

Революция в редактировании генома



Обнаруженная у архей и бактерий система адаптивного иммунитета CRISPR-Cas произвела сенсацию в научном мире. Благодаря этому открытию была разработана новая методика редактирования генома, которая может изменить будущее человечества. Победа над наследственными болезнями, точные и быстрые изменения свойств промышленных и сельскохозяйственных объектов, и даже «дизайнерские дети» могут стать реальностью уже в недалеком будущем

ИЗЯЩНАЯ СИСТЕМА АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

Система CRISPR-Cas обнаружена на хромосомах и мобильных генетических элементах почти у всех известных архей и у большинства бактерий. Основу этой системы составляют особые участки генома — короткие палиндромные кластерные повторы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), к которым всегда прилегают однотипная группа генов Cas (CRISPR-associated genes). Выяснилось, что эти кластеры кодируют инструкции для реакций приобретенного иммунитета против вирусов. CRISPR играют роль «полок», разделяющих «папки с фотографиями преступников», то есть фрагментами генома ДНК вирусов, с которыми когда-то сталкивались предки данной бактерии. Функцию уничтожения агрессора выполняют Cas-белки, называемые эффекторными. Если вирус с совпадающей ДНК попадет в бактериальную клетку, он будет распознан специальным ферментом (нуклеазой Cas9), которая разрезает вирусную ДНК и запускает цепь реакций по уничтожению интервента. Коллекция «фотографий преступников» регулярно обновляется с помощью Cas1 и Cas2, вырезающим из чужаков кусочки генетического материала, а адаптационные белки встраивают эти фрагменты в CRISPR-кассету. Именно это свойство — «распознавать → разрезать → встраивать» и является основой новой методики редактирования генома.

КАК CRISPR/CAS9 РЕДАКТИРУЕТ ГЕНОМ

Метод редактирования генома CRISPR/Cas9 реализуется в два этапа. Сначала специальная нуклеаза, то есть фермент, разрезающий ДНК, вносит двуцепочечный разрыв в нужное место генома. Сложность с редактированием генома до сих пор заключалась именно в том, чтобы внести этот разрыв. Он должен появиться в одном-единственном месте генома и нигде больше. Это место нуклеаза находит с помощью короткой направляющей РНК, последовательность которой должна с точностью до буквы совпадать с нужным кодом генома. После того как разрыв внесен, замена ДНК происходит за счет природных механизмов — в клетке запускается режим аварийной ситуации. Ведь появление разрыва ДНК чревато возникновением мутаций и в целом угрожает целостности генома, поэтому клетка включает систему репарации. Существуют специальные белки, которые находят «оборванные концы» в геноме и запускают реакцию «починки». Разрыв может быть просто склеен, но это чревато потерей фрагмента ДНК в месте стыка и,

как следствие, сдвигом рамки считывания и полным выключением гена. Поэтому клетка обычно ищет похожую последовательность поблизости и использует ее в качестве образца для восстановления правильной последовательности в месте разрыва. Вот тут-то ферментам можно предложить тот вариант ДНК, которым мы хотим заменить природную последовательность. К сожалению, сценарий, по которому пойдет репарация разреза, не всегда соответствует желаемому, поэтому сейчас ученые активно ищут факторы, влияющие на правильный выбор.

ПРИНЦИПАЛЬНАЯ РАЗНИЦА

Технология генных модификаций с помощью системы CRISPR/Cas9 принципиально отличается от старых методик направленностью внесения изменений. Раньше биоинженеры просто встраивали ДНК-конструкцию в клетки. При этом место в геноме, куда эта конструкция попадет, предсказать было невозможно. Это приводило к тому, что природная версия гена сохранялась в геноме и только дополнялась новой, искусственной версией. Такой метод подходит для получения какого-либо нового свойства, например, усиленной выработки гормона роста у ГМ-лосося или для синтеза витамина А в зернах риса. Однако случайное встраивание в геном может привести к неэффективной работе трансгена. Поскольку активность любого гена зависит от его окружения, то, попадая в неудачный кусок генома, ген может оказаться выключен или, наоборот, слишком активен. Кроме того, когда речь идет о замене сломанного гена его правильной копией, тем более в человеческой ДНК, точность генетических модификаций имеет первостепенное значение. В отличие от старых методов технология CRISPR/Cas9 позволяет не просто встроить новую последовательность в ДНК, а с высокой точностью заменить ее старую версию новой.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ВЫРЕЗАНИЯ НУКЛЕОТИДОВ

Во избежание ошибок, возникающих при двойных разрывах ДНК, биоинженеры Гарвардского университета разработали метод «редактирование оснований» (base editing). Это альтернативный подход, позволяющий аккуратно заменять комплементарную пару оснований путем химической модификации нуклеотидов без создания двойных разрывов. Таким образом, на сегодня уже существует молекулярная конструкция, позволяющая с высокой точностью

ЛЬВІВСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ФОРУМ

17-19 квітня

ПАЛАЦ МИСТЕЦТВ
(вул.Коперника, 17)



24

МЕДИЧНА ВИСТАВКА

«ГалMED»

ЗА ПІДТРИМКИ:

- Міністерства охорони здоров'я України
- Департаменту охорони здоров'я ЛОДА

ОРГАНІЗАТОРИ НАУКОВИХ ЗАХОДІВ:

- Українська Асоціація по вивченню болю
- Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
- Українська Асоціація медичного туризму
- Львівська обласна Асоціація фізичної терапії
- Українське лікарське товариство у Львові
- Львівський державний університет фізичної культури
- Львівський обласний центр здоров'я

ПАРТНЕРИ ФОРУМУ:



ПАРТНЕР ВИСТАВКИ:



Генеральний телепартнер:



Інформаційні партнери:



ТЕМАТИЧНІ РОЗДІЛИ:

- Лікувальне, діагностичне та реабілітаційне обладнання
- Лабораторна техніка медицина
- Медичні прилади та інструменти
- Засоби реабілітації та товари для людей з обмеженими можливостями
- Медичний туризм
- Фармацевтичні препарати
- Сучасна клініка та послуги
- Засоби санітарії та дезінфекції
- Лікувальна косметика

В рамках виставки:

- IV спеціалізована експозиція «Реабілітація»
- IV спеціалізована експозиція «Медичний туризм»

Наукові заходи Форуму:

- 17 квітня Науково-практична конференція «Сучасна онкологія в еру скринінгових програм»
- 18 квітня Науково-практична конференція «Сучасні аспекти в комплексному підході до фізичної реабілітації»
- 19 квітня Практичний майстер-клас по новітнім технологіям в галузі реабілітації

ОРГАНІЗАТОР ФОРУМУ:

Гал-ЕКСПО®
АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО
тел.: (032) 2971369, 2970628

www.galexpo.com.ua/galmed
www.facebook.com/Lviv.Medical.Forum/

и с минимумом побочных эффектов осуществлять в живых клетках все четыре нуклеотидные замены цитозин→тимин, гуанин→аденин, аденин→гуанин и тимин→цитозин. Это даст возможность редактировать некоторые реальные человеческие полиморфизмы, связанные с патологиями (например, при серповидноклеточной анемии). Однако следует отметить, что даже самым передовым и точным современным методом редактирования генома еще далеко до достижения стопроцентной эффективности и абсолютной точности. Но если вспомнить, что систему CRISPR-Cas обнаружили только в 1989 г., то достигнутый с тех пор прогресс не может не впечатлять.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОРЫВ

Уже создали и протестировали CRISPR-системы для риса, пшеницы, кукурузы, сорго и многих других сельскохозяйственных культур. Кроме улучшения пищевых качеств, новые инструменты генетической манипуляции позволяют повысить устойчивость растений к вредителям и неблагоприятным факторам окружающей среды, а также могут помочь избежать выращиваемых животных от нежелательных генов. Например, успешно прошла инактивация эндогенных ретровирусов в клетках свиней, что имеет большое значение для трансплантации свиных органов человеку, поскольку при смене хозяина всегда есть опасность активации «спящих» вирусов. Открываются новые перспективы для контроля распространения инфекций, переносимых животными. Благодаря технологии «gene drive» («продвижение гена»), основанной на изменении классического наследования, ген устойчивости к малярийному плазмодию, встроенный в одного комара, может быстро распространиться по всей популяции. Расширяются возможности для конструирования новых метаболических путей и осуществления направленной эволюции биомолекул, в частности для оптимизации ферментных систем промышленных бактерий и грибов. Встраивание в штаммы бактерий систем CRISPR-Cas с заданными свойствами может защитить их от бактериофагов и нежелательных плазмид.

КАК ТЕХНОЛОГИЯ CRISPR/CAS9 ИЗМЕНИТ МЕДИЦИНУ?

Потенциально, технология CRISPR/Cas9 способна изменить отношение человечества к сотням и тысячам наследственных заболеваний. Если раньше они были либо полностью неизлечимы, либо предполагали только симптоматическое лечение, то сейчас открывается возможность устранять саму причину возникновения болезни. Регуляторные возможности системы CRISPR-Cas уже востребованы в медицине и открывают новые перспективы для скрининга мишеней лекарств. Одновременно с появлением технологии редактирования генома возникает и возможность его «улучшения» в самых разных смыслах этого слова. Потенциально мишенями для редактирования могут стать не только «поломанные» гены, но и гены, связанные с повышенным риском для здоровья, или даже гены, которые способны улучшить физиологические показатели организ-

ма. CRISPR-технологии не только позволяют изучать роль конкретных генов в процессах развития и жизнедеятельности человека и других видов, но и открывает небывалые возможности для высокоточного редактирования генома. Новая технология поможет выяснить роль генов и их перестроек в возникновении и прогрессировании генетических болезней и рака. Это важный шаг на пути к созданию геномных редакторов, достаточно надежных для того, чтобы использовать их для лечения наследственных заболеваний.

НА ПУТИ К ПОБЕДЕ НАД ГЕНЕТИЧЕСКИМИ БОЛЕЗНЯМИ

Успешно проводятся опыты по лечению наследственных заболеваний у лабораторных животных и генные модификации культур человеческих тканей. CRISPR-Cas9 использовали для исправления мутантного CFTR-локуса в кишечных стволовых клетках человека. Эту технологию можно использовать для лечения таких моногенных заболеваний, как бета-талассемия, муковисцидоз или гемофилия. Возможно устранение патологических наследственных мутаций при серповидноклеточной анемии, M2DS-синдроме, тирозинемии. Появились обнадеживающие данные по лечению миодистрофии Дюшена у взрослых мышей, причем эксперименты были проведены в трех различных независимых лабораториях. Стало известно об успешном применении технологии для лечения тяжелого пигментного ретинита, особое внимание уделяется лечению катаракты. Преимущества коррекции генома генеративных и стволовых клеток очевидны, но даже изменения, вносимые в соматические клетки уже развитых органов, дают эффект, особенно если речь идет о лечении болезней печени и мышц.

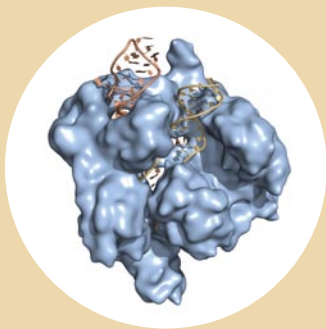
Существовать разновидности рака, вероятность возникновения которых тесно связана с особо неудачными вариантами некоторых генов. Типичный пример — ген BRCA1, мутации в котором могут в несколько раз повышать вероятность возникновения рака молочной железы. С помощью технологии CRISPR/Cas9 можно внести изменения в геном сперматозоида или яйцеклетки и таким образом предотвратить передачу мутантного варианта гена своим детям. В терапии опухолей найдут применение варианты CRISPR-системы VI типа, которая уничтожает только РНК. Впервые технологию CRISPR/Cas9 для лечения онкологических заболеваний применили в Китае при терапии рака легкого.

БОРЬБА С ИНФЕКЦИОННЫМИ АГЕНТАМИ

Отдельным перспективным направлением применения CRISPR-систем является лечение хронических вирусных заболеваний типа гепатита и ВИЧ-инфекции. Если возбудитель сохраняется в организме в виде вирусной ДНК, встроенной в клеточный геном (провирус), то его можно просто вырезать. Американские биологи успешно устранили ВИЧ из лимфоцитов человека, однако из-за изменчивости этого вируса очень сложно подобрать точные «генетические ножницы».

Системы CRISPR-Cas могут вмешиваться в общение бактерий, которые без «достижения кворума» (quorum sensing) не способны вызывать инфекцию. Это помогает регулировать групповое поведение патогенных микроорганизмов, препятствуя формированию плодовых тел и спор у миксококков, биопленок у синей палочки. Белки систем II типа Cas9 регулируют репарацию ДНК и вирулентность патогенов *Legionella pneumophila*, *Francisella novicida*, *Campylobacter jejuni* и *Neisseria meningitidis*. Изменения CRISPR-системы приводят к повышению чувствительности бактерий к повреждающим ДНК факторам при реорганизации генома, вследствие чего могут перевести бактерии в неактивное состояние и даже вызвать гибель их клеток.

Татьяна Кривомаз, д-р техн. наук, канд. биол. наук, профессор
(Продолжение следует)



С помощью технологии CRISPR/Cas9 можно внести изменения в геном сперматозоида или яйцеклетки и таким образом предотвратить передачу мутантного варианта гена своим детям