



БІАЛОГІЯ

УДК 577.21

ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КЛЕТКИ

А.А. Чиркин, Е.О. Данченко*Учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»*

Нобелевская премия 2012 года присуждена Д. Гердону и С. Яманака, впервые продемонстрировавшим возможность перепрограммирования соматических клеток в эмбриональное состояние, а Нобелевская премия 2020 года – Д. Дудна и Э. Шарпентьер за разработку метода редактирования геномов.

Цель работы – суммировать материалы о методах перепрограммирования и редактирования генома клеток для оптимизации преподавания молекулярной биологии и биотехнологии.

Материал и методы. *В статье использованы данные, опубликованные в международных научных журналах, а также материалы сайтов VIKIPEDIA, Vrachirf.ru и др.*

Результаты и их обсуждение. *Описаны методы перепрограммирования клеток путем переноса ядра специализированной клетки в эмбриональную стволовую клетку, слияния дифференцированной клетки и эмбриональной и применения ретровирусных векторов, несущих гены плюрипотентности. Для редактирования генома обосновано использование пары crRNA и tracrRNA для точного сайт-специфического расщепления ДНК дезоксирибонуклеазой Cas9.*

Заключение. *Приведенные результаты позволяют применять в обучении студентов первой и второй ступеней высшего образования два новых фундаментальных подхода – перепрограммирование и редактирование генома клеток – для формирования компетенций в области активного управления судьбой растительных и животных клеток.*

Ключевые слова: *перепрограммирование, редактирование, геном, молекулярная биология, биотехнология.*

REPROGRAMMING AND EDITING THE CELL GENOME

A.A. Chirkin, E.O. Danchenko*Education Establishment “Vitebsk State P.M. Masherov University”*

The 2012 Nobel Prize was awarded to D. Gerdon and S. Yamanaka, who for the first time demonstrated the possibility of reprogramming somatic cells into an embryonic state. The 2020 Nobel Prize was awarded to D. Dudna and E. Charpentier for the development of the method for genome editing.

The purpose of the work is to summarize materials on the methods of reprogramming and editing the genome of cells to optimize the teaching of molecular biology and biotechnology.

Material and methods. *The article uses data published in international scientific journals, as well as materials from VIKIPEDIA, Vrachirf.ru, sites etc.*

Findings and their discussion. *Methods of reprogramming cells by transferring the nucleus of a specialized cell into an embryonic stem cell, by fusing a differentiated cell and an embryonic one, and using retroviral vectors carrying pluripotency genes are described. For genome editing, the use of a pair of crRNA and tracrRNA for precise site-specific DNA cleavage by Cas9 deoxyribonuclease is justified.*

Conclusion. *The findings presented make it possible to use two new fundamental approaches in teaching students of the first and second stages of higher education – reprogramming and editing of the cell genome – for the formation of competencies in the field of active management of the fate of plant and animal cells.*

Key words: *reprogramming, editing, genome, molecular biology, biotechnology.*

В середине XX века многолетние исследования ученых обеспечили достижение существенных успехов в изучении проблемы перепрограммирования клеток. Начало 1960-х годов ознаменовалось блестящим экспериментом Д. Гердона, которому удалось получить головастики в результате переноса ядер дифференцированных кишечных эпителиальных клеток в яйца энуклеированной лягушки. Овечка Долли (5 июля 1996 – 14 февраля 2003) оказалась первым клонированным млекопитающим, созданным путем пересадки ядра соматической клетки в цитоплазму яйцеклетки [1; 2]. Нобелевская премия 2012 года была присуждена ученым Д. Гердону и С. Яманака, впервые продемонстрировавшим возможность перепрограммирования соматических клеток в эмбриональное состояние. Спустя 50 лет после опытов Д. Гердона С. Яманака с помощью смеси четырех факторов (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc) сумел перепрограммировать ядерную соматическую клетку у мышей в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs) [3; 4]. Сегодня получение индуцированных стволовых клеток является широко распространенным способом аутологичной клеточной терапии при заболеваниях животных и человека [5].

В том же 2012 году была опубликована статья шести авторов, двум последних из которых – Д. Дудна (Jennifer A. Doudna) и Э. Шарпентьер (Emmanuelle Charpentier) присудили Нобелевскую премию по химии 2020 года за редактирование геномов [6]. Суть работы заключалась в доказательстве того, что кластерные системы с регулярными интервалами коротких палиндромных повторов (CRISPR) / CRISPR-ассоциированные с нуклеазой Cas-9 обеспечивают бактерии и археи адаптивным иммунитетом против вирусов и плазмид за счет использования РНК CRISPR (crRNA) для подавления инвазивных нуклеиновых кислот. Защита клеток включает создание пары crRNA с транскрибирующей crRNA (tracrRNA), направляющей CRISPR-связанный белок Cas9 для введения двухцепочечных разрывов в чужеродную целевую ДНК. В работе описано семейство рибонуклеаз, которые используют пары РНК для сайт-специфического расщепления инвазивной ДНК вирусов, и обосновано применение такой системы для редактирования геномов.

Цель статьи – суммировать материалы о методах перепрограммирования и редактирования генома клеток для оптимизации преподавания молекулярной биологии и биотехнологии.

Материал и методы. При этом использованы данные, опубликованные в международных научных журналах, а также материалы сайтов VIKIPEDIA, Vrachirf.ru и др. В предложенной работе, предназначенной для преподавательской деятельности, авторы с благодарностью использовали публикации известных популяризаторов последних достижений в области медико-биологических исследований С.Ф. Багирова, И.С. Березина, К.В. Северинова. В статье представлены материалы по двум важнейшим направлениям молекулярно-генетического воздействия на клетку: перепрограммированию соматической клетки и редактированию генома клетки.

Результаты и их обсуждение. Общий смысл перепрограммирования заключается во введении в эмбриональную клетку (клетку зародыша) генетического материала в форме молекул ДНК дифференцированной клетки (клетки взрослого организма). Таким образом, полученная клетка становится плюрипотентной, способной превращаться в различные клетки данного зародышевого листка. Это позволяет подобные клетки применять для замещения поврежденных клеток органа, образованного в рамках этого зародышевого листка. Перепрограммированные клетки отличаются от тотипотентных клеток (зигота до стадии морулы), способных превращаться во все типы взрослого организма. Перепрограммирование соматических клеток осуществляют по трем основным методам: 1. Перенос ядра специализированной клетки в эмбриональную стволовую клетку. 2. Слияние дифференцированной клетки и эмбриональной. 3. Использование ретровирусных векторов, несущих гены плюрипотентности.

Методика переноса ядра обычно применяется в лабораториях, изучающих стволовые клетки [7]. Последовательность операций метода переноса ядра: ядро из клетки пациента помещают в ооцит, из которого предварительно удалили ядро → полученная гибридная клетка развивается до стадии бластоцисты → полученная бластоциста культивируется → эмбриональные клетки размножаются → после

направленной дифференцировки исследуемые (или необходимые для терапевтического использования) клеточные ростки изолируются → затем они вводятся пациенту, у которого исходно брали клетки. В результате формируется клон клеток, генетически идентичных клеткам донора, из которых возможно выращивание тканей и органов, с применением каркасов (рассасывающихся скафолдов). К. Эгган (K. Eggan) и его коллеги из Института стволовой клетки Гарварда смогли соединить взрослую клетку кожи человека с эмбриональной стволовой клеткой и повторно генетически запрограммировать полученный химерный продукт на эмбриональное состояние. В работе были использованы фибробласты, которые были слиты с человеческими эмбриональными стволовыми клетками. В результате получились гибридные тетраплоидные клетки. В одной из тысячи химерных клеток гены фибробластов вернулись в эмбриональное состояние и смогли превращаться в клетки нервной и мышечной ткани, а также в клетки волосающих фолликулов. Основная трудность метода слияния клеток состоит в предупреждении формирования тетраплоидности клеток. Применение вирусных векторов в перепрограммировании клеток предложили S. Yamanaka и Джеймс J. Thomson. Суть метода заключается в том, что в геном соматической клетки вводятся эмбриональные гены, экспрессия которых делает клетку плюрипотентной. Введение генов осуществляется с помощью ретровирусных векторов (специальных генноинженерных конструкций). В природе ретровирусы обладают ферментом – обратной транскриптазой, с помощью которой они могут встраиваться в геном клетки и экспрессировать свои гены. Последовательность операций использования вирусных векторов: на базе ретровируса получают рекомбинантный РНК-геном, включающий информацию о необходимых генах и инфицируют им клетки, выделенные из организма пациента → рекомбинантная вирусная частица взаимодействует с рецепторами на поверхности клетки пациента → в клетку проникают вирусный РНК-геном и фермент – обратная транскриптаза → обратная транскриптаза в инфицированной клетке синтезирует ДНК-копию по шаблону РНК ретровируса → двуцепочечная ДНК, синтезированная по программе вирусной РНК, транспортируется в ядро и встраивается в ДНК ядра → запускается экспрессия принесенных вирусом генов → в процессах транскрипции и трансляции образуются компоненты новых вирусных частиц и формируются продукты, с помощью которых осуществляется перепрограммирование клеток → образовавшиеся вирионы выходят из клетки → потом процесс повторяется в новых инфицированных вирусом клетках. Дальнейшие исследования показали, что можно получить индуцированные стволовые клетки из клеток печени и эпителия желудка, причем выяснилось, что стволовые клетки формируются из гепатоцитов, продуцирующих альбумин [8].

Хорошо известно, что все клетки живого организма обладают одним и тем же набором генов, но они отличаются друг от друга по типу функционирования или молчания генов. Существуют три основных типа контроля экспрессии генов: 1) метилирование цитозина, что нарушает функционирование пары Ц-Г в молекуле ДНК; 2) химическая модификация аминокислотных остатков гистонов нуклеосом (гистоновый код, эпигенетическое активирование / ингибирование экспрессии генов) и 3) некодирующие РНК – микроРНК, регулирующие экспрессию генов, и пиРНК, участвующие в регуляции мобильных элементов генома. Эти процессы могут быть связаны с перепрограммированием клеток, особенно в эмбриогенезе и опухолевой трансформации клеток.

Система иммунитета присуща многоклеточным организмам, поскольку они обладают клеточными и гуморальными средствами неспецифической и специфической защиты от попадания во внутреннюю среду организма чужеродной генетической информации [9]. Бактерии и археи не имеют такой системы защиты, как у животных, поскольку бактерии – существа одноклеточные. В 1987 году в геноме кишечной палочки *Escherichia coli* был обнаружен загадочный участок, состоящий из многочисленных повторов. Функция этого участка, названного CRISPR-локусом, долгое время оставалась непонятной. Но в 2005 году сразу три группы ученых сообщили, что разделяющие эти повторы промежуточные последовательности зачастую бывают идентичны последовательностям, найденным в геномах бактериофагов и в плазмидах. Эта находка запустила целый каскад исследований, показавших, что бактерии не беззащитны против вирусов-бактериофагов и других патогенов. Система элементов геномной последовательности, названная CRISPR (произносится «КРИСПЕР»), и ассоциированные с ней белки Cas помогают им распознавать и уничтожать чужеродный генетический материал. Упрощенная схема строения CRISPR представлена на рис. 1.

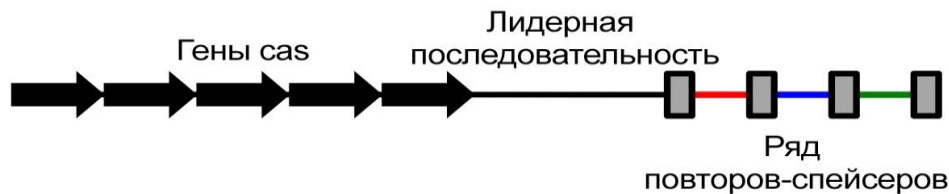


Рис. 1. Схема строения локуса CRISPR

Название локуса CRISPR «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats» переводится как «скопление разделенных регулярными промежутками коротких симметричных повторов». В каждом конкретном локусе все повторы практически одинаковы и имеют длину от 24 до 48 пар нуклеотидов. Промежутки также примерно одинаковы по длине (21–72 п. н.), но весьма вариабельны по последовательностям ДНК. Промежуточные последовательности, или спейсеры, часто происходят из плазмид и фагов. Бактерии, выжившие после атаки фага, в результате так называемой адаптации пополняют свой CRISPR за счет спейсеров, идентичных небольшим «трофейным» участкам ДНК фага. Следовательно, спейсерные последовательности массива CRISPR – это память бактерии-хозяина о вирусных инфекциях и встречах с инородным генетическим материалом, напоминающая альбом сыщика, в котором на одинаковых листах прикреплены фотографии разных преступников.

В настоящее время строение локуса CRISPR представляется следующим образом. К локусу CRISPR примыкает лидерная последовательность (длиной до 550 п. н.), а также CRISPR-ассоциированные гены (*cas*), кодирующие белки семейства Cas. Лидерная последовательность играет роль промотора, откуда начинается транскрипция массива CRISPR, то есть «переписывание» последовательности на РНК. Кроме того, возможно, что лидерная последовательность узнает белки, участвующие во встраивании новых спейсеров: как новые участки ДНК от нападавших микроорганизмов, так и новые повторы обычно встраиваются на границе между ней и CRISPR. После расщепления ДНК фага или плазмиды «трофейный» фрагмент вставляется в локус CRISPR в качестве спейсера. Затем он будет использован как шаблон для создания малых молекул crPНК. С помощью комплексов crPНК и белка Cas9 бактерия защищается от инфекций.

Теперь рассмотрим более детально вклад Д. Дудна и Э. Шарпентьер в науку, за что им присудили Нобелевскую премию [6]. Длинная молекула РНК, которая образуется после транскрипции CRISPR, разрезается на фрагменты. Они называются CRISPR РНК (crPНК), причем каждый содержит спейсер и часть повтора. В этом процессе участвует небольшая РНК, комплементарная повторам, – tracrPНК: она необходима для точной работы белка Cas9 в комплексе с ферментом РНКазой III, катализирующим разрывы длинной молекулы РНК. Затем РНКазы III отделяется и организуется комплекс двух молекул crPНК и tracrPНК с белком Cas9. Белок Cas9 является дезоксирибонуклеазой. Белок Cas9 после связывания с tracrPНК за счет изменения третичной структуры приобретает способность осуществлять двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК.

Фермент РНКазы III и белок Cas9 распознают tracrPНК, комплементарную последовательностям повторов в цельной молекуле РНК-предшественника (pre-crPНК). Расщепление, вероятно, происходит в середине повтора. Образуются crPНК, каждая из 42-нуклеотидов: 22 «хвостовых» – остаток повтора, остальные 20 – уникальный спейсерный фрагмент, который помогает белку Cas9 искать чужеродную ДНК. Итак, комплекс crPНК / tracrPНК – Cas9 обеспечивает поиск и деградацию чужеродной ДНК в два этапа: 1) спейсерные участки crPНК находят комплементарные им участки чужеродной ДНК и приносят к ним активированные Cas-белки; 2) Cas-белки вызывают их расщепление и последующую деградацию. (Эта последовательность событий напоминает РНК-интерференцию). Таким образом, crPНК выполняет роль проводника, направляющего нуклеазу к цели, за что она и получила свое другое название: «РНК-гид».

В описываемом процессе деградации чужеродной ДНК необходимо учесть возможность повреждения собственных генов бактерии. Для этого имеется механизм, согласно которому белки Cas узнают и затем деградируют опознанную РНК-гидом последовательность ДНК только при наличии после сайта-мишени короткой (от трех до девяти нуклеотидов) последовательности PAM (protospacer adjacent motif) (рис. 2).

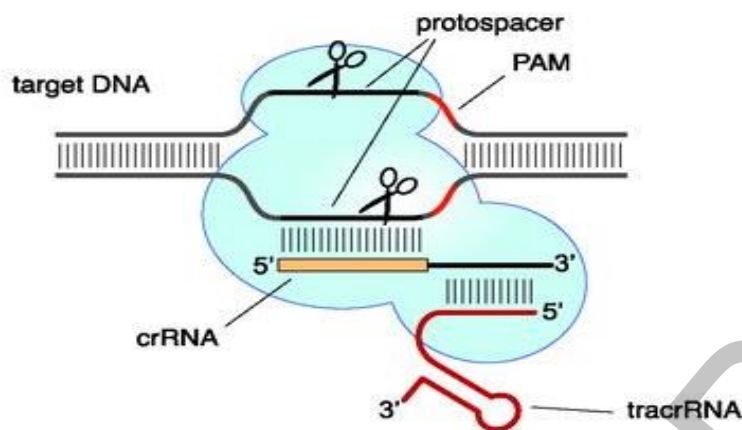


Рис. 2. Механизм точного разрезания двухцепочечной ДНК-мишени дезоксирибонуклеазой Cas9 [6]. Cas9 распознает мишень с помощью crРНК, которая удерживается в молекуле Cas9 благодаря посредничеству tracrРНК. Места разрезов обозначены ножницами. Фермент разрезает обе цепи ДНК

Широкое применение предложенного метода точного разрезания двухцепочечной ДНК основано на объединении tracrРНК и crРНК в одну цельную молекулу РНК, названную РНК гидом, или sgРНК (от англ. single-guide RNA), и изобретении вектора для клонирования этой РНК. Оказалось, что данная синтетическая sgРНК образует комплекс с белком Cas9 так же, как tracrРНК и crРНК по отдельности. Эта синтетическая молекула находит комплементарные ДНК и правильно размещает Cas9 для их точного разрезания (рис. 3).

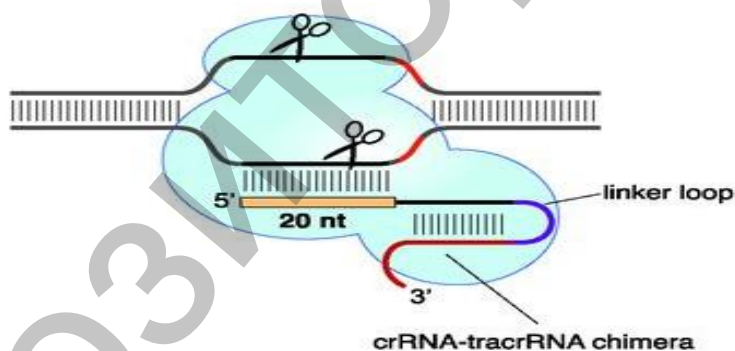


Рис. 3. Механизм точного разрезания двухцепочечной ДНК-мишени дезоксирибонуклеазой Cas9, регулируемой химерной РНК, состоящей из crРНК и tracrРНК [6]

Создание различных sgРНК обеспечило развитие прорывных исследований в рамках проблемы редактирования геномов. Создаваемый фирмами-производителями фрагмент sgРНК должен быть комплементарен участку ДНК-мишени для точного разрезания с последующей направленной модификацией генов. После того как разрез в нужном месте сделан, клетка сама стремится его ликвидировать с помощью процесса, называемого репаративным синтезом ДНК.

В современной биотехнологии широко используется высокоточный генный скальпель, состоящий из sgРНК и Cas9. Для этого применяют CRISPR-Cas9-клонировующий вектор, т.е. кольцевую молекулу ДНК, которая кодирует sgРНК и матричную РНК белка Cas9. Данные векторы предлагаются биотехнологическими фирмами для точной вставки, с возможностью вставить в нужное место участок комплементарный ДНК-мишени. В таком векторе, кроме кодирующих последовательностей, будут и управляющие, ко-

торые определяют начало транскрипции РНК. В коммерческий вектор вставляют изучаемую последовательность ДНК и ее внедряют в клетки специального лабораторного штамма кишечной палочки. В результате культивирования делящиеся клетки многократно копируют вектор (процесс молекулярного клонирования). Копируют, но «не читают», так как sgРНК и Cas9 в бактериальных клетках не синтезируются. После этого вектор выделяют из бактерий и трансформируют им клетки, геном которых подлежит редактированию. В трансформированных клетках синтезируются РНК-гид и Cas9. Их комплекс переносится в ядро и находит полинуклеотидные цепи ДНК, подлежащие точному разрезанию. За короткие сроки синтезирована огромная библиотека РНК-гидов, включающая более 100 000 различных sgРНК. С ее помощью можно направлять Cas9 на 85–95% всех последовательностей генома человека.

Заключение. Приведенные результаты позволяют использовать в обучении студентов первой и второй ступеней высшего образования два новых фундаментальных подхода – перепрограммирование и редактирование генома клеток – для формирования компетенций в области активного управления судьбой растительных и животных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gurdon, J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles / J.B. Gurdon // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1962. – Vol. 10, № 4. – С. 622–640.
2. Wilmut, I. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / I. Wilmut [et al.] // *Nature.* – 1997. – Vol. 385, iss. 661. – P. 810–813.
3. Johnson, M.H. Reprogramming rewarded: the 2012 Nobel prize for Physiology or Medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka / M.H. Johnson, J. Cohen // *Reproductive biomedicine online.* – 2012. – Vol. 25, № 6. – С. 549–550.
4. Takahashi, K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – Vol. 126, № 4. – С. 663–676.
5. Корель, А.В. Направленное перепрограммирование соматических клеток: преимущества и недостатки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (обзор литературы) / А.В. Корель, С.Б. Кузнецов // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2018. – Т. 38, № 4. – С. 21–29.
6. Jinek, M. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Issue Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity / M. Jinek [et al.] // *Science.* – 2012. – Vol. 337, iss. 6096. – P. 816–821.
7. Egli, D. Nuclear Transfer into Mouse Oocytes / D. Egli, K. Eggan // *J. Vis. Exp.* – 2006. – Vol. 1. – P. 116.
8. Aoi, T. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells / T. Aoi [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 321, iss. 5889. – P. 699–702.
9. Чиркин, А.А. Система иммунитета и здоровый образ жизни / А.А. Чиркин // *Біялогія і хімія.* – 2020. – № 4(82). – С. 3–16.

REFERENCES

1. Gurdon, J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles / J.B. Gurdon // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1962. – Vol. 10, № 4. – P. 622–640.
2. Wilmut, I. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / I. Wilmut [et al.] // *Nature.* – 1997. – Vol. 385, iss. 661. – P. 810–813.
3. Johnson, M.H. Reprogramming rewarded: the 2012 Nobel prize for Physiology or Medicine awarded to John Gurdon and Shinya Yamanaka / M.H. Johnson, J. Cohen // *Reproductive biomedicine online.* – 2012. – Vol. 25, № 6. – S. 549–550.
4. Takahashi, K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – Vol. 126, № 4. – P. 663–676.
5. Korel A.V., Kuznetsov S.V. *Sibirski nauchny meditsinski zhurnal* [Siberian Scientific Medical Journal], 2018, 38(4), pp. 21–29.
6. Jinek, M. A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Issue Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity / M. Jinek [et al.] // *Science.* – 2012. – Vol. 337, iss. 6096, pp. 816–821.
7. Egli, D. Nuclear Transfer into Mouse Oocytes / D. Egli, K. Eggan // *J. Vis. Exp.* – 2006. – Vol. 1. – P. 116.
8. Aoi, T. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells / T. Aoi [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 321, iss. 5889. – P. 699–702.
9. Chirkin A.A. *Biyalogiya i khimiya* [Biology and Chemistry], 2020, 4(82), pp. 3–16.

Поступила в редакцию 13.10.2020

Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.