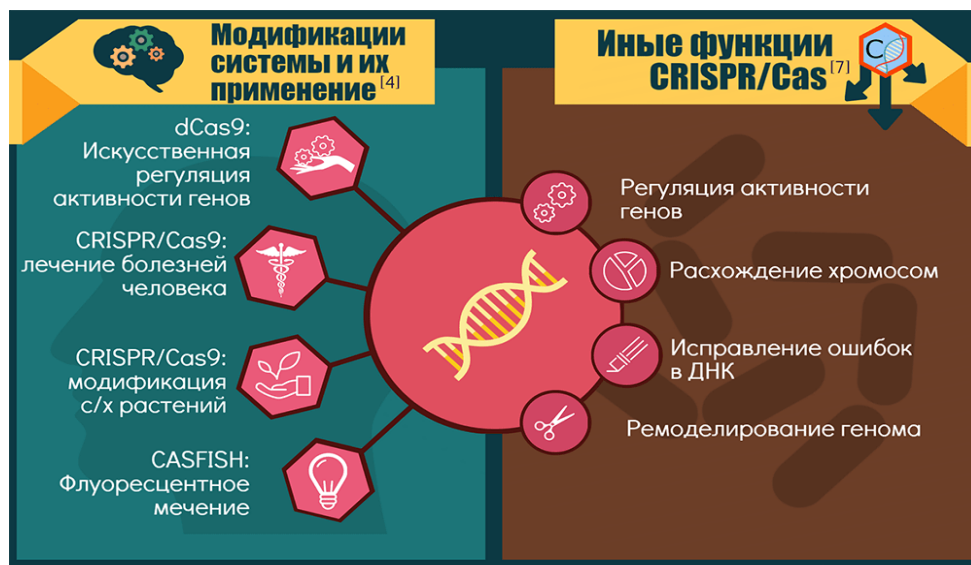


Технологии редактирования генома: CRISPR/Cas-системы и их применение

Технологии редактирования генома позволяют целенаправленно изменять определенные участки генетического материала. До появления CRISPR для направленного воздействия на ДНК активно развивались системы ZFN и TALEN, в которых специфичность распознавания мишени обеспечивалась специально сконструированными белковыми доменами. **CRISPR/Cas-системы** изменили подход к редактированию генома, поскольку в наиболее известных вариантах адресность определяется главным образом небольшой направляющей РНК, взаимодействующей с Cas-белком. Благодаря этому изменение мишени во многих исследовательских задачах стало значительно проще.

Аббревиатура **CRISPR** расшифровывается как *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* — кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы. Эти последовательности были обнаружены в геномах бактерий и архей задолго до того, как стало понятно их функциональное значение.

Позднее было установлено, что CRISPR вместе с Cas — CRISPR-associated proteins является частью естественной системы защиты бактерий и архей от чужеродного генетического материала, в частности некоторых вирусов и других мобильных генетических элементов. Поэтому CRISPR изначально возник не как лабораторная технология, а как природный механизм адаптивной защиты микроорганизмов.



В природном CRISPR-локусе располагаются повторяющиеся последовательности, между которыми находятся участки, называемые спейсерами. Многие спейсеры происходят из генетического материала, с которым микроорганизм сталкивался ранее. Благодаря этому система может использовать соответствующую последовательностную информацию при повторной встрече с похожей генетической мишенью.

В упрощенном виде природную CRISPR-систему можно представить как своеобразную молекулярную память:

контакт с чужеродной нуклеиновой кислотой → сохранение фрагмента последовательности в CRISPR-локусе → образование направляющих CRISPR-РНК → распознавание комплементарной последовательности → действие Cas-белков.

Этот природный принцип впоследствии был адаптирован для направленного редактирования геномов.

Одной из наиболее известных систем стала CRISPR/Cas9. Cas9 представляет собой РНК-направляемую нуклеазу. В лабораторных системах ее направляют к определенному участку ДНК с помощью специально подобранной направляющей РНК.

Классическую систему CRISPR/Cas9 для учебных целей удобно рассматривать как взаимодействие трех основных компонентов: Cas9, направляющей РНК и целевой ДНК.

Направляющая РНК содержит участок, который способен взаимодействовать с комплементарной последовательностью ДНК. В широко используемых инженерных вариантах элементы природных crRNA и tracrRNA объединены в единую молекулу, называемую single-guide RNA — sgRNA.

Поэтому основной принцип можно выразить следующим образом:

sgRNA определяет адрес → Cas9 обеспечивает нуклеазную активность → целевая ДНК подвергается разрезанию.

Это принципиально отличается от ZFN и TALEN. В этих системах для изменения генетической мишени необходимо изменять ДНК-связывающую часть белка. В CRISPR/Cas9 Cas-белок может оставаться тем же, а специфичность для новой мишени во многих случаях изменяется путем изменения направляющей последовательности RNA. Однако одной комплементарности направляющей РНК недостаточно. Для многих Cas-систем рядом с целевой последовательностью должен присутствовать короткий специфический мотив, называемый PAM — protospacer adjacent motif.

PAM распознается Cas-белком и играет важную роль в определении допустимых участков-мишеней. Различные Cas-белки могут иметь различные требования к PAM.

Поэтому общая организация участка-мишени может быть представлена как: последовательность, комплементарная направляющей РНК + PAM.

После обнаружения подходящего PAM Cas9 начинает проверять соседнюю последовательность на соответствие направляющей РНК. При достаточной комплементарности формируется стабильный комплекс, после чего активные центры Cas9 обеспечивают расщепление цепей ДНК.

В результате классическая активная Cas9 может создавать двуцепочечный разрыв — double-strand break, DSB.

Таким образом, базовый механизм можно представить в виде цепочки:

sgRNA + Cas9 → поиск PAM → распознавание целевой последовательности → связывание комплекса → разрезание ДНК → клеточная репарация.

Именно клеточная репарация определяет значительную часть конечного результата.

После возникновения двуцепочечного разрыва клетка стремится восстановить целостность генома. Одним из основных механизмов является NHEJ — non-homologous end joining, негомологичное соединение концов.

NHEJ способен быстро соединить разорванные участки, но восстановление может сопровождаться небольшими вставками или делециями — indels. Если они возникают в кодирующей области, может измениться рамка считывания или структура белка.

Поэтому CRISPR/Cas9 широко применяется в исследовательской биологии для получения knockout, то есть нарушения функции выбранного гена.

Вторым механизмом является HDR — homology-directed repair, гомологически направленная репарация. При соответствующих клеточных условиях восстановление может использовать гомологичную последовательность в качестве информации для репарации. Этот принцип позволяет получать более определенные изменения, хотя возможности HDR сильно зависят от типа и состояния клеток.

Следовательно, классическую схему можно представить так:

CRISPR/Cas9 → DSB → NHEJ → indels → возможный knockout

или

CRISPR/Cas9 → DSB → HDR → направленное изменение последовательности.

При этом важно понимать, что CRISPR — это значительно более широкое понятие, чем Cas9. В природе существует большое разнообразие CRISPR/Cas-систем, отличающихся составом белков, организацией и типом нуклеиновой кислоты-мишени.

Одной из других известных нуклеаз является Cas12. Различные представители Cas12 используются для работы с ДНК и имеют особенности, отличающие их от Cas9.

Еще одно важное семейство связано с Cas13. В отличие от широко известных ДНК-направленных систем Cas9, некоторые Cas13 ориентированы на работу с РНК. Это расширяет концепцию CRISPR за пределы постоянного изменения последовательности ДНК.

Таким образом, термин «CRISPR-технологии» включает целое семейство молекулярных инструментов. Большим этапом развития стало создание модифицированной dCas9 — dead Cas9, или каталитически неактивной Cas9. Такая молекула теряет способность разрезать ДНК, но сохраняет возможность направляться к определенному участку с помощью guide RNA. Это позволило использовать CRISPR не только для разрезания ДНК, но и для управления активностью генов. Если dCas9 направляется к определенной регуляторной области и препятствует нормальной работе транскрипционного аппарата, можно добиться подавления экспрессии. Такой подход называют CRISPR interference — CRISPRi. Если dCas9 объединяется с активирующими регуляторными компонентами, можно повысить активность определенного гена. Такой подход называют CRISPR activation — CRISPRa.

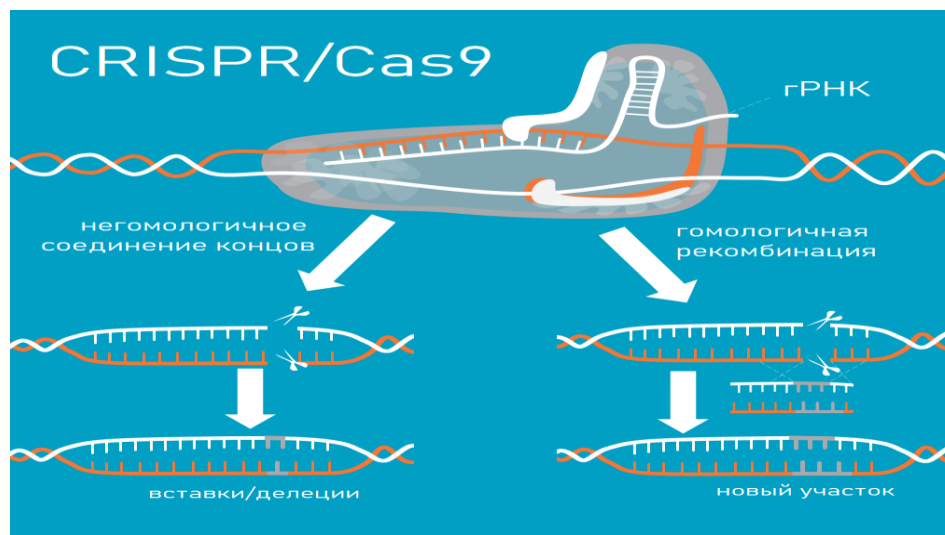
Таким образом:

CRISPRi → снижение активности выбранного гена;
CRISPRa → повышение активности выбранного гена.

Это особенно важно для функциональной геномики, поскольку позволяет исследовать роль генов без обязательного создания двуцепочечного разрыва.

Следующим важным направлением стало base editing — редактирование оснований. Основная идея заключается в изменении определенного нуклеотидного состояния без классического двуцепочечного разрыва ДНК. Для этого модифицированный Cas-компонент объединяется с ферментом, способным проводить определенное химическое преобразование основания. В результате становится возможным осуществлять некоторые типы точечных изменений более направленно, чем при классическом DSB-зависимом подходе. Существуют различные классы base editors, рассчитанные на определенные типы преобразований. При этом они имеют собственные ограничения, включая доступность подходящей мишени и возможность нежелательных изменений в определенном окне редактирования. Еще одним развитием технологии стало prime editing. Этот подход также направлен на получение определенных изменений без обязательного классического двуцепочечного разрыва.

В prime editing используется модифицированная Cas-система, связанная с обратной транскриптазой, а направляющая РНК содержит дополнительную информацию, связанную с предполагаемым изменением. Концептуально prime editing можно рассматривать как более сложную систему, объединяющую распознавание генетической мишени и запись заданной последовательностной информации.



Поэтому развитие CRISPR можно условно представить следующим образом:

CRISPR/Cas9	→	направленное	расщепление	ДНК;
dCas9	→	управление	генами	без разрезания;
base editing	→	изменение	отдельных	оснований;
prime editing	→	более гибкое точное редактирование.		

CRISPR также позволяет работать сразу с несколькими генетическими мишенями. Такой подход называют multiplex genome editing. Возможность использовать несколько направляющих РНК делает CRISPR особенно привлекательным для исследования сложных генных сетей. Большое значение имеют CRISPR-скрининги. В традиционном эксперименте исследователь может изменять один ген и наблюдать результат. В CRISPR-скрининге можно параллельно исследовать большое количество генов и выявлять те из них, которые связаны с определенным клеточным фенотипом. Например, общая исследовательская логика может выглядеть следующим образом:

множество генов → библиотека направляющих РНК → изменение активности различных генов → отбор клеток по фенотипу → секвенирование → биоинформатический анализ → выявление функционально значимых генов.

Именно поэтому CRISPR стал важнейшим инструментом современной функциональной геномики. CRISPR применяется при создании клеточных моделей. Исследователь может изменить определенный ген, а затем изучить последствия на уровне РНК, белка, метаболизма и фенотипа.

Правильная логика функционального исследования выглядит так:

редактирование ДНК → подтверждение генотипа → анализ экспрессии → исследование белкового продукта → оценка клеточной функции → фенотипическая интерпретация.

Наличие изменения в последовательности ДНК еще не доказывает автоматически изменение биологической функции. Поэтому функциональное подтверждение остается обязательным элементом качественного исследования. Большое значение CRISPR имеет в генетической инженерии микроорганизмов. Системы редактирования позволяют исследовать функции микробных генов, изменять метаболические пути и создавать экспериментальные или биотехнологические штаммы. CRISPR тесно связан с метаболической инженерией. Если необходимо изменить образование определенного метаболита, исследователь может воздействовать на гены соответствующего биохимического пути. Однако изменение одного гена не всегда приводит к ожидаемому результату, поскольку клеточный метаболизм представляет собой сложную взаимосвязанную сеть. В растительной биотехнологии CRISPR применяется для функционального исследования генов и направленного изменения признаков растений. Редактирование может затрагивать гены, связанные с развитием, качеством продукции или взаимодействием растения с окружающей средой. В исследованиях животных CRISPR используется для создания модельных систем, позволяющих изучать функции генов и молекулярные механизмы различных процессов.

Особенно большое внимание уделяется медицинским применениям. Один из подходов заключается в *ex vivo* редактировании: клетки получают от пациента, генетически модифицируют в контролируемых условиях, проверяют их характеристики и затем используют в рамках соответствующей медицинской технологии. Другой концепцией является *in vivo* редактирование, при котором компоненты системы должны быть доставлены непосредственно к необходимым клеткам организма. В этом случае одной из основных проблем становится эффективная и специфичная доставка. Таким образом, эффективность редактирования определяется не только самой нуклеазой и guide RNA. Необходимо обеспечить попадание компонентов в нужную ткань и нужные клетки.

Одной из важнейших проблем CRISPR являются off-target effects, то есть нежелательное воздействие на участки генома, отличные от основной мишени. Если в геноме присутствует последовательность, достаточно похожая на целевую, комплекс в определенных условиях может взаимодействовать и с ней. Поэтому специфичность направляющей системы имеет принципиальное значение.

Современные подходы стремятся повышать специфичность за счет оптимизации направляющих последовательностей, модификации Cas-белков и совершенствования методов анализа потенциальных внецелевых изменений. Существует и противоположная проблема — нежелательные результаты непосредственно в целевом участке, иногда называемые on-target complexities. После создания разрыва клеточная репарация может сформировать не единственный ожидаемый вариант, а различные изменения. Поэтому результат необходимо подтверждать экспериментально.

Для этого применяются молекулярно-генетические методы, включая секвенирование целевого участка, а в зависимости от задачи — более широкие геномные исследования. CRISPR тесно связан с биоинформатикой. Перед экспериментом необходимо проанализировать последовательность гена, определить подходящую область, оценить наличие необходимых мотивов и возможные сходные

участки генома. После редактирования биоинформатика используется для анализа последовательностей и оценки полученных вариантов.

Общую исследовательскую цепочку можно представить следующим образом:

биологический вопрос → выбор гена-мишени → анализ последовательности → проектирование направляющей системы → редактирование → анализ целевого локуса → оценка специфичности → функциональное исследование → статистический анализ → биологический вывод.

CRISPR/Cas необходимо сравнить с рассмотренными ранее ZFN и TALEN.

В ZFN адресность определяется массивом zinc-finger белковых доменов, а расщепление обычно обеспечивается FokI.

В TALEN последовательность распознается TALE-повторами, а для разрезания также используется FokI. В CRISPR/Cas адресность в наиболее распространенных системах определяется взаимодействием направляющей РНК с целевой нуклеиновой кислотой при участии Cas-белка.

Это можно запомнить следующим образом:

ZFN: белок распознает ДНК + FokI разрезает.

TALEN: TALE-белок распознает ДНК + FokI разрезает.

CRISPR/Cas: направляющая РНК задает мишень + Cas выполняет основную эффекторную функцию.

Именно простота перепрограммирования guide RNA стала одним из факторов широкого распространения CRISPR. Однако нельзя утверждать, что CRISPR автоматически является оптимальным методом для любой задачи. Выбор технологии зависит от доступности мишени, необходимой специфичности, типа клеток, способа доставки, характера требуемого изменения и других факторов.

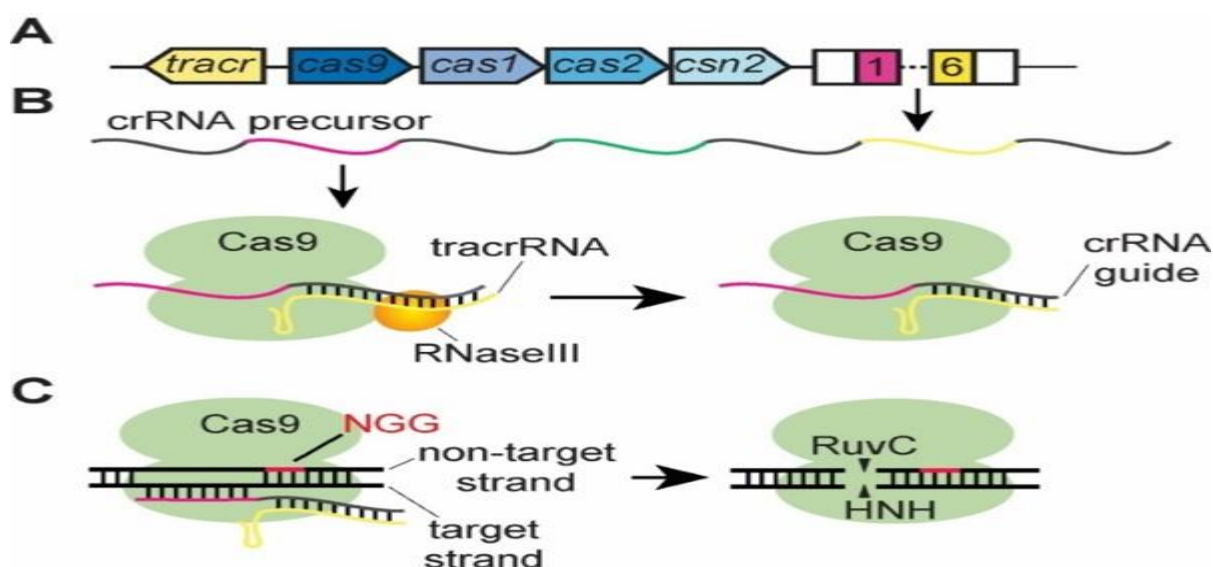
CRISPR/Cas-системы также имеют важное диагностическое направление. Некоторые Cas-белки после распознавания определенной нуклеиновой кислоты способны формировать измеряемый сигнал в специально разработанных диагностических системах. Это позволило создать молекулярные подходы для обнаружения определенных последовательностей ДНК или РНК. Таким образом, CRISPR постепенно превратился из инструмента разрезания ДНК в целую технологическую платформу. Она включает редактирование генома, регулирование экспрессии, функциональные скрининги, работу с РНК, эпигенетическое регулирование и молекулярную диагностику.

Отдельного внимания требуют этические вопросы. Особенно важно различать редактирование соматических клеток и изменения, которые потенциально могут передаваться следующим поколениям.

Соматическое редактирование направлено на клетки конкретного организма и само по себе не предполагает наследования изменения потомством. Редактирование зародышевой линии вызывает значительно более сложные научные, медицинские, социальные и этические вопросы, поскольку изменения потенциально могут стать наследуемыми. Поэтому развитие технологий геномного редактирования сопровождается требованиями к оценке безопасности, эффективности, информированному согласию в медицинских исследованиях и нормативному контролю. Для студентов важно понимать, что техническая возможность изменить последовательность ДНК еще не означает, что такое изменение необходимо или допустимо выполнять. Научная осуществимость, медицинская целесообразность,

безопасность и этическая приемлемость являются разными вопросами. CRISPR также хорошо показывает связь всех тем курса ДНК-технологий. Для работы с геномным редактированием необходимы знания о структуре ДНК, генах и геномах, ПЦР, молекулярном клонировании, векторах, секвенировании, функциональной геномике и биоинформатике.

Общую концепцию можно представить следующим образом:
 геномная последовательность → выбор мишени → CRISPR/Cas → изменение ДНК или активности гена → секвенирование → биоинформатический анализ → функциональная проверка → биологический вывод.



Для запоминания классического механизма CRISPR/Cas9 достаточно выделить пять ключевых компонентов: Cas9, guide RNA, целевая ДНК, PAM и клеточная система репарации.

В упрощенном виде весь механизм выглядит так:
 guide RNA определяет мишень → Cas9 распознает подходящий комплекс мишень/PAM → происходит связывание → Cas9 изменяет целевую ДНК → клеточная репарация формирует конечный результат.

Если используется классическое разрезание:
 Cas9 + sgRNA → целевая ДНК → DSB → NHEJ или HDR → генетическое изменение.

Если используется модифицированная система, возможны другие результаты:
 dCas9 → CRISPRi/CRISPRa → изменение активности гена;
 base editor → определенные точечные преобразования без классического DSB;
 prime editor → более гибкое направленное изменение последовательности.

Таким образом, CRISPR/Cas-системы стали одним из наиболее значимых инструментов современной молекулярной биологии. Их фундаментальное преимущество заключается в возможности программировать распознавание

генетической мишени преимущественно посредством направляющей РНК, не создавая новый ДНК-связывающий белок для каждого участка, как в классических ZFN и TALEN. Для будущего специалиста по биотехнологии особенно важно понимать не только формулу «CRISPR режет ДНК», а более широкую концепцию: CRISPR — это программируемая платформа адресного взаимодействия с генетической информацией. В зависимости от используемого Cas-белка и присоединенных функциональных компонентов она может применяться для изменения последовательности, регуляции активности генов, функционального исследования генома и молекулярной диагностики. Главную идею темы можно сформулировать следующим образом: CRISPR/Cas объединяет точное распознавание генетической мишени с программируемым молекулярным воздействием, а конечный биологический результат определяется типом используемой CRISPR-системы, механизмами клетки и задачей исследования.