

БИОИНЖЕНЕРИЯ

№ 10



редактирование
генома

Редактирование генома – это внесение направленных изменений в геном непосредственно в живой клетке.

Такой биоинженерный подход значительно более удобен, чем традиционная генная инженерия, которая подразумевает манипуляции с ДНК *in vitro*. В пробирке оно, конечно, легче, но ведь эту ДНК потом надо из пробирки взять и каким-то образом засунуть в живой организм, а это не всегда получается.

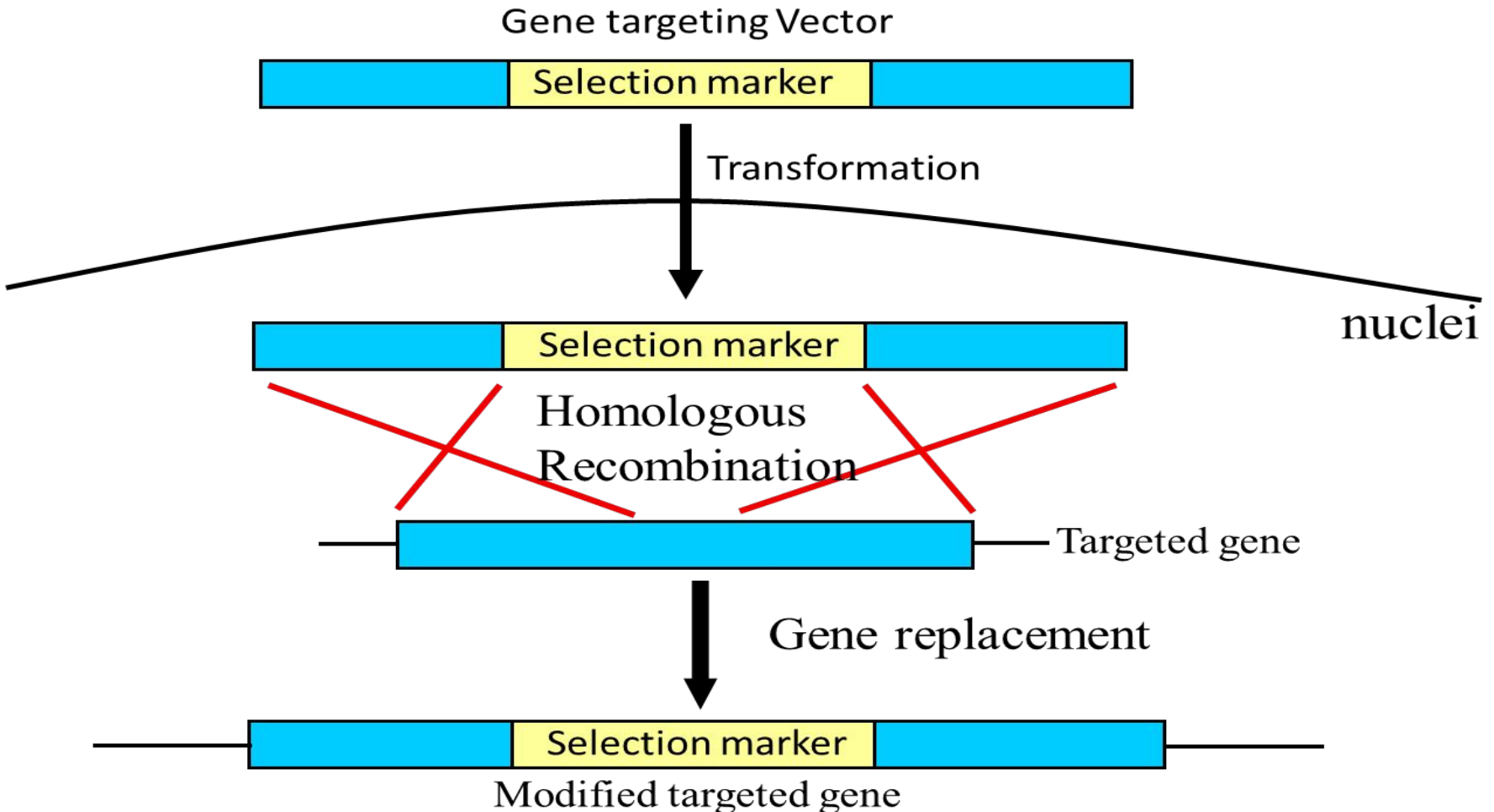
Сегодня технологии редактирования геномов еще довольно дороги и недостаточно эффективны, а самое главное – слишком часто приводят к редактированию геномов не там, где надо (так называемый эффект off-target). Однако доведение этих технологий до ума – это вопрос только времени, сегодня в этом уже никто не сомневается.

Сейчас все думают, что редактирование генома тождественно равно CRISPR/Cas9, но это далеко не так.

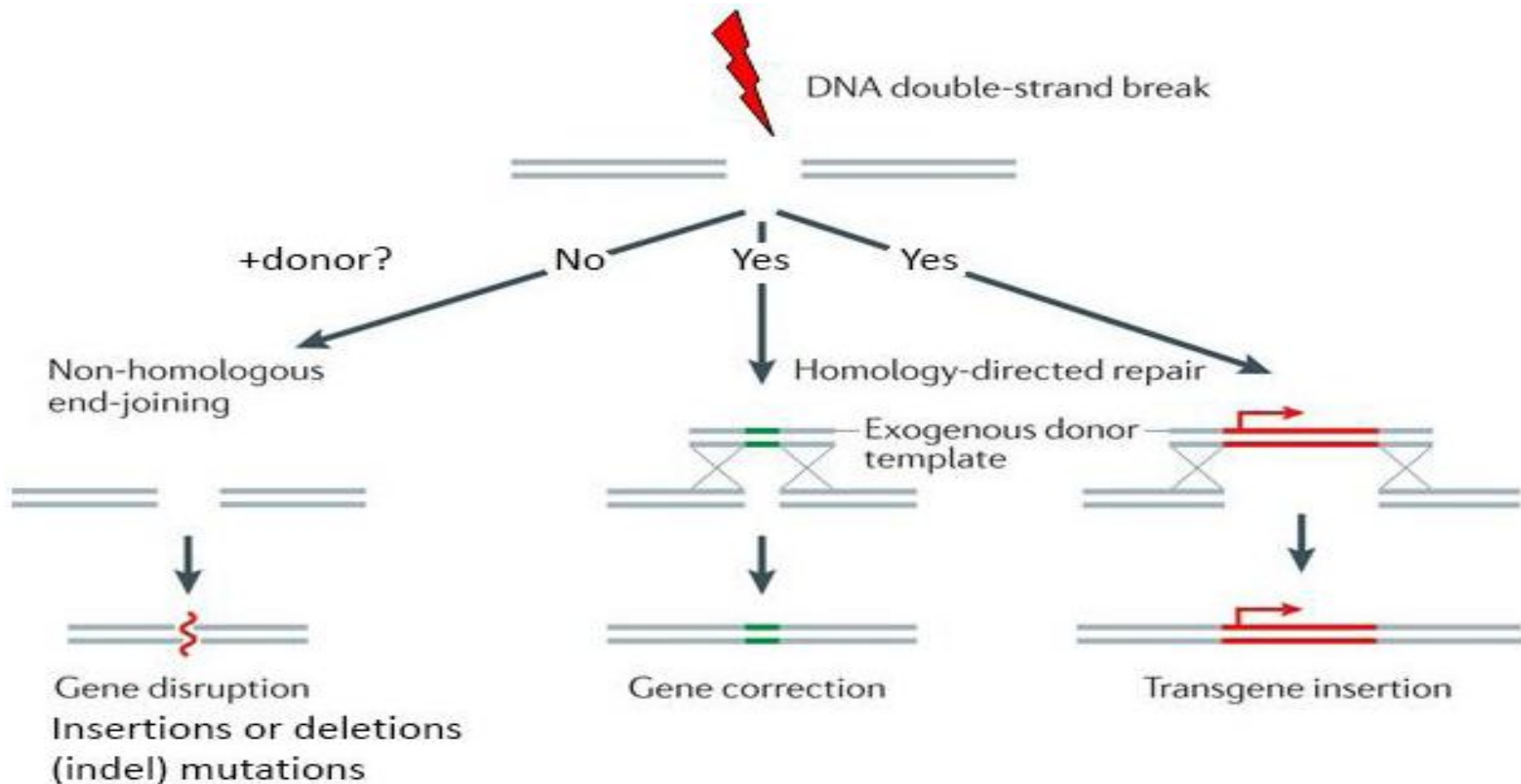
Gene targeting

первый метод редактирования геномов

Разработан в начале 1980-х годов. В 2007 году за него была выдана Нобелевская премия. Суть метода заключается в трансфекции клеток неким фрагментом ДНК, который затем встраивается в целевой участок генома при помощи гомологичной рекомбинации.



Репарация двуцепочечных разрывов ДНК



Встраивание чужеродной ДНК в геном возможно только при репарации разрывов геномной ДНК. Такие разрывы возникают в геноме в результате действия случайных факторов или ферментов (таких как топоизомеразы или ферменты репарации), но частота этих событий в конкретном месте генома очень низка.

Gene targeting

Как и любой пионерский метод, он поначалу был не очень удачен.

Две его основные проблемы:

1. Очень высокая частота событий неспецифического встраивания в геном (эффекта off-target, как сейчас говорят) за счет прохождения негомологичной рекомбинации.
2. Низкая эффективность процесса гомологичной рекомбинации у высших эукариот (от 10^{-7} до 10^{-6}).

В целом, обе проблемы были преодолены.

Gene targeting

Дрожжи – организм, которому плевать на проблемы жалких высших эукариот!

1. Эффективность гомологичной рекомбинации у дрожжей на два порядка выше
2. За счет этого и эффект off-target проявляется слабее

Дрожжевая генетика – самая сильная генетика на свете!

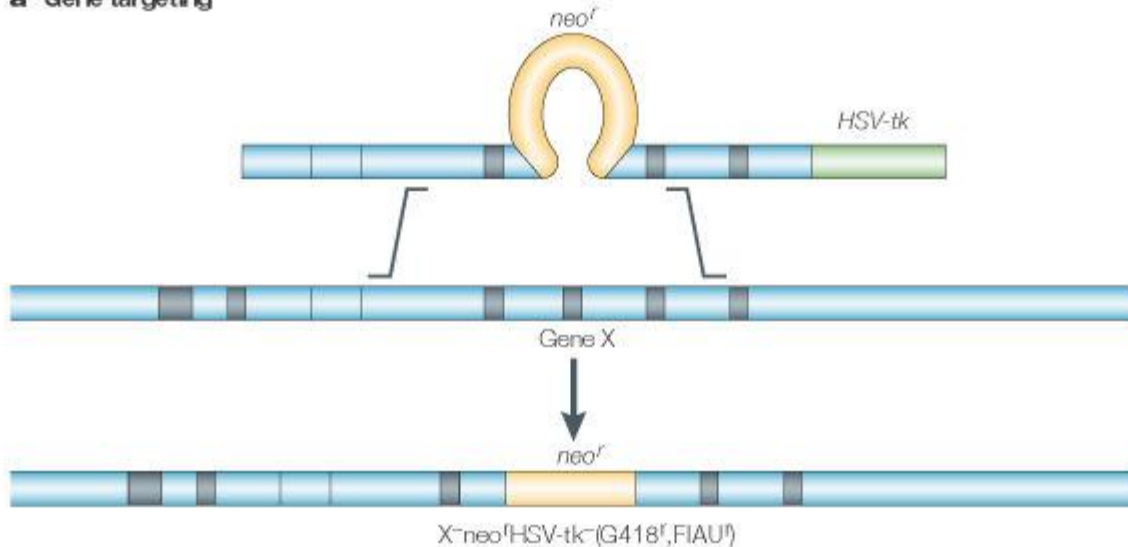
Работая на дрожжах, вы с изумительной легкостью можете:

- Удалить ген из генома (первая полная делеционная библиотека – дрожжевая),
- Вносить в целевые гены любые нужные вам изменения,
- Скрестить два гаплоидных штамма дрожжей, у каждого из которых делетирован какой-либо ген, и получить двойного делетанта,
- Вы даже можете организовать гомологичную рекомбинацию в митохондриях и получать мутации в митохондриальной ДНК,
- И многое, многое другое!

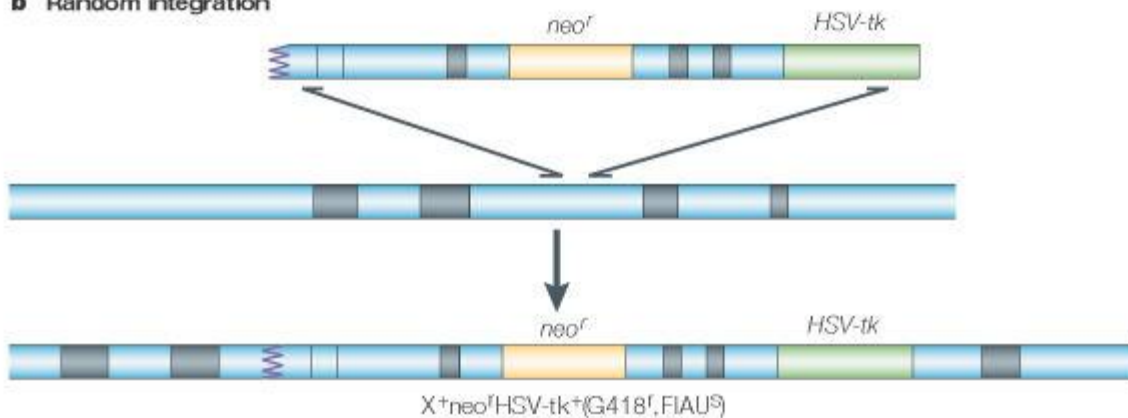
Gene targeting

Способ борьбы с неспецифичностью встраивания*

a Gene targeting



b Random integration



Конструкция для встраивания содержит не один, а два маркерных гена, причем второй располагается за сайтами гомологичной рекомбинации. В этом случае нормальная гомологичная рекомбинация приведет к встраиванию в геном только одного маркерного гена, а ненужная нам негомологичная рекомбинация (встраивание в случайный регион генома) – к интеграции обоих маркерных генов. Следовательно, у вас есть возможность отобрать только те клетки, в которых случилось нужное вам рекомбинационное событие.

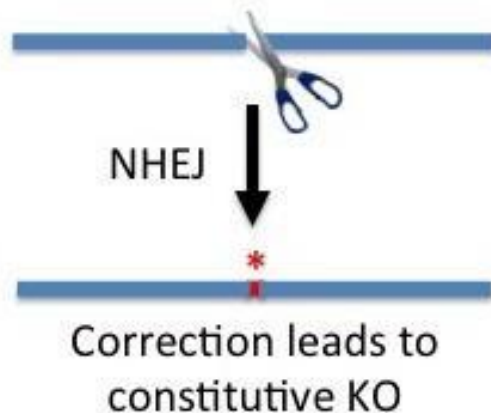
* Один из многих.

Gene targeting

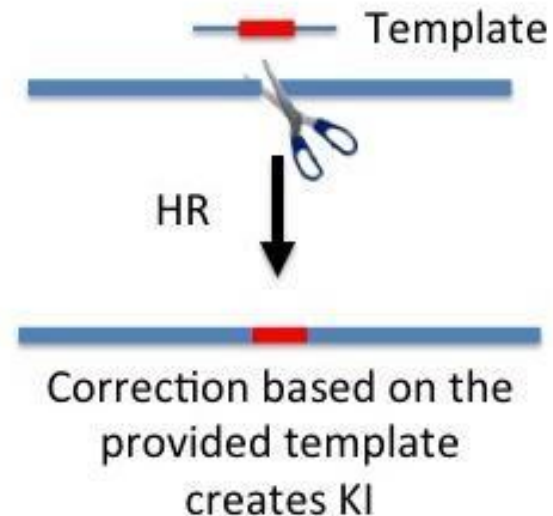
Способ повышения эффективности процесса

Все очень просто – **направленные двуцепочечные разрывы!**

Use of non-homologous end joining
(NHEJ)



Use of homologous recombination
(HR)



Если внести в ДНК двуцепочечный разрыв и одновременно засунуть в клетку конструкцию для гомологичной рекомбинации по сформировавшимся концам – эффективность рекомбинации существенно повышается. При этом доля событий негомологичного соединения концов (NHEJ) относительно невысока.

Это всё просто великолепно, но есть одна проблема:

Как внести двуцепочечный разрыв ровно в то место генома, куда вам надо?

С ответа на этот вопрос началась современная геномная инженерия.

Первое, что для этого придумали – **мегануклеазы**.

Мегануклеазы – природные ферменты, найденные у некоторых прокариот и водорослей. Высокоэффективно и высокоспецифично расщепляют строго определённые последовательности ДНК. Распознают участок ДНК длиной от 12 до 40 п.н., что делает их наиболее специфичными из всех встречающихся в природе эндонуклеаз рестрикции.

Сильные стороны: очень высокая эффективность и специфичность (в геноме не так много одинаковых последовательностей длиной по 40 нуклеотидов).

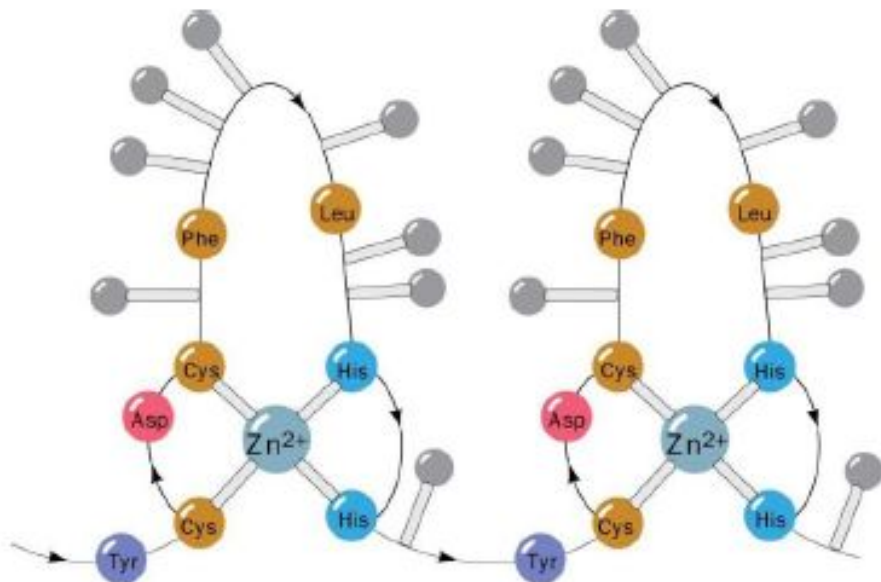
Слабая сторона: плохо поддаются инженерии (очень трудно сделать искусственную мегануклеазу для распознавания какого-то другого сайта). Поэтому их применение в редактировании геномов сильно ограничено.

Zinc Finger Nucleases

(ZFN, нуклеазы типа «цинковые пальцы»)

В 1992 году было показано, что эндонуклеаза рестрикции FokI может быть легко разделена на два отдельных домена: ДНК-связывающий и эндонуклеазный. Последний, как выяснилось, работает сиквенс-неспецифическим образом, то есть разрежет любой участок ДНК, с которым связался связывающий домен.

А в 1996 году были впервые опробованы на практике ZFN: химерные ферменты, состоящие из эндонуклеазного неспецифического домена FokI и ДНК-связывающих доменов типа «цинковые пальцы».

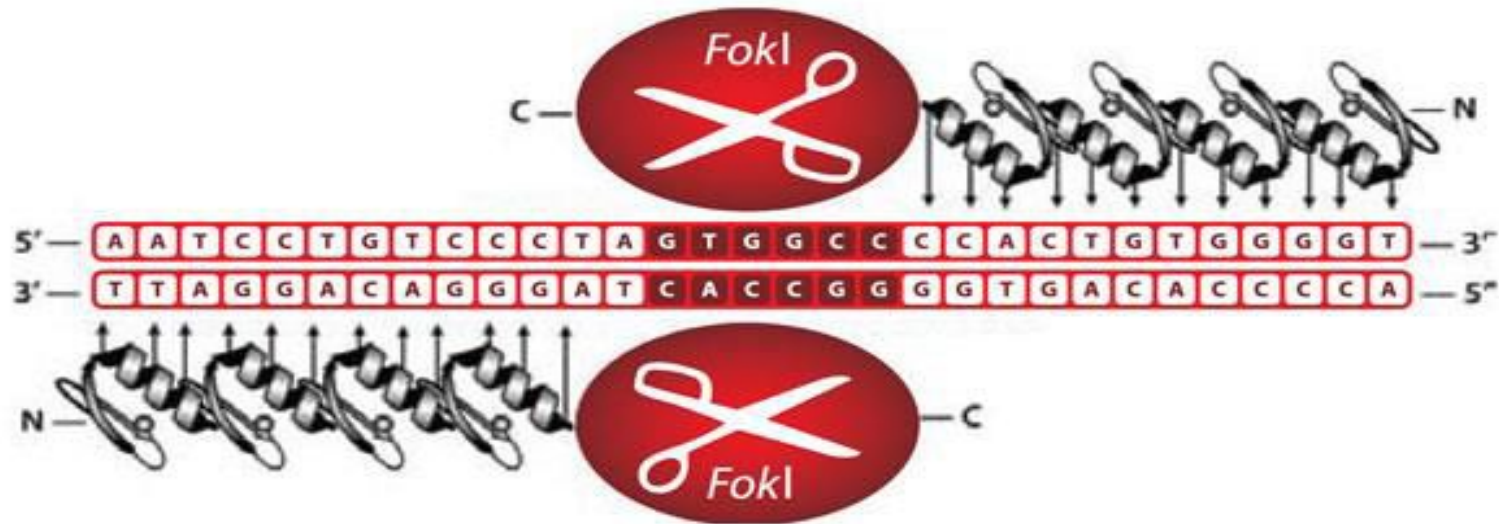


«Цинковый палец» длиной около 30 аминокислот взаимодействует с ионом цинка, формируя стабильную структуру, способную распознавать 3 п.н.

Для каждого нуклеотидного триплета существует свой «цинковый палец».

А значит, ZFN можно конструировать!

Zinc Finger Nucleases



Каждый домен типа «цинковых пальцев» узнает триплет нуклеотидов. Комбинируя четыре домена, можно создать ДНК-связывающий домен, распознающий 12 нуклеотидов. Поскольку для действия FokI необходимы две субъединицы, то в целом слева и справа от требуемого места внесения двухцепочечного разрыва узнается последовательность 24 п.н. (по 12 с каждой стороны), что обеспечивает очень высокую специфичность.

Именно при помощи ZFN было впервые проведено редактирование генома в животной клетке (2002-2003 гг).

Zinc Finger Nucleases

В ноябре 2017 года в США впервые в мире отредактировали геном живого взрослого человека! И использовали они не CRISPR/Cas9, а именно ZFN!!!



44-летний Брайан Мадо согласился на эксперимент, так как, по его словам, «страдал от боли каждый день». За свою жизнь ему пришлось перенести 26 операций, чтобы справиться с симптомами своей болезни, синдрома Хантера — грыжами, деформацией первых пальцев стоп, прорастанием кости в спинной мозг, проблемами с глазами, ушами и желчным пузырем.

Были использованы вирусные средства доставки конструкций в клетки печени.

В сентябре 2018 года были обнародованы промежуточные результаты: метод лечения работает!!! Правда, не совсем так, как ожидали ученые, но все же людям реальное становится легче!

Zinc Finger Nucleases

Недостатки:

1. Относительная дороговизна и сложность процесса конструирования.
2. Неидеальная специфичность. Некоторые ZFN способны связываться с участками ДНК, несколько отличающимися от целевого. Отдельные ZFN делают это достаточно часто, в результате чего приобретают цитотоксичность и становятся непригодными для редактирования геномов.

ZFN были реальной революцией в геномной инженерии (это понятие вообще родилось благодаря им), но достаточно быстро стало ясно, что нужны какие-то новые, более удачные методы.

И они, конечно же, были найдены!

TALEN (Transcription-Activator-Like Effector Nuclease)

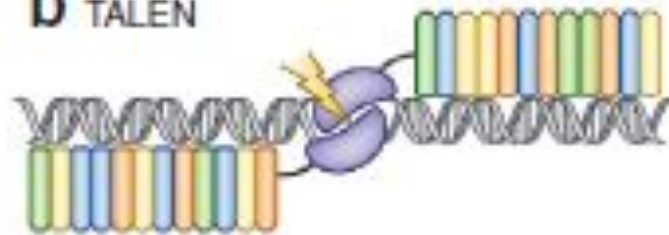
Белки TALE секретируются патогенными бактериями *Xanthomonas*. Они нужны для связывания с промоторами растений-хозяев и активации транскрипции их генов, способствующих выживанию бактерии и распространению инфекции.

«Код TALE» был взломан в 2009 году. Оказалось, что каждый небольшой домен таких белков специфически связывает **ОДИН** нуклеотид ДНК. Один – это лучше, чем три. Соедините набор доменов TALE с нуклеазой FokI – и у вас получится TALEN!

a ZFN



b TALEN



TALEN

Преимущества над ZFN:

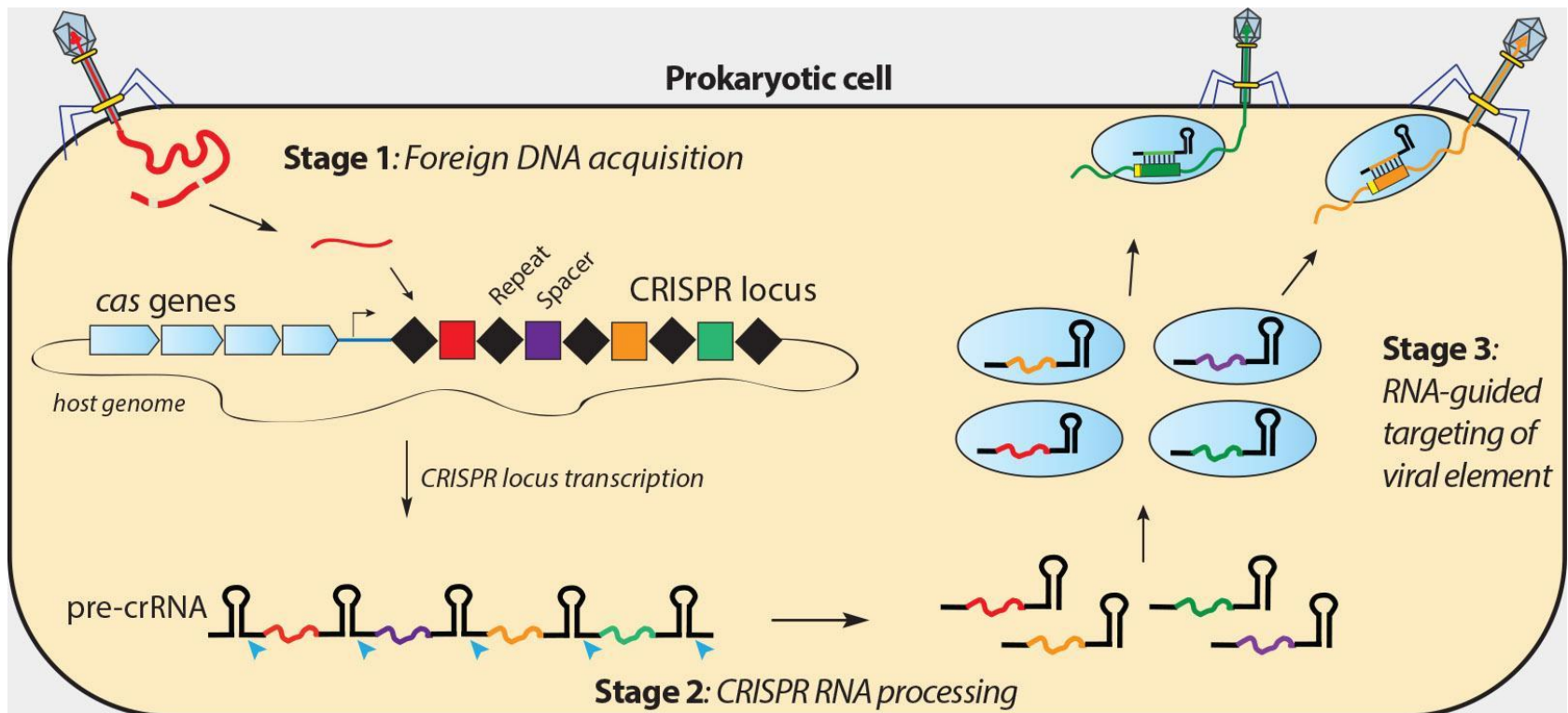
1. Можно сконструировать практически на любую последовательность в геноме
2. Более эффективны, выше уровень трансгенеза
3. Уровень неспецифической активности значительно ниже
4. Процесс инжиниринга TALEN занимает значительно меньше времени, менее трудоемкий и значительно дешевле

TALEN – единственная технология редактирования генома, которая сработала для митохондриальной ДНК клеток человека!

Ее очень сложно редактировать, поскольку если в ядро любая ДНК после трансфекции полезет по определению, то в митохондрию ее еще поди засунь.

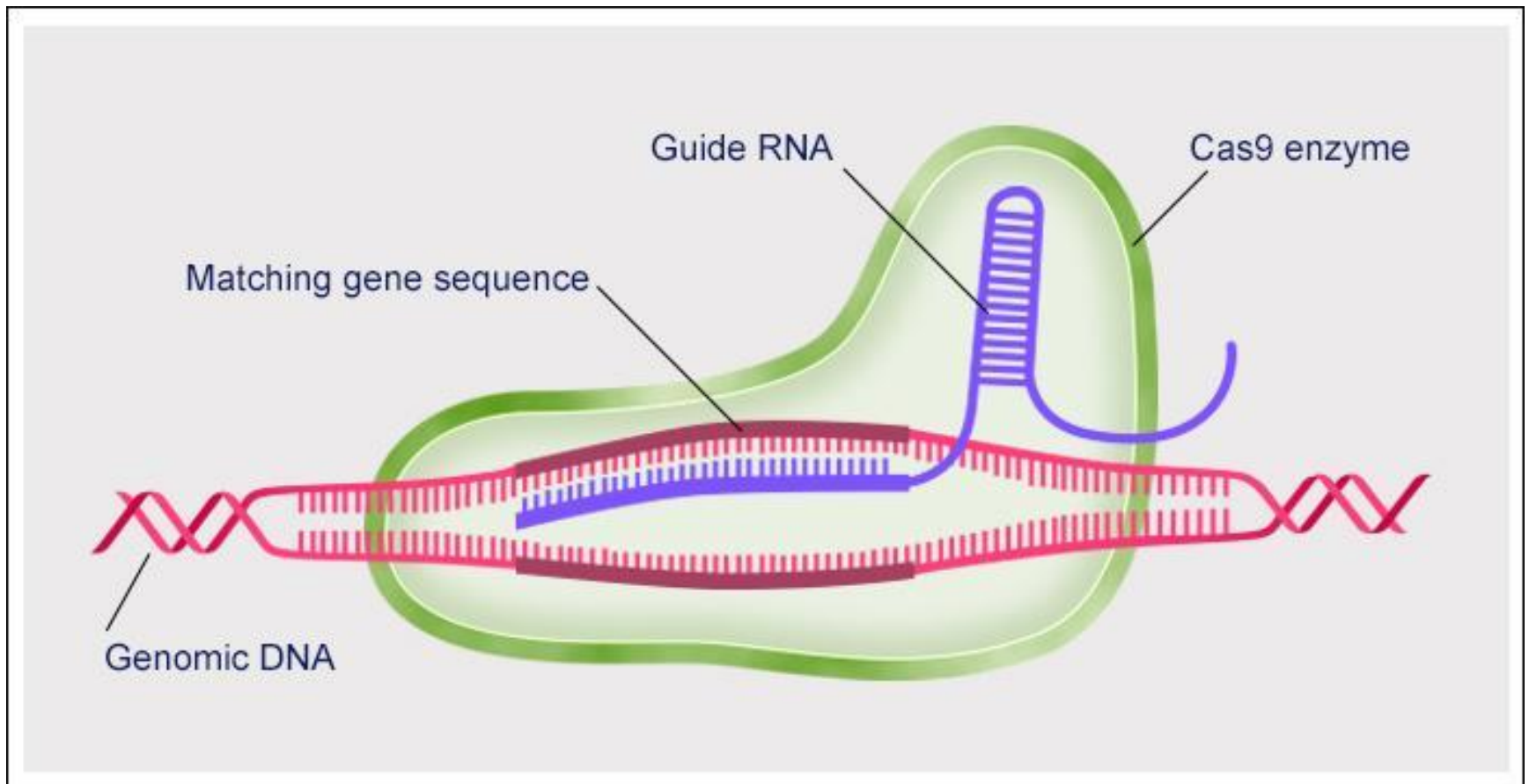
CRISPR/Cas9 – новая эра геномной инженерии

CRISPR – это Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, участки бактериальных геномов, кодирующих короткие РНК, которые связываются с целевыми участками ДНК по комплементарному принципу и привлекают нуклеазу Cas, которая вносит в участке связывания двуцепочечный разрыв. По сути дела, у бактерий эта система является системой иммунитета – РНК CRISPR транскрибируются с участков чужеродной (чаще всего фаговой) ДНК, встроившихся в бактериальный геном.



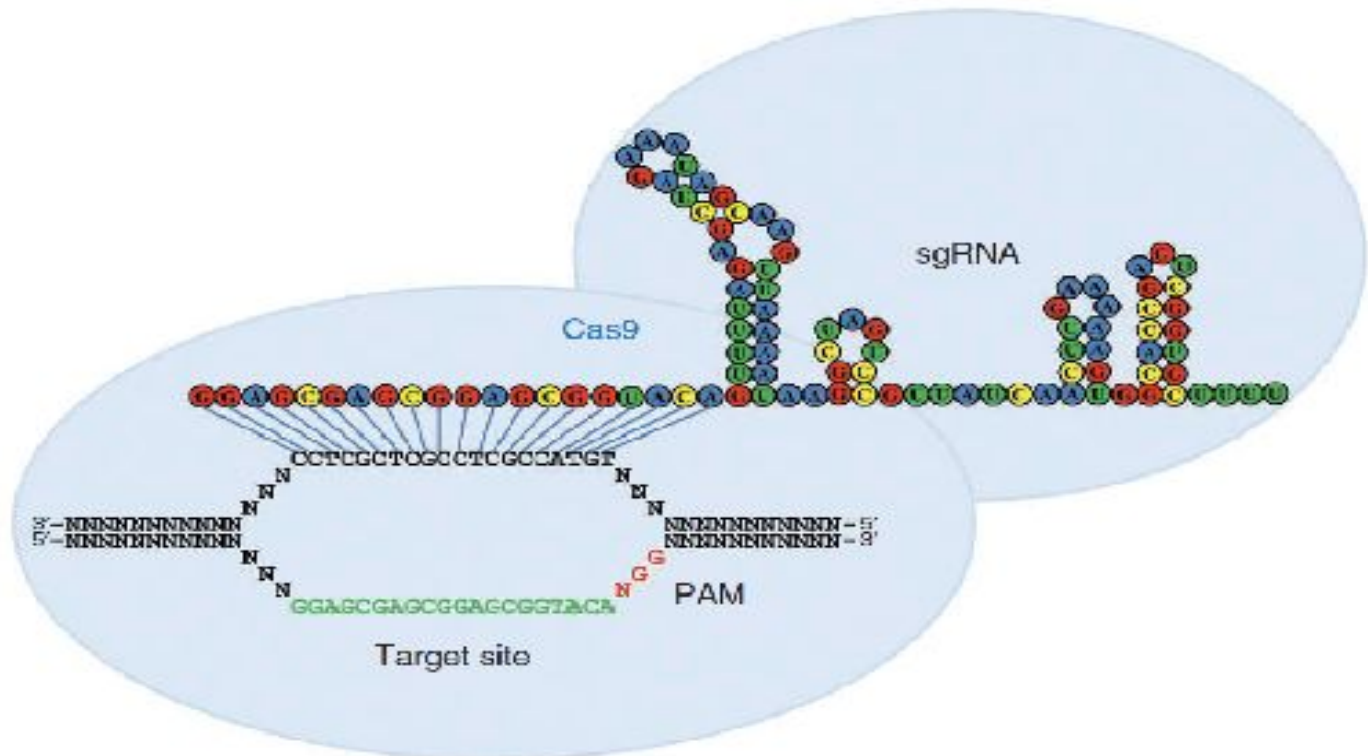
CRISPR/Cas9

На самом деле, белков Cas у бактерий много, но только Cas9 работает как единственный белок системы. В остальных случаях нужна комбинация нескольких белков Cas, что делает системы неудобными для практического использования.



CRISPR/Cas9

Для того, чтобы Cas9 могла связаться с ДНК, участок связывания должен заканчиваться на так называемую последовательность PAM, которая представляет собой NGG. Таких последовательностей в геноме много, и если не было бы РНК CRISPR, Cas9 связывался бы с каждой из них с одинаковой вероятностью. Но так как РНК CRISPR есть, они тащат Cas9 только в нужное место. Но вы должны помнить, что там, куда вы хотите приманить Cas9, должна быть PAM!



CRISPR/Cas9

Главное преимущество метода:

В качестве ДНК-узнающих элементов используются не белки, как в ZFN и TALEN, а РНК! Это невероятно облегчает работу. Конструирование белковых доменов – дело долгое и достаточно дорогое, а тут и конструировать ничего не надо – возьми сиквенс целевого участка ДНК, замени Т на У, добавь сиквенс Cas9-связывающей шпильки – вот тебе и гидовая РНК!

При помощи этой системы уже очень много чего сделали:

- исправление патогенных мутаций в **клетках** человека,
- создание новых пород животных и сортов растений для сельского хозяйства,
- направленное редактирование геномов микробных сообществ для биотехнологии,
- редактирование генома эмбриона человека (эксперимент был прекращен на стадии 4 бластомеров по этическим соображениям),
- свеженькие китайские близняшки с отредактированным геномом, невосприимчивые к ВИЧ (скорее всего, фейк).

CRISPR/Cas9

И все считают, что за этой системой будущее биоинженерии и науки вообще.

И я тоже так считаю. Но наряду с этим, имеется несколько очень серьезных проблем, которые в настоящее время не позволяют выводить CRISPR/Cas9 в медицину и затрудняют ее использование в с/х и биотехнологии.

Главный недостаток метода:

Эффект off-target, или неспецифичное действие системы.

-Cas9 – мономер, а FokI – димер. Поэтому ZFN и TALEN специфичнее.

-Связывание ДНК «цинковыми пальцами» и TALE гораздо более специфично, чем РНК CRISPR. Cas9 – по определению неспецифическая нуклеаза, которая должна расщепить в труху чужеродную ДНК в бактериальной клетке.

Соответственно она ведет себя и в клетках высших эукариот. Неспецифические двуцепочечные разрывы залечиваются NHEJ с ошибками.

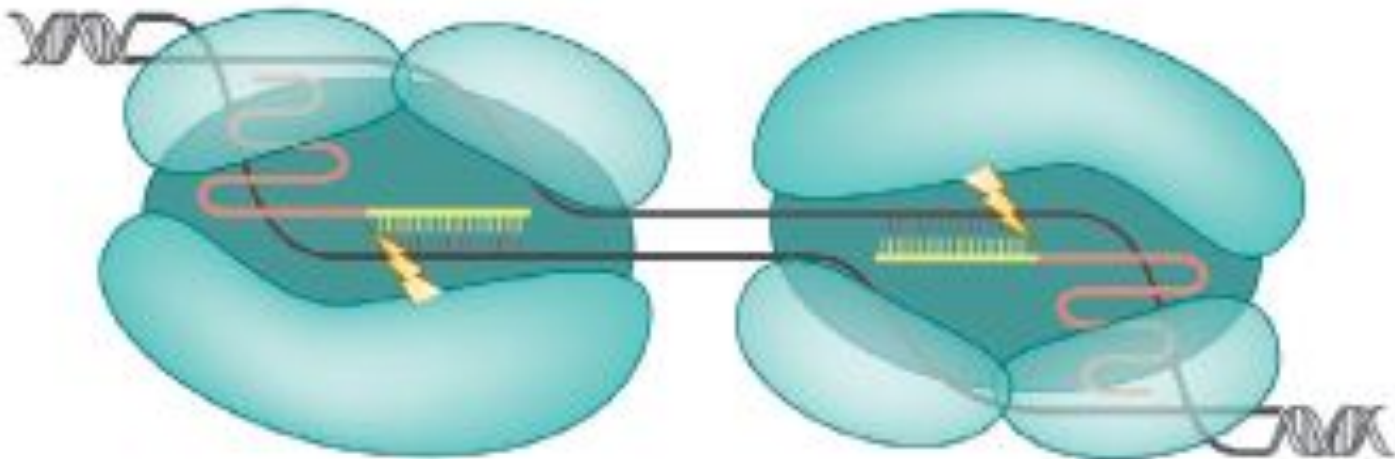
Все это приводит к тому, что система реально неспецифичная. По последним оценкам, в геноме мыши при использовании технологии CRISPR/Cas9 появляется более сотни точечных мутаций и десятки делеций или вставок! Понятно, что большинство из них ни на что не повлияют, но как такую систему внедрять в медицину?! Да никак просто-напросто.

CRISPR/Cas9

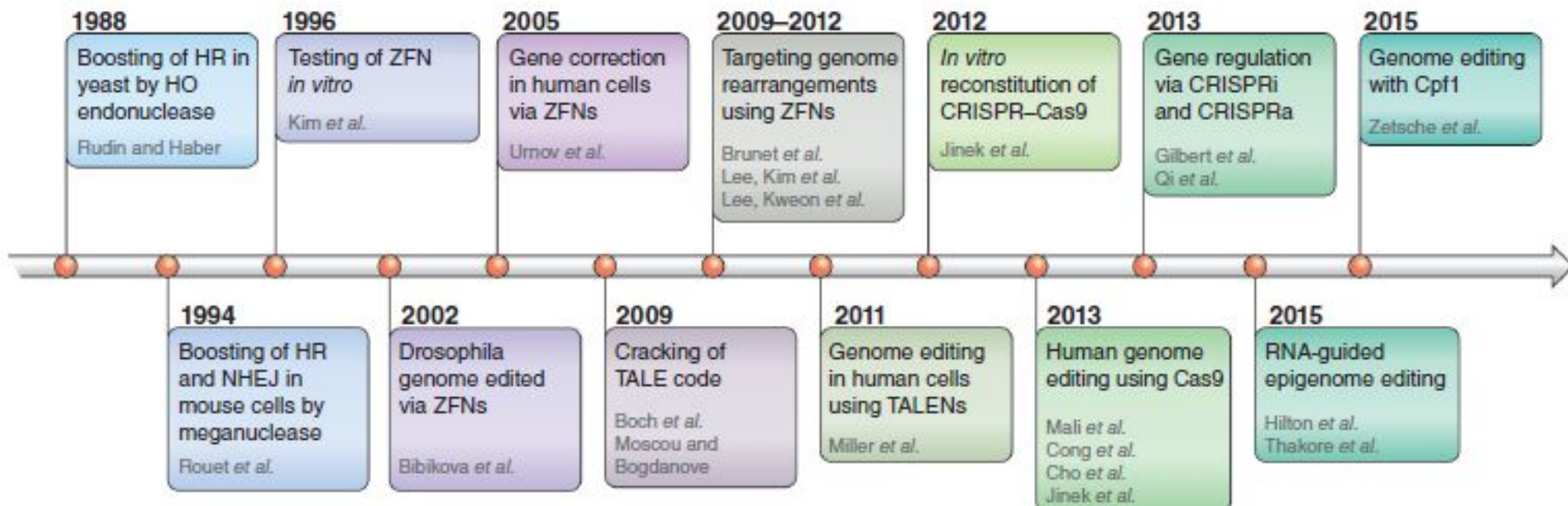
Способы улучшения системы

1. Направленный мутагенез Cas9 для минимизации неспецифического связывания с ДНК.
2. Оптимизация РНК CRISPR (например, их укорачивание с 5'-конца).
3. Использование гибридов Cas9/FokI, активных только при димеризации (повышение точности в теории в два раза).
4. Превращение Cas9 в никазу – фермент, вносящий одноцепочечные разрывы, которые не могут быть залечены NHEJ. Соответственно, и ошибок в геноме меньше.

Paired Cas9 nickases



Временная шкала редактирования геномов



Дальше вправо будет еще интереснее!

Спасибо за внимание



НЕ НУЖНО ОВАЦИЙ