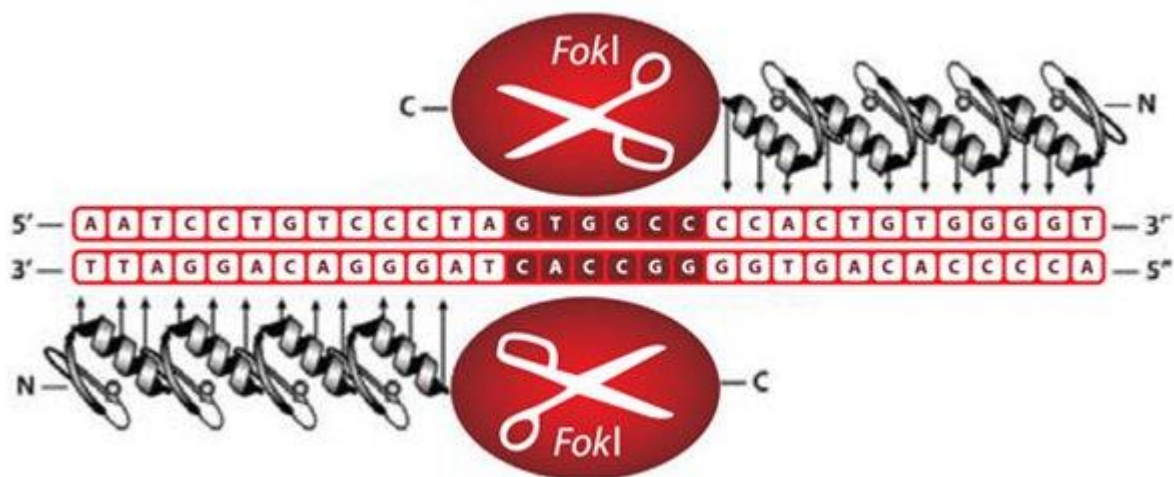


Технология TALEN: принципы конструирования и применения

Технология TALEN — Transcription Activator-Like Effector Nucleases — относится к программируемым инструментам редактирования генома. Она была разработана после ZFN и стала важным этапом развития методов направленного изменения ДНК до широкого распространения CRISPR-Cas. Основная идея TALEN заключается в том, что специально сконструированный белок распознает заданный участок ДНК, а связанный с ним нуклеазный домен обеспечивает разрыв ДНК. После этого собственные системы репарации клетки восстанавливают повреждение, в результате чего в целевом участке могут возникнуть генетические изменения.

По общей логике TALEN похожа на ZFN. Обе технологии используют модульный принцип: одна часть белка отвечает за узнавание определенной последовательности ДНК, а другая — за ее расщепление. Однако механизм распознавания последовательности у TALEN значительно отличается от системы zinc finger.



Рисонок 1: Технология TALEN — Transcription Activator-Like Effector Nucleases

Название TALEN происходит от TALE — Transcription Activator-Like Effector. TALE-белки были обнаружены у бактерий рода *Xanthomonas*, взаимодействующих с растениями. В природе эти бактериальные белки способны попадать в растительные клетки и связываться с определенными участками ДНК, влияя на экспрессию генов хозяина. Изучение механизма их взаимодействия с ДНК позволило превратить TALE-домены в программируемые инструменты молекулярной биологии.

Центральной особенностью TALE является наличие повторяющихся белковых модулей. Каждый такой повтор состоит приблизительно из 34 аминокислот. Большая часть последовательности повторов сходна, однако две аминокислотные позиции отличаются и играют ключевую роль в распознавании нуклеотидов ДНК. Эти две позиции получили название RVD — repeat-variable diresidue.

Различные RVD преимущественно распознают определенные основания ДНК. Благодаря этому исследователь может сформировать последовательность TALE-модулей таким образом, чтобы она соответствовала выбранной последовательности ДНК.

Главный принцип можно выразить очень просто:

один TALE-повтор $\approx$ распознавание одного нуклеотида ДНК.

Это является одним из фундаментальных отличий TALEN от ZFN. В ZFN один zinc-finger модуль обычно взаимодействует приблизительно с тремя парами оснований, причем взаимодействия соседних модулей могут усложнять проектирование. В TALE-системе соответствие между повтором и отдельным основанием является более прямым и модульным.

Для учебного понимания можно представить, что последовательность ДНК:

5'-A-T-G-C-C-A-T-G-3'

распознается последовательностью TALE-модулей, каждый из которых соответствует определенной позиции. Таким образом, порядок модулей белка программируется в соответствии с порядком нуклеотидов в целевом участке.

Однако один TALE-домен способен только узнавать ДНК. Чтобы превратить его в инструмент редактирования генома, к нему присоединяют нуклеазный компонент. Как и в классических ZFN, в TALEN обычно используется нуклеазный домен FokI.

Таким образом, одна молекула TALEN состоит из двух основных функциональных частей:

TALE DNA-binding domain + FokI nuclease domain.

TALE-домен определяет адрес, а FokI обеспечивает расщепление ДНК.

При этом FokI эффективно функционирует как димер. Поэтому для создания двуцепочечного разрыва используют две TALEN, распознающие участки по разные стороны от предполагаемого места разрезания.

Условно структура целевого участка выглядит следующим образом:

левая мишень TALEN $\rightarrow$ spacer $\leftarrow$ правая мишень TALEN.

Первая TALEN связывается с одной стороной выбранной области ДНК, вторая — с другой. Между ними располагается участок, который называют spacer. После правильного связывания двух белков их домены FokI сближаются и формируют функциональный димер.

В результате возникает двуцепочечный разрыв ДНК — double-strand break, DSB.

Поэтому основной механизм TALEN можно представить как:

распознавание левой мишени + распознавание правой мишени $\rightarrow$ сближение двух FokI $\rightarrow$ димеризация $\rightarrow$ двуцепочечный разрыв ДНК.

На этом непосредственная функция TALEN в основном заканчивается. Последующий результат определяется механизмами репарации клетки.

После возникновения двуцепочечного разрыва одним из основных вариантов восстановления является NHEJ — non-homologous end joining, нехомологичное соединение концов.

При NHEJ разорванные концы ДНК соединяются, однако восстановление может сопровождаться небольшими вставками или делециями — indels. Если такие изменения возникают в кодирующей части гена, они могут изменить рамку считывания или структуру белкового продукта.

Поэтому TALEN может использоваться в функционально-геномных исследованиях для нарушения функции определенного гена, то есть получения gene knockout.

Второй путь связан с HDR — homology-directed repair, гомологически направленной репарацией. При наличии подходящей гомологичной последовательности клетка может использовать ее как информацию для восстановления поврежденного участка.

Таким образом, принципиально возможны две основные схемы:

TALEN $\rightarrow$ DSB $\rightarrow$ NHEJ $\rightarrow$ indels $\rightarrow$ возможное нарушение функции гена

или

TALEN → DSB → HDR → направленное изменение последовательности.

Важно понимать, что TALEN создает адресный разрыв, но окончательное изменение формируется системой репарации клетки. Поэтому две клетки после воздействия на одну и ту же генетическую мишень не обязательно получают абсолютно одинаковые изменения.

Принцип конструирования TALEN

Конструирование TALEN начинается с определения биологической задачи. Исследователь должен понимать, какой ген или регуляторный участок необходимо изучить и какого типа изменение требуется получить.

После этого выбирается целевой участок ДНК. Необходимо подобрать две области связывания, расположенные по обе стороны предполагаемого места разрезания.

Далее для каждой последовательности проектируется соответствующий набор TALE-повторов. Поскольку отдельные RVD обладают предпочтительностью к определенным нуклеотидам, последовательность модулей формируется в соответствии с последовательностью мишени.

В упрощенном виде процесс проектирования выглядит так:

выбор гена → определение целевой области → выбор левой и правой последовательностей → подбор соответствующих RVD → создание двух TALE-массивов → объединение каждого массива с FokI → получение пары TALEN.

Именно необходимость создания пары является важной особенностью технологии.

Следует различать понятия «TALE» и «TALEN». TALE представляет собой ДНК-связывающую платформу. Когда TALE-связывающий домен объединяется с нуклеазой, получается TALEN.

Конструкция одной TALEN в упрощенном виде может быть представлена как:

N-концевая область → массив TALE-повторов → C-концевая область → FokI.

Для редактирования используются две соответствующие конструкции.

В классических TALEN применяются характерные RVD. В учебной литературе часто приводят соответствия, при которых, например, определенные RVD преимущественно взаимодействуют с А, С, G или Т. Однако эти взаимодействия не следует воспринимать как абсолютно жесткий «код»: специфичность зависит также от контекста и особенностей конкретной конструкции.

Именно модульность TALE-кода сделала TALEN привлекательной технологией. Исследователь получил возможность проектировать ДНК-связывающий белок относительно понятным способом — последовательность модулей непосредственно соответствует последовательности мишени.

После проектирования необходимо получить генетические конструкции, кодирующие соответствующие TALEN. Это может быть технически сложным этапом, поскольку TALE-домены состоят из большого числа очень похожих повторяющихся последовательностей.

Обычные методы клонирования не всегда удобны для сборки таких повторов. Поэтому для TALEN были разработаны специальные стратегии модульной сборки генетических конструкций. Исторически большое значение получили подходы на основе Golden Gate и другие методы сборки повторяющихся модулей.

На уровне лекционного курса важно запомнить не конкретный лабораторный протокол, а общую идею: последовательность ДНК-мишени определяет порядок RVD-модулей, а из этих модулей формируется специфический TALE-связывающий домен.

После получения конструкции TALEN должна попасть в исследуемую клеточную систему. Конкретная стратегия доставки зависит от типа клеток и экспериментальной задачи. После появления функциональных TALEN в клетке они находят соответствующие участки ДНК и связываются с ними.

Если обе половины системы одновременно связались с правильными участками, FokI сближаются и создают разрыв.

Весь процесс можно запомнить как последовательность:

мишень ДНК → проектирование двух TALE-доменов → создание пары TALEN → распознавание левой и правой последовательностей → димеризация FokI → DSB → NHEJ/HDR → изменение генома → проверка результата.

Проверка результатов редактирования

После воздействия TALEN необходимо определить, произошло ли изменение именно в интересующем участке. Для этого целевой регион анализируют молекулярно-генетическими методами.

На концептуальном уровне схема проверки выглядит следующим образом:

редактирование → выделение ДНК → анализ целевого локуса → обнаружение изменений → определение их последовательности → оценка функционального эффекта.

Секвенирование позволяет установить точный характер возникшего изменения. Это особенно важно при NHEJ, поскольку разные клетки могут содержать различные вставки или делеции.

Однако подтверждение изменения последовательности ДНК является только первым этапом. Если целью было изменение функции гена, необходимо установить, действительно ли изменился соответствующий биологический процесс.

Поэтому полноценное функциональное исследование может включать:

изменение ДНК → изменение РНК → изменение белка → изменение клеточной функции → изменение фенотипа.

Такой подход позволяет связать генотип с наблюдаемым биологическим эффектом.

Специфичность и off-target эффекты

Одним из важнейших требований к любой технологии геномного редактирования является специфичность. TALEN должна распознавать целевой участок и минимально воздействовать на похожие последовательности в других областях генома.

Нежелательные изменения называют off-target effects.

Специфичность TALEN обеспечивается, в частности, необходимостью одновременного правильного связывания двух половин системы. Для эффективного разрезания должны быть правильно расположены обе TALEN и соответствующие домены FokI.

Тем не менее риск внецелевых взаимодействий полностью не исчезает. Поэтому при разработке системы анализируют потенциально похожие последовательности, а в исследованиях оценивают специфичность полученного редактирования.

Применение TALEN

Одной из основных областей применения TALEN является функциональная геномика. Направленное нарушение гена позволяет изучать его функцию. Если после изменения гена возникает определенный фенотип, исследователь получает информацию о возможной роли данного гена.

TALEN использовались для создания экспериментальных клеточных моделей и модельных организмов. Такие системы позволяют исследовать молекулярные механизмы различных биологических процессов.

Технология получила применение и в растительной биотехнологии. Направленное редактирование позволяет изменять определенные генетические признаки растений и одновременно изучать функции соответствующих генов.

Еще одним направлением является биомедицинская разработка. TALEN исследовались и используются в некоторых подходах клеточной инженерии, где генетическое изменение проводится в контролируемой клеточной системе. Для таких применений особенно важны точность редактирования, характеристика клеток и оценка безопасности.

В микробиологии и промышленной биотехнологии программируемые нуклеазы могут использоваться как часть инструментов для исследования и модификации генетических систем, хотя выбор конкретной технологии зависит от организма и задачи.

TALEN и ZFN

TALEN и ZFN имеют общий фундаментальный принцип. В обоих случаях используется искусственно программируемый ДНК-связывающий белок, соединенный с FokI.

Для ZFN:

zinc-finger массив + FokI.

Для TALEN:

TALE-массив + FokI.

Главное различие заключается в механизме распознавания ДНК. В ZFN отдельный zinc-finger модуль обычно взаимодействует приблизительно с тремя парами оснований. В TALEN каждый основной повтор преимущественно соответствует одному нуклеотиду.

Поэтому проектирование TALEN стало более модульным и предсказуемым по сравнению со многими классическими ZFN-конструкциями.

При этом TALEN имеют и недостатки. TALE-массивы являются сравнительно крупными белковыми структурами, а повторяющаяся организация кодирующей ДНК может усложнять создание конструкций и некоторые способы доставки.

TALEN и CRISPR-Cas

Особенно важно понимать различие между TALEN и CRISPR.

В TALEN специфичность определяется последовательностью аминокислот ДНК-связывающего белка. Поэтому для новой генетической мишени необходимо создавать новый TALE-массив.

В CRISPR-Cas адресность в классическом варианте определяется преимущественно направляющей РНК. Для изменения мишени обычно изменяют последовательность guide RNA, сохраняя основной Cas-белок.

Это различие существенно повлияло на распространение CRISPR, поскольку RNA-guided системы во многих задачах оказались проще для перепрограммирования и мультиплексирования.

Но TALEN сохраняют научное и практическое значение. Для отдельных задач их характеристики могут быть полезны, поэтому выбор системы должен определяться конкретной экспериментальной целью.

Упрощенно развитие программируемых технологий можно представить как:

ZFN → TALEN → CRISPR-Cas.

Однако правильнее рассматривать их не просто как «старую, среднюю и новую» технологии, а как различные платформы адресного взаимодействия с геномом.

Их общий принцип:

распознать нужную последовательность → воздействовать на нее → использовать клеточную репарацию → получить генетическое изменение.

Главное различие заключается в способе распознавания.

ZFN — распознавание посредством zinc-finger белковых доменов.

TALEN — распознавание посредством TALE-повторов.

CRISPR-Cas — распознавание преимущественно посредством направляющей РНК и взаимодействия с Cas-системой.

Для студента третьего курса особенно важно запомнить четыре основных компонента механизма TALEN: TALE-повторы, RVD, FokI и клеточная репарация ДНК.

TALE-повторы обеспечивают контакт с последовательностью. RVD определяют предпочтительность распознавания отдельных оснований. FokI обеспечивает расщепление после образования функционального димера. NHEJ или HDR формируют конечный результат редактирования.

Поэтому механизм можно представить одной цепочкой:

целевая последовательность ДНК → TALE/RVD-распознавание → связывание двух TALEN → димеризация FokI → двуцепочечный разрыв → NHEJ или HDR → изменение генома.

Главным преимуществом TALEN является относительно понятный модульный принцип распознавания ДНК и возможность направленного воздействия на выбранный геномный участок. К ограничениям относятся необходимость конструирования новых белковых массивов для разных мишеней, сравнительно крупный размер системы, сложность работы с повторяющимися последовательностями и возможность внецелевых эффектов.

Таким образом, TALEN представляет собой программируемую белковую систему редактирования генома, в которой TALE-домен определяет адрес в ДНК, а FokI выполняет разрезание. Для функционирования используются две TALEN, связывающиеся по разные стороны целевого участка. После образования двуцепочечного разрыва клетка восстанавливает ДНК через NHEJ или HDR, что и позволяет получить генетическое изменение.

Если ZFN заложили фундамент идеи программируемых нуклеаз, то TALEN сделали распознавание ДНК более модульным и наглядным. В дальнейшем развитие этой концепции привело к широкому распространению CRISPR-Cas, где программирование мишени стало осуществляться главным образом за счет направляющей РНК.