

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ СВИНЕЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9

GENETIC MODIFICATION OF PIGS USING THE CRISPR/CAS9 EDITING METHOD

**G. Mkrtchyan
A. Krovikova
D. Piskaryov**

Summary. Pigs are one of the most popular types of productive animals. But they have a fairly large number of pathologies at the genetic level. The technology of editing the genome allows you to neutralize them without harm to the anatomical and physiological state of pigs.

Keywords: CRISPR / Cas9; Pigs; 3D modeling; Molecular biology; Editing the genome.

Мкртчян Гаянэ Владимировна

*К.с.-х.н., доцент, ФГБОУ ВО МГАВМиБ- МВА
им. К. И. Скрябина
Milan1011@mail.ru*

Кровикова Анна Николаевна

*К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО МГАВМиБ- МВА
им. К. И. Скрябина*

Пискарев Даниил Игоревич

ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА им. К. И. Скрябина

Аннотация. Свины являются одним из популярнейших видов продуктивных животных. Но они имеют достаточно большое количество патологий на генетическом уровне. Технология редактирования генома позволяет нейтрализовать их без вреда для анатомо-физиологического состояния свиней.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; Свины; 3D моделирование; Молекулярная биология; Редактирование генома.

Редктирование генома — это современная технология, представляющая из себя процесс изменения первичной последовательности нуклеотидов в ДНК, естественным или искусственным путем, благодаря специальным белкам.

CRISPR/Cas9 — это передовой метод редактирования геномов высших организмов, базирующаяся на иммунной системе бактерий. В основе этой системы — особые участки бактериальной ДНК, короткие полиндромные кластерные повторы, или CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), которые являются специализированными хранителями информации о фрагментах вирусов. В CRISPR существуют спейсеры — фрагменты ДНК (РНК) отличающиеся друг от друга и располагающиеся между идентичными повторами в ДНК (РНК), многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных Cas-белков, связанных с CRISPR РНК (последовательность РНК, ассоциированная с CRISPR). Если фрагмент вируса зафиксирован в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки, обычно эту функцию выполняет белок Cas-9, проводят рестрикцию вирусной ДНК и уничтожают ее, защищая клетку от инфекции.

Данный механизм был описан и разработан в начале 2000-х двумя группами ученых, первая группа возглавлялась биоинформатиком Евгением Куниным, а вторая профессором, доктором биологических наук Джоном ван дер Остом. Эти ученые первые описали механизм работы

CRISPR/Cas9. Далее в начале 2013 года несколько групп ученых показали, что системы CRISPR/Cas могут работать не только в клетках бактерий, но и в клетках высших организмов, а значит, CRISPR/Cas-системы дают возможность исправлять патогенные участки генома и таким образом лечить наследственные заболевания человека.

В клетки, в которых мы хотим убрать ген, вводится раствор CRISPR/Cas-9, причем вводится не просто CRISPR, а CRISPR РНК. Спейсеры данной РНК содержат фрагменты того гена, который надо «вырезать» из генома клеток пациента после связывания спейсера с протоспейсером (фрагментом гена, аналогичным по нуклеотидной последовательности со спейсером РНК) болезнетворного гена, Cas-9 уничтожает данный участок из ДНК клеток пациента. Далее белок ДНК-лигаза сшивает разделенные участки ДНК и лишние белки CRISPR/Cas-9 удаляются из клеток. Результатом таких манипуляций является уничтожение болезнетворного гена из генома пациента без нарушения работоспособности клеток.

На основе этой системы разработана технология высокоточного редактирования генома эукариот, позволяющая выключать или встраивать гены в четко заданном участке ДНК. Ограничивают применение этой технологии побочные (off-target) модификации генома. Они возникают из-за того, что при двухцепочечном разрыве ДНК нуклеазой Cas9 репарация происходит преимущественно путем негомологичного соединения концов, что часто приводит к возникновению небольших мутаций по типу инсерций-делеций и хромосомных перестроек.

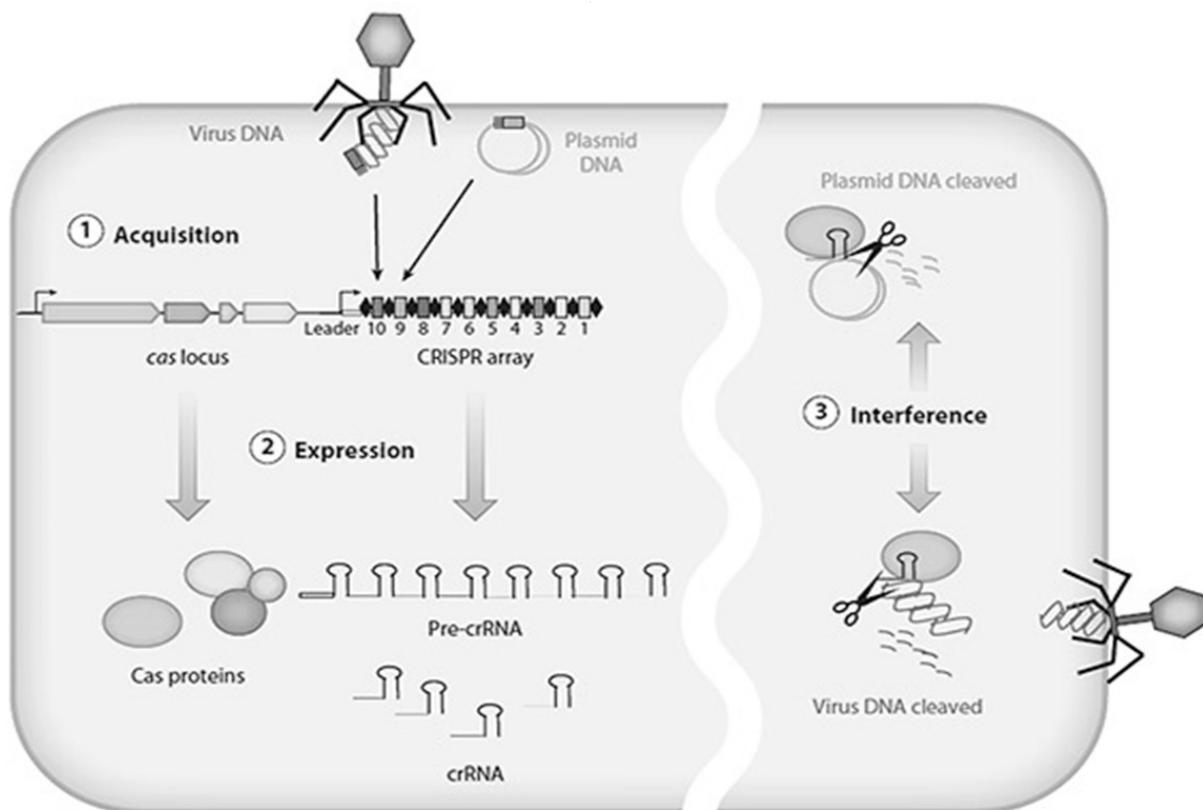


Рис. 1. Механизм работы CRISPR/Cas9 у бактерий и архей

В последнее время активно исследуется возможность редактирования генома свиней по нескольким причинам:

Во-первых, с каждым годом число пациентов, для лечения которых требуется пересадка органов, возрастает. При этом количество органов, доступных для пересадки, сильно ограничено, так как обычно их получают посмертно от только что погибших людей. Решить проблему доступности донорских органов могла бы ксенотрансплантация, то есть использование для пересадки органов других животных, например, обезьян или свиней. Врачам известно, что свиные органы совпадают по размеру и функциям с человеческими и хорошо подходят для трансплантации. Однако их использование в клинике пока невозможно по двум причинам — иммунная несовместимость и присутствие в клетках свиней специфического ретровируса.

Эндогенным ретровирусом свиней (PERV — Porcine Endogenous Retrovirus) заражены практически все известные породы домашних свиней. По-видимому, он появился в эволюционной истории свиней еще до одомашнивания, и даже сыграл роль в приобретении некоторых признаков, таких как интенсивность жиротложения.

Особенностью жизненного цикла ретровирусов является стадия интеграции в геном хозяина. Если вирус длительно присутствует в организме, следы его пребывания накапливаются в ДНК. При этом увеличивается как количество неактивных «обломков» генома, так и количество копий активного вируса.

В клинических примерах не было зарегистрировано случаев передачи вируса от свиньи к человеку, несмотря на то, что свиные клетки поджелудочной железы уже использовали для трансплантации людям. Тем не менее, при совместном культивировании свиных и человеческих клеток заражение происходит. Обнаружено, что PERV поражает клетки почек человека, продуцирует там РНК, и количество его копий в геноме увеличивается. Такие зараженные клетки могут, в свою очередь, передавать вирус здоровым клеткам. Таким образом, при использовании крупных свиных органов, таких как сердце и печень, инфекция не исключена. Поэтому условием использования свиных клеток в человеческом теле является инактивация PERV.

«Выключить» ген в клетках с использованием современных технологий генной инженерии не представляет труда, однако большой помехой для инактивации ретровируса является его многокопийность. Однако при по-

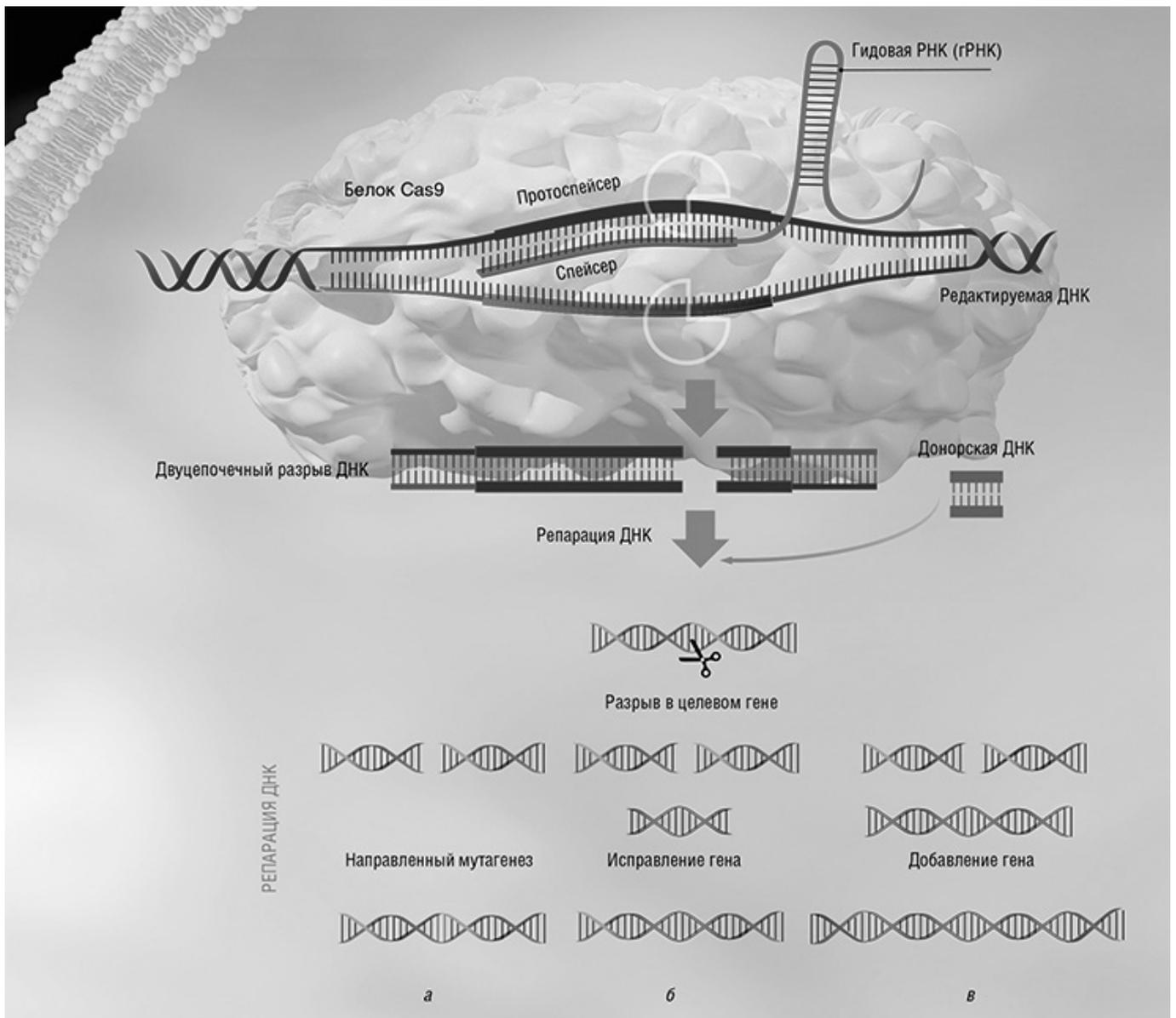


Рис. 2. Механизм редактирования генома у эукариот

мощи технологии CRISPR/Cas9 — удалось одновременно выключить в клетках свиней сразу 62 копии вируса. Для того, чтобы «сломать» ретровирус, направленно вносили двухцепочечный разрыв в ген с использованием Cas9, кодирующий обратную транскриптазу вируса, без которой он неактивен.

Но теперь с развитием технологий проводилось редактирование генома клетки соединительной ткани свиньи, чтобы потом использовать ядра этих клеток для пересадки в яйцеклетку (технология, стандартно используемая для клонирования животных). В клетках оказалось 25 копий ретровируса. После нескольких раундов редактирования оказалось, что нужный ген удалось

выключить только в трети клеток. По-видимому, накопление большого количества двухцепочечных разрывов запускало программу клеточного самоуничтожения (апоптоз), что существенно снижало конечную эффективность редактирования. Чтобы избежать самоуничтожения редактируемых клеток пришлось проводить эксперимент в присутствии ингибиторов апоптоза. После этого эффективность редактирования генома достигла 100 процентов. Таким образом, удалось выключить в клетках все 25 копий вируса.

Отключение апоптоза при наличии в клетках большого количества двухцепочечных разрывов может привести к хромосомным перестройкам. Действительно, наблю-



Рис. 3. Белок Термогенин свиней

дался такой эффект в большинстве полученных «безвирусных» клеточных линий. Однако при помощи анализа хромосом и выборочного секвенирования некоторых участков генома, удалось отобрать клеточную линию, в которой редактирование не привело к перестройкам или ненужным мутациям. Ядра этих клеток были использованы для пересадки в яйцеклетки.

В результате было создано 37 поросят, из которых впоследствии выжило 15. Многочисленные проверки, включающие в себя анализ ДНК и РНК животных показали, что вирус в них полностью неактивен и никаких отклонений в развитии не обнаружено.

Несмотря на то, что удалось успешно избавиться от свиного ретровируса, для того, чтобы использовать свиней в качестве доноров, предстоит решить проблему иммунной несовместимости человека и свиньи. Дело в том, что свиные клетки содержат на поверхности другой набор белков и полисахаридов, нежели человеческие, поэтому ожидаемо вызывают против себя иммунный ответ.

Во-вторых, у свиней способность к формированию бурого жира и нормальной терморегуляции, которая была утрачена в процессе эволюции, редактирование генома позволяет решить эту проблему.

Поддерживать температуру тела на холоде млекопитающим помогает бурый жир — разновидность жировой ткани, богатой митохондриями. Бурый жир особенно развит у новорожденных животных. По мере взросления животные (в том числе человек) теряют его большую часть — за исключением видов, практикующих зимнюю спячку.

Основной функцией бурого жира является окисление липидов в митохондриях и рассеяние полученной энергии в тепло. За последний процесс отвечает белок термогенин, который кодируется геном UCP1. Термогенин в процессе эволюции исчез у птиц и рептилий, но есть у всех млекопитающих кроме ленивцев и свиней. По-видимому, у последних ген UCP1 «сломался» в те времена, когда предки современных свиней жили в тропическом климате, и термогенин, как и бурый жир, был им не нужен.

Так как термогенин помогает расходовать липиды, нарушение его функции связывают с предрасположенностью к ожирению за счет увеличения массы обычного, белого жира. Скорее всего, склонность свиней к запасанию жира сыграла роль в процессе их одомашнивания человеком. Однако в настоящее время повышенная чувствительность поросят к холоду дорого обходится фермерам. Около трети расходов на электроэнергию свинофермы в холодных регионах США составляет обогрев новорожденных поросят, без которого они часто умирают от переохлаждения.

У свиней популярной породы бама взяли стволовые клетки соединительной ткани. В геном этих клеток

вместо «сломанного» собственного гена UCP1 вставили функциональный мышинный ген с регуляторным участком, ограничивающим его экспрессию жировой тканью. Ядра клеток со вставкой гена пересадили в яйцеклетки, и полученные «эмбрионы» подсадили суррогатным матерям. Три беременности из 13 оказались успешными, и в результате на свет появилось 12 генномодифицированных поросят.

При помощи позитронно-эмиссионной томографии убедились, что у ГМ-поросят действительно восстановились запасы бурого жира в паховой области и активировался термогенин в тесте на холодоустойчивость. По сравнению с обычными поросятами, при выдерживании в холодном помещении с температурой 4 градуса Цельсия, ГМ-поросята поддерживали стабильную температуру тела.

Помимо устойчивости к холоду, восстановление функционального термогенина у свиней привело к тому, что животные стали запасать меньше белого жира. При том, что активность и потребление пищи у таких свиней не изменилось по сравнению с обычными, содержание жира в организме у них составило 15 процентов против 20 у обычных свиней. Процентное содержание «сухого» мяса при этом увеличилось на три пункта.

Учитывая, что усилия животноводов сейчас направлены на получение пород свиней с уменьшенным содержанием жира, новая порода наверняка станет востребованной в аграрной промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baltimore D., Berg P., Botchan M., Carroll D., Charo R. A., Church G., Corn J. E., Daley G. Q., Doudna J. A., Fenner M., Greely H. T., Jinek M., Martin G. S., Penhoet E., Puck J., Sternberg S. H., Weissman J. S., Yamamoto K. R. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification // Science. — 2015. — Vol. 348, no. 6230. — P. 36–38.
2. Lanphier E., Urnov F., Haecker S. E., Werner M., Smolenski J. Don't edit the human germ line. (англ.) // Nature. — 2015. — Vol. 519, no. 7544. — P. 410–411.
3. Chinese scientists genetically modify human embryos. Nature (22 April 2015).
4. James Gallagher. Scientists get 'gene editing' go-ahead, BBC News, BBC (1 February 2016).
5. Maria Cheng. Britain approves controversial gene-editing technique, AP News (1 February 2016).