

CRISPR/Cas9, RNA-seq, CAR-T cells κι άλλες σύγχρονες τεχνολογίες. Από τη θεωρία στην πράξη.

Κωνσταντίνος Ξανθόπουλος
Επ. Καθ. Φαρμακολογίας
Τμήμα Φαρμακευτικής Α.Π.Θ.
xantho@pharm.auth.gr

5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εφαρμοσμένης Φαρμακευτικής
Θεσσαλονίκη, 18-19/5/2019

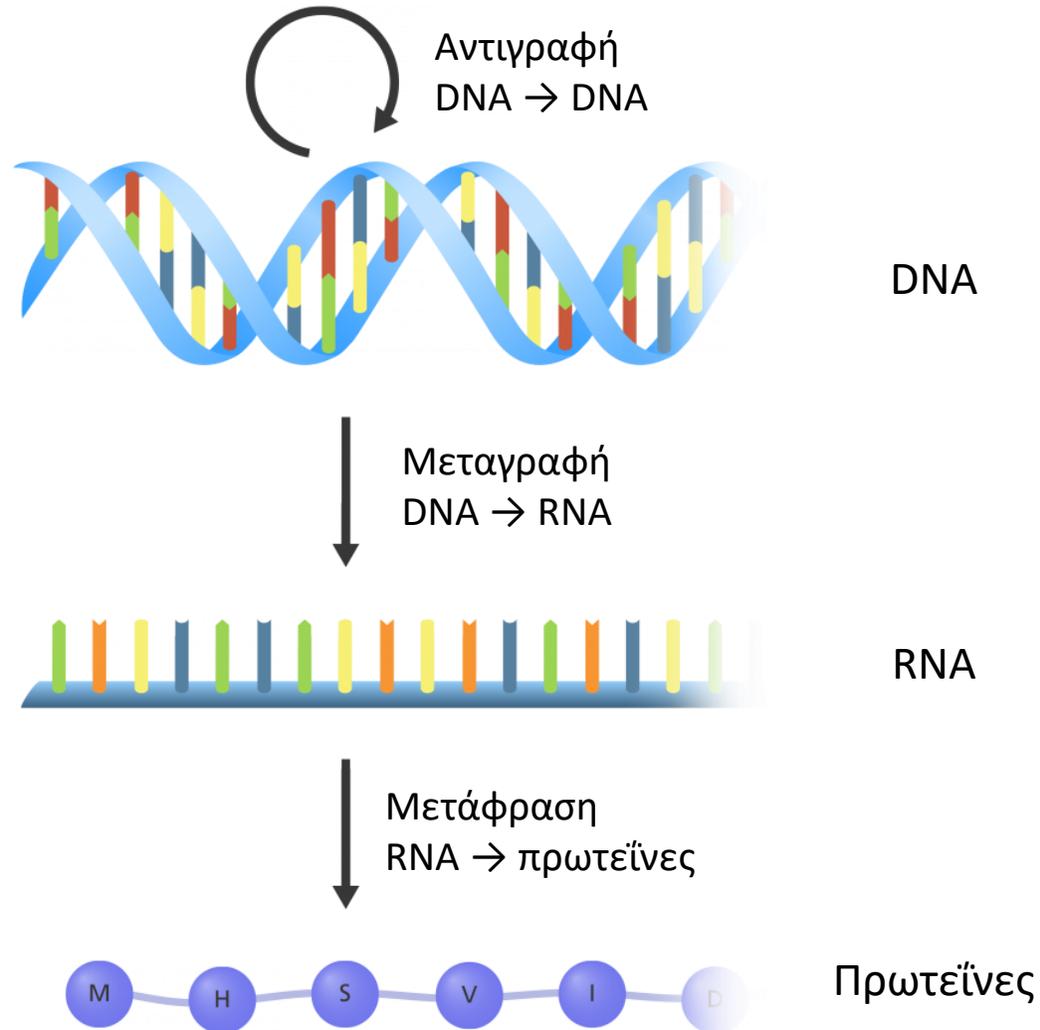


ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

RNA-seq

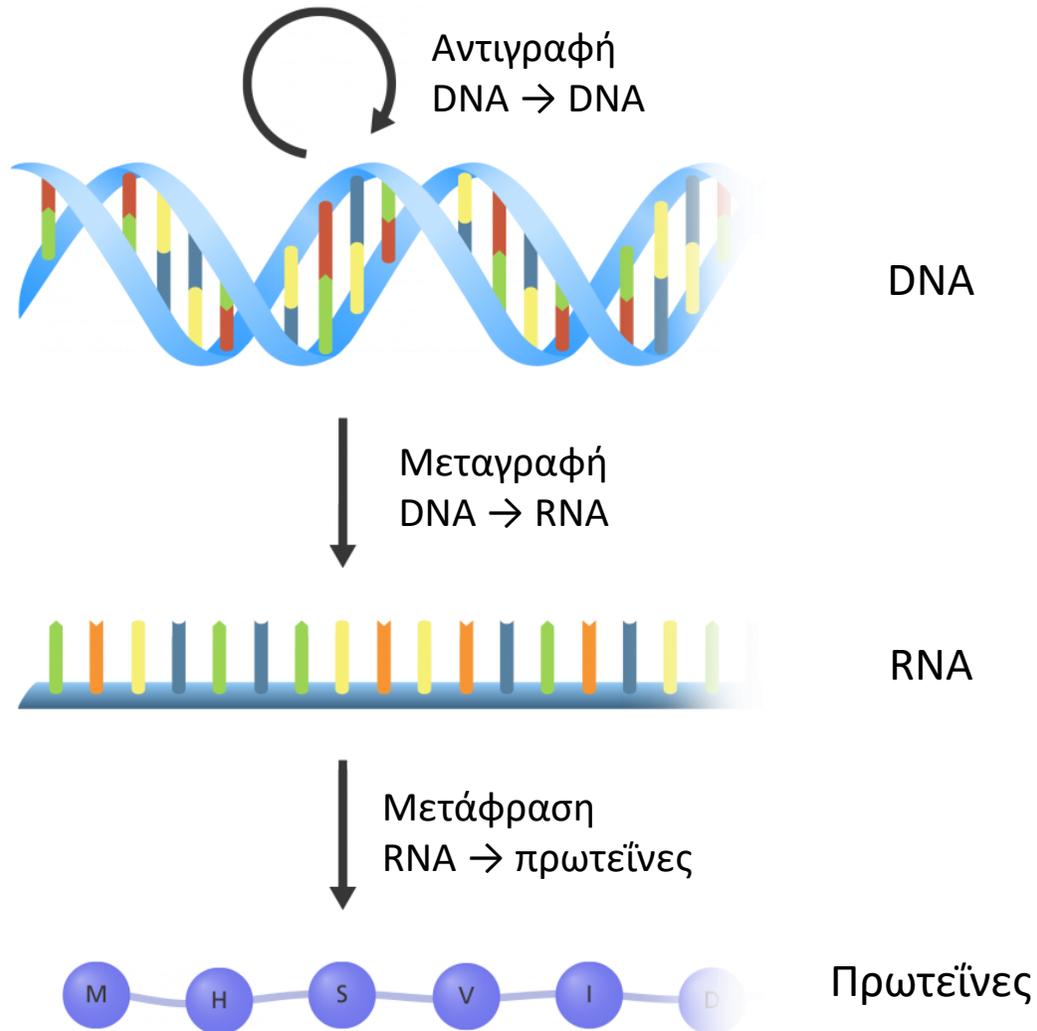


Το βασικό δόγμα της βιολογίας





Το βασικό δόγμα της βιολογίας



Γονιδίωμα

- Ίδιο σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού
- Περιέχει την πληροφορία για τη σύνθεση όλων των πρωτεϊνών όλων των κυττάρων

Μεταγράψιμο

- Μεταβάλλεται διαρκώς σε απόκριση διαφορετικών ερεθισμάτων/καταστάσεων
- Περιέχει τη λειτουργική πληροφορία για τη σύνθεση των πρωτεϊνών, που το κύτταρο χρειάζεται την εκάστοτε στιγμή

Πρωτέωμα

- Τροποποιείται σε απόκριση του μεταγραφώματος
- Καθορίζει χαρακτηριστικά και λειτουργίες του κυττάρου (φαινότυπος)

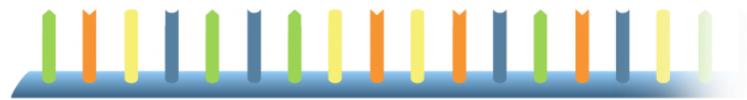
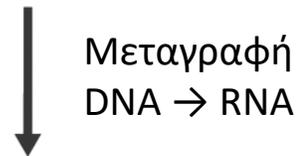


Το βασικό δόγμα της βιολογίας



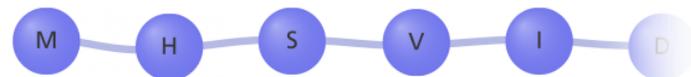
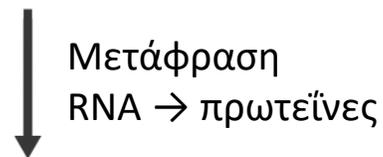
DNA

Αλληλούχιση γονιδιώματος



RNA

Αλληλούχιση μεταγραφώματος
(RNA-seq)



Πρωτεΐνες

Πρωτεομικές αναλύσεις



Πώς μεταβάλλεται το μεταγράψωμα;

- Η ανάγκη για διαρκή προσαρμογή του κυττάρου στις υφιστάμενες συνθήκες προϋποθέτει τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών
- Επαγωγή της σύνθεσης νέων πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της μεταγραφής του αντίστοιχου RNA, που κατευθύνει τη σύνθεση της πρωτεΐνης
- Για τη μελέτη μεταβολών του μεταγραφώματος είναι αναγκαίο να ξέρουμε ποιο τμήμα του μεταγραφώματος μεταβάλλεται και προς ποια κατεύθυνση



Πώς μελετάμε τις μεταβολές στο μεταγράφημα;

Οι αρχικές προσπάθειες επιτρέπουν την ανάλυση μεταβολών της έκφρασης ενός περιορισμένου αριθμού γνωστών γονιδίων:

- 1977, στύπωμα northern (Northern blot, ημιποσοτική μέθοδος, 1 γονίδιο)
- 1992-1993, ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR, ποσοτική μέθοδος, 1-5 γονίδια)
- 1995, μικροσυστοιχίες (array, ημιποσοτική μέθοδος, εκατοντάδες γονίδια)

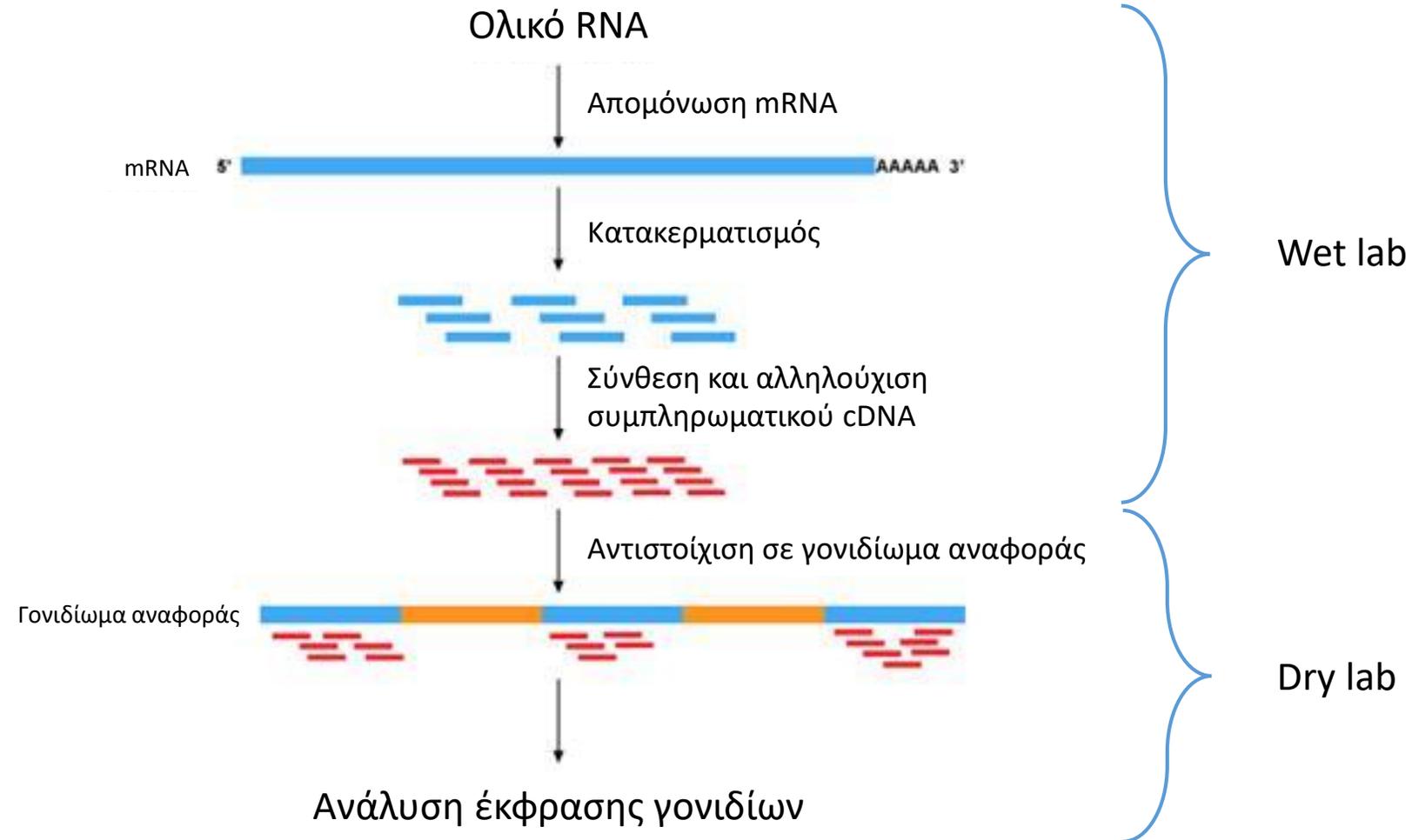


Τι είναι το RNA-seq;

- Το RNA-seq είναι μία ανάλυση υψηλής απόδοσης, που επιτρέπει την πλήρη αποτύπωση του συνόλου του μεταγραφώματος σε μία δεδομένη στιγμή
- Μέσω του RNA-seq είναι εφικτός ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του μεταγραφώματος
- Δεν είναι απαραίτητη η προηγούμενη γνώση των εξεταζόμενων γονιδίων

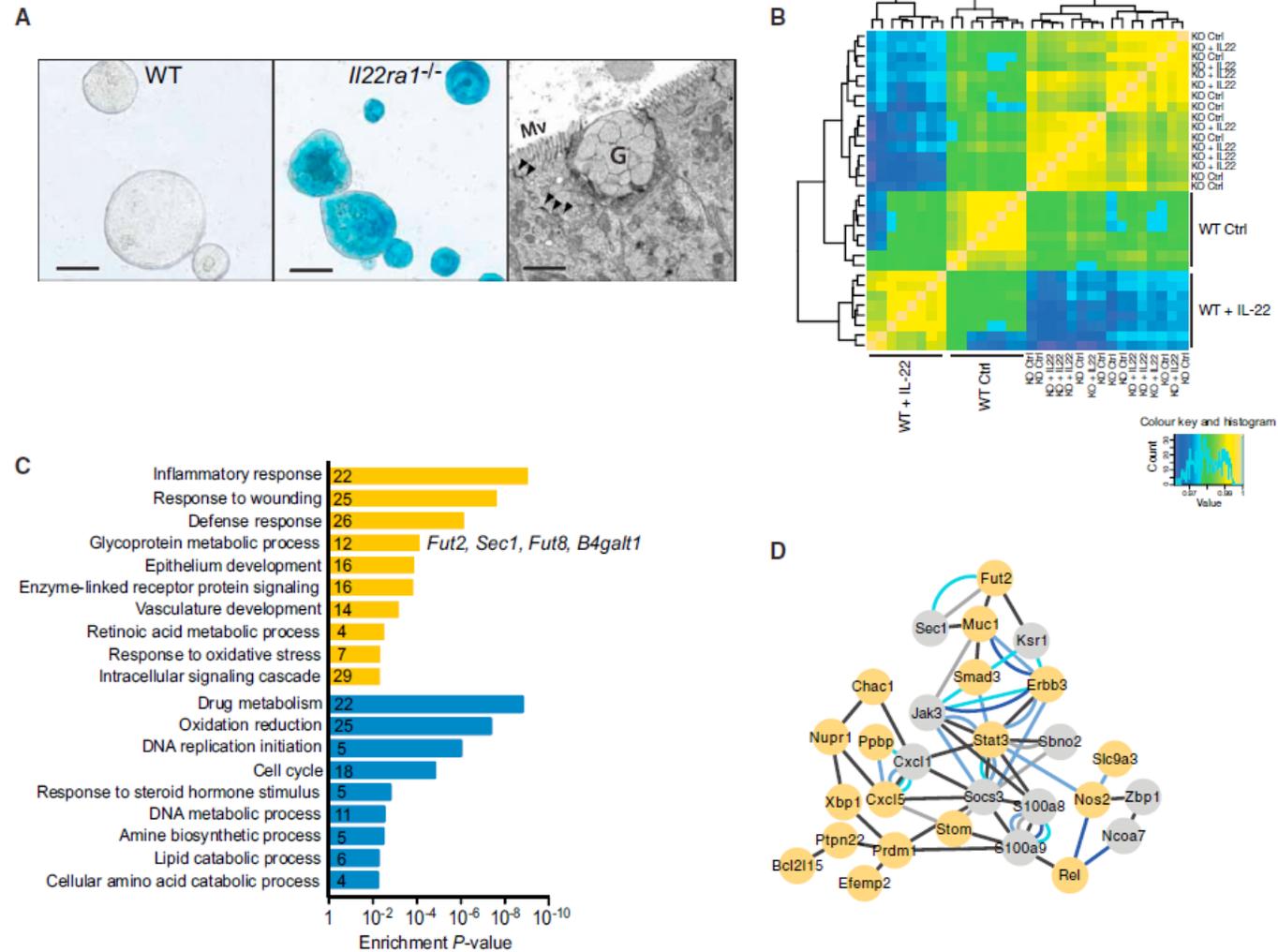


Πώς πραγματοποιείται το RNA-seq;





Πώς μπορούν να αξιοποιηθούν τα αποτελέσματα;





Πώς μπορούν να αξιοποιηθούν τα αποτελέσματα;

- Το RNA-seq είναι εξαιρετικά αποτελεσματική τεχνική για την:
 - Κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών
 - Ταυτοποίηση στόχων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος
 - Εύρεση νέων βιοδεικτών διαγνωστικής ή προγνωστικής σημασίας

CRISPR/Cas9



Γονιδιωματική τροποποίηση

- Η επέμβαση επί συγκεκριμένων γενομικών αλληλουχιών σε ζώντα κύτταρα με στόχο την αναγνώριση, τροποποίηση ή επέκταση των λειτουργιών τους

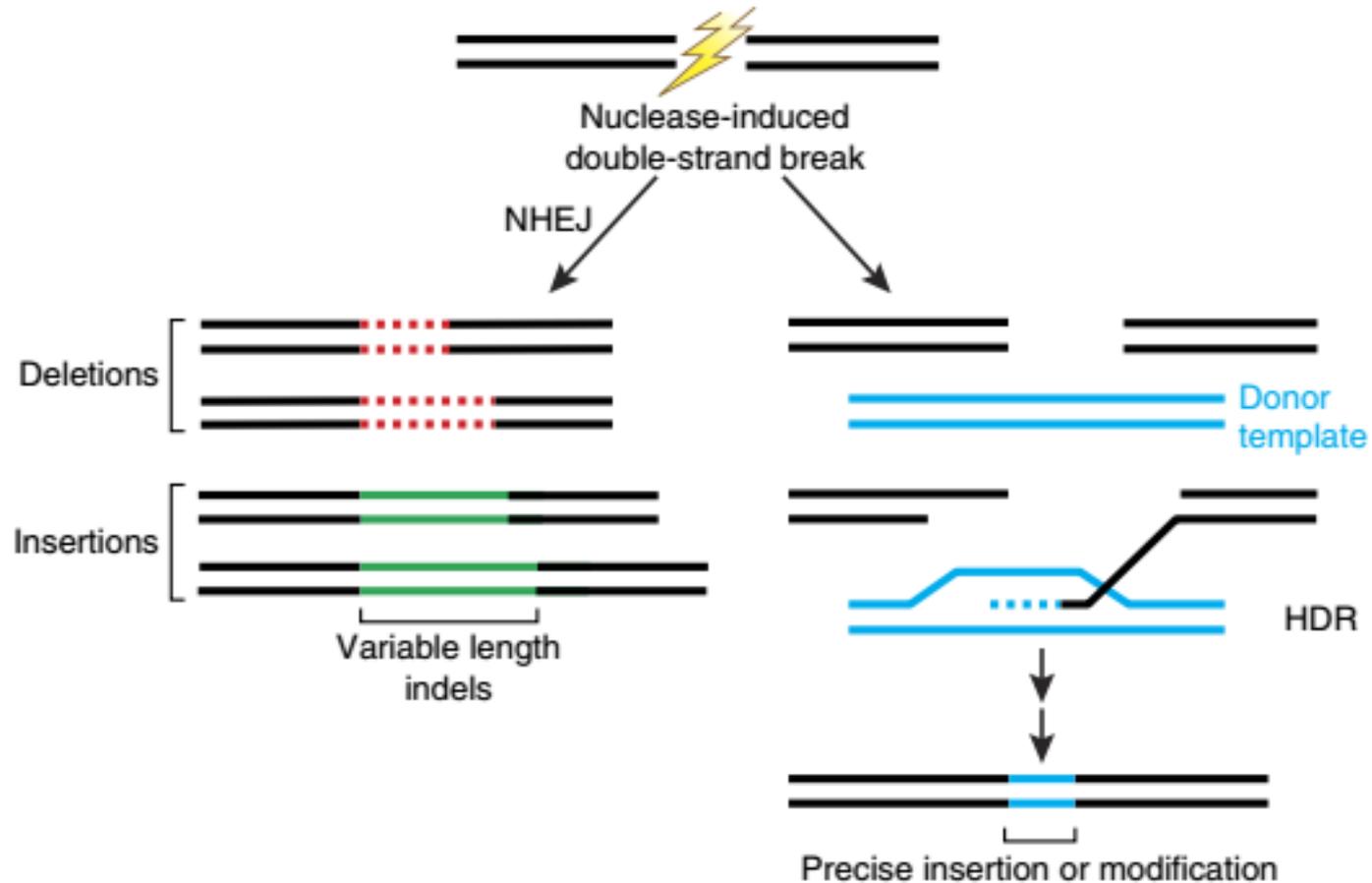


Τι χρειαζόμαστε για τη γονιδιωματική τροποποίηση;

- Για τη γονιδιωματική τροποποίηση αξιοποιούμε τους φυσιολογικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA του κυττάρου
 - Μη ομόλογη σύνδεση των άκρων (Non homologous end joining, NHEJ)
 - Ομόλογος ανασυνδυασμός (Homology driven recombination, HDR)
- Απαραίτητη η δημιουργία μίας διπλής θραύσης (double-stranded break, DSB) στην επιθυμητή γενετική θέση



Πώς αξιοποιείται η διπλή θραύση για γονιδιακή τροποποίηση;



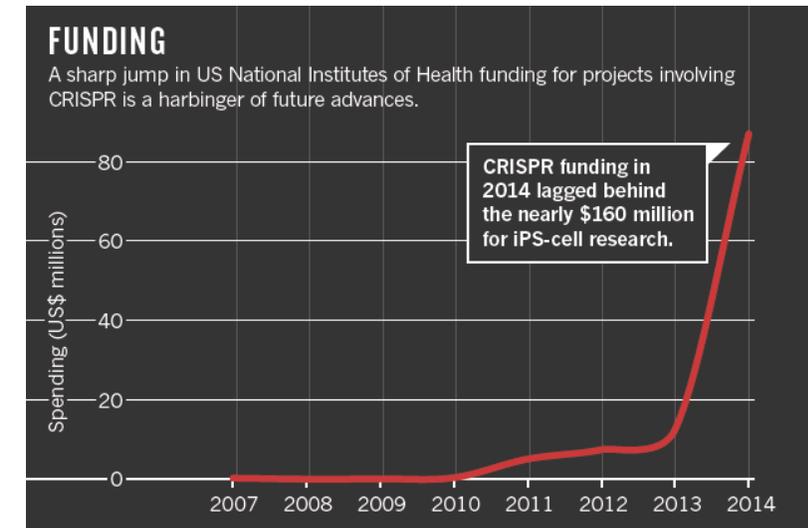
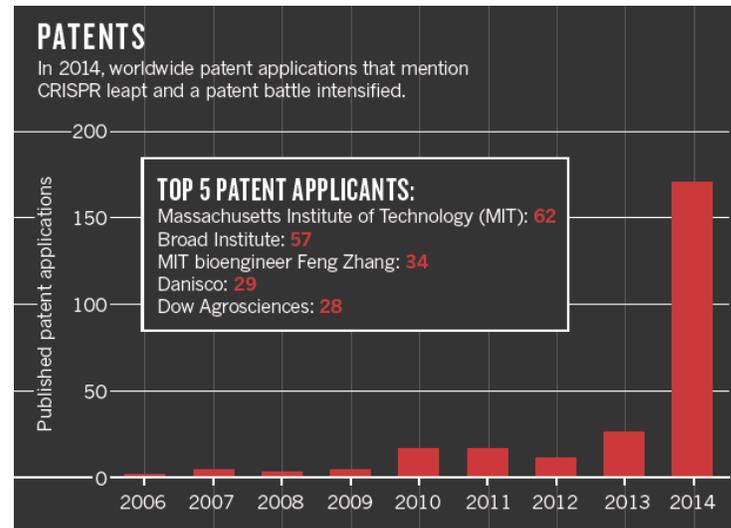
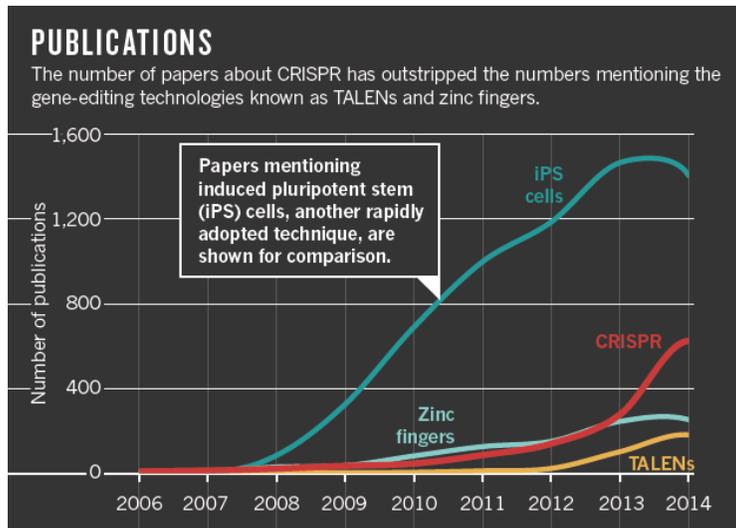


Πώς δημιουργείται η διπλή θραύση;

- Για τη δημιουργία της διπλής θραύσης είναι αναγκαία η χρήση μίας μοριακής μηχανής με διπλή δράση:
 - Δράση σύνδεσης με το DNA, μέσω της οποίας αναγνωρίζονται συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA
 - Δράση ενδονουκλεάσης, μέσω της οποίας πέπτεται το DNA στην περιοχή αναγνώρισης
- Παλαιότερες προσεγγίσεις στηρίχθηκαν στην χρήση πρωτεϊνών Zinc-Finger και TALEN
 - Ακριβές και χρονοβόρες μέθοδοι



Η τελευταία λέξη της μόδας: CRISPR/Cas9

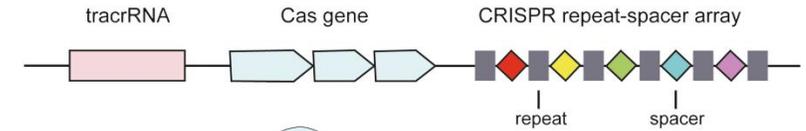




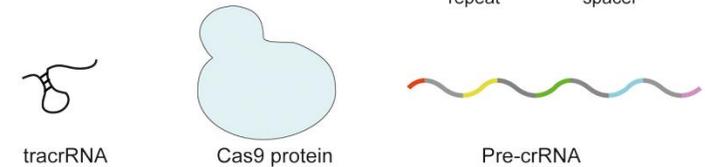
Το σύστημα CRISPR-Cas

- Πρόκειται για ένα σύστημα επίκτητης ανοσίας που εμφανίζουν τα αρχαία και τα βακτήρια
- Αποτελείται από:
 - Τις αλληλουχίες CRISPR (clustered regularly interspersed short palindromic repeats)
 - Οι αλληλουχίες CRISPR περιλαμβάνουν τμήματα ξένου DNA, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
 - Τις νουκλεάσες Cas
 - Τις αλληλουχίες tracrRNA
- Για την αναγνώριση των αλληλουχιών και την πέψη του DNA είναι απαραίτητες οι αλληλουχίες PAM (protospacer adjacent motif)

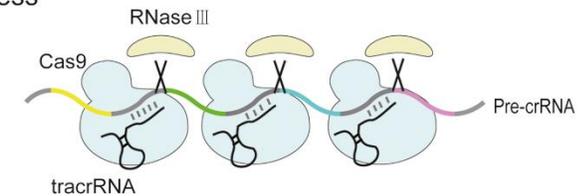
Genomic CRISPR locus



Transcription



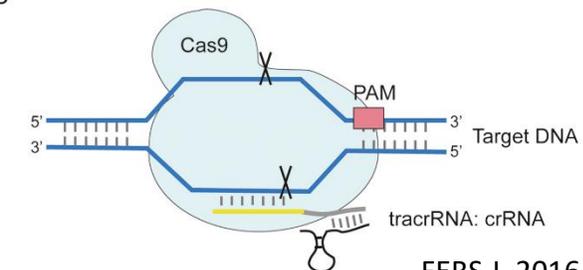
Post-transcription process



tracrRNA-crRNA-Cas9 complex formation



Cas9-mediated cleavage



Το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην γονιδιωματική τροποποίηση

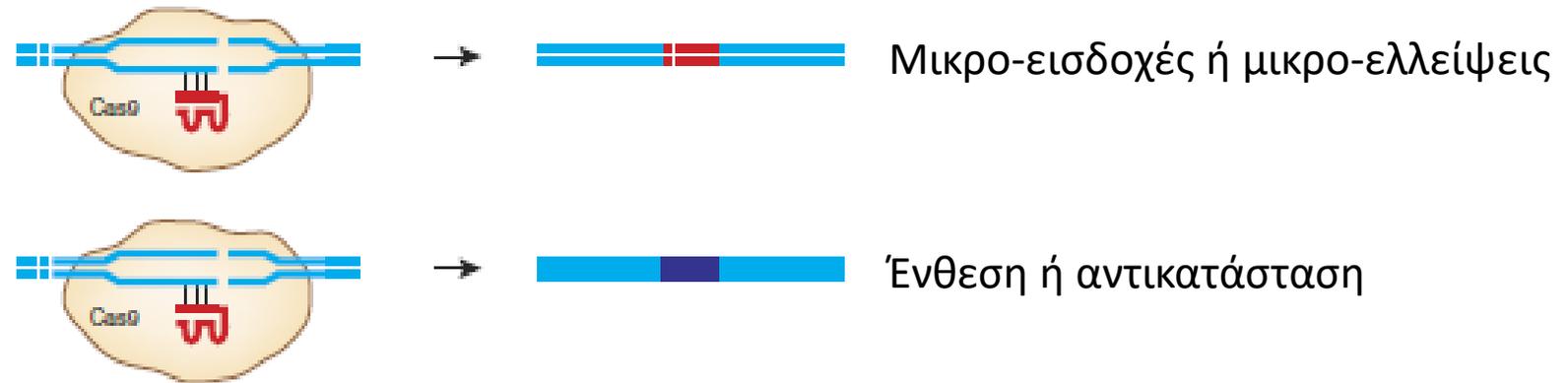
A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Chylinski,^{3,4*} Ines Fonfara,⁴ Michael Hauer,^{2†}
Jennifer A. Doudna,^{1,2,5,6‡} Emmanuelle Charpentier^{4‡}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems provide bacteria and archaea with adaptive immunity against viruses and plasmids by using CRISPR RNAs (crRNAs) to guide the silencing of invading nucleic acids. We show here that in a subset of these systems, the mature crRNA that is base-paired to trans-activating crRNA (tracrRNA) forms a two-RNA structure that directs the CRISPR-associated protein Cas9 to introduce double-stranded (ds) breaks in target DNA. At sites complementary to the crRNA-guide sequence, the Cas9 HNH nuclease domain cleaves the complementary strand, whereas the Cas9 RuvC-like domain cleaves the noncomplementary strand. The dual-tracrRNA:crRNA, when engineered as a single RNA chimera, also directs sequence-specific Cas9 dsDNA cleavage. Our study reveals a family of endonucleases that use dual-RNAs for site-specific DNA cleavage and highlights the potential to exploit the system for RNA-programmable genome editing.

17 AUGUST 2012 VOL 337 SCIENCE

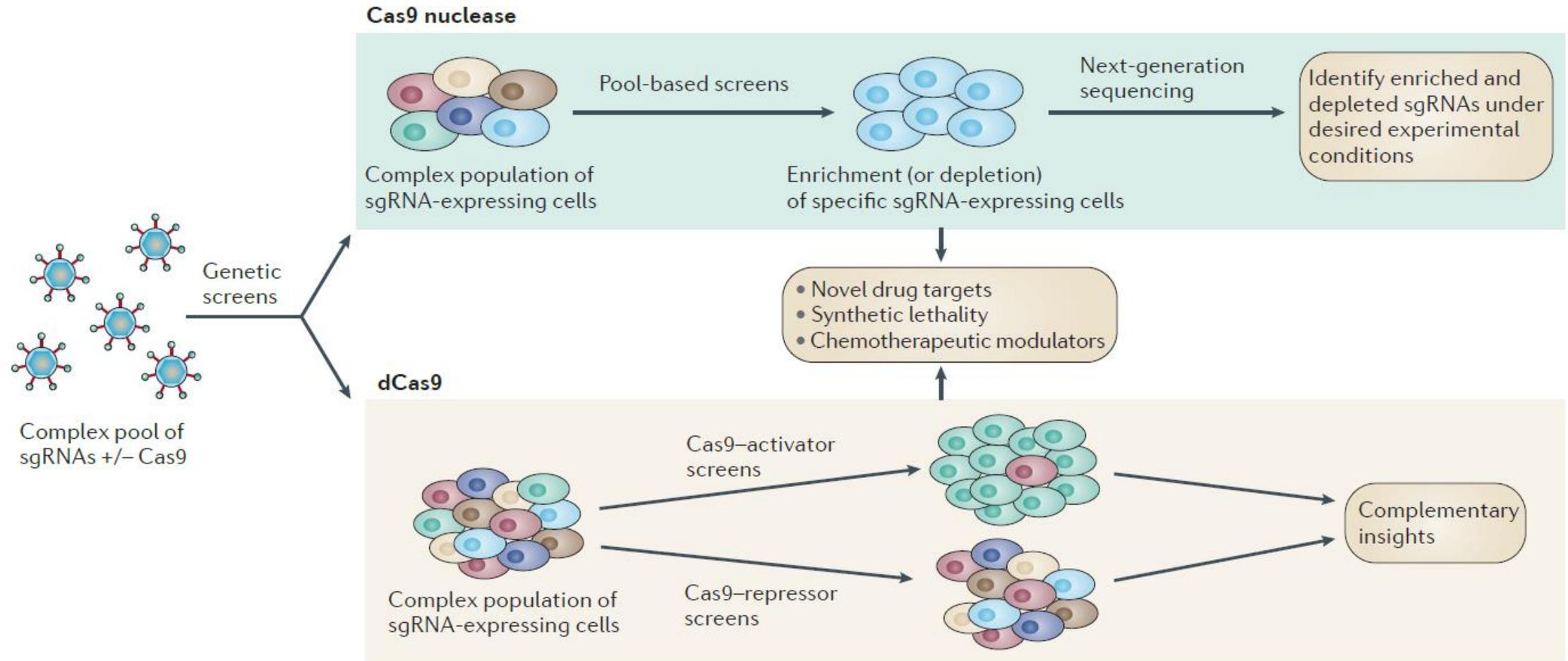
Τι συμβαίνει μετά την εισαγωγή DSB;



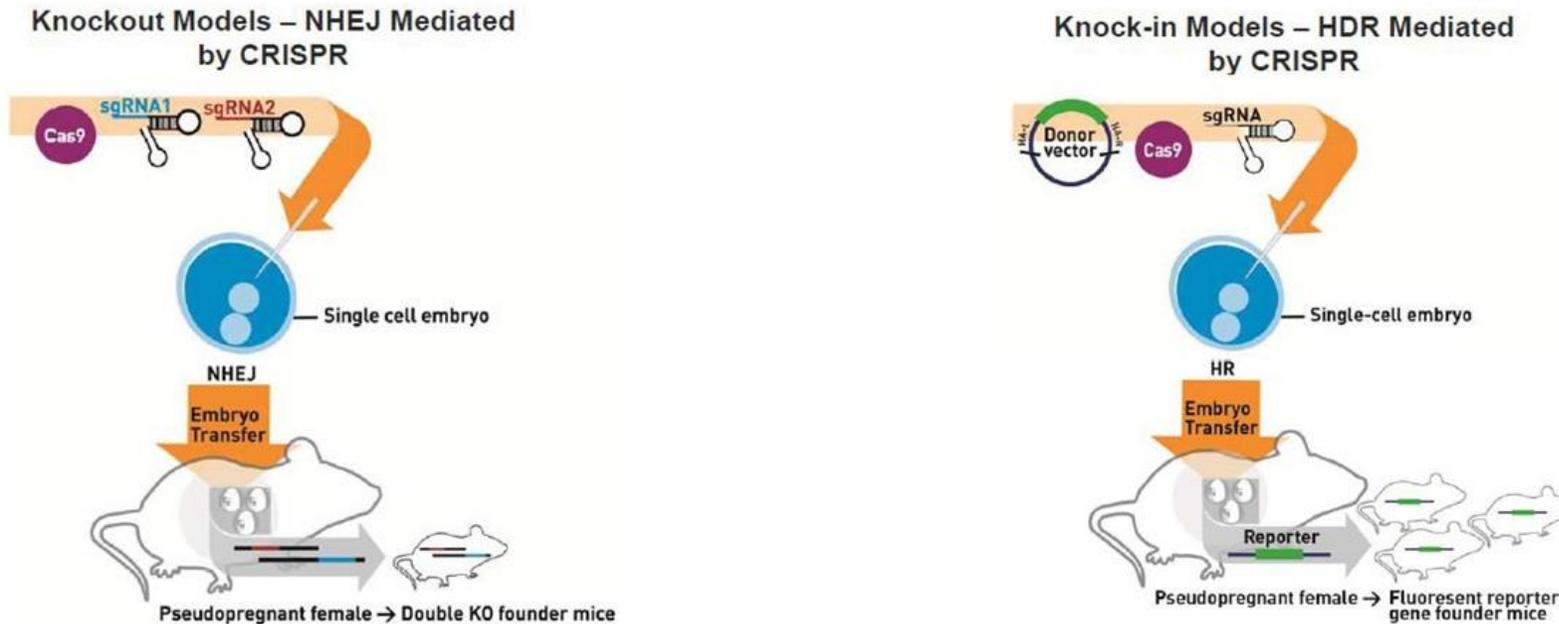
Προκλήσεις στη γονιδιωματική τροποποίηση με CRISPR-Cas9

- Στόχοι είναι:
 - Βελτίωση εκλεκτικότητας
 - Βελτίωση αποτελεσματικότητας
 - Έλεγχος του χρονικού σημείου και του ιστού όπου λαμβάνει χώρα η τροποποίηση

Άλλες εφαρμογές: Έλεγχος λειτουργιών γονιδιώματος

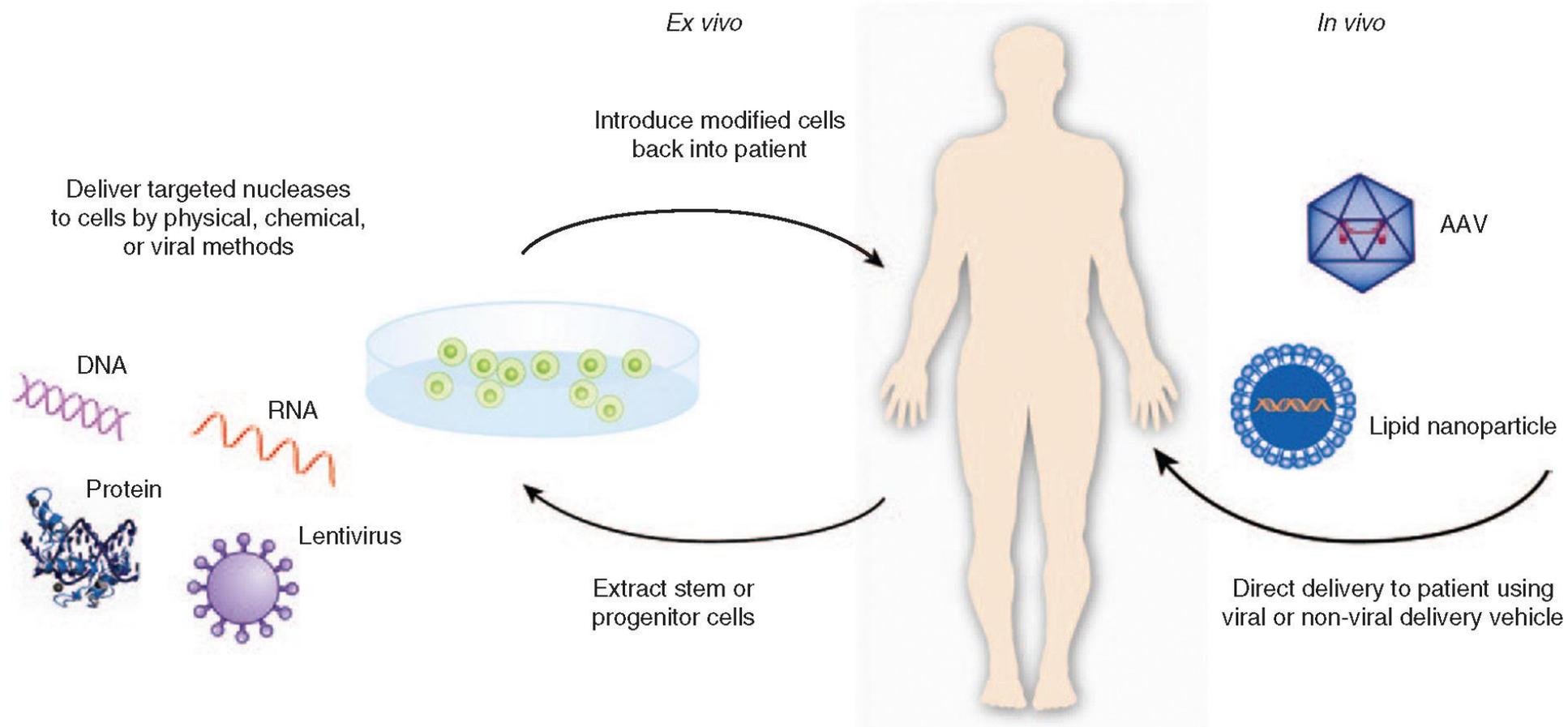


Άλλες εφαρμογές: Δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών



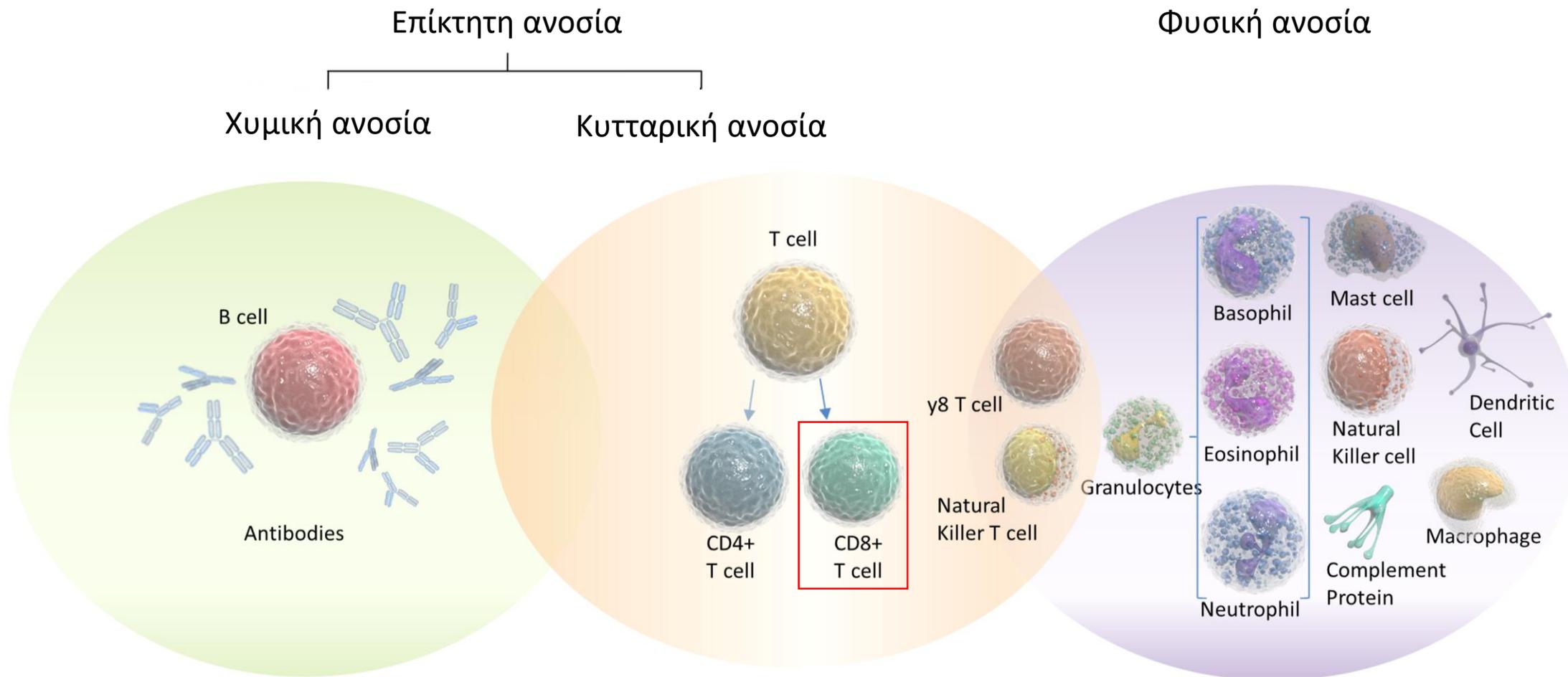
Μεγάλο πλεονέκτημα συγκριτικά με τις κλασικές τεχνικές η εξοικονόμηση χρόνου: απαιτούνται περίπου 3 μήνες έναντι > 12

Άλλες εφαρμογές: Γονιδιακή Θεραπεία

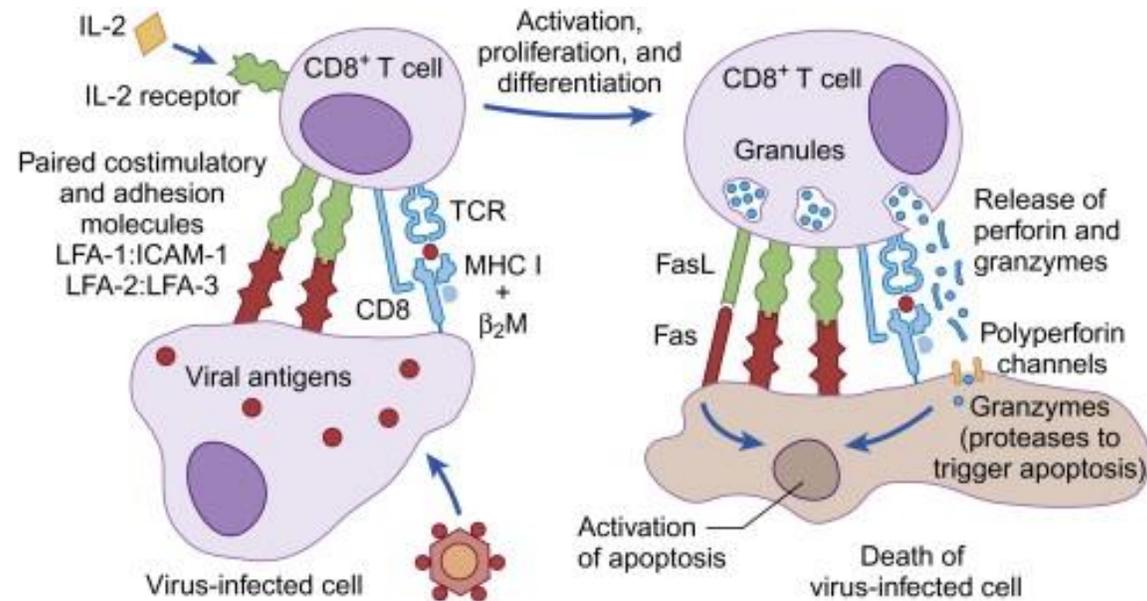


CAR-T cells

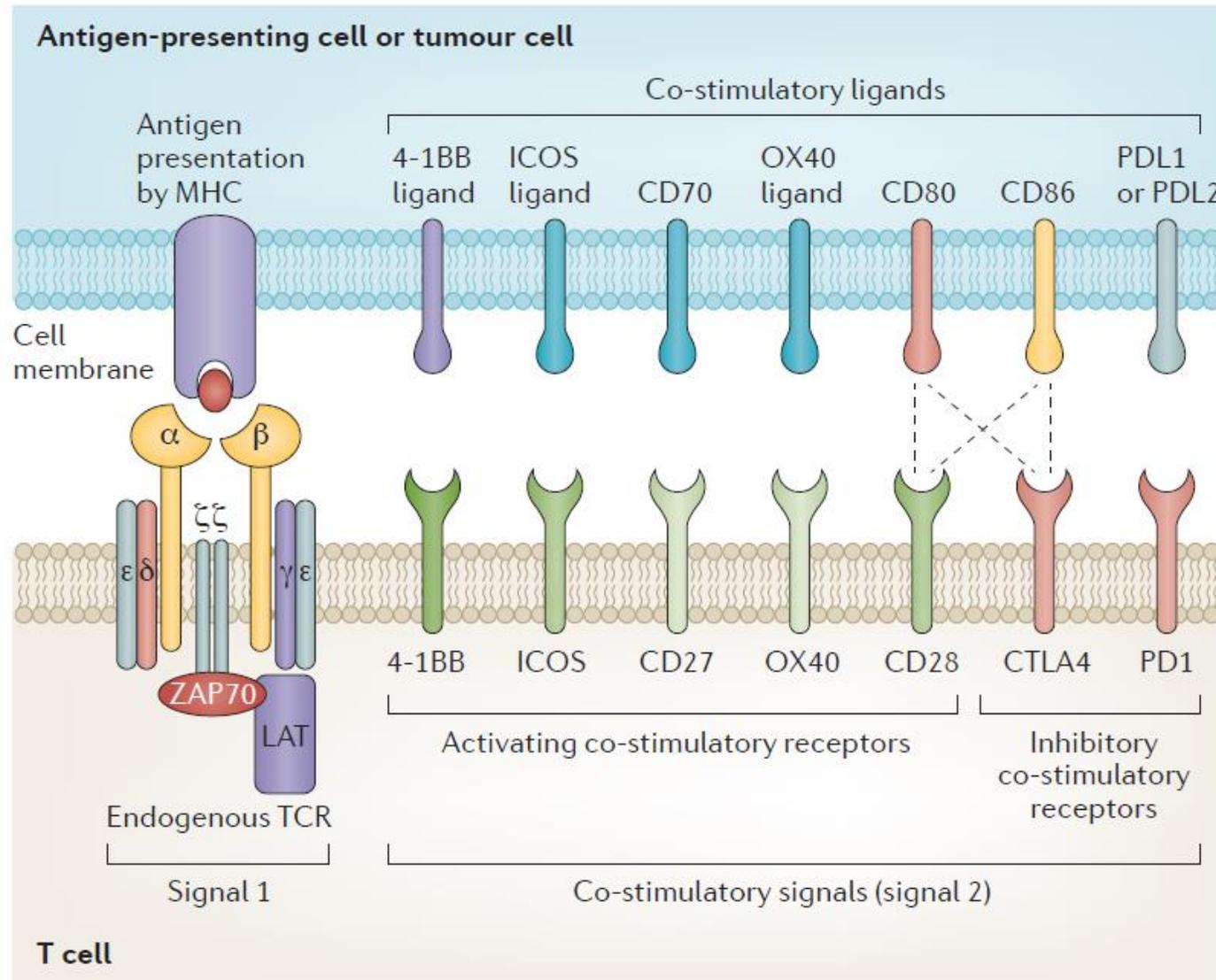
Φυσική και επίκτητη ανοσία



Τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα είναι κυτταροτοξικά

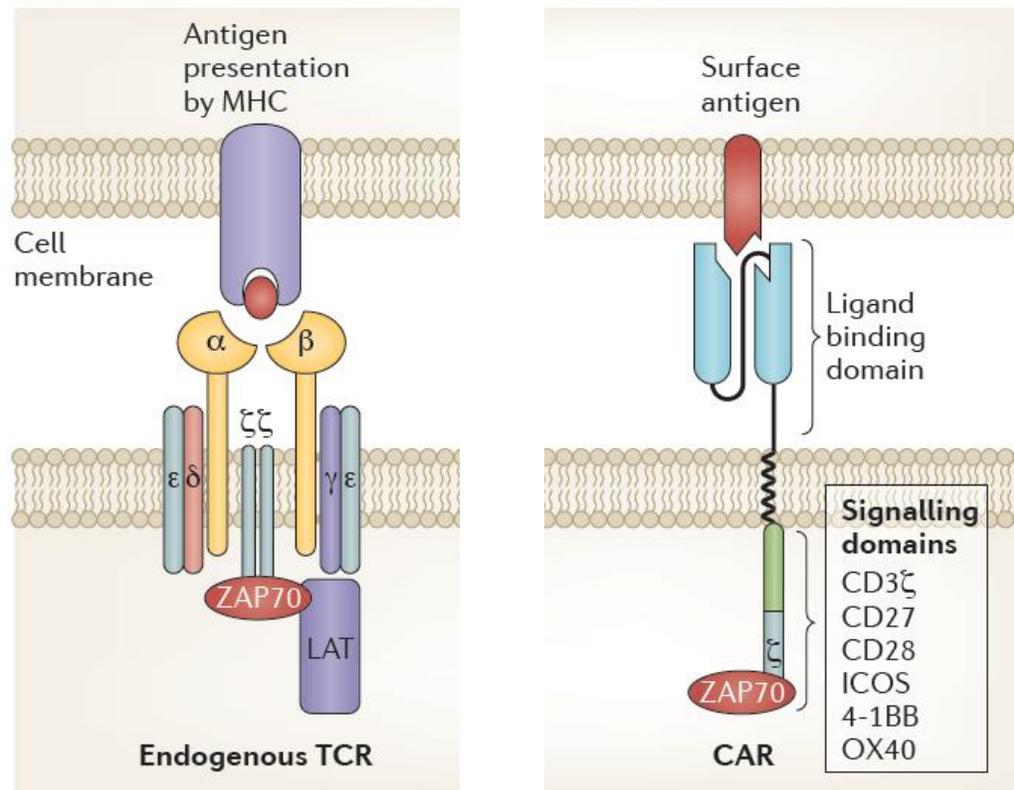


Η ενεργοποίηση των CD8⁺ είναι πολύπλοκη



CAR-T κύτταρα

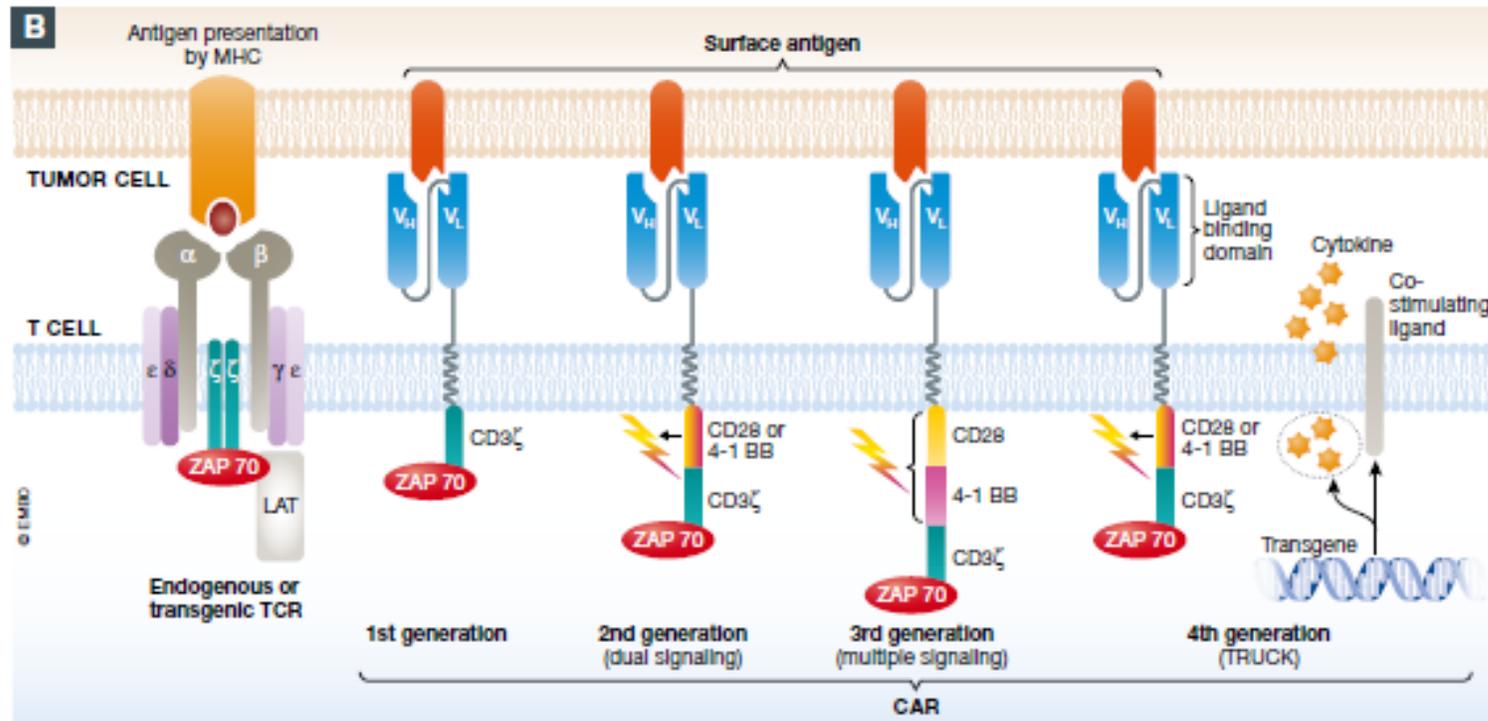
- Στα T λεμφοκύτταρα με χιμαιρικό υποδοχέα αντιγόνου (CAR) ο υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων έχει αντικατασταθεί από έναν χιμαιρικό υποδοχέα



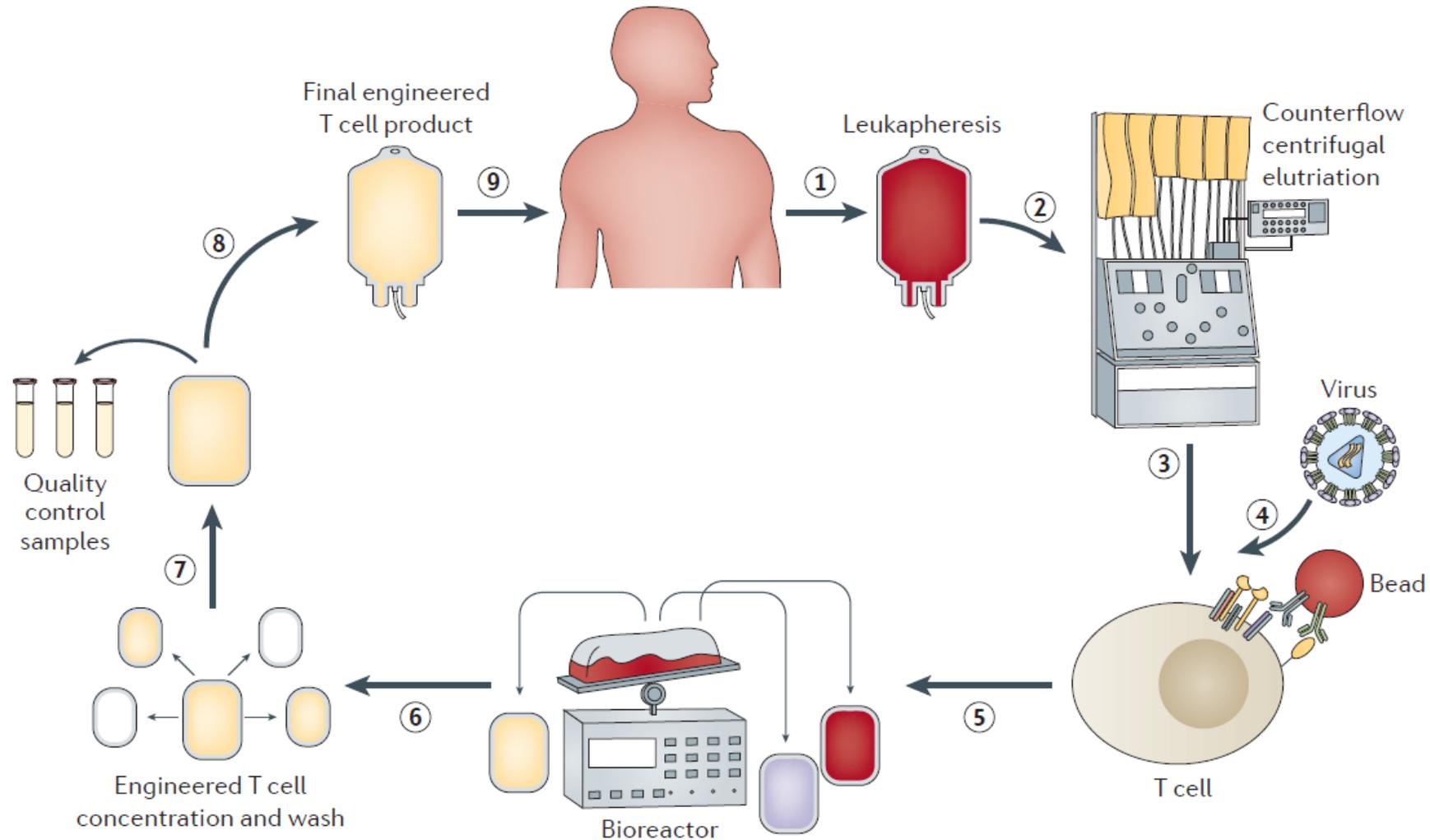
CAR-T κύτταρα

- Στα T λεμφοκύτταρα με χιμαιρικό υποδοχέα αντιγόνου (CAR) ο υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων έχει αντικατασταθεί από έναν χιμαιρικό υποδοχέα
- Ο χιμαιρικός υποδοχέας αντιγόνου επιτρέπει την αναγνώριση οποιουδήποτε αντιγόνου επιλέξουμε και την καταστροφή του κυττάρου που το φέρει

Πώς εξελίσσεται ο χιμαιρικός υποδοχέας;



Αγωγή με CAR-T κύτταρα



CAR-T κύτταρα στην κλινική πράξη

- Έως σήμερα έχουν λάβει άδεια κυκλοφορίας από τον FDA και τον EMA δύο σκευάσματα που στηρίζονται στα CAR-T κύτταρα:
 - Kymriah
 - Yescarta
- Πρόκειται για CAR-T κύτταρα που στοχεύουν έναντι του CD19
- Πλήρης ίαση ~50% των περιπτώσεων
- Υψηλό κόστος αγωγής (\$370000-475000)

Ευχαριστώ για την προσοχή σας