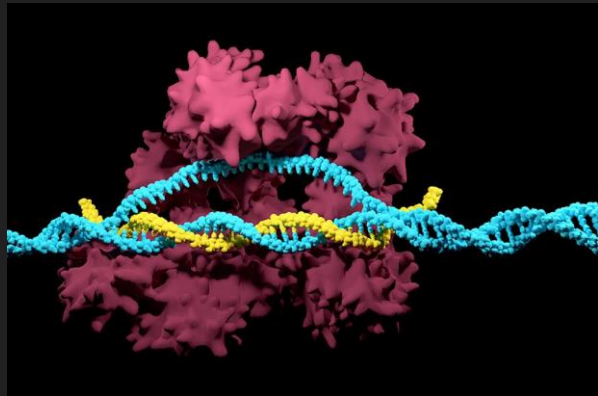




Методы редактирования генома: ZFN, TALEN, CRISPR-Cas системы.



Преподаватель: старший преподаватель
кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Сmekенов И.Т.

Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 5)

Цель

описание перспективных технологий редактирования генома ZFN, TALENs и CRISPR/Cas9, возможности их применения в лечении различных заболеваний, а также оценка безопасности и эффективности разрешенных к применению современных методов редактирования. .

Задачи

1. Описать общие принципы работы системы редактирования геномов.
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 систем в области геномного редактирования и генной терапии.

Ключевые слова: ZFN, TALENs , димер, CRISPR/Cas9, приобретение спейсеров, crPHK, интерференция, PAM, редактирование генома, генная терапия

Редактирование генома — это целенаправленное изменение последовательности ДНК в клетке для исправления, удаления или вставки генов. Эти технологии лежат в основе современной **генной инженерии и терапии наследственных заболеваний**.

ZFN (цинковые пальцы, Zinc Finger Nucleases) — искусственные ферменты, состоящие из: ДНК-связывающего домена (цинковые пальцы, узнающие конкретные последовательности ДНК), каталитического домена нуклеазы FokI, который расщепляет ДНК. Для разрыва ДНК необходим **димер** — две ZFN связываются по обе стороны целевой области, создавая двухцепочечный разрыв.

TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) — ферменты, аналогичные ZFN, но связывающие ДНК с помощью **TALE-доменов** (эффektоры бактерий рода *Xanthomonas*). TALEN также действуют **в виде димеров**, а их специфичность выше и проектирование проще, чем у ZFN.

CRISPR/Cas9 — наиболее современная и эффективная система редактирования генома, заимствованная у бактерий как часть их адаптивного иммунитета против вирусов. Она состоит из двух ключевых компонентов: **Cas9** — белок-нуклеаза, рассекающая ДНК; **crPHK (CRISPR RNA)** и **tracrPHK**, объединённые в направляющую РНК (sgRNA), которая определяет место разреза по принципу комплементарности.

Принципы работы CRISPR/Cas9:

Приобретение спейсеров: бактерия включает фрагменты вирусной ДНК в свой CRISPR-локус.

crPHK: формируется из CRISPR-повторов и несёт "память" о вирусе.

Интерференция: при повторном заражении комплекс Cas9–sgRNA узнаёт комплементарный участок ДНК и делает **двухцепочечный разрыв**.

Необходимым условием является присутствие **PAM (protospacer adjacent motif)** рядом с мишенью.

Редактирование генома после разрыва:

Клетка "чинит" разрыв двумя путями:

NHEJ (не-гомологичное соединение концов) — ведёт к делециям или вставкам (нокаут гена).

HDR (гомологичная рекомбинация) — позволяет вставить новый ген или скорректировать мутацию.

Генная терапия — практическое применение этих технологий для лечения наследственных, онкологических и вирусных заболеваний.

CRISPR/Cas9 уже используется в клинических испытаниях для лечения анемии Фанкони, серповидноклеточной анемии, некоторых форм рака и ВИЧ-инфекции.

ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

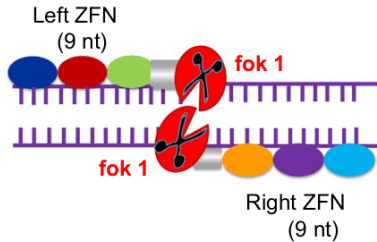
- 1) Что такое редактирование генома и зачем оно применяется?
- 2) Как устроены и как работают ZFN и TALENs?
- 3) Почему ZFN и TALENs действуют в виде димеров?
- 4) Из чего состоит система CRISPR/Cas9 и какова её природная функция?
- 5) Что означает термин «приобретение спейсеров» в системе CRISPR?
- 6) Какую роль играет crRNA в процессе интерференции?
- 7) Что такое PAM, и почему он необходим для работы Cas9?
- 8) Какие пути репарации ДНК используются клеткой после разреза Cas9?
- 9) Как методы редактирования генома применяются в генной терапии?
- 10) В чём преимущества и недостатки систем ZFN, TALENs и CRISPR/Cas9?

➤ Редактирование генома

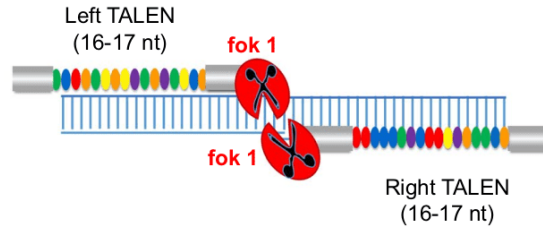
- **Редактирование генома** — это совокупность методов и технологий, направленных на целенаправленное изменение последовательности ДНК в клетках живых организмов с целью коррекции генетической информации.
- Данный процесс предполагает внесение специфических изменений в структуру генетического материала, таких как удаление, замена, вставка или модификация отдельных нуклеотидов или участков ДНК.
- Редактирование генома позволяет управлять наследственными признаками, исправлять мутации, создавать модели заболеваний и разрабатывать новые методы лечения.



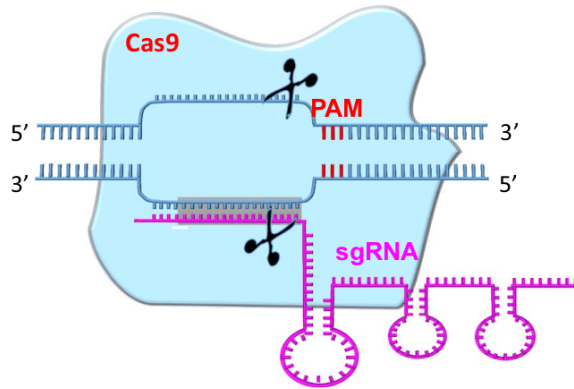
Zinc Finger Nuclease



Transcription Activator-Like Effector Nuclease



CRISPR/Cas9



- Основной редактирования генома являются молекулярные инструменты, способные распознавать определённые участки ДНК и вносить в них изменения. Наиболее известным и широко применяемым методом является система **CRISPR-Cas9**, которая использует направленную РНК для поиска нужного участка в геноме и фермент Cas9 для разрезания двойной спирали ДНК. После разреза клеточные механизмы репарации запускают процессы восстановления, в ходе которых возможно внедрение желаемых изменений.
- Помимо CRISPR-Cas9, существуют и другие технологии, такие как **TALEN** и **ZFN**, обладающие схожими функциями, но отличающиеся по принципам распознавания и специфичности.

- Редактирование генома представляет собой инновационный инструмент молекулярной биологии и медицины, позволяющий изменять генетический код **с высокой точностью**.
- Эта технология открывает новые горизонты в лечении заболеваний, исследовании функций генов и разработке биотехнологических продуктов, однако требует тщательного контроля и регулирования для безопасного и этически оправданного применения.

1. CRISPR-Cas9

Применение: Фундаментальные исследования — нокаут и нок-ин генов для изучения их функции. **Биомедицина** — разработка генетических терапий при наследственных заболеваниях (например, серповидноклеточная анемия, дистрофия Дюшенна). **Создание моделей** заболеваний — получение клеточных и животных моделей для изучения патогенеза. **Сельское хозяйство** — получение устойчивых к болезням, стрессам и вредителям растений и животных. **Микробиология и биотехнология** — оптимизация штаммов-продуцентов, инженерия метаболических путей. **Диагностика** — создание систем для экспресс-диагностики инфекций (например, CRISPR-базированные тесты SHERLOCK и DETECTR).

2. TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

Применение: Точное редактирование генов — внесение целевых мутаций или замен в геноме растений, животных и клеточных линий. **Создание трансгенных организмов** — модификация зигот или эмбрионов для получения устойчивых к заболеваниям животных. **Генная терапия** — коррекция мутантных аллелей в соматических клетках человека. **Коррекция генов** в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (iPSCs) — для дальнейшего использования в регенеративной медицине. **Изучение регуляции** экспрессии генов — слияние TALEN с активаторами или репрессорами транскрипции.

3. ZFN (Zinc Finger Nucleases)

Применение: Терапевтическое редактирование — первая технология, применённая в клинических испытаниях для лечения ВИЧ (выключение CCR5). **Модификация генома** клеток млекопитающих — создание нокаутных линий клеток. **Генная инженерия растений** — повышение урожайности, устойчивости к патогенам. **Создание трансгенных животных** — точное изменение целевых генов. **Функциональная геномика** — изучение роли отдельных генов в клеточных процессах.

	TALEN (transcription activator-like effector nucleases)	ZFN (zinc finger nucleases)	CRISPR/Cas
Target	Protein: DNA	Protein: DNA	(gRNA-Cas9): DNA
Construct	Proteins containing DNA-binding domains that recognize specific DNA sequences down to the base pair	Zinc finger DNA binding motifs in a $\beta\beta\alpha$ configuration, the α -helix recognizes 3 bp segments in DNA	20nt crRNA (CRISPR RNA) fused to a tracrRNA and Cas9 endonuclease that recognize specific sequences to the base pair
Design feasibility	Difficult: -Need a customized protein for each gene sequence -Low delivery efficiency		Easy: - all-in-one gRNA-Cas9 vector system - multigene editing is feasible
References	Moscou and Bogdanove, 2009 Boch <i>et al.</i> , 2009 Gaj <i>et al.</i> , 2013	Beerli <i>et al.</i> , 1998 Perez-Pinera <i>et al.</i> , 2012 Gaj <i>et al.</i> , 2013	Mali <i>et al.</i> , 2013 Cong <i>et al.</i> , 2013 Jiang <i>et al.</i> , 2015

1989

HR-mediated
targeting

First study describing
genome editing via
HR in mouse ES cells
(Capecci *et al*).



1998

Zinc-finger nucleases
(ZFNs)

Discovery of zinc-finger
proteins that can target
specific DNA sequences
(Beerli *et al*).



2009

Transcription-like effector
nucleases (TALENs)

DNA binding proteins
discovered in *Xanthomonas*
bacteria (Boch *et al*).



1992

Cre-lox

The Cre-lox editing
technology was success-
fully used for site-specific
recombination in mice
(Orban *et al*).



2000

Bacterial CRISPR/Cas

The CRISPR defense
system is first identified
in prokaryotes (Mojica
et al).



2013

CRISPR/Cas genome
editing

First demonstration that
the CRISPR/Cas system can
be used for mammalian
cell genome editing (Mali
et al, Cong *et al*).

Системы редактирования CRISPR-Cas

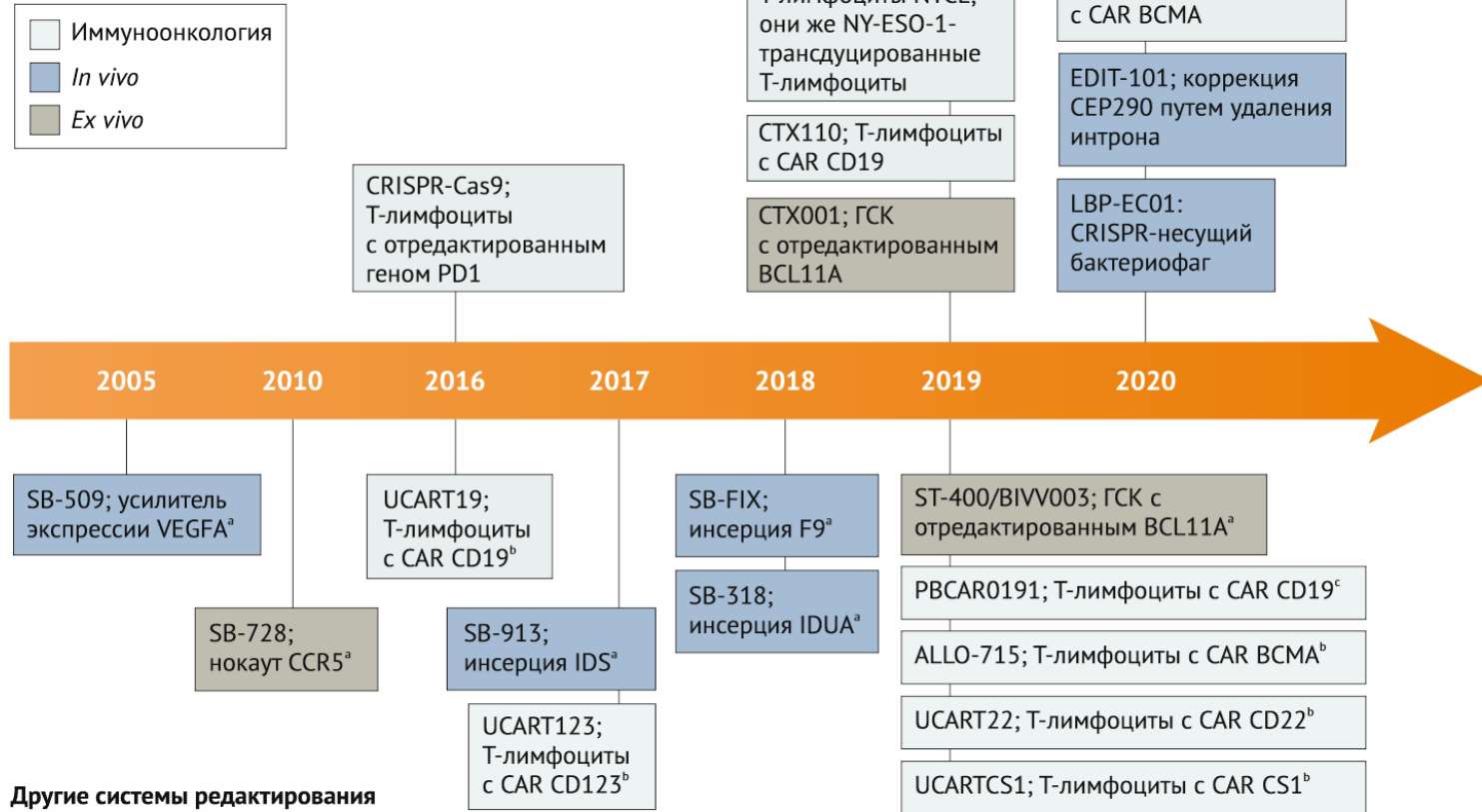


Рис. | Хронология отобранных и финансируемых промышленными фирмами клинических испытаний по редактированию генов

a — белки «цинковые пальцы». b — TALEN (эффеторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции). c — Мегануклеазы. CAR — химерный рецептор антигена; ГСК — гематопозитические стволовые и прогениторные клетки.

Таблица 1 | Выборочный перечень систем редактирования генов *ex vivo*, применяющихся в клинике или близких к клиническому применению

Препарат	Спонсоры	Система редактирования	Характеристики	Показание	Статус
ST-400/ BIVV003	Sangamo/ Sanofi	ZFN	ГСК с отредактированным BCL11A	СКА и β -талассемия	Фаза I/II
CTX001	CRISPR Therapeutics/ Vertex	CRISPR-Cas9	ГСК с отредактированным BCL11A	СКА и β -талассемия	Фаза I
OTQ923	Intellia/ Novartis	CRISPR-Cas9	ГСК с отредактированным BCL11A	СКА и β -талассемия	Заявка* одобрена
EDIT-301	Editas	CRISPR-Cas12a	ГСК с отредактированным HBG1/2	СКА и β -талассемия	Подача заявки* в 2020 году
Не указано	BEAM	На основе CRISPR	Не указано	Не указано	Подача заявки* в 2021 году

Заявка* — заявка на проведение клинических испытаний.

ГСК — гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки;

СКА — серповидноклеточная анемия; ZFN — нуклеаза «цинковые пальцы».

Таблица 2 | Выборочный перечень потенциальных систем редактирования генов в иммуноонкологии, применяющихся в клинике или близких к клиническому применению

Препарат	Спонсоры	Система редактирования	Характеристики	Показание	Статус
UCART19/ ALLO-501	Allogene/ Cellecris/Servier	TALEN	T-лимфоциты с CAR CD19, аллогенные	CD19+ опухоли	Фаза I
PBCAR0191	Precision Biosciences/Servier	Мегануклеаза	T-лимфоциты с CAR CD19, аллогенные	Неходжкинская лимфома и ОЛЛ	Фаза I
CTX110	CRISPR Therapeutics	CRISPR-Cas9	T-лимфоциты с CAR CD19, аллогенные	CD19+ опухоли	Фаза I/II
T-лимфоциты NYCE	Университет Пенсильвании / Институт Паркера /Tmunity	CRISPR-Cas9	TCR, распознающие NY-ESO-1	ММ	Фаза I
ALLO-715	Allogene	TALEN	T-лимфоциты с CAR BCMA, аллогенные	ММ	Фаза I
CTX120	CRISPR Therapeutics	CRISPR-Cas9	T-лимфоциты с CAR BCMA, аллогенные	ММ	Фаза I/II
UCART123	Cellecris	TALEN	T-лимфоциты с CAR CD123, аллогенные	ОМЛ	Фаза I
UCART22	Cellecris	TALEN	T-лимфоциты с CAR CD22, аллогенные	В-ОЛЛ	Фаза I
UCARTCS1	Cellecris	TALEN	T-лимфоциты с CAR CS1, аллогенные	ММ	Фаза I
NTLA-5001	Intellia	CRISPR-Cas9	T-лимфоциты с CAR WT1, аллогенные	ОМЛ	Подача заявки* в 2021 году
Не указано	Refuge Biotech	CRISPR-dCas9	T-лимфоциты с CAR HER2	Опухоли	Подача заявки* в 2021 году
EDIT-201	Editas	CRISPR-Cas	NK-клетки, аллогенные	Солидные опухоли	Исследования для определения возможности подачи заявки*

Заявка* — заявка на проведение клинических испытаний.

ОМЛ — острый миелобластный лейкоз; В-ОЛЛ — В-клеточный острый лимфобластный лейкоз; CAR — химерный рецептор антигена; ММ — множественная миелома; NK — натуральные киллеры; NYCE — NY-ESO-1-трансдуцированные Т-лимфоциты; TALEN — эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции; TCR — Т-клеточный рецептор.

Т-лимфоциты также служат доступным и привлекательным объектом редактирования генов ex vivo.

Компания Sangamo Therapeutics впервые опробовала этот подход в 2010 году вместе со своей второй программой для использования в клинике. До того, как иммуноонкология вошла в моду, Sangamo Therapeutics нашли способ настраивать Т-лимфоциты на борьбу с инфекционными заболеваниями. В рамках своей ex vivo программы SB-728 компания использовала ZFN, чтобы нарушить экспрессию рецептора CCR5 во взятых у пациента Т-лимфоцитах. Для проникновения в Т-лимфоциты ВИЧ соединяется с рецептором CCR5, поэтому Sangamo Therapeutics предположили, что этот подход защитит Т-лимфоциты от ВИЧ-инфекции. В 2014 году Карл Джун (Carl June), ведущий исследователь из Пенсильванского университета, и его коллеги сообщили в New England Journal of Medicine, что редактор генов компании Sangamo может модифицировать CCR5 и является безопасным, что доказывает возможность использования ZFN для создания специальных Т-клеток.

С тех пор SB-728 отошел на второй план, но потенциал использования генно-инженерных Т-клеток в иммуноонкологии возрос (таблица 2).

Таблица 3 | Выборочный перечень систем редактирования генов *in vivo*, применяющихся в клинике или близких к клиническому применению

Препарат	Спонсоры	Система редактирования	Характеристики	Показание	Статус
SB-913	Sangamo	ZFN	Инсерция IDS	МПС II	Фаза I/II безуспешна
EDIT-101	Allergan/Editas Medicine	CRISPR-Cas9	Коррекция CEP290 путем удаления интрона	LCA10	Фаза I/II
LBP-EC01	Locus Biosciences	CRISPR-Cas3	CRISPR- несущий бактериофаг	ИМП	Фаза II
EBT-101	Excision BioTherapeutics	CRISPR-Cas9	Вырезание ДНК ВИЧ	ВИЧ	Фаза I в 2020 году
NTLA-2001	Intellia/Regeneron	CRISPR-Cas9	Нокаут TTR	ATTR	Фаза I в 2020 году
Не указано	Navega Therapeutics	CRISPR-dCas9	Эпигенетический сайленсинг Nav1.7	Боль	Фаза I к 2021 году
Не указано	Precision Biosciences/Gilead	Мегануклеаза	ДНК HBV	Гепатит В	Подача заявки* в 2021 году

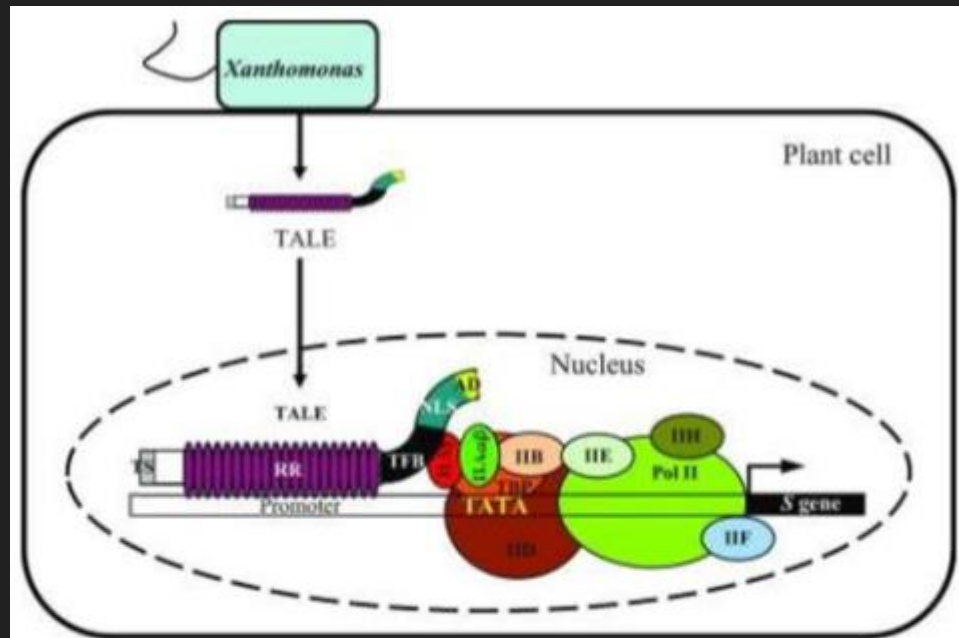
Заявка* — заявка на проведение клинических испытаний.

ATTR — транстиретиновый амилоидоз; HBV — вирус гепатита В; LCA10 — врожденный амавроз Лебера 10; МПС II — мукополисахаридоз тип II; ИМП — инфекция мочевыводящих путей; ZFN — нуклеаза с цинковыми пальцами.

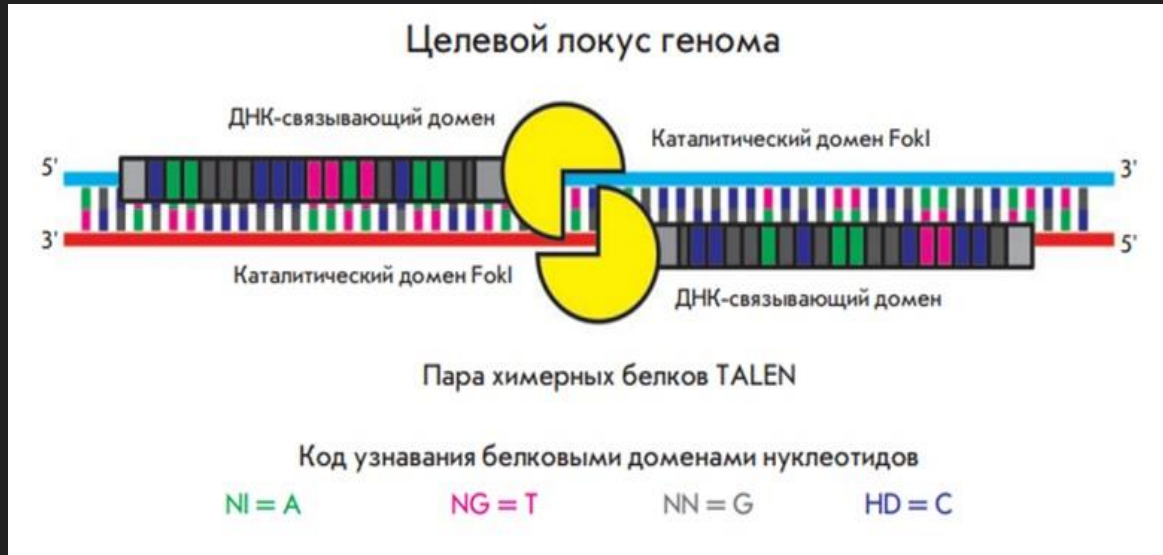
- Клинические испытания агентов, редактирующих геном, в том числе технологий CRISPR-Cas9, нуклеаз «цинковые пальцы» и TALEN, расширяют границы терапии *ex vivo*, *in vivo* и иммуноонкологии.
- За последние полтора года в США или ЕС в клиническое применение вошли не менее 11 таких программ, и шесть из них — это системы редактирования геномов на основе CRISPR-Cas.
- «Сейчас такое захватывающее время», — говорит Дженнифер Дудна (Jennifer Doudna) из Калифорнийского университета в Беркли, пионер технологии CRISPR-Cas и соучредитель нескольких компаний, работающих с CRISPR. После многих лет, потраченных на размышления о том, как эта новая технология может изменить лечение болезней, мы наконец вот-вот получим ключевые клинические данные.
- Пока что большинство программ по редактированию генов сосредоточены на редких моногенных заболеваниях и применении в области иммуноонкологии, но сторонники данной технологии уже рассматривают более широкие области применения.

Transcription activator-like effector nucleases (TALEN)

- TALEN переводится как "эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции"
- История этой системы началась с маленьких любителей перца и помидоров - бактерий рода *Xanthomonas*. Для успешного поедания вкусных культур они впрыскивают в цитоплазму растений белки TAL-эффекторы. Эти вещества, притворяясь транскрипционными факторами, активируют гены растений, которые способствуют лучшему выживанию паразитов. На основе этого механизма и был создан метод TALEN



- ДНК-связывающий домен TALEN состоит из мономеров, каждый из которых опознает один нуклеотид. Каждый мономер состоит из 34 аминокислот, две из которых (в 12 и 13 положениях) называются "высоко вариабельными" (Repeat Variable Di-residue, RVD). Именно эти две аминокислоты отвечают за узнавание нуклеотида
- Мы снова можем составлять ожерелье из таких мономеров. А пришитый к нему домен рестриктазы FokI делает нужный разрез (аналогично прошлому примеру с цинковыми пальцами)



Стоит заметить, что специфичность RVD аминокислот не идеальна. Некоторые RVD могут связываться с несколькими нуклеотидами с разной эффективностью, что грешит опасностью нецелевых разрывов. Также условием для работы TALEN является наличие тимина перед 5'-концом таргетной последовательности. Ограничение нестрашное, но есть. Помимо названных преград мы снова утыкаемся в проблему высокой дороговизны системы, ведь для каждой мишени ДНК нам нужно создавать отдельный белок.

- **Нуклеазы цинковых пальцев (ZFNs)** - это ферменты, которые связывают и разрезают различные последовательности двухцепочечной ДНК (dsDNA).
- Функциональная единица CompoZr ZFN состоит из двух отдельных мономерных белков, которые связывают «полусайт» ДНК, состоящий примерно из 15-18 нуклеотидов (см. Рисунок 1). Когда два мономера ZFN «возвращаются» к своим соседним участкам-мишеням, домены расщепления ДНК димеризуются и создают двухцепочечный разрыв (DSB) в ДНК. Введение в геном ZFN-опосредованных DSB закладывает основу для высокоэффективного редактирования генома.

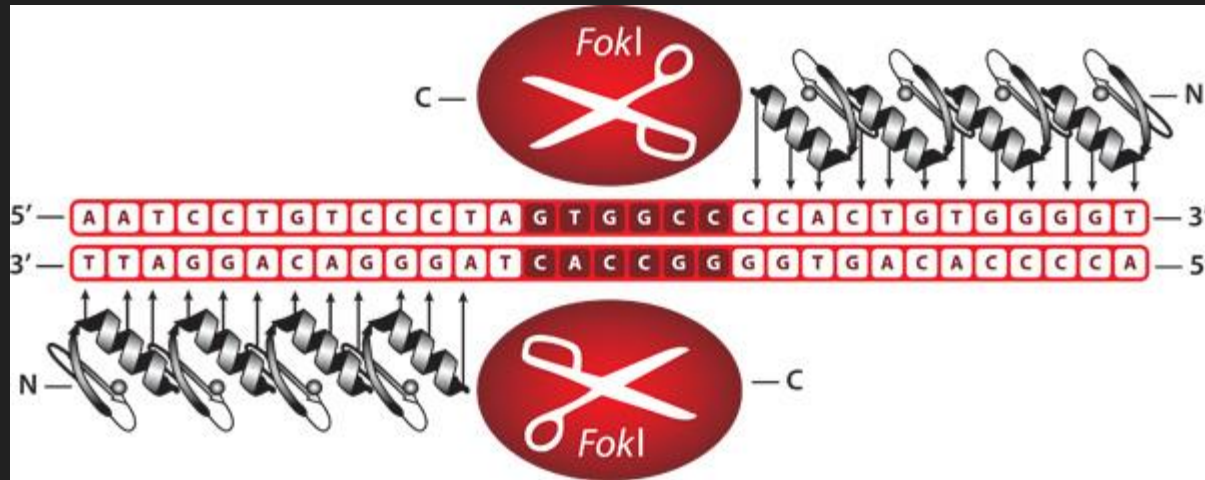
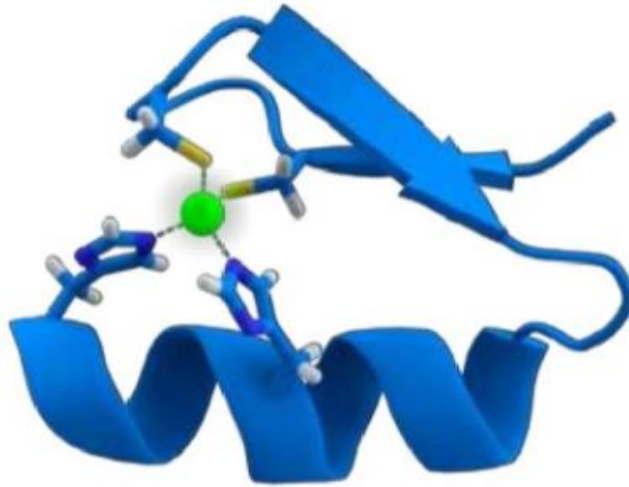


Рисунок. Представление связанных нуклеазы пальцем цинка.

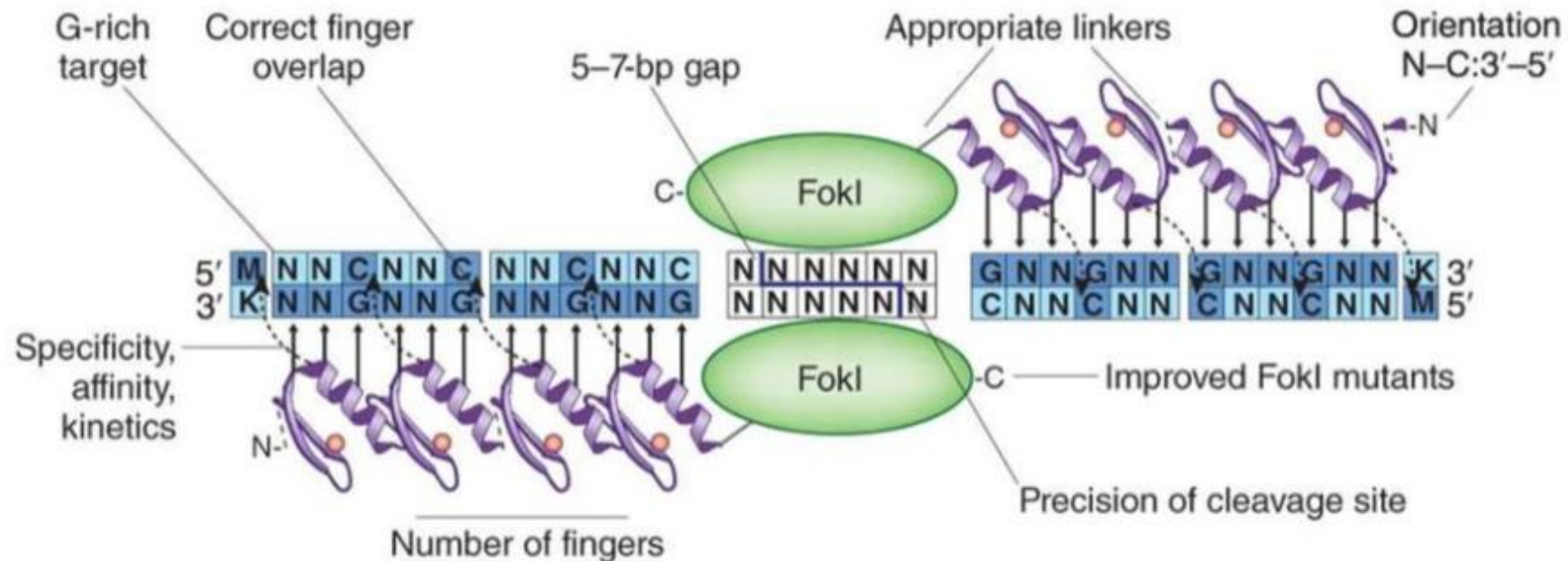
ZFNs разработаны белки состоят из цинкового пальца ДНК-связывающим доменом слит с расщеплением области рестриктазы FokI. При привязке как гетеродимер, ZFNs создания двухцепочечной перерыв в указанной пользователем последовательности ДНК.

Zinc Finger технология



- **Цинковый палец** ([англ. zinc finger](#)) — тип [белковой](#) структуры, небольшой [белковый мотив](#), стабилизированный одним или двумя ионами [цинка](#), связанными [координационными связями](#) с аминокислотными остатками белка. Как правило, цинковый палец включает около 20 аминокислот, ион цинка связывает 2 [гистидина](#) и 2 [цистеина](#). Цинковые пальцы являются белковыми модулями, взаимодействующими с [ДНК](#), [РНК](#), другими белками или небольшими молекулами.
- Основными группами белков с цинковыми пальцами являются ДНК-связывающие [факторы транскрипции](#), а также искусственные [ферменты рестрикции](#), получаемые слиянием ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-разрезающим доменом нуклеазы. Домен цинкового пальца может быть спроектирован так, чтобы узнавать желаемую последовательность ДНК и связываться с ней.

ZFPs functional as a pair

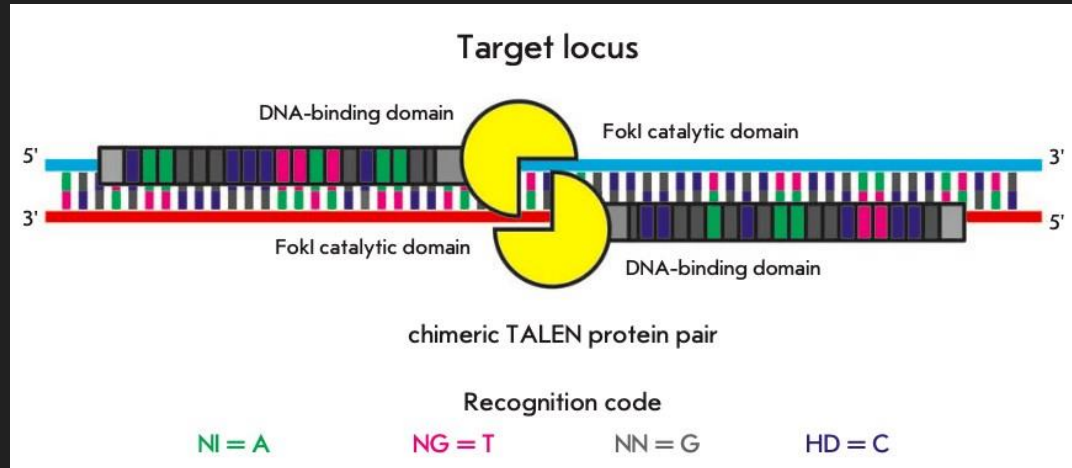


Unique DNA target in genome, no related sites, accessible chromatin

Mark Isalan «Zinc-finger nucleases: how to play two good hands» , Nature Methods, 9, 32-34 (2012)

Система TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

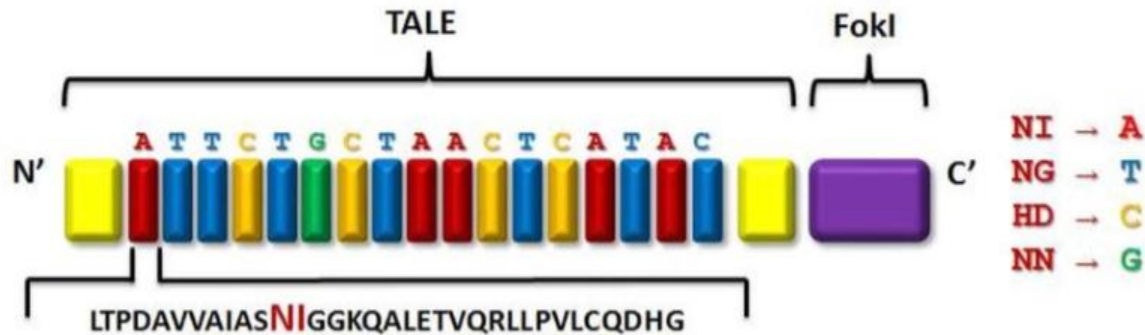
- В 2011 году методы высокоточного редактирования геномов, среди которых была и система **TALEN**, названы журналом Nature Methods методом года.
- История разработки этой системы связана с изучением бактерий рода *Xanthomonas*. Эти бактерии являются патогенами таких культурных растений, как рис, перец, томат, они наносят экономически значимый вред сельскому хозяйству, что стало причиной их тщательного изучения.



- Белки TALE состоят из центрального домена, ответственного за связывание ДНК, сигнала ядерной локализации и домена, активирующего транскрипцию целевого гена.
- Впервые способность этих белков связываться с ДНК была описана в 2007 году, а всего через год двумя группами ученых был расшифрован код узнавания целевой последовательности ДНК белками TALE.
- Показано, что ДНК-связывающий домен состоит из мономеров, каждый из которых связывается с одним нуклеотидом в целевой нуклеотидной последовательности. Мономеры представляют собой тандемные повторы из 34 аминокислотных остатков, из которых два, расположенные в позициях 12 и 13, высоко вариабельные (Repeat Variable Di-residue, RVD), и именно они отвечают за узнавание определенного нуклеотида.
- Этот код является вырожденным, некоторые RVD могут связываться с несколькими нуклеотидами с разной эффективностью. При этом перед 5'-концом последовательности, с которой связываются мономеры TALE, в целевой молекуле ДНК всегда находится один и тот же нуклеотид – тимидин, влияющий на эффективность связывания. Последний тандемный повтор, связывающий нуклеотид на 3'-конце сайта узнавания, состоит из 20 аминокислотных остатков, поэтому он назван полуповтором.

- Теоретически с помощью искусственных нуклеаз TALEN с двухцепочечный разрыв можно внести в любой участок генома, с известными сайтами узнавания ДНК-связывающих доменов.
- Единственное ограничение по выбору сайтов нуклеаз TALEN заключается в необходимости присутствия T перед 5'-концом целевой последовательности.
- Тем не менее, варьируя длину спейсерной последовательности, в подавляющем большинстве случаев можно осуществить выбор сайтов. Показано, что остаток W232 в составе N-концевой области ДНК-связывающего домена взаимодействует с 5'-T, влияя на эффективность связывания TALEN с целевым сайтом.
- Однако и это ограничение удастся преодолеть в результате селекции мутантных вариантов N-концевого домена.

Структура TALE системы с FokI нуклеазой



1. ДНК связывающего домена

- ДНК-связывающий домен состоит из мономеров, каждый из которых связывает один нуклеотид. Мономеры тандемных повторов 34 аминокислотных остатков, два из которых расположены в положениях 12 и 13 позиции и высоко вариабельны и именно они несут специфичность для связывания с определенными нуклеотидами (RVD - Repeat Variable Diresidue). Могут связываться с несколькими нуклеотидами с различной эффективностью

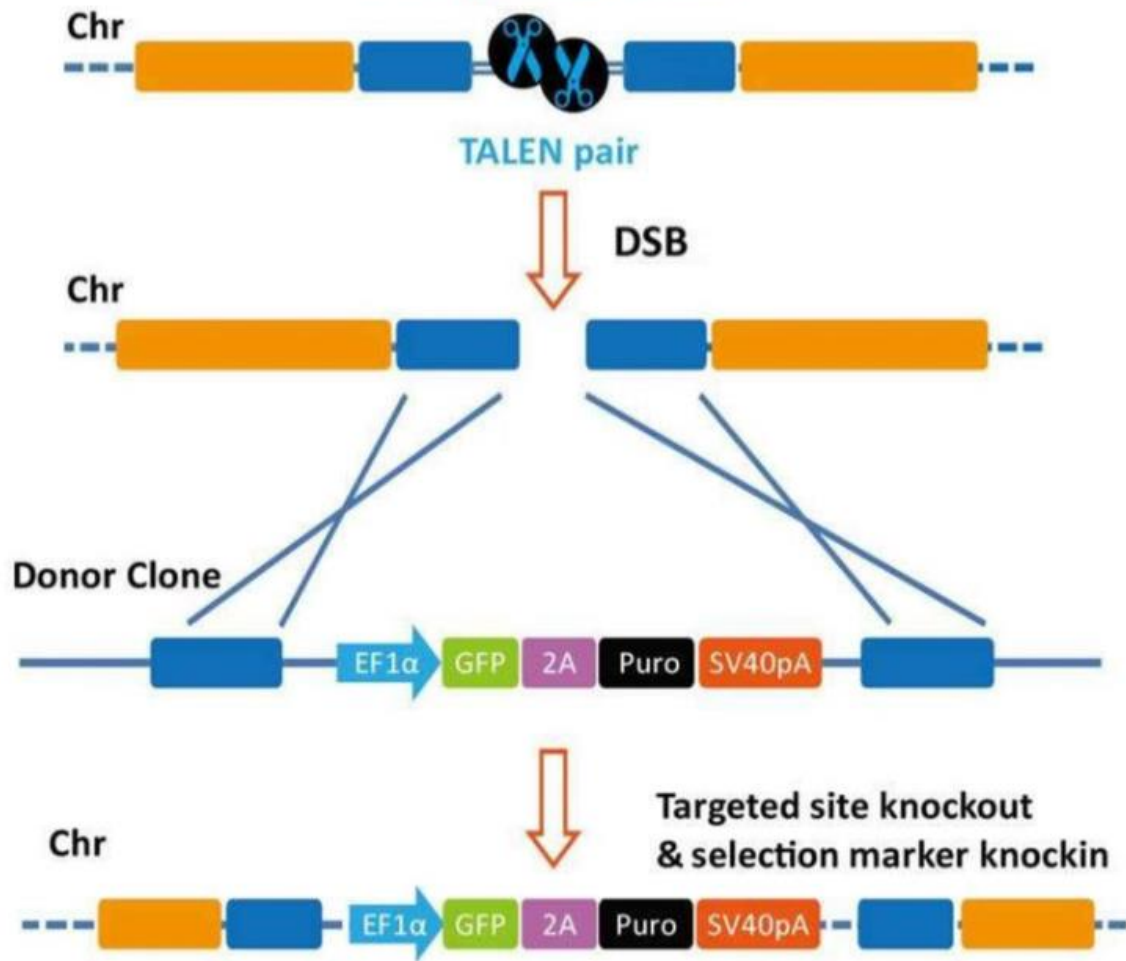
2. Неспецифический домен расщепления ДНК – FokI эндонуклеаза.

- FokI связывается с двухцепочечной ДНК ДНК-связывающим доменом в области узнавания 5'-GGATG-3'. Домен расщепление ДНК активируется и расщепляет ДНК.

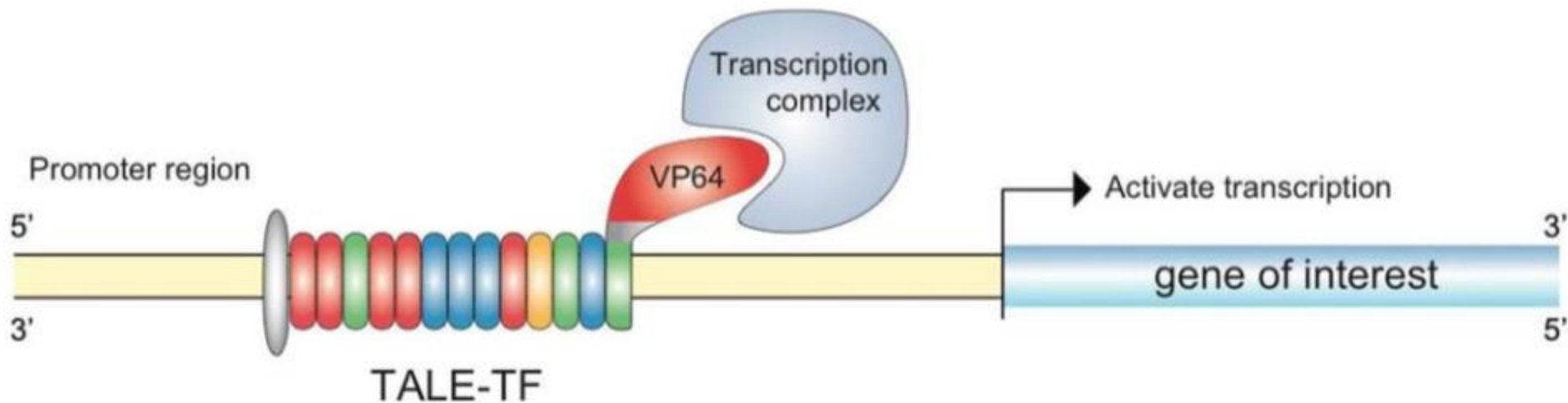


Модификации генома используя метод TALEN

→ Targeted locus ←



Активация транскрипции

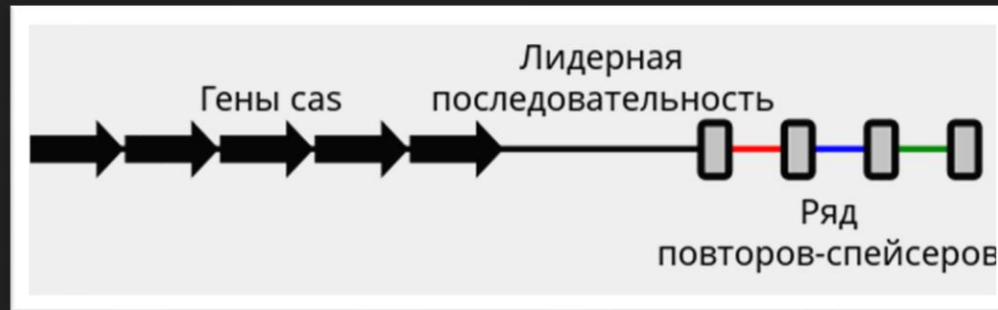


Введение

- ***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



Отвечает за увеличение количества спейсеров после вирусных атак

Повторяющиеся идентичные участки (повторы)

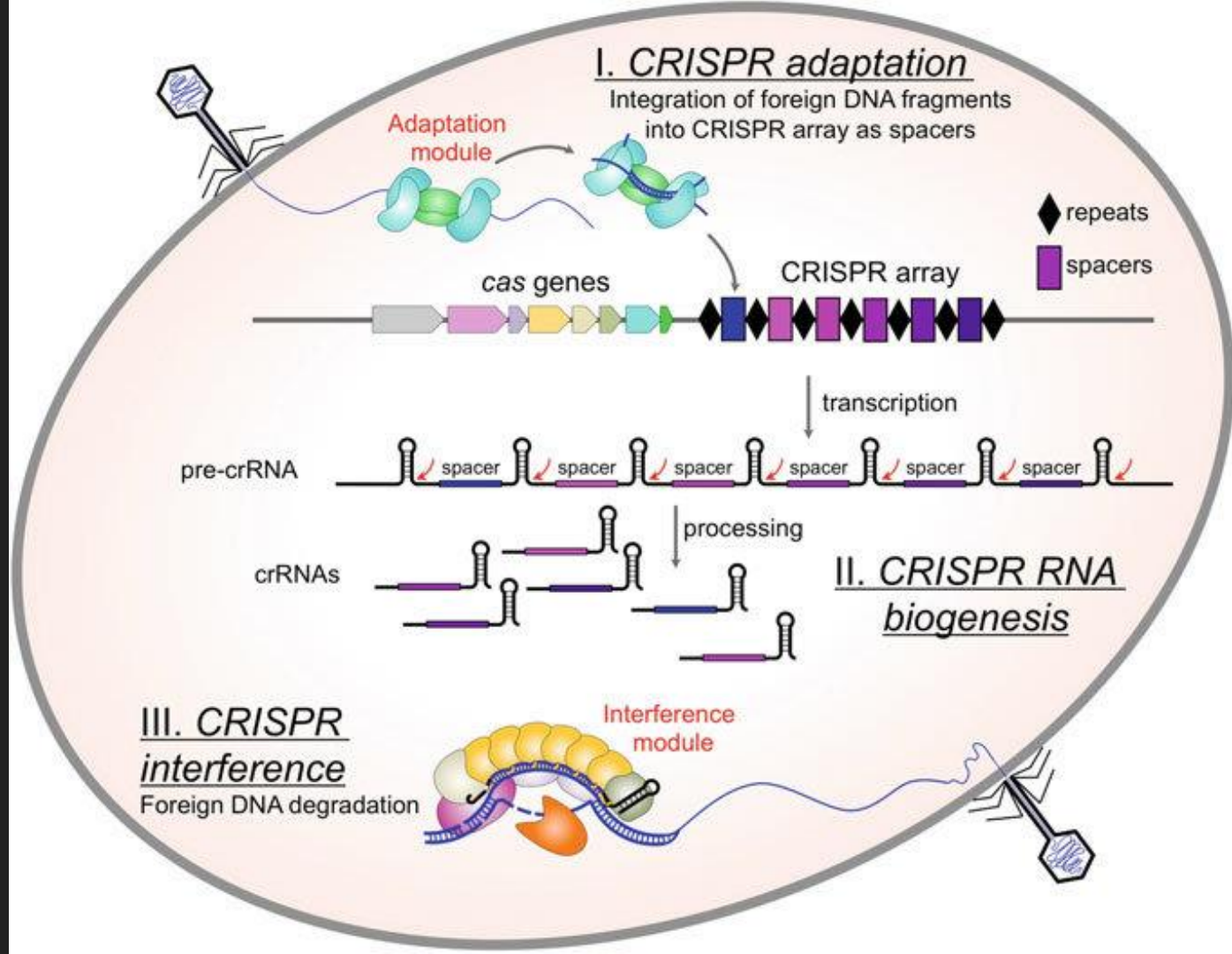


Уникальные участки ДНК (спейсеры)

Появляются после вирусных инфекций и необходимы для приобретенного иммунитета.

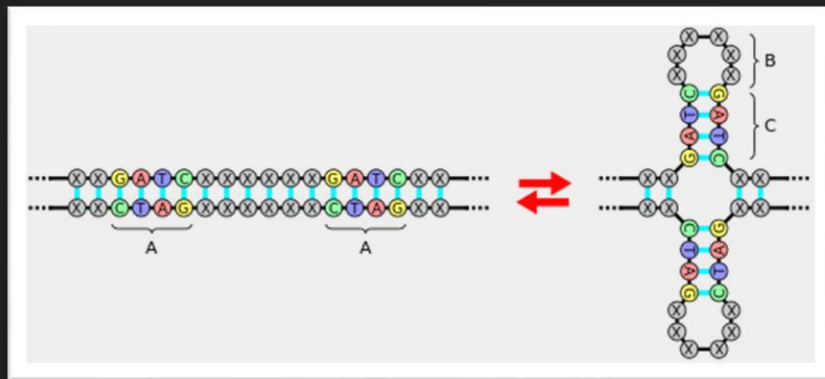
Приобретение спейсеров

- 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 дупликация 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

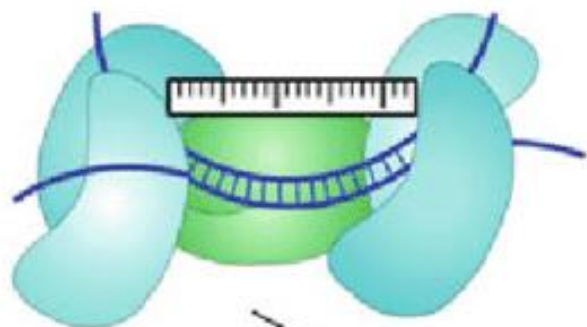
- После интеграции в CRISPR частей чужеродных генетических элементов требуется перевести их в форму, способную нацеливать белки Cas на последовательности-мишени для их распознавания и разрушения. Такой формой служит направляющая crРНК, которая содержит уникальную последовательность, комплементарную определённой 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



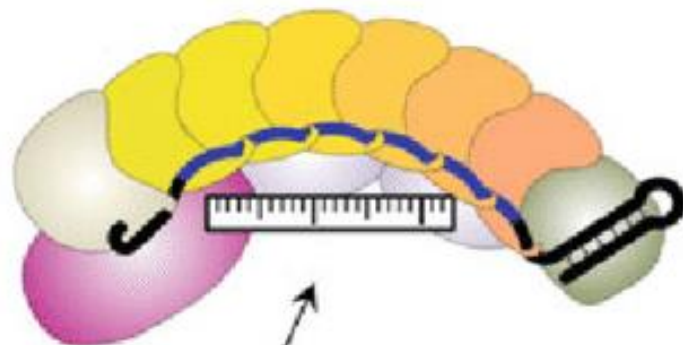
Интерференция

- 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.

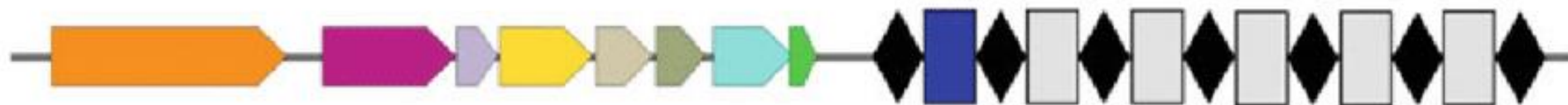
Adaptation module



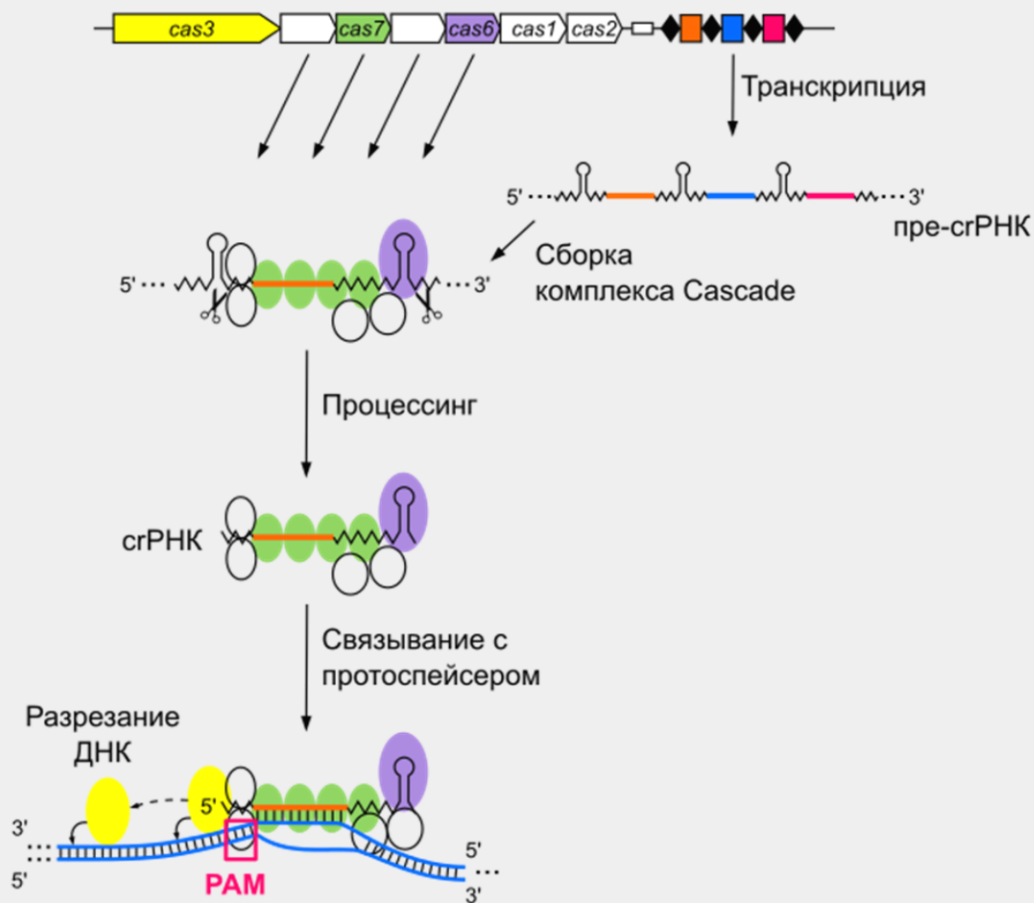
Interference module



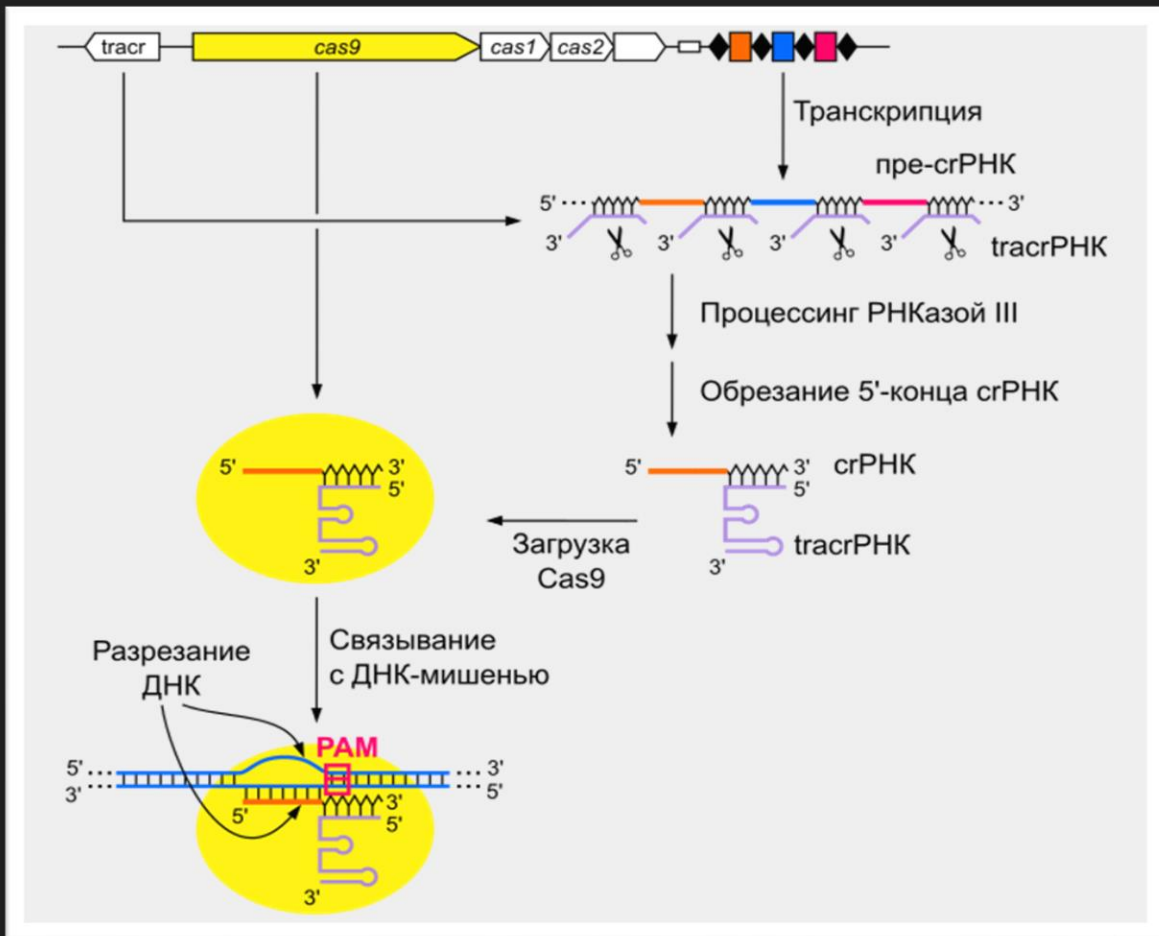
CRISPR array



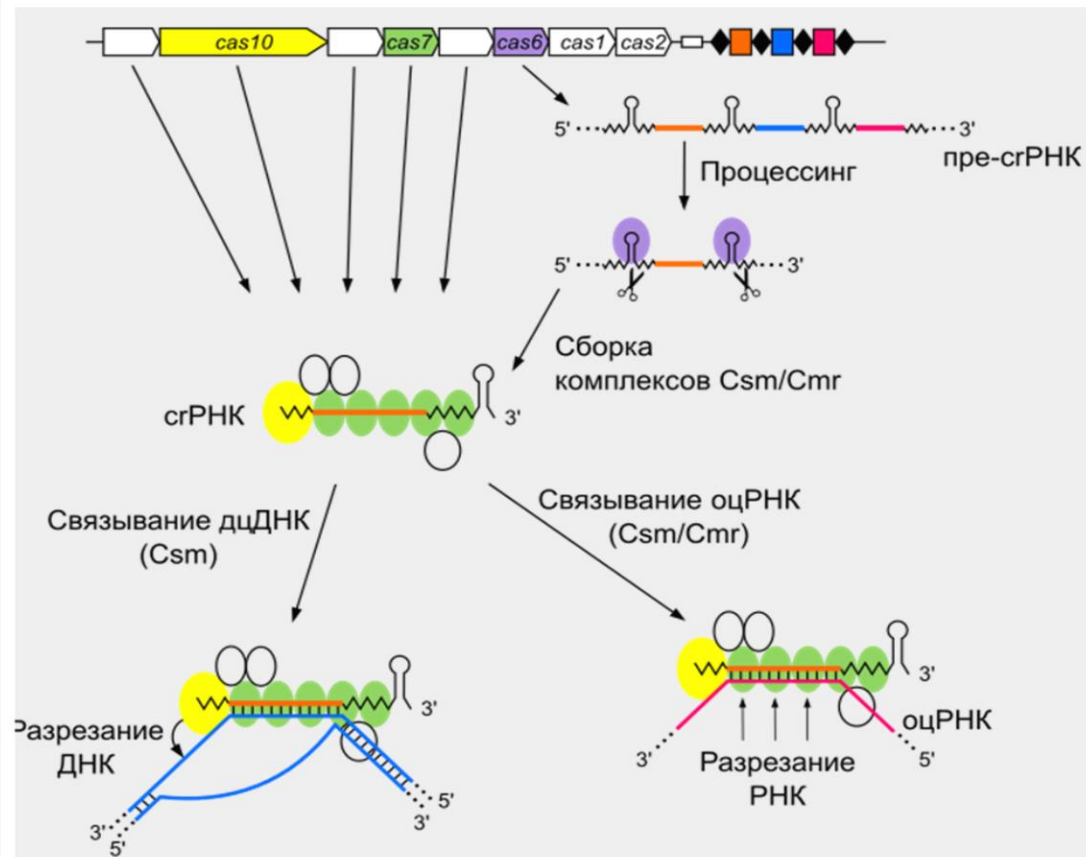
Системы I типа



Системы II типа



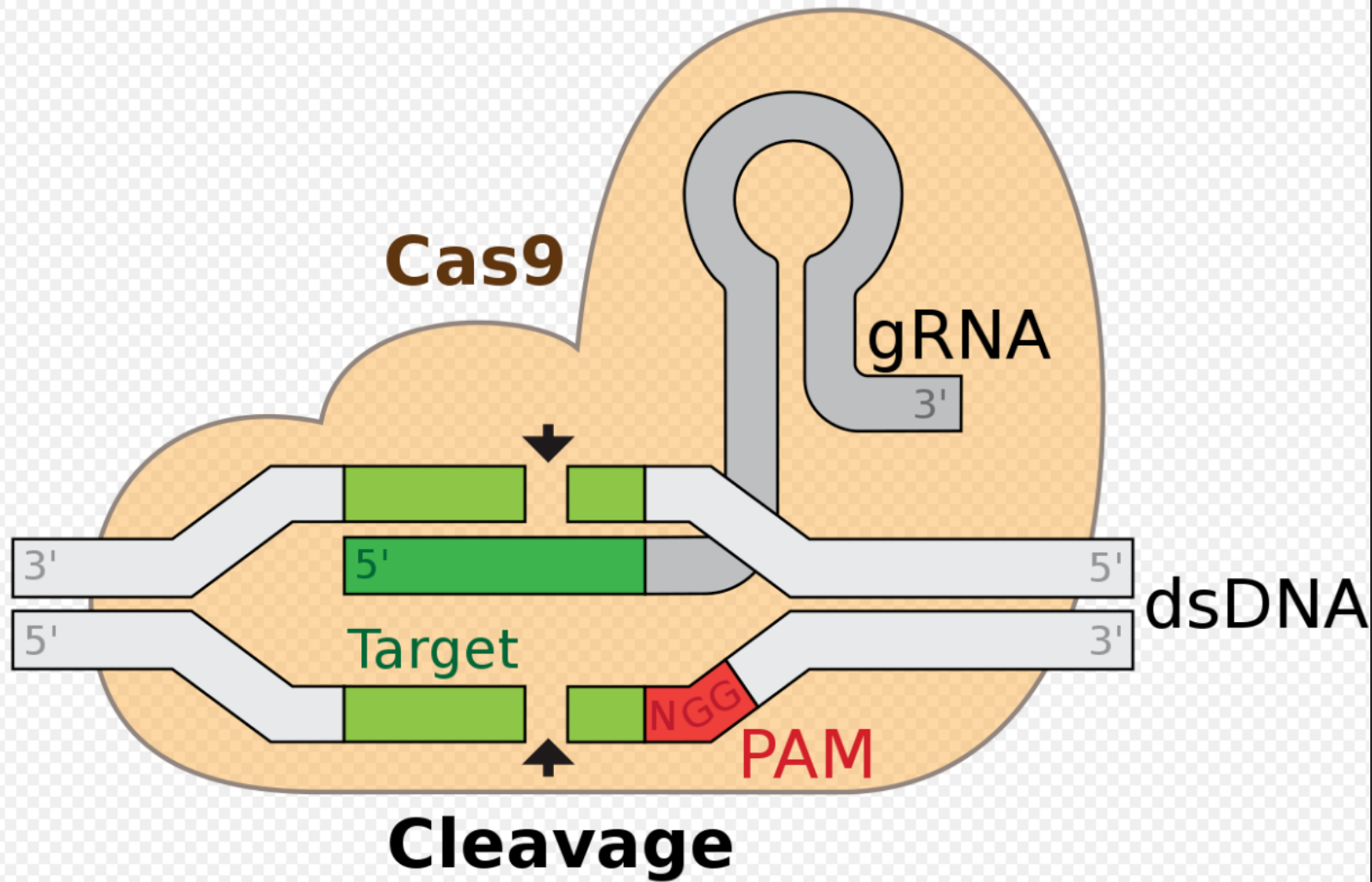
Системы III типа

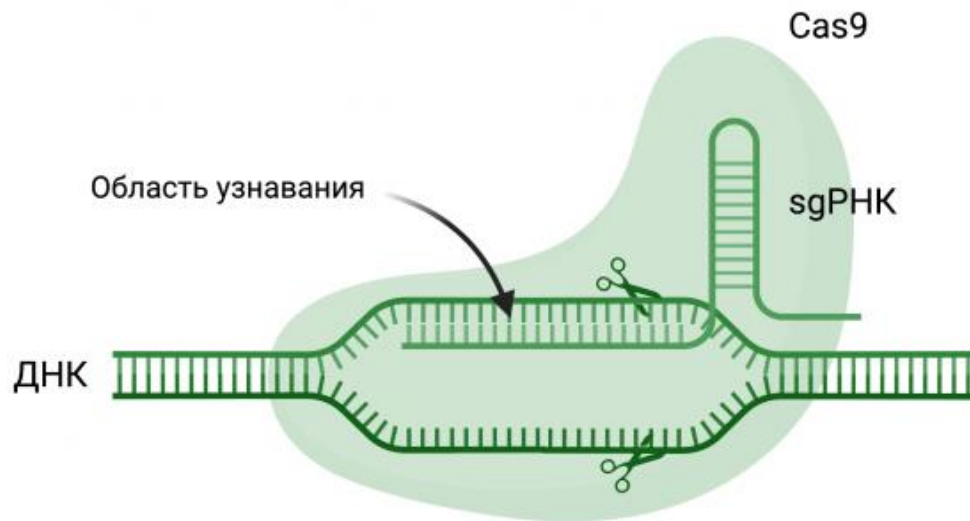


Мотив, смежный с протоспейсером

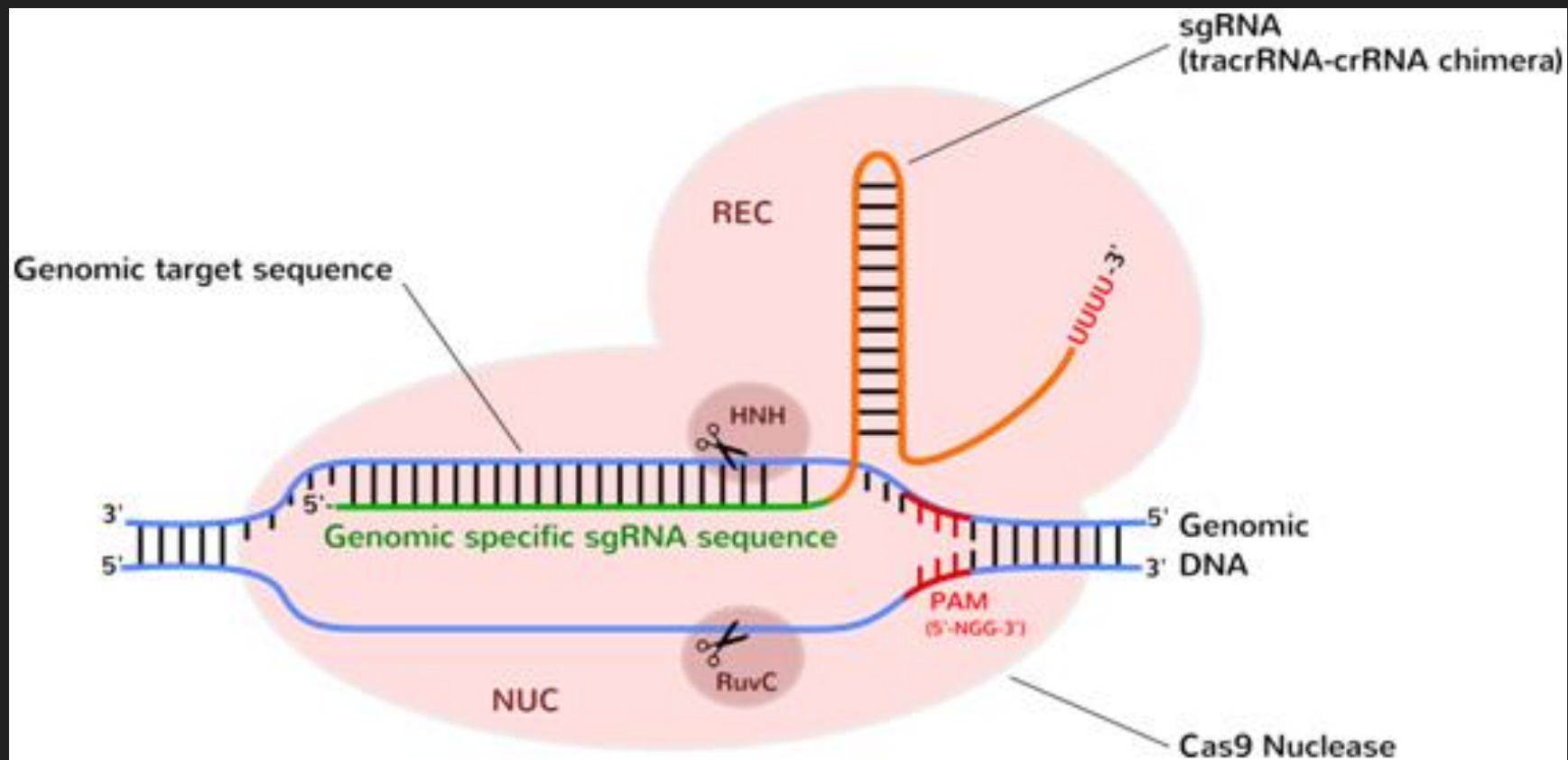
Смежный мотив протоспейсера представляет собой последовательность ДНК из 2–6 пар оснований, непосредственно следующую за последовательностью ДНК, на которую нацелена нуклеаза Cas9. Является компонентом вируса или плазмиды, но не обнаружен в геноме бактерии-хозяина. Cas9 не будет успешно связываться или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

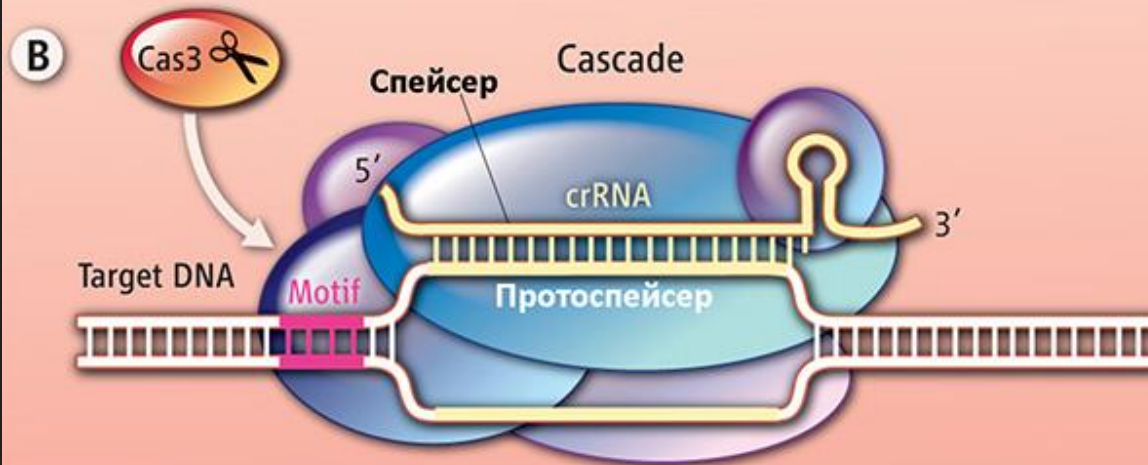
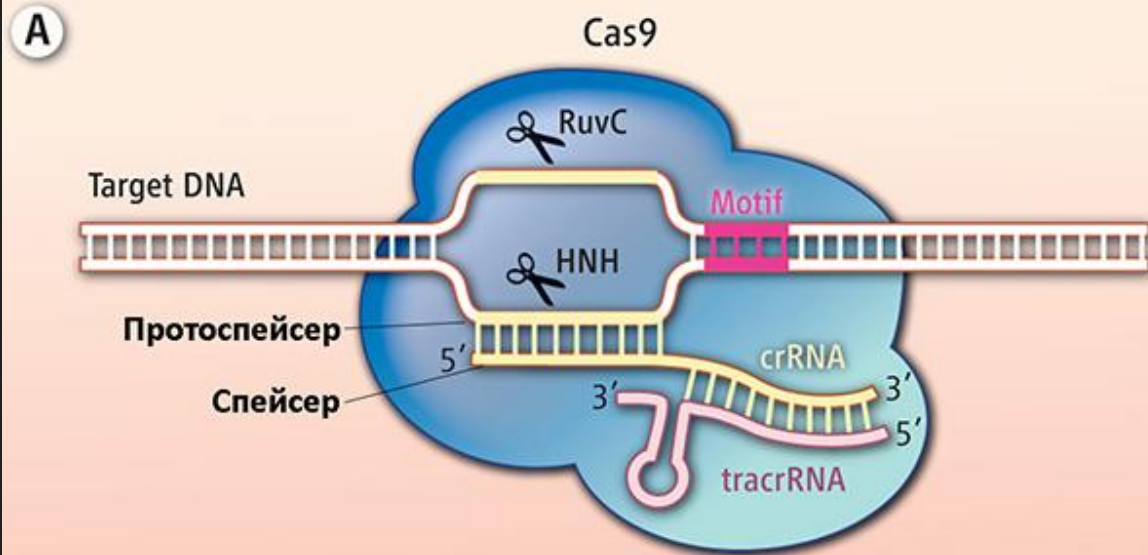
	<u>nuclease</u>	<u>PAM</u>	<u>size (kDa)</u>
engineered	SpCas9	NGG	150
	SpCas9-VQR	NGAG	150
	SpCas9-VRER	NGCG	150
	SpCas9-NG	NGN	150
	SpCas9-xCas9	NG/GAA/GAT	150
	SpCas9-Sc++	NNG	150
	SpCas9-SpG	NGN	150
	SpCas9-SpRY	NRN	150
		“near -PAMless”	150
	FnCas9	NGG	180
	FnCas9-RHA	YG	180
	SaCas9	NNGRRT	115
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



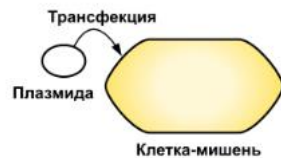


sgРНК - (single-guide РНК)
химерная РНК сочетающая в
себе tracrРНК и crРНК,
которые выполняют функцию
нацеливания нуклеазы Cas9
в природных системах

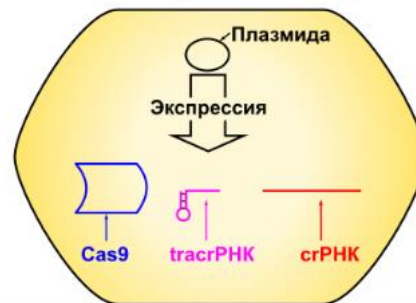




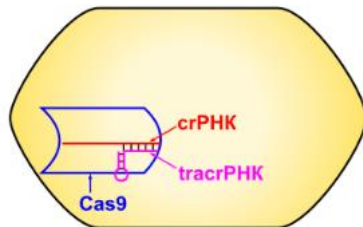
1: Трансфекция



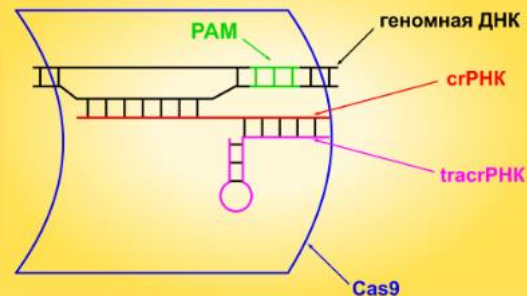
2: Экспрессия плазмиды



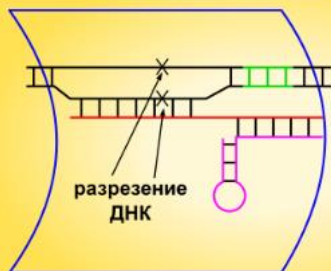
3: Активация Cas9



4: Связывание с последовательностью-мишенью в геноме



5: Разрезание геномной ДНК



6: ДНК готова к репарации





Cleavage



DNA repair



Deletion / Insertions



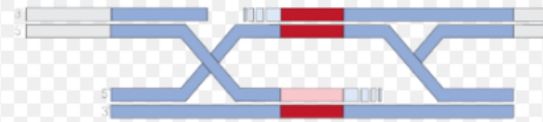
**Non-Homologous
End Joining (NHEJ)**



Homology



Donor DNA



New DNA

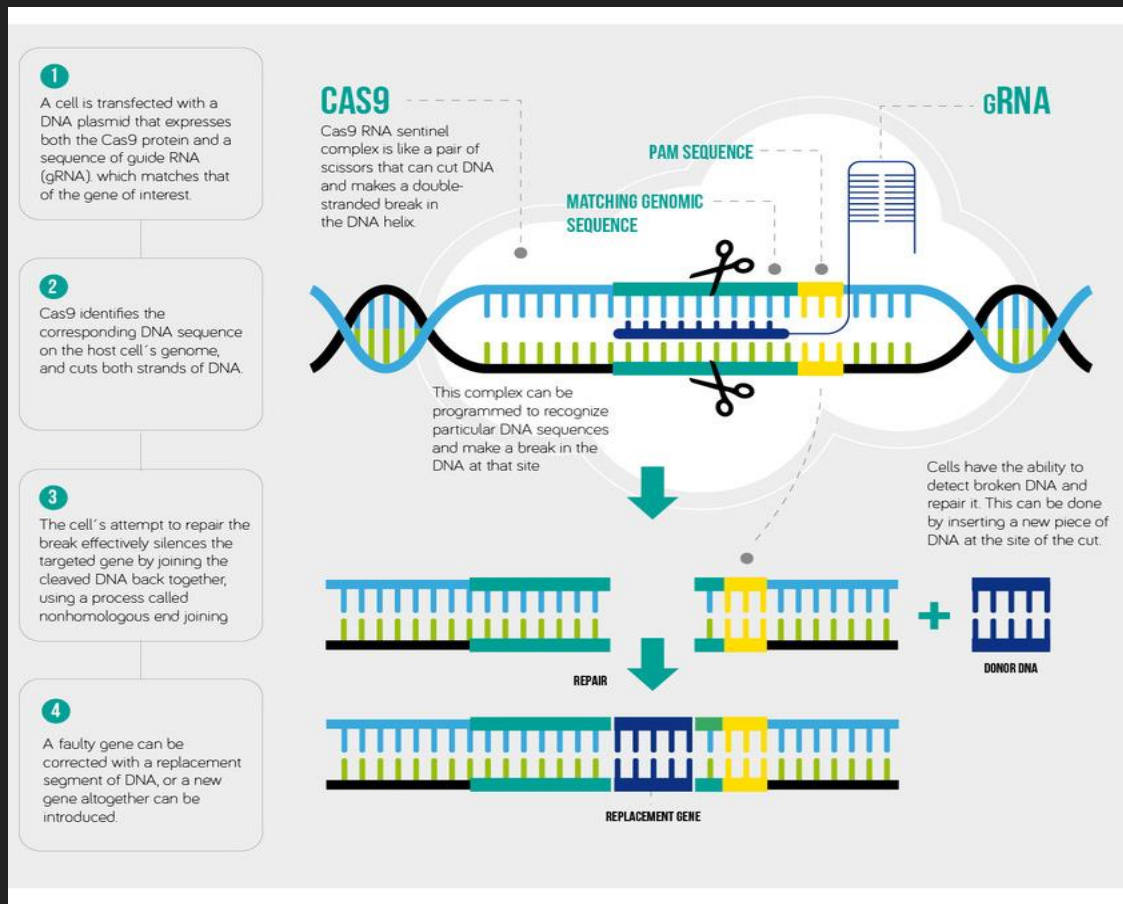


**Homology Directed Repair
(HDR)**

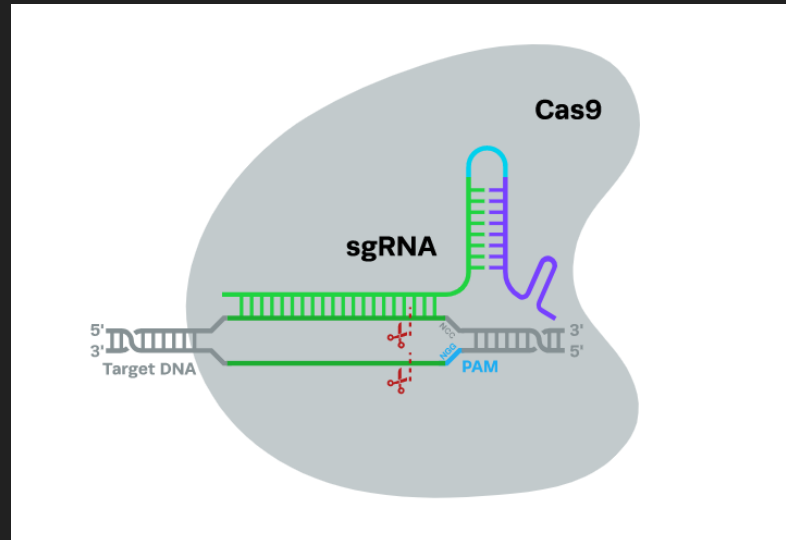
Механизм геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9

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.



- 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*.

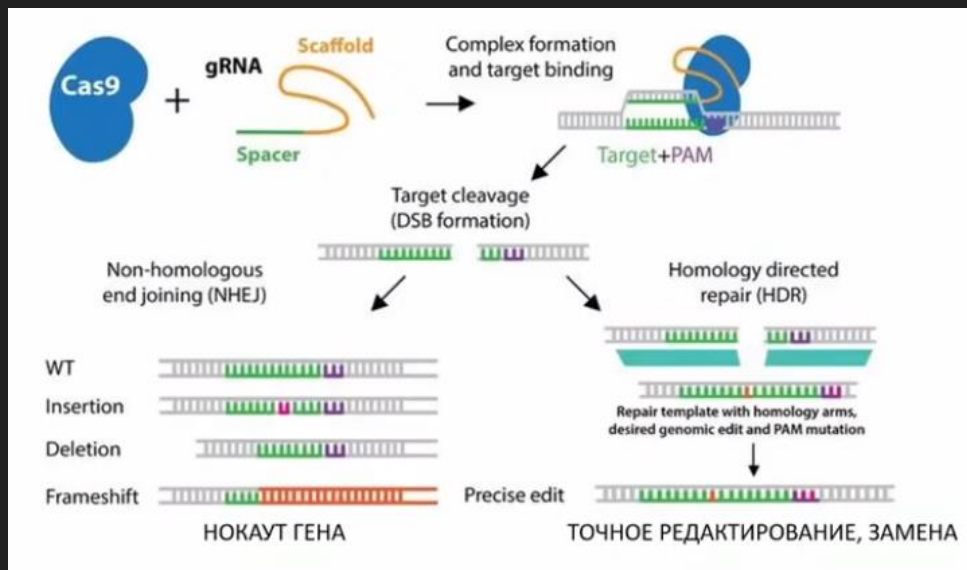


Применение

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, β -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 корецептора 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.

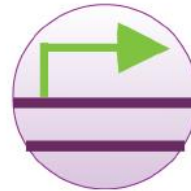
Регуляция активности генов

Помимо редактирования генома, CRISPR/Cas-9 можно использовать для искусственной регуляции (активации или репрессии) определенной мишени гена путем усовершенствованной модификации белка Cas-9.¹⁵ 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.

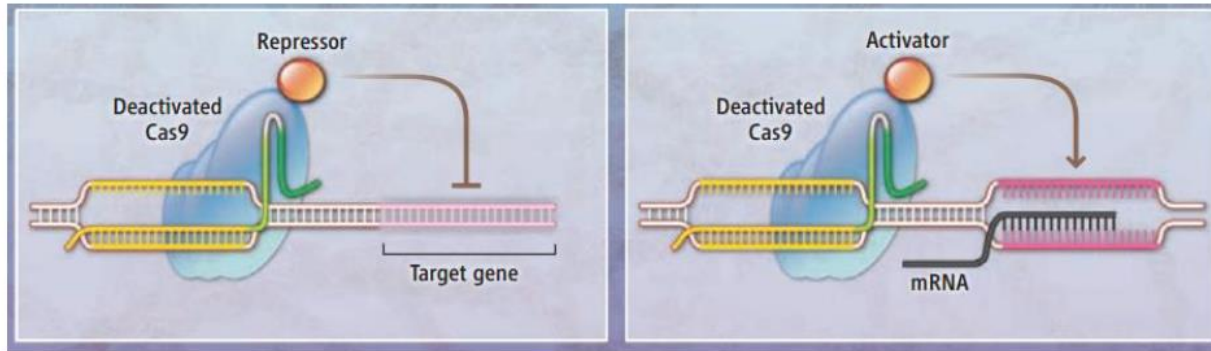
Эпигенетический контроль экспрессии



Ингибирование экспрессии генов



Активация экспрессии генов





Модификации системы и их применение^[4]

dCas9:
Искусственная
регуляция
активности генов



CRISPR/Cas9:
лечение болезней
человека



CRISPR/Cas9:
модификация
с/х растений



CASFISH:
Флуоресцентное
мечение



Иные функции CRISPR/Cas^[7]



Регуляция активности
генов



Расхождение хромосом



Исправление ошибок
в ДНК



Ремоделирование генома



недостатки метода:

1. Эта система не настолько точно распознаёт искомую последовательность нуклеотидов, поэтому высока вероятность нецелевых разрывов
2. Отдельный цинковый палец способен влиять на узнавание мишени у соседних цинковых пальцев. Нужны дополнительные исследования их взаимодействий, которые сейчас уже не выгодно проводить в виду наличия более совершенных систем редактирования
3. Для каждой искомой последовательности ДНК необходимо создание отдельного химерного комплекса цинковых пальцев с нуклеазой, что очень **долго и дорого**

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
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