Ільчевський Володимир Володимирович
студент IV курсу
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Україна

Шопова Злата Степанівна
студентка III курсу
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Україна

Литвинов Григорій Сергійович
професор кафедри промислової біотехнології
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Україна

CRISPR-НАНОРОБОТ, ЯКИЙ РЕВОЛЮЦІОНІЗУВАВ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Анотація. *Мета роботи - дослідження й аналіз наукових праць спеціалістів в галузі генної інженерії, зокрема праць Дженніфер Дудни (Нобелівська премія 2020) та інших. CRISPR-системи – новітня біотехнологія редагування геномів вищих організмів, яка запозичує у природи алгоритми захисного механізму протидії бактеріофагам імунною системою бактерій. В основу методу покладено взаємодію ділянки бактеріальної ДНК, короткі паліндромні кластерні повтори, або CRISPR.*
Ключові слова: *CRISPR, TALEN, CRD, Cas12a, Т-клітина, РАК, анемія.*

ВСТУП

Великі відкриття часто виявляються серією щасливих збігів, однак якщо розглянути цей факт дещо ретельніше, то можна дійти висновку, що по справжньому видатні відкриття постають перед нами тільки в результаті важкої дослідницької роботи науковців. Молекулярній біології пощастило мати одразу два фундаментальних відкритті за майже ніж півсторіччя: перша революція відбулася в 1970-х роках, коли були відкриті ферменти рестрикції, без яких неможливе молекулярне клонування і генна інженерія (Нобелівська премія з

фізіології і медицини 1978 р. В. Арберу, Д. Натансу, Г.Сміту) і відкриття Crispr/Cas-систем, що дозволяють редагувати геном не тільки прокаріот, але і людини(Нобелівська премія з хімії, 2020р. Д. Даудна таЕ. Шарпантье).

Редагування геному – це модифікація геномної ДНК в певній цільовій ділянці в широкому спектрі типів клітин і організмів, включаючи інсерцію, делецію і заміну ДНК, що призводить до інактивації генів-мішеней, надання нових генетичних ознак і корекції патогенних мутацій генів[1].

В даний час в світі існують три основні інструменти редагування геному: нуклеази цинкового пальця (ZFNs), транскрипційні активатор-подібні ефекторні нуклеази (TALENs) і керовані РНК системи CRISPR (Короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами)-Cas (CRISPR-асоційовані) нуклеази. Завдяки перевагам простої конструкції, низької вартості, в порівнянні з іншими методами, високої ефективності і короткому циклу системи CRISPR-Cas стали найбільш широко використовуваною технологією редагування генома в лабораторіях молекулярної біології по всьому світу .

Дана робота ставить перед собою мету ознайомити Вас із системамим CRISPR-Cas, включаючи інновації та додатки в дослідженнях захворювань людини і генної терапії, а також проблеми і можливості, з якими доведеться зіткнутися при практичному застосуванні систем CRISPR-Cas, поточний і майбутній вплив даного інструменту у науці, медицині та біотехнології.[2]

АНАЛІЗ ТРАДИЦІЙНИХ РЕКОМБІНАНТНИХ МЕТОДІВ РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМА

Першим поколінням інструментів редагування генома є ZFN білкові комплекси, що містять в якості керуючих структур певний тип білкових доменів «цинкові пальці», які містять молекулу цинку і за формою нагадують палець. Кожен з цих білкових доменів здатний розпізнавати і специфічно зв'язувати певну послідовність молекули ДНК з трьох нуклеотидів. Створюючи штучні нуклеази, для точкового впливу на цікавлячі нас ділянки в складі генома, конструюється ланцюжок з "цинкових пальців" так, що вони

впізнають саме цільову ділянку ДНК.

Даний метод не отримав широкого поширення, так як розпізнавання повторів з трьох нуклеотидів не є точним, що може призвести, в ряді випадків, до розрізання молекули ДНК на ділянках, які не є цільовими.

Більш перспективним засобом виборчого впливу на ДНК виявилися конструкції на основі “химерних нуклеаз” , названих нуклеазами TALEN. Основою для їх створення послужили ефекторні білки, подібні до активатора транскрипції (TALE), які ідентифікують і запускають певні промотори генів рослин за допомогою набору тандемних повторів.

Штучна нуклеаза TALEN складається з двох функціональних доменів: ДНК-розпізнаючого домену і неспецифічного домену розщеплення ДНК *Fok I*. Роль ДНК-розпізнаючої структури в них приймають білкові домени (TALE), які в свою чергу включають в себе центральний повторюваний домен (CRD). Він забезпечує зв'язування ДНК і складається з тандемних повторів (містить 34 амінокислотних залишки), кожен з яких «впізнає» тільки один нуклеотид в нуклеотидній послідовності-мішені. Два амінокислотних залишки в повторі, розташовані у положеннях 12 і 13 високоваріабельні (повторювана змінна напрямку – RVD) і відповідальні за розпізнавання специфічного нуклеотиду з виродженістю зв'язування декількох нуклеотидів з диференціальною ефективністю.

МЕХАНІЗМ CRISPR

Ключовим кроком у редагуванні генома організму є вибіркове націлювання на певну послідовність ДНК. Дві біологічні макромолекули, білок Cas9 і направляюча РНК, взаємодіють, утворюючи комплекс, який може ідентифікувати цільові послідовності з високою селективністю.

Білок Cas9 відповідає за локалізацію і розщеплення ДНК-мішені, як в природних, так і в штучних системах CRISPR/Cas. Білок Cas9 має шість доменів, REC I, REC II, мостоподібну спіраль (Bridge Helix), PAM, HNH і RuvC.

Домен Rec I є найбільшим і відповідає за зв'язування направляючої РНК. Роль домену REC II ще недостатньо добре вивчена. Багата аргініном місткова

спіраль має вирішальне значення для ініціювання активності розщеплення при зв'язуванні ДНК-мішені. Домен, що взаємодіє з PAM, надає специфічність PAM і, отже, відповідає за ініціювання зв'язування з ДНК-мішенню. Домени HNH і RuvC це нуклеазні домени, які розрізають одноланцюгову ДНК. Вони високогомологічні доменам HNH і RuvC, виявленим в інших білках. [3]

Білок Cas9 залишається неактивним за відсутності направляючої РНК. В системах CRISPR напрямна РНК складається з однієї нитки РНК, яка утворює Т-подібну форму, що складається з однієї тетрапетлі і двох або трьох стовбурових петель. Направляюча РНК спроектована так, щоб мати 5' - кінець, який є комплементарним послідовності ДНК-мішені

Ця штучна направляюча РНК зв'язується з білком Cas9 і при зв'язуванні індукує конформаційну зміну білка. Конформаційна зміна перетворює неактивний білок в його активну форму. Механізм конформаційної зміни до кінця не вивчений, але Джинек і його колеги припускають, що стеричні взаємодії або слабке зв'язування між бічними ланцюгами білка і основами РНК можуть викликати цю зміну.

Як тільки білок Cas9 активований, він шукає ДНК-мішень, зв'язуючись з послідовностями, які відповідають його послідовності мотиву протоспейсера (PAM). PAM-це послідовність з двох або трьох основ, розташована в межах одного нуклеотиду нижче області, комплементарної направляючої РНК. PAM були ідентифіковані у всіх системах CRISPR, і конкретні нуклеотиди, що визначають PAM, специфічні для конкретної категорії систем CRISPR. PAM у Streptococcus pyogenes становить 5' - NGG-3'. Коли білок Cas9 знаходить потенційну цільову послідовність з відповідним PAM, білок розплавить основи безпосередньо перед PAM і з'єднає їх з комплементарною областю на направляючій РНК (Sternberg et al. 2014). Якщо комплементарна область і область-мішень з'єднуються правильно, нуклеазні домени RuvC і HNH будуть розрізати ДНК-мішень після третього нуклеотидної основи вище за напрямком від PAM.

РОЗШИРЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ЗА РАХУНОК CRISPR/CAS12a

Розробки CRISPR-систем постійно вдосконалюються і дослідження

проведене командою під керівництвом доктора Вей Лі з Інституту зоології Китайської Академії наук, надає нам більш дієздатні Cas12a / Cpf1, що розширює наш арсенал в на основі CRISPR-Cas і підвищує ефективність націлювання ферментів Cas12a шляхом розробки та оптимізації каркаса CRISPR-РНК.

Cas12a володіє унікальними характеристиками, що робить його взаємним доповненням систем CRISPR-Cas9. Однак деякі недоліки все ще існують і вимагають поліпшення, такі як менша сфера геномного спийняття і менша ефективність таргетування.

Відносно нещодавно було ідентифіковано кілька нових локусів CRISPR-Cas12a, які були використані для виконання функцій редагування генома ссавців. Відкриті шість нових ортологів Cas12a здатні редагувати геноми в клітинах ссавців.

Деякі з цих шести ортологів Cas12a можуть розпізнавати більш простий 5'-TTN PAM, що в принципі вказує на чотириразове збільшення геномного охоплення в порівнянні з широко використовуваними AsCas12a і LbCas12a. крім того, в аналізах розщеплення in vitro було виявлено, що HkCas12a може використовувати неканонічні PAMs (5'-YYN і 5'-TBBN-). Хоча в клітинних лініях було визначено менше послідовностей PAM, також можна реалізувати HkCas12a для редагування генома ссавців з використанням 5'-YTN і 5'-TYYN PAMs. У порівнянні з канонічним 5'-TTN PAM, PAMS, розпізнаний HkCas12a, збільшує діапазон націлювання HkCas12a в геномах ссавців в три рази. [5]

БІОМЕДИЧНИЙ ВПЛИВ CRISPR/CAS ТЕХНОЛОГІЇ

2020 рік був видатним роком для CRISPR-відкриття нових білків Cas, використання технології CRISPR для вивчення та розробки діагностичних тестів COVID-19, Нобелівська премія та багато іншого. Минулий рік також приніс результати клінічних випробувань з використанням технології CRISPR, про які вперше було повідомлено повідомили в 2019 році, і початок нових клінічних випробувань.

Поточні випробування з використанням методів лікування на основі CRISPR все ще знаходяться на ранніх стадіях. Це означає, що навіть якщо

методи лікування безпечні та ефективні, вони, ймовірно, все ще знаходяться в декількох роках від затвердження Всесвітньою організацією охорони здоров'я.

Захворювання крові

Передісторія хвороби

Еритроцити використовують гемоглобін для перенесення кисню з легенів в усі тканини організму. Мутації в гені, що кодує частину молекули гемоглобіну, викликають два різних генетичних розлади: серповидно-клітинну хворобу (SCD) і бета-таласемію.

Підхід, який застосовується для лікування захворювань крові за допомогою технології CRISPR, безпосередньо не фіксує варіанти генів, які викликають захворювання, але використовує хитрий обхідний шлях: замість прямої фіксації мутацій, що викликають захворювання, мета полягає в підвищенні рівня фетального гемоглобіну. Це форма гемоглобіну, яку плід виробляє в утробі матері, але діти і дорослі не виробляють. Не зовсім зрозуміло, чому люди переключаються з однієї форми гемоглобіну на іншу, але фетальний гемоглобін може зайняти місце дефектного дорослого гемоглобіну в еритроцитах. Це лікування може бути використано для лікування як бета-таласемії, так і серповидно-клітинної хвороби.

Першим кроком лікування є збір стовбурових клітин крові пацієнта з його крові. Потім вчені редагують геноми цих клітин. Потім хіміотерапія усуває дефектні стовбурові клітини крові в організмі пацієнта, і мільярди відредагованих геномом стовбурових клітин повертаються в їх кровотік. Стовбурові клітини крові, відредаговані генами, доставляються внутрішньовенно.

Цей підхід до лікування вважається редагуванням геному ex vivo, оскільки редагування відбувається поза тілом пацієнта. Редагування Ex vivo гарантує, що інструменти для редагування генома вступають в контакт тільки з правильними клітинами-мішенями.

В ході першого застосування терапії на основі CRISPR ex vivo для

лікування генетичного захворювання дослідники лікували пацієнта з бета-таласемією в Німеччині в лютому 2019 р.з тих пір було проліковано ще 12 пацієнтів, і сім з них спостерігалися протягом принаймні трьох місяців. Жоден з пацієнтів не потребував переливання крові протягом декількох місяців після лікування.

Всі пацієнти, які отримували лікування з приводу SCD або бета-таласемії, демонструють нормальний або майже нормальний рівень гемоглобіну, де принаймні 30% (SCD) або 40% (бета-таласемія) гемоглобіну є фетальним гемоглобіном.

РАК

Т-клітини, тип білих кров'яних тілець, необхідних для відповіді імунної системи, покриті рецепторами, які розпізнають інші клітини як безпечні або загрозливі. Вони патрулюють тіло, вбиваючи чужорідні або небезпечні клітини чи залучаючи інші клітини для надання допомоги. У імунотерапії CAR-T дослідники генетично проектують Т-клітини пацієнта, щоб мати рецептор, який розпізнає ракові клітини пацієнта, наказуючи Т-клітинам атакувати. Імунна система регулюється, щоб уникнути нападу на здорові клітини. Деякі рецептори Т-клітин працюють як "контрольні точки", які визначають, чи виникає імунна відповідь. Коли Т-клітинний рецептор PD-1 вступає в контакт з молекулою, що називається PD-L1, на іншій клітині, він повідомляє, що це "безпечна" клітина, і Т-клітина залишає її в спокої.

Ракові клітини часто маскуються цими сигналами молекулярної безпеки, обманом змушуючи патрулюючі Т-клітини ігнорувати їх. Дослідники використовують CRISPR для редагування гена PD-1 В Т-клітинах, щоб перешкодити їм створювати функціональні рецептори PD-1, щоб їх не могли обдурити ракові клітини. Цей підхід до імунотерапії відомий як інгібування контрольних точок, і він часто використовується в поєднанні з інженерією CAR-T, щоб дати Т-клітинам максимально можливий шанс усунути рак.

Побічні ефекти-небажані зміни в різних місцях генома спостерігалися з низькою частотою і були в основному в тих частинах геному, які не кодують

білки. Небажані зміни на цільовій ділянці зустрічалися частіше (медіана 1,69%).

Відредаговані Т-клітини були виявлені у 11 з 12 пацієнтів через два місяці після інфузії, хоча і на низькому рівні. Пацієнти з більш високим рівнем відредагованих клітин мали менше прогресування захворювання.

ХВОРОБИ ОКА

Вроджений Амавроз Лебера (LCA) є найпоширенішою причиною спадкової дитячої сліпоти, а LCA 10 є найпоширенішою формою LCA. Це захворювання, викликане єдиною нуклеотидною мутацією в гені фоторецептора, викликає важку втрату зору або сліпоту протягом перших кількох місяців життя.

Фоторецепторні клітини в оці перетворюють світло в нервові сигнали, які надходять в мозок. У LCA 10 мутація в гені фоторецептора означає, що клітини виробляють укорочену, дефектну версію найважливішого білка. Цей дефектний білок робить клітини-фоторецептори дисфункціональними. Пацієнти з LCA10 можуть сприймати світло, але дисфункціональні фоторецепторні клітини не можуть надсилати повідомлення в мозок. Без зв'язку між очима і мозком пацієнти страждають на погіршення зору або сліпоту.

Лікуванняза допомогою CRISPR для LCA10 вносить зміни в дефектний ген фоторецептора пацієнта, так що він знову створює повнорозмірний функціональний білок замість короткої, зламаної версії.

Добровольці-пацієнти отримують разову дозу терапії CRISPR шляхом ін'єкції безпосередньо в око. Ін'єкція містить непатогенний вірус (AAV), що несе білок Cas9 і його направляючу РНК. Віруси часто використовуються в генній терапії та редагуванні геному, оскільки вони мають природну здатність проникати в клітини. Для лікування LCA10 вірусний вектор сконструйований таким чином, що терапія активна тільки в фоторецепторних клітинах.

Цей підхід відрізняється від тих, які тестуються на рак і захворювання крові, тому що це лікування in vivo, тобто редагування генома відбувається

всередині тіла пацієнта. У порівнянні з редагуванням ex vivo, редагування in vivo має більше проблем і інший набір ризиків. Один з найбільших ризиків полягає в тому, що засоби доставки вірусів або компоненти редагування генома можуть спровокувати небезпечні імунні реакції у пацієнта. [5]

МОРАЛЬНО-ЕТИЧНИЙ АСПЕКТ. РЕАКЦІЯ НАУКОВОГО СУСПІЛЬСТВА НА ЗАПРОВАДЖЕННЯ CRISPR-СИСТЕМ У МЕДИЧНУ ПРАКТИКУ

Незалежне розслідування, проведене Радою з біоетики Наффілда, дійшло висновку, що редагування ДНК людського ембріона, сперми або яйцеклітини з метою вплинути на характеристики майбутньої людини («успадковане редагування генома») може бути морально допустимим. Якщо це станеться, спочатку необхідно вжити ряд заходів, щоб гарантувати, що редагування генома відбувається етично прийнятними способами. Техніка редагування генома - навмисна зміна цільової послідовності ДНК в живій клітині-теоретично може бути використана при допоміжній репродукції для зміни ДНК людського ембріона, перш ніж він буде перенесений в матку.

В даний час це не є законним у Великобританії, але з часом може стати доступним в якості опції для батьків, які хочуть вплинути на генетичні характеристики своєї майбутньої дитини (наприклад, щоб виключити спадкове захворювання або схильність до раку в більш пізньому віці). Рада заявляє, що можливості, що відкриваються цим радикально новим підходом до репродуктивного вибору, можуть мати серйозні наслідки для окремих осіб і для всього суспільства, і зараз необхідно вжити заходів для підтримки громадських дебатів і введення належного управління.

Список джерел:

1. Wright A.V., Nuñez J.K., Doudna J.A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 2016;164:29–44. [PubMed] [Google Scholar]
2. Nishimasu H, Yamano T, Gao L, Zhang F, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for the altered PAM recognition by engineered CRISPR-Cpf1. Mol Cell. 2017;67:139–47 e132.

3. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013;339:819–23.
4. Kim HK, Song M, Lee J, Menon AV, Jung S, Kang YM, Choi JW, Woo E, Koh HC, Nam JW, Kim H. In vivo high-throughput profiling of CRISPR-Cpf1 activity. Nat Methods. 2017;14:153–9.
5. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. Nat Biotechnol. 2019;35:31–4.