

Исправляя гены

Служба по оплодотворению и эмбриологии Великобритании (HFEA) лицензировала исследование Кэти Ниакан (Институт Фрэнсиса Крика), связанное с использованием системы редактирования генома в работе с эмбрионами человека. Новость, несомненно, вызывает самые разные эмоции (особенно у людей, склонных к гиперболизации). Однако, как говорит руководитель лаборатории геномной и белковой инженерии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и лаборатории геномных технологий НГУ доктор биологических наук **Дмитрий Олегович Жарков**, никакая сенсационности тут нет: «На самом деле произошла довольно рутинная бюрократическая процедура»



Дмитрий Жарков

«В лаборатории Кэти Ниакан с 2005 года идет работа над проектом, который заключается в изучении механизмов, работающих в ранних эмбриональных клетках человека, и получении линий этих клеток для исследований. Речь идет о самых первых стадиях деления, когда только-только происходит оплодотворение, прежде, чем идет имплантация в стенку матки, — объясняет ученый. — Соответственно, нужно это не только для фундаментальной науки, но и прежде всего для лучшего понимания процессов, происходящих при искусственном оплодотворении, а в конечном итоге — для помощи во врачебном деле».

Во всем мире, безусловно, запрещены работы по клонированию человека и генетическим манипуляциям с эмбрионами в репродуктивных целях. Однако если говорить о технологиях, использующихся в исследованиях, то есть различные варианты в рамках законов и подзаконных актов. В странах, где биоэтика развита, все подобные операции с эмбрионами делаются исключительно с информированного согласия доноров.

Как говорит Дмитрий Жарков, технология геномного редактирования очень удобна, ведь она позволяет селективно изменять те или иные гены, убирая негативные мутации, которые приводят к тяжелейшим заболеваниям. Разумеется, это имеет большое будущее в медицине.

«В прошлом году ученые из Китая опубликовали статью, посвященную исправлению «поломки» в одном из генов, обуславливающей тяжелую наследственную болезнь крови — бета-талассемию, в эмбриональных клетках человека. При этом исследователи работали с клетками, которые в принципе не могут развиваться в продвинутой эмбрион: когда делают оплодотворение in vitro, иногда бывает, что два сперматозоида попадают в одну яйцеклетку и в итоге получается тройной набор хромосом, развитие не идет дальше стадии в несколько сотен клеток. Это снимало этические проблемы», — рассказывает Дмитрий Жарков.

В лаборатории же Кэти Ниакан уже было разрешение на манипуляции с эмбрионами, на получение из них отдельных клеток и клеточных линий, хранение этого материала. Сейчас, когда английские ученые захотели использовать новые технологии, то просто подали запрос на расширение этого списка. Причем, надо отметить, что лицензия была получена после двух раундов строгого рецензирования заявки.

«Речь не идет о выращивании генетически измененных людей, хотя бы потому, что технологии далеки от совершенства, их эффективность достаточно низкая, и пока не удается добиться того, чтобы изменения происходили исключительно в нужном месте, а не где-нибудь еще, и к мутации ничего лишнего не добавлялось. В принципе, подобные исследования и нужны, чтобы совершенствовать технологию, и она когда-нибудь обязательно придет в медицину», — комментирует Дмитрий Жарков.

Ни остроту зрения, ни длину ног, ни цвет глаз, по словам ученого, при этом подкорректировать не удастся, ведь это все полигенные признаки (даже такая хорошо наследуемая вещь, как рост, обуславливается несколькими сотнями генов). А вот моногенные как раз и вызывают тяжелые наследственные заболевания. Например, муковисцидоз — одна конкретная мутация в одном конкретном гене. «Если можно ее исправить в половых клетках, а потом провести оплодотворение in vitro, то дети этот недуг не унаследуют, — говорит Дмитрий Жарков. — Надо отметить, что таких болезней

достаточно много. Известно: в среднем каждый человек несет две смертельных мутации, правда, рецессивные и в гетерозиготе. Понятно, что они довольно редкие и вероятность встречи двух их носителей мала. Однако это показывает, насколько велик у нас генетический груз, и понятно: рано или поздно методы редактирования генома человечеству понадобятся».

С Дмитрием Жарковым согласен и заведующий лабораторией клеточного деления Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН к.б.н. **Алексей Валерьевич Пиндюрин**. Он также отмечает, что перспективы у подобных исследований очень большие, причем, это касается как фундаментальных научных работ, так и нужд медицины. «В геноме могут быть сломаны или изменены разные участки, и очень важно исправить повреждение, причем точно и нужным образом», — говорит биолог.

Он рассказывает, что несколько методов для подобных действий появилось еще в прошлом веке. Ученые выяснили: существует много белков, обладающих ДНК-связывающей активностью. То есть способных распознать специфические, как правило, не очень длинные участки цепочки нуклеотидов (так называемые мотивы), которые присутствуют в геноме, а затем состыковаться с ними. Такие белки стали изучать, и в конечном счете выяснили: их свойство основывается на определенной структуре, так что можно, скомбинировав ряд последовательностей аминокислотных остатков, создать искусственный белок, опознающий именно тот фрагмент ДНК, что нужен исследователю. Соответственно, к подобному «локомотиву» вполне реально прицепить «вагон» — другой белок, вносящий изменения.

«Исходно цель была во внесении точечных поломок и наблюдения, на что влияет неправильная работа того или иного гена, — объясняет Алексей Пиндюрин. — В фундаментальной науке есть такой вопрос: вот у нас в наличии ген, а что он делает? Чтобы это понять, его достаточно выключить и затем посмотреть на последствия (или, иными словами, фенотипические проявления)».

В качестве «вагона» здесь используется белок, обладающий нуклеазной активностью, то есть способный расщеплять ДНК. Попадая в цель, он ломает обе цепочки нуклеотидов. Однако если взять хромосому и внести в нее разрыв, то клетка просто не сможет дальше нормально жить и делиться. Поэтому, используя механизмы репарации, она распознает повреждение и ремонтирует его. Либо с помощью гомологичной рекомбинации (используя неповрежденную парную хромосому в качестве матрицы, восстанавливает первую), либо просто сшивая оба конца поломанной хромосомы. При последнем процессе часто добавляются или исчезают несколько нуклеотидов, и если действие направлено на кодирующую часть гена, то в результате образуется белок с нарушенной функцией. Таким образом, получается, что и поломка в наличии, и клетка существует дальше.

Алексей Пиндюрин: «Если в качестве цели взять очень короткую последовательность, то в геноме она будет присутствовать в огромном количестве мест, соответственно, искусственный белок свяжется и там, где мы хотим, и там, где не хотим. Присоединенной же нуклеазе без разницы, где щепить ДНК, так что изменения будут не только в нужных нам местах. Соответственно, необходимо, чтобы распознаваемый мотив был как можно длиннее, это повышает шансы на более точное позиционирование».

«Конструирование таких белков достаточно сложное дело», — отмечает Алексей Пиндюрин. Поэтому метод CRISPR/Cas9, с помощью которого будут работать английские ученые, оказывается удобнее, так как основан на немного другом подходе. Этот протокол также включает белок, способный связываться с ДНК, но в качестве направляющего агента («локомотива») выступает небольшая последовательность РНК. Синтезировать ее намного легче, что упрощает и использование самого метода. «Вы выбираете ген, находите с помощью определенных алгоритмов оптимальные последовательности-цели, создаете генно-инженерную конструкцию — она будет, с одной стороны, нарабатывать позиционирующую РНК, а с другой — кодировать белок Cas9.



Алексей Пиндюрин

Вместе они обнаруживают заданное место, и дальше нуклеаза Cas9 расщепляет ДНК, причем по обеим цепям», — говорит ученый.

Он подчеркивает, что этот способ, по сравнению с предыдущими, имеет большее преимущество во внесении мутаций, а также в направленном изменении того или иного участка генома. «Мы можем добавить к комплексу белка Cas9 с направляющей РНК также и нужную нам последовательность ДНК, состоящую, условно говоря, из трех частей. Первая, левая, гомологична последовательности до разрыва, последняя, правая — той, что после повреждения, а между ними — фрагмент, необходимый ученому», — объясняет Алексей Пиндюрин. В результате гомологичной рекомбинации этот дополнительный фрагмент будет встроено в выбранное место генома. Такой подход, в частности, позволяет исправлять те или иные нарушения в геноме путем замещения поломанных участков.

Метод CRISPR/Cas9 уже опробован в институтах СО РАН. В ИМКБ с помощью этого метода работают, изменяя геном плодовой мушки, сейчас протокол ставится для культивируемых клеток млекопитающих. «В частности, известно, что трехмерная организация хромосом имеет очень большое значение именно для регуляции активности генов, так что мы хотим исследовать особенности взаимодействия хромосом с внутренней ядерной оболочкой и для этого получить трансгенную мышь, у которой экспрессировался бы крайне специфичный химерный белок. Он позволил бы нам посмотреть в разных тканях организма, какие последовательности ДНК находятся на периферии клеточного ядра», — рассказывает Алексей Пиндюрин. Что касается лаборатории Кэти Ниакан, то там с помощью CRISPR/Cas9 будут изучать, как нарушение работы генов влияет на раннее развитие эмбриона.

Алексей Пиндюрин предполагает, что в дальнейшем, с учетом совершенствования метода, можно будет соединить работы на его основе с использованием плюрипотентных стволовых клеток. «Взять у пациента клетки, содержащие негативные мутации, превратить в плюрипотентные, внести необходимые изменения, проверить и вживить человеку обратно. Это не такая уж и фантастика», — говорит ученый.

Екатерина Пустолякова
Фото Юлии Поздняковой, Алексея Пиндюрина
и Дианы Хомяковой

