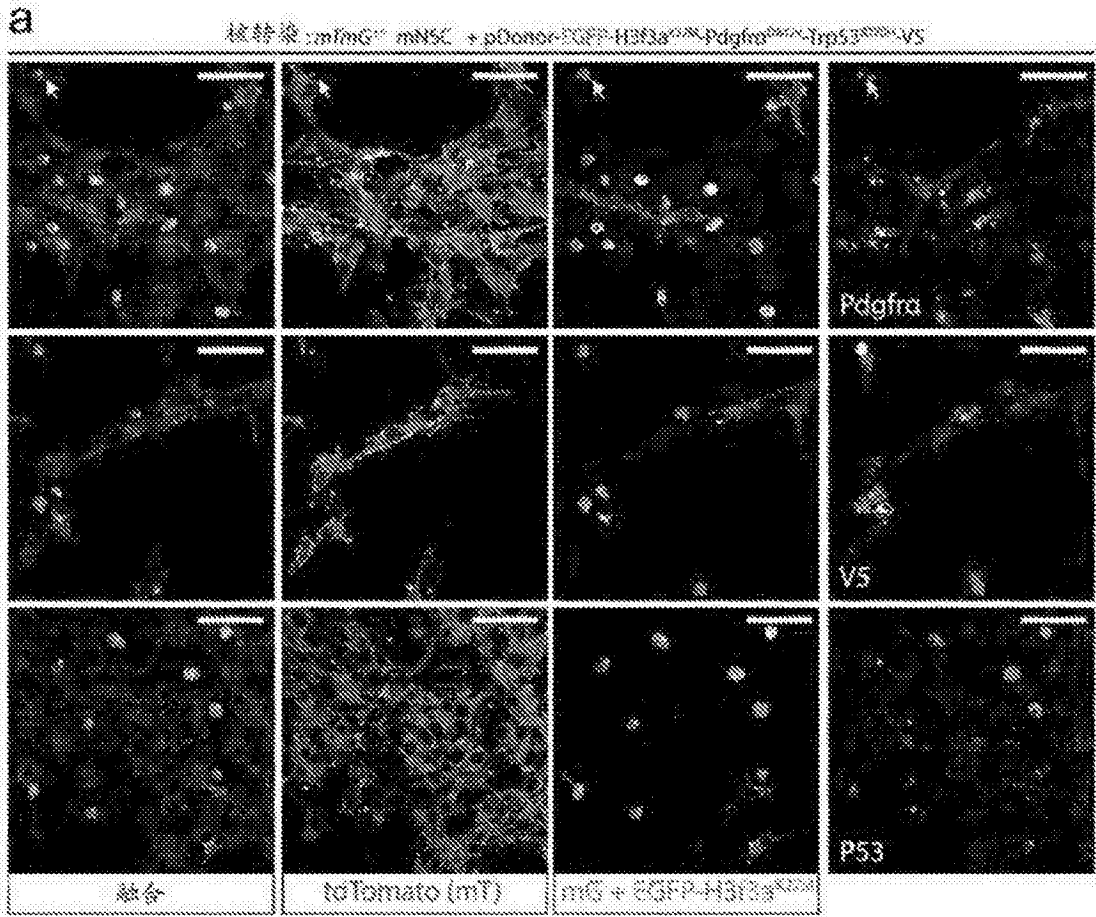
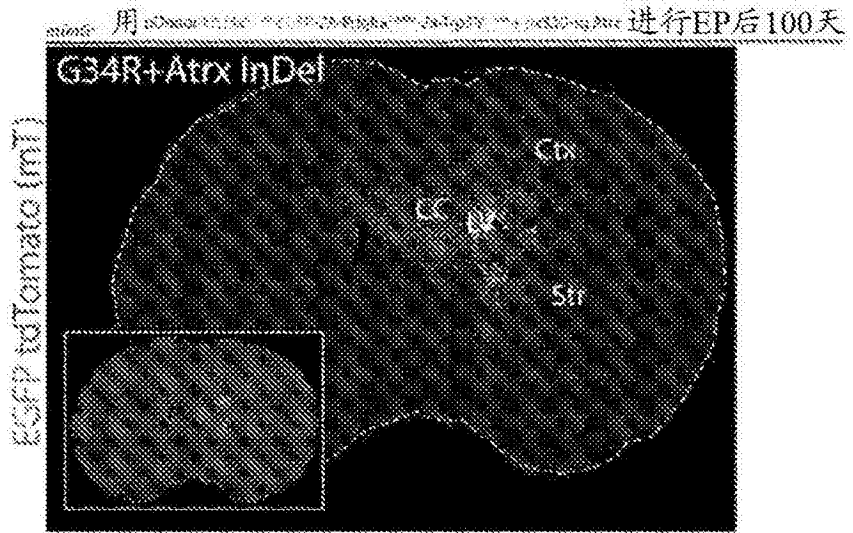
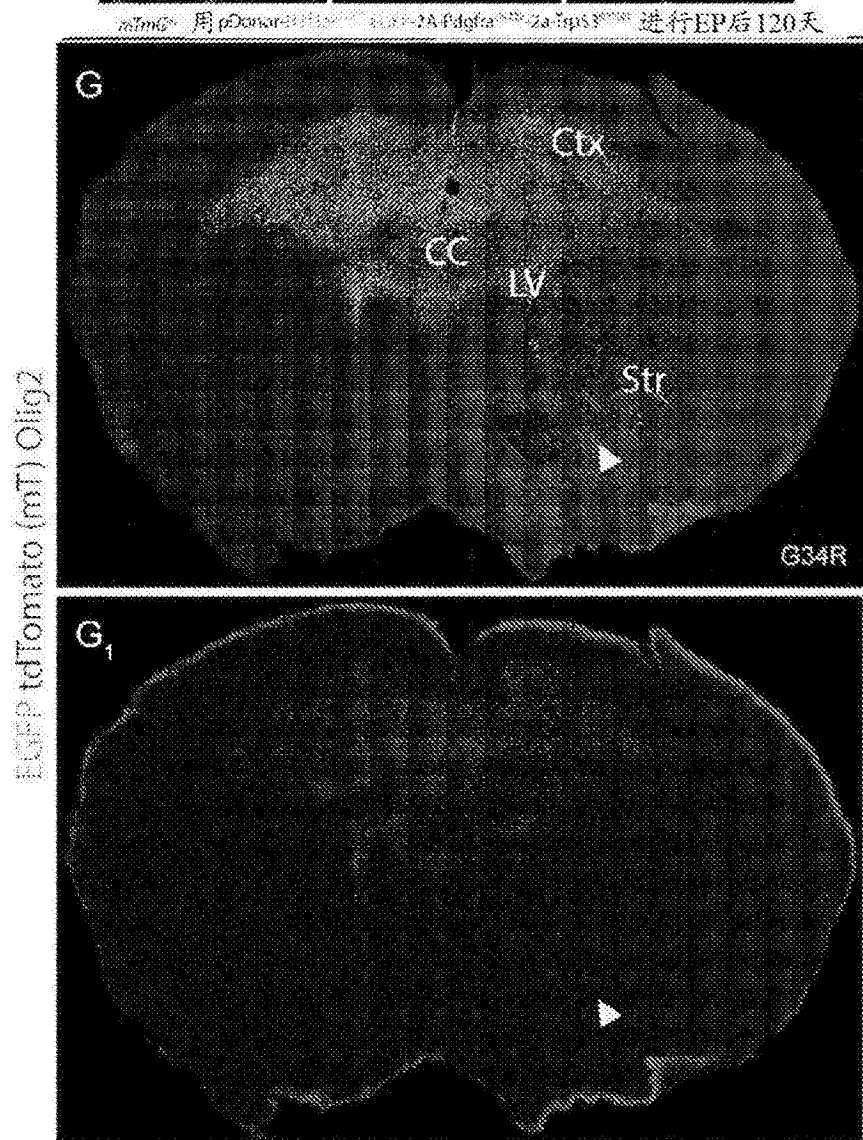
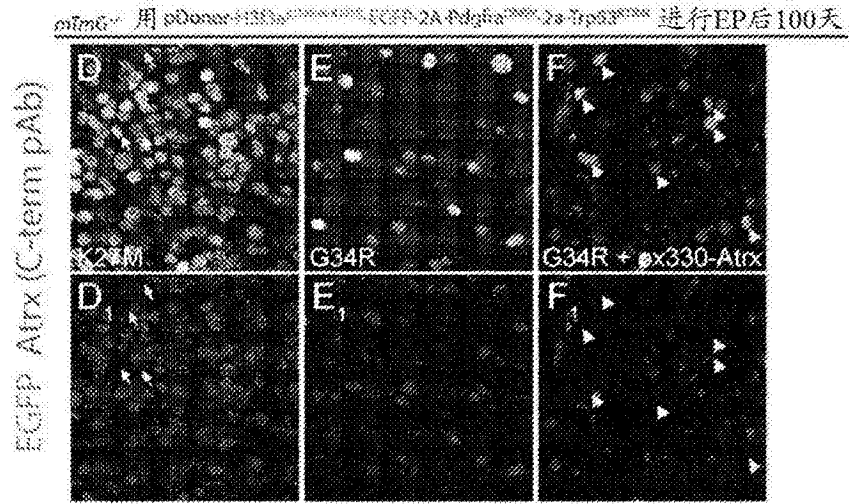


图10



C





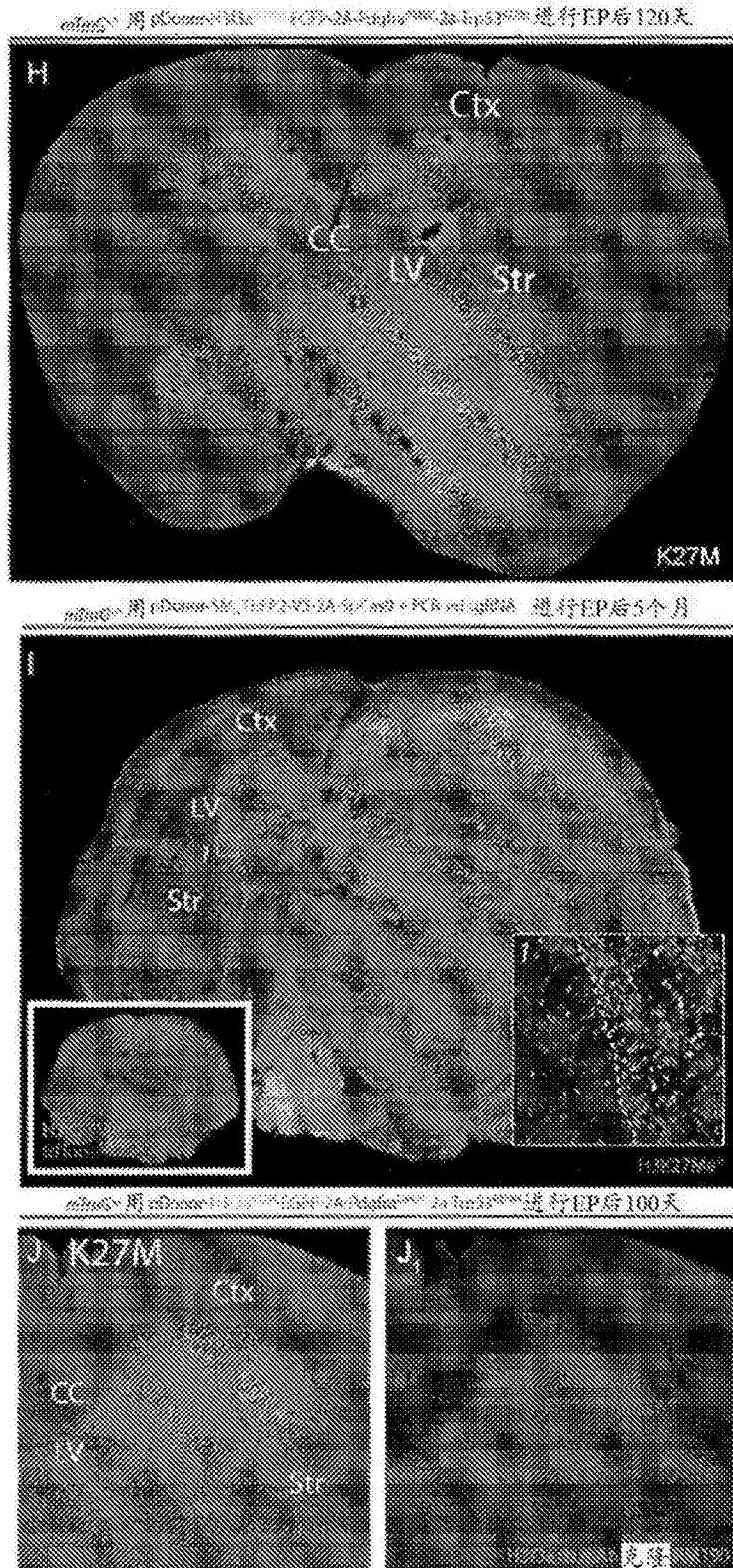


图11

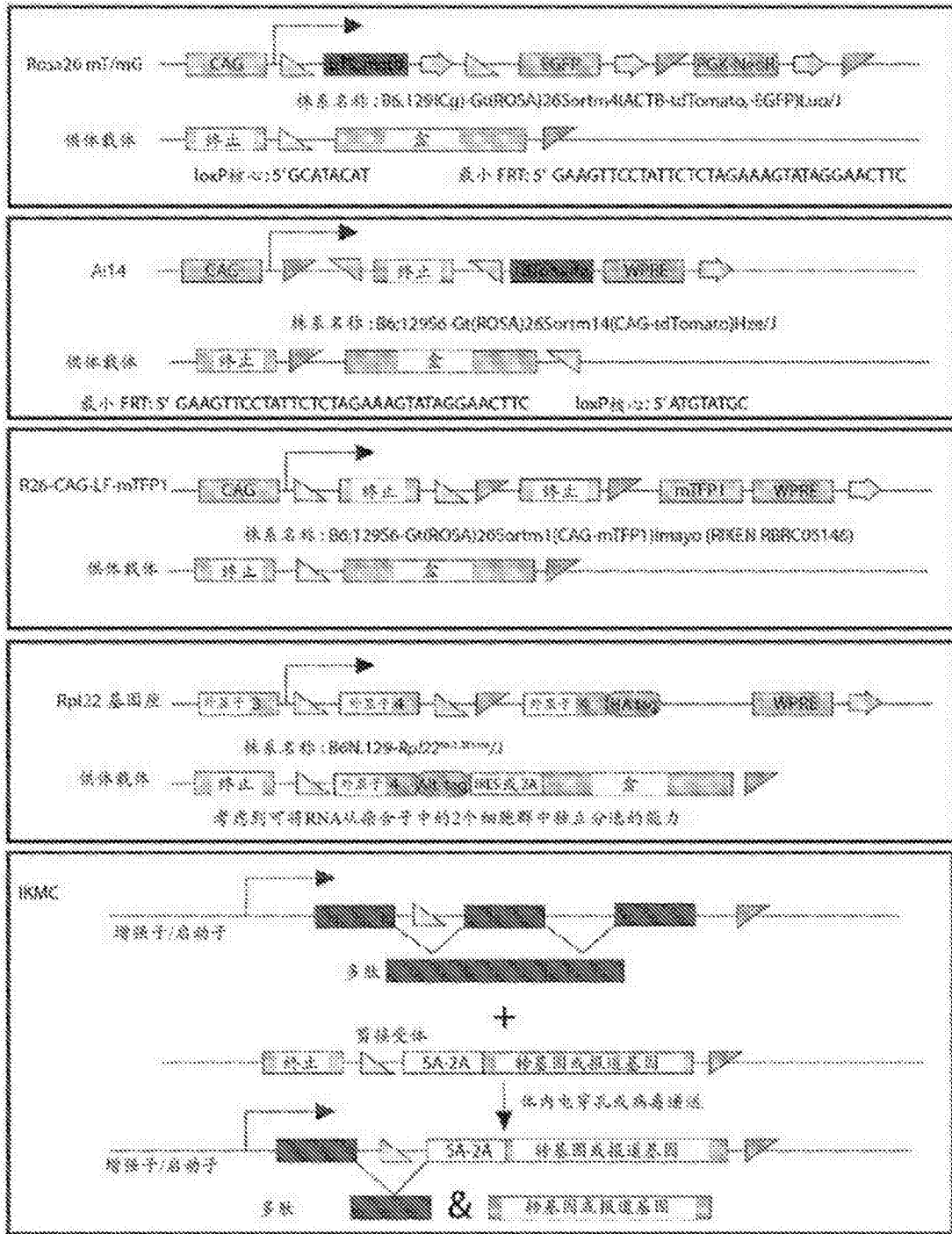


图12

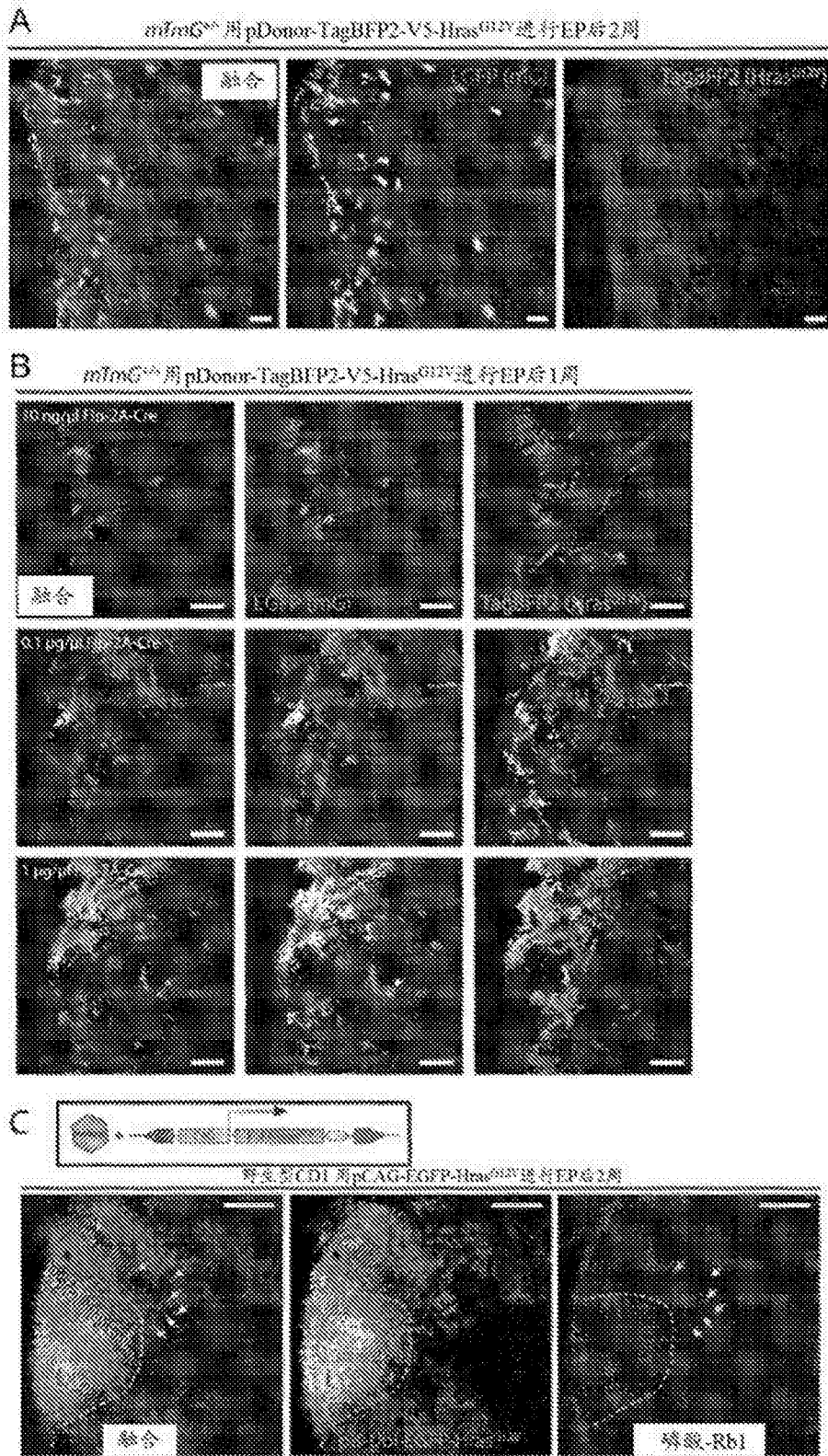


图13

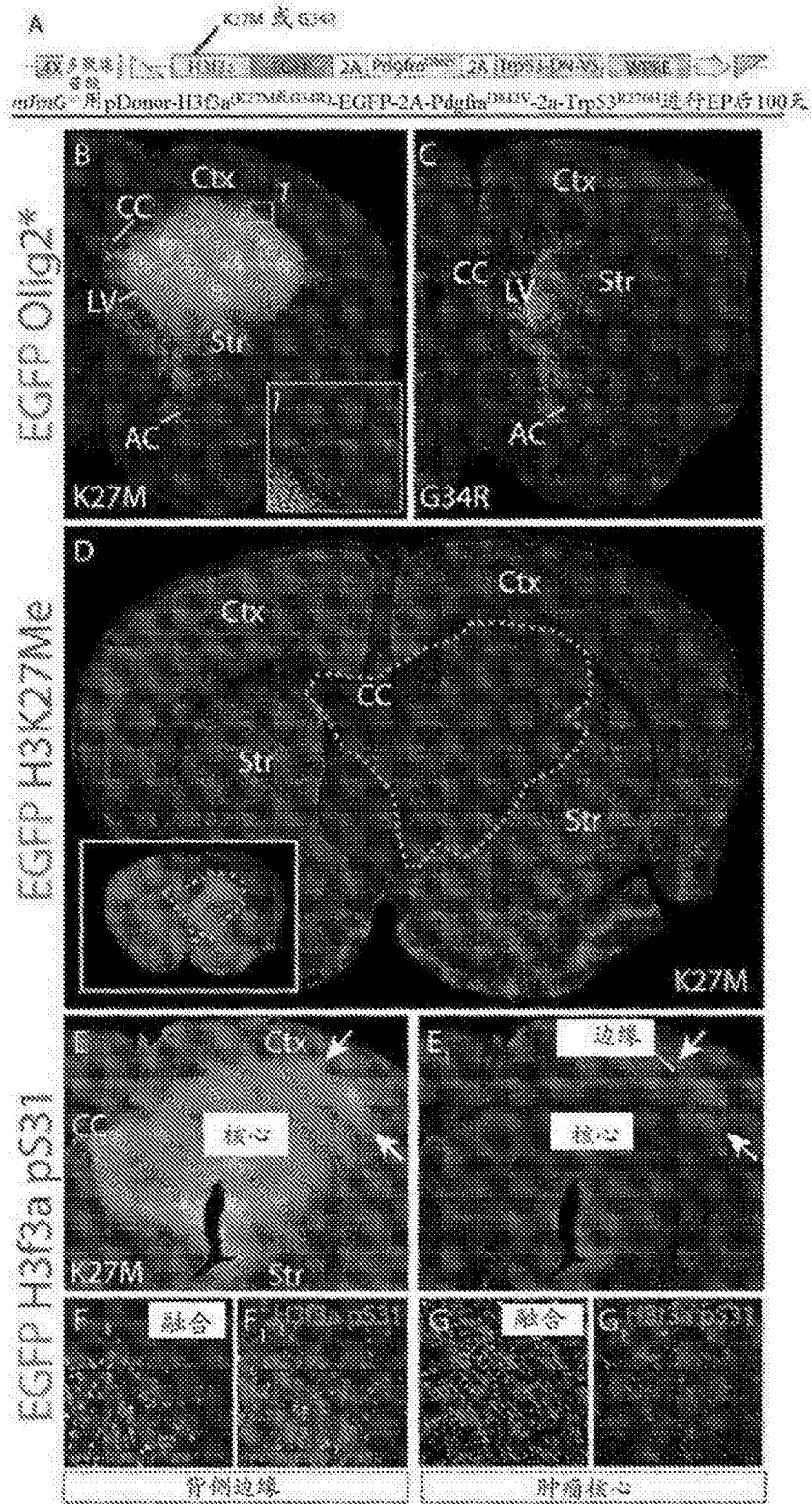


图14

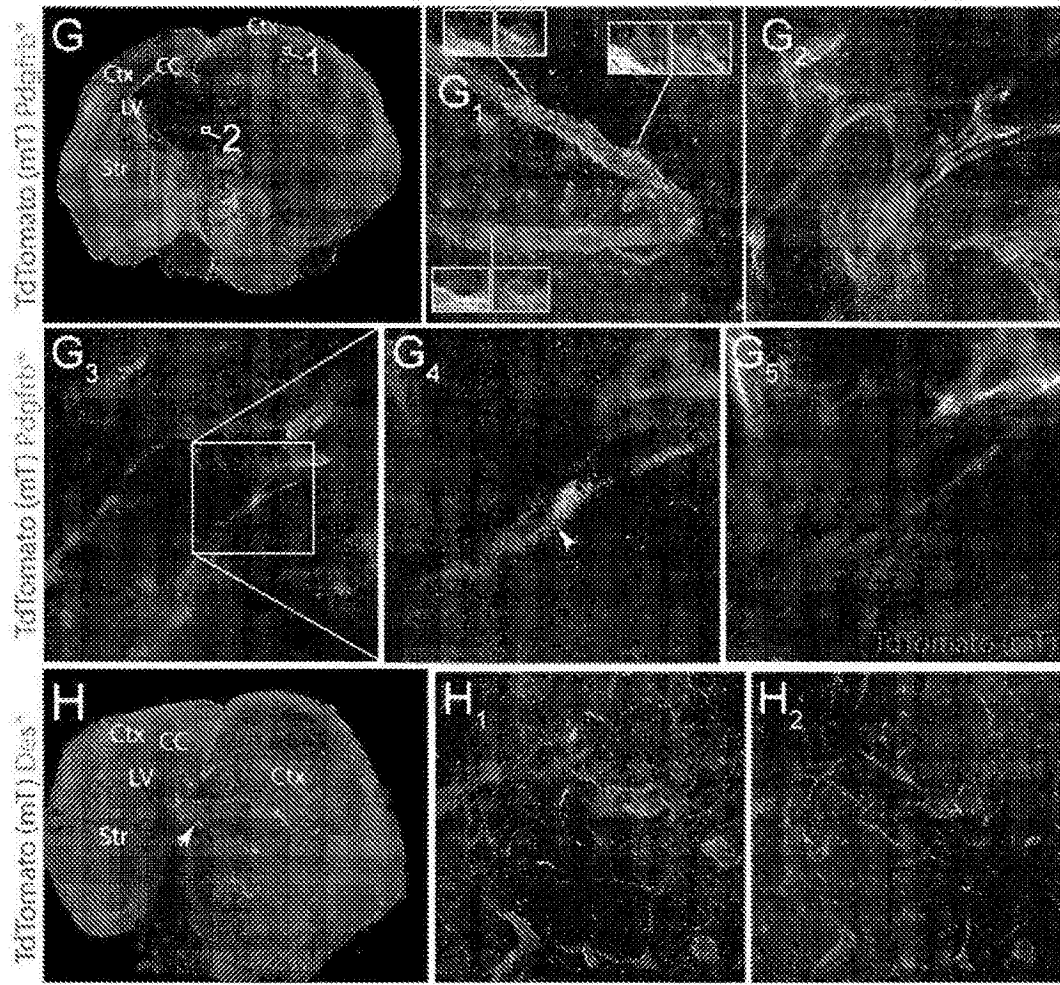


图15

