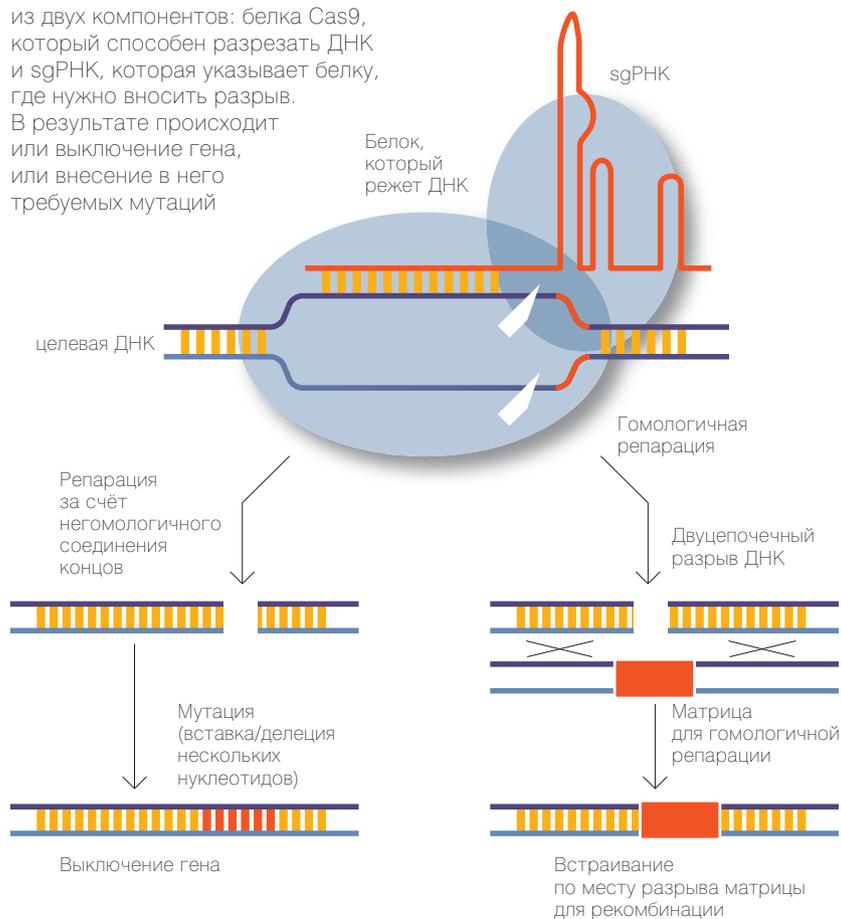


Система CRISPR/Cas9 состоит из двух компонентов: белка Cas9, который способен разрезать ДНК и sgРНК, которая указывает белку, где нужно вносить разрыв. В результате происходит или выключение гена, или внесение в него требуемых мутаций



Для генной терапии, которая подает такие надежды врачам по всему миру, требуется осторожное, всеобъемлющее и очень точное тестирование, назидательно пишут Брэдли и Косицки

НЕЗАМЕТНО, ПОЭТОМУ ОПАСНО

Радость от того, что исследователи, а затем и практики получили генетические ножницы CRISPR-Cas9 — инструмент, с помощью которого можно редактировать геном, а значит, в скором будущем начать лечить генетические заболевания и корректировать свойства сельскохозяйственных животных, — надо бы поумерить. Такой вывод делает группа исследователей из института Wellcome Sanger в статье, опубликованной в журнале Nature Biotechnology в середине августа. Этот институт финансируется из Wellcome Trust, благотворительного фонда биомедицинских исследований, — его создал сэр Генри Уэлкам, знаменитый бизнесмен, основатель фармацевтической компании Wellcome, которая теперь находится в составе одной из крупнейших фармацевтических корпораций мира — GlaxoSmithKlein. Второе имя институт получил в честь Фредерика Сенгера, британского биохимика, единственного дважды лауреата Нобелевской премии по химии: за определение структуры инсулина и за метод секвенирования ДНК.

Авторы исследования **Алан Брэдли** и **Майкл Косицки** считают, что сделали первую систематическую оценку событий, которые следуют за редактированием генома с помощью «ножниц» CRISPR-Cas9. По их мнению, результаты вмешательства могут иметь неожиданные последствия, потому что значимость воздействия «ножниц» серьезно занижалась — а потому технологии CRISPR-Cas9 нужно применять с максимальной осторожностью и очень внимательно наблюдать за всеми изменениями, вызванными вмешательством.

Первым неладное заметил Майкл Косицки: он экспериментировал с «ножницами» и вдруг понял, что его манипуляции сказываются и на других частях генома, а когда осознал масштаб бедствия, предложил изучить вопрос подробнее.

Повреждения, которые наносят геному «ножницы», серьезней, чем считалось раньше, объясняют авторы исследования, но обнаружить это генетикам не удалось, потому что стандартные тесты, отслеживающие изменения в отредактированной ДНК, не «видят» нанесенного CRISPR-Cas9 генетического ущерба. Для генной терапии, которая подает такие надежды врачам по всему миру, требуется осторожное, всеобъемлющее и очень точное тестирование, назидательно пишут Брэдли и Косицки.

Действительно, появление генетических ножниц породило множество радужных ожиданий: CRISPR-Cas9 рассматривается как перспективный инструмент для лечения таких неодолимых пока заболеваний, как вирус иммунодефицита человека, рак или серповидноклеточная анемия. Генно-терапевтическими методами, надеется множество исследователей, можно будет инактивировать ген, вызывающий заболевание, или исправить генетическую мутацию.

Предыдущие исследования не показывали, что воздействие CRISPR-Cas9 приводит к множеству незапланированных мутаций. Брэдли и Косицки показали, что и в мышечных, и в человеческих клетках после вмешательства CRISPR-Cas9 нередко выявляются обширные изменения, причем на большом удалении от целевого места воздействия. Речь идет о значительных делециях ДНК, вставках фрагментов и перегруппировках ее участков. Возможно, все эти изменения ведут к включению или выключению каких-то генов, а о последствиях этого не хочется даже и задумываться.

Профессор Мария Ясин, исследователь из Мемориального онкологического центра имени Слоуна-Кеттеринга (Нью-Йорк), не участвовавшая в работе Брэдли и Косицки, высоко оценила результаты коллег, впервые исследовавших истинный размер повреждения генома при воздействии CRISPR-Cas9, и заметила, что, прежде чем браться за практическое использование «ножниц», стоит провести дополнительные исследования.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НОЖНИЦЫ

Сегодня технологию геномного редактирования CRISPR/Cas9 по важности для биомедицины ставят в один ряд с технологией полимеразной цепной реакции. Связано это с тем, что совершенно неожиданно в руках исследователей оказался высокоэффективный программируемый инструмент для разрезания ДНК в строго определенном месте, который можно применять для редактирования генома клеток и даже целых организмов.

1987

Японский исследователь **Исино Ёсидзуми** обнаружил в геноме кишечной палочки структурно консервативные, но отличающиеся по нуклеотидной последовательности элементы. Большого резонанса это открытие тогда не получило. Но постепенно такие структуры были обнаружены в геномах многих, в том числе патогенных, микроорганизмов.



— Исино Ёсидзуми

1993

Испанский исследователь **Франсиско Мохика** нашел у галофильных архей (живущих в очень соленой среде вроде Мертвого моря примитивных микроорганизмах без ядра и мембранных органелл) нечто похожее на последовательности, открытые Ёсидзуми в геноме кишечной палочки. Вероятно, именно Мохика стал автором аббревиатуры CRISPR — расшифровывается как clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

2005

Развитие исследовательских методов биоинформатики и накопление данных о геномах позволило тому же Франсиско Мохике с коллегами определить, что в повторяющихся структурах в геноме бактерий закодированы участки геномов вирусов, к которым эти бактерии устойчивы. В случае кишечной палочки это были участки генома бактериофага P1. Бактериофаги воздействуют на геном бактерии, подавляя его функции.



— Франсиско Мохика

Исследователи предположили, что обнаружена система адаптивного «иммунитета» бактерий. При исследовании механизма работы такой «иммунной системы» бактерий обнаружены белки, которые отвечают за уничтожение ДНК вируса, проникшего в клетку бактерии. Оказалось, что, используя РНК, наработанную с участков генома вируса, которые закодированы в ДНК бактерий, белки типа Cas9 узнают ДНК этого вируса, если он проник в клетку, и режут ее, не давая вирусу развиваться.

2013

Система была впервые применена для внесения разрывов в геном эукариот, в том числе растений и животных. В декабре в журнале Cell, в частности, появился отчет о работе Геральда Шванка с соавторами, которым удалось с помощью этой системы скорректировать инвитро клетки кишечника, мышечные и человеческие, имевшие дефект, вызывавший муковисцидоз. Это был выдающийся успех. Долгие годы разрабатывались различные способы внесения таких разрывов в ДНК, что очень важно для генной инженерии на живых клетках. Но все существовавшие до этого системы (нуклеазы типа цинковых пальцев и TALEN-нуклеазы) были основаны на прямом узнавании «белок — ДНК», эти белки были очень громоздкими, «программирование» нуклеаз требовало значительных биоинформатических расчетов и кропотливой работы для создания «ножниц», которые из-за больших размеров было сложно доставлять в клетки. Оказалось, что белок CRISPR/Cas9 не имеет таких недостатков. Сам белок Cas9 достаточно компактный, а программирование состоит в подборе специфической РНК, которую можно легко синтезировать в лаборатории. Сегодня на CRISPR/Cas9 возлагаются большие надежды, эту систему уже пытаются адаптировать для генной терапии человека. Так за 30 лет пройден путь от непонятных поворотов в геноме бактерий до перспективного инструмента генной терапии человека.