

УДК 06.05NOBEL:54+61

ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ ОТКРЫТИЯ НОБЕЛЕВСКИХ ЛАУРЕАТОВ ПО ХИМИИ 2020 ГОДА

Г. М. Зубарева, Н. П. Лопина, Г. Е. Бордина, Л. Р. Волкова, Е. И. Нилова,
ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России

Резюме: В данной статье описан механизм редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9, его преимущества по сравнению с ранее открытыми методами, заболевания, для лечения которых уже применяется данная методика, а также перспективы использования CRISPR/Cas9 в генной инженерии и медицине.

Ключевые слова: наследственные заболевания, мутации, редактирование генома, CRISPR/Cas9, генная инженерия.

SIGNIFICANCE FOR MEDICINE OF THE DISCOVERY OF THE 2020 NOBEL LAUREATES IN CHEMISTRY

G. M. Zubareva, N. P. Lopina, G. E. Bordina, L. R. Volkova, E. I. Nilova,
Tver State Medical University

Summary: This article describes the mechanism of genome editing using the CRISPR / Cas9 system, its advantages over previously discovered methods, diseases for the treatment of which this technique is already used, as well as the prospects for using CRISPR/Cas9 in genetic engineering and medicine.

Key words: hereditary diseases, mutations, genome editing, CRISPR/Cas9, genetic engineering.

Наследственные заболевания – это группа болезней, которые вызваны изменениями в геноме человека, то есть различными мутациями (генными, хромосомными или геномными). Данный вид заболеваний является одной из главных проблем современной медицины. В настоящее время наследственные болезни невозможно лечить традиционными методами, такими как, например, медикаментозное лечение или оперативные способы. Все это дает возможность облегчить протекание заболевания, устранить симптомы, но не позволяет избавиться от причины болезни – мутаций.

На протяжении многих лет множество ученых по всему миру были в поисках решения данной проблемы. Долгое время они изучали причины возникновения наследственных болезней и разрабатывали возможные пути их лечения. Было совершено много открытий, которые дали медицине и генетике возможность развиваться дальше.

За открытия, необходимые для дальнейшего развития медицинской генетики, даже были присуждены Нобелевские премии:

В 1978 году Нобелевская премия по физиологии или медицине была присуждена за обнаружение рестрикционных ферментов, имевших огромное значение для клонирования ДНК (Дениэл Натанс, соавторы: В. Арбер, Г. Смит).

В 1993 году Нобелевскую премию по химии присудили Майклу Смиту за разработку олигонуклеотидного направленного мутагенеза.

В том же 1993 году Нобелевскую премию получил Кэрри Мюллис, автор метода ПЦР, без которого сегодня не обходится ни одна биологическая лаборатория.

А в 2007 году Нобелевскую премию вручают авторам методики нокаутирования генов мышей с использованием эмбриональных стволовых клеток (Мартин Эванс, Марио Капекки, Оливер Смитис).

И, наконец, в 2020 году Нобелевскую премию по химии вручают за один из самых главных и востребованных методов современной генной инженерии – генетические ножницы, или CRISPR/Cas9. Лауреатами стали американка Дженнифер Дудна (Jennifer Doudna) – сотрудник Медицинского института Говарда Хьюза, профессор Калифорнийского университета в

Беркли, член Академии наук и Медицинской академии США, и француженка Эммануэль Шарпантье (Emmanuelle Charpentier) – директор и профессор Института инфекционной биологии Общества Макса Планка, иностранный член НАН США и член Французской Академии наук (Рис.1) [6].



Рисунок 1. Дженнифер Дудна – слева, Эммануэль Шарпантье – справа.

Как говорится в сообщении Нобелевского комитета, «метод CRISPR/Cas9 произвел революцию в молекулярных науках, открыл новые возможности для селекции растений, внес свой вклад в инновационные методы лечения рака и может воплотить мечту об излечении наследственных болезней».

До открытия Дудны и Шарпантье ученые могли лишь прочесть геном человека. Теперь же, пользуясь методом CRISPR/Cas9, они имеют возможность редактировать геном путем встраивания недостающих генов или вырезания лишних, которые имеют дефекты в виде вредных мутаций.

Таким образом, открытый метод в настоящее время способен сыграть огромную роль в развитии геной инженерии и медицины, позволяя делать то, о чем раньше ученые и врачи могли только мечтать, - редактировать геном человека и лечить заболевания, ранее считавшиеся неизлечимыми.

В настоящее время известно четыре вида методов редактирования. Они основаны на использовании четырех различных специфических нуклеаз: мегануклеаз, ZF-нуклеаз, TALE-нуклеаз и системы CRISPR/Cas (рис. 2).

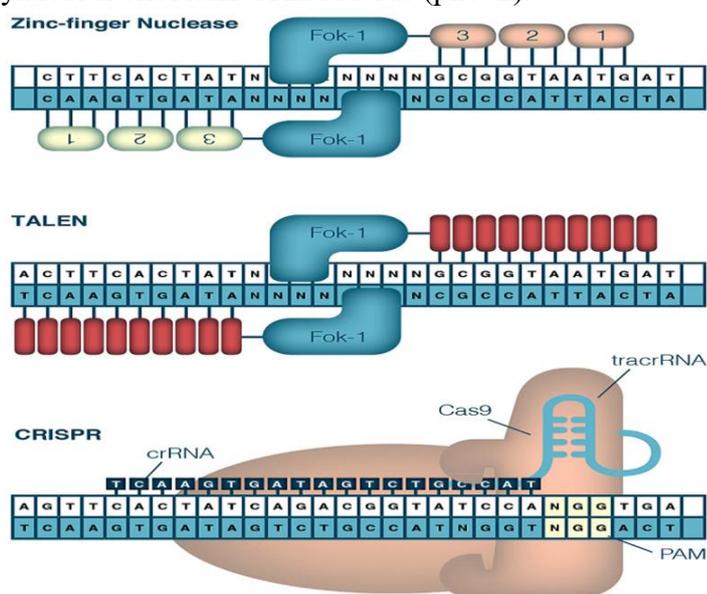


Рисунок 2. Устройство наиболее известных систем редактирования генома: ZFN, TALEN и CRISPR.

Системы ZFN и TALEN основываются на специфичности структуры белка, который избирательно связывается с определенной последовательностью нуклеотидов ДНК. В отличие от них, у CRISPR нет необходимости в специальном дизайне нуклеазы для каждой конкретной последовательности. Для этого метода достаточно лишь подобрать комплементарную crРНК.

Отличие CRISPR/Cas от других способов редактирования генома заключается в его универсальности и относительной простоте применения. Таким образом, если при использовании первых трех систем нужно изменять структуру белка, который выполняет функцию «молекулярных ножниц», для каждой конкретной мишени, то для работы с системой CRISPR/Cas достаточно просто синтезировать новую РНК, имеющую нужную последовательность нуклеотидов [7].

В 2012 году Шарпантье и Дудна первыми предположили, что механизм CRISPR/Cas9 можно использовать для запрограммированного редактирования генома. Это стало одним из самых важных открытий в области генной инженерии. Дудна и Шарпантье открыли тончайшие грани этих генетических ножниц и отладили их. Они изучали работу белка Cas9, работая с бактерией *Streptococcus pyogenes*.

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – это короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами. Это особые локусы в генах бактерий и архей. Они состоят из повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными – спейсерами. В CRISPR хранится вся информация обо всех видах вирусов, с которыми бактерии приходилось сталкиваться. Бактерия способна узнавать их и уничтожать. Cas9 – это белок, который уничтожает вирусы. Он использует направляющие РНК для атаки вирусов и уничтожения их генетического материала [4].

Чтобы редактировать геном при помощи генетических ножниц, в роли которых выступает система CRISPR/Cas9, ученые сначала искусственно синтезируют направляющую РНК. Она соответствует по последовательности нуклеотидов тому фрагменту ДНК, который предстоит вырезать. Затем белок Cas9, делающий разрез, образует комплекс с направляющей РНК, которая должна будет доставить всю эту систему к тому месту в геноме, где предстоит сделать разрез и провести удаление выбранного фрагмента. (Рис.3)

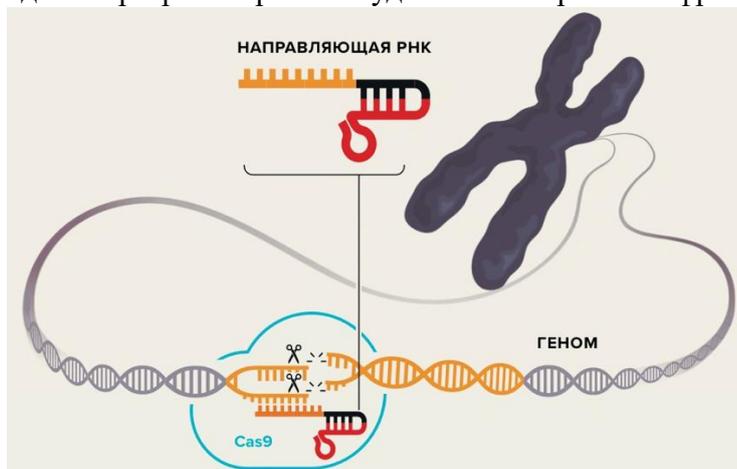


Рисунок 3. Механизм работы CRISPR/Cas9.

Далее у ученых есть два пути, которыми они могут восстановить целостность разрезанного фрагмента ДНК. В первом случае они могут подвергнуть ДНК самостоятельному восстановлению. (Рис.4). Но этот способ имеет недостаток в виде того, что в этом месте, где был сделан разрез, может возникнуть мутация, которая приведет к прекращению работы гена. Есть и другой способ. (Рис.5). Он заключается в создании специальной молекулы ДНК, которая починит разрыв. К данному методу ученые прибегают в том случае, если есть необходимость сделать определенную вставку и изменить последовательность нуклеотидов гена.

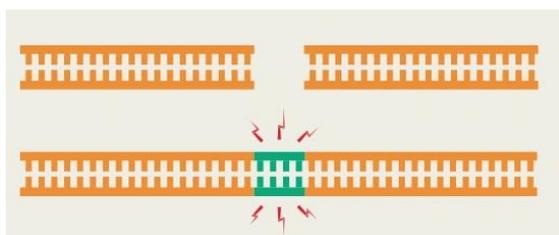


Рисунок 4. Самостоятельное восстановление ДНК, приводящее к нарушениям.

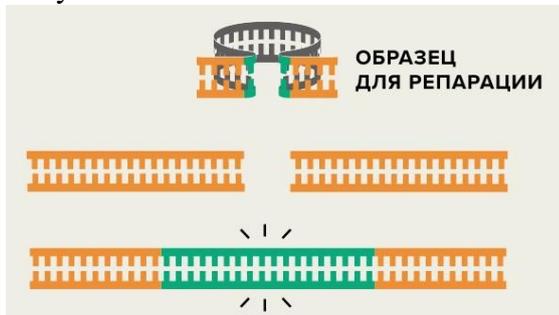


Рисунок 5. Репарация ДНК с помощью специального образца.

Из технологии редактирования выросло огромное множество практических приложений. К примеру, сейчас в стадии клинических испытаний находятся методики, использующие геномное редактирование для лечения некоторых форм рака легких, проблем, связанных со старческой дегенерацией сетчатки, а также многих лейкозов, наследственных заболеваний (гемофилия, серповидно-клеточная анемия, β -талассемия, мышечная дистрофия, фенилкетонурия).

Как СКА, так и β -талассемия, возникают из-за мутации в гене β -цепи гемоглобина, что нарушает перенос кислорода эритроцитами. Исправление этих мутаций позволяет повысить уровень нормально функционирующего гемоглобина в крови. Таким образом, устраняются последствия данной патологии. Использование просто системы CRISPR для подобной модификации генома не будет достаточно эффективным. Поэтому вместо замены или вырезания мутации разработан немного другой способ. Ученые изменили геном таким образом, чтобы клетки стали вырабатывать другую форму гемоглобина – фетальный гемоглобин. Это внутриутробный белок, который со временем заменяется обычным гемоглобином. Подавление выработки этого белка регулируется на генетическом уровне и существует мутация, которая способна продлевать его продукцию у взрослых людей. Это позволит устранить проявления СКА и β -талассемии у больных. Терапия СТХ001 имитирует эффект такой мутации, выключая ген *BCL11A*, который кодирует белок-репрессор, подавляющий синтез фетального гемоглобина. Блокировка данного гена проводится при помощи системы CRISPR в отобранных стволовых клетках пациента. Данная терапия пока не распространена, однако уже есть первые результаты для двух пациентов. У 19-летней девушки, больной β -талассемией, более нет необходимости в переливании крови до 16 раз в год. Теперь все ее эритроциты производят фетальный гемоглобин. Больная СКА 33-летняя женщина страдала от множественных болезненных кризов. После терапии у нее больше не наблюдалось ни одного. Практически 100% ее эритроцитов теперь тоже производят фетальный гемоглобин [8].

Амавроз Лебера – это наследственное заболевание, при котором поражается сетчатка глаза и происходит частичная или полная потеря зрения. Амавроз Лебера 10 типа возникает из-за мутации в гене *CEP290*. Полной информации об этом исследовании в открытом доступе пока нет, но известны некоторые детали. Больному субретинально вводили жидкость, которая содержала препарат на основе CRISPR. Он должен был разрезать ДНК по обе стороны от мутации, вызвавшей заболевание, тем самым устраняя ее. Предполагалось, что данная терапия должна была восстановить нормальное функционирование гена и, таким образом, или вернуть утраченное зрение, или значительно его улучшить [8].

Особое значение придается технологии CRISPS/Cas9 в лечении и предотвращении инфицирования ВИЧ. Группа ученых из университета Темпл смогли полностью вырезать фрагмент встроенного ВИЧ из ДНК Т-лимфоцитов, макрофагов и клеток микроглии, которые выполняют иммунные функции в мозге. Более того, заражение новых клеток также удалось предотвратить. Сейчас ученые работают над возможностью применять эту технологию *in vivo* (внутри организма, а не на культуре клеток) [5].

Но есть и более экзотические потенциальные применения. Например, борьба с мультифакторными заболеваниями (диабет, шизофрения, алкоголизм) или редактирование эмбрионов при искусственном оплодотворении для подбора определенной внешности у детей. Именно здесь возникает множество этических вопросов [7].

Почему же премия была вручена именно по химии, хотя ее тема близка к физиологии и медицине? Дело в том, что технология является базой для дальнейшего изучения и применения в практической медицине (как было с наградой за открытие метода ПЦР в 1993 году), то есть клиническое применение CRISPR/Cas еще впереди. Масштабы практического применения этого инструмента невозможно предугадать. И самим авторам работы, и всем их коллегам и критикам было ясно, что у этого изобретения большое будущее: система CRISPR/Cas9 позволяет вырезать из последовательности ДНК любую часть, а также вставить в нее любой фрагмент, а следовательно, предотвращать и лечить серьезные наследственные заболевания. Хотя, по мнению лауреатов, до использования молекулярных ножниц для лечения человеческих генетических недугов потребуется еще очень много работы. Ведь точность относительна, а ошибка в один нуклеотид может оказаться не менее опасной, чем сама болезнь [6]. На данный момент можно сказать, что метод так называемых молекулярных ножниц значительно расширил потенциал геной инженерии, и уже на практике показал свою эффективность (в отношении ряда заболеваний) и даже успел стать предметом громкого скандала «за биоэтику».

Литература:

1. Darshana Gupta, Oindrila Bhattacharjee, Drishti Mandal: CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116636
2. M. Jinek et al.: A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829
3. Q. Zheng et al.: Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1707853114
4. Артамонова И., Гоглева А.: CRISPR-системы: иммунизация прокариот. «Биомолекула», 2007-2021. URL: <https://biomolecula.ru/articles/crispr-sistemy-immunizatsiia-prokariot>
5. Елмуратов А., Коростин Д.: CRISPR/CAS9: что значит для человечества переход от чтения генома к его редактированию?: Forbes, 2016. URL: [https://www.forbes.ru/tehnologii/333985-crispcas9-chto-znachit-dlya-chelovechestva-perehod-ot-chteniya-genoma-k-ego](https://www.forbes.ru/tehnologii/333985-crispcas9-chto-znachit-dlya-chelovechestva-perehod-ot-chteniya-genoma-k-ego-redaktirovaniyu?)
6. Наймарк Е.: Нобелевская премия по химии 2020: «Элементы», 2020. URL: https://elementy.ru/novosti_nauki/433713/Nobelevskaya_premiya_po_khimii_2020
7. Северинов К.: Редактирование генома с CRISPR/Cas9: Издательский дом «ПостНаука», 2016. URL: <https://postnauka.ru/faq/59807>
8. Тарасов Ю.: Генная терапия: познакомьтесь с лекарствами будущего. «Биомолекула», 2007-2021. URL: <https://biomolecula.ru/articles/gennaia-terapiia-poznakomtes-s-lekarstvami-budushchego>