



МЕДВЕДЕВ Сергей Петрович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института цитологии и генетики СО РАН и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), ведущий научный сотрудник Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина. Автор и соавтор 14 научных работ

Ключевые слова: геном человека, геномная инженерия, система CRISPR/Cas, генные мутации, клеточные модели наследственных заболеваний человека.

Key words: human genome, genomic engineering, CRISPR/Cas system, gene mutations, cell-based model of human hereditary diseases

Как отредактировать наследственность

Второе место в десятке научных прорывов 2013 г., по версии журнала «Science», занял метод редактирования геномов под названием CRISPR/Cas, позволяющий манипулировать хромосомной ДНК прямо в живых клетках. Система CRISPR/Cas состоит из компонентов адаптивной иммунной системы бактерий, адаптированных для работы в клетках высших организмов (эукариот), включая человека. С ее помощью можно не только изучать тяжелые, в том числе наследственные, заболевания, но и создавать модели для разработки новых способов их лекарственной и генной терапии

Еще с начала прошлого века ученые пытались понять принципы наследования признаков, хранения, воспроизведения и передачи генетической информации. И их усилия не пропали даром: постепенно были выяснены роль и функции в этих процессах основных «молекул жизни» – ДНК, РНК и белков. Раскрытие материальных основ наследственности и изменчивости организмов по праву было признано одним из важнейших научных достижений человечества XX в.

Наконец, благодаря усилиям тысяч ученых, были разработаны методы манипуляции с молекулами нуклеиновых кислот – носителей наследственной информации. Были открыты *эндоуклеазы рестрикции* (группа ферментов, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот) и разработаны методы клонирования ДНК. Все эти открытия привели к формированию новой науки – *генетической инженерии*.

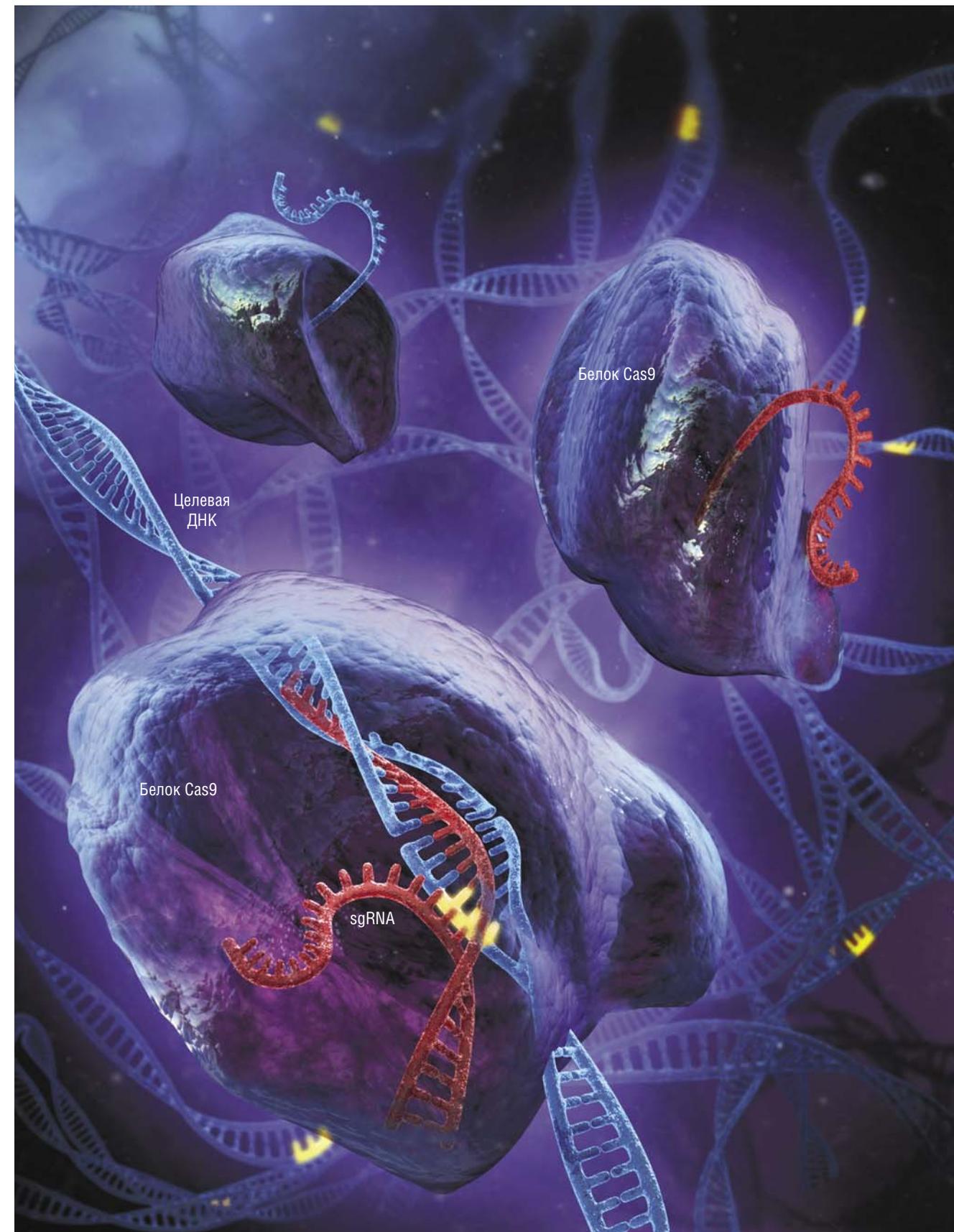
Рубеж между прошлым и нынешним веком был отмечен еще одним важнейшим событием – завершением международного проекта «Геном человека», основной целью которого была расшифровка (определение нуклеотидной последовательности) ДНК всего генома человека. Критики этого проекта утверждали, что его осуществление – пустая трата огромных денежных и людских ресурсов, которая породит больше вопросов, чем ответов. Однако если сейчас трезво взглянуть на результаты этого проекта, то станет очевидно, что он внес неоценимый вклад в развитие современной, в том числе персонализированной, медицины.

В результате его реализации стало возможным раскрытие молекулярных механизмов тысяч наследственных заболеваний, развитие которых связано с конкретными *мутациями* – вариантами последовательности ДНК различных генов. Сегодня уже ни для кого не секрет, что и предрасположенность к возникновению многих тяжелых и распространенных болезней, таких как рак, сахарный диабет и гипертония, также определяется генетически. И проект «Геном человека», безусловно, создал основу для лучшего понимания подобных явлений.

При редактировании генома с помощью системы CRISPR/Cas9 маленькая «руководящая» молекула РНК (sgRNA) направляет белок-фермент Cas9 к целевой последовательности ДНК, комплементарно соединяясь с нужным участком (справа).

Credit: Prof. Feng Zhang, Broad Institute & Massachusetts Institute of Technology

© С. П. Медведев, 2014



Таким образом, к началу XXI в. человечество подошло с огромным багажом знаний о геноме человека и многих других организмов, а также с набором различных методов для его исследования. Казалось бы, чего еще желать? Конечно же, научиться легко и эффективно манипулировать геномами в живых клетках и организмах! Но не является ли это вполне естественное желание лишь очередным капризом ученых?

Все мы знаем, что такое хирургия. Очень упрощенно суть этого медицинского направления заключается в инструментальном удалении больного органа или его части. В случае же трансплантационной хирургии удаленный орган заменяют другим, здоровым. А теперь представьте себе, что аналогичную операцию можно провести на геноме: вырезать «большую» часть молекулы, содержащую мутацию, и заменить ее «здоровой»! Задача, безусловно, более чем актуальная и жизненно важная. Однако для ее решения необходимы соответствующие инструменты. Если хирург пользуется скальпелем или лазером, то для исследователя, который производит операцию на молекуле ДНК, требуются молекулы-инструменты, соответствующие ей по размерам и обладающие высокой точностью.

Одним из таких инструментов, позволяющим манипулировать ДНК в составе хромосом в живых клетках, стала система *CRISPR/Cas*. Справедливости ради нужно сказать, что подобные инструменты уже были разработаны ранее. Среди них – искусственные ферменты нуклеазы, содержащие специальные ДНК-связывающие домены («цинковые пальцы»); химерные нуклеазы *TALENs* – искусственные ферменты, способные связываться практически с любой последовательностью гена и изменять ее. Однако явными преимуществами системы *CRISPR/Cas* являются простота создания, легкость использования и высокая эффективность действия.

В основу *CRISPR/Cas* легла защитная система бактерий, своего рода приобретенный иммунитет, позволяющий им эффективно противостоять вирусам-бактериофагам.

Открытие иммунитета у бактерий началось с обнаружения в бактериальном геноме в 1980-х гг. странных участков ДНК, содержащих множественные одинаковые *палиндромные повторы* (повторяющиеся некодирующие нуклеотидные последовательности), разделенные неодинаковыми и притом уникальными для каждого штамма бактерий участками – *спейсерами*. Эти участки ДНК и были названы *CRISPR* или *CRISPR-кассета* (от *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами).

Результатом *транскрипции* (считывания информации с *CRISPR-касеты*) оказываются короткие некодирующие РНК (*crRNA*), состоящие из спейсера и части палиндромного повторяющегося участка.

Для функционирования системы необходима еще одна некодирующая РНК – *tracrRNA*. В непосредственной близости от большинства *CRISPR* находятся также гены, кодирующие белки *Cas* – ферменты-нуклеазы, способные разрезать нить ДНК.

Для чего все эти молекулы нужны бактериям, выяснилось только около десяти лет назад, когда было сделано открытие, что нуклеотидная последовательность спейсеров в составе *CRISPR-касеты* у определенной бактерии комплементарна последовательностям геномов вирусов, которые поражают бактерии этого штамма. При поиске механизма данного явления выяснилось, что в случае проникновения вируса его ДНК может *рекомбинировать* (обмениваться участками) с нуклеотидной последовательностью *CRISPR-касеты*. В результате с последней могут нарабатываться *crRNA*, способные специфически распознавать ДНК именно этого конкретного вируса. В случае повторной вирусной инфекции *crRNA* в комплексе с *tracrRNA* и белками *Cas* начинает взаимодействовать с вирусной ДНК, что в итоге разрушает ее.

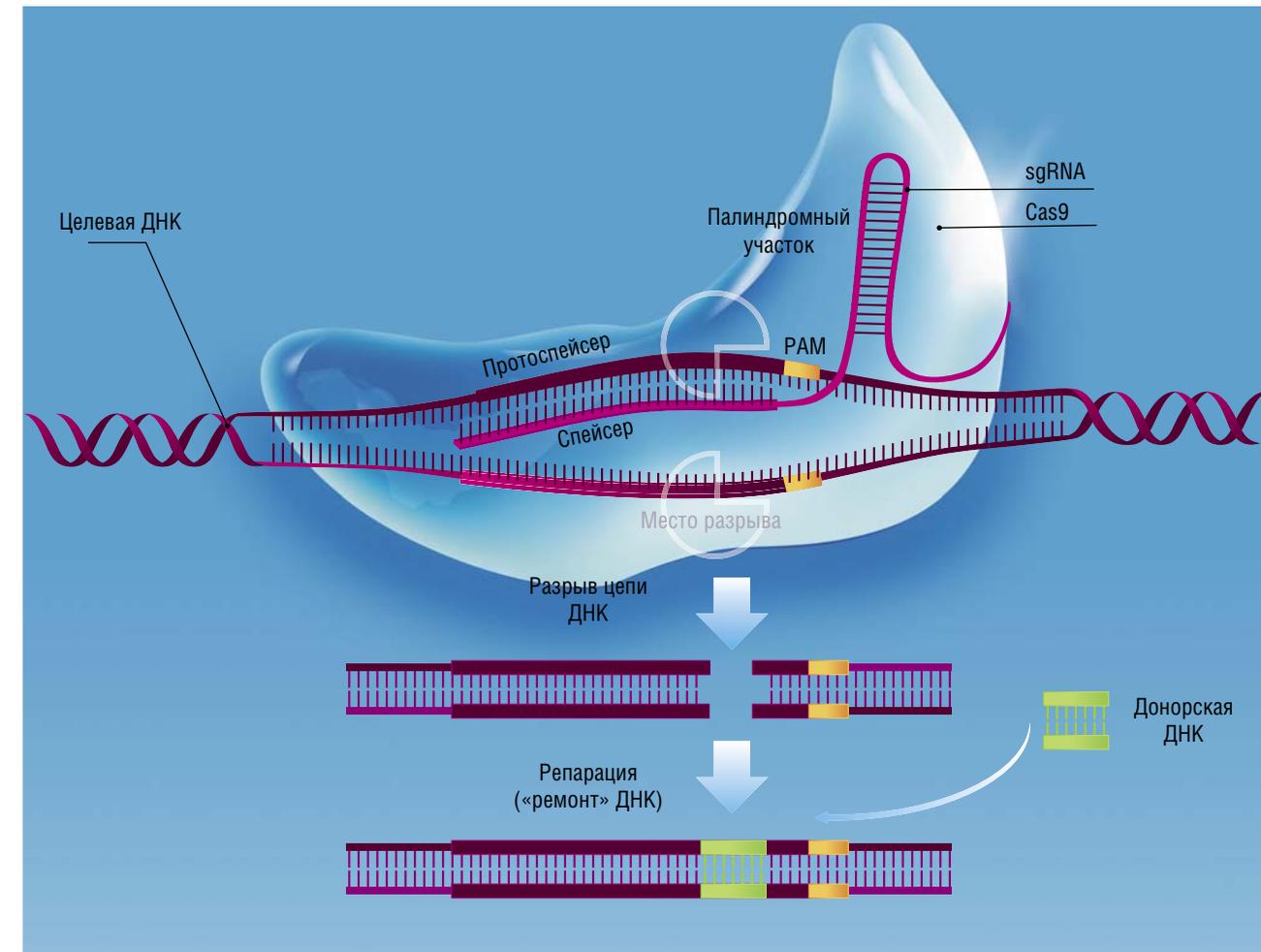
Таким образом, у бактерии формируется «иммунитет» к определенному вирусу, и ее потомки наследуют данное свойство. На основании подобной системы бактерии *Streptococcus pyogenes* были разработаны инструменты для модификации геномов эукариотических клеток высших организмов.

Для этого генные инженеры создали специальные *векторы* (искусственные генетические конструкции), нуклеотидные последовательности которых кодировали *crRNA*, *tracrRNA* и белок *Cas9* (при этом *crRNA* и *tracrRNA* объединили в одну химерную молекулу – *sgRNA*). В определенный участок *sgRNA* поместили короткую последовательность – спейсер, которая может «опознавать» последовательность нужного гена.

Так была создана искусственная система *CRISPR/Cas*, которая на сегодня состоит из двух основных частей: некодирующей РНК (*sgRNA*) и нуклеазы *Cas9*. Использовать ее можно двояким образом. Так, после разрезания целевой молекулы ДНК в нужном месте этот разрыв затем можно «отремонтировать» путем негомологичного сшивания концов, в результате чего образуются небольшие *делеции* (выпадения) или *инсерции* (вставки) нуклеотидов. Таким образом можно «выключать» определенные гены и изучать их функции – этот подход уже прочно занял свое место в функциональной геномике.

Если же совместно с *CRISPR/Cas* в клетку поместить «донорную молекулу» ДНК, то при «ремонте» целевой молекулы в геном может встроиться новый фрагмент. Именно таким способом можно исправлять генные мутации в живых клетках.

В 2013 г. прошел шквал публикаций, посвященных применению системы *CRISPR/Cas* для редактирования



геномов высших организмов, от плодовой мушки и нематоды до мыши и человека. В этих исследованиях решались задачи создания модельных животных, несущих мутации в определенных генах, и клеточных моделей наследственных заболеваний человека, а также исправление этих генетических нарушений.

В настоящее время методы редактирования геномов, такие как *TALENs* и *CRISPR/Cas*, начинают выходить из академических лабораторий и внедряться в медицинскую индустрию. В конце 2013 г. группа ученых, в которую вошли пионеры в области изучения этих систем модификации генома, организовала инновационную фирму «Editas Medicine». Цель нового предприятия – развивать методы геномной инженерии и применять их для создания медицинских продуктов.

Безусловно, лидерами в создании и применении систем редактирования геномов являются ученые из США и Европы. Вдохновленный успехами коллег, коллектив лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) активно применяет технологии *TALENs* и *CRISPR/Cas* для создания на основе стволовых клеток человека клеточных моделей нейродегенеративных и сердечно-сосудистых болезней человека (болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона и т. д.). Ученые надеются, что эти работы помогут в поиске новых способов лекарственной и генной терапии тяжелых заболеваний.

Система *CRISPR/Cas* для редактирования генома, аналогична иммунной системе бактерий, направленной на вирусную ДНК. Система состоит из двух основных частей: некодирующей РНК (*sgRNA*) и белков-ферментов нуклеаз *CAS*. *sgRNA* с помощью *Cas*-белков присоединяется к протоспейсеру – комплементарному участку вирусной ДНК (либо, в случае искусственной системы, участку целевого гена эукариотической клетки). В месте посадки спейсера нуклеаза разрезает цепь ДНК. При репарации в место разреза возможно встроить любую донорную молекулу ДНК – таким образом можно исправлять генетические нарушения