

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490351** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.06.11**

(51) Int. Cl. **C07K 14/46** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2018.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.09.05**

**(54) ГЕНЕТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ У ЛОСОСЕВЫХ РЫБ**

(31) **2112807.9**

(32) **2021.09.08**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2022/052254**

(87) **WO 2023/037098 2023.03.16**

(71) Заявитель:

**ДЭ ЮНИВЕРСИТИ КОРТ ОФ ДЭ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЭДИНБУРГ (GB)**

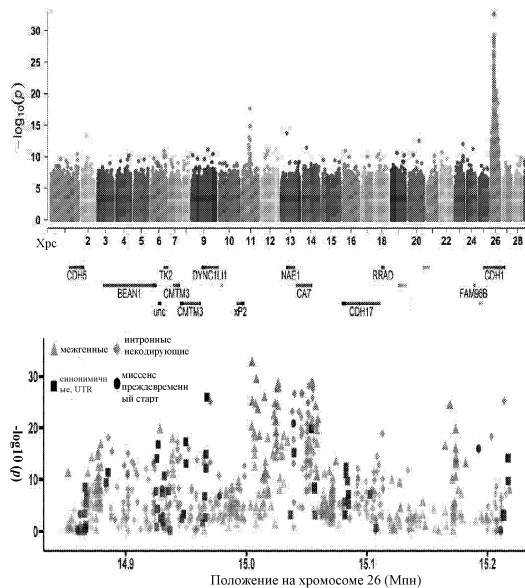
(72) Изобретатель:

**Хьюстон Росс, Пэйвеллин Джонатан  
Эндрю, Санчес Диего Робледо, Чжин  
Ехва (GB)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к способам скрининга лососевых на повышенную устойчивость к вирусной инфекции, такой как инфекция, вызванная вирусом инфекционного панкреонекроза (IPNV). Данное изобретение также относится к рыбам, которые были генетически модифицированы для повышения устойчивости к вирусной инфекции/инфекции IPNV. Данное изобретение дополнительно относится к использованию указанных рыб, у которых была обнаружена повышенная генетическая устойчивость или которые были генетически модифицированы для повышения устойчивости, в программах разведения и/или производстве продукции аквакультуры. Данное изобретение дополнительно относится к применению низкомолекулярных соединений, мишенью которых является NAE1, и к их применению в лечении или предупреждении вирусной инфекции/инфекции IPNV.

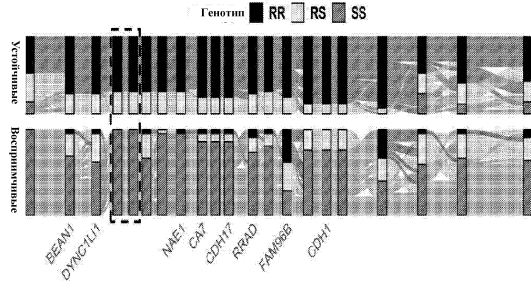


**A1**

**202490351**

**202490351**

**A1**



PCT/GB2022/052254

МПК: C07K 14/46 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ У ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к способам скрининга лососевых на повышенную устойчивость к вирусной инфекции, такой как инфекция, вызванная вирусом инфекционного панкреонекроза (IPNV). Данное изобретение также относится к рыбам, которые были генетически модифицированы для повышения устойчивости к вирусной инфекции/инфекции IPNV. Данное изобретение дополнительно относится к использованию указанных рыб, у которых была обнаружена повышенная генетическая устойчивость или которые были генетически модифицированы для повышения генетической устойчивости, в программах разведения и/или производстве продукции аквакультуры. Данное изобретение дополнительно относится к применению низкомолекулярных соединений, мишенью которых является NAE1, и к их применению в терапии или предупреждении вирусной инфекции/инфекции IPNV.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Понимание генетической регуляции признаков, важных для производства сельскохозяйственных животных, является ключом к оптимальному использованию геномной информации в программах селекции<sup>1</sup>. Такие производственные признаки обычно подкреплены полигенной архитектурой, причем многие локусы с незначительным эффектом способствуют их наследственности<sup>1</sup>. Однако существуют исключения, когда локусы основных эффектов разделяются внутри популяций сельскохозяйственных животных, и в основе большинства генетических вариаций интересующего признака лежит одна геномная область. Одним из таких примеров является случай устойчивости хозяина к вирусу инфекционного панкреонекроза (IPNV) у лососевых, таких как атлантический лосось, вид, чей мировой объем продукции аквакультуры превышает 2,4 миллиона тонн на сумму более 17,1 миллиарда долларов США в 2018 году. Основной локус количественного признака (QTL), влияющий на устойчивость, был описан двумя независимыми группами<sup>2,3</sup> и объясняет 80–100% генетической изменчивости смертности вследствие заболевания. Применение селекции с использованием маркеров для выявленного аллеля устойчивости продемонстрировало преимущества, которые можно получить от применения

молекулярной генетики, способствуя снижению смертности от IPN с десятков миллионов в 2009 году до незначительного уровня пять лет спустя. Однако, хотя ранее предполагалось, что ген эпителиального кадгерина (*cdh1*) играет роль в обеспечении эффекта QTL<sup>5</sup>, все еще существуют значительные пробелы в знаниях о функциональных механизмах, лежащих в основе QTL.

IPNV представляет собой типичный бирнавирус (род *Aquabirnaviridae*, семейство *Birnaviridae*) и состоит из капсида без оболочки, в котором находится геном, состоящий из двух сегментов двухцепочечной РНК. IPNV способен вызывать высокий уровень заболеваемости и смертности выращиваемых видов лососевых, включая атлантического лосося (*Salmo salar*) и радужную форель (*Oncorhynchus mykiss*). Клинические признаки IPNV включают панкреонекроз, сопровождающийся вздутием живота, потемнением кожи и нарушение координации при плавании. Вспышки IPNV в аквакультуре лосося обычно происходят на двух различных этапах производственного цикла аквакультуры: при первом кормлении мальков в пресной воде и у смолтов после перевода в морскую воду<sup>5</sup>. Защита при пресноводном производстве может быть частично достигнута за счет бдительного мониторинга и биобезопасности, но это неэффективно в загонах с открытой морской водой из-за постоянного воздействия океанической среды. Вакцинация также частично эффективна, но, как правило, возможна только для предотвращения заболеваний на более поздней стадии жизненного цикла производства пост-смолта.

Был продемонстрирован большой и значительный генетический компонент устойчивости к IPN на обеих важнейших стадиях жизненного цикла атлантического лосося, а основной QTL, объясняющий большую часть этой генетической изменчивости, был хорошо описан как в шотландских, так и в норвежских популяциях с доказательствами, по меньшей мере, частичного доминирования аллеля, связанного с устойчивостью<sup>2,3</sup>. Было высказано предположение, что ген *cdh1* играет функциональную роль в устойчивости хозяина к IPNV за счет предотвращения проникновения вируса в клетки<sup>4</sup>. Однако предполагаемая функциональная мутация в этом гене находилась лишь в частичном неравновесии по сцеплению с предполагаемым генотипом QTL ( $r^2 \sim 0,58$ ), а это означает, что в эффект QTL должны вносить вклад и другие важные факторы. Более того, предполагаемый механизм изменения аминокислоты в Cdh1, предотвращающий проникновение вируса в клетки, маловероятен, поскольку IPNV может успешно реплицироваться у полностью резистентных мальков лосося<sup>6</sup>. Более того, теперь было продемонстрировано, что механизмом проникновения вируса в клетки является микропиноцитоз, который несовместим с предполагаемым клатрин-опосредованным

эндоцитозом, связанным с *cdh1*<sup>5</sup>.

### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на серии экспериментов по генетике, геномике, редактированию генома и функциональной вирусологии, которые были выполнены для исследования предполагаемой функции генов-кандидатов в основной области QTL у атлантического лосося. Для обнаружения и функциональной аннотации всех полиморфизмов в области QTL применяли пулированное полногеномное секвенирование мальков лосося RR (гомозиготных устойчивых) и SS (гомозиготных восприимчивых). Транскриптомный анализ и анализ вирусной нагрузки хозяина проводили у мальков RR и SS из двух семей, взяв за основу образцы цельных мальков, собранные в выбранные моменты времени до и после заражения IPNV. Точное картирование с использованием пулированного полногеномного секвенирования выявило ряд высокозначимых SNP (однонуклеотидных полиморфизмов) в области QTL, которые кластеризовались вокруг кодирующей области и предполагаемых регуляторных областей гена NEDD-8-активирующего фермента 1 (*nae1*). Более того, *nae1* был одним из генов, наиболее значимо дифференциально экспрессирующимся во всем геноме у мальков RR и SS, демонстрируя заметно более высокие уровни экспрессии у резистентных рыб как конститутивно, так и после заражения. После этих находок была проведена серия экспериментов на линиях клеток атлантического лосося для нарушения активности *nae1* и *cdh1* посредством нокаута с использованием CRISPR-Cas9 и специфических молекулярных ингибиторов. Результаты указывают на важную роль *nae1*, но не *cdh1*, в репликации вируса в клетках лосося, что существенно подтверждает гипотезу о том, что *nae1* является функциональным геном, опосредующим большое влияние QTL на устойчивость к вирусу. Дополнительные исследования были проведены на линиях клеток радужной форели, что дополнительно подтверждает роль *nae1* в устойчивости к вирусной инфекции у лососевых рыб.

В первом аспекте предложен способ определения того, может ли лососевая рыба проявлять повышенную устойчивость к заражению вирусом, способ включает обнаружение нуклеотидной модификации, изменения уровня экспрессии или активности гена *nae1* и/или белка у лососевых рыб и определение того, являются ли лососевые рыбы устойчивыми или могут ли они проявлять повышенную устойчивость к инфекции, или могут ли они иметь потомство, которое демонстрирует повышенную устойчивость к заражению вирусом, на основании обнаруженных нуклеотидных модификаций, изменений уровня экспрессии или активности.

В соответствии с настоящим изобретением ожидается, что модифицированная (то

есть мутированная) нуклеотидная последовательность или измененный уровень экспрессии или активности гена *nae1* и/или белка будут связаны с повышенной устойчивостью к вирусной инфекции. Соответственно, ожидается, что последовательность дикого типа или нормальный уровень экспрессии или активности гена *nae1* и/или белка будут связаны со сниженной устойчивостью к вирусной инфекции. Таким образом, в одном воплощении способы определения того, может ли лососевая рыба демонстрировать повышенную устойчивость к заражению вирусом, предназначены для выявления рыб, которые демонстрируют пониженный уровень экспрессии или активности гена и/или белка *nae1*, для выявления рыб, которые могут демонстрировать повышенную устойчивость к заражению вирусом. Чтобы выяснить, имело ли место нуклеотидная модификация или изменение экспрессии или активности *nae1* и/или белка, может оказаться целесообразным провести сравнение с геном *nae1* дикого типа, чтобы определить, имеет ли место нуклеотидная модификация и/или изменение уровня экспрессии или активности гена *nae1* или белка.

NAE1: Белок, кодируемый *nae1*, связывается с белком-предшественником бета-амилоида у человека. Белок-предшественник бета-амилоида представляет собой белок клеточной поверхности, обладающий свойствами медиатора, и считается, что он играет роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Кроме того, кодируемый белок может образовывать гетеродимер с UBE1C и связывать и активировать NEDD8, убиквитиноподобный белок. Этот белок необходим для прохождения клеточного цикла через контрольную точку S/M. У данного гена найдено три варианта транскриптов, кодирующие разные изоформы. Ген *nae1* был обнаружен у многих организмов, включая виды рыб. Например, у нерки он был обнаружен в хромосоме 28.

В одном воплощении вирус, к которому устойчивы лососевые рыбы, представляет собой бирнавирус. Бирнавирусы представляют собой двухцепочечные РНК-вирусы, поражающие лососевых рыб. В одном воплощении бирнавирус представляет собой вирус инфекционного панкреонекроза (IPNV). Заболевание поражает преимущественно молодь лососевых рыб, таких как, форель и лосось, возрастом менее шести месяцев, хотя взрослые рыбы могут быть бессимптомными носителями вируса. Таким образом, обнаружение вируса у молодых (младше 6 месяцев) и/или более взрослых рыб имеет значение для данного изобретения.

В контексте настоящего изобретения лососевые рыбы включают всех рыб семейства *Salmonidae*. Лососевые являются холодноводными рыбами и включают лосося (например, атлантического лосося, нерку, стальноголового лосося, кижуча и чавычу), форель (например, радужную и кумжу), гольцов, пресноводных сигов и хариуса. В одном варианте

лососевая рыба представляет собой форель, например, радужную форель.

В соответствии с изложенным, устойчивость к инфекции может, согласно одной идее изобретения, коррелировать с выживаемостью при инфекции, а согласно другой идее изобретения - с увеличением времени выживания при инфекции. Согласно одной идее изобретения, может быть принято во внимание как увеличение выживаемости, так и увеличение времени выживания (дней до летального исхода).

Рыба, у которой установлено, что она обладает повышенной устойчивостью к вирусной инфекции в соответствии с данным изобретением, с большей вероятностью, чем обычно, производит потомство, которое имеет больше шансов, чем обычно, иметь повышенную устойчивость к вирусной инфекции. Следовательно, в дополнительном аспекте изобретения предложен способ отбора лососевых рыб для использования в качестве производителей, при этом, на основе способа, описанного в настоящем документе, отбираются лососевые рыбы с повышенной устойчивостью к вирусной инфекции. Для использования в качестве маточного стада могут быть выбраны как самцы, так и самки рыб, у которых выявлена повышенная устойчивость к вирусной инфекции.

И наоборот, лососевые рыбы, у которых с помощью описанных здесь способов предсказано, что они не обладают повышенной устойчивости к вирусной инфекции, не будут выбраны в качестве маточного стада.

В соответствии с вышеизложенным и идеями настоящего документа, в следующем аспекте предложена популяция лососевых рыб, полученная по меньшей мере от одного самца и по меньшей мере одной самки лососевых рыб, у которой с помощью описанного здесь способа было выявлено наличие повышенной устойчивости к вирусной инфекции или которые были генетически модифицированы в соответствии с настоящим изобретением, чтобы иметь повышенную устойчивость к вирусной инфекции.

В следующем воплощении идеи настоящего изобретения могут быть использованы в отборе с использованием маркеров (MAS), при котором у лососевых рыб, включенных в программу разведения, проверяют в соответствии со способом, описанным выше, уровень экспрессии гена *nae1* и/или белка. Это может принимать форму диагностического генетического теста для выявления одной или более нуклеотидных модификаций в гене или локусе гена *nae1* и/или изучения уровней экспрессии и/или активности NAE1. Например, лососевые рыбы, имеющие одну или более нуклеотидных модификаций, которые в данном документе идентифицированы как повышающие устойчивость к вирусной инфекции, могут быть включены в программу разведения с целью отбора потомства, которое также несет такие нуклеотидные модификации. Соответственно, нуклеотидные модификации можно

использовать для нелетального скрининга потенциального маточного стада на предмет повышенной устойчивости к вирусной инфекции. Например, в рамках программы разведения у рыбы можно взять кусок ткани плавника и можно извлечь и проанализировать ДНК, чтобы определить, имеет ли место модификация одного или нескольких нуклеотидов в идентифицированном гене *nae1*. Если имеет ли место модификация одного или нескольких нуклеотидов/SNP, связанных с устойчивостью к вирусной инфекции, такую рыбу желательно включить в программу разведения.

Указанная(ые) нуклеотидная(ые) модификация(и) (или мутации) может(могут) представлять собой замену, делецию, инверсию, вставку или повтор (например, дупликацию) одного или более нуклеотидов в последовательности гена *nae1* или в предполагаемой регуляторной области, прилежащей к гену *nae1*, которая связана с экспрессией *nae1*. Эта предполагаемая регуляторная область включает до 100, 50 или 25 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) в направлении по ходу транскрипции и против хода транскрипции гена *nae1*. В одном воплощении нуклеотидная модификация представляет собой SNP, изменяющий уровень экспрессии *nae1*. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) — это замена одного нуклеотида в определенном положении генома, которая присутствует у достаточно большой части популяции (например, 1% или более). Обычно, хотя и не исключительно и без ограничения какой-либо теорией, изменение нуклеотидов/SNP может приводить к разнице в уровнях экспрессии РНК и/или белка гена *nae1* или может приводить к альтернативному сплайсингу и результирующей экспрессии *nae1*. Нуклеотидная модификация также может привести к различию в аминокислотной последовательности и/или структуре белка, влияя на активность NAE1.

Типичные SNP из соответствующего локуса на хромосоме 26 генома атлантического лосося включают:

Положение	Аллель
14187161	T/G
14885284	T/C
14967309	C/G
15004590	T/G
15014829	T/C
15017459	T/A
15026219	A/G
15039085	A/C
15053849	G/A
15054366	A/G
15059304	G/A
15102250	G/C



15109977	A/C
15133823	G/A
15192533	T/C
15216801	A/-
15218171	AT/-
15927162	A/C
16401284	T/G
16943333	G/G
17373181	T/G

(Нумерация согласно базе данных NCBI, сборка генома атлантического лосося GCA\_000233375.4)

В одном воплощении способ включает выявление, происходят ли указанные одна или более нуклеотидных модификаций (или мутаций) на обеих копиях хромосом, несущих ген *naeI*, и считаются гомозиготными модификациями, или происходят только на одной хромосоме и поэтому считаются гетерозиготными модификациями. В одном воплощении способ выявляет одно или более гомозиготных нуклеотидных модификаций.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что для определения наличия генетических модификаций/SNP, идентифицированных в настоящем описании, можно использовать ряд способов. Например, в данной области техники известны различные методики обнаружения модификации гена/SNP в образце, включая генотипирование, микрочипы (также известные как SNP-матрицы или SNP-чипы), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, Саузерн-блоттинг, SSCP (анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов), dHPLC (денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография), однонуклеотидное удлинение праймера, аллель-специфическая гибридизация, аллель-специфическое удлинение праймера, анализ лигирования олигонуклеотидов и инвазивное усиление сигнала, времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией в присутствии матрицы (MALDI-TOF) и поляризация флуоресценции (FP).

Соответственно, нуклеотидные модификации/SNP могут быть обнаружены посредством генотипирования. Способы генотипирования хорошо известны в данной области техники. В одном способе выбирают праймеры, фланкирующие нуклеотидную модификацию/SNP, и используют для амплификации области, содержащей SNP. Затем амплифицированную область секвенируют с использованием методов секвенирования ДНК, известных в области техники, и анализируют на нуклеотидную модификацию/SNP.

В другом воплощении способ определения нуклеотидной модификации/SNP

включает использование зонда. Например, в одном воплощении амплифицированную область, содержащую нуклеотидную модификацию/SNP, гибридизуют с использованием композиции, содержащей зонд, специфичный для нуклеотидной модификации/SNP, в строгих условиях гибридизации.

Таким образом, в описании дополнительно изложены выделенные нуклеиновые кислоты, связывающиеся в строгих условиях с нуклеотидной модификацией/SNP, которые используются в качестве зондов для определения наличия генной модификации/SNP. В конкретном воплощении нуклеиновые кислоты помечены детектируемым маркером. Маркер или метка обычно способны формировать напрямую или опосредованно, детектируемый сигнал. Например, метка может быть рентгеноконтрастной или радиоизотопной, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ; флуоресцентным (флуорофор) или хемилюминесцентным (хромофор) соединением, таким как флуоресцеин изотиоцианат, родамин или люциферин; ферментом, таким как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена; визуализирующим агентом или ионом металла.

Термин «зонд» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. В одном примере зонд гибридизуется в строгих условиях с последовательностью, содержащей специфическую нуклеотидную модификацию/SNP или его комплемент, но не гибридизуется с соответствующим аллелем дикого типа или его комплементом. Длина зонда зависит от условий гибридизации и последовательностей зонда и целевой последовательности нуклеиновой кислоты. В одном воплощении зонд представляет собой олигонуклеотид длиной 8-50 нуклеотидов, например, 8-10, 8-15, 11-15, 11-20, 16-20, 16-25, 21-25 или 15-40 нуклеотидов в длину.

В следующем воплощении предложен набор для применения в одном или более описанных здесь способах выявления, причем набор содержит один или более зондов для гибридизации с указанными одной или более нуклеотидными модификациями в гене *nae1* и/или регуляторной области, связанной с экспрессией *nae1*. В одном воплощении набор содержит только зонды для гибридизации с указанными одним или несколькими нуклеотидными модификациями в гене *nae1*. То есть наборы не содержат зонды, способные специфически гибридизоваться в жестких условиях с какими-либо другими генами или внутри хромосом(ы), на которых(ой) расположен ген *nae1*, за исключением одного или нескольких зондов, которые можно использовать для положительного контроля. Зонды в наборе могут содержать или состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 500 или 1000 зондов, которые предназначены для специфической гибридизации с указанными

одной или более нуклеотидными модификациями в гене *nae1*, как указано в настоящем документе.

Набор может принимать любую форму. В одном воплощении набор может содержать субстрат, с которым указанный(е) зонд(ы) связаны или прикреплены к нему иным образом. Зонды могут быть представлены в виде чипа, где отдельные зонды связаны/прикреплены к определенным и различимым местам на субстрате, чтобы облегчить идентификацию того, какие зонды связываются с тестируемой нуклеиновой кислотой.

Специалисту в данной области хорошо известны другие компоненты, такие как реагенты, буферы, нуклеотиды и так далее, которые могут быть включены в набор.

Под «жесткими условиями» подразумевают, что выбраны условия, которые способствуют селективной гибридизации между двумя комплементарными молекулами нуклеиновых кислот в растворе. Гибридизация может происходить со всей последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты или с ее частью. Специалисты в данной области техники поймут, что стабильность дуплекса или гибридов нуклеиновых кислот определяется  $T_m$ , которая в натрийсодержащих буферах является функцией концентрации ионов натрия и температуры ( $T_m = 81,5X - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\%(\text{G}+\text{C}) - 600/\text{L})$  или аналогичное уравнение).

Соответственно, параметрами условий промывки, определяющими стабильность гибрида, являются концентрация ионов натрия и температура. Чтобы выявить молекулы, которые похожи, но не идентичны известной молекуле нуклеиновой кислоты, можно предположить, что несоответствие в 1% приведет к уменьшению  $T_m$  примерно на 1°C, например, если ищут молекулы нуклеиновой кислоты, которые обладают идентичностью свыше 95%, температура финальной отмывки снизится примерно на 5°C. На основании этих соображений специалисты в данной области смогут легко выбрать подходящие условия гибридизации. В предпочтительных воплощениях выбирают строгие условия гибридизации. В качестве примера для достижения строгой гибридизации можно использовать следующие условия: гибридизация в 5x хлориде натрия/цитрате натрия (SSC)/5x растворе Денхардта/1,0% SDS при  $T_m - 5^\circ\text{C}$  в течение 15 минут на основе приведенного выше уравнения, с последующим промывкой 0,2x SSC/0,1% SDS при 60°C. Однако понятно, что эквивалентные строгие условия могут быть достигнуты с использованием альтернативных буферов, солей и температур. Дополнительные рекомендации относительно условий гибридизации можно найти в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y., 1989, 6.3.1-6.3.6 и в *Sambrook et al., Molecular*

Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol.3. [0072] Последовательности нуклеиновой кислоты, которые являются праймерами, применимы для амплификации последовательностей ДНК или РНК, содержащих нуклеотидные модификации/SNP по настоящему изобретению. Соответственно, в одной идее изобретения предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, которая представляет собой специфический зонд или праймер, способный гибридизироваться и/или амплифицировать последовательность, содержащую нуклеотидную модификацию/SNP, обнаруженную в *nae1* или регуляторной области *nae1*. Специалист в данной области поймет, как идентифицировать и тестировать зонды/праймеры, которые можно использовать для обнаружения/амплификации последовательностей, содержащих нуклеотидные модификации/SNP, идентифицированные в гене *nae1* или его регуляторной области.

В следующем воплощении нуклеотидную(ые) модификацию(и)/SNP можно обнаружить с помощью анализа удлинения праймера. Коротко говоря, поисковый праймер гибридизуется с последовательностью нуклеотидов, находящихся непосредственно перед нуклеотидной модификацией/нуклеотидом SNP. Затем ДНК-полимераза продляет гибридизованный поисковый праймер, добавляя основание, которое комплементарно нуклеотидной модификации/SNP. Затем определяют последовательность праймера, содержащую включенное основание, при помощи способов, известных в данной области техники. В одном воплощении добавленное основание представляет собой флуоресцентно меченный нуклеотид. В другом воплощении добавленное основание представляет собой меченный гаптенем нуклеотид, распознаваемый антителами.

Такие методики обнаружения, известные в данной области техники, включают микрочипы, анализы гибридизации, молекулярные маяки, динамическую аллель-специфическую гибридизацию (DASH) и/или их комбинации.

Возможно, описанные здесь нуклеотидные модификации/SNP обнаруживаются с использованием ферментов рестрикции. Например, амплифицированные продукты могут расщепляться ферментом рестрикции, который специфически распознает последовательность, содержащую один из аллелей нуклеотидных модификаций/SNP, но не распознает аллель дикого типа (или наоборот). В одном воплощении для амплификации ДНК, содержащей нуклеотидную модификацию/SNP используют ПЦР, амплифицированные продукты ПЦР подвергают расщеплению ферментом рестрикции в подходящих условиях и оценивают продукты рестрикции. Если, например, специфическая нуклеотидная модификация/аллель SNP соответствует последовательности, расщепленной

ферментом рестрикции, расщепление указывает на обнаружение этой конкретной нуклеотидной модификации/аллеля SNP. Продукты рестрикции можно анализировать посредством электрофореза, как это принято в данной области техники.

Нуклеотидные модификации/аллели SNP также можно обнаружить с помощью множества других способов, известных в данной области техники. Например, для амплификации последовательностей и транскриптов можно использовать ПЦР и ОТ-ПЦР, а также праймеры, фланкирующие нуклеотидную модификацию/SNP, в образце, содержащем ДНК (для ПЦР) или РНК (для ОТ-ПЦР), соответственно. Возможно, амплифицированные продукты секвенируют для определения того, какие из нуклеотидных модификаций/аллелей SNP присутствуют в образце.

В одном воплощении изобретение включает выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые в строгих условиях избирательно гибридизуются с *nae1*, содержащим одну или более модификаций/мутаций. Следующее воплощение включает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая избирательно гибридизуется с нуклеиновой кислотой, содержащей измененный аллель или его комплемент. Фраза «специфично гибридизуется с измененным аллелем или его комплементом» означает, что в тех же условиях выделенная последовательность нуклеиновой кислоты будет предпочтительно гибридизоваться с одним из измененных аллелей или его комплементом по сравнению с аллелем дикого типа. Термин «гибридизация» относится к специфичному для последовательности нековалентному связывающему взаимодействию с комплементарной нуклеиновой кислотой. В предпочтительном воплощении гибридизация проводится в условиях высокой строгости.

В одном воплощении настоящее изобретение направлено на определение уровня экспрессии *nae1* или NAE1 у лососевых рыб, чтобы установить, повышен или понижен уровень экспрессии по сравнению с лососевыми рыбами дикого типа.

Специалисту в данной области техники известны различные способы определения уровня экспрессии *nae1*, включая, помимо прочего, Q-PCR, RT-PCR, микрочипы, высокопроизводительное секвенирование, последовательный анализ экспрессии (SAGE) и цифровую экспрессию генов (DGE). В некоторых воплощениях уровень экспрессии *nae1* можно определить по различным характеристикам продукта экспрессии гена, таким как экзоны, интроны, эпитопы белка и активность белка.

Анализируемый продукт экспрессии может представлять собой, например, РНК или полипептид. Продукт экспрессии может быть фрагментирован. Например, в анализе можно использовать праймеры, комплементарные целевой последовательности продукта

экспрессии, так что можно измерить полный транскрипт, а также фрагментированный продукт экспрессии, содержащий целевую последовательность.

Продукты экспрессии РНК можно анализировать непосредственно или путем определения кДНК, полученной с помощью методов амплификации на основе ПЦР, таких как количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (qRT-PCR) (например, патент US 7587279). Полипептидные продукты экспрессии можно анализировать с использованием иммуногистохимии (ИГХ) с помощью протеомных методик или функциональных анализов, которые предназначены для определения уровня активности белка. Кроме того, для анализа продуктов экспрессии как РНК, так и полипептидов можно использовать микрочипы.

Способы профилирования экспрессии генов включают способы, основанные на анализе гибридизации полинуклеотидов, способы, основанные на секвенировании полинуклеотидов, и способы, основанные на протеомике. Примеры способов количественной оценки экспрессии РНК в образце включают Нозерн-блоттинг и гибридизацию *in situ*, известные в данной области техники (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106: 247-283 (1999)), анализ с помощью защиты от рибонуклеаз (РНКаз) (Hod, *Biotechniques* 13: 852-854 (1992)), а также способы на основе ПЦР, такие как ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) (Weis et al., *Trends in Genetics* 8: 263-Н.264 (1992)). 263-Н.264 (1992)).

Уровни экспрессии *NAE1* можно определять, например, с помощью гель-электрофореза, иммуноанализа (такого как ELISA (иммуноферментный твердофазный анализ)), вестерн-блоттинга и спектрофотометрических методов, известных в данной области техники. Уровни активности *NAE1* можно определять с помощью функциональных анализов, таких как обнаружение маркеров экспрессии нижележащих генов, таких как *IRF3* и/или *IRF7*. Также, активность *NAE1* можно определять, например, с помощью набора для инициации конъюгации с *NEDD8* (доступного для приобретения в Bio-Techne Ltd, UK).

Кроме того, для выявления лососевых рыб, имеющих нуклеотидную модификацию, изменение экспрессии или уровня активности гена *nae1* и/или белка, в данном изобретении дополнительно предложена генетически модифицированная лососевая рыба, причем рыба была генетически модифицирована таким образом, что ее геном содержит, по существу состоит или состоит из мутантного гена или аллеля *nae1*.

Как описано выше в отношении лососевых рыб, у которых обнаружена «естественная» нуклеотидная модификация, измененная экспрессия и/или уровень

активности гена *nae1* и/или белка, такие генетически модифицированные рыбы могут использоваться, например, в программах разведения и аквакультуры.

Генетически модифицированные рыбы могут быть получены с помощью методов рекомбинантной молекулярной биологии (например, методик гомологичной рекомбинации) или способов редактирования генома (таких как CRISPR), которые приводят к ингибированию NAE1 и/или повышению устойчивости к вирусной инфекции. Также было замечено, что NAE1 можно ингибировать с помощью химических веществ. Таким образом, далее предложен ингибитор NAE1 для применения в лечении или предупреждении вирусной инфекции, такой как инфекция IPNV, у лососевых рыб. В альтернативном воплощении предложен ингибитор NAE1 для применения при производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения вирусной инфекции у лососевых рыб, такой как инфекция IPNV.

Примеры типов ингибиторов NAE1, полезных для изобретения, включают, помимо прочего, пептид, пептидомиметик, низкомолекулярное соединение, полинуклеотид или полипептид.

Ингибирование NAE1 в настоящем документе относится к снижению одного или более из следующего: экспрессии гена *nae1* в чистом выражении, уровня белка NAE1 в чистом выражении или активности NAE1 в чистом выражении. Ингибирование NAE1 может включать снижение уровня активности NAE1 в присутствии данной дозы ингибитора NAE1 или как следствие данной дозы ингибитора NAE1 по меньшей мере примерно от 10% до 100% относительно уровня активности NAE1 при его отсутствии, например, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или другое процентное снижение активности NAE1 от примерно 10% до примерно 100%. В некоторых воплощениях рыбе, подлежащей лечению, вводят ингибитор NAE1.

Повышенная устойчивость к вирусной инфекции, упоминаемая в настоящем документе, относится к увеличению выживаемости при инфекции и/или увеличению времени выживания при инфекции. Это может включать по меньшей мере 10%-ное увеличение выживаемости и/или времени выживания, например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. Любое увеличение устойчивости к вирусной инфекции может быть просто достигнуто по сравнению с лососевыми рыбами, содержащими ген *nae1* дикого типа и/или демонстрирующими нормальный уровень/активность NAE1.

Для нокаута или снижения экспрессии *nae1* можно использовать рекомбинантные методики. Трансгенные методы и методы направленного воздействия на гены хорошо

известны специалистам в данной области техники и были приняты для рыб<sup>7</sup>. Производство и разработка генетически модифицированных рыб может быть основано на манипуляциях с эмбрионами и технологии гомологичной рекомбинации. Благодаря целенаправленной модификации генома рыб измененная генетическая информация наследуется *in vivo*. Таким образом, специалисту в области техники известны способы гомологичной рекомбинации, которые могут быть использованы, чтобы вызвать нокаут гена *nae1*. Более современные методы, в которых используются сайт-специфические нуклеазы, такие как методы с использованием нуклеаз с «цинковыми пальцами», TALENS или CRISPR, известны и описаны в настоящем документе.

В некоторых воплощениях экспрессию *nae1* можно ингибировать с помощью полинуклеотида, который может ингибировать экспрессию *nae1* или активность NAE1, по меньшей мере, одним из множества различных механизмов, как описано.

#### *РНК интерференция*

В некоторых воплощениях полинуклеотидный ингибитор *nae1* действует путем снижения экспрессии белка NAE1 путем нацеливания на его мРНК. Например, полинуклеотид может представлять собой RNAi.

Термины «РНК-интерференция», «RNAi» или «сайленсинг гена» обычно относятся к процессу, при котором молекула двухцепочечной РНК снижает экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой молекула двухцепочечной РНК обладает существенной или полной гомологией. Однако было показано, что РНК-интерференция также может быть достигнута с использованием двухцепочечных молекул, не являющихся РНК (см., например, US 20070004667).

В некоторых воплощениях ингибитор NAE1 содержит молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие и/или кодирующие двухцепочечные области для РНК-интерференции с мРНК *nae1*, кодирующей NAE1. Молекулы нуклеиновой кислоты обычно представляют собой РНК, но могут содержать химически модифицированные нуклеотиды и нуклеотиды.

Двухцепочечные области должны состоять по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, например, примерно от 19 до 23 нуклеотидов, или могут быть длиннее, например, из 30 или 50 нуклеотидов, или 100 нуклеотидов или более. Можно использовать полноразмерную последовательность, соответствующую полному транскрипту гена. Предпочтительно они имеют длину от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов.

Степень идентичности двухцепочечного участка молекулы нуклеиновой кислоты



целевому транскрипту должна составлять по меньшей мере 90% и более предпочтительно 95-100%. Молекула нуклеиновой кислоты, конечно, может содержать неродственные последовательности, которые могут стабилизировать молекулу.

Термин «короткая интерферирующая РНК» или «siRNA», используемый в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая содержит рибонуклеотиды, способные ингибировать или подавлять экспрессию гена, например, опосредуя RNAi специфичным для последовательности образом, где двухцепочечная часть представляет собой менее 50 нуклеотидов в длину, предпочтительно от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов в длину. Например, siRNA может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую самокомплементарные смысловую и антисмысловую области, причем антисмысловая область содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности в целевой молекуле нуклеиновой кислоты или ее части, а смысловая область имеет нуклеотидную последовательность, соответствующую целевой последовательности нуклеиновой кислоты или ее части. siRNA может быть собрана из двух отдельных олигонуклеотидов, где одна цепь является смысловой цепью, а другая - антисмысловой цепью, причем антисмысловая и смысловая цепи являются самокомплементарными.

В настоящем документе подразумевается, что термин «siRNA» эквивалентен другим терминам, используемым для описания молекул нуклеиновой кислоты, которые способны опосредовать последовательность-специфическую RNAi, например, микро-РНК (miRNA), короткая шпилечная РНК (shRNA), короткий интерферирующий олигонуклеотид, короткая интерферирующая нуклеиновая кислота (siNA), короткий интерферирующий модифицированный олигонуклеотид, химически модифицированная siRNA, РНК, осуществляющая посттранскрипционный сайленсинг гена (ptgsRNA) и другим. Кроме того, подразумевается, что используемый здесь термин RNAi эквивалентен другим терминам, используемым для описания последовательность-специфической РНК-интерференции, такой как посттранскрипционный сайленсинг генов, ингибирование трансляции или эпигенетика. Например, молекулы siRNA можно использовать для эпигенетического сайленсинга генов как на посттранскрипционном, так и на претранскрипционном уровне. В примере, который не является исчерпывающим, эпигенетическая регуляция экспрессии генов с помощью молекул siRNA может быть результатом опосредованной siRNA модификации структуры хроматина, приводящей к изменению экспрессии генов.

Под «shRNA» или «короткой шпилечной РНК» понимают молекулу РНК, в которой менее чем приблизительно 50 нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 19 до

приблизительно 23 нуклеотидов, являются основаниями, спаренными с комплементарной последовательностью, расположенной на той же молекуле РНК, и где указанная последовательность и комплементарная последовательность разделены неспаренным участком длиной по меньшей мере от приблизительно 4 до приблизительно 15 нуклеотидов, образующим одноцепочечную петлю над структурой ствола, созданной двумя участками комплементарных оснований.

Включенные shRNA представляют собой шпилечные двухпальцевые, или бипальцевые, или мультипальцевые дцРНК, в которых молекула РНК содержит две или более таких структур «стебель-петля», разделенных одноцепочечными спейсерными областями.

После дизайна молекул нуклеиновой кислоты, содержащих двухцепочечную область, они могут быть созданы любым известным в данной области техники способом, например, путем транскрипции *in vitro*, рекомбинантными или синтетическими способами.

Для улучшения свойств молекул нуклеиновой кислоты могут быть введены модификации или аналоги нуклеотидов. Улучшенные свойства включают повышенную устойчивость к нуклеазам и/или улучшенную способность проникать через клеточные мембраны. Соответственно, термины «молекула нуклеиновой кислоты» и «молекула двухцепочечной РНК» включает синтетически модифицированные основания, такие как инозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил-, 2-пропил- и другие алкиладенины, 5-галогенурацил, 5-галогенцитозин, 6-азацитозин и 6-азатимин, псевдоурацил, 4-тиурацил, 8-галогенаденин, 8-аминоаденин, 8-тиоладенин, 8-тиолалкиладенины, 8-гидроксиладенин и другие 8-замещенные аденины, 8-галогенгуанины, 8-аминогуанин, 8-тиолгуанин, 8-тиоалкилгуанины, 8-гидроксиалкилгуанин и другие замещенные гуанины, другие аза- и деаза-аденины, другие аза- и деаза-гуанины, 5-трифторметилурацил и 5- трифторцитозин, без ограничения.

#### *Полинуклеотиды, кодирующие пептиды или полипептиды*

В некоторых воплощениях ингибитор NAE1 на основе полинуклеотида кодирует полипептид, так что доставка полинуклеотида рыбам приводит к экспрессии кодируемого пептидного или полипептидного ингибитора белка NAE1.

В некоторых воплощениях полинуклеотидный ингибитор NAE1 кодирует программируемую нуклеазу, которая ингибирует активность NAE1 путем инактивации или снижения экспрессии гена *nae1*. Используемый здесь термин «программируемая нуклеаза» относится к нуклеазам, которые «нацелены» («запрограммированы») на распознавание и редактирование заранее заданного местоположения в геноме. В некоторых воплощениях

кодируемый полипептид представляет собой программируемую нуклеазу, «нацеленную» или «запрограммированную» на введение генетической модификации в ген *nae1* или его регуляторную область. В некоторых воплощениях генетическая модификация представляет собой делецию или замену гена *nae1* или его регуляторной области.

В некоторых воплощениях программируемая нуклеаза может быть запрограммирована на распознавание геномного положения по комбинации ДНК-связывающих доменов белков «цинковые пальцы» (ZFP). ZFP распознают определенные 3-п.н. в последовательности ДНК, комбинацию ZFP можно использовать для распознавания конкретного участка генома. В некоторых воплощениях программируемая нуклеаза (TALEN) может быть запрограммирована на распознавание геномного положения с помощью ДНК-связывающих доменов эффекторов, подобных активаторам транскрипции (TALE). В альтернативном воплощении программируемая нуклеаза может быть запрограммирована на распознавание геномного положения по одной или более последовательностям РНК. В альтернативном воплощении программируемая нуклеаза может быть запрограммирована одной или более последовательностями ДНК. В альтернативном воплощении программируемая нуклеаза может быть запрограммирована одной или более гибридными последовательностями ДНК/РНК. В альтернативном воплощении программируемая нуклеаза может быть запрограммирована одной или более последовательностями РНК, последовательностями ДНК и гибридными последовательностями ДНК/РНК.

Программируемые нуклеазы, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают рекомбинантную РНК-направляемую нуклеазу (RGEN), полученную из бактериальной системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)-cas (CRISPR-ассоциированной), нуклеазу с «цинковыми пальцами» (ZFN), нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), и белки *argonaute*.

В некоторых воплощениях нуклеаза представляет собой полученную при помощи инженерии РНК-направляемую нуклеазу (RGEN). В некоторых воплощениях RGEN происходит из генома архей или представляет собой ее рекомбинантную версию. В некоторых воплощениях RGEN происходит из бактериального генома или представляет собой ее рекомбинантную версию. В некоторых воплощениях RGEN происходит из системы (CRISPR)-cas (CRISPR-ассоциированной) I типа. В некоторых воплощениях RGEN происходит из системы (CRISPR)-cas (CRISPR-ассоциированной) II типа. В некоторых воплощениях RGEN происходит из системы (CRISPR)-cas (CRISPR-

ассоциированной) III типа. В некоторых воплощениях нуклеаза представляет собой RGEN класса I. В некоторых воплощениях нуклеаза представляет собой RGEN класса II. В некоторых воплощениях RGEN представляет собой многокомпонентный фермент. В некоторых воплощениях RGEN представляет собой однокомпонентный фермент. В некоторых воплощениях RGEN представляет собой CAS3. В некоторых воплощениях RGEN представляет собой CAS10. В некоторых воплощениях RGEN представляет собой CAS9. В некоторых воплощениях RGEN представляет собой Cpf1. В некоторых воплощениях на RGEN нацелена одна РНК или ДНК. В некоторых воплощениях на RGEN нацелено более чем одна РНК и/или ДНК. В некоторых воплощениях программируемая нуклеаза может представлять собой ДНК-программируемый белок argonaute (см. WO 14/189628).

В некоторых воплощениях полинуклеотидный ингибитор NAE1 представлен в векторе экспрессии для доставки *in vivo* или *in vitro* в клетки рыб с использованием любого из ряда способов трансфекции, известных в данной области техники, например, трансдукцией рекомбинантным вирусом, трансфекцией на основе липосом, электропорацией или трансфекцией на основе наночастиц.

В настоящем документе «вектор экспрессии» представляет собой ДНК- или РНК-вектор, который способен осуществлять экспрессию одного или более полинуклеотидов в клетке-хозяине (например, эмбрионе рыбы). Вектор обычно представляет собой плазмиду или рекомбинантный вирус. Можно использовать любой подходящий вектор экспрессии, примеры которого включают плазмидный или вирусный вектор, без ограничения. В некоторых воплощениях вирусный вектор представляет собой вектор на основе ретровируса, лентивируса, аденовируса, вируса герпеса или аденоассоциированного вируса.

Такие векторы будут включать один или более промоторов для экспрессии полинуклеотида для сайленсинга гена, такого как дцРНК. Подходящие промоторы включают LTR ретровирусов; промотор SV40 и промотор цитомегаловируса человека (CMV), без ограничения. Также можно использовать клеточные промоторы, такие как эукариотические клеточные промоторы, включая, без ограничения, промоторы гистонов, РНК полимеразы III (в случае экспрессии shRNA или miRNA) и промоторы  $\beta$ -актина.

Термин «последовательность нуклеиновой кислоты» (или молекула нуклеиновой кислоты) относится к молекуле ДНК или РНК в одноцепочечной или двухцепочечной форме, в частности к ДНК, кодирующей белок или фрагмент белка по изобретению.

Термин «ген» означает последовательность ДНК, содержащую область

(транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу РНК (например, пре-мРНК, содержащую интронные последовательности, которая затем подвергается сплайсингу в зрелую мРНК) в клетке, функционально связанную с регуляторными областями (например, промотором). Таким образом, ген может содержать несколько функционально связанных последовательностей, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, содержащая, например, последовательности, участвующие в инициации трансляции, (белок-) кодирующую область (кДНК или геномной ДНК) и 3'-нетранслируемую последовательность, содержащую, например, сайты терминации транскрипции.

Термины «белок» или «полипептид» используются взаимозаменяемо и относятся к молекулам, состоящим из цепочки аминокислот, безотносительно конкретного способа действия, размера, трехмерной структуры или происхождения.

Используемый здесь термин «аллель(и)» означает любую из одной или более альтернативных форм гена в конкретном локусе. В диплоидной (или амфидиплоидной) клетке организма аллели заданного гена находятся на хромосоме в определенном положении или локусе (множественное число - локусы). На каждой хромосоме из пары гомологичных хромосом присутствует один аллель. В настоящем документе термин «гомологичные хромосомы» означает хромосомы, которые содержат информацию об одних и тех же биологических признаках и содержат одни и те же гены в одних и тех же локусах, но, возможно, разные аллели этих генов. Гомологичные хромосомы — это хромосомы, которые спариваются во время мейоза. «Негомологичные хромосомы», представляющие все биологические особенности организма, образуют набор, а количество наборов в клетке называется пloidностью. Диплоидные организмы содержат два набора негомологичных хромосом, причем каждая гомологичная хромосома унаследована от другого родителя.

В настоящем документе термин «гетерозиготный» означает генетическое состояние, существующее, когда два разных аллеля находятся в определенном локусе, но расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке. И наоборот, используемый здесь термин «гомозиготный» означает генетическое состояние, существующее, когда два идентичных аллеля находятся в определенном локусе, но расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке. [30] В данном документе термин «локус» (мн. ч. локусы) означает конкретное место или места или сайт на хромосоме, где, например, обнаружен ген или генетический маркер. Например, «локус *nae1*» относится к положению на хромосоме, где может быть обнаружен

ген *nae1* (и два аллеля *nae1*).

Термин «нуклеотидная модификация», «мутант» или «мутация» относится, например, к рыбе или гену, который отличается от так называемого варианта «дикого типа» (также обозначаемого «wild-type» или «wild type»), который относится к типичной форме, например, рыбе или гену, которые чаще всего встречается в природе. «Рыба дикого типа» относится к рыбе с наиболее распространенным фенотипом таких рыб в естественной популяции. «Аллель дикого типа» относится к аллелю гена, необходимому для образования фенотипа дикого типа. Мутантное растение или аллель может встречаться в естественной популяции или быть получено в результате вмешательства человека, например, путем мутагенеза, и «мутантный аллель», таким образом, относится к аллелю гена, необходимому для образования мутантного фенотипа.

В настоящем документе термин «мутантный аллель *nae1*» относится к аллелю *nae1*, который управляет экспрессией значительно меньшего количества функционального белка NAE1, чем соответствующий аллель дикого типа. Это может происходить либо за счет мутантного аллеля *nae1*, кодирующего нефункциональный белок NAE1, который в настоящем документе относится к белку NAE1, не обладающему биологической активностью, обладающему значительно модифицированной и/или значительно сниженной биологической активности по сравнению с соответствующим функциональным белком NAE1 дикого типа, или мутантного аллеля *nae1*, кодирующего значительно уменьшенное количество функционального белка NAE1 или полное отсутствие белка NAE1. Таким образом, такой «мутантный аллель *nae1*» содержит одну или более мутаций в его последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с аллелем дикого типа, при этом мутация(и) предпочтительно приводит(ят) к значительному уменьшению (абсолютному или относительному) количества функционального белка NAE1 в клетке *in vivo*.

В настоящем документе термин «уровень экспрессии» применительно к гену или белку представляет собой нормализованный уровень гена или генного продукта (например, нормализованное значение, определенное относительно уровня ДНК или РНК гена или уровня полипептида).

Термин «генный продукт» или «продукт экспрессии», используемый в настоящем документе, относится к РНК-транскриптам (транскриптам) генов, включая мРНК, и полипептидным продуктам трансляции таких РНК-транскриптов. Генный продукт может представлять собой, например, несплайсированную РНК, мРНК, сплайс-вариант мРНК, микроРНК, фрагментированную РНК, полипептид, посттрансляционно

модифицированный полипептид, сплайс-вариант полипептида и тому подобное.

В настоящем документе термин «транскрипт РНК» относится к РНК-транскрипту гена, включая, например, мРНК, несплайсированную РНК, сплайс-вариант мРНК, микроРНК и фрагментированную РНК.

В настоящем документе «значительно уменьшенное количество функционального белка NAE1» относится к уменьшению количества функционального белка NAE1, продуцируемого клеткой, содержащей мутантный аллель *nae1*, по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60% и 70%, 80%, 90%, 95% или 100% (то есть функциональный белок не продуцируется клеткой) по сравнению с количеством функционального белка NAE1, продуцируемого клеткой, не содержащей мутантный аллель *nae1*. Чтобы определить, имеет ли рыба согласно изобретению, то есть рыба, содержащая один или несколько мутантных аллелей *nae1*, значительно сниженный уровень NAE1, можно провести сравнение с соответствующей рыбой дикого типа (то есть с таким же фоновым генотипом), не содержащей указанный мутантный аллель(и) *nae1*, выращенной в тех же условиях.

Всякий раз, когда упоминают «рыбу» или «лососевых» согласно изобретению, подразумевают, что настоящий документ также охватывает части рыбы (клетки, ткани, органы, эмбрионы, сперма или икра и так далее), потомство рыбы, которые сохраняют отличительные признаки родителей (то есть сниженные уровни NAE1), если не указано иное.

Используемый здесь термин «генетически модифицированный» при использовании по отношению к описанной здесь рыбе означает рыбу, геном которой был модифицирован человеком. Трансгенная рыба, например, представляет собой генетически модифицированную рыбу, которая содержит экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, например, химерный ген, содержащий транскрибируемую область, которая при транскрипции дает биологически активную молекулу РНК, способную снижать экспрессию эндогенного гена, такого как ген *nae1* по изобретению и, следовательно, была генетически модифицирована человеком. Кроме того, рыба, содержащая мутацию в эндогенном гене, например, мутацию в эндогенном гене *nae1* (например, в регуляторном элементе или в кодирующей последовательности) в результате воздействия мутагенного агента или посредством генетической модификации, как описано в данном документе, также считается генетически модифицированной рыбой, поскольку она была генетически модифицирована человеком. Кроме того, рыба определенных видов, таких как радужная форель, содержит мутацию в эндогенном гене, например, в эндогенном гене *nae1*, не встречающегося у этого конкретного вида рыб в природе, в результате, например, процессов целенаправленного

скрещивания, таких как скрещивание и селекция с использованием маркеров, также считается генетически модифицированной рыбой. Напротив, рыба, содержащая только спонтанные мутации или мутации естественного происхождения, то есть рыба, которая не была генетически модифицирована человеком, не является «негенетически модифицированной рыбой», как определено в данном документе, и, следовательно, не охватывается изобретением. Специалист в данной области понимает, что, хотя генетически модифицированная рыба обычно имеет нуклеотидную последовательность, которая изменена по сравнению с рыбой, встречающейся в природе, генетически модифицированная рыба также может быть генетически модифицирована человеком без изменения ее нуклеотидной последовательности, например, путем модификации паттернов ее метилирования или гликозилирования.

Термин «содержащий» следует интерпретировать как определяющий наличие указанных частей, этапов или компонентов, но не исключает присутствия одной или нескольких дополнительных частей, этапов или компонентов. Таким образом, рыба, имеющая определенный признак, может иметь дополнительные признаки. Понятно, что при упоминании слова в единственном числе (например, рыба) здесь также включается множественное число (например, множество рыб или рыбы). Таким образом, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более одного элемента, если только контекст явно не требует, чтобы был один и только один из элементов. Таким образом, термин в единственном числе обычно означает «по меньшей мере один».

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, должны иметь то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области (например, в клеточной культуре, клеточной биологии и молекулярной генетике).

Если не указано иное, способы культивирования клеток и молекулярной биологии, используемые в настоящем изобретении, представляют собой стандартные процедуры, хорошо известные специалистам в данной области. Такие способы описаны и объяснены в литературе в таких источниках, как J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel *et al.* (editors).



## СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее данное изобретение будет описано более подробно с отсылкой к графическим материалам, где показано:

Фиг. 1: Генетическое картирование и функциональная характеристика области QTL устойчивости к IPN; А) Манхэттенский график, показывающий связь между SNP в полном геноме и генотипом QTL, В) карта аннотированных генов и функциональная аннотация SNP в наиболее значимой области QTL; С) Конкордантность между значимыми генотипами SNP и предполагаемыми генотипами QTL у потомков из двойных гетерозиготных родительских семей. Каждая вертикальная полоса представляет SNP в области QTL или вблизи нее, а каждая горизонтальная линия представляет отдельное животное. Область в рамке содержит два наиболее значимых SNP, полученных при полногеномном сканировании, а также SNP, которые демонстрируют полную конкордантность между генотипом QTL и генотипом SNP у восприимчивых гомозиготных животных. Не существует SNP с полной конкордантностью между генотипом QTL и генотипом SNP у резистентных гомозиготных животных;

Фиг. 2: Дифференциальная экспрессия генов в области QTL устойчивости к IPN у мальков лосося перед заражением, через 1 день после заражения и через 7 дней после заражения. Ген *nae1* неизменно является наиболее значимым дифференциально экспрессирующимся геном в области QTL во все моменты времени. Тепловая карта справа показывает относительные уровни экспрессии генов в области QTL, демонстрируя значительные различия между мальками RR и SS в любой момент времени;

Фиг. 3: Оценка роли *Nae1* и *Cdh1* в репликации IPNV в клетках атлантического лосося. А) Вирусная нагрузка IPNV через 96 и 120 часов после инокуляции в контроле и *nae1* KO SHK-1, инфицированных IPNV, при множественности заражения (MOI) 0,01. Относительные уровни экспрессии VP2 IPNV к *ef1a* в клетках нормализовали к контрольным клеткам SHK-1 с согласованием во времени. В) Инфекционную активность IPNV в надосадочной жидкости через 120 часов после инокуляции в контрольных и *nae1* KO SHK-1, инфицированных IPNV при MOI 0,01, оценивали по TCID<sub>50</sub>/мл (медиана инфекционной дозы для культуры ткани) на наивных клетках CHSE-214. С) Инфекционную активность IPNV в клетках и надосадочной жидкости через 120 часов после инокуляции в клетках SHK-1, обработанных 100 нМ, 1 мкМ и 5 мкМ MLN4924 или только ДМСО (диметилсульфоксид) и инфицированных IPNV при MOI 0,01, оценивали по TCID<sub>50</sub>/мл на наивных клетках CHSE-214. D) Белок вируса IPNV в надосадочной жидкости клеток SHK-

1, обработанных 100 нМ MLN4924 и инфицированных при MOI 0,01, анализировали через 120 часов после инокуляции методом вестерн-блоттинг с использованием антитела против белков вируса IPNV. Е) Вирусная нагрузка IPNV через 120 часов после инокуляции в контрольных и *cdh1* КО SHK-1, инфицированных IPNV при MOI 0,01. Относительные уровни экспрессии VP2 IPNV к *ef1a* в клетках нормализовали к контрольным клеткам SHK-1 с согласованием во времени. F) Инфекционную активность IPNV в надосадочной жидкости через 120 часов после инокуляции в контроле и *cdh1* КО SHK-1, инфицированных IPNV при MOI 0,01, оценивали по TCID<sub>50</sub>/мл на наивных клетках CHSE-214.

Фиг. 4: Изменения профиля экспрессии гена VP2 в различных клеточных популяциях (2-е и 3-е испытания, клетки подвергались заражению через 24 дня после электропорации). На графиках показаны значения  $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$ , оцененные на основе анализа данных RT-qPCR  $C_q$ . Все клеточные популяции нормализовали относительно популяции клеток дикого типа соответствующего момента времени, подвергнутой электропорации без Cas9/RNA.

Фиг. 5: Профили вирусного выхода через 72 часа после инокуляции вируса для клеток, обработанных MLN4924 в трех различных дозах: только ДМСО, 1 мкМ и 5 мкМ.

## Материалы и методы

### *Секвенирование ДНК и точное картирование.*

23 нуклеарных семьи из двух возрастных групп, полученных в результате коммерческой программы разведения лосося (Hendrix Genetics), где и самцы и самки производители были гетерозиготны по QTL устойчивости к IPN, идентифицировали с использованием способов, описанных Houston *et al.*<sup>8</sup>. В каждой из этих семей идентифицировали по два малька, гомозиготных по аллелю устойчивости (RR), и два малька, гомозиготных по аллелю восприимчивости (SS). Затем были выделены четыре группы: мальки RR из возрастной группы 1 (n = 22), мальки SS из возрастной группы 1 (n = 22), мальки RR из возрастной группы 2 (n = 24) и молодь SS из возрастной группы 2 (n = 24). Затем геномную ДНК из образцов ткани плавников мальков, взятую у отдельных мальков в каждой группе, объединяли в эквимольных концентрациях, в результате чего получали четыре пула геномной ДНК. Затем каждый из этих пулов секвенировали в компании Edinburgh Genomics (Эдинбург, Великобритания) с использованием парноконцевых прочтений длиной 2 x 125 п.н. с использованием химии HiSeq V4, стремясь к среднему покрытию каждого пула 25X. У полученных в результате считывания секвенирования четырех пулов данных отрезали адаптеры секвенирования, а затем выравнивали на референсный геном атлантического лосося (регистрационный номер

Genbank GCA\_000233375.4) с использованием программы bwa-mem (PMID: 20080505). В полученных выравниваниях в формате bam проводили удаление дубликатов с использованием Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), а затем поиск вариантов с использованием GATK<sup>20</sup> с настройками Unified Genotyper. Для фильтрации вариантов использовали рекомендации GATK best practices. Глубины аллелей, наблюдаемые для каждого пула по каждому положению SNP, экспортировали из vcf-файла и использовали в анализе для сопоставления пулов RR и SS внутри возрастной группы путем определения их абсолютных различий в частотах аллелей.

### ***Заражение и анализ экспрессии генов***

Чтобы идентифицировать гены, которые, по-видимому, по-разному регулируются у устойчивых к IPN и восприимчивых особей при воздействии вируса, проводили эксперименты с заражением для анализа профилей экспрессии генов следующим образом. 20 семей мальков атлантического лосося заражали вирусом IPNV (способ заражения описан в Houston *et al.*<sup>8</sup>), для каждой семьи заражение мальков выполняли параллельно в двух резервуарах. Для каждой семьи определяли среднее по двум резервуарам значение уровня смертности, и после прекращения заражения смертность в этих семьях колебалась от 0 до 34%. На основании уровней смертности семьи J и N были обозначены как восприимчивые, семьи Q и T оказались устойчивыми, а семьи I, P, B, O, D, S, C и L были обозначены как промежуточные. Чтобы установить генотип QTL родителей зараженного потомства в этих семьях, брали образец плавников от каждого родителя и генотипировали по IPN QTL-связанным микросателлитным маркерам, приведенным в Houston *et al.*<sup>8</sup> Семьи B и C были идентифицированы как «двойные гетерозиготные» семьи, где оба родителя были предполагаемыми гетерозиготами по QTL, и, следовательно, последующие данные по экспрессии генов рассматривались только для этих двух семей.

### ***Тестирование IPNV***

Погибших и выживших мальков из зараженных и контрольных резервуаров проверяли на наличие IPNV с использованием различных способов. Мальков взвешивали, гомогенизировали при помощи стерильного пестика, ступки и песка, а затем разводили 1:10 в среде для культивирования клеток. Гомогенат центрифугировали при 2500×g в течение 15 мин при 4°C, затем надосадочную жидкость удаляли и фильтровали через фильтр 0,45 мкм (Whatman) перед инокуляцией на конфлюэнтный монослой клеток CHSE-214 возрастом 24 часа в 96-луночных культуральных планшетах для титрования. Планшеты с культурами инкубировали при 15°C и считывали титры через 7 дней. Лунки, показавшие положительный цитопатический эффект (CPE) для каждого образца, дополнительно

протестировали с помощью ELISA (Test-Line) для подтверждения присутствия IPNV. Впоследствии для определения вирусной нагрузки в образцах, использованных для эксперимента на микрочипах, использовали анализ RT-QPCR, проводившийся в аккредитованной коммерческой лаборатории (Integrin Advanced Biosystems, Великобритания).

#### ***Микрочиповая платформа, гибридизация и фильтрация по качеству***

РНК выделяли, очищали, амплифицировали и метили, как описано в <sup>6</sup>. Микрочиповая платформа и способы для гибридизации с микрочипом описаны в <sup>6</sup>. Профили экспрессии генов у резистентных и восприимчивых потомков в семьях В и С анализировали следующим образом. Каждая семья была представлена тремя резервуарами, каждый из которых содержал по 100 мальков, в одном из которых эксперимент останавливали и отбирали пробы через 1 день после заражения («момент времени 1»), в одном через 7 дней после заражения («момент времени 2») и в одном через 20 дней после заражения («момент времени 3»). Кроме того, перед заражением брали выборку из 100 мальков из всех семей («момент времени 0»). Чтобы определить генотип QTL отобранных особей в каждый момент времени, брали образец плавников от каждого потомства и генотипировали по микросателлитным маркерам, связанным с QTL, влияющим на устойчивость к IPN, приведенным в Houston *et al.*<sup>8</sup> В каждый момент времени выделяли РНК от шести рыб каждого генотипа QTL (то есть гомозигот по QTL, устойчивых к IPN: RR; или гомозигот по QTL, восприимчивых к IPN: SS) и гибридизовали с чипом для анализа экспрессии генов атлантического лосося содержащим 44000 олигонуклеотидов (Agilent)<sup>9</sup>. Этот микрочип состоит из 43661 зонда (частичных последовательностей генов), что составляет примерно 90% известных меток экспрессируемых последовательностей атлантического лосося (EST)<sup>13</sup>.

Значимую дифференциальную экспрессию зондов определяли путем сравнения среднего сигнала микрочипа в оба момента времени с использованием трехфакторного дисперсионного анализа [факторы = генотип QTL (устойчивый или восприимчивый), семья (В или С) и момент времени (0 или 1)]. Чтобы избежать исключения генов, имеющих потенциальную биологическую значимость, выбирали номинальный порог значимости  $P < 0,05$  (т.е. значения  $P$  не корректировались для множественного тестирования).

#### ***Культивирование вируса и клеток***

Клетки головной почки лосося SHK-1 (ATCC 97111106) размножали при 17,5°C в среде L15 с добавлением 5% FBS (эмбриональная бычья сыворотка), 40 мкМ β-меркаптоэтанола, 4 мМ глутамина и антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Пассажи

клеток осуществляли при конfluenceности 80% с использованием 0,25% трипсина/ЭДТА, осаждали и делали рассев 1:3. Свежую среду добавляли к кондиционированной среде в соотношении 2:1. Клетки эмбриона чавычи CHSE-214 (ATCC 91041114) размножали при 17,5°C в среде L15 с добавлением 10% FBS, 4 mM глутамина и пенициллина и стрептомицина. Клетки пассировали с использованием 0,25% трипсина/ЭДТА при конfluenceности 80% и разводили 1:6 в свежей среде. IPNV VR1318 был предоставлен компанией Marine Scotland в виде сырого изолята. Рабочие экземпляры культуры получали путем заражения клеток CHSE-214 с 80% конfluenceнностью при очень низкой MOI в нормальных условиях культивирования клеток с 2% сыворотки. Примерно через 7 дней после инокуляции или когда более чем у 50% клеток наблюдали цитопатический эффект, надосадочную жидкость собирали, дебрис осаждали, а вирусный материал делили на аликвоты и замораживали при -80°C. Титр вирусного материала определяли при помощи анализа бляшкообразования на CHSE-214. Заражение IPNV осуществляли на 80% конfluenceнтных клетках SHK-1 или CHSE-214. Клетки высевали, инкубировали в течение ночи, промывали PBS перед нанесением вируса, разведенного в бессывороточной L15. Через 2 часа при 15°C вирусный инокулят удаляли, промывали PBS и на клетки наслаивали среду с 2% FBS при 15°C.

#### ***Влияние нокаута *nae1* и *cdh1* in vitro***

Конструировали направляющие РНК CRISPR-Cas9 для *nae1* и *cdh1* и отбирали по максимальной эффективности целевого воздействия и минимальному количеству нецелевых эффектов с использованием платформы benchling ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)) и визуальных конструкторов Synthego CRISPR. Клетки *nae1* KO и *cdh1* KO SHK-1 получали с применением способа, описанного в <sup>10</sup>. Вкратце, клетки SHK-1 трансфицировали 1 мкМ рибонуклеопротеина Cas9, нацеленного на экзон 2 *nae1* или *cdh1* (дополнительная Таблица 1), путем электропорации 2 импульсами при 1400 В в течение 20 мс. Геномную ДНК выделяли через 7 дней после электропорации, целевую область амплифицировали с помощью ПЦР (дополнительная Таблица 1), а эффективность редактирования генов оценивали с помощью секвенирования по Сэнгеру и анализа ICE (<https://ice.synthego.com>), показывая 94 и 93% эффективность редактирования в клетках *nae1* KO и *cdh1* KO SHK, соответственно.

Клетки как дикого типа, так и клетки KO SHK-1 высевали в 48-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. IPNV инокулировали при MOI 0,01 в бессывороточной L15 с пенициллином-стрептомицином в течение 2 часов при 15°C. Затем вирусный инокулят удаляли, а монослои клеток промывали PBS. В каждую лунку добавляли 200 мкл L15 с 2%

FBS, 40 мкМ β-меркаптоэтанола и пенициллином-стрептомицином и инкубировали при 15°C. Через 96 и 120 часов после инокуляции надосадочную жидкость собирали и хранили при -70°C для анализа TCID50. Суммарную РНК из клеток выделяли с использованием набора реагентов Direct-zol RNA в микропрепаративном варианте (Zymo Research, Ирвин, США) с обработкой ДНКазой I и хранили при -70°C для количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Для оценки вирусной нагрузки в клетках анализировали относительный уровень транскриптов IPNV VP2 к *efla* в суммарной РНК с помощью qRT-PCR с использованием реагента Luna Universal One-Step RT-qPCR (NEB, Ипсвич, США) и прибора LightCycler 480 (Roche, Базель, Швейцария) в двух повторностях. Каждая реакция состояла из 0,5 мкл РНК, 1X реакционной смеси, 1X смеси ферментов, 0,4 мкМ каждого праймера (дополнительная Таблица 4) и воды, не содержащей нуклеаз, до 10 мкл. Термоциклирование начиналось с обратной транскрипции при 55°C в течение 10 минут и начальной денатурации при 95°C в течение 1 минуты, за которыми следовали 40 циклов денатурации при 95°C в течение 10 секунд и удлинения при 60°C в течение 30 секунд со считыванием показателей в планшете и анализом кривой плавления. Эффективность и линейность ( $R^2$ ) каждой пары праймеров проверяли с использованием последовательных разведений суммарной РНК в двух повторностях. Относительный уровень вирусного транскрипта IPNV VP2 по сравнению с *efla* в клетках КО SHK-1 по сравнению с клетками SHK-1 дикого типа в каждый момент времени рассчитывали с использованием  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

**Таблица 1** crRNA и праймеры для *nae1* и *cdh1*

	crRNA	ID гена	Fw (5'-3')	Rv (5'-3')	Ампликон (пн)	Темп.отжига (°C)
<i>nae1</i>	TGATCAATTC	100194854	ATGCCAGC	TTCCGACGT	580	69
	CACAGCATCT		CAACCAGC	CTTCCCCGG		
			ATGCTT	AGAC		
<i>cdh1</i>	TCGGAGTCAA	106587268	CCACATTT	ATTTCCCAG	416	56
	CATGTCTACC		CGCAATCG	TCGGAGCTC		
			GGTGAA	GTTT		

**Таблица 2.** Праймеры для qRT-PCR

Fw (5'-3')	Rv (5'-3')	Ампликон (пн)	Эффектив- ность	$R^2$	ID гена/ref
------------	------------	---------------	-----------------	-------	-------------

<i>efla</i>	GGCTGGTTC	AA CAGAGTCACA	60	1,98	0,999	AF321836
	GGGATGGA	CCATTGGCG				
IPNV VP2	GACCAAGTTCG	ATCGGCTTGG	156	1,96	0,9997	FN257531. <sup>11</sup>
	ACTTCCAGC	TGATGTTCTC				

Инфекционную активность выхода вируса в надосадочной жидкости через 120 часов после инокуляции оценивали по TCID<sub>50</sub> на наивных клетках CHSE-214 в 96-луночном планшете с 4 лунками на разведение в среде с 2% сыворотки. TCID<sub>50</sub> рассчитывали с использованием метода Рида и Мюнха<sup>12</sup>.

Чтобы оценить роль *cdh1* в инфекции IPNV, проводили нейтрализацию антител с использованием последовательных разведений 1:1 BSA, антитела IPNV-VP2 и специфического для *cdh1* антитела, которое, как известно, распознает *Cdh1* атлантического лосося<sup>4</sup>, в 96-луночном планшете. На клетки SHK-1 наслаивали среду, содержащую последовательно разбавленные антитела или BSA, инкубировали при 15°C в течение 2 часов и впоследствии инфицировали IPNV при MOI 0,01. Через 120 часов после инокуляции из клеток собирали РНК и оценивали вирусную нагрузку IPNV с помощью qRT-PCR.

#### ***Влияние ингибитора активности Nae1 (MLN4924) in vitro.***

Лиофилизированный MLN4924 (певонедистат) ресуспендировали в ДМСО. MLN4924 титровали на цитотоксичность на клетках CHSE-214 и SHK-1. Клетки SHK-1 или CHSE-214 высевали при 80% конфлюэнтности и обрабатывали 0 (только ДМСО), 100 нМ, 1 мкМ или 5 мкМ MLN4924 в течение 24 часов перед инокуляцией IPNV при MOI 0,01. Влияние MLN4924 на жизнеспособность клеток оценивали путем отбора проб через 24, 48, 72 и 96 часов после инокуляции и сравнения выживаемости клеток во всех зараженных группах (включая контроль ДМСО) по сравнению с незараженным контролем в тот же момент времени.

Чтобы оценить инфекционную активность вирусного выхода, клетки и надосадочную жидкость собирали через 120 часов после инокуляции и оценивали по TCID<sub>50</sub> на наивных клетках CHSE-214. Для полуколичественного определения выхода вирусного белка проводили вестерн-блоттинг вирусных белков. Через 120 часов после инокуляции надосадочную жидкость из чашек размером 150 мм, содержащих клетки SHK-1, обработанные либо 100 нМ MLN4924, либо ДМСО в течение 24 часов перед инфицированием IPNV при MOI 0,01, собирали, стерильно фильтровали и ультрацентрифугировали при 22000 x g в течение 1 ч. Ультрацентрифугированный вирусный осадок из надосадочной жидкости ресуспендировали в буфере Леммли.

Ассоциированный с клетками вирус также анализировали путем сбора клеток в буфере Лэммли. Эти образцы разделяли с помощью PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле) (4-15% Mini-Protean, BIORAD), переносили на нитроцеллюлозную мембрану и визуализировали вирусный белок с использованием моноклонального антитела, которое распознает все вирусные белки IPN, и вторичных антител LICOR.

## Результаты

### *Точное картирование QTL устойчивости к IPN с использованием данных полногеномной последовательности*

Для точного картирования QTL устойчивости к IPN и выявления потенциальных функциональных генов и полиморфизмов пулировали геномную ДНК мальков лосося с известным генотипом QTL и проводили полногеномное секвенирование. Эти мальки были отобраны в ходе двух крупных экспериментов по заражению IPNV, проведенных на мальках лосося в 2007 и 2008 годах. Идентифицировали семьи, в которых оба родителя были гетерозиготны по QTL ( $n = 11$  в 2007 г. и  $n = 12$  в 2008 г.), и от каждой из этих семей выбирали по две гомозиготные устойчивые (RR) рыбы и две гомозиготные восприимчивые (SS) рыбы (всего  $n = 22$  в 2007 г. и всего  $n = 24$  в 2008 г.) для пулирования геномной ДНК в эквимольных концентрациях и секвенирования (2 х пула рыб RR и 2 х пула рыб SS; прочитывания последовательностей доступны в архиве коротких прочтений NCBI PRJNA614520). После выравнивания прочтений последовательностей с референсным геномом атлантического лосося (регистрационный номер в GenBank GCA\_000233375.4) проводили поиск вариантов и рассчитали различия в частоте аллелей между пулами RR и SS (Фиг. 1А). Область QTL хромосомы 26 содержала подавляющее большинство наиболее значимых SNP с заметным пиком примерно на 15 Мпн в межгенной области в направлении против хода транскрипции гена *nedd-8*-активирующего фермента E1 (*nae1*) (Фиг. 1А, 1В).

Для скрининга предполагаемых функциональных кандидатных SNP и инсерционно-делеционных полиморфизмов в области QTL оценивали предсказанные эффекты всех вариантов с использованием программного обеспечения SNPEFF<sup>17</sup>. В области QTL выявляли две миссенс-мутации, одну в локусе эпителиального кадгерина (*cdh1*), ранее выявленной Moen *et al.*<sup>6</sup>, и одну в локусе *nae1*, о которой ранее не сообщалось (Фиг. 1В).

Для дальнейшей оценки связи между выбранными высокоприоритетными SNP, рассредоточенными по всей области QTL, и предполагаемым генотипом QTL, разрабатывали анализ KASP для 21 полиморфизма, которые впоследствии генотипировали в отдельных образцах с генотипами RR и SS, использованных в эксперименте по пулированному секвенированию. Не было какого-либо SNP или инсерционно-



делеционного полиморфизма, который показал бы полную конкордантность с предполагаемым лежащим в основе генотипом QTL, что согласуется с Moen *et al*<sup>4</sup>. Однако в межгенной области примерно на 15 Мпн было два SNP, показавшие паттерн, при котором все генотипированные рыбы SS в двух возрастных группах размножаемой популяции были гомозиготными по одному аллелю, рыбы RR были либо гомозиготными по альтернативному аллелю, либо гетерозиготными (Фиг. 1С), а гетерозиготные родители были либо гетерозиготными по SNP, либо фиксированными по аллелю SNP, связанному с восприимчивостью (данные не показаны). Этот паттерн согласуется с доминантно действующим главным локусом в этом положении, где одной копии аллеля, связанного с устойчивостью, было достаточно, чтобы гарантировать полную устойчивость рыбы (то есть выживание после заражения IPNV), но также предполагает возможность существования второстепенного локуса, действующего в области QTL.

***Контраст в экспрессии гена *nae1* между устойчивыми и восприимчивыми мальками лосося***

Чтобы составить список генов-кандидатов в области QTL, которые могут быть причиной устойчивости к IPN, проводили глобальный анализ экспрессии генов у особей с генотипами RR и SS из семей, где оба родителя были гетерозиготны по QTL (семьи В и С в Houston *et al*<sup>8</sup>). Для этого семьи в отдельных резервуарах (n = 50 на резервуар) в повторностях подвергали заражению IPNV методом погружения, как описано в Robledo *et al*<sup>6</sup>, и отбирали образцы цельных мальков до заражения, через 24 часа после заражения и через 7 дней после заражения. У мальков определяли их генотип QTL с использованием панели микросателлитных маркеров, описанной в Houston *et al*<sup>8</sup>, и выбирали гомозиготных по RR и SS мальков для анализа экспрессии генов. Мальков гомогенизировали целиком, объединяли по четыре и выделяли общую РНК.

Анализ глобальной экспрессии генов объединенных в пул особей «RR» и «SS» показал, что *nae1* был наиболее значимым дифференциально экспрессирующимся геном в области QTL (Фиг. 2) и одним из наиболее значимых во всем геноме при инфекции IPNV. Интересно, что экспрессия *nae1* была стабильно выше у QTL-резистентных мальков, чем у QTL-восприимчивых мальков во все моменты времени, включая конститутивно более высокую экспрессию перед заражением (Фиг. 2).

***Вирус IPN реплицируется как у устойчивых, так и у восприимчивых рыб***

Вирусную нагрузку у мальков RR, RS и SS из семей В и С, зараженных IPNV, оценивали на 1-й, 7-й и 21-й день после заражения. Обнаружили, что вирусная нагрузка на 1–2 log ниже у особей RR и RS по сравнению с особями с SS, но вирусную нагрузку имеют

все генотипы, что указывает на продуктивную репликацию вируса. Это согласуется с предыдущими сообщениями Reyes-Lopez *et al*<sup>11</sup> and Robledo *et al*<sup>6</sup> как по головной почке, так и по малькам целиком, продемонстрировавшим заметное увеличение вирусной нагрузки у мальков как из полностью резистентных, так и восприимчивых семей во время заражения IPNV. Эти данные показывают, что механизм, лежащий в основе генетической устойчивости, не заключается ни в предотвращении проникновения вируса в клетку, ни в полном предотвращении репликации вируса внутри клетки.

***Нокаут *nae1* при помощи CRISPR заметно снижает репликацию IPNV в клетках лосося***

Nae1 — это фермент, который отвечает за ковалентное связывание убиквитиноподобного белка Nedd8 с белками-мишенями, часто модифицируя их функцию<sup>14</sup>. Было показано, что ингибирование активности *nae1* с помощью низкомолекулярного ингибитора (MLN4924) обладает противовирусной активностью широкого спектра действия и ингибирует репликацию множества ДНК- и РНК-вирусов *in vitro*, что подчеркивает важность процесса неддильирования при вирусной инфекции<sup>15</sup>. Чтобы оценить роль *nae1* в репликации IPNV в клетках атлантического лосося, использовали два взаимодополняющих подхода с использованием линии клеток головной почки лосося (SHK-1); нокаут (KO) гена *nae1* при помощи CRISPR-Cas9 и ингибирование MLN4924 активности белка *nae1*.

Во-первых, использовали редактирование генома при помощи CRISPR-Cas9 для выключения гена *nae1* в клетках SHK-1 с использованием рекомбинантного белка Cas9 и специально синтезированных направляющих РНК; способ высокоспецифичного редактирования генов-мишеней в культурах клеток лососевых<sup>10</sup>. Мишенью был 2 экзон локуса *nae1* атлантического лосося, а эффективность редактирования составляла 93-97%, что приводило к мутации со сдвигом рамки считывания в 82-87% (в зависимости от репликата), что подчеркивало, что подавляющее большинство клеток в смешанной популяции клеток было успешно отредактировано. После заражения IPNV при множественности инфекции (MOI) 0,01 оценивали нагрузку РНК IPNV и продуктивный вирусный выход с помощью анализов qRT-PCR и TCID50 соответственно. Вирусная нагрузка в культурах клеток *nae1* KO SHK-1 через 96 и 120 часов после инокуляции была в 109,6 и 2,7 раз ниже (соответственно), чем в контрольных клетках SHK-1 с ложным заражением (Фиг. 3А,  $p < 0,001$  и  $0,05$ ). Кроме того, инфекционная активность вирусного выхода в надосадочной жидкости через 120 часов после инокуляции была в 7,8 раза ниже в клетках *nae1* KO (Фиг. 3В,  $p < 0,01$ ).

Во-вторых, в клеточной линии SHK-1 атлантического лосося для ингибирования функции белка *pael* использовали низкомолекулярный ингибитор *pael* MLN4924. Клетки обрабатывали 100 нМ MLN4924, растворенным в ДМСО, или только ДМСО в качестве отрицательного контроля в течение 24 часов до инфицирования IPNV и проводили измерения вирусной нагрузки и выхода, как описано выше. Несмотря на небольшую разницу в количестве копий РНК IPNV в ходе инфекции, наблюдалось существенное (от 13 до 73 раз) снижение выхода вируса, измеренное в клетках SHK-1 через 120 часов после инокуляции (Фиг. 3С). Чтобы подтвердить это снижение выхода вируса, анализировали вирусные белки методом вестерн-блоттинг на вирусе, выделенном из клеток SHK-1, обработанных MLN4924 или ДМСО, через 120 часов (Фиг. 3D). Происходило заметное снижение содержания вирусных белков IPNV в клетках, обработанных MLN4924, что демонстрировало, что ингибирование активности *pael* приводит к снижению выхода вируса. Снижения жизнеспособности клеток, связанного с обработкой MLN4924, по сравнению с контрольной группой, обработанной ДМСО, не наблюдалось.

#### ***Cdh1 не требуется для инфекции IPNV и репликации в клетках лосося***

QTL устойчивости к IPN был независимо описан Moen *et al*<sup>3</sup>, и впоследствии фенотип устойчивости был частично приписан миссенс-варианту гена *cdh1-1*, кодирующего рецептор клеточной поверхности<sup>4</sup>. Было высказано предположение, что этот ген кодирует белок, необходимый для проникновения IPNV в клетки. Чтобы проверить эту гипотезу и оценить предполагаемую роль *cdh1* в инфекции IPNV, создавали клетки *cdh1* KO SHK-1 посредством редактирования генома с использованием CRISPR-Cas9 описанным выше способом. При использовании направляющей РНК, нацеленной на 2 экзон *cdh1-1*, наблюдалась эффективность редактирования 90–94%, что приводило к частоте мутаций со сдвигом рамки считывания 90–93% (в зависимости от репликата) в клетках SHK-1. Если бы *cdh1* имел решающее значение для проникновения и репликации IPNV, проникновение вируса, вероятно, было бы предотвращено в клетках с нокаутом, и можно было бы ожидать заметного снижения вирусной нагрузки в культуре клеток, подвергшихся редактированию. Однако, хотя наблюдалось незначительное (2,1-кратное) снижение вирусной нагрузки, измеренной с помощью qPCR, по сравнению с контролем через 96 часов после инокуляции, наблюдалось небольшое увеличение в 1,3 раза по сравнению с контролем через 120 часов после инокуляции (Фиг. 3Е). Кроме того, не было различий в продуктивном вирусном выходе между *cdh1* KO и контрольными клетками, по результатам анализа TCID50 (Фиг. 3F). Это указывает на то, что *cdh1* не важен ни для проникновения IPNV в клетки лосося, ни для успешной репликации IPNV и продуктивного выхода вируса в этих клеточных

линиях. Для дальнейшей оценки роли *cdh1* в устойчивости к IPN использовали специфические антитела против внеклеточного домена *cdh1* (используемые в Moen *et al*<sup>4</sup>), чтобы оценить, блокируют ли они инфекцию IPNV и репликацию в клетках лосося. Несмотря на эффективную и поразительную нейтрализацию инфекции IPNV специфическим антителом против белка VP2 вируса IPNV, никаких признаков влияния антитела против *cdh1* на репликацию IPNV в SHK-1 обнаружено не было.

#### Материалы и способы (для экспериментов с радужной форелью)

##### Культура клеток

Линия клеток, используемая в этом исследовании, представляет собой клетки гонад радужной форели (RTG-2), которая является иммортализованной линией клеток, полученных из радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), приобретенную в ECACC (продукт 90102529). Клетки RTG-2 поддерживали в среде Leibovitz-15 (L1518, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), а также раствора пенициллина 100 единиц/мл и стрептомицина 100 мкг/мл (Gibco, Уолтем, США). Среду L-15, содержащую 2% FBS (Gibco, Уолтем, США), использовали для анализа TCID<sub>50</sub>, используемого для титрования вируса и для заражения вирусом.

#### Оптимизация настроек электропорации и редактирование генома в клетках RTG-2 при помощи Cas9 RNP

Для разработки эффективных методов редактирования генома *in vitro* с использованием электропорации рибонуклеопротеина Cas9 (RNP) тестировали линию клеток гонад радужной форели (RTG-2), и результат был опубликован ранее<sup>10</sup>. Коротко, настройки электропорации оптимизировали путем тестирования нескольких комбинаций напряжения, длительности и количества импульсов, а также двух разных буферов для электропорации. Степень трансфекции при каждой различной комбинации настроек измеряли с помощью проточной цитометрии. 1400 V, 20 мс, 1 импульс и использование буфера Opti-MEM (Gibco, Waltham, США) обеспечивали степень трансфекции 99,9–100%. Клетки трансфицировали RNP Cas9 с использованием указанных настроек электропорации и продемонстрировали эффективность редактирования генома 93,5–94,5% для тестируемого гена *slc45a2*.

#### Дизайн направляющих РНК и формирование белково-рибонуклеинового комплекса

Конструировали направляющие РНК, нацеленные на кодирующую область *nae1* на хромосомах 6 и 26 радужной форели, области, гомологичные основному QTL, влияющему на устойчивость к IPNV, у атлантического лосося. Конструировали три направляющие РНК: две были нацелены на *nae1* на хромосоме 6, а другая была нацелена на обе хромосомы:

6 и 26. Направляющие РНК выбирали на основе предсказанной высокой эффективности разрезания с низким количеством потенциальных нецелевых результатов, используя CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) и Benchling (<https://benchling.com/>).

#### Секвенирование

Геномную ДНК выделяли из клеток, подвергнутых редактированию, через 7 и 24 дней после электропорации с использованием универсального набора Dynabeads® DNA DIRECT™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) и обрабатывали в соответствии с протоколом производителя. Образцы ДНК амплифицировали в ПЦР-реакциях, проводимых в объеме 50 мкл с использованием реакционной смеси Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, Ипсвич, США) и 1-3 мкл экстрагированной гДНК в 35 циклах амплификации при оптимальной температуре отжига (**Таблица 4**). Затем образцы ПЦР очищали с использованием набора магнитных шариков AMPure XP (Agencourt, Беверли, США) и планшета DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Образцы, отправленные на секвенирование по Сэнгеру, содержали 5 мкл 2 нг/мкл (для ДНК размером до 300 п.н.) или 12 нг/мкл (для ДНК размером 300–1000 п.н.) очищенного ПЦР-продукта, 2,5 мкл 10 мкМ прямого или обратного праймера и воду, не содержащую нуклеаз, до 10 мкл. Образцы отправляли в GATC/Eurofins (Германия) и получали данные секвенирования в файле формата .abi. Результаты анализировали и сравнивали с соответствующей контрольной (не подвергавшейся редактированию) последовательностью с использованием программы Inference of CRISPR Edits (ICE, Synthego Inc).

#### Модель заражения IPNV и способы оценки вирусного выхода

После электропорации клетки *nae1* KO RTG-2 и контрольные клетки RTG-2 дикого типа высевали в 6 повторностях в лунки (24-луночные планшеты). Затем проводили заражение вирусом путем инокуляции каждой популяции клеток  $10^{-5}$  TCID<sub>50</sub>/мл или разведением материала вируса IPN  $10^{-5}$  (приготовленным в среде с 2% FBS и пенициллином/стрептомицином) (1 мл/24 лунки) и инкубации инокулированных клеток при 15°C на протяжении всего эксперимента. Через 2 часа после инокуляции инокулят удаляли и добавляли в лунки свежую среду с 2% FBS (с пенициллином/стрептомицином) (1 мл/24 лунки). Собирали надосадочную жидкость и выделяли РНК из инфицированных клеток в два разных момента времени после инокуляции вируса; через 48 и 72 часа. Надосадочную жидкость и РНК метили и хранили при -80°C до использования.

Вирусный выход измеряли как вирусную нагрузку в клетках и инфекционную активность в надосадочной жидкости. Выделение РНК проводили при помощи набора

Direct-zol™RNA Microprep (Zymo Research, Ирвин, США) согласно протоколу производителя. Вирусную нагрузку в клетках оценивали с помощью RT-qPCR с использованием набора Luna® Universal One-Step RT-qPCR (New England Biolabs, Ипсвич, США). Для обнаружения и относительного количественного определения вирусной РНК, присутствующей в клетках, исследуемым геном был ген VP2 вируса IPN. *actb* оказался наиболее подходящим референсным геном и впоследствии использовался для нормализации данных qPCR для гена VP2. Праймеры для этих двух генов включены в **Таблицу 3**.

**Таблица 3.** Последовательности праймеров для амплификации и обнаружения генов VP2 и *actb*

Ген-мишень	Праймеры (5' – 3')
<i>Actb</i>	Fw: CTGACGGAGCGCGGTTACAG Rv: AAGGAGGGCTGGAAGAGGGC
VP2	Fw: GACCAAGTTCGACTTCCAGC Rv: ATCGGCTTGGTGATGTTCTC

Тест на цитотоксичность MLN4924, обработка и последующая инокуляция IPNV

Первоначально на свежих клетках RTG-2 тестировали четыре различные концентрации MLN4924: 0 (только ДМСО), 0,1, 1 и 5 мкМ, чтобы выяснить, обладают ли они токсичностью в отношении клеток RTG-2 дикого типа. Для оценки какого-либо существующего цитопатического действия применяли анализ жизнеспособности клеток в четыре различных момента времени: 24, 48, 72 и 96 часов после обработки ингибитором в четырех различных концентрациях. Результаты показали, что ни одна из доз не была цитотоксичной, поэтому все четыре из них были позже использовали в тесте с последующей инокуляцией вирусом, как описано ниже.

Клетки RTG-2 дикого типа высевали в 4 повторностях в 24-луночные планшеты и давали осесть в течение 24 часов. Затем четыре параллельных экземпляра обрабатывали только ДМСО, 0,1, 1 или 5 мкМ MLN4924, соответственно. Через 24 часа после обработки MLN4924 ингибиторный инокулят удаляли и клетки инокулировали IPNV в дозе  $10^{-5}$

TCID50/мл наряду с четырьмя дозами MLN4924. Надосадочную жидкость собирали через 48 и 72 часов после инокуляции и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до применения.

Анализ инфекционной активности надосадочной жидкости клеток, обработанных MLN4924 и IPNV

Для оценки вирусного титра через 72 часа после инокуляции в надосадочной жидкости, собранной у клеток, обработанных MLN4924 и IPNV, анализировали TCID50 (медиана инфекционной дозы для культуры ткани). Сначала 20000 клеток/лунку высевали в лунки 96-луночного планшета (в четыре ряда по 10 лунок на каждый супернатант, в 4 повторностях), давали осесть и культивировали в течение ночи. На следующий день среду удаляли многоканальной пипеткой и заменяли последовательными 10-кратными разведениями (начиная с неразведенной исходной надосадочной жидкости, содержащей вирусные частицы, до разведения  $10^{-7}$ ). Последние готовили в среде с 2% FBS (с пенициллином и стрептомицином). Высеянные клетки инокулировали этими последовательными разведениями (четыре повтора на разведение вируса, 100 мкл/96 лунок). Последние две лунки каждого ряда использовали в качестве контроля, то есть туда не добавляли вирус, а только среду. 96-луночный планшет инкубировали при  $15^{\circ}\text{C}$  на протяжении всего эксперимента. Цитопатический эффект (CPE) вирусной инфекции оценивали с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток *CellTiter-Glo*® (Promega, Мэдисон, США) через 30 часов после инокуляции. Затем рассчитывали 50% конечный титр с использованием метода Рида и Мюнха<sup>16</sup>.

Направляющие РНК и праймеры для ПЦР

**Таблица 4.** Последовательности направляющих РНК и праймеров, использованных для амплификации и секвенирования целевых геномных областей генов *nae1* и *slc45a2* при использовании нуклеазы Cas9.

<b>gRNA1_nae1_ch6 (1)</b>		<b>GGAGCGTTCACATTTGTAGA</b>
	<b>Последовательность праймера</b>	<b>T<sub>a</sub> (°C)</b>
Fw (ch6)	GCAACATGCCGGTGTATGA	63,3
Rv (ch6)	AGCATAATCGTTTACCCTTCCT	
Fw (ch26)	TCCACTGCATCCGGGACTGA	60,7
Rv (ch26)	CGACGTCTTCCCCGGAGACT	

<b>gRNA1_nae1_ch6 (2)</b>		<b>TGATCAATCCACAGCATCT</b>
		<b>T<sub>a</sub> (°C)</b>

Fw (ch6)	GCAGCTAGTTAACGTTAGTTATGC	63,3
Rv (ch6)	GAAGAGAGCAACTAGCTTAGG	
Fw (ch26)	AACAAGGCATTGGAGATTGG	59
Rv (ch26)	GAAGAGAGCAACTAGCTTAGG	

<b>gRNA3_nae1_ch6&amp;ch26</b>		<b>TGATGTATCTGGCAACTTTG</b>
	<b>Последовательность праймера</b>	<b>T<sub>a</sub> (°C)</b>
Fw (ch6)	AGCAACAACAGCATAGGAAGG	59
Rv (ch6)	CCCCAAAACSTTTTGAACAGTGG	
Fw (ch26)	СТАAGCTAGTTGCTCTCTTCATCAGG	63,3
Rv (ch26)	CACTCAGCAATCAATACAATCAACG	

<b>gRNA_slc45a2_ch5</b>		<b>AGCCCCTTCAGACCGATGTA</b>
	<b>Последовательность праймера</b>	<b>T<sub>a</sub> (°C)</b>
Fw	ACCGGAACACAGCAGAAGGGT	67
Rv	ACAGGTGGTGGATGAGGTTCGCA	

### Результаты на радужной форели

Целью этих экспериментов было проверить, влияет ли нарушение гена *nae1* на инфекцию IPNV в клетках радужной форели. Это включало как химическое ингибирование белка *nae1*, так и нокаут CRISPR/Cas9 в иммортализованных клеточных линиях с последующим заражением IPNV и оценкой продуктивной репликации вируса. Используемые способы соответствовали общим протоколам, используемым для атлантического лосося, и подробно описаны ниже.

### Заражение клеток *nae1* KO вирусом и количественная оценка вирусной нагрузки

#### Нокаут гена *nae1*, предположительно влияющего на устойчивость к IPNV

Исследование сохранения порядка генов показало, что область, гомологичная области QTL IPNV у атлантического лосося (хромосома 26 у лосося), содержащая ген *nae1*, расположена на хромосоме 6 в геноме радужной форели. Однако, из-за дупликации всего генома лососевых дополнительные копии этих генов встречаются на хромосоме 11 в геноме атлантического лосося. У радужной форели эти дополнительные копии обнаружены на хромосоме 26. Эти копии демонстрируют высокую степень сходства с генами в области



QTL, и поэтому, предвидя потенциальную функциональную избыточность, копии в хромосоме 26 также были выбраны мишенями.

Конструировали направляющие РНК, нацеленные на ген *nae1* (GCA\_0023375.4 из базы данных NCBI) (i) только на хромосоме 6 (но не одновременно на хромосоме 26) и (ii) на хромосомах 6 и 26 одновременно (всего 3 направляющие РНК – 2 направляющие РНК, нацеленные на *nae1* на хромосоме 6, и одна, нацеленная на *nae1* на хромосомах 6 и 26 одновременно). Для оценки эффективности редактирования конкретно в каждой области разрабатывали праймеры, независимо отжигающиеся на каждую из двух областей (посредством ПЦР-амплификации и секвенирования по Сэнгеру). Кроме того, ген *slc45a2* использовали в качестве тестового гена во время оптимизации электропорации, а также в испытаниях, где он служил индикатором того, как нокаут «случайного» гена, скорее всего, не участвующего в устойчивости к IPNV (нокаут этого гена вызывает альбинизм *in vivo*), может влиять на восприимчивость клеток к вирусу (**Таблица 4**).

Эффективность редактирования (процент отредактированных клеток) в целевой области оценивали с помощью секвенирования ПЦР-продуктов по Сэнгеру, как описано выше. Эффективность редактирования (процент отредактированных клеток) четырех разработанных направляющих РНК была протестирована ранее и в целом была высокой.

#### Вирусное заражение КО-клеток, подвергнутых редактированию

Вирусное заражение проводили путем инокуляции  $17 \times 10^4$  клеток/лунку (24-луночные)  $10^{-5}$  TCID<sub>50</sub>/мл исходной вирусной суспензии и инкубации инокулированных клеток при 15°C в течение всего эксперимента. При этом вирусном заражении отредактированные популяции клеток были получены в результате обычной электропорации, результаты которой представлены в **Таблице 5**, и клетки были заражены вирусом через 24 дня после электропорации (dpe), находясь на пассаже номер 31. Популяцию клеток дикого типа, подвергнутую электропорации без Cas9/RNP, использовали в качестве контроля для нормализации данных qPCR других популяций клеток КО.

**Таблица 5.** Процент редактирования, достигнутый в популяциях клеток, использованных при вирусном заражении

Направляющая РНК	КО ИНДЕКС
Направляющая РНК <i>slc45a2</i>	33%
Направляющая РНК <i>nae1</i> ch6 (1)	87%
Направляющая РНК <i>nae1</i> ch6 (2)	73%

Направляющая РНК <i>nae1</i> ch6&ch26 (1)	67% (ch6) – 49% (ch26)
Направляющая РНК <i>nae1</i> ch6&ch26 (2)	74% (ch6) – 62% (ch26)

После инокуляции вирусом клетки собирали в 2 разных момента времени: 48 и 72 часов после инокуляции, и выделяли РНК из всех клеток в каждой лунке. Дальнейший анализ RT-qPCR вирусной нагрузки на образцы РНК в каждый момент времени позволил получить значения  $C_q$ . Реакции с более чем одним пиком на кривой плавления RT-qPCR, что указывает на возможную контаминацию, были исключены из дальнейшего анализа, а оставшиеся образцы использовали в дальнейшем анализе и нормализовали относительно контрольной популяции клеток. Значения  $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$ , показывающие различия в вирусной нагрузке между различными отредактированными популяциями клеток, показаны на **Фиг. 4**.

Наибольшие различия в вирусной нагрузке, присутствующей в клетках, это различия, обусловленные *nae1* КО на обеих хромосомах 6 и 26 (столбцы, заштрихованные синим и коричневым цветом). Наблюдается тенденция к снижению по сравнению с контролем (заштрихован зеленым), при этом *nae1* нокаутирован в обеих хромосомах, демонстрируя статистически значимые различия ( $*p \leq 0,05$ ) через 72 часа после инокуляции (hpi).

#### **Ингибирование NAE1 с использованием специфического ингибитора MLN4924**

##### Анализ инфекционной активности надосадочной жидкости через 72 часа после инокуляции

Ингибитор MLN4924 использовали для ингибирования активности *nae1*. Четыре супернатанта каждой дозовой группы, собранные из клеток, обработанных MLN4924 и IPNV, через 72 часа после инокуляции, тестировали в двух независимых анализах инфекционной активности TCID50 с последующим анализом жизнеспособности клеток через 30 часов после инокуляции при помощи метода Рида и Мюнха для анализа цитопатического действия, наблюдающегося в лунках. Результаты двух независимых анализов TCID50 представлены на **Фиг. 5**. Данные для дозы MLN4924 0,1 мкМ не показаны, поскольку они демонстрировали эффект, аналогичный эффекту в группе клеток, обработанных только ДМСО.

По-видимому, наблюдается заметное снижение продуктивного выхода вируса IPNV в клетках, обработанных MLN4924, для доз ингибитора 1 и 5 мкМ по сравнению с клетками, обработанными только ДМСО.

#### **Обсуждение**

Хорошо документировано, что устойчивость к IPN у атлантического лосося имеет основной генетический компонент, и большая часть различий в смертности, наблюдаемая между устойчивыми и восприимчивыми рыбами, может быть объяснена основным QTL на хромосоме 26<sup>2,3</sup>. Однако, каузативные мутации и молекулярная биология фенотипа устойчивости, не были хорошо изучены. В текущем исследовании полногеномное секвенирование мальков лосося с известными генотипами QTL использовали для точного картирования наиболее значимых SNP и инсерционно-делеционных полиморфизмов в области, расположенной в направлении против хода транскрипции от гена *nae1*. Профилирование глобальной экспрессии генов выявило дифференциальную экспрессию у восприимчивых и устойчивых рыб до и во время заражения IPNV, и это показало, что *nae1* является одним из наиболее значимых дифференциально экспрессирующихся генов во всем геноме и наиболее значимым в области QTL. Наконец, на моделях клеточных линий лосося тестировали изменение двух основных генов-кандидатов в пределах QTL, связанного с IPN: *cdh1* (предложенного Moen et al.<sup>5</sup>) и *nae1* на основании данных текущего исследования.

Полногеномное ресеквенирование выявило две миссенс-мутации в кодирующих областях: одну в *nae1* и одну в *cdh1*. Результаты генотипирования показали, что не было какого-либо SNP или инсерционно-делеционного полиморфизма, который был бы полностью конкордантным с генотипом QTL, однако все кластеры SNP в этой области оказались гомозиготными по одному аллелю у восприимчивых рыб и либо гетерозиготными, либо гомозиготными по альтернативному аллелю у устойчивых рыб. Эти данные могут соответствовать локальному эпистазу, с доминантно-действующим главным локусом устойчивости или с дополнительным (неидентифицированным) второстепенным локусом или локусами в области, связанной с эффектом QTL у рыб, фиксированных по аллелю восприимчивости в этом главном локусе. Эти результаты в целом согласуются с результатами, полученными Moen et al. при использовании аналогичного подхода, хотя расположение наиболее значимых SNP отличается<sup>4</sup>. Результаты сравнения экспрессии генов показали, что *nae1* является одним из наиболее значимых генов, дифференциально экспрессирующихся у восприимчивых и устойчивых рыб, как у мальков до заражения, так и во все измеренные моменты времени после заражения. Это подчеркивает возможность того, что межгенная область, расположенная ~15 Мпн на хромосоме 26, содержит регуляторные элементы для экспрессии *nae1* или что миссенс SNP *nae1* изменяет экспрессию гена (прямо или косвенно). Интересно, что, хотя более высокая экспрессия была связана с устойчивостью у мальков, зараженных IPNV, последующие функциональные эксперименты предполагают, что отсутствие функциональной активности

*nae1* связано со снижением продуктивной репликации вируса.

*Nae1* представляет собой фермент, ответственный за ковалентное присоединение *nedd8*, убиквитиноподобного модификатора, к белкам-субстратам. Неддилирование в первую очередь активирует лигазы куллин-RING, которые, в свою очередь, регулируют деградацию специфических субстратов посредством убиквитинирования<sup>14</sup>. В текущем исследовании, касающегося IPNV у атлантического лосося, нокаут или химическое ингибирование *nae1* приводит к значительному снижению продуктивной репликации вируса (Фиг. 3). Неддилирование играет значительную роль в стимуляции ответа хозяина в виде секреции интерферона типа 1 на вирусные инфекции, и многие вирусы пытаются уклониться от иммунного ответа хозяина, нацеливаясь на передачу сигналов интерферона типа I<sup>17</sup>. И IRF3, и IRF7 были среди генов, наиболее значимо дифференциально экспрессирующихся у мальков RR и SS после заражения IPNV в текущем исследовании, демонстрируя более высокую экспрессию у восприимчивых рыб и подчеркивая их важность в ответе хозяина на IPNV. Вполне возможно, что генетические варианты, идентифицированные в регуляторных или кодирующих областях *nae1*, приводят к изменению функции неддилирования у резистентных рыб. Как следствие, это может приводить к модифицированному ответу интерферона 1 типа, возможно, из-за изменений в передаче сигналов IRF3 и IRF7, что может защитить рыбу, инфицированную IPNV, от разрушительного цитокинового шторма, который, как предполагается, является основной причиной осложнений при IPN<sup>18</sup>.

SNP в гене E-кадгерина (*cdh1*) ранее был предложен в качестве функционального варианта, который приводит к устойчивости к IPN у атлантического лосося<sup>18</sup>. Предполагаемый механизм заключался в том, что *Cdh1* действует как рецептор IPNV для проникновения в клетки посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза, а каузативный SNP блокирует связывание и/или проникновение IPNV. Хотя было показано, что IPNV связывается с *cdh1*<sup>4</sup>, маловероятно, что это единственный путь проникновения при заражении. Reyes-Lopez *et al.*<sup>11</sup>, Robledo *et al.*<sup>6</sup>, и результаты, представленные в данном документе, показывают, что резистентная рыба действительно заражается IPNV, и уровни вирусной нагрузки можно объяснить только успешной репликацией в клетках полностью (гомозиготной) резистентного малька лосося. Недавно также было продемонстрировано, что макропиноцитоз является основным путем проникновения IPNV в клетки SHK-1 и CHSE-214, процесс, который, вероятно, будет иметь недискриминационный характер и не будет зависеть от конкретного рецептора<sup>19</sup>. Чтобы оценить это далее в текущем исследовании, редактирование CRISPR-Cas9 использовалось для высокоэффективного

нокаута *cdh1* в культуре клеток лосося. Когда эти КО-клетки подвергались заражению IPNV, было мало доказательств влияния на вирусную нагрузку и отсутствовали доказательства влияния на продуктивный выход вируса по сравнению с клетками дикого типа, что указывает на то, что *cdh1* не важен для проникновения или репликации вируса в этих клетках (Фиг. 3Е). Более того, используя антитело против е-кадгерина, не удалось заблокировать проникновение IPNV или ингибировать репликацию в клетках атлантического лосося в культуре в настоящем. Хотя вполне вероятно, что *cdh1* играет роль в резистентности к IPN в очаге инфекции *in vivo* (например, в эпителии кишечника), результаты, представленные в данном документе, не подтверждают важную роль *cdh1* в резистентности к IPN. Напротив, генетическое картирование, экспрессия генов и эксперименты по функциональной вирусологии свидетельствуют о важной роли *nae1*, обуславливающей основную QTL устойчивости к IPN.

QTL IPN стал хорошо известным примером применения молекулярной генетики для решения серьезной проблемы инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных<sup>1</sup>. Применение отбора с помощью маркеров аллеля устойчивости позволило снизить частоту вспышек заболеваний почти до нуля во всех основных странах-производителях лосося<sup>1</sup>. Хотя обнаружение основного каузативного гена и механизмов имеет ограниченную практическую ценность для борьбы с болезнями в аквакультуре лосося, IPN также является серьезным патогеном для других видов лососевых, включая радужную форель. В документах уровня техники не было никаких доказательств того, что происходит сегрегация эквивалентного основного QTL, влияющего на устойчивость к IPN, в коммерческих популяциях радужной форели, в отличие от лосося. Приведенные здесь результаты подтверждают роль *Nae1* как значимого аллеля устойчивости.

### **Выводы**

Точное картирование основного QTL устойчивости к IPNV с использованием полногеномного секвенирования в сочетании с дифференциальной экспрессией у гомозиготных устойчивых и гомозиготных восприимчивых рыб указало на *nae1* как на сильного кандидата в каузативные гены. Функциональная оценка нокаута *nae1* при помощи CRISPR-Cas9 и специфического ингибирования активности белка *nae1* в клетках лосося, зараженных IPNV, выявила заметное снижение продуктивного вирусного выхода. Было высказано предположение, что ранее идентифицированный ген-кандидат *cdh1* является клеточным рецептором для IPNV, устойчивость к которому обусловлена предотвращением проникновения вируса в клетки. Однако в текущем исследовании предотвращение связывания IPNV с *cdh1* либо вследствие нокаута *cdh1* посредством CRISPR-Cas9, либо в

результате связывания антитела к *cdh1* не влияло на продуктивную репликацию IPNV. Дальнейшие исследования по изучению *nae1* у радужной форели показали, что ингибирование NAE1 приводит к значительному снижению вирусного выхода при контролируемой инфекции. В совокупности эти результаты показывают, что *nae1* является вероятным каузативным геном, обуславливающим основной QTL IPN, что подчеркивает значительную роль неддилирования в иммунном ответе на широкий спектр вирусных инфекций.

### Литература

1. Houston, R. D. *et al.* Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. *Nature Reviews Genetics* 1–21 (2020) doi:10.1038/s41576-020-0227-y.
2. Houston, R. D. *et al.* Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* **178**, 1109–15 (2008).
3. Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K. & Kjøglum, S. Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics* **10**, 368 (2009).
4. Moen, T. *et al.* Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. *Genetics* **200**, 1313–26 (2015).
5. Roberts, R. J. & Pearson, M. D. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* **28**, 383–390 (2005).
6. Robledo, D. *et al.* Gene expression comparison of resistant and susceptible Atlantic salmon fry challenged with Infectious Pancreatic Necrosis virus reveals a marked contrast in immune response. *BMC Genomics* **17**, 279 (2016).
7. Gratacap, R. L., Wargelius, A., Edvardsen, R. B. & Houston, R. D. Potential of genome editing to improve aquaculture breeding and production. *Trends Genet.* **35**, 672–684 (2019).
8. Houston, R. D. *et al.* The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. *Heredity (Edinb).* **105**, 318–327 (2010).
9. Taggart, J. B. *et al.* A description of the origins, design and performance of the TRAITSGP Atlantic salmon *Salmo salar* L. cDNA microarray. *J. Fish Biol.* **72**, 2071–2094 (2008).
10. Gratacap, R. L., Jin, Y. H., Mantsopoulou, M. & Houston, R. D. Efficient Genome Editing

- in Multiple Salmonid Cell Lines Using Ribonucleoprotein Complexes. *Mar. Biotechnol.* 1–8 (2020) doi:10.1007/s10126-020-09995-y.
11. Reyes-López, F. E. *et al.* Differential immune gene expression profiles in susceptible and resistant full-sibling families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dev. Comp. Immunol.* **53**, 210–221 (2015).
  12. REED, L. J. & MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS<sup>12</sup>. *Am. J. Epidemiol.* **27**, 493–497 (1938).
  13. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. **6**, 80–92 (2012).
  14. Enchev, R. I., Schulman, B. A. & Peter, M. Protein neddylation: Beyond cullin-RING ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 16 30–44 (2015).
  15. Le-Trilling, V. T. K. *et al.* Broad and potent antiviral activity of the NAE inhibitor MLN4924. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
  16. Ramakrishnan, M. A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* **5**, 85–86 (2016).
  17. Han, K. & Zhang, J. Roles of neddylation against viral infections. *Cellular and Molecular Immunology* vol. 15 292–294 (2018).
  18. Teijaro, J. R. Cytokine storms in infectious diseases. *Seminars in Immunopathology* vol. 39 501–503 (2017).
  19. Levican, J. *et al.* Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
  20. Van der Auwera, G. A. *et al.* From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **43**, (2013).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Генетически модифицированная лососевая рыба, причем рыба генетически модифицирована таким образом, что ее геном содержит, по существу состоит или состоит из мутантного гена или аллеля *nae1*.

2. Генетически модифицированная лососевая рыба по п. 1, отличающаяся тем, что мутантный ген или аллель *nae1* содержит замену, делецию, инверсию, вставку или повтор одного или более чем одного нуклеотида в последовательности гена *nae1* или в регуляторной области, смежной с геном *nae1*, связанной с экспрессией *nae1*.

3. Генетически модифицированная лососевая рыба по любому из пп. 1 или 2, отличающаяся тем, что мутантный ген или аллель *nae1* приводит к снижению уровня белка и/или активности NAE1.

4. Генетически модифицированная лососевая рыба по любому из пп. 1-3, демонстрирующая повышенную устойчивость к вирусной инфекции по сравнению с соответствующей лососевой рыбой дикого типа, которая не содержит мутантного гена или аллеля *nae1*.

5. Способ разведения популяции лососевых рыб, проявляющих повышенную устойчивость к вирусной инфекции, при котором берут по меньшей мере одного самца генетически модифицированной лососевой рыбы и по меньшей мере одну самку генетически модифицированной лососевой рыбы по любому из пп.1-4 и разводят популяцию лососевых рыб, проявляющих повышенную устойчивость к вирусной инфекции, от указанного по меньшей мере одного самца генетически модифицированной лососевой рыбы и указанной по меньшей мере одной самки генетически модифицированной лососевой рыбы.

6. Популяция рыб, демонстрирующая повышенную устойчивость к вирусной инфекции, полученная из генетически модифицированной рыбы по любому из пп. 1-4 или способом по п. 5.

7. Бассейн для аквакультуры, содержащий генетически модифицированную лососевую рыбу по любому из пп. 1-4 или популяцию рыб по п. 6.

8. Способ определения, может ли лососевая рыба проявлять повышенную устойчивость к заражению вирусом, включающий обнаружение нуклеотидной модификации, изменения экспрессии или уровня активности гена *nae1* и/или белка у



лососевых рыб и определение того, являются ли лососевые рыбы устойчивыми или могут ли проявлять повышенную устойчивость к инфекции, или могут ли иметь потомство, которое демонстрирует повышенную устойчивость к заражению вирусом, на основании обнаруженных нуклеотидных модификаций, изменения экспрессии или уровня активности.

**9.** Способ по п.8, отличающийся тем, что пониженный уровень экспрессии или активности гена *nae1* и/или белка связан с рыбами, которые, вероятно, демонстрируют повышенную устойчивость к заражению вирусом.

**10.** Способ по п. 9, дополнительно включающий отбор рыбы, которая демонстрирует пониженный уровень экспрессии или активности гена *nae1* и/или белка, для использования в качестве маточного стада.

**11.** Способ разведения популяции лососевых рыб, проявляющих повышенную устойчивость к вирусной инфекции, при котором берут по меньшей мере одного самца лососевых рыб и по меньшей мере одну самку лососевых рыб, идентифицированных в соответствии с п. 10, и разводят популяцию лососевых рыб, демонстрирующих повышенную устойчивость к вирусной инфекции, от указанного по меньшей мере одного самца лососевых рыб и указанной по меньшей мере одной самки лососевых рыб.

**12.** Популяция лососевых рыб, демонстрирующая повышенную устойчивость к вирусной инфекции, полученная от лососевых рыб, идентифицированных как обладающих повышенной устойчивостью к вирусной инфекции в соответствии со способом по любому из пп. 8-10, или полученная способом по п. 11.

**13.** Бассейн для аквакультуры, содержащий рыбу, проявляющую повышенную устойчивость к вирусной инфекции, полученную от рыбы, идентифицированной как проявляющую повышенную устойчивость к вирусной инфекции в соответствии со способом по любому из пп. 8-10, полученную способом по п. 11, или содержащий популяцию лососевых рыб по п. 12.

**14.** Способ лечения или предупреждения вирусной инфекции у лососевых рыб, включающий введение ингибитора белка NAE1 лососевым рыбам или популяции лососевых рыб.

**15.** Ингибитор белка NAE1 для применения в способе лечения или предупреждения вирусной инфекции у лососевых рыб.

**16.** Способ или ингибитор белка NAE1 для применения в способе по пп. 14 или 14, отличающийся тем, что ингибитор NAE1 представляет собой MLN4924 (певонедистат).

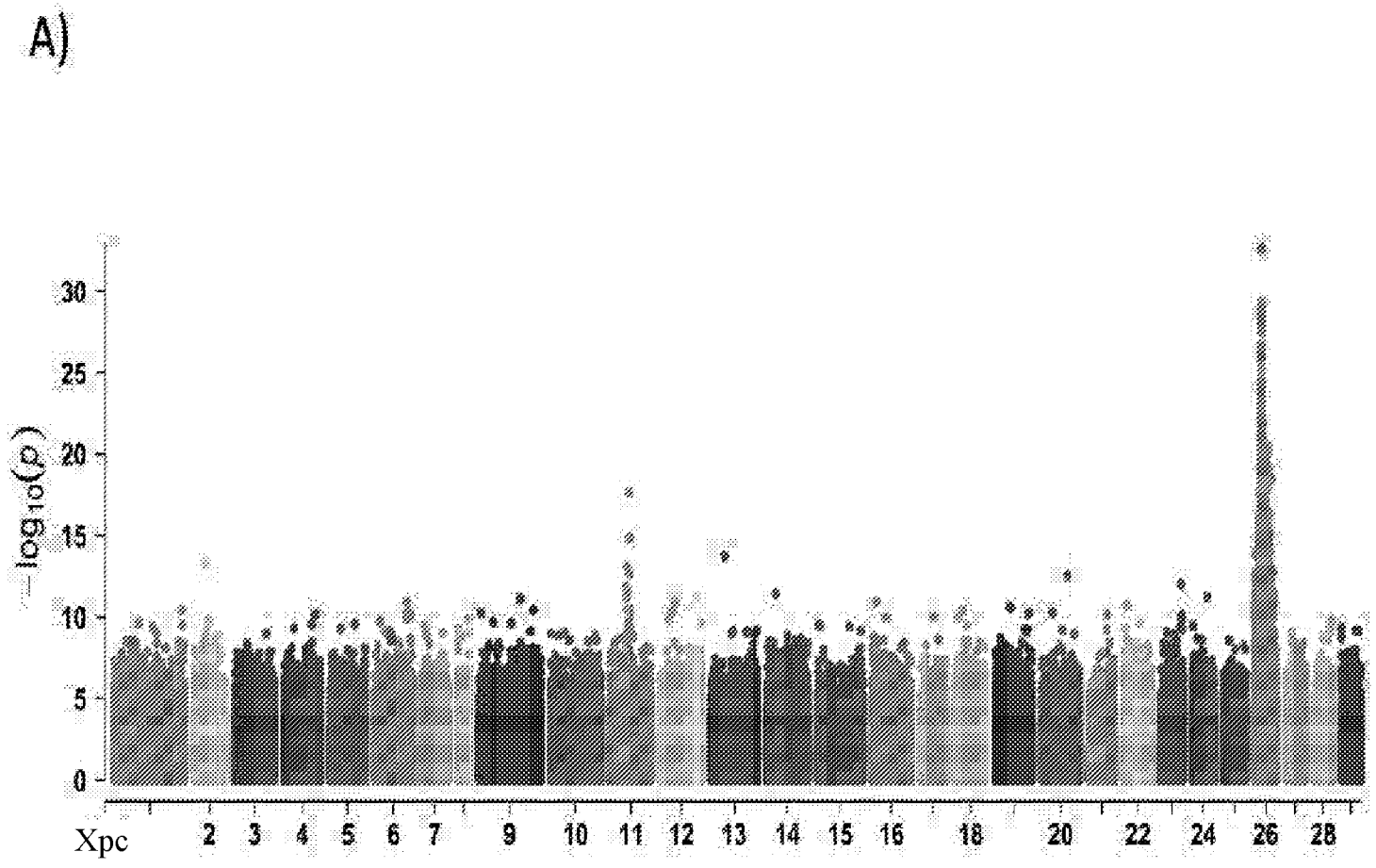
**17.** Генетически модифицированная лососевая рыба, способ, популяция, аквакультура или ингибитор NAE1 для применения в способе по любому из пп.1-16, где вирус представляет собой бирнавирус.

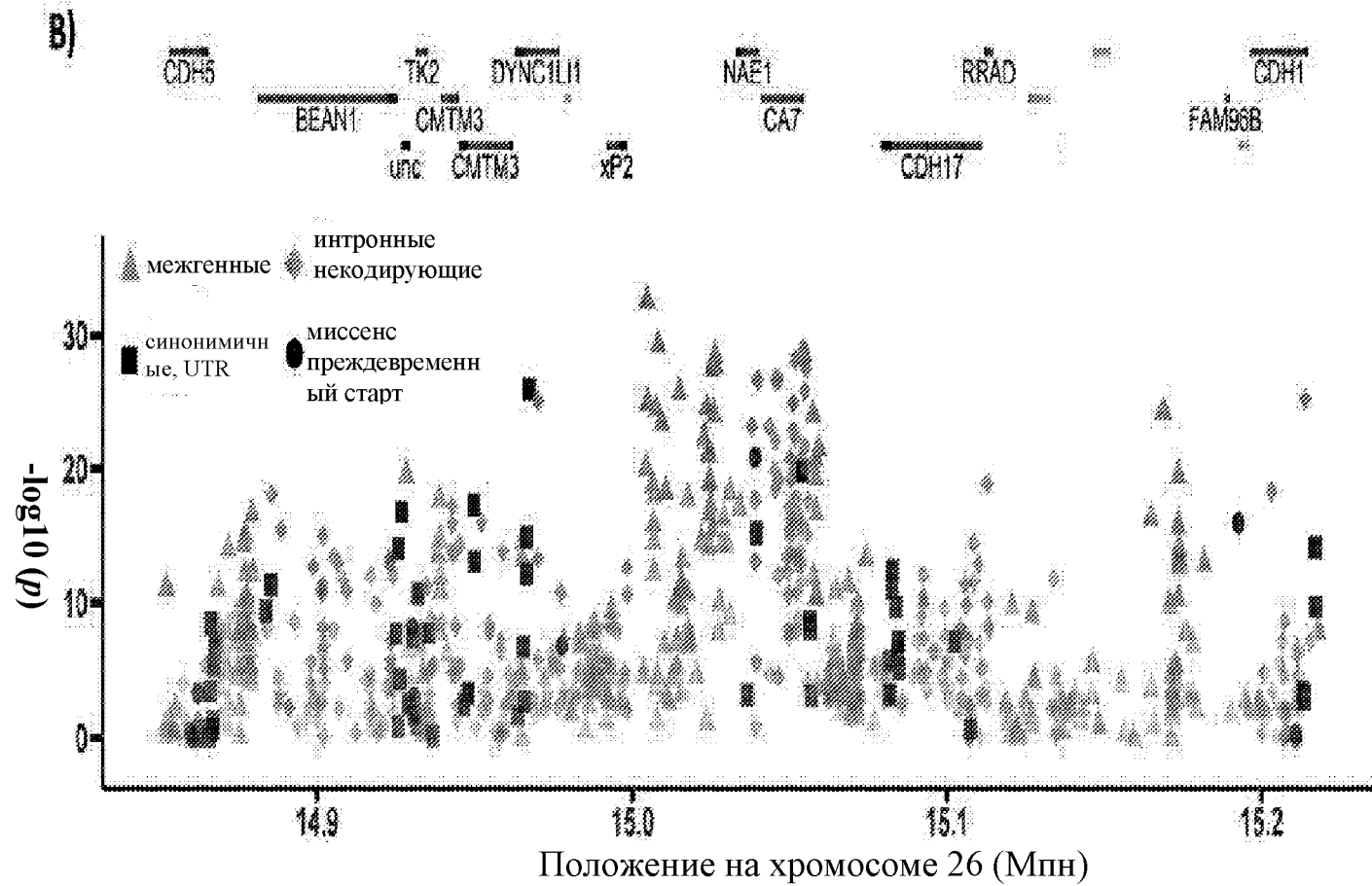
**18.** Генетически модифицированная лососевая рыба, способ, популяция, аквакультура или ингибитор NAE1 для применения в способе по п. 17, где вирус представляет собой вирус инфекционного панкреонекроза (IPNV).

**19.** Генетически модифицированная лососевая рыба, способ, популяция, аквакультура или ингибитор NAE1 для применения в способе по любому из пп.1-18, где лососевая рыба выбрана из группы, состоящей из лосося (такого как атлантический лосось, нерка, стальноголовый лосось, кижуч и чавыча), форель (например, радужная и кумжа), гольца, пресноводного сига и хариуса.

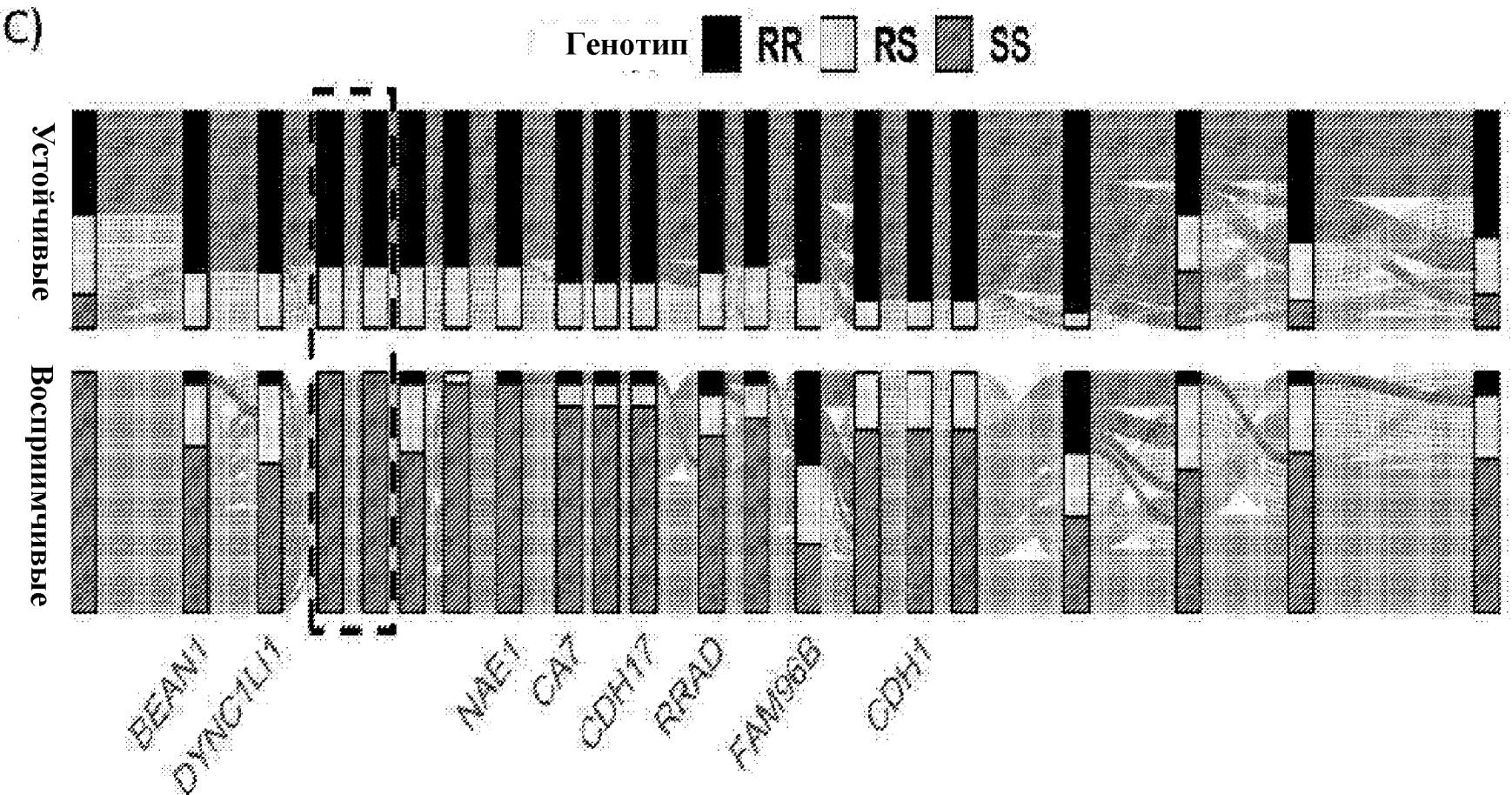
**20.** Генетически модифицированная лососевая рыба, способ, популяция, аквакультура или ингибитор NAE1 для применения в способе по п. 19, где лососевая рыба представляет собой радужную форель.

Фиг. 1

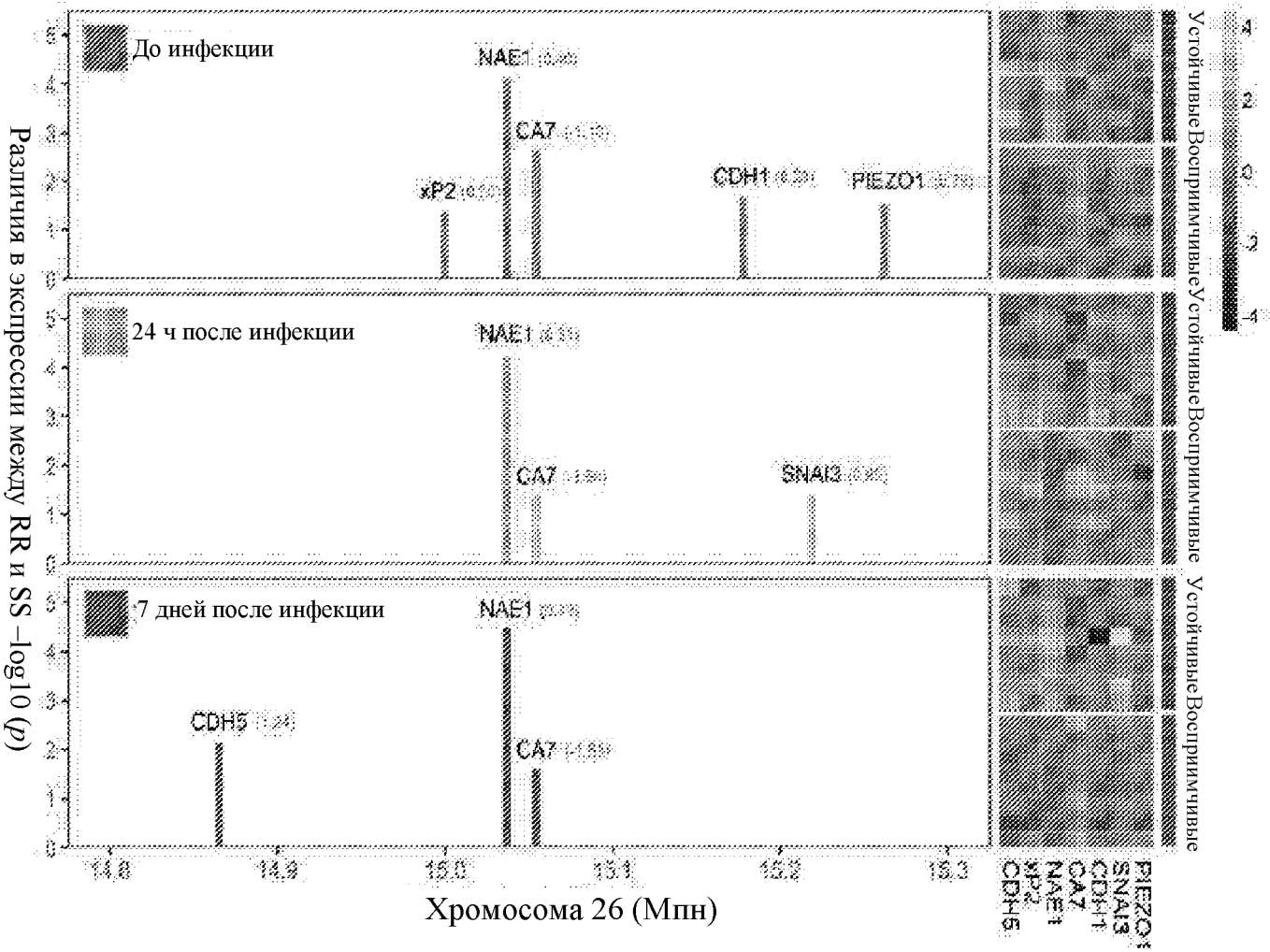




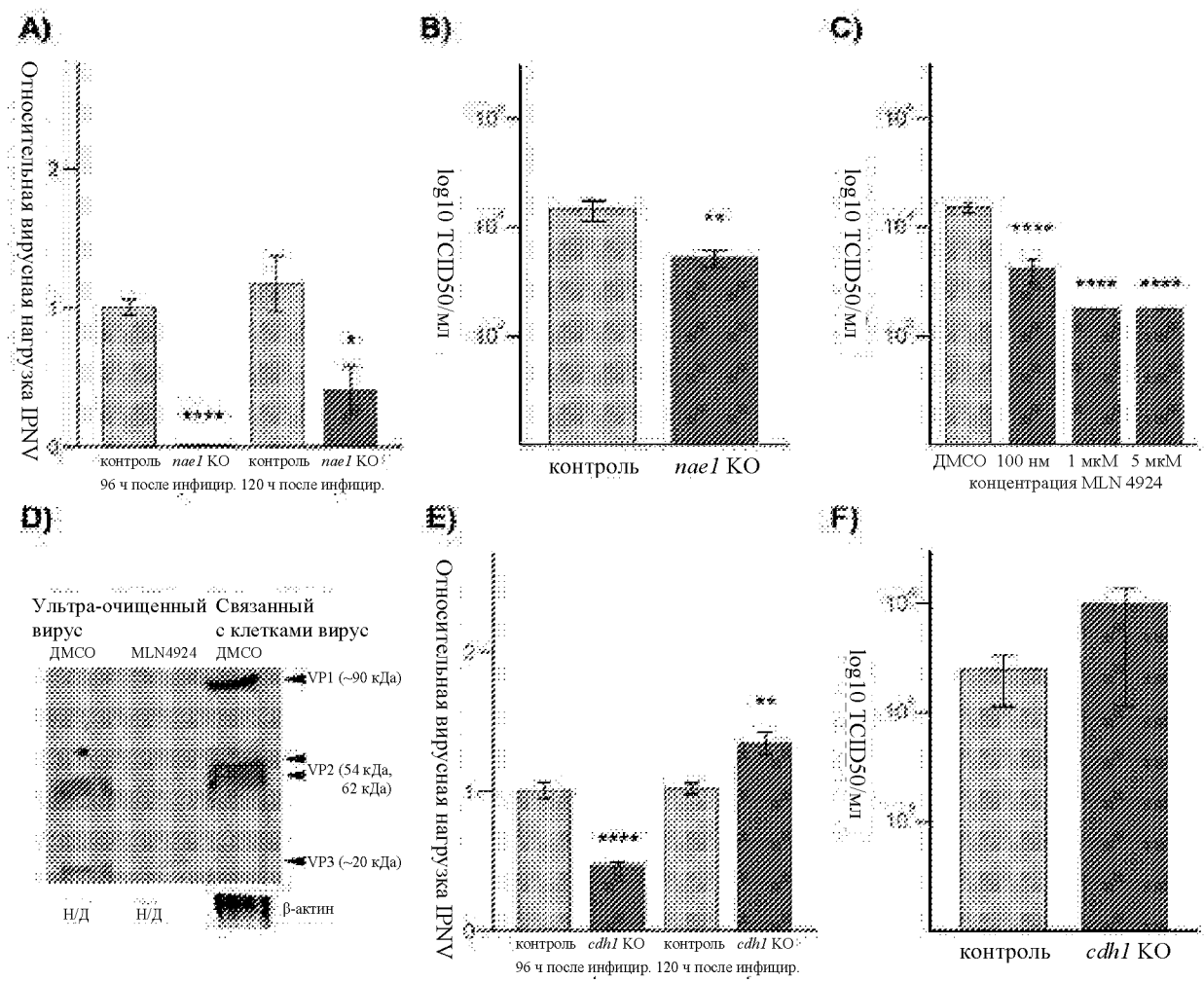
Фиг. 1 (продолж.)



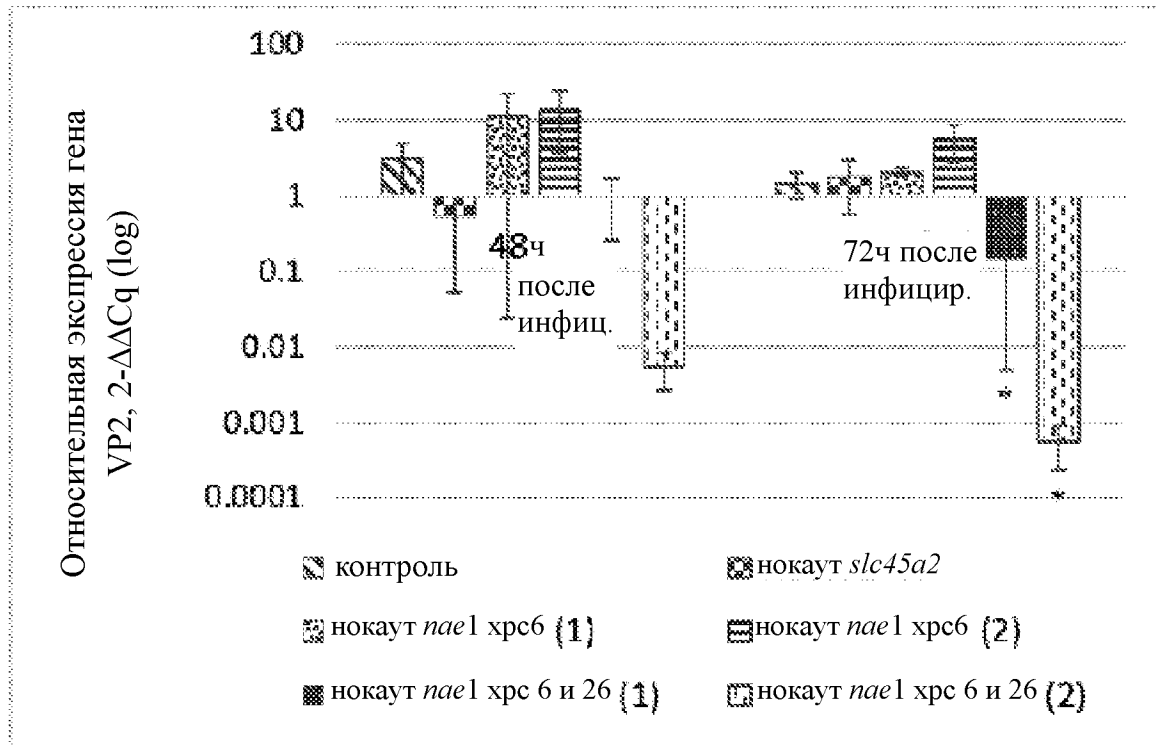
Фиг. 1 (продолж.)



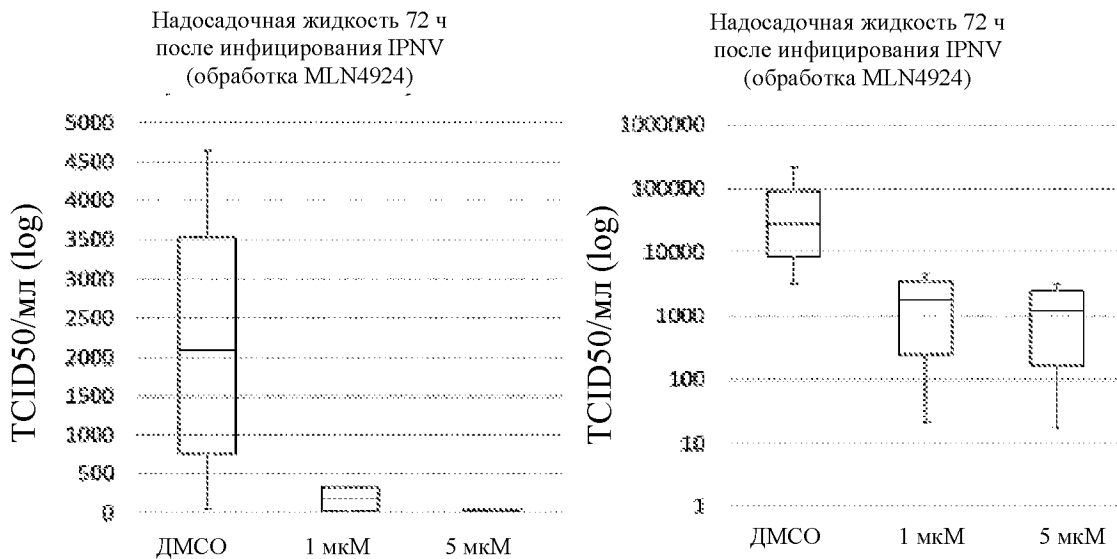
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5