

# CRISPR-CAS9 технология и ее применение

**Преподаватель:** старший преподаватель  
кафедры молекулярной биологии и генетики,  
PhD, Сметенов И.Т.  
**Дисциплина:** Рекомбинация ДНК

*(Лекция 6)*

## Цель

Изучить механизмы работы системы CRISPR/Cas9 и ее применение в редактировании генома.

## Задачи

1. Описать общие принципы работы системы CRISPR/Cas9, включая этапы приобретения спейсеров и экспрессии crRNA.
2. Рассмотреть процесс интерференции и роль Cas9 в распознавании и разрезании ДНК-мишени.
3. Объяснить значение мотива, смежного с протоспейсером (PAM), для активации системы CRISPR/Cas9.
4. Изучить современные применения CRISPR/Cas9 в области геномного редактирования и генной терапии.

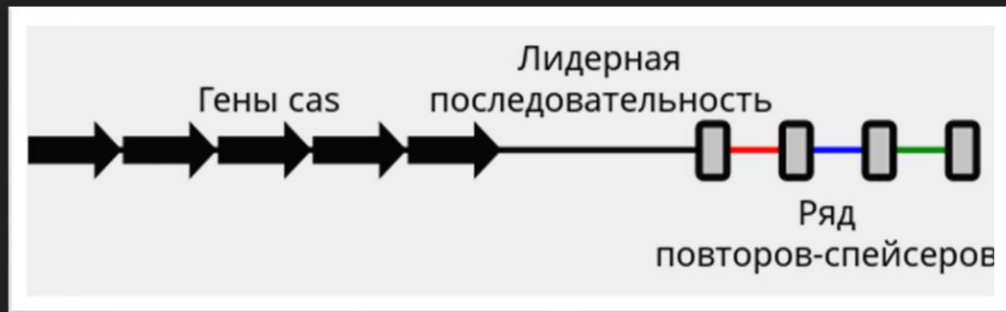
*Ключевые слова: CRISPR/Cas9, приобретение спейсеров, crRNA, интерференция, PAM, редактирование генома, генная терапия*

# Введение

- *CRISPR/Cas9* — это новая технология редактирования геномов высших организмов, базирующаяся на иммунной системе бактерий. В основе этой системы — особые участки бактериальной ДНК, короткие палиндромные кластерные повторы, или **CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)**.
- Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК — **спейсеры**, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных Cas-белков (CRISPR-associated sequence — последовательность, ассоциированная с CRISPR), связанных с CRISPR РНК.

# Общие принципы

- Системы CRISPR-Cas различаются как структурно, так и функционально. Тем не менее, всем системам CRISPR-Cas присущ ряд общих черт.
- Локусы CRISPR могут выполнять функцию иммунитета только при наличии генов cas, которые обычно располагаются в непосредственной близости от CRISPR. Набор генов cas определяет тип системы CRISPR-Cas. Локусы CRISPR представлены короткими (обычно около 30—40 нуклеотидов длиной) прямыми повторами, которые отделяются друг от друга неповторяющимися спейсерами, произошедшими из ДНК тех чужеродных генетических элементов, с которыми сталкивалась клетка или её предшественники. Длина спейсеров обычно сопоставима с длиной повторов. Перед рядом повторов и спейсеров располагается лидерная последовательность, содержащая, как правило, промотор, с которого начинается однонаправленная транскрипция повторов и спейсеров CRISPR. Спейсеры полностью интегрированы в геном клетки и передаются её потомкам при делении



# CRISPR-Cas9



В ДНК бактерий и архей выделяют особый участок - CRISPR-кассету. Она состоит из лидерного участка, регулярно повторяющихся (повторов) и уникальных участков ДНК (спейсеров). CRISPR-кассета вместе с cas-генами и кодируемыми ими cas-белками формирует CRISPR-систему [6]

## Структура CRISPR-системы

### cas-гены



Кодируют белки cas, необходимые для функционирования системы CRISPR/Cas

Лидерная последовательность



Повторяющиеся идентичные участки (повторы)



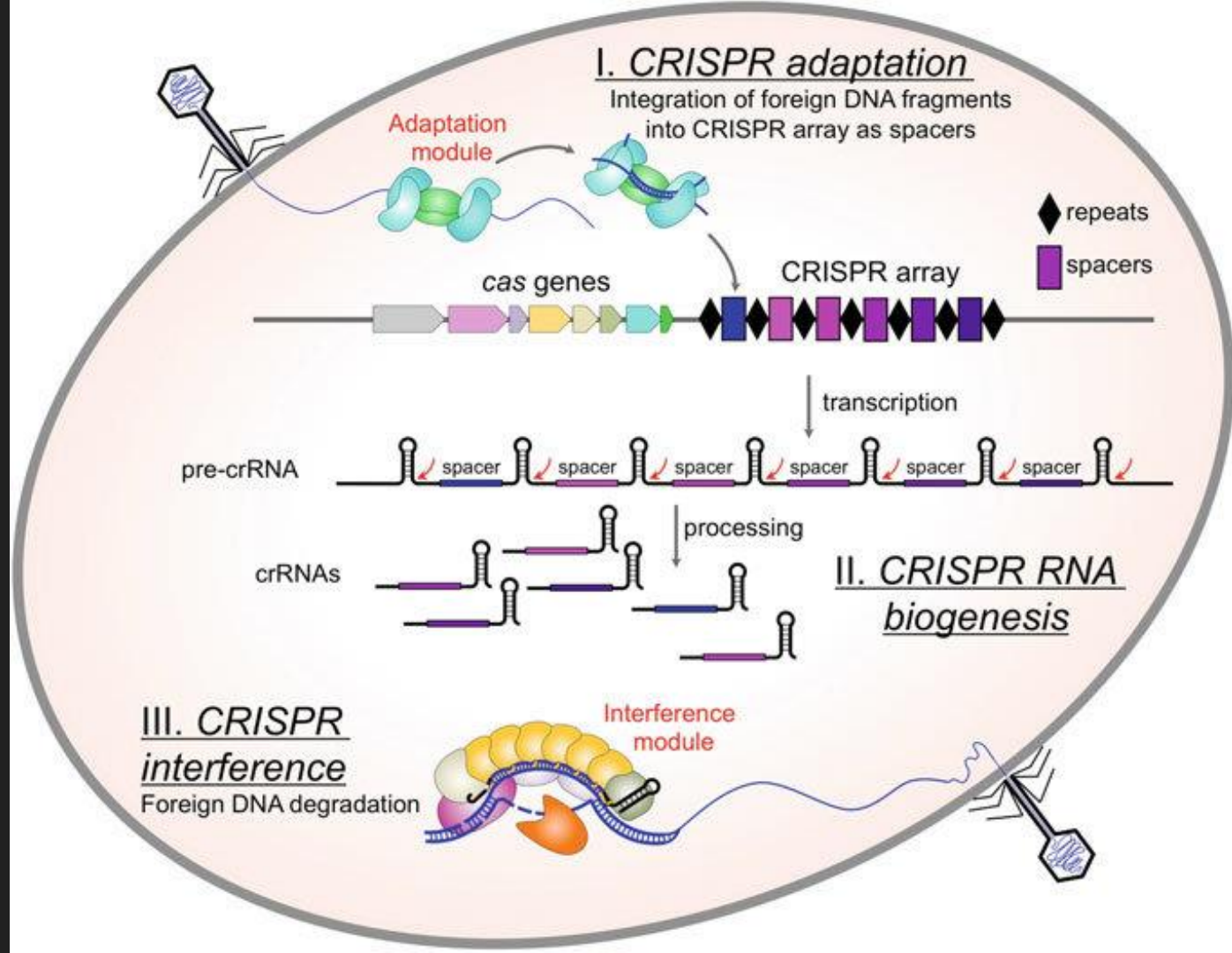
Отвечает за увеличение количества спейсеров после вирусных атак

Уникальные участки ДНК (спейсеры)

Появляются после вирусных инфекций и необходимы для приобретенного иммунитета.

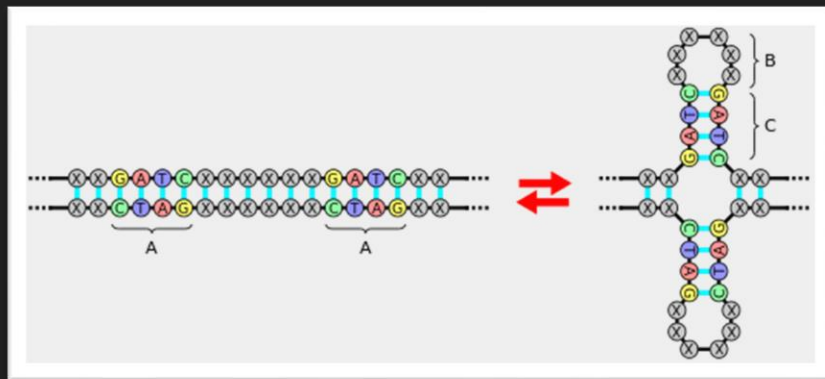
# Приобретение спейсеров

- Спейсеры составляют иммунологическую память, в которой хранится информация о прошлых инфекциях, и именно она лежит в основе ответа на повторное вторжение сходных генетических элементов. Большая часть данных о молекулярных механизмах приобретения новых спейсеров получена при изучении системы **CRISPR I** типа *Escherichia coli* и **II** типа *Streptococcus thermophilus*. Правильная ориентация и вставка нового спейсера происходит при участии последовательности, расположенной непосредственно выше первого повтора; таким образом, новые спейсеры добавляются к 5'-концу локуса CRISPR. Интеграция нового спейсера в промежуток между лидерной последовательностью и первым повтором осуществляется комплексом Cas1-Cas2-протоспейсер. У некоторых систем CRISPR-Cas в этом процессе участвуют дополнительные белки. При вставке нового спейсера происходит дубликация повтора, за счёт чего сохраняется правильная структура локуса, который должен начинаться с повтора.
- Поскольку спейсеры передаются от предков к потомкам при делении клеток, при наличии схожих спейсеров можно устанавливать филогенетические связи между штаммами, имеющими общие предковые спейсеры, а также штаммами, имеющими новые, недавно приобретённые спейсеры



# Экспрессия и образование crРНК

- После интеграции в CRISPR частей чужеродных генетических элементов требуется перевести их в форму, способную нацеливать белки Cas на последовательности-мишени для их распознавания и разрушения. Такой формой служит направляющая crРНК, которая содержит уникальную последовательность, комплементарную определённой мишени. Сначала ряд повторов и спейсеров CRISPR транскрибируется в единый длинный транскрипт — пре-crРНК, который далее разрезается на короткие crРНК. Большинство повторов в CRISPR являются палиндромами, поэтому соответствующие им участки пре-crРНК формируют шпильки. Во многих случаях именно эти шпильки распознаются белками Cas, процессирующими пре-crРНК в crРНК

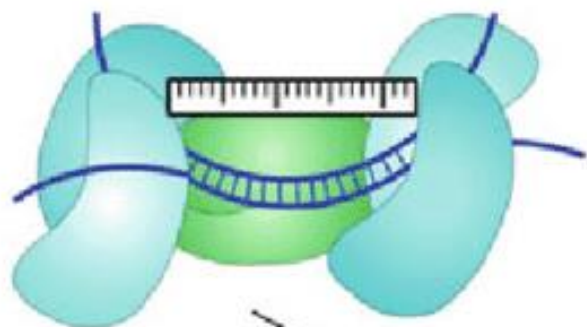




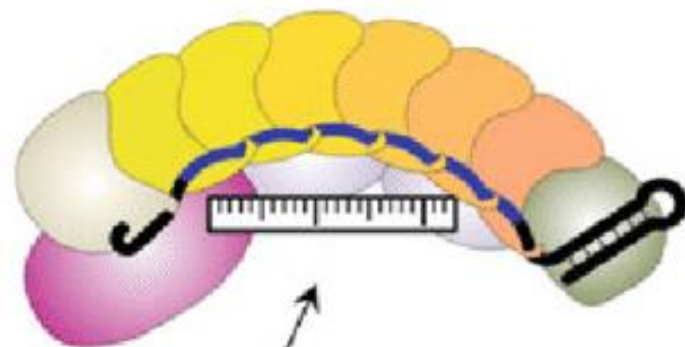
# Интерференция

- На стадии интерференции crРНК связываются со своими мишенями за счёт спаривания оснований и, таким образом, направляют эндонуклеазы Cas на разрезание и разрушение мишени. Формирование комплекса crРНК и белков Cas обеспечивает эндонуклеолитическое разрушение комплементарных crРНК последовательностей НК. Хотя мишенями, в основном, являются двуцепочечные ДНК (дцДНК), некоторые системы CRISPR-Cas могут разрушать комплементарные одноцепочечные РНК (оцРНК).
- Системы CRISPR-Cas, распознающие дцДНК, требовательны по отношению к соседним с протоспейсером последовательностям: в частности, в системах типов I и II распознаются только мишени, содержащие мотив PAM (требование наличия PAM может служить для защиты от разрезания системой CRISPR-Cas клеточного генома). У систем, работающих с оцРНК, подобных требований нет. После начальной эндонуклеолитической атаки (внесения разрыва в мишень), производимой Cas, дальнейшее разрушение мишени может происходить под действием других нуклеаз.

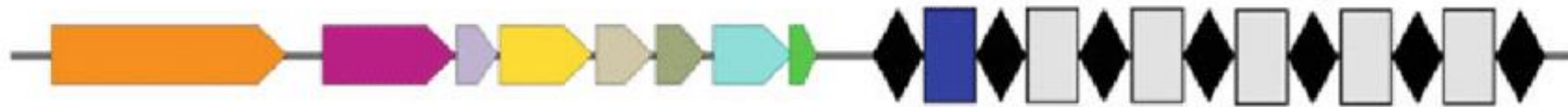
Adaptation module



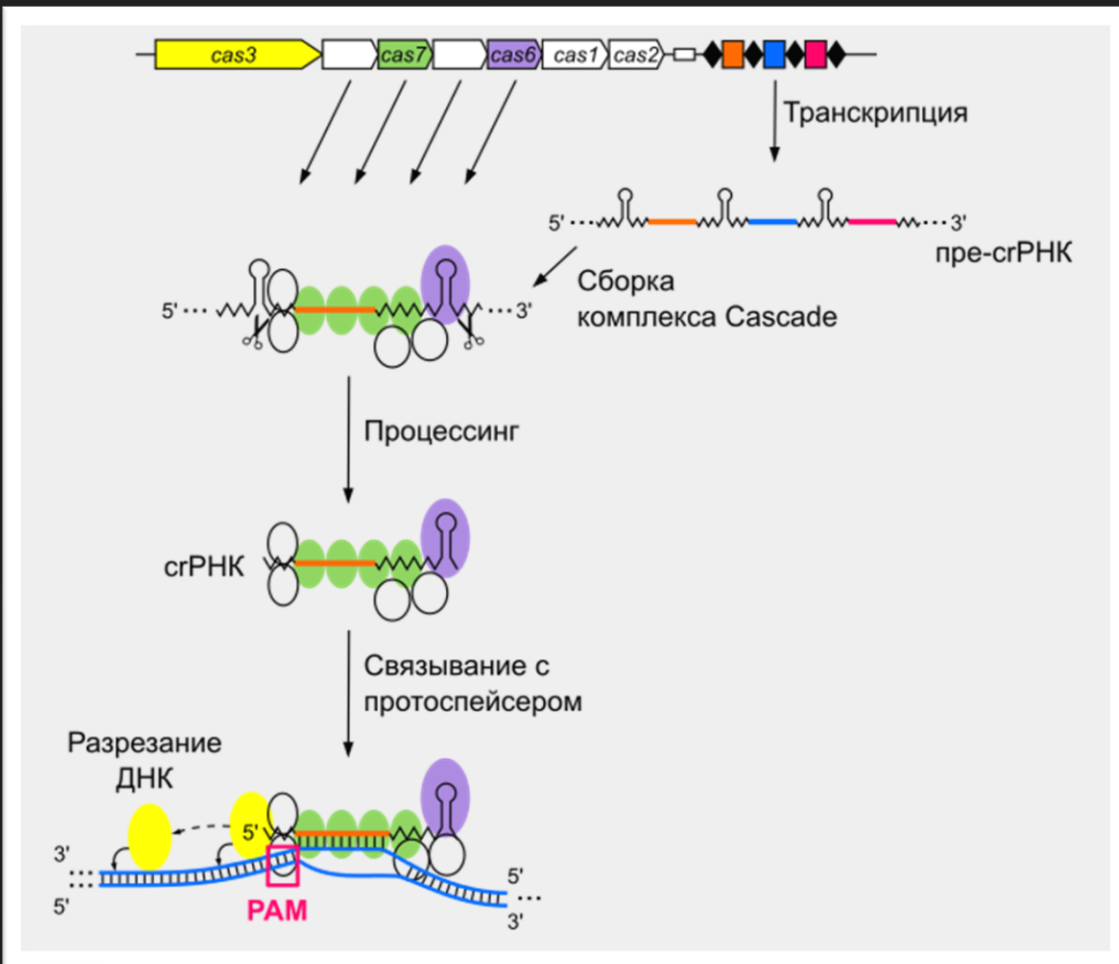
Interference module



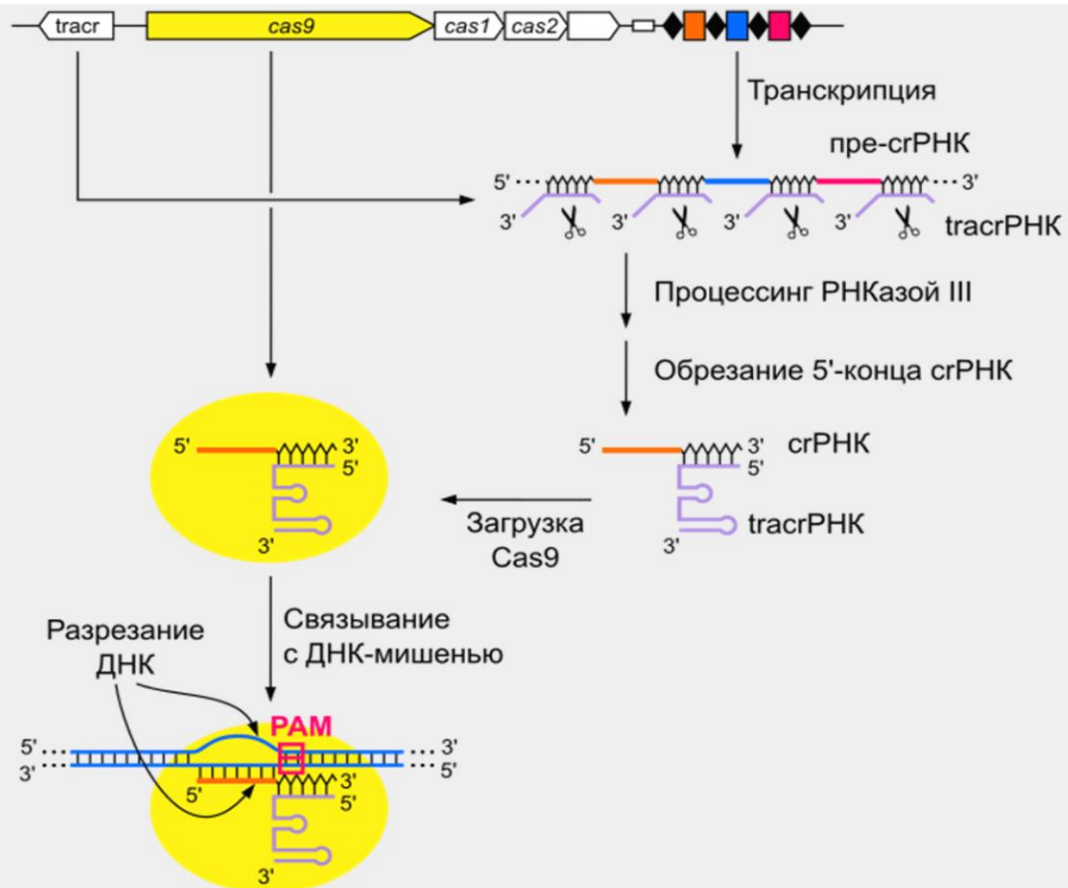
CRISPR array



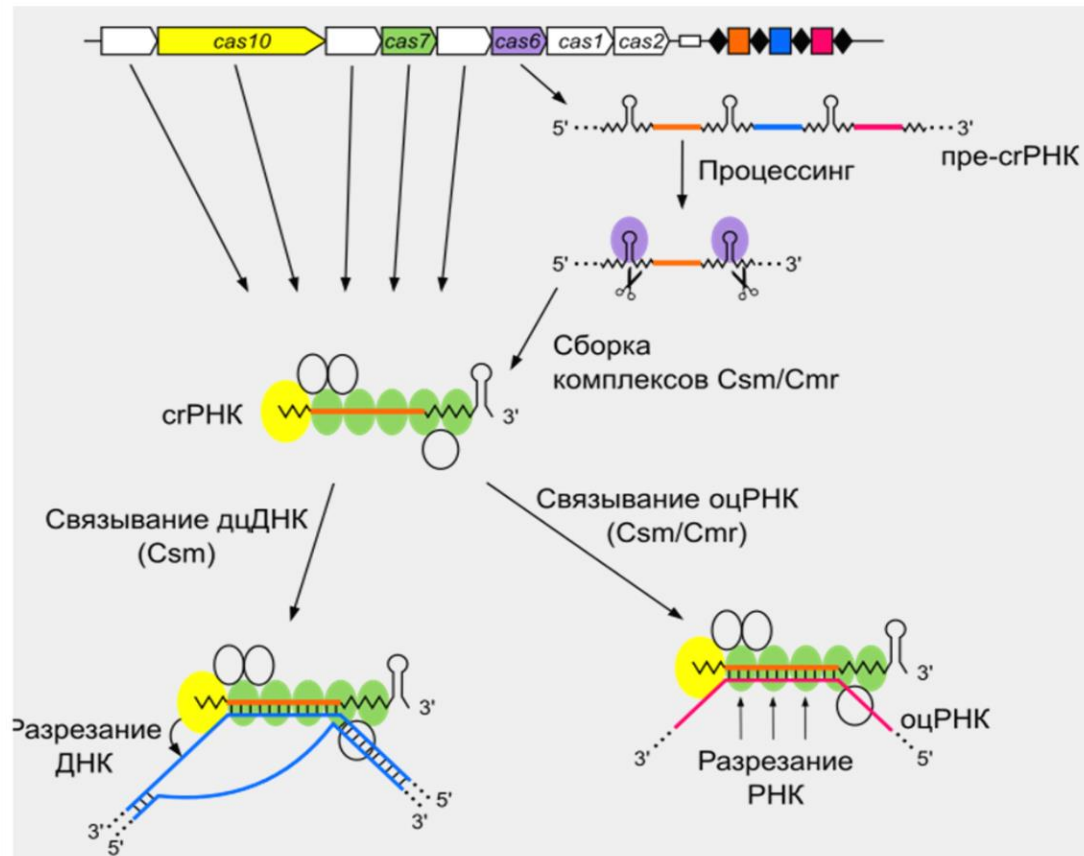
# Системы I типа



# Системы II типа



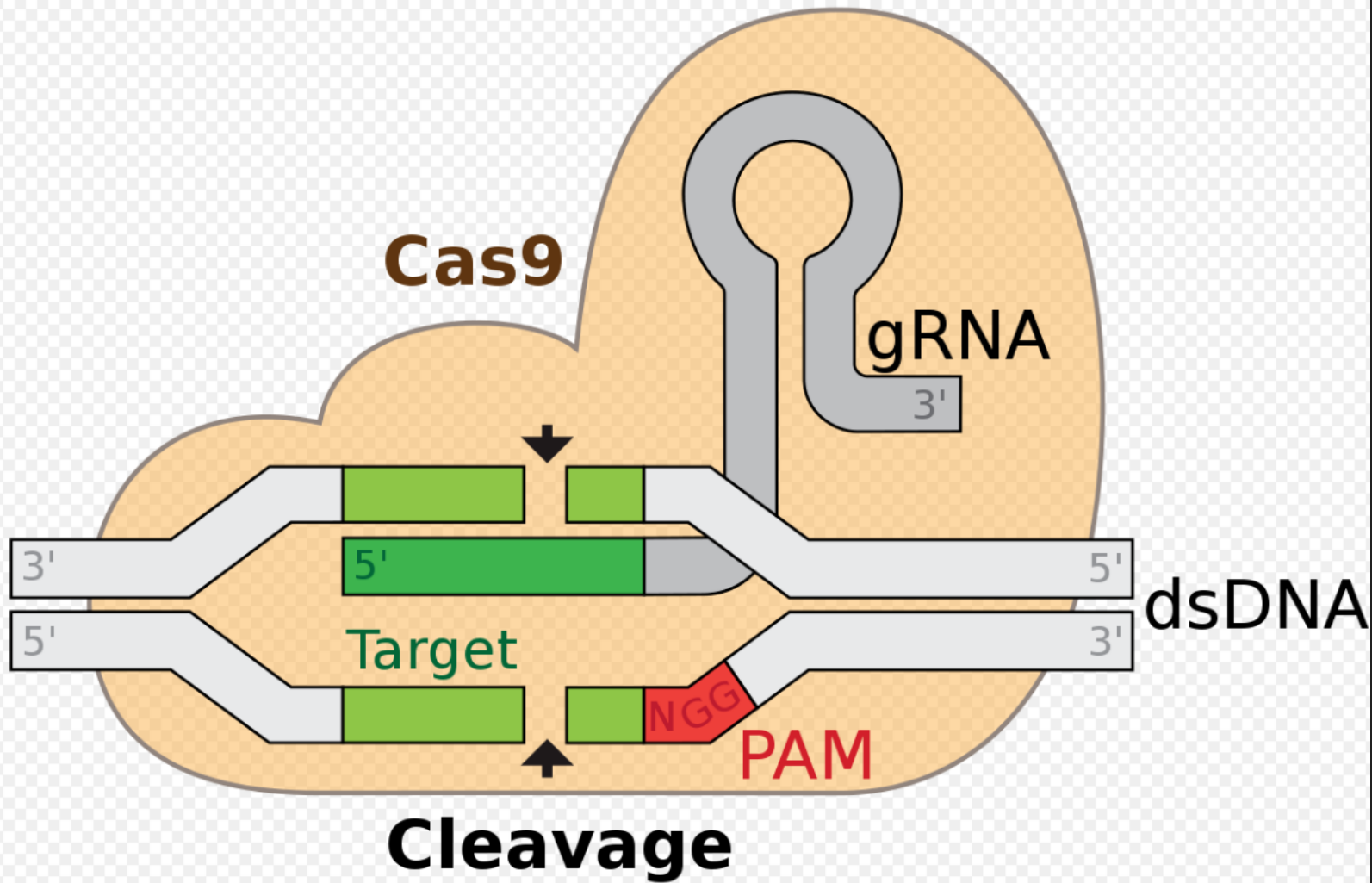
# Системы III типа



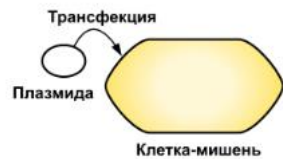
# Мотив, смежный с протоспейсером

Смежный мотив протоспейсера представляет собой последовательность ДНК из 2–6 пар оснований, непосредственно следующую за последовательностью ДНК, на которую нацелена нуклеаза Cas9. Является компонентом вируса или плазмиды, но не обнаружен в геноме бактерии-хозяина. Cas9 не будет успешно связываться или расщеплять последовательность ДНК-мишени, если за ней не следует последовательность PAM. PAM является важным нацеливающим компонентом, который отличает бактериальную собственную ДНК.

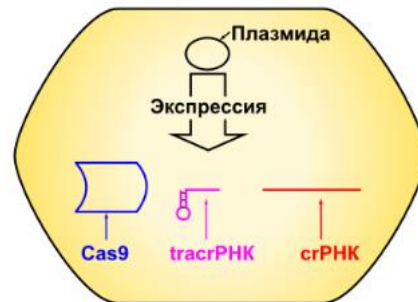
	<u>nuclease</u>	<u>PAM</u>	<u>size (kDa)</u>
engineered	SpCas9	NGG	150
	SpCas9-VQR	NGAG	150
	SpCas9-VRER	NGCG	150
	SpCas9-NG	NGN	150
	SpCas9-xCas9	NG/GAA/GAT	150
	SpCas9-Sc++	NNG	150
	SpCas9-SpG	NGN	150
	SpCas9-SpRY	NRN	150
			“near -PAMless”
	FnCas9	NGG	180
	FnCas9-RHA	YG	180
	SaCas9	NGRRT	115
	SaCas9-KKH	NNRRT	115
	St1Cas9	NNAGAA	125
	NmCas9	NNNGATT	120
	GeoCas9	NNNCRAA	120
<hr/>			
	AsCas12a	TTTV	145
	AsCas12a-RR	TYCV	145
	AsCas12a-RVR	TATV	145
	FnCas12a	TTTV	145
<hr/>			
	Cas12j	TTN	75
<hr/>			
	Cas12e	TTCN	110
<hr/>			
	Un1Cas12f1	TTTN	60
	CnCas12f1	CCN	55



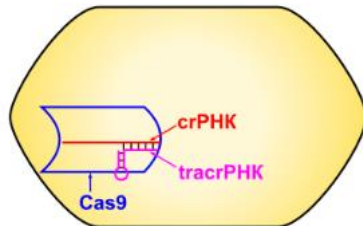
### 1: Трансфекция



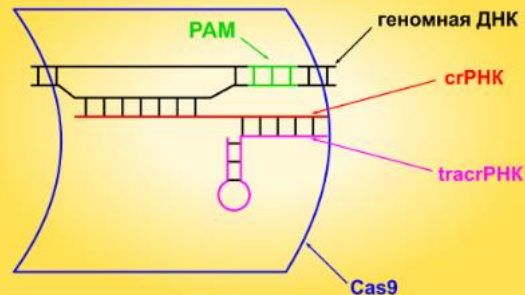
### 2: Экспрессия плазмиды



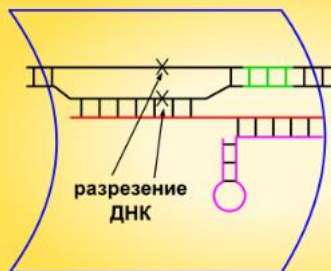
### 3: Активация Cas9



### 4: Связывание с последовательностью-мишенью в геноме



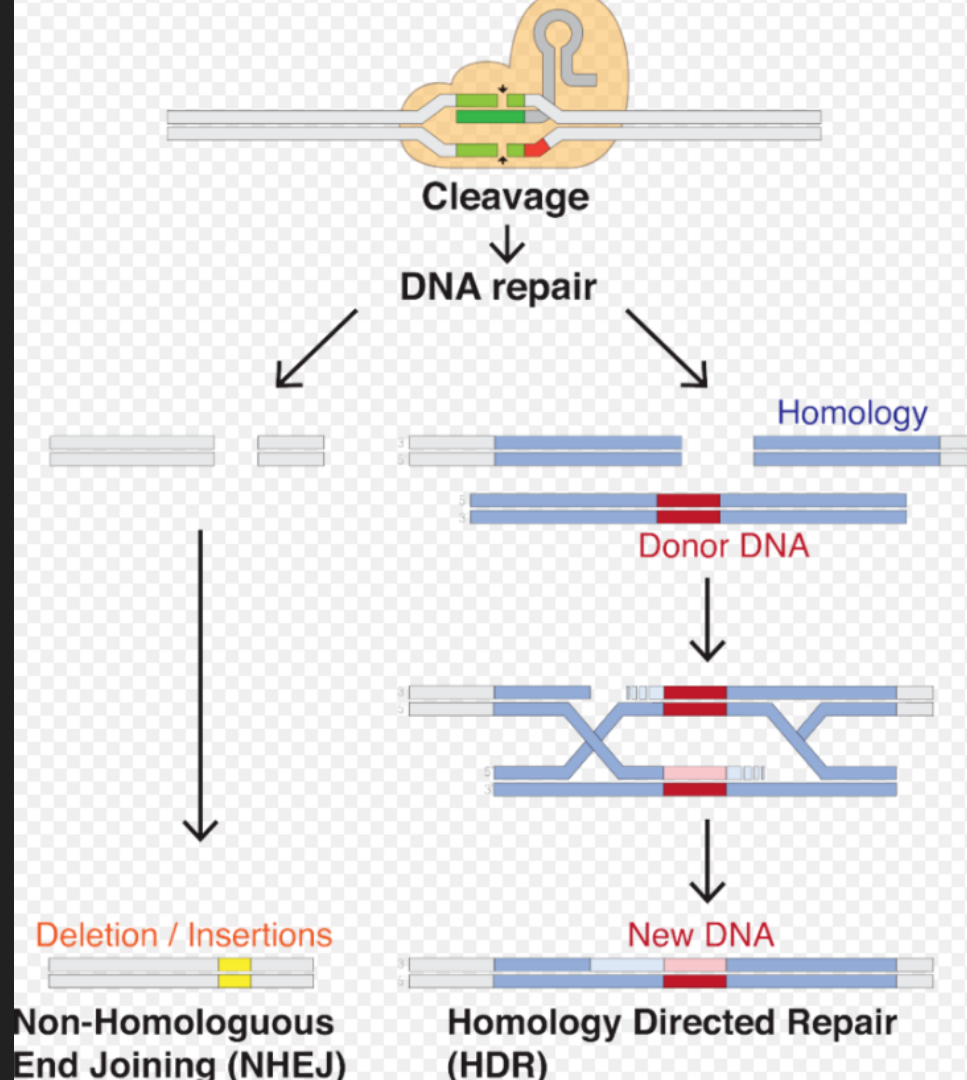
### 5: Разрезание геномной ДНК



### 6: ДНК готова к репарации







# Механизм геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9

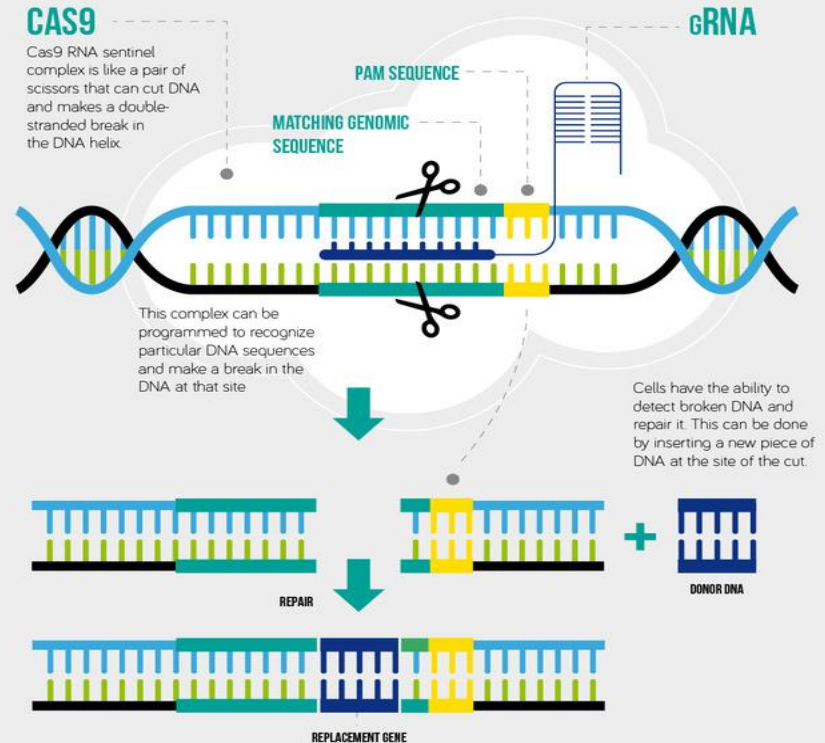
Для того чтобы вылечить генетическую болезнь, нужно исправить генетическую информацию, затронутую мутацией. Гемофилия, как и большинство генетических болезней, вызвана изменением только одной буквы ДНК. В целом описанный механизм функционирует за счет принципа комплементарности, который впервые был предложен Джимом Уотсоном и Френсисом Криком в их знаменитой модели двуцепочечной ДНК.

**1**  
A cell is transfected with a DNA plasmid that expresses both the Cas9 protein and a sequence of guide RNA (gRNA), which matches that of the gene of interest.

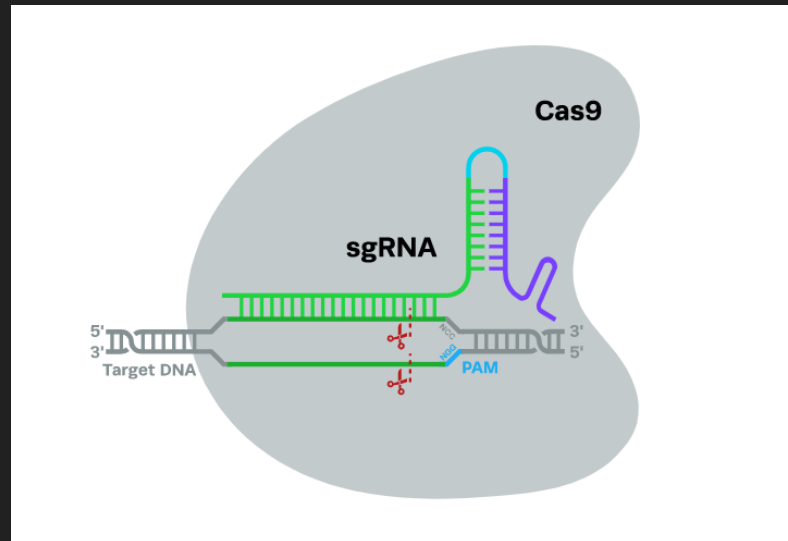
**2**  
Cas9 identifies the corresponding DNA sequence on the host cell's genome, and cuts both strands of DNA.

**3**  
The cell's attempt to repair the break effectively silences the targeted gene by joining the cleaved DNA back together, using a process called nonhomologous end joining.

**4**  
A faulty gene can be corrected with a replacement segment of DNA, or a new gene altogether can be introduced.



- Система RISPR-Cas опирается на два основных компонента: направляющую РНК (gRNA) и нуклеазу, ассоциированную с CRISPR (Cas).
- Направляющая РНК — это специфическая последовательность РНК, которая распознает интересующую целевую область ДНК и направляет туда нуклеазу Cas для редактирования.
- gRNA состоит из двух частей: crispr РНК (crRNA), последовательность из 17-20 нуклеотидов, комплементарная целевой ДНК, и tracr РНК, которая служит связующим каркасом для нуклеазы Cas.
- Связанный с CRISPR белок — это неспецифическая эндонуклеаза. Он направляется в определенный локус ДНК с помощью gRNA, где он делает двухцепочечный разрыв. Существует несколько версий нуклеаз Cas, выделенных из разных бактерий. Наиболее часто используемой является нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes*.

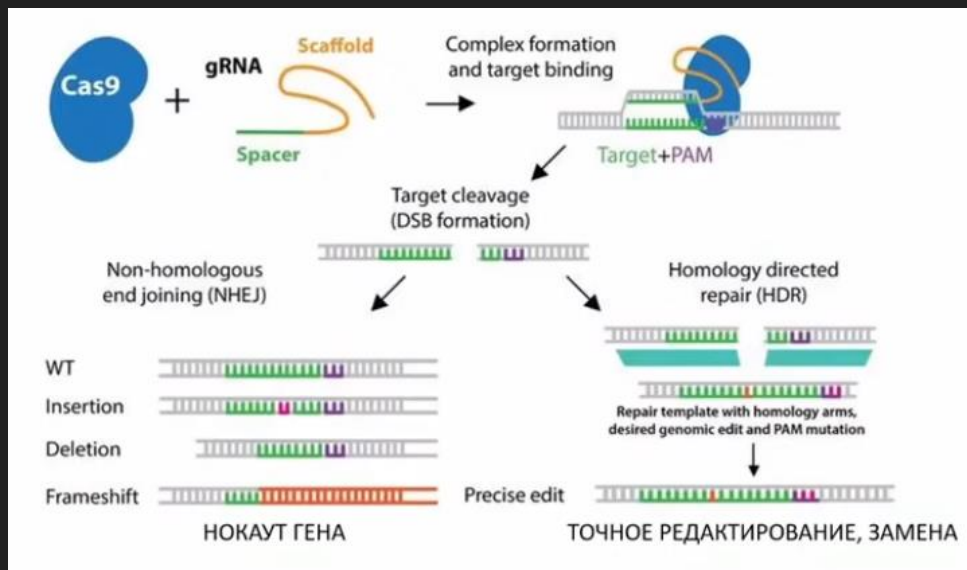


# Применение

1. Генная инженерия
2. Терапевтическая роль
3. Сельское хозяйство
4. Регуляция активности генов

# Генная инженерия

С момента своего открытия в 2012 году, CRISPR/Cas9 редактирование генов обещает излечить большинство известных генетических заболеваний, таких как серповидно-клеточная болезнь,  $\beta$ -талассемия, муковисцидоз и мышечная дистрофия.



# Терапевтическая роль

Первое испытание терапии на основе CRISPR на человеке было проведено для лечения пациентов с рефрактерным раком легких. Сначала исследователи извлекли Т-клетки из крови трех пациентов и в лаборатории с помощью CRISPR/Cas9 удалили гены (TRAC, TRBC и PD-1), которые мешали бороться с раковыми клетками. Затем они ввели модифицированные Т-клетки пациентам. Модифицированные Т-клетки могли нацеливаться на специфические антигены и убивать раковые клетки. В итоге не было отмечено никаких побочных эффектов, а модифицированные Т-клетки можно было обнаружить вплоть до 9 месяцев после введения. В мае 2017 года группа исследователей из Темпльского университета продемонстрировала, что репликация ВИЧ-1 может быть полностью остановлена, а вирус уничтожен из инфицированных клеток путем иссечения генома ВИЧ-1 с помощью CRISPR/Cas9 на животных моделях. В дополнение к подходу, направленному на геном ВИЧ, технология CRISPR/Cas9 также может быть использована для блокирования проникновения ВИЧ в клетки хозяина путем редактирования генов хемокинового корцептора типа-5 (CCR5) в клетках хозяина. Например, исследование *in vitro*, проведенное в Китае, показало, что редактирование генома CCR5 с помощью CRISPR/Cas9 не выявило признаков токсичности (инфекции) на клетках, и они пришли к выводу, что отредактированные клетки могут быть эффективно защищены от ВИЧ-инфекции, чем немодифицированные клетки.

# Сельское хозяйство

Поскольку население планеты продолжает расти, риск нехватки сельскохозяйственных ресурсов реален. Следовательно, существует потребность в новых технологиях для увеличения и улучшения производства натуральных продуктов питания. CRISPR/Cas9 является уже существующим дополнением в этой области, поскольку он используется для генетической модификации продуктов питания, чтобы улучшить их питательную ценность, увеличить срок хранения, сделать их засухоустойчивыми и повысить устойчивость к болезням.

# Регуляция активности генов

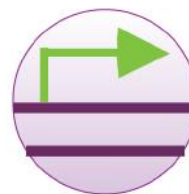
Помимо редактирования генома, CRISPR/Cas-9 можно использовать для искусственной регуляции (активации или репрессии) определенной мишени гена путем усовершенствованной модификации белка Cas-9.<sup>15</sup> Исследователи создали усовершенствованную модифицированную эндонуклеазу Cas-9 под названием dCas-9 nuclease путем инактивации ее доменов HNH и RuvC. Нуклеаза dCas-9 не обладает активностью расщепления ДНК, но ее активность связывания ДНК не нарушена. Затем с dCas-9 могут быть соединены активаторы или ингибиторы транскрипции для образования комплекса CRISPR/dCas-9. Таким образом, каталитически неактивный dCas-9 может быть использован для активации (CRISPRa) или глушения (CRISPRi) экспрессии определенного интересующего гена. Более того, CRISPR/dCas-9 может быть использован для визуализации и точного определения местоположения интересующего гена внутри клетки (субклеточная локализация) путем слияния маркера, такого как зеленый флуоресцентный белок (GFP), с ферментом dCas-9. Это позволяет маркировать и визуализировать локусы в живых клетках для дальнейшего использования.



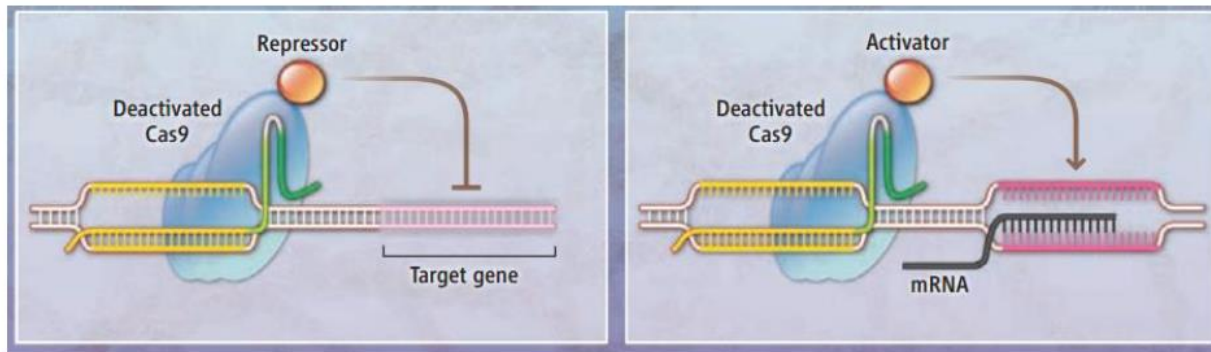
## Эпигенетический контроль экспрессии



**Ингибирование экспрессии генов**



**Активация экспрессии генов**





## Модификации системы и их применение<sup>[4]</sup>

dCas9:  
Искусственная  
регуляция  
активности генов



CRISPR/Cas9:  
лечение болезней  
человека



CRISPR/Cas9:  
модификация  
с/х растений



CASFISH:  
Флуоресцентное  
мечение



## Иные функции CRISPR/Cas<sup>[7]</sup>



Регуляция активности  
генов



Расхождение хромосом



Исправление ошибок  
в ДНК



Ремоделирование генома



# Источники

1. <https://postnauka.ru/faq/59807>
2. [https://www.researchgate.net/publication/319010479\\_Interdependencies\\_Between\\_the\\_Adaptation\\_and\\_Interference\\_Modules\\_Guide\\_Efficient\\_CRISPR-Cas\\_Immunity](https://www.researchgate.net/publication/319010479_Interdependencies_Between_the_Adaptation_and_Interference_Modules_Guide_Efficient_CRISPR-Cas_Immunity)
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737346/>
4. [https://www.researchgate.net/publication/354042144\\_Mechanism\\_and\\_Applications\\_of\\_CRISPRCas-9-Mediated\\_Genome\\_Editing](https://www.researchgate.net/publication/354042144_Mechanism_and_Applications_of_CRISPRCas-9-Mediated_Genome_Editing)