

Επεξεργασία του γονιδιώματος με υψηλή ακρίβεια

Νέα μέθοδος εισαγωγής πολλαπλών γονιδίων σε συγκεκριμένες θέσεις και αφαίρεση των ελαττωματικών γονιδίων

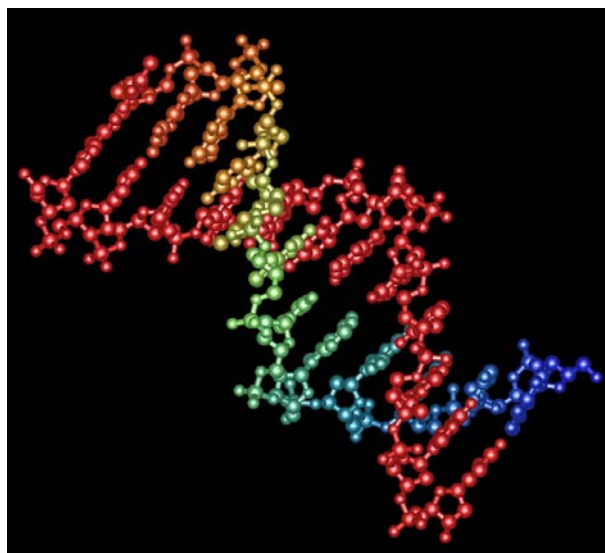
Περίληψη: Μία τεχνική επεξεργασίας του γονιδιώματος με τη βοήθεια τροποποιημένων βακτηριακών πρωτεϊνών. Η νουκλεάση Cas9 «κόβει» το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις. Το σύστημα είναι πολύ φιλικό στον χρήστη και η μέθοδος παρουσιάζει πολύ μεγάλη ακρίβεια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων όπως η νόσος του Huntington ή το AIDS.

Ερευνητές του MIT, του Broad Institute και του Πανεπιστημίου Rockefeller ανέπτυξαν νέα τεχνική για την επίτευξη αλλαγής μεγάλης ακρίβειας του γονιδιώματος των ζωντανών κυττάρων μέσω προσθήκης ή αφαίρεσης γονιδίων. Οι ερευνητές ισχυρίζονται ότι τεχνολογία αυτή θα μπορούσε να παράσχει μια εύκολη στην εφαρμογή και όχι δαπανηρή μέθοδο για τη δημιουργία οργανισμών που θα παράγουν βιοκαύσιμα, για τη σχεδίαση πρότυπων συστημάτων ζωικών οργανισμών, προκειμένου να μελετηθούν ασθένειες στον άνθρωπο και για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, μεταξύ άλλων δυνητικών εφαρμογών.

Προκειμένου να διαμορφώσουν τη νέα τεχνική επεξεργασίας του γονιδιώματος, οι ερευνητές τροποποίησαν μια σειρά βακτηριακών πρωτεϊνών που φυσιολογικά χρησιμοποιούνται ως αμυντικός μηχανισμός έναντι των ιικών εισβολέων. Χρησιμοποιώντας το παραπάνω σύστημα, οι επιστήμονες μπορούν να μεταβάλλουν αρκετές γενετικές θέσεις ταυτόχρονα και να ελέγξουν καλύτερα την ενσωμάτωση των νέων γονιδίων, αναφέρει ο Feng

Zhang, βοηθός καθηγητή του τομέα Νευροεπιστήμης του MIT και επικεφαλής της ερευνητικής ομάδας.

«Οποιαδήποτε εφαρμογή της Γενετικής Μηχανικής απαιτεί την τοποθέτηση νέων γονιδίων ή την τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων, θα μπορούσε να ωφεληθεί από την νέα αυτή προσέγγιση», αναφέρει ο Zhang, που αποτελεί κεντρικό μέλος του Broad Institute και του McGovern Institute του MIT για την Έρευνα του Εγκεφάλου.



Προηγούμενες προσπάθειες

Τα πρώτα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια δημιουργήθηκαν τη δεκαετία του 1980 με την προσθήκη μικρών τμημάτων DNA σε εμβρυικά κύτταρα ποντικίου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικίων, προκειμένου να μελετηθούν οι ασθένειες στον άνθρωπο, αν και, εξαιτίας της τυχαίας ενσωμάτωσης του DNA στο γονιδίωμα, οι ερευνητές αδυνατούσαν να αντικαταστήσουν τα υπάρχοντα γονίδια με τα νεοεισερχόμενα.

Στα πρόσφατα χρόνια, οι επιστήμονες αναζήτησαν πιο ακριβείς μεθόδους επεξεργασίας του γονιδιώματος. Μια τέτοια μέθοδος, γνωστή ως **ομόλογος ανασυνδυασμός**, περιλαμβάνει τη μεταφορά τμήματος DNA που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο περιβαλλόμενο από αλληλουχίες που ταιριάζουν στην περιοχή του γονιδιώματος όπου πρόκειται να εισαχθεί. Ωστόσο, ο ρυθμός επιτυχίας της μεθόδου είναι ιδιαίτερα χαμηλός, επειδή η διεργασία του ανασυνδυασμού είναι σπάνια στα φυσιολογικά κύτταρα.

Ακριβής στόχευση

«Το νέο σύστημα είναι πολύ πιο φιλικό στο χρήστη», αναφέρει ο Zhang. Χρησιμοποιώντας φυσικά προκύπτοντα συστήματα βακτηριακών πρωτεϊνών-RNA που αναγνωρίζουν και «ψαλιδίζουν» το ιϊκό DNA, οι ερευνητές μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα επεξεργασίας του DNA, που αποτελούνται από μια νουκλεάση ονόματι **Cas9** που προσδένεται σε αλληλουχίες RNA μικρού μεγέθους. Οι αλληλουχίες αυτές σχεδιάστηκαν, ώστε να στοχεύσουν σε συγκεκριμένες θέσεις εντός του γονιδιώματος όταν πραγματοποιηθεί ζευγάρωμα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του γονιδιώματος, τότε η Cas9 «κόβει» το DNA.

Η παραπάνω προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για τη διακοπή της λει-

Πρόσφατα, οι βιολόγοι ανακάλυψαν ότι θα μπορούσαν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της παραπάνω διεργασίας με την προσθήκη ενζύμων που ονομάζονται **νουκλεάσες**, τα οποία μπορούν να «κόψουν» το DNA αφού προηγουμένως αναγνωρίσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες. Οι **δακτύλιοι ψευδαργύρου (zinc fingers)**¹ χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μεταφορά της νουκλεάσης σε συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, αν και δεν μπορούν να στοχεύσουν σε κάθε πιθανή αλληλουχία του DNA, περιορίζοντας έτσι το εύρος των εφαρμογών τους. Επιπρόσθετα, η συγκρότηση του συμπλέγματος των πρωτεϊνών αποτελεί μια ιδιαίτερα επίπονη και δαπανηρή διεργασία.

Μολονότι, σύμπλοκα γνωστά ως **TALEN (Transcription Activator-Like Effectors Nucleases)** δηλαδή τεχνητά περιοριστικά ένζυμα, μπορούν επίσης να «κόψουν» το γονιδίωμα σε συγκεκριμένες θέσεις, η διεργασία συγκρότησής τους είναι επίπονη και δαπανηρή.

τουργίας ενός γονιδίου είτε για την αντικατάστασή του από ένα άλλο. Προκειμένου να γίνει το δεύτερο, οι ερευνητές θα πρέπει να προσθέσουν στο σύστημα και ένα καλούπι DNA για το νέο γονίδιο, που θα είναι σε θέση να αντιγραφεί μετά την κοπή του DNA.

Κάθε ένα από τα τμήματα RNA μπορεί να στοχεύσει σε διαφορετική αλληλουχία του γονιδιώματος. «Αυτή είναι η ομορφιά του πράγματος – μπορείς εύκολα να προγραμματίσεις τη νουκλεάση, ώστε να στοχεύσει σε μία ή περισσότερες θέσεις εντός του γονιδιώματος», αναφέρει ο Zhang.

Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά ακριβής. Η διαφορά έστω και σε ένα ζεύγος βάσεων μεταξύ της αλληλουχίας-στόχου RNA

και της αλληλουχίας του γονιδιώματος, είναι αρκετή για να μην ενεργοποιηθεί η νουκλεάση Cas9. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται ούτε στην περίπτωση των δακτυλίων ψευδαργύρου ούτε στην περίπτωση των TALEN. Επίσης, το νέο σύστημα φαίνεται ότι είναι πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το TALEN, και πολύ πιο οικονομικό.

Το νέο σύστημα «αποτελεί μια σημαντική πρόοδο στο πεδίο της επεξεργασίας του γονιδιώματος και, από την πρώτη κιόλας εφαρμογή του, ήδη είναι συγκρίσιμο σε αποτελεσματικότητα τόσο με τους δακτύλιους ψευδαργύρου όσο και με το TALEN», αναφέρει ο Aron Geurts, βοηθός καθηγητή στον τομέα της Φυ-

σιολογίας του Medical College of Wisconsin. «Η αποκρυπτογράφηση των συνεχώς αυξανόμενων στοιχείων πάνω στη γενετική ποικιλομορφία που σχετίζεται με την υγεία του ανθρώπου και τις ασθένειες θα απαιτήσει τέτοιου τύπου διευρυμένη και ακριβή επεξεργασία του γονιδιώματος σε πρότυπα συστήματα».

Η ερευνητική ομάδα έχει θέσει στη διάθεση της επιστημονικής κοινότητας τα απαραίτητα «εργαλεία γενετικής μηχανικής» σε έναν μη κερδοσκοπικό οργανισμό ονόματι Addgene, προκειμένου να τα χρησιμοποιήσει όποιος θέλει. Επιπλέον, οι ερευνητές έχουν δημιουργήσει ιστοθέση με συμβουλές για την επιτυχή εφαρμογή της νέας τεχνικής.

Κατασκευάζοντας νέες θεραπείες

Μεταξύ άλλων πιθανών εφαρμογών, αυτό το σύστημα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για ασθένειες όπως η νόσος του Huntington, που φαίνεται ότι προκαλείται από ένα μη φυσιολογικό γονίδιο. Κλινικές μελέτες που κάνουν χρήση των δακτυλίων ψευδαργύρου με νουκλεάσες για την απενεργοποίηση γονιδίων βρίσκονται σε εξέλιξη, και η νέα τεχνολογία θα μπορούσε να προσφέρει μια πιο αποτελεσματική εναλλακτική προσέγγιση.

Επιπρόσθετα, το σύστημα αυτό θα μπορούσε να αποδειχθεί χρήσιμο στη θεραπεία των οροθετικών ασθενών με την αφαίρεση των λεμφοκυττάρων τους και την πρόκληση μετάλλαξης στον υποδοχέα CCR5, μέσω του οποίου ο ιός εισέρχεται στα κύτταρα. Επανατοποθετώντας τα στον ασθενή, τα τροποποιημένα πλέον κύτταρα θα μπορούσαν να αντισταθούν στη μόλυνση από τον ιό HIV.

Η προσέγγιση αυτή θα καθιστούσε πιο εύκολη τη μελέτη των ασθενειών στον άνθρωπο με την επαγωγή συγκεκριμένων μεταλλάξεων στα ανθρώπινα αρχέγονα κύτταρα (human stem cells). «Χρησιμοποιώντας αυτό το σύστημα επεξεργασίας του γονιδιώματος,

μπορείτε να εισάγετε συστηματικά μεμονωμένες μεταλλάξεις και να διαφοροποιήσετε τα αρχέγονα κύτταρα σε νευρώνες ή σε καρδιομυοκύτταρα, προκειμένου να δείτε πώς οι μεταλλαγές μεταβάλλουν τη βιολογία των κυττάρων», αναφέρει ο Zhang.

Στη μελέτη που δημοσιεύθηκε στο περιοδικό Science, οι ερευνητές δοκίμασαν το σύστημα σε κυτταροκαλλιέργειες στο εργαστήριο, αλλά σχεδιάζουν την εφαρμογή της νέας αυτής τεχνολογίας στη μελέτη της λειτουργίας του εγκεφάλου και των ασθενειών που σχετίζονται με αυτόν.

ⁱ **Δακτύλιοι ψευδαργύρου (zinc fingers):** πρόκειται για πρωτεΐνες με επαναλαμβανόμενο μοτίβο αμινοξέων που προσδένει ένα Zn⁺⁺, σχηματίζοντας μια σχετικά ανεξάρτητη περιοχή μέσα στο πρωτεϊνικό μόριο που προσδένεται στο DNA και/ή στο RNA.

<http://web.mit.edu/newsoffice/2013/editing-the-genome-with-high-precision-0103.html>