



Среда 26.02 в 16:00  
Конференц-зал ИЦИГ

Публичная лекция  
Константина Орищенко

# Геномная инженерия: ВОЗМОЖНОСТИ И перспективы

- Геномная инженерия – перенос большей части либо всего генетического материала из одной клетки в другую.
- Современная геномная инженерия также включает в себя стратегии и подходы направленной специфической модификации генов в геноме.
- Что можно делать с помощью методов геномной инженерии:
  - Изучать функцию генов (knock-out, fusion, мутации)
  - Изучать регуляторные элементы генов (промоторы, энхансеры, сайленсеры и др.)
  - Изучать организацию генома
  - Исправлять мутации в генах (клеточная терапия)
  - Получение трансгенных животных и генномодифицированных растений

Для этих целей использовали различные виды мутагенеза:

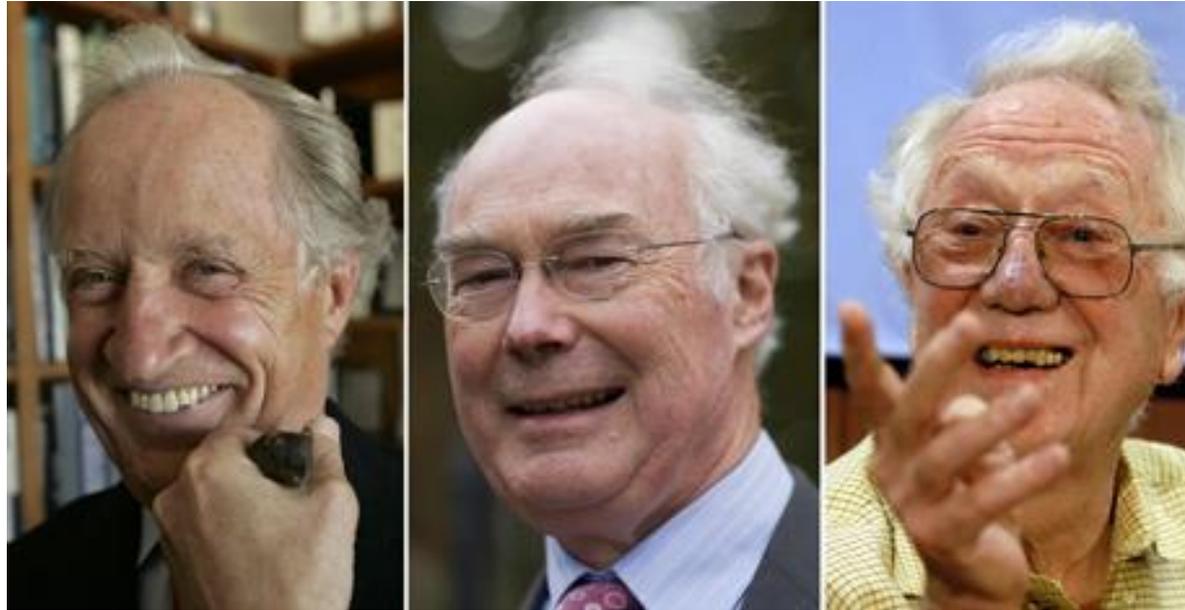
- Спонтанный
- Индуцированный
  - Химический
  - Радиационный
  - УФ-излучение
  - Мобильные элементы и др.

Основные недостатки:

- Неспецифичность (случайные события)
- Необходимо большое количество клеток для отбора целевой мутации
- Трудно воспроизвести
- Ограничение по модификациям

Поэтому многочисленные лаборатории занимались разработкой подходов направленной модификации последовательностей ДНК в геноме

# Нобелевская премия по физиологии и медицине 2007



Марио Капекки

Мартин Эванс

Оливер Смитис

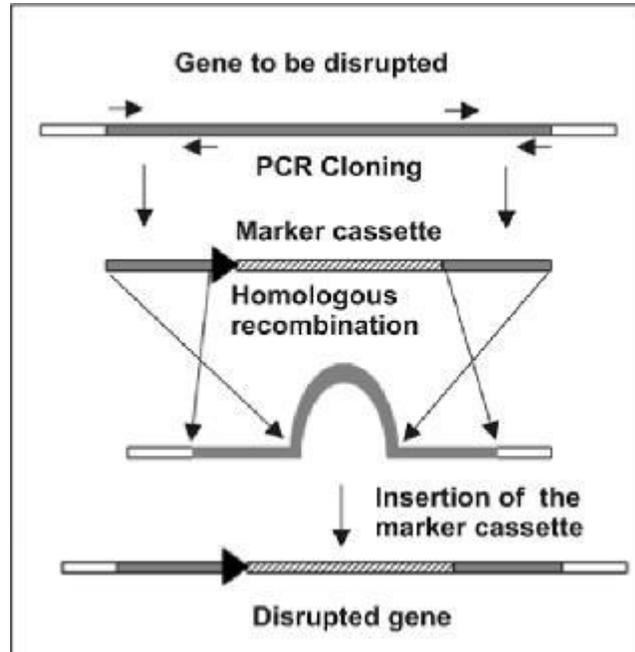
*Фото с сайта <http://news.nationalgeographic.com/>*

за “открытие принципов введения специфических генных модификаций в организм мышей посредством эмбриональных стволовых клеток” = направленная модификация генома (нокаут генов)

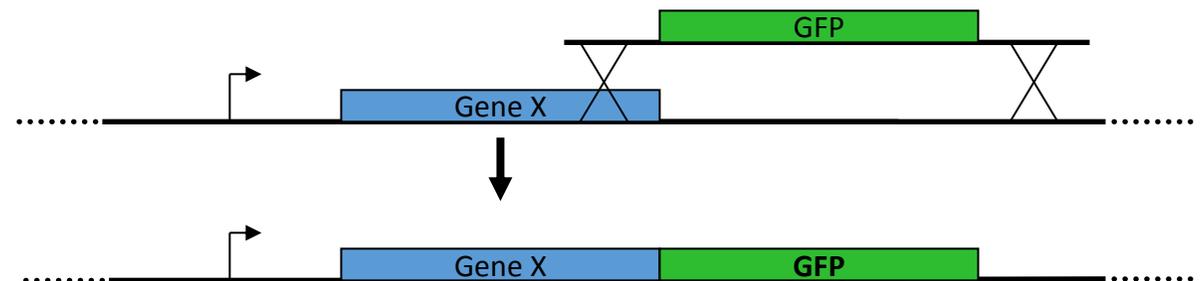


- Метод knock-out позволяет получать линии мышей у которых выключены определенные гены. С помощью него можно исследовать роль каждого конкретного гена в развитии организма и его нормальном и патологическом функционировании, а также изучать различные заболевания человека, используя нокаут для моделирования заболеваний на животных.
- В основе метода лежит явление гомологичной рекомбинации — обмена соответствующими участками между парами гомологичных хромосом.
- Капекки и Смитис показали возможность гомологичной рекомбинации с участием искусственно синтезированных фрагментов ДНК, имеющих определенную последовательность нуклеотидов, соответствующую участку целевого гена.
- Эксперименты проводились на клеточных линиях.

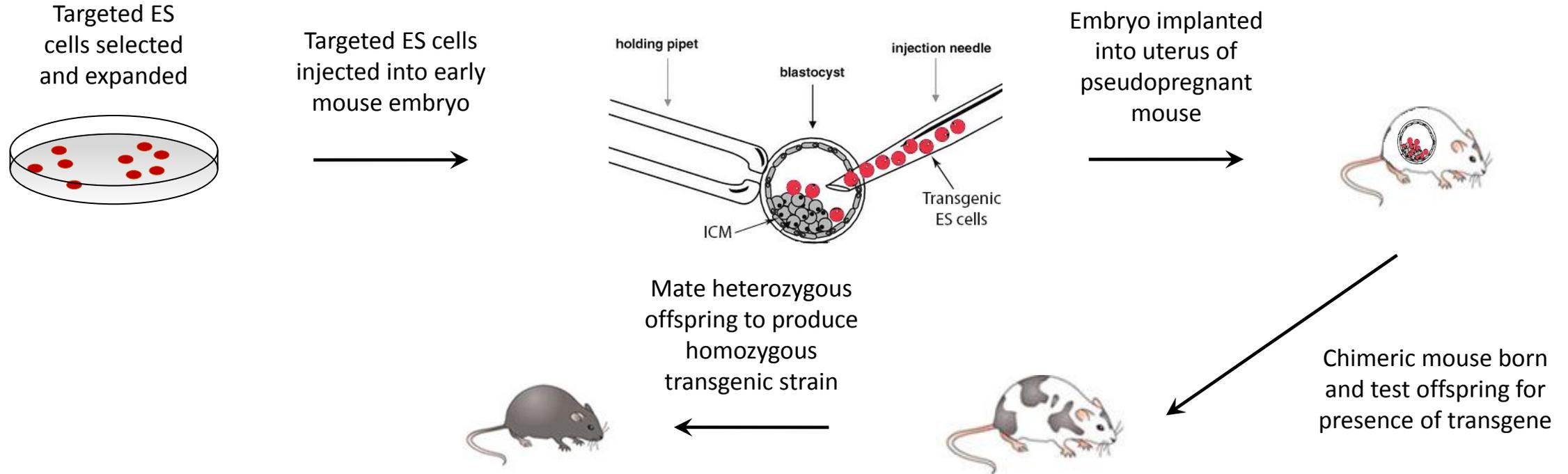
“Knock out”



“Knock in”

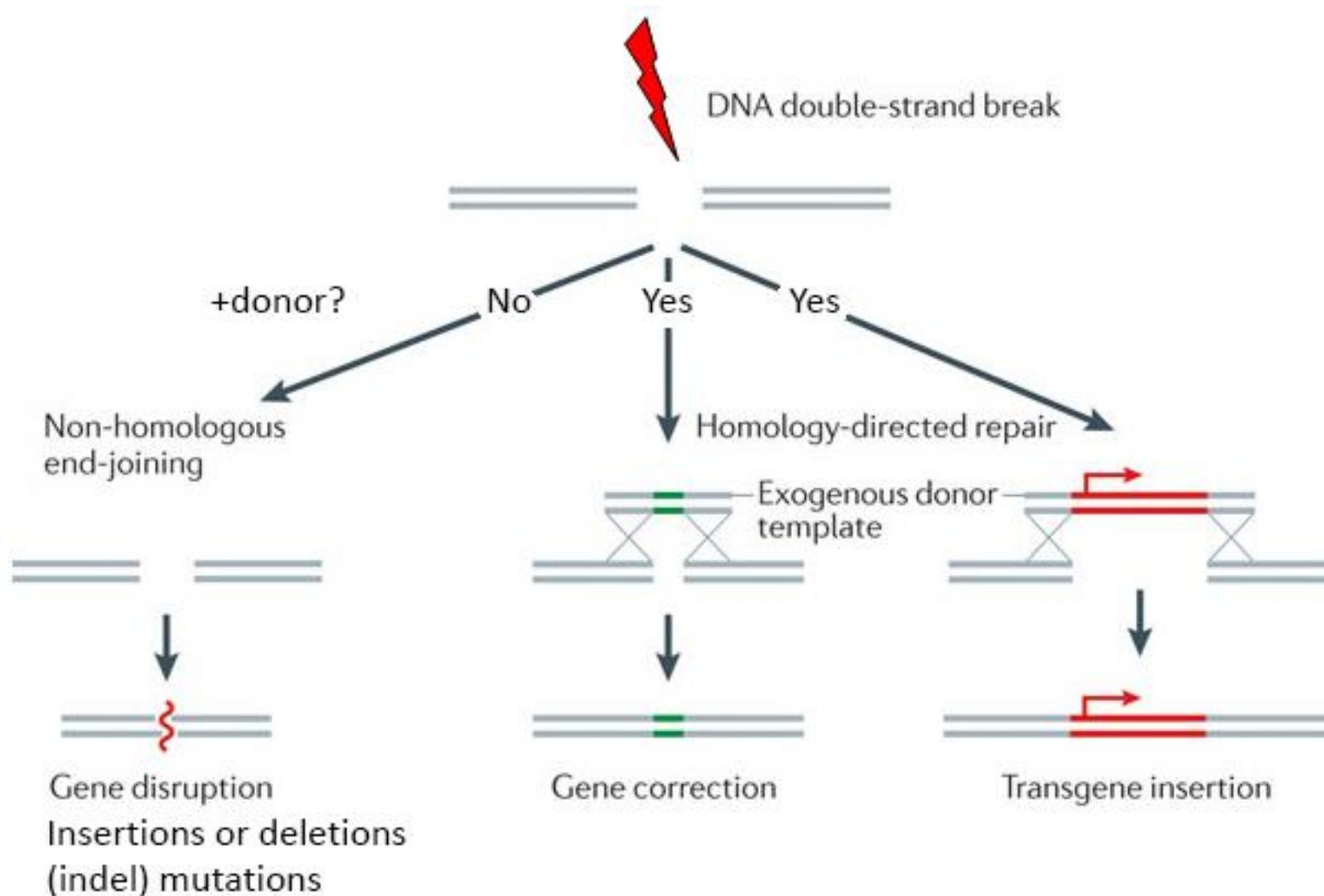


- Эванс: В начале 80 удалось идентифицировать, выделить и нарастить эмбриональные стволовые клетки мыши
- Разработал метод получения химерных мышей (состоящих из клеток, полученных от разных организмов) с использованием стволовых клеток. И модифицировал его, вводя трансгены в ЭС клетки с помощью ретровирусов



- Частота встраивания трансгена в определенное место генома очень низкая ( $10^{-6} - 10^{-9}$ ). Помимо этого часто трансгены встраиваются в случайное место в геноме
- Без использования специфических ферментов (рекомбиназ, транспозаз, интеграз и т.п.) встраивание чужеродной ДНК в геном возможно только при репарации разрывов геномной ДНК. Такие разрывы постоянно возникают в геноме в результате действия случайных факторов или действия ферментов (таких как топоизомеразы или ферменты репарации).

## Пути репарации двухцепочечного разрыва ДНК



В качестве донорной ДНК могут быть использованы:

- Олигонуклеотиды (небольшие мутации, инсерции, делеции)
- Плазмиды (большие делеции, инсерций, gene knock-in/out)

- Пути репарации двухцепочечных разрывов конкурируют в клетке и на одно событие гомологичной рекомбинации приходится 1000 - 10000 событий негомологичного соединения концов.
- Кроме того важно, что для встраивания трансгена по механизму гомологичной рекомбинации необходимо, чтобы случайный разрыв возник неподалеку (в пределах участков гомологии трансгена) от целевого места. Понятно, что такое стечение обстоятельств встречается очень редко.

Как внести двуцепочечный разрыв в строго определенном месте генома?

Эндонуклеазы используемые для геномной инженерии:

- 1) Мегануклеазы (хоуминг эндонуклеазы рестрикции)
- 2) «Цинковопальцевые нуклеазы» (нуклеазы на основе белков, содержащих домен «цинковые пальцы»)
- 3) Искусственные нуклеазы на основе TALE белков (TALEN)
- 4) РНК-направляемые нуклеазы CRISPR/Cas9 система

Мегануклеазы – искусственные аналоги природных ферментов, найденных у некоторых прокариот и водорослей. Создаются для высокоэффективного и высокоспецифичного расщепления строго определённых и заранее заданных последовательностей ДНК

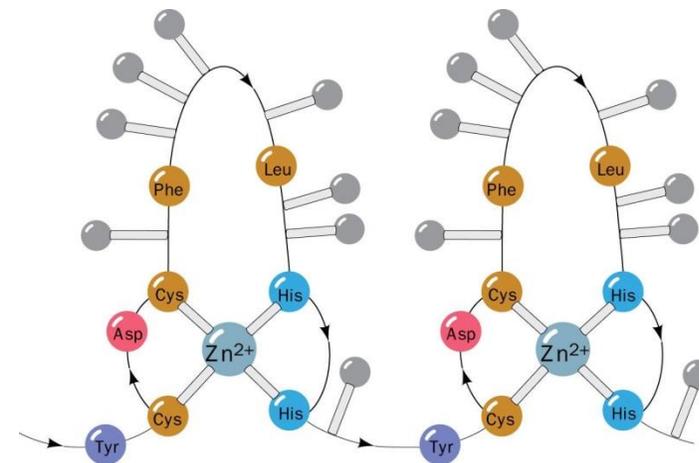
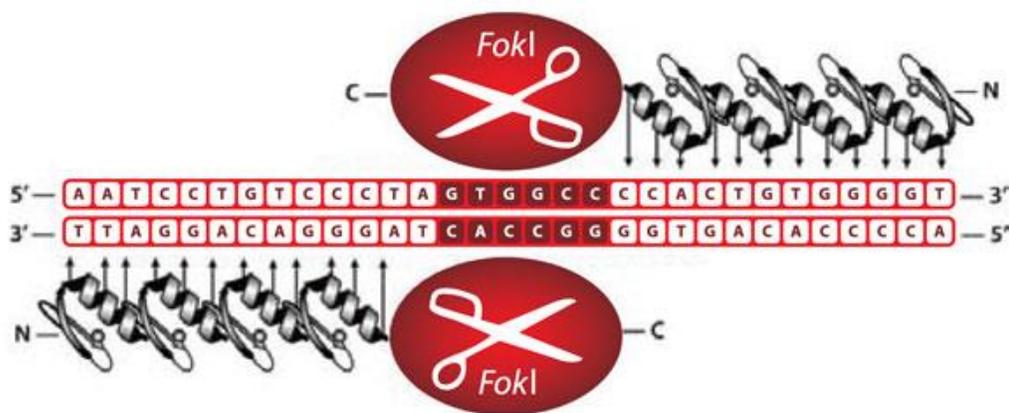
Распознают участок ДНК длиной от 12 до 40 п.н., что делает их наиболее специфичными из всех встречающихся в природе эндонуклеаз рестрикции.

# «Цинковопальцевые нуклеазы» (нуклеазы на основе белков, содержащих домен «цинковые пальцы»)

ZFN нуклеазы состоят из двух доменов – ДНК связывающего и нуклеазного (FokI)

ДНК-связывающий домен «цинковые пальцы» встречается примерно в половине транскрипционных факторов человека

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



«Цинковопальцевые нуклеазы» – представляют собой искусственные белки, состоящие из двух доменов: днк-связывающего (на основе «цинковых пальцев») и нуклеазного на основе каталитической субъединицы эндонуклеазы FokI. Каждый домен типа цинковых пальцев узнает триплет нуклеотидов, таким образом комбинируя четыре домена можно создать днк-связывающий домен, распознающий 12 нуклеотидов. Поскольку для действия FokI необходимы две субъединицы, слева и справа от требуемого места внесения двухцепочечного разрыва то у целом узнается последовательность 24 п.н., что обеспечивает очень высокую специфичность

# Недостатки «Цинковопальцевых нуклеаз»:

Не на все последовательности генома можно создать цинковопальцевую нуклеазу, из-за ограниченного набора доменов типа цинковые пальцы

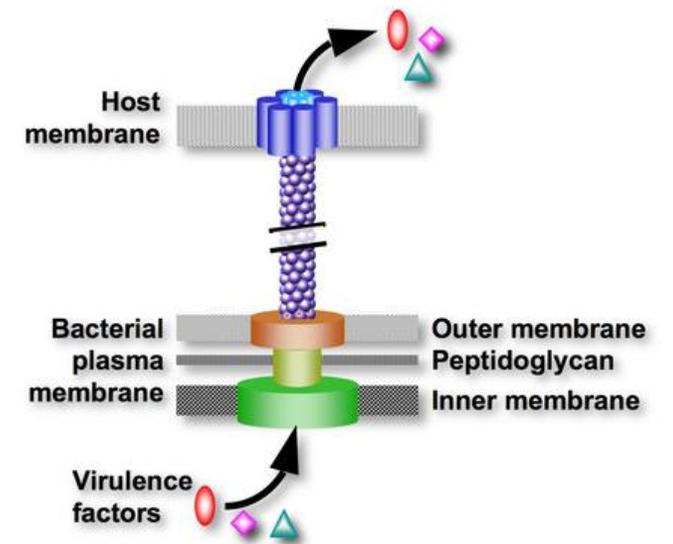
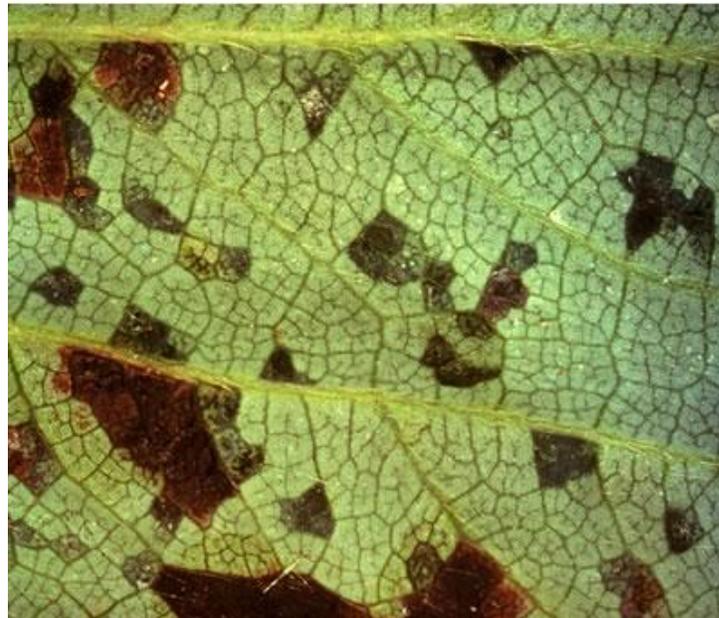
Некоторые цинковопальцевые нуклеазы обладают неспецифической активностью и вносят разрывы в незапланированных сайтах генома

Создание цинковопальцевых нуклеаз довольно долгий, трудоемкий и дорогой процесс

# Искусственные нуклеазы на основе TALE белков (TALEN)

TALE (Transcription Activator - Like Effector) белки были обнаружены у бактерий рода *Xanthomonas* поражающих рис, перец, хлопок и другие растения.

Когда бактерии заражают растение TALE и др. белки проникают в растительные клетки путем системы секреции 3-го типа (T3SS) достигают ядра и связываются с промоторами генов, активируя экспрессию генов, способствующих выживанию бактерий и распространению инфекции.

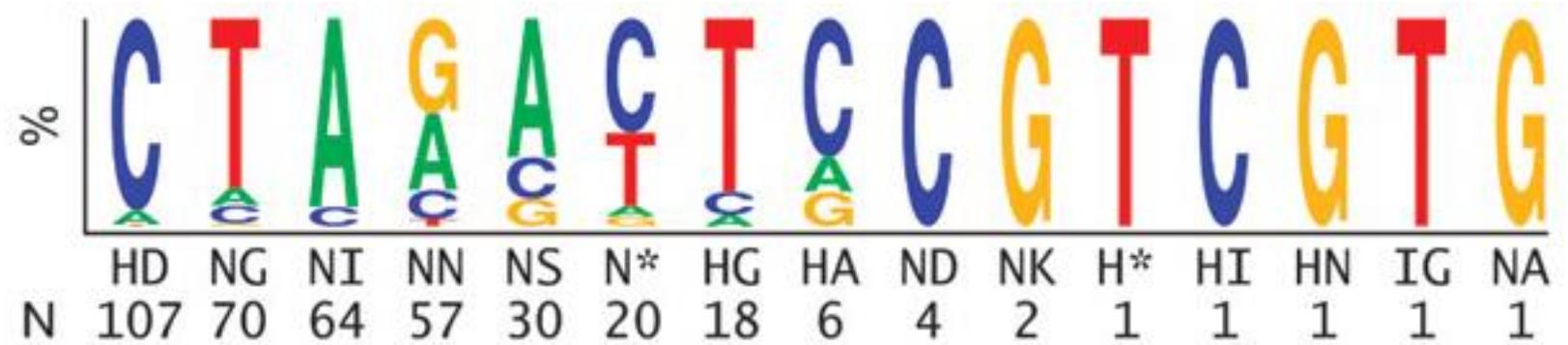
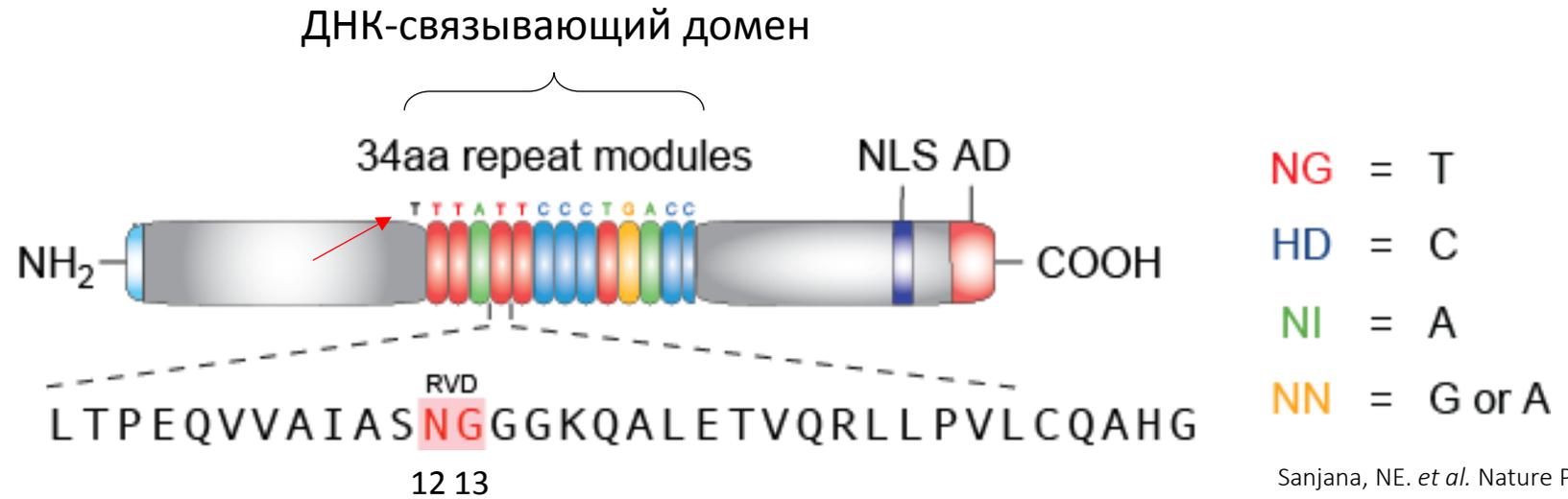


The Type III secretion system

Изображение с сайта  
<http://carbon.bio.ku.edu/research.html>

# Как TALE белки активируют экспрессию генов?

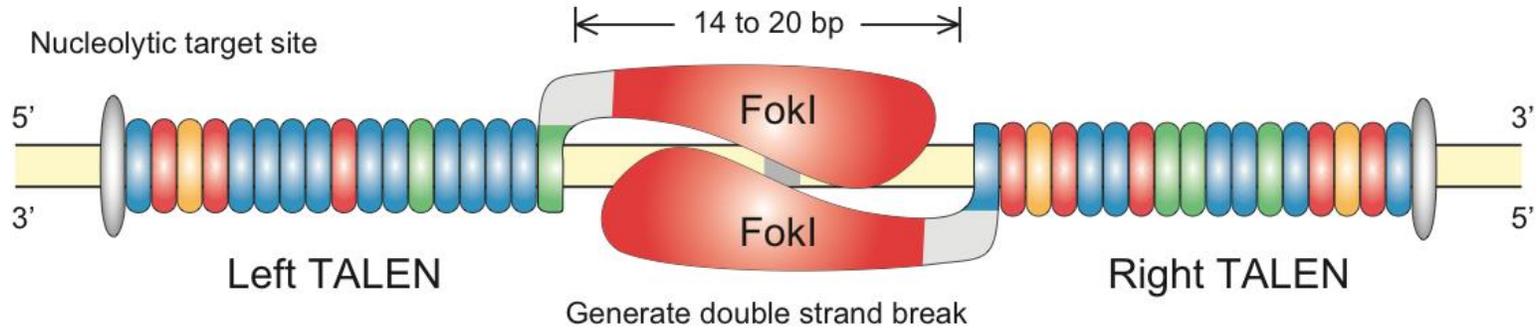
- Структура TALE белка



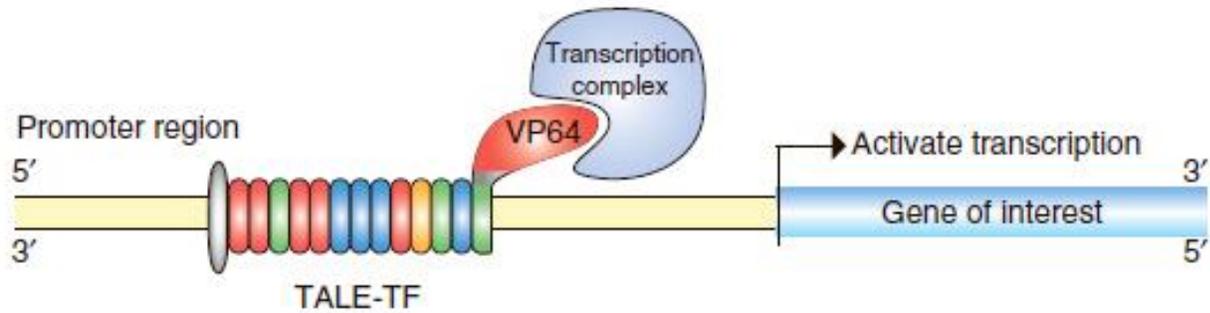
Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J. Science (2009)

N (Asn) – аспарагин, G (Gly) – глицин, H (His) – гистидин, D (Asp) – аспарагиновая кислота, I (Ile) - изолейцин

- TALENs

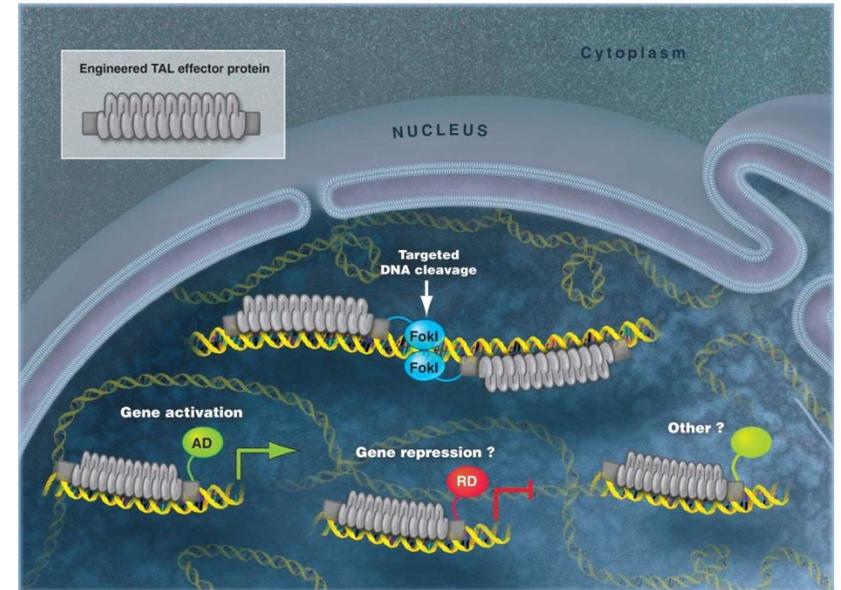


- TALE-TF



Sanjana, NE. *et al.* Nature Protocols (2012)

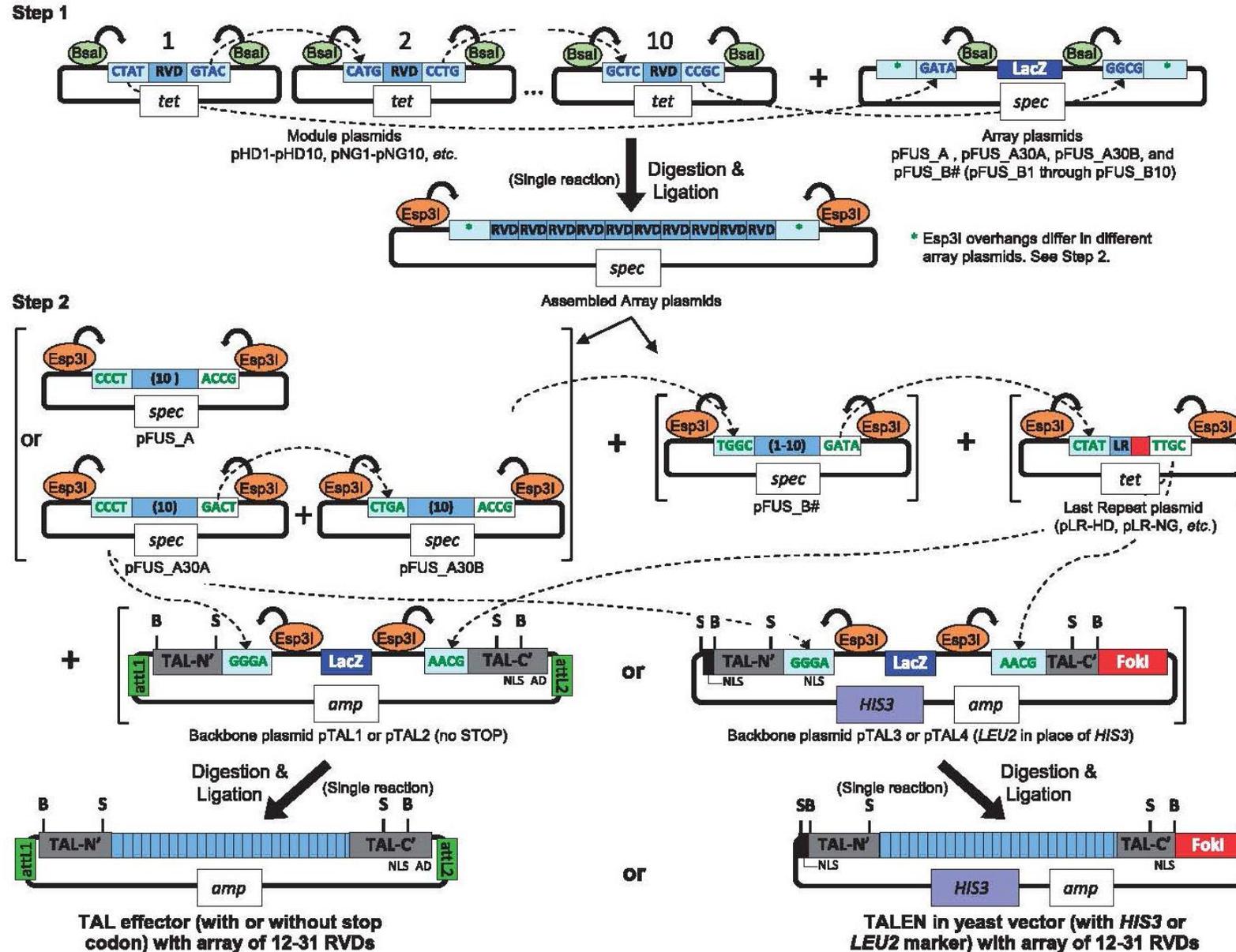
- Журнал *NATURE METHODS* признал в 2011 году TALENs методом года

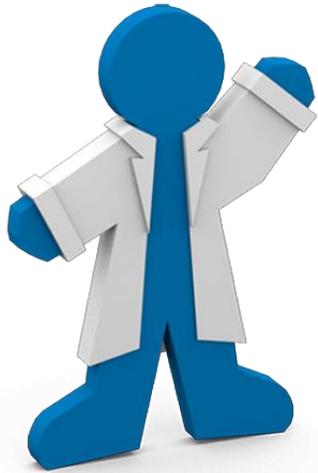


Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. Science (2011)

VP64 – активатор транскрипции из белка VP16 вируса простого герпеса

# Golden Gate assembly





<https://www.addgene.org>

### TALEN Kits:

TALEN Kit	Description	Depositing PI
<a href="#">Golden Gate TALEN 2.0</a>	Golden Gate cloning method. Validated in multiple organisms.	<a href="#">Dan Voytas</a> <a href="#">Adam Bogdanove</a>
<a href="#">Joung Lab TAL Effector Engineering Reagents</a>	Assembly via serial ligation. Validated in zebrafish somatic cells.	<a href="#">Keith Joung</a>
<a href="#">Zhang Lab TALE Toolbox</a>	PCR/Golden Gate cloning method. Optimized for human expression.	<a href="#">Feng Zhang</a>
<a href="#">LIC TAL Effector Assembly Kit</a>	Assembly by ligation-independent cloning (LIC). Validated in human cells.	<a href="#">Veit Hornung</a>
<a href="#">Musunuru/Cowan Lab TALEN Kit</a>	Kit comprised of 834 plasmids of pre-assembled trimer and tetramer RVD domains designed for rapid TALEN assembly.	<a href="#">Kiran Musunuru</a> and <a href="#">Chad Cowan</a>

# Преимущества TALEN по сравнению с «Цинковопальцевыми» нуклеазами:

Можно сконструировать практически на любую последовательность в геноме

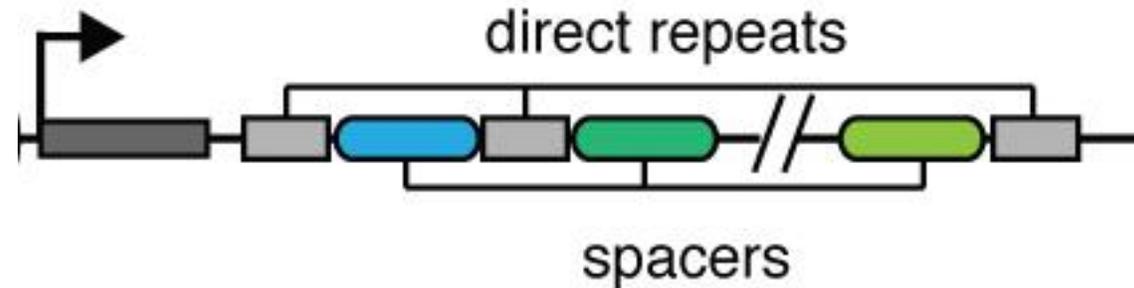
Более эффективны, выше уровень трансгеноза

Уровень неспецифической активности значительно ниже

Процесс создания TALEN нуклеазы занимает значительно меньше времени (1-2 недели), менее трудоемкий и значительно дешевле

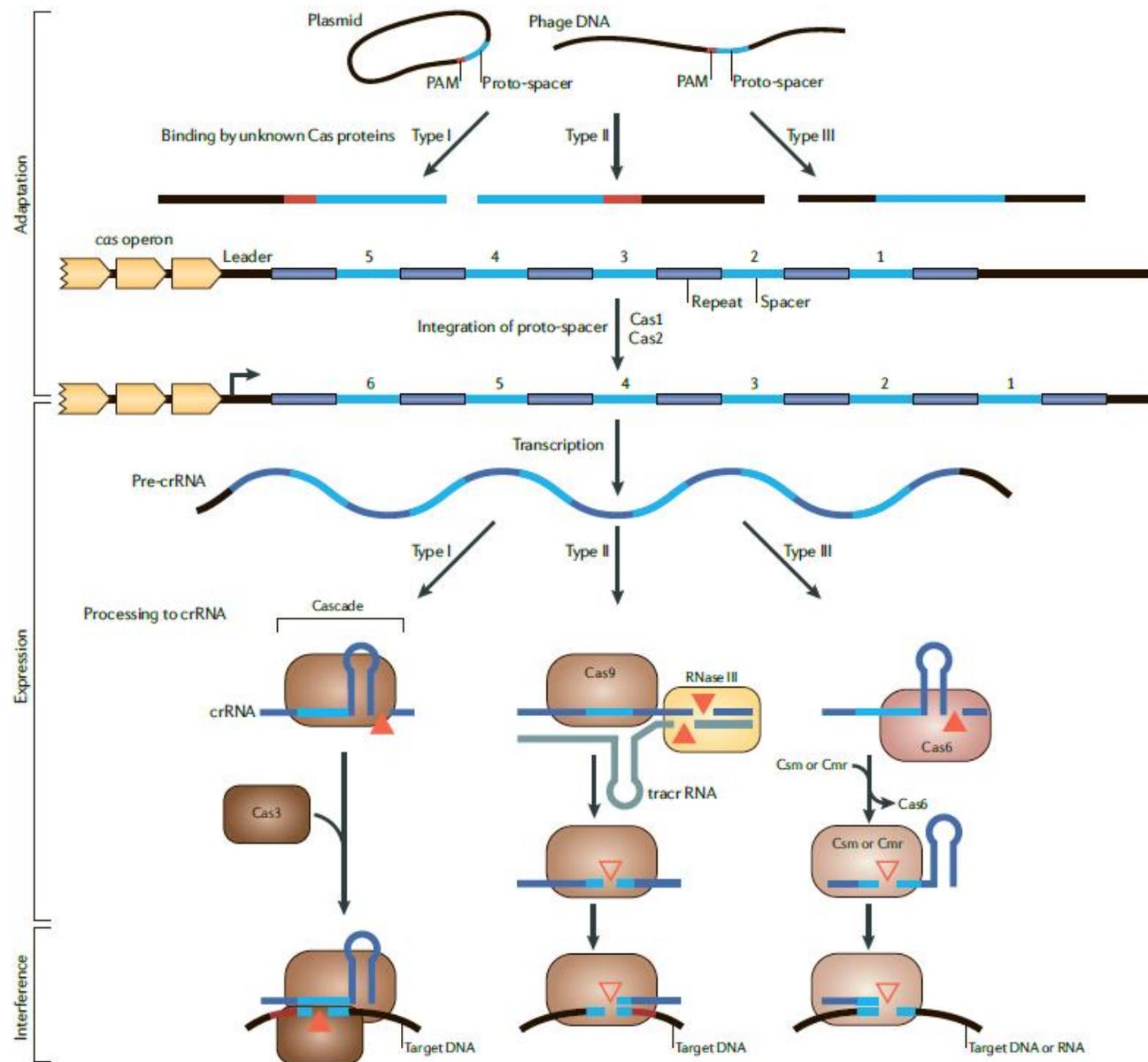
## РНК-направляемые нуклеазы CRISPR/Cas9 система

- CRISPR (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) — это кластеризованные регуляторные разделенные промежутками короткие палиндромные повторы или участки ДНК, содержащие множественные повторы, разделенные уникальными участками — спейсерами
- Cas – **CRISPR Associated** гены



- CRISPR были обнаружены в конце 80-ых в геноме E. Coli и позднее выявлены у других бактерий (40%) и архей.
- Набор спейсеров уникален для каждого штамма
- Спейсеры соответствуют участкам из геномов разных вирусов
- CRISPR-система – адаптивный иммунитет прокариот

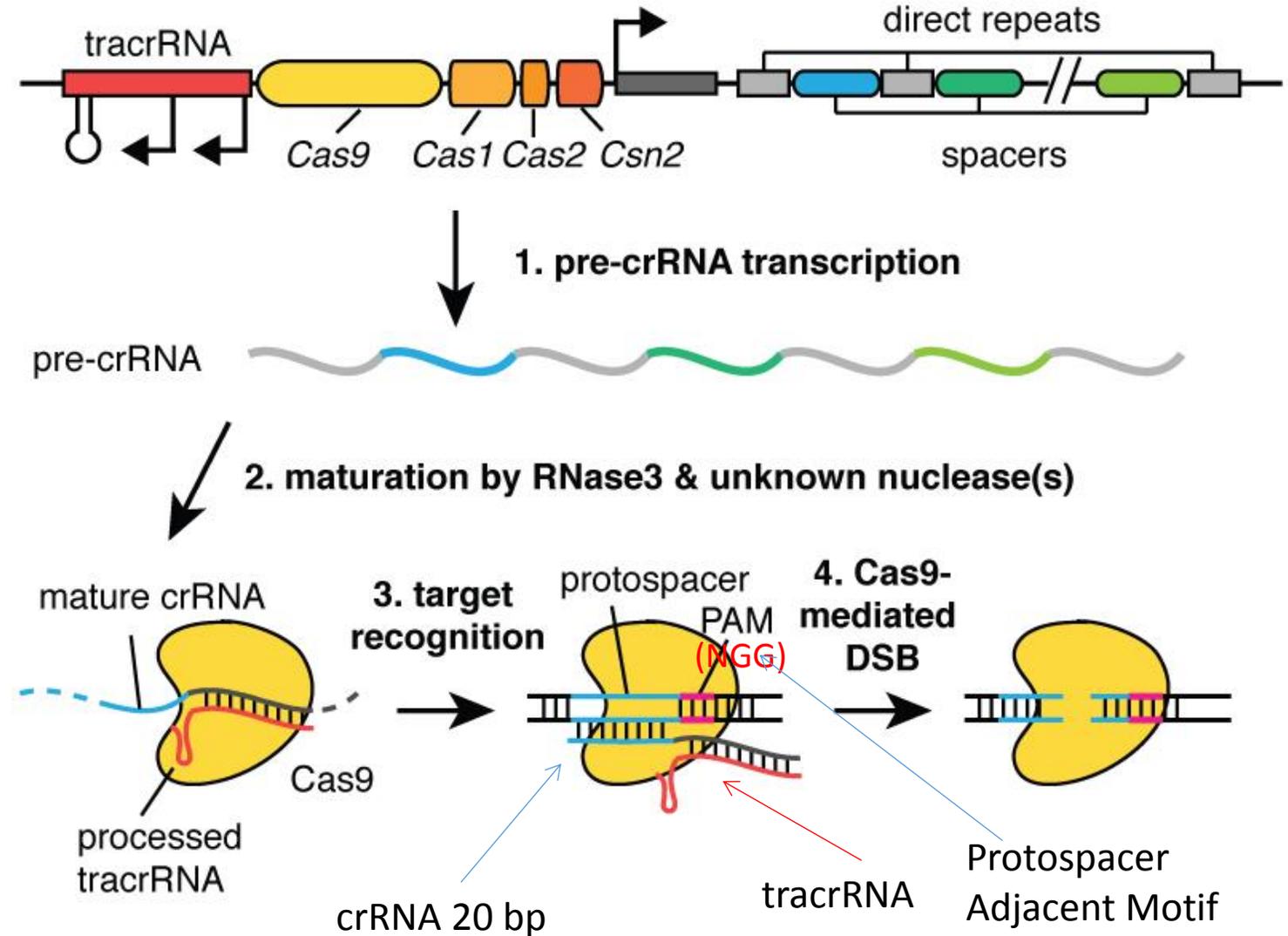
# Выявлено три типа CRISPR/Cas систем



# CRISPR/Cas система II типа

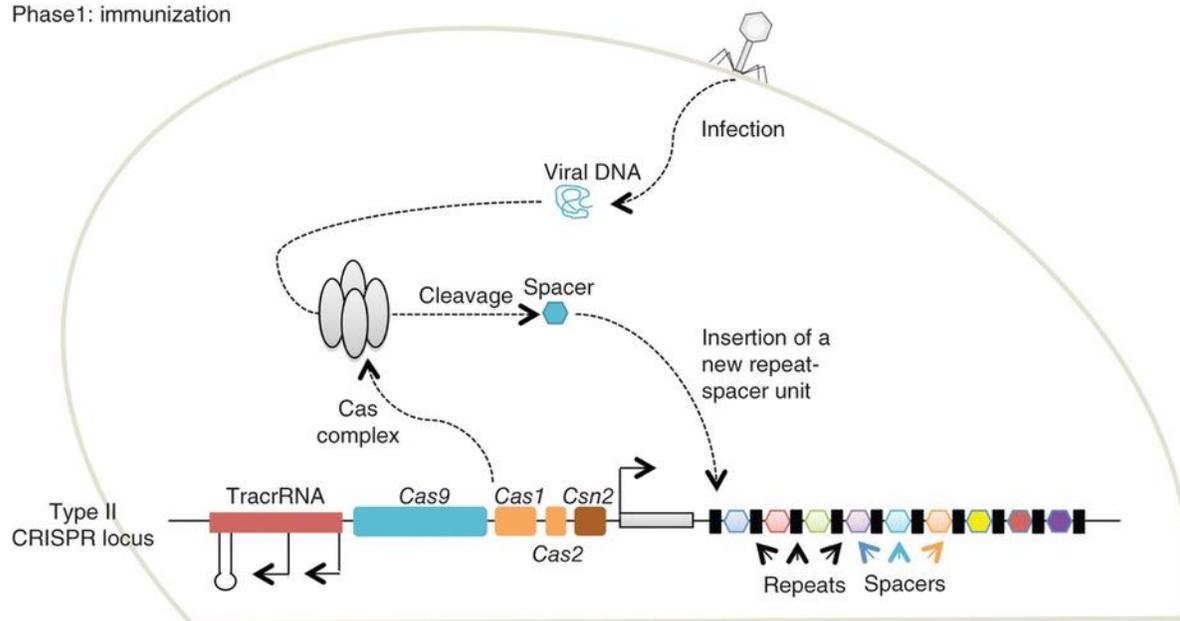
*Streptococcus pyogenes* SF370 CRISPR locus 1

- Таргетинг осуществляется за счет crRNA-tracrRNA дуплекса
- crRNA – CRISPR RNA
- tracrRNA – Trans-activating crRNA

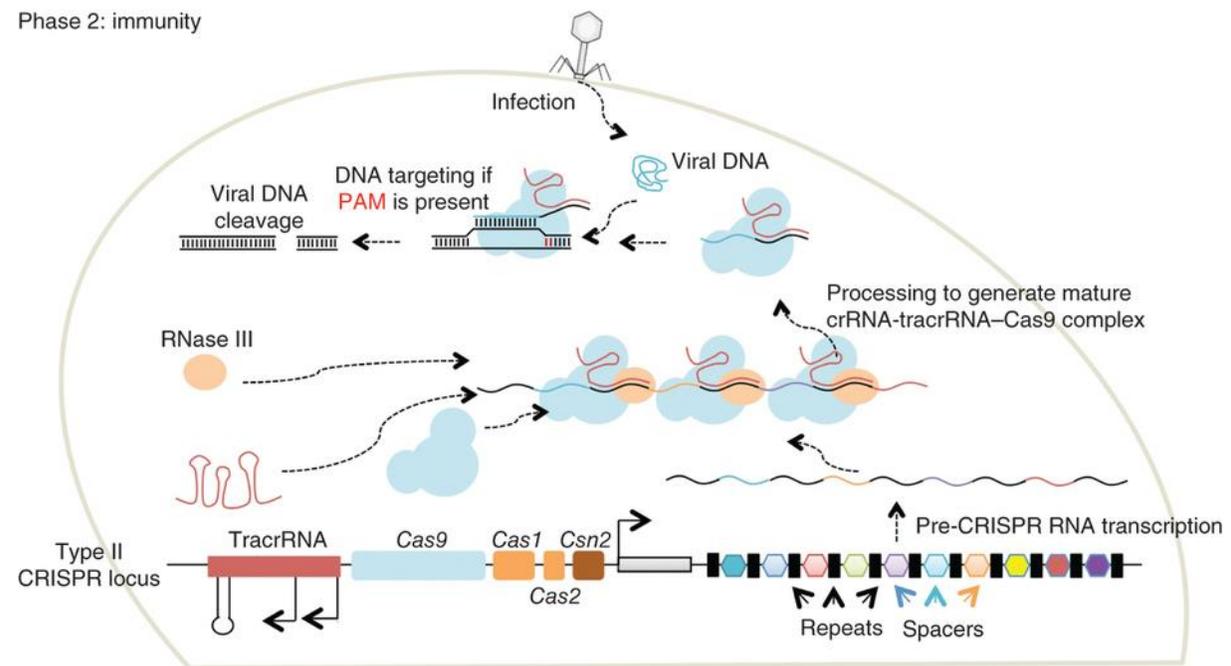


## Работа CRISPR-системы второго типа в бактериях

Phase 1: immunization

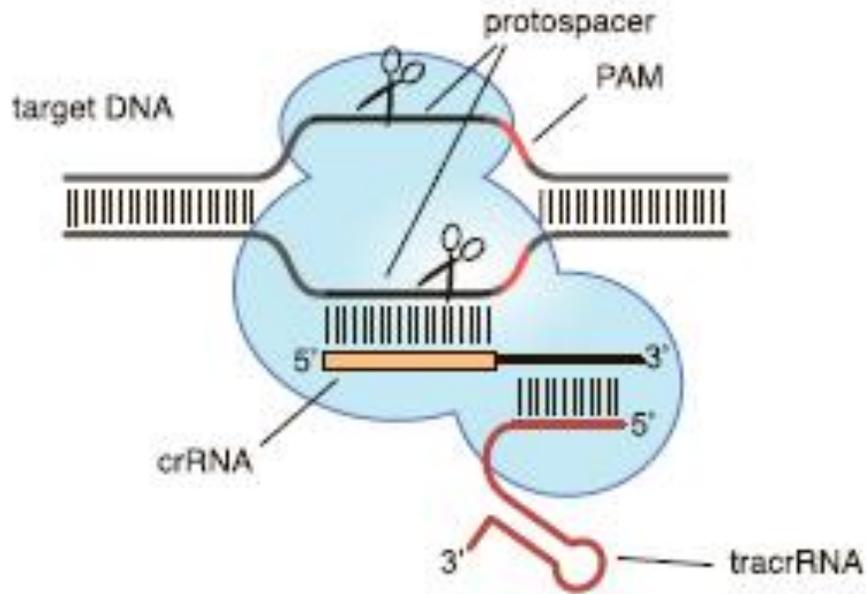


Phase 2: immunity

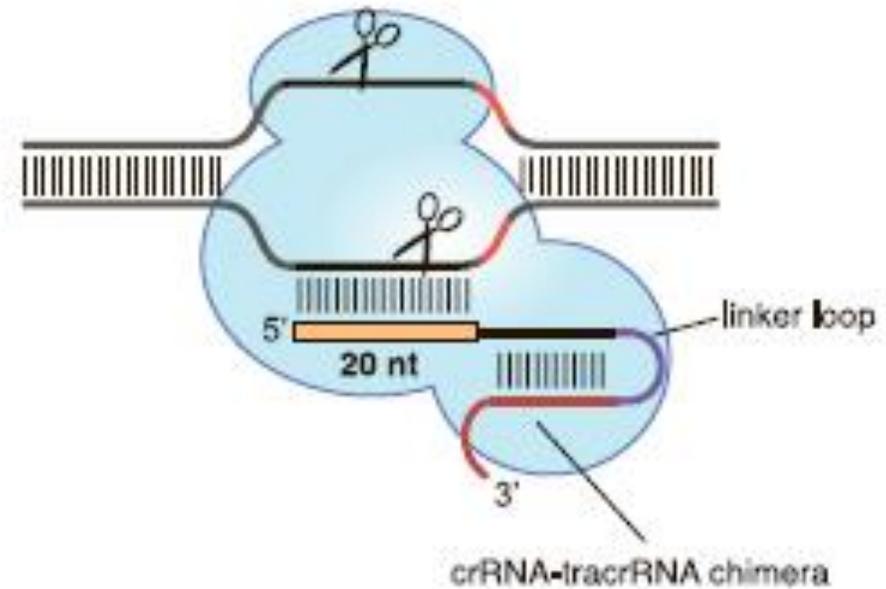


Чем меньше компонентов, тем проще работать с системой и тем выше шанс, что система заработает в нестандартных для себя условиях работы в эукариотической клетке.

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex

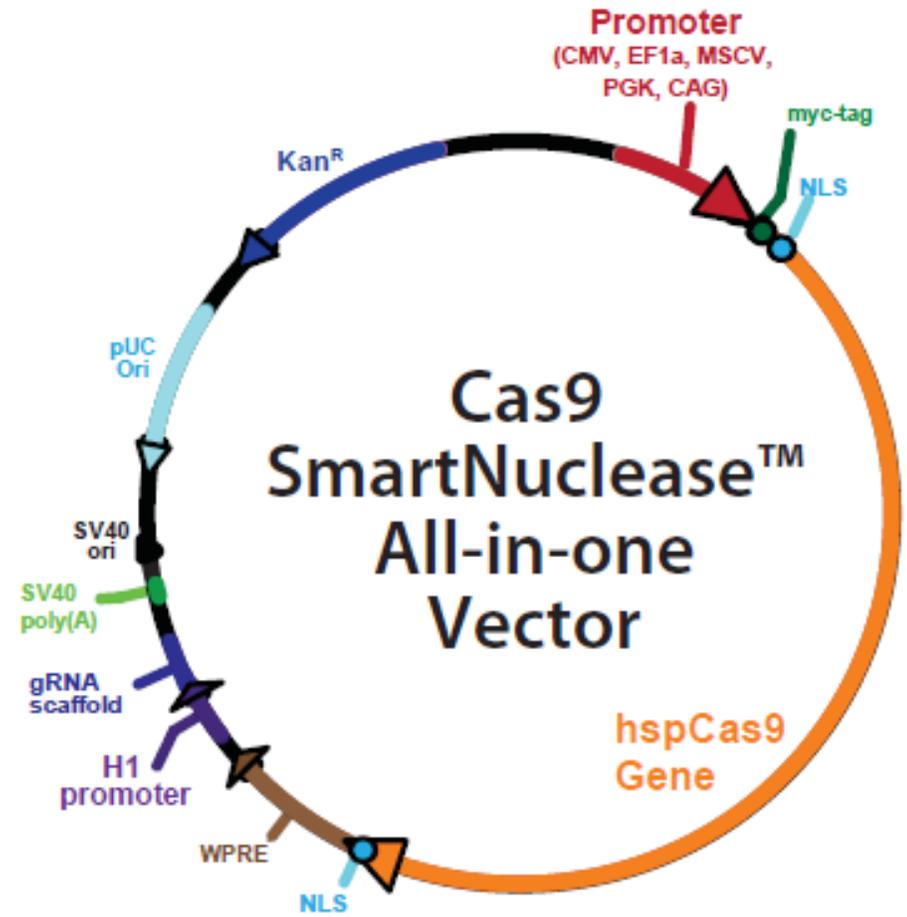


Cas9 programmed by single chimeric RNA

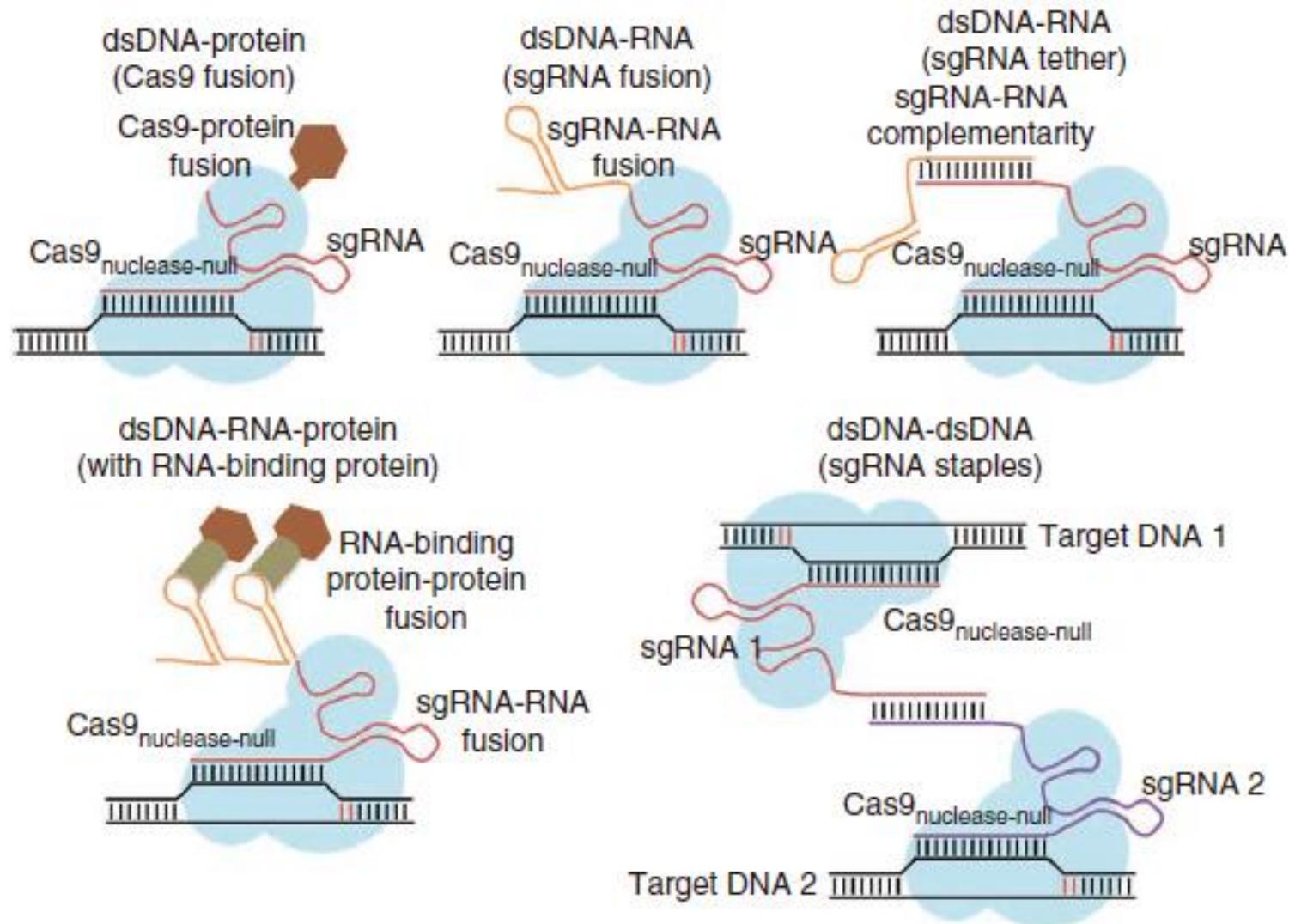


- Оптимизирован кодонный состав Cas9 нуклеазы
- Используется Guide RNA – фьюжн crRNA-tracrRNA  
crRNA – 20 п.н. специфичны к целевой последовательности  
tracrRNA – постоянная часть, входящая в состав вектора

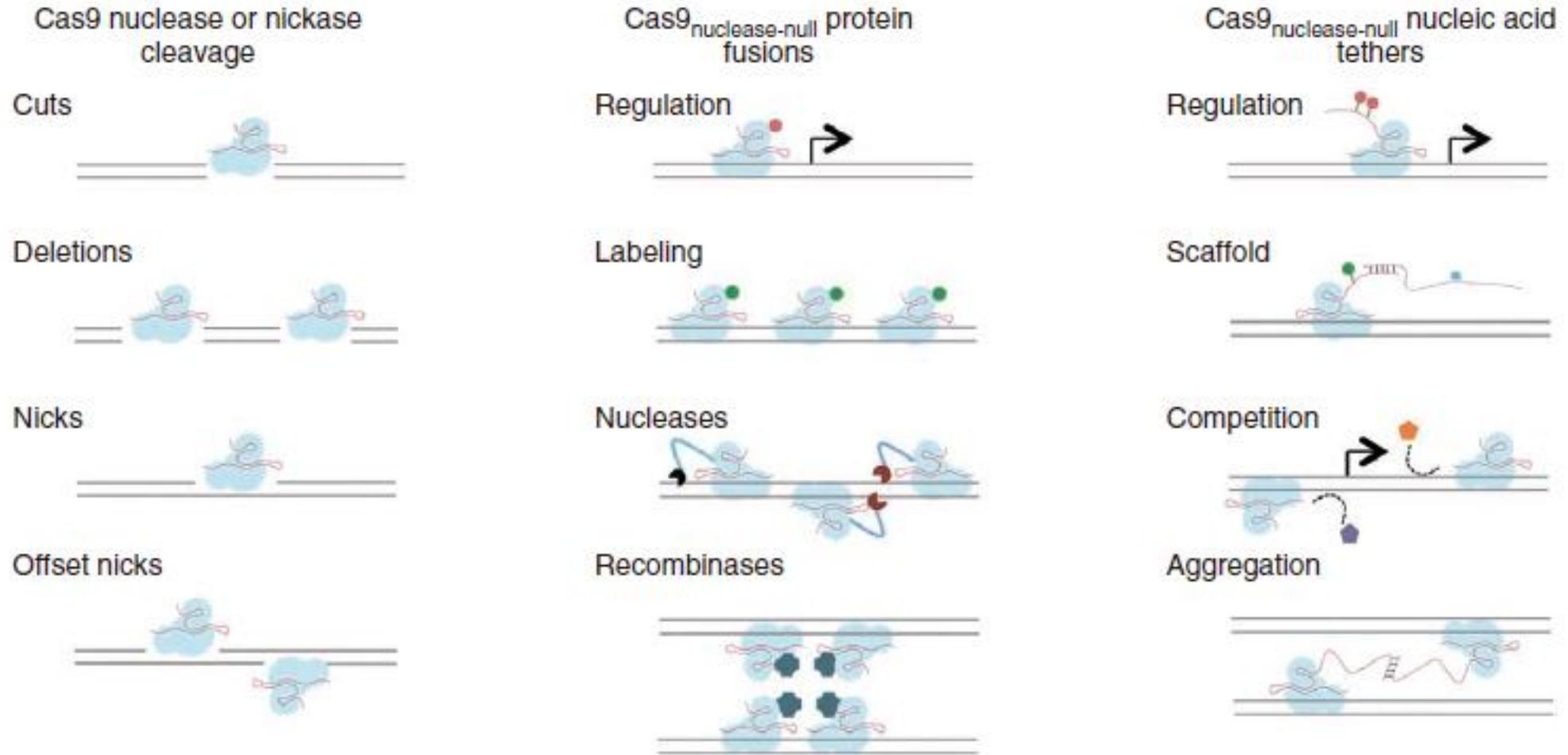
# All-in-one vectors



Помимо внесения двухцепочечных разрывов система CRISPR/Cas9 позволяет осуществлять специфическую локализацию белков, РНК и ДНК

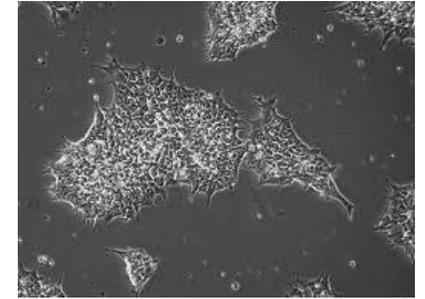
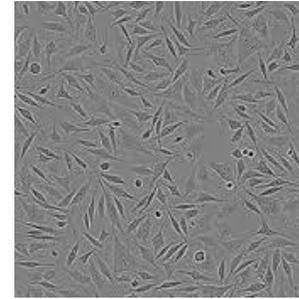
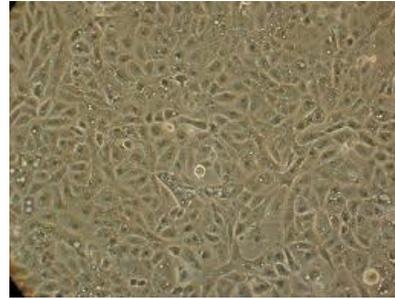
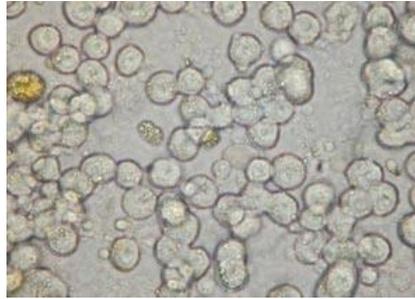


# Способы применения CRISPR/Cas9 системы



## Системы направленной модификации генома могут применяться на:

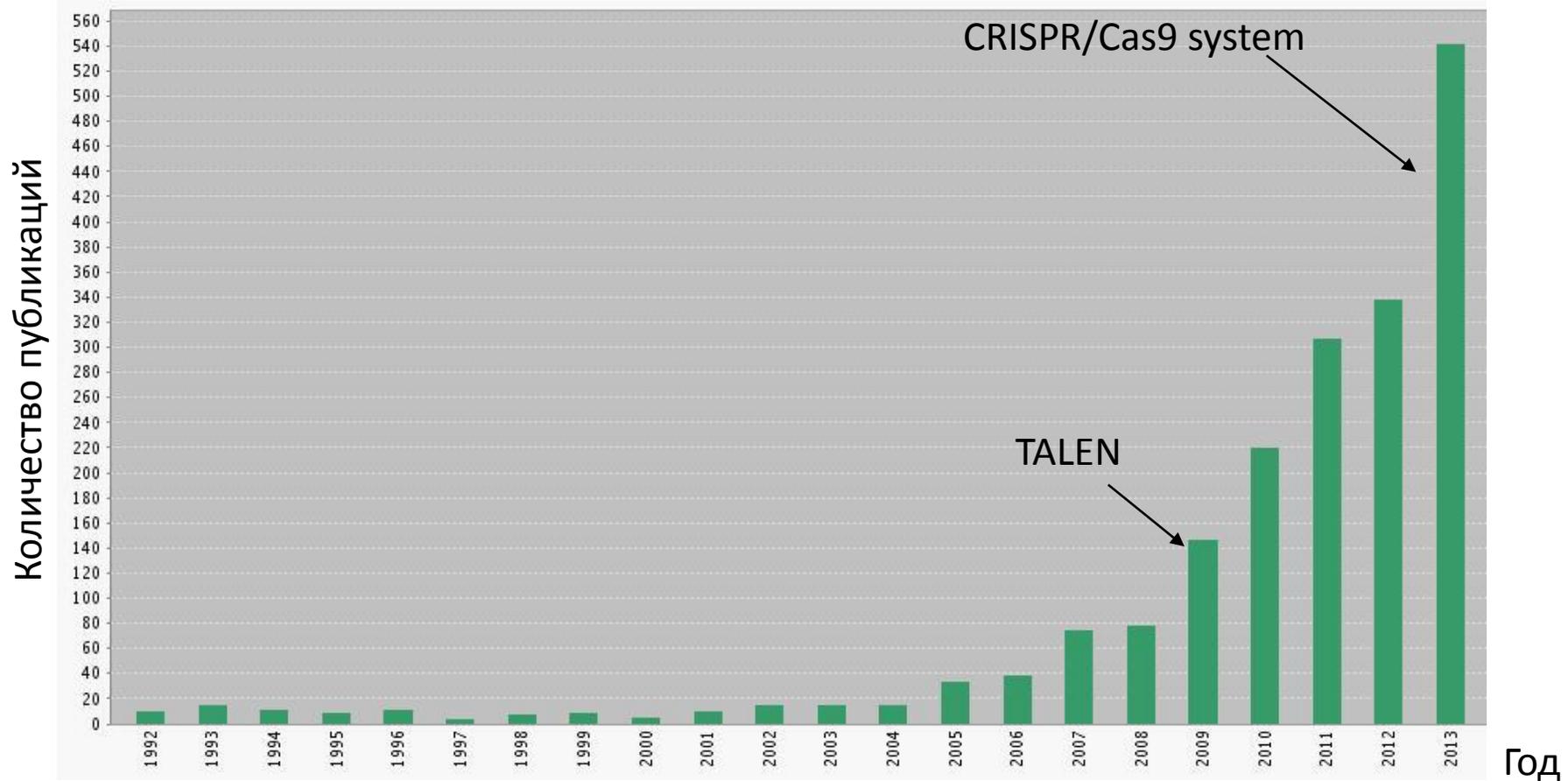
- Клеточных линиях



- Животных, растениях, насекомых



# Публикации в которых упоминаются искусственные нуклеазы



Поиск проводился в базе данных Web of science по статьям опубликованным с 1990 по 2013 год по ключевым словам – TOPIC: (TALEN) OR TOPIC: (TAL effector) OR TOPIC: (Transcription activator-like effector nuclease) OR TOPIC: (Transcription activator like effector nuclease) OR TOPIC: (TAL nuclease) OR TOPIC: (transcription activation like nuclease) OR TOPIC: (zinc finger nuclease) OR TOPIC: (ZFN) OR TOPIC: (meganuclease) OR TOPIC: (CRISPR-Cas9 system) OR TOPIC: (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat) OR TOPIC: (CRISPR/Cas9 system) NOT AUTHOR: (talen) NOT AUTHOR: (zfn) NOT AUTHOR: (talens) OR TOPIC: (RNA-guided nucleases)

# Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs

Sandra R Bacman, Siôn L Williams, Milena Pinto, Susana Peralta & Carlos T Moraes

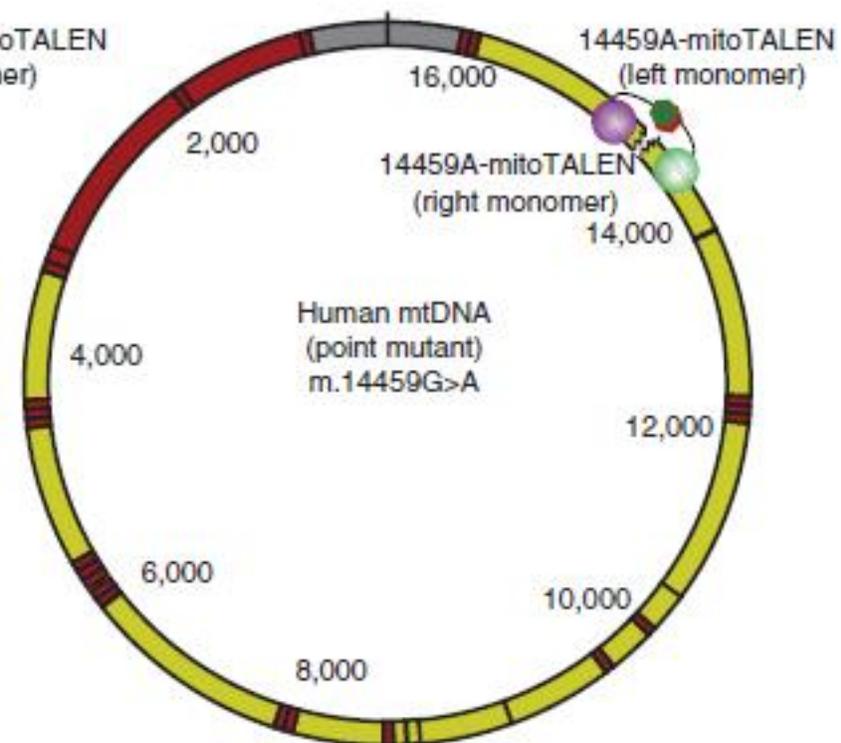
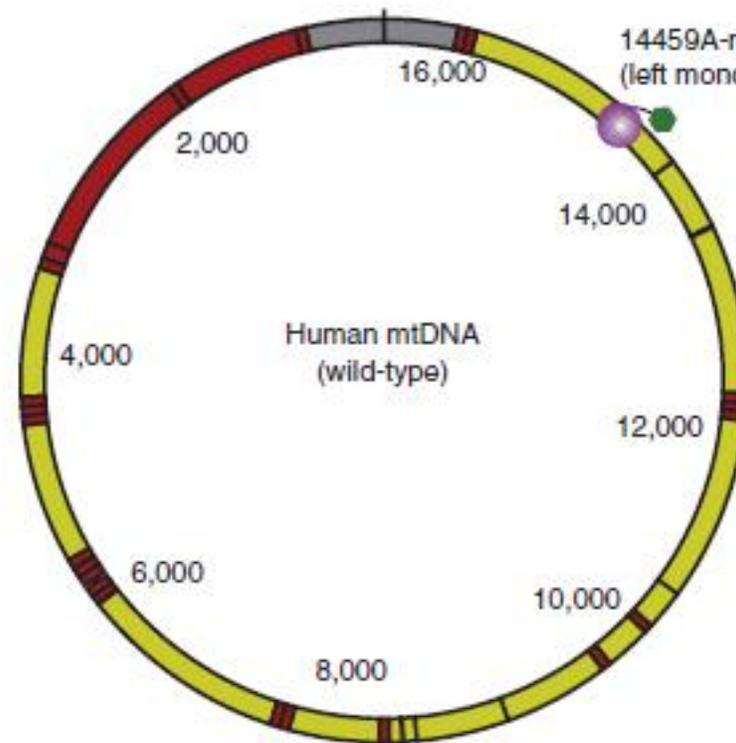
[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding author](#)

*Nature Medicine* **19**, 1111–1113 (2013) | doi:10.1038/nm.3261

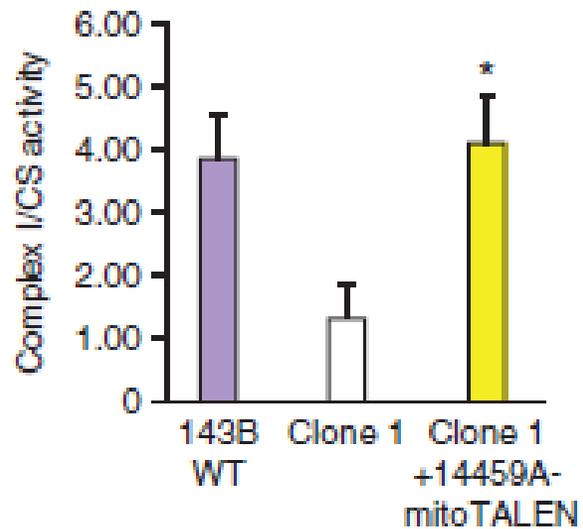
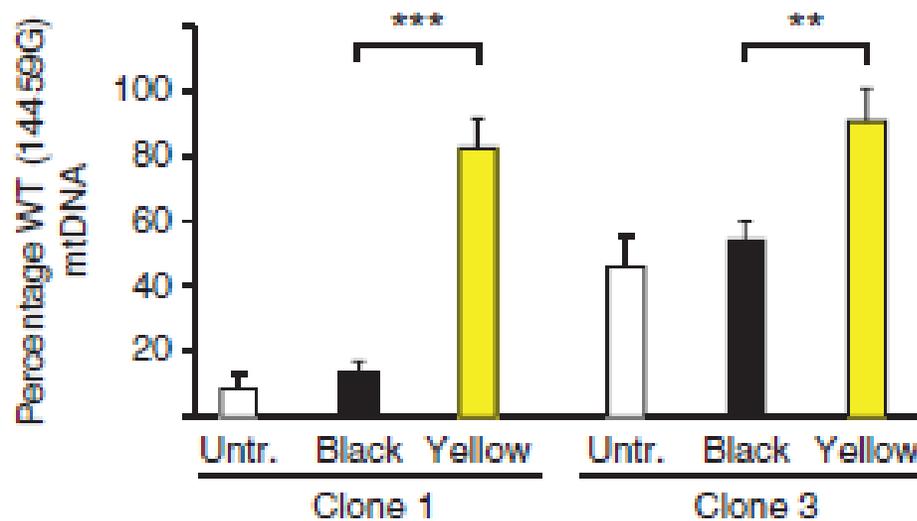
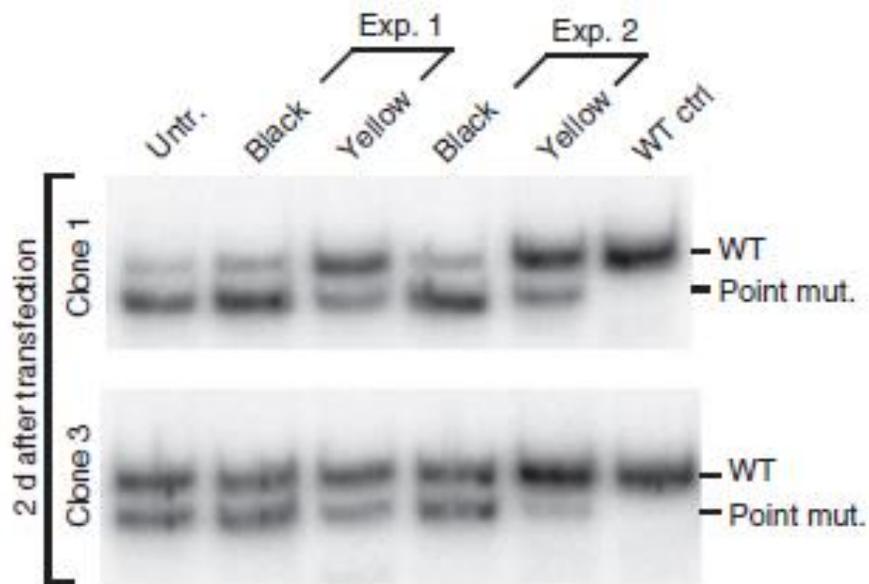
Received 13 March 2013 | Accepted 20 May 2013 | Published online 04 August 2013

Mitochondrial diseases are commonly caused by mutated mitochondrial DNA (mtDNA), which in most cases coexists with wild-type mtDNA, resulting in mtDNA heteroplasmy. We have engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs) to localize to mitochondria and cleave different classes of pathogenic mtDNA mutations. Mitochondria-targeted TALEN (mitoTALEN) expression led to permanent reductions in deletion or point-mutant mtDNA in patient-derived cells, raising the possibility that these mitochondrial nucleases can be therapeutic for some mitochondrial diseases.

# MitoTALENs



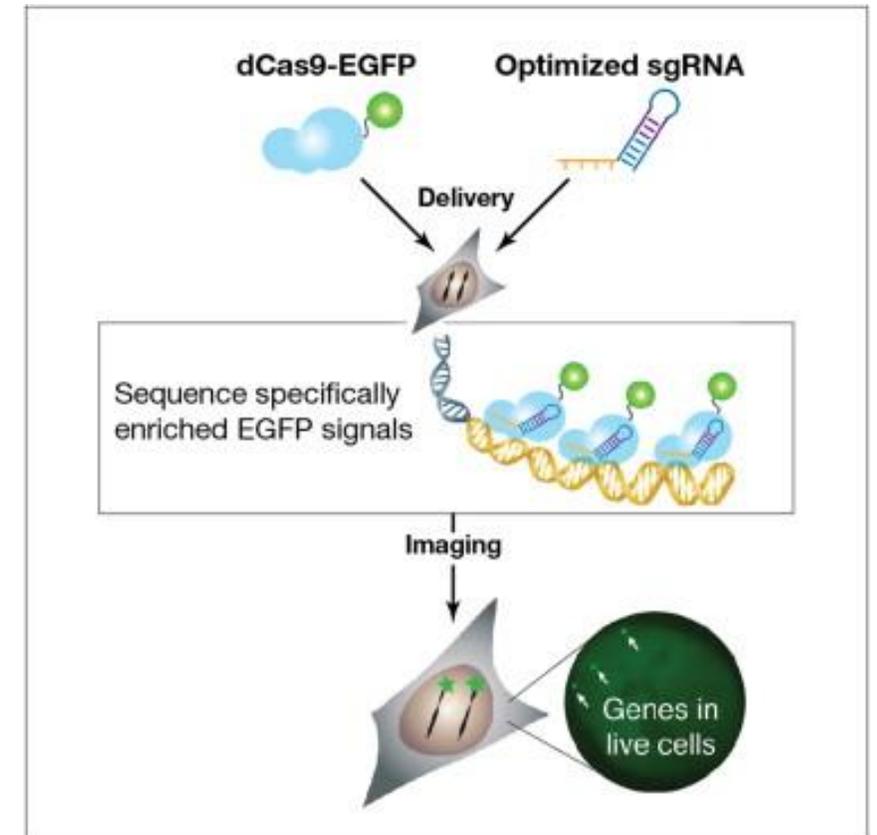
## Элиминация 14459A мутантной мтДНК



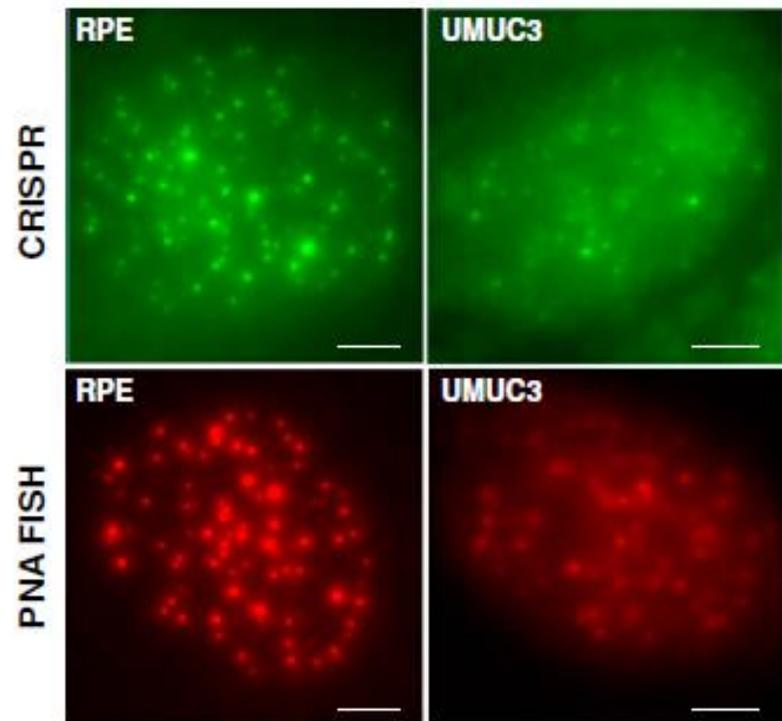
# Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System

Baohui Chen,<sup>1</sup> Luke A. Gilbert,<sup>2,7</sup> Beth A. Cimini,<sup>3,4</sup> Joerg Schnitzbauer,<sup>1</sup> Wei Zhang,<sup>1</sup> Gene-Wei Li,<sup>2,7</sup> Jason Park,<sup>2,5</sup> Elizabeth H. Blackburn,<sup>3</sup> Jonathan S. Weissman,<sup>2,6,7,8</sup> Lei S. Qi,<sup>2,5,8,\*</sup> and Bo Huang<sup>1,3,8,\*</sup>

- Изучение конформации и динамики нативных хромосом в живой клетке
- Данный подход совмещает гибкость использования зондов на основе нуклеиновых кислот и прижизненную визуализацию сигнала

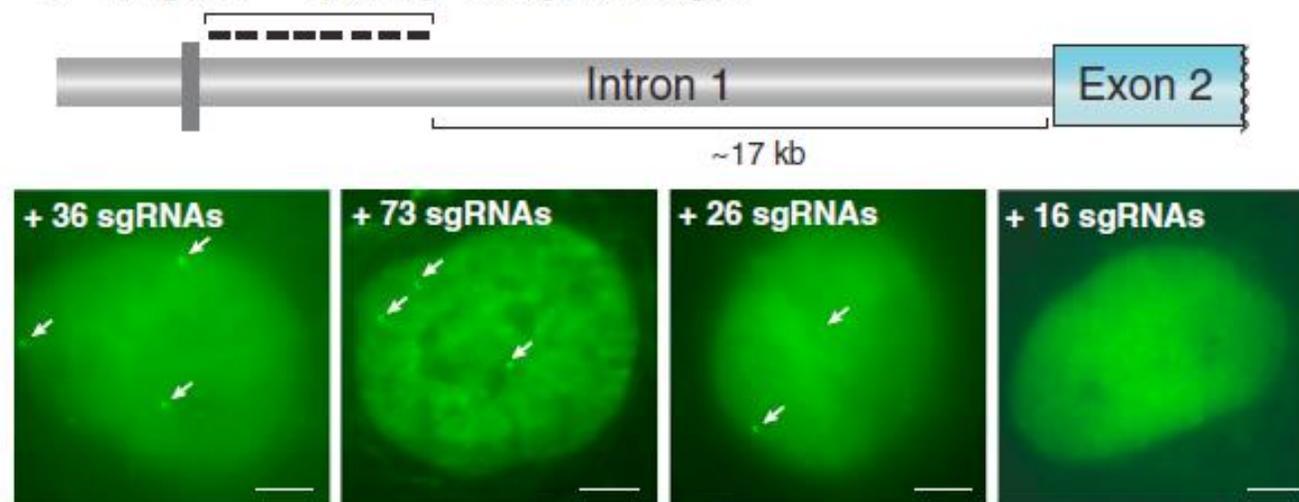


**A** Comparison of CRISPR and FISH for labeling telomeres



**A** Visualizing the non-repetitive sequence of the *MUC4* gene

16 ~ 73 sgRNA<sup>(F+E)</sup> spanning ~ 5 kb genome region



# Projects: no limit, just talent

