

Иммунитет

– естественный «иммунитет» бактерий, биохимическая система защиты от вирусов, которая требуется одноклеточным организмам, неспособным поддерживать такую сложную иммунную систему, как наша. Первые намеки на ее существование были найдены еще в конце 1980-х, когда Йошизуми Исино и его коллеги исследовали обыкновенную кишечную палочку, точнее говоря, один ее малопримечательный ген (*iap*).

На всякий случай японцы секвенировали его последовательность вместе с участками по бокам от него: может, там будут какие-то фрагменты, участвующие в регуляции активности *iap*?.. Вместо этого биологи обнаружили в ДНК длинные последовательности повторяющихся, совершенно идентичных повторов длиной ровно 29 нуклеотидов. Между ними – как сухие растения между листами бумаги в гербарии – оказались «проложены» короткие фрагменты длиной по 32 нуклеотида, которые не повторялись никаким образом.

Позднее эту странную часть ДНК назвали «регулярно сгруппированные, разделенные короткие палиндромные повторы» – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. В остальном работы над ними надолго остановились, хотя многие ученые заинтересовались загадочными участками хромосомы, а некоторые даже рассуждали об их роли. Функциональное значение CRISPR оставалось загадкой, да и особенных прорывов никто от них не ждал: «Биологическое значение этих последовательностей неясно», – написал тогда Исино с соавторами.

Однако во второй половине 1990-х начался настоящий бум секвенирования. Установить последовательность ДНК становилось все проще, и геномы все новых и новых организмов стали пополнять компьютерные базы данных и анализироваться со всех сторон. Тайнственная – и вроде бы бессмысленная, совершенно не похожая ни на какой ген – последовательность CRISPR обнаруживалась у бактерий повсеместно. Нидерландский биолог Рууд Янсен заметил, что они всегда соседствуют с генами одних и тех же белков. Функции их тогда были тоже неизвестны, и их назвали просто «белками, ассоциированными с CRISPR» (CRISPR-Associated Proteins, Cas).

И лишь в 2005 году сразу три группы исследователей сообщили, что уникальные участки CRISPR – это фрагменты вирусных геномов. «Тут у меня что-то шелкнуло», – вспоминал впоследствии всемирно известный биоинформатик и эволюционист Евгений Кунин. К тому времени он уже несколько лет бился над загадкой CRISPR – и, наконец, его озарило: эта ДНК может быть частью противовирусной защиты бактериальной клетки.

Эта идея понравилась микробиологу Родольфу Баррангу, который в то время работал в компании Danisco, производящей йогурты. В этом бизнесе вирусная эпидемия среди молочнокислых бактерий способна принести серьезные убытки, и исследователь искал методы защиты от нее. Чтобы проверить гипотезу Кунина, он заразил стрептококков *Streptococcus thermophilus* двумя штаммами бактериофагов. Большинство бактерий погибло, однако выжившие оказались довольно устойчивы к этим вирусам. Секвенировав их ДНК, ученые подтвердили: в ней появились следы встречи.

Инструмент

Дженнифер Дудна и Блейк Виденхейфт взялись за изучение структуры белков Cas: к этому моменту выяснилось, что они выполняют роль нуклеаз, то есть разрезают ДНК. Несмотря на все находки, значение открытия по-прежнему было неясным: «У вас нет никакой определенной практической цели, – объясняла Дудна работавшему в ее лаборатории Виденхейфту. – Важно лишь понять, как это работает». Но по мере работы выяснились многие удивительные детали.

CRISPR – это, действительно, нечто вроде гербария, каталог, в котором бактериальная клетка сохраняет образцы, фрагменты геномов вирусов, с которыми доводилось сталкиваться ей или ее предкам. Пользоваться этим каталогом могут специальные белки, ассоциированные с CRISPR (CRISPR-Associated Proteins, Cas). Ориентируясь на эти образцы, они быстро распознают новые вирусные гены и разрезают их, выводя из строя.

Биолог Карл Циммер объясняет работу системы CRISPR/Cas так: «По мере того, как область CRISPR заполняется вирусной ДНК, она становится ключевой «галереей» в клетке, где представлены «портреты» микробов, с которыми бактерии доводилось встречаться. Впоследствии эта вирусная ДНК может использоваться для «наведения» точного орудия Cas-белков».

Для этого бактериальная клетка синтезирует на сохраненных фрагментах ДНК короткие образцы, молекулы РНК. Каждый из этих РНК-«гидов» (гРНК) связывается с белком Cas, способным разрезать ДНК, подходящую под этот образец. Эти комплексы постоянно патрулируют клетку, отслеживая появление любой ДНК и сопоставляя ее с гРНК. Если совпадение есть, двойная спираль ДНК тут же разрезается на части и инактивируется. «Как только мы осознали Cas в качестве программируемых, разрезающих ДНК ферментов, произошел интересный момент, – вспоминала впоследствии Дженнифер Дудна. – Мы воскликнули: «Боже, да это же может быть инструментом!»»

Сегодня определено целое семейство белков Cas, но наиболее изученным и освоенным оказался протеин Cas9, выделенный из бактерий *Streptococcus pyogenes* – возбудителей скарлатины. Именно он лег в основу новейшей методики генетической модификации живых организмов CRISPR/Cas9, методики, обещающей невиданный прорыв в биотехнологиях, сельском хозяйстве и медицине.

Модификация

В самом деле, белок Cas9 – это нуклеаза, то есть фермент, разрезающий ДНК. Для любого метода генетической модификации – удаления или добавления целевых активных генов в организм – эта способность играет ключевое значение. Чтобы копировать и вставлять, нужно вырезать, причем делать это в строго определенном месте. До сих пор с точностью у генетиков были проблемы.

Вспомним, что молекула ДНК – это, по молекулярным меркам, невероятно длинная цепочка, общая длина которой в каждой хромосоме каждой нашей клетки достигает порядка сантиметров. Разнообразием этот полимер не отличается, состоя всего из четырех разных звеньев: аденина (А), гуанина (Г), тимина (Т) и цитозина (Ц), которые повторяются миллионы и миллионы раз. Найти в этом однообразии именно нужный участок невероятно сложно.

Долгое время в распоряжении генетиков имелись лишь системы с нуклеазами, которые

распознавали короткие участки - например, четыре нуклеотида АТЦЦ или ТГЦА, - которых на протяжении цепочки могут встречаться десятки и сотни. В результате разрезы производились в случайном из этих мест, и лишь кропотливая работа позволяла отобрать клетки, в которых этот процесс прошел в нужном участке генома. В отличие от них, вооруженный гРНК белок Cas9 распознает фрагмент длиной с эту РНК - около 20 нуклеотидов. Такие участки уже, как правило, вовсе не повторяются в ДНК даже высших организмов.

Более того, сама структура комплекса Cas9 с гРНК определяет простоту работы с ней. Достаточно открыть в компьютере базу с ДНК нужного организма, найти фрагмент, который должен быть разрезан, и синтезировать молекулы гРНК с той же последовательностью оснований (и заменой тимина, роль которого в РНК играет урацил, U). Cas9 - нуклеазы неразборчивые и будут резать ДНК где угодно, лишь бы гРНК совпала.

В отличие от этого, системы генетической модификации предыдущих поколений требовали долгой работы по проектированию и синтезу ферментов-нуклеаз, способных распознавать определенные участки ДНК. Например, методы с использованием связывающихся с ДНК «цинковых пальцев» ZFN (Zinc Finger Nuclease) или белков TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) теоретически позволяют работать с еще более длинными фрагментами ДНК. Однако для каждой конкретной задачи их приходится проектировать отдельно.

Наконец, CRISPR/Cas9 универсален по отношению к разным видам модифицируемых организмов. Метод прост и эффективен и, по крайней мере, теоретически с одинаковым успехом подходит для получения риса с повышенным содержанием витамина А или лосося, набирающего массу вдвое быстрее обычного, для внесения новых генов или замены дефектных у племенных лошадей и людей... Но прежде чем перейти к людям, давайте «потренируемся на кошках». А лучше - на мышах.

Мыши, люди и все-все-все

Представим, что нам требуется получить мышей-альбиносов, чтобы изучить, как влияет это состояние на здоровье разных систем организма у людей. Для этого следует «выключить» обе копии гена, связанного с синтезом пигмента меланина. Если мы привержены традиционным подходам к генетической модификации (кстати, по большей части тоже заимствованным у бактерий), то нам стоит запастись терпением.

Для начала нам следует синтезировать «ген альбиносовости» и получить мышинные эмбрионы на самых первых этапах развития. Затем в их ядра через тончайшую полую стеклянную иглу внести новую ДНК. В делящихся клетках происходит рекомбинация - обмен гомологичными участками хромосом - так что, трижды сплюнув, будем надеяться, что она захватит и нужный нам фрагмент. Методом проб и ошибок, бесконечными повторами и отбраковыванием мы можем получить мышей, которые получили одну копию «гена альбиносовости» и оказались способны передать ее потомству. Затем, скрещивая таких животных, рано или поздно мы добьемся рождения особей с заменой обеих копий. Можно выжидать, а лучше сразу переходить на CRISPR/Cas9.

Действительно, чтобы получить тех же мышей-альбиносов, достаточно найти пограничные участки нашего целевого гена и синтезировать для них гРНК, после чего ввести в эмбрион вместе с белками Cas9 и ДНК нового гена. Подхватив гРНК, нуклеазы Cas9 разрежут обе копии гена по краям, после чего в дело включатся клеточные системы репарации, ответственные за

поддержание целостности генома.

Это чрезвычайно ответственная задача, поэтому белки репарации действуют быстро и даже грубо. Обнаружив повреждение ДНК – тем более такое опасное, как двухцепочечный разрез, – они готовы подхватить первый попавшийся кусок ДНК, буквально «затыкая» образовавшуюся брешь. Так что если в клетке окажется достаточно нужных нам фрагментов, в место, разрезанное белками Cas9, будут встроены они.

Недаром за прошедшее с момента открытия CRISPR/Cas9 генетическая модификация совершает прорыв за прорывом. Громкое заявление китайских биологов – тому лишь один из примеров. КНР остается страной с одним из самых мягких законодательств в области генной инженерии. Даже в Великобритании, где разрешены эксперименты по применению CRISPR/Cas9 на человеческих эмбрионах, получившихся химер требуется уничтожить в возрасте не старше 14 суток. В Китае допускается куда больше.

Такие работы невероятно перспективны: буквально в последние годы показано, что CRISPR/Cas9 позволяет редактировать гены даже во взрослом организме, очищая ДНК Т-лимфоцитов от заразившего их ВИЧ. А в том же Китае ученые (не слишком успешно) пытались получить эмбрионы, устойчивые к этой инфекции. Теперь же речь идет о борьбе с раком. Для этого медики планируют отредактировать ДНК тех же Т-лимфоцитов – точнее говоря, ген белка PD-1, который в норме держит их под контролем.

Активный ген PD-1 блокирует способность Т-лимфоцитов атаковать собственные клетки организма и предотвращает развитие аутоиммунных заболеваний. Однако в случае рака такая способность пришлась бы очень к месту, и ученые собираются, забрав клетки у реальных онкологических больных, изменить ген PD-1 с помощью CRISPR/Cas9 (теперь мы в общих чертах понимаем, как это можно сделать). Вернув в организм эти лимфоциты, авторы ожидают, что те начнут размножаться и атаковать опухоль.

Рак и ВИЧ – лишь пара громких примеров. Однако в будущем CRISPR/Cas9 и генетическая модификация позволят избавиться от множества других болезней. Тем более что множество тяжелых состояний связаны с нарушением в работе всего одного гена: их, видимо, исправить будет куда проще, чем вылечить тот же рак. В отличие от них, доброта и ум, красота или спортивные способности – продукт работы массы разных генов, воспитания и других факторов среды. Так что CRISPR/Cas9 принесет лишь пользу, а использовать ее во вред вряд ли получится. Разве что просто попугать.

https://t.me/sneg_list

Внимание! Этот перевод, возможно, ещё не готов.

Его статус: перевод редактируется

<http://tl.rulate.ru/book/12870/253785>