

НОВЫЙ ЗНАЧИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП В РАЗВИТИИ ГЕНЕТИКИ: CRISPR/CAS9 - РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Борис Фуке

В 2012 году Дженифер (Беркли, Калифорния) и Эммануэль Карпентер (Швеция) независимо друг от друга предложили новую молекулярно-генетическую технологию, которая открыла, как было признано позже, новую эру в биологии (1). В течение двух лет было опубликовано 600 работ по этой теме. У молекулярных биологов появилась возможность ввести структуру CRISPR/Cas9 в живую клетку – в точно назначенное место ДНК генома, полностью разрезать спираль ДНК в обеих хромосомах, т.е. инактивировать разрезанный ген или вставить в место разреза любой другой ген (или гены). Это действительно редактирование генома.

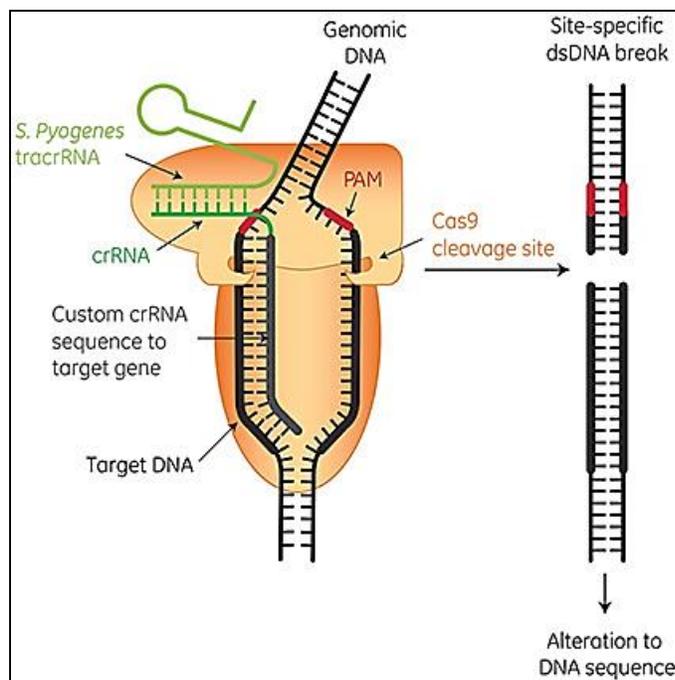


Рис. 1. Схема технологии CRISPR/Cas9

На рис. 1 представлена схема введения в клетку CRISPR/Cas9. Слева на рисунке показана геномная ДНК, нити которой отошли друг от друга. С одной из нитей в комплементарный контакт вступила РНК. Такой контакт обусловлен взаимным узнаванием азотистых оснований в нитях ДНК и РНК. Вокруг возникшей структуры видны контуры фермента нуклеазы (Cas9). Под влиянием tracrРНК нуклеаза разрезает обе нити ДНК в запланированном месте, что показано на рис справа. Разрезанный ген инактивирован, в область разреза может быть вставлен один или несколько генов. Эта процедура, охватывающая обе гомологичные хромосомы, происходит в живой клетке, не нарушая её жизнедеятельности.

Если речь идет об оплодотворённой яйцеклетке, то возникающий в результате такого редактирования организм не подчиняется кардинальному праву наследования по Менделю и в течение ряда поколений имеющееся изменение ДНК «оккупирует» всю популяцию. Такая закономерность получила название драйв гена. Она позволяет изменить в нужную сторону или полностью уничтожить данную популяцию, например насекомых – переносчиков той или иной болезни. Однако возможность тотальной «оккупации» создает опасность для суммарного человеческого генома, поскольку может даже изменить эволюцию человека. Учитывая это, настоятельно не рекомендуется работать с герминативными клетками человека.

Возможность инактивировать любой ген в живой клетке уже использована для инактивации гена СПИДА в разных клетках больного человека *in vitro*. Авторы статьи в PNAS USA (2) считают, что они уже на пороге возможности излечения индивидуального больного от этой тяжелой болезни.

Новое направление широко используется в разных областях биологии, генетики и медицины. В короткой статье приходится ограничиваться лишь несколькими примерами.

Инактивация гена СПИДА. Авторы статьи наметили мишень с ДНК промотера вируса, имеющегося в разных клетках больного человека (промотор – условная голова вируса). В

микроглие, промоноцитах и Т-клетках. CRISPR/Cas9 вырезала куски вирусной ДНК, вирус инактивировался, клетки становились иммунными к вирусу. Авторы наметили несколько путей терапии человека: доставка комплекса CRISPR/Cas9 в наночастицах или с вирусным вектором, или терапия и иммунизация клеток предшественников *in vitro*, затем введение клеток хозяину в расчёте на то, что эти клетки станут родоначальниками новых здоровых иммунной и кроветворной систем. Заметим однако, что заявление авторов о возможности уже сейчас излечивать больного СПИДом кажется несколько преждевременным.

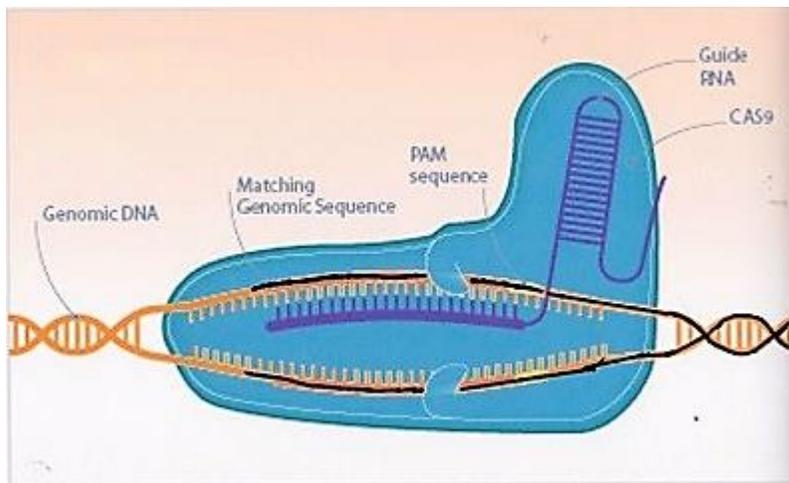


Рис. 2.

исправлены путём использования CRISPR/Cas9 и так называемой опосредованной гомологичной рекомбинации, что свидетельствует о перспективности стратегии генной терапии для людей с любыми наследственными болезнями. Из немногих стволовых клеток костного мозга в организме может регенерироваться вся иммунная и кроветворная система. Уже давно, работая на мышах, было известно, что обе эти системы могут восстановиться из одной стволовой клетки мыши. Обнаружены стволовые клетки соединительной ткани, стволовые клетки эпителия кишечника. Новая технология пока до них не добралась.

Известно, что бета - талассемия – одно из самых распространенных генетических заболеваний человека в мире - вызывается мутациями в гене гемоглобина бета (HBB). Создание индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), выделенных от пациентов бета-талассемией – подход к лечению этого заболевания. (Напомню, что стволовыми названы клетки, генетически изготовленные, например, из взятых на животе пациента клеток соединительной ткани). Коррекция с помощью CRISPR/Cas9 болезнетворных мутаций в таких клетках восстанавливает их нормальную функцию и обеспечивает богатый источник клеток для трансплантации (4).

Хотел обратить внимание читателя на то, что во многих областях медицины начаты исследования с целью лечения болезней с помощью новой технологии. Полностью завершённые работы мне неизвестны. Это понятно: известны требования FDA. Это всегда время, большое время. В других областях биологии есть завершённые масштабные достижения.

Трансплантация органов. Идея трансплантации органов свиньи человеку была не реализована из-за множества ретровирусов у свиней. Сегодня все 62 вируса удалены с помощью CRISPR/Cas9 (5). Новая технология проникает повсюду, создавая бесценную перспективу в области раковых, вирусных и генетических болезней человека.

Ликвидация малярии. Сегодня можно более подробно изложить как уже была радикально решена одна важная медицинская проблема – проблема малярии. Переносчиком малярийных плазмодиев является комар анофелес. В хромосомы яйцеклетки комара *in vitro* вводили ген антитела, затем яйцеклетку вводили комару.

В статье (3) приведены результаты исследования лимфоцитов человека, пораженных вирусом СПИДА. На рис. 2 чёрные линии – вирус, встроенный в геномную ДНК. Введённая CRISPR/Cas9 находила заданное место в промотере гена вируса. Фермент «перекусывал» промотер вируса, лимфоцит «выздоровливал».

Стволовые клетки. Первичные стволовые клетки с дефектным геном могут быть

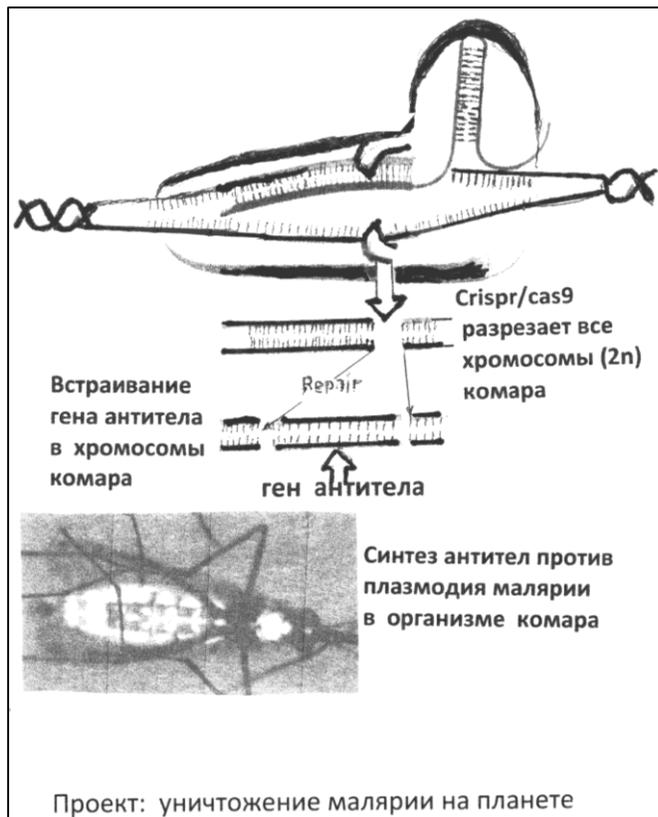


Рис. 3.

Рис. 3 иллюстрирует сильно упрощенный процесс, так как на самом деле вводили не один ген. С самцами анофелеса вся процедура была освоена раньше, чем с самками – с последними были серьезные трудности, только в этом году они преодолены (6). У самок выбрали три “комариных” гена, в каждый из которых вводили структуру CRISPR/Cas9 и новый генетический материал – ген антитела. Самки, как и самцы теперь тоже стали убийцами малярии. Итак сейчас все готово, чтобы начать уничтожать малярию на планете. Для этого нужно, чтобы ген антитела распространился на всю популяцию комаров анофелес. Этому способствует закономерность, названная драйвом гена: если данный ген имеется у немногих представителей вида в обеих хромосомах, то в процессе относительно немногих генераций такой ген распространится на весь вид.

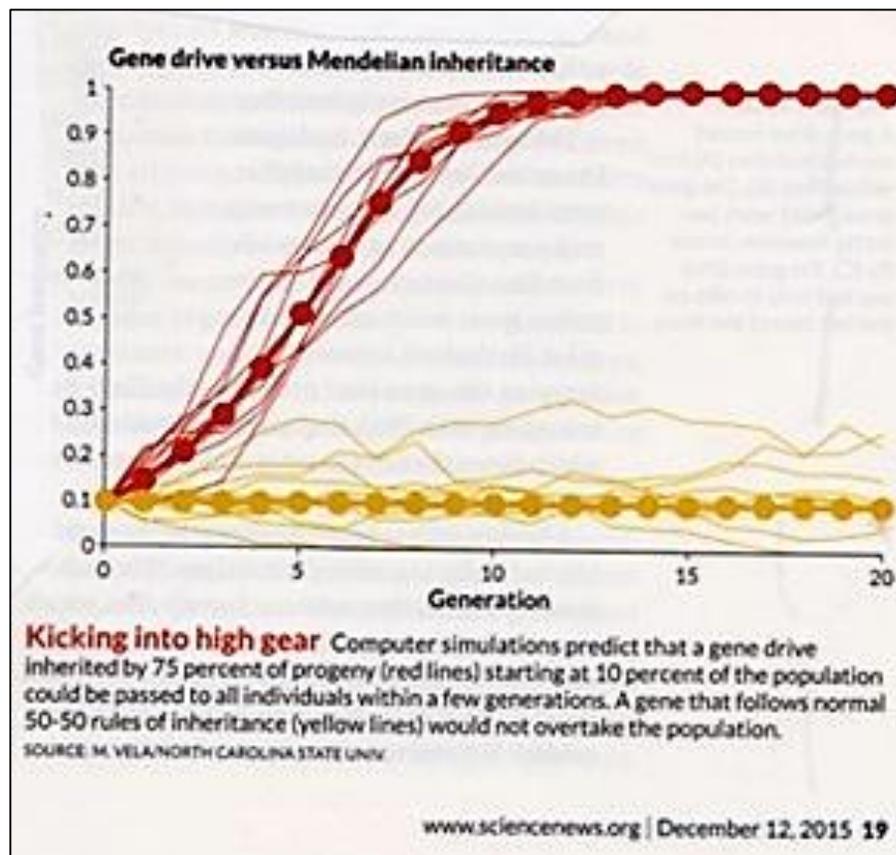


Рис. 4.

На рис. 4 приведены графики наследования генов пока ограниченной популяции комаров по теории Менделя (нижние кривые) и в случае использования CRISPR/Cas9 (верхние кривые). На нижних кривых содержание, например, гена антитела при наследовании гена по Менделю равно их исходному содержанию. На верхних кривых драйв гена после его введения комарам с помощью CRISPR/Cas9. После 20 генераций у 100% комаров есть ген антитела.



Рис. 5. Дженифер Дудна

Завершая статью представим читателю авторов новой молекулярно – генетической технологии – это Дженифер Дудна (рис. 5) и Эммануэль Карпентер (рис. 6). Это очень серьезные исследователи и руководители научных коллективов. Журнал «Тайм» включил их в число 100 самых влиятельных личностей 2012 г. Они сделали последний и в то же время первый решающий шаг в новую эру науки. Новая эра имеет отношение уже не к нам, а к нашим детям, скорее даже к внукам. Это историческая закономерность. Наше поколение получило иммунологию и



Рис. 6. Эммануэль Карпентер

антибиотики. Следующие поколения должны получить прецезионную генную инженерию, новую медицину и, весьма вероятно, возможность продления жизни (7,7а).

Порадуемся за наших детей и внуков.

Источники

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A, programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17; 337 (6096):816-21.

1a. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346:1258096.

2. Wenhui Hu, Rafal Kaminski, Fan Yang, et al, RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 5; 111(31): 11461–11466.

3. Panpan Hou, Shuliang Chen, Shilei Wang, Xiao Yu, Yu Chen, Meng Jiang, Ke Zhuang, Wenzhe Ho, Wei Hou, Jian Huang, and Deyin Guok, Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection *Sci Rep*. 2015; 5: 15577.

4. Niu X, He W, Song B, Ou Z, Fan D, Chen Y, Fan Y, Sun X, Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in Beta-thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem*. 2016 Jun 10.

5. Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesho E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G, Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015 Nov 27; 350(6264):1101-4.

6. Andrew Hammond, Roberto Galizi, Kyros Kyrou et al, CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*, *Nature Biotechnology* 34 78–83 (2016).

7. Ramunas E. Yakubov J. J. Brady, S. Y. Corbel, C. Holbrook, M Brandt, J Stein, J G Santiago, J P Cooke, H M Blau, Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *The FASEB Journal*, 2015.

7a. Blau Helen, .Safe M, Rapid Telomere Extension to Prevent and Treat Hypertension, Stanford University, Stanford, CA, United States. 2016.