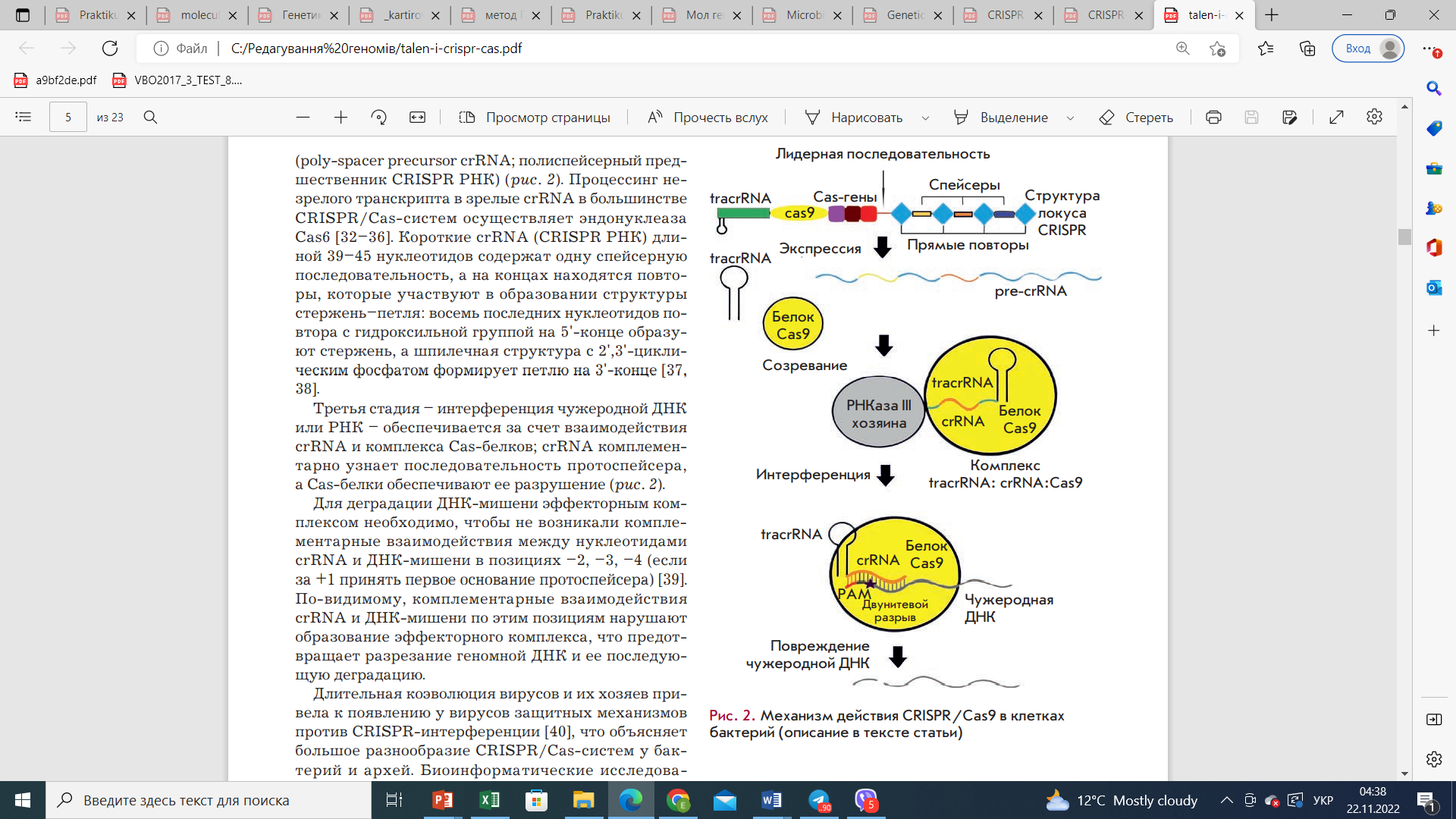
**Лекція 8**

**CRISPR/CAS – АДАПТИВНА ІМУННА СИСТЕМА У БАКТЕРІЙ**

**ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ У РЕДАГУВАННІ ГЕНОМІВ**

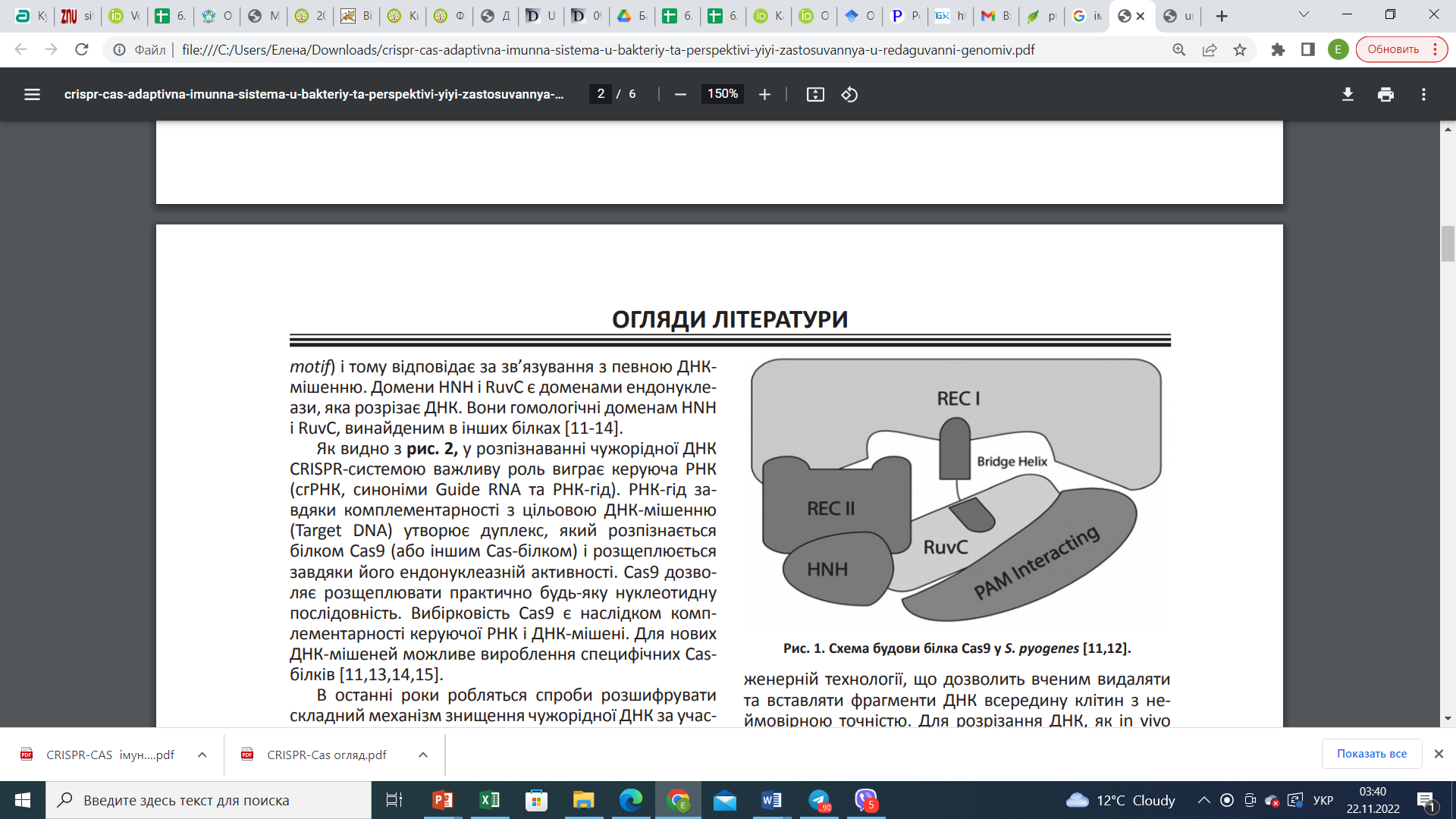
У 50–70-х роках XX ст. було вже відомо, що бактерії використовують для боротьби з вірусами спеціальні ензими — рестриктази (від лат. restrictio — обмеження), що розрізають вірусну ДНК і є специфічними до певної невеликої послідовності ДНК. Власну ДНК бактерії захищають від рестриктаз за допомогою метилювання нуклеотидних залишків аденіну та цитозину. Пізніше виявилося, що бактерії захищаються від вірусів не тільки за допомогою рестриктаз: у них є інший, більш специфічний механізм, який надає захист після зустрічі з певним вірусом. Цей механізм реалізує їх імунна система з досить громіздкою назвою CRISPR/Cas9, або криспер.

Коли ДНК вірусу проникає в бактерію, відбувається копіювання фрагменту цієї ДНК і перенесення його в спеціальне «сховище» інформації про віруси у власному геномі — CRISPR (акронім від англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами). Тут зразки ДНК різних вірусів (спейсери) накопичуються між однаковими короткими повторами бактеріальної ДНК. Ці спейсери представляють собою сегменти захоплених вірусних або плазмідних послідовностей. CRISPR-повтор, зазвичай, містить 23-47 пар основ, а спейсер – 21-72 пари. Число груп «повтор/спейсер» може сягати 375, але зазвичай менше 50. Новий спейсер завжди вбудовується зі сторони АТ-багатої лідерної послідовності, що знаходиться перед CRISPR-касетою, в ній же знаходяться промоторні елементи і сайти посадки регуляторних білків. Бактерії можуть містити більше одного локусу CRISPR. Зазвичай CRISPR знаходяться в бактеріальній хромосомі, але можуть бути розташовані і в плазмідній ДНК.

Спейсерні ділянки використовуються для виготовлення CRISPR РНК — **сrРНК** (їх ще називають РНК-зондами або **РНК-гідами**), що специфічно розпізнають гени певних вірусів і зв’язуються з ними у разі повторного зараження. Весь CRISPR-локус транскрибується у довгу pre-crRNA (poly-spacer precursor crRNA; поліспейсерний попередник CRISPR РНК). Процесинг незрілого транскрипту в зрілі crRNA в більшості CRISPR/Cas-систем здійснює ендонуклеаза Cas6. Процесинг crRNA залежить також від малої некодуючої РНК– **tracrRNA** (trans-activating crRNA; **трансактивуюча crРНК**). Молекули tracrRNA комплементарно зв'язуються з послідовностями повторів у pre-crRNA, формуючи дуплекс, а одна з рибонуклеаз клітини-господаря – РНКаза III у присутності Cas9 розрізає дуплекс з утворенням зрілої crRNA, яка містить идну спейсерну послідовність на 5'-кінці.

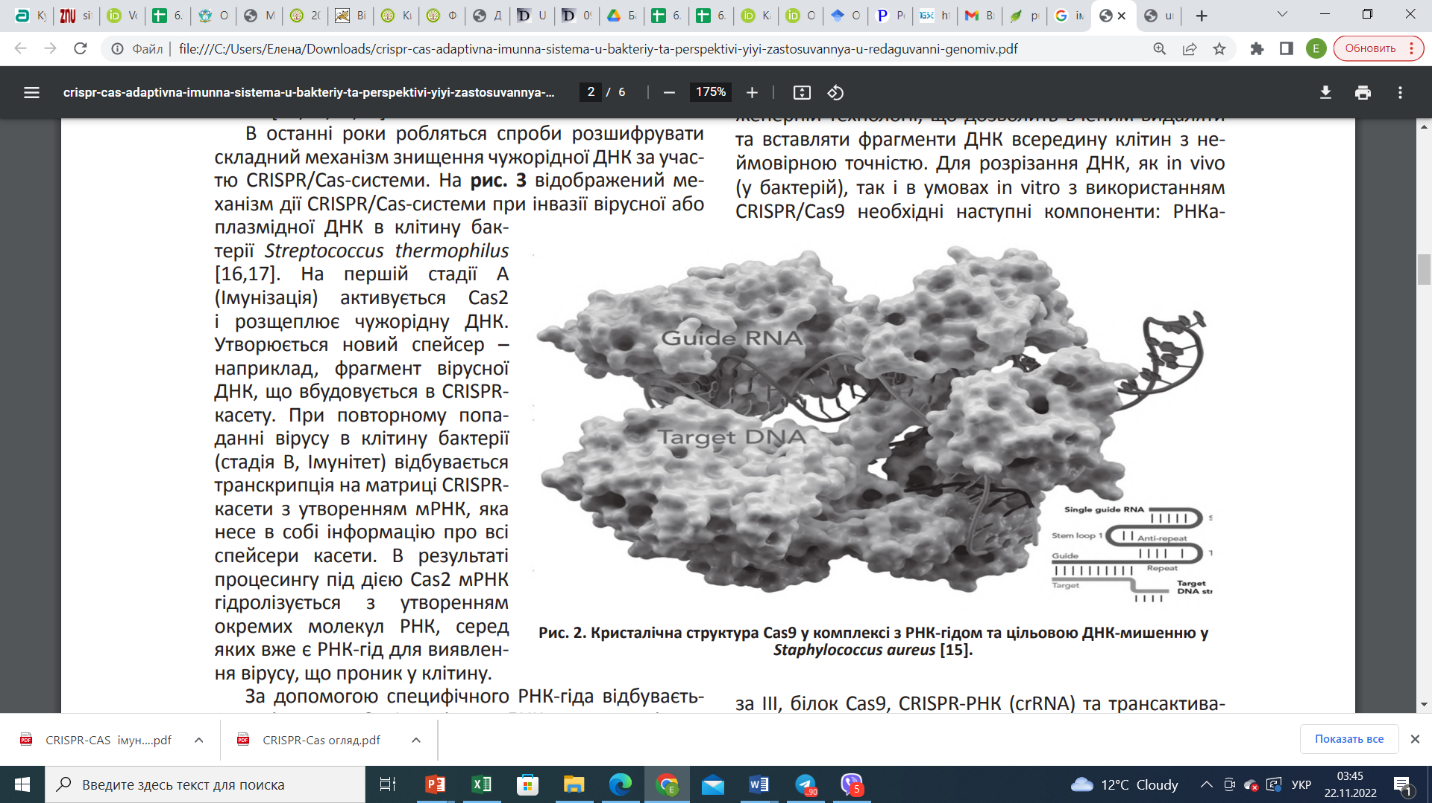
Отже, короткі **crRNA** (CRISPR РНК) довжиною 39-45 нуклеотидів містять одну 20 – нуклеотидну спейсерну послідовність, а на кінцях знаходяться повтори, які беруть участь в утворенні структури стрижень-петля: вісім останніх нуклеотидів повтору з гідроксильною групою на 5'-кінці утворюють стрижень, а шпилечна структура з 2',3'-циклічним фосфатом формує петлю на 3'-кінці.

Завдяки сrРНК вірусну ДНК знаходять спеціальні ензими — протеїни Cas (CRISPR-асоційовані протеїни), гени яких розміщені поруч з масивом CRISPR. Сas-гени локусів CRISPR зібрані в оперони, що за складом та функціями мають відмінності у різних бактерій. Ці ензими є ендонуклеазами, тобто вони здатні розрізати ДНК вірусу, знешкоджуючи її, тому їх називають «генетичними ножицями».

Кожний Cas-білок ( якщо брати Cas9) несе декілька функціональних доменів: типових нуклеаз (розрізають ДНК), хеліказ (розплітають ланцюги ДНК), полімераз (нарощують ланцюг ДНК при її подвоєнні) і ДНК-зв’язуючих білків. Тобто білки є поліфункціональними і здатні виконувати функції всіх перелічених вище ферментів.

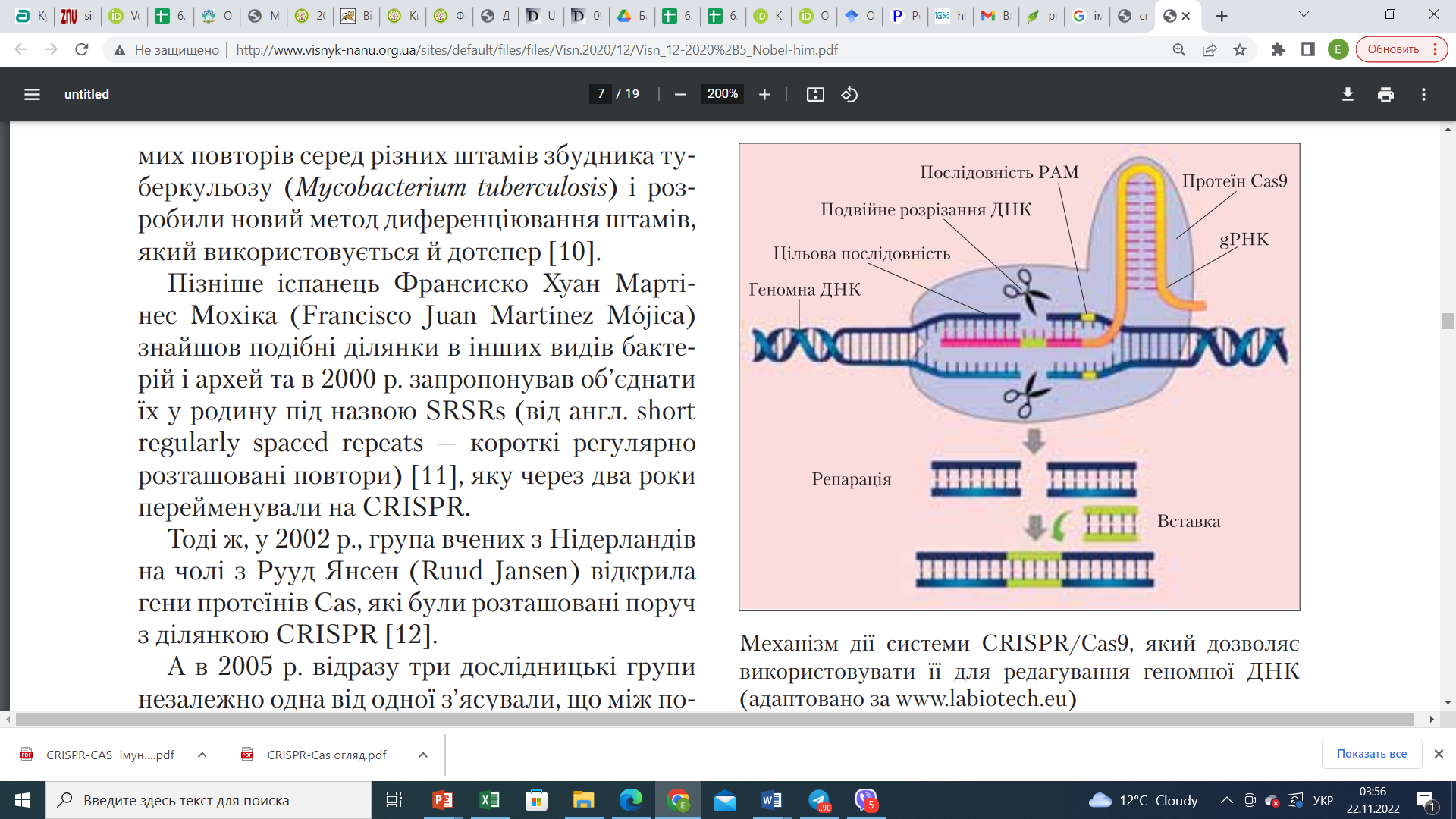
На рис. зображена молекулярна структура білка Cas9, виділеного із клітин *Streptococcus* pyogenes. Він складається із 5 доменів (REC I, REC II, HNH, RuvC, РАМ) і з’єднуючої місткової спіралі (Bridge Helix).

Домен Rec I є найбільшим і відповідає за зв’язування з керуючою РНК. Роль домена REC II ще недостатньо вивчена. Збагачена аргініном місткова спіраль (Bridge Helix) має вирішальне значення для ініціації активності розщеплення при зв’язуванні с ДНК-мішенню. Домен PAM-іnteracting забезпечує специфічність PAM (від англ. protospacer adjacent motif) і тому відповідає за зв’язування з певною ДНК-мішенню. Домени HNH і RuvC є доменами ендонуклеази, яка розрізає ДНК: відповідно ланцюг , комплементарний crРНК та протилежний.

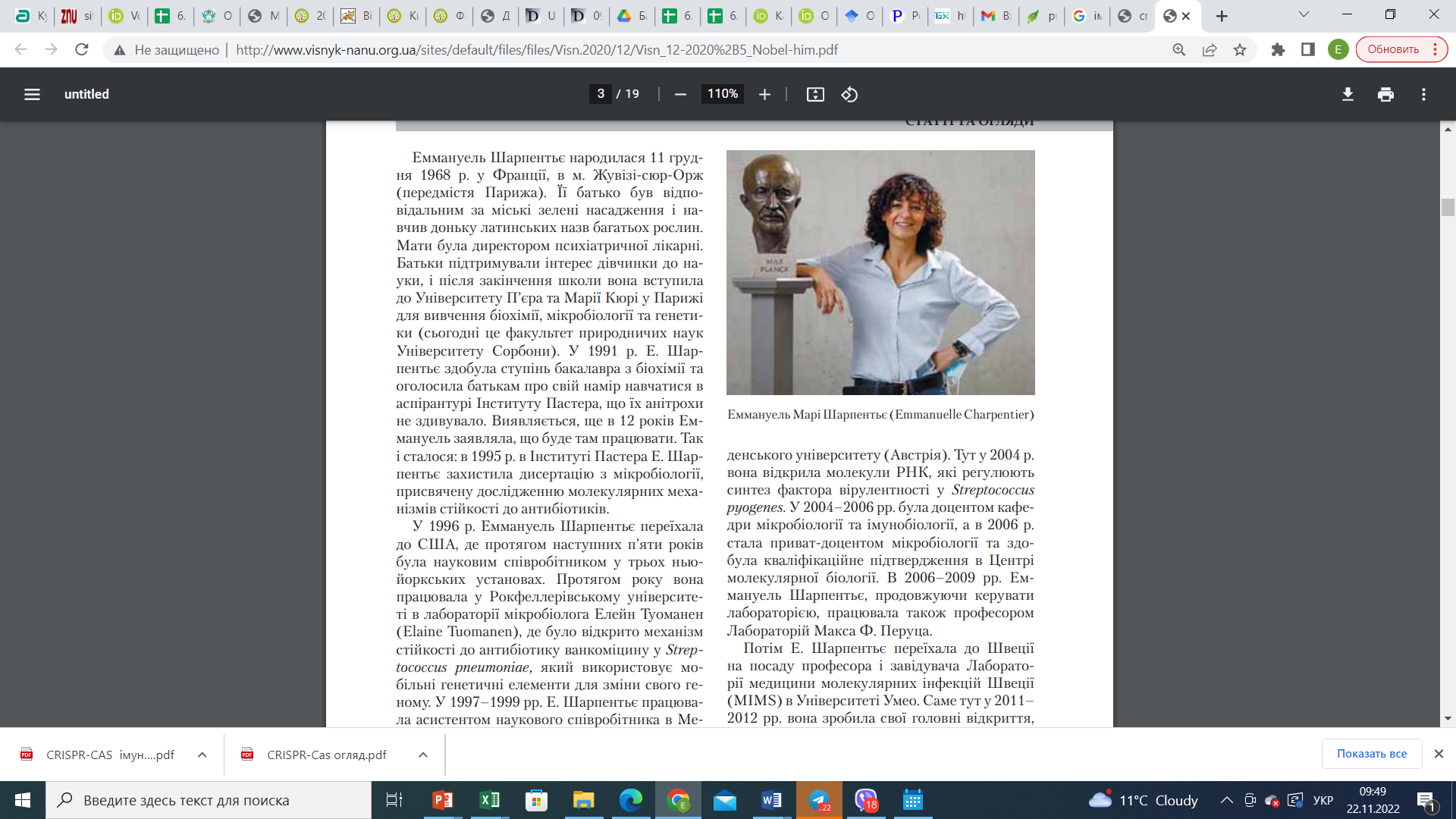
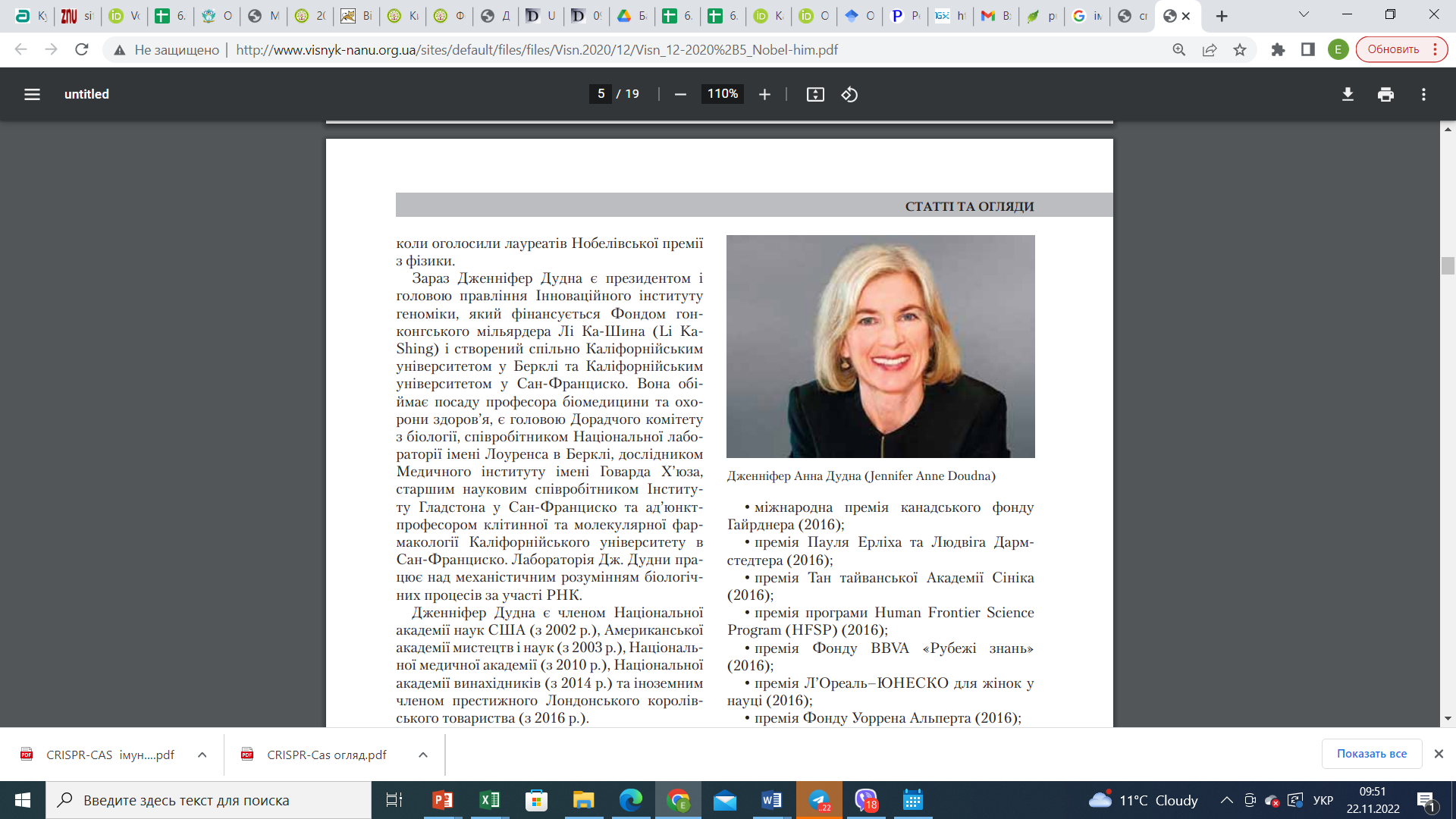
У розпізнаванні чужорідної ДНК CRISPR-системою важливу роль виграє **керуюча РНК** (**сгРНК**, синоніми Guide RNA та **РНК-гід**). РНК-гід завдяки комплементарності з **цільовою ДНК**-мішенню (**Target DNA**) утворює дуплекс, який розпізнається білком Cas9 (або іншим Cas-білком) і розщеплюється завдяки його ендонуклеазній активності. Cas9 дозволяє розщеплювати практично будь-яку нуклеотидну послідовність.

Розглянемо, як працює ця система, на прикладі CRISPR/Cas9. Після транскрипції масиву CRISPR утворюється довга молекула РНК, до якої приєднується невелика РНК, комплементарна повторам (**tracrРНК**). До tracrРНК приєднується та активується протеїн Cas9, до якого, у свою чергу, приєднується ензим РНКаза III, що розрізає довгу РНК на фрагменти — **сrРНК** та від’єднується. Фактично в результаті розрізання довгої РНК утворюються комплекси crРНК, tracrРНК і активованого протеїну Cas9. Спейсерна частина crРНК розпізнає комплементарну ділянку вірусної ДНК, а протеїн Cas9 замикається на двох нитках ДНК і «розрізає» їх, спричиняючи подальшу деградацію чужорідної ДНК.

Для успішного розпізнавання ДНК-«мішені» та її пошкодження необхідно, щоб протеїн Cas9 розпізнав певну коротку (3–9 нуклеотидів) послідовність PAM (від англ. protospacer adjacent motif — мотив, що примикає до протоспейсеру), яка відрізняється у різних бактерій і розміщена поруч з розпізнаною crРНК ділянкою РАМ містить мотив 5’- NGG-3’, де N – будь-який з 4 нуклеотидів. Розрізання відбувається за три нуклеотида від РАМ – послідовності.

Те, що цей консенсус такий короткий, є, з одного боку, перевагою (його можна використовувати для великої кількості генів), а з іншого – недоліком, так як існує порівняно висока ймовірність нецільових мутацій. Ймовірно, що розпізнавання PAM необхідне для захисту власних генів бактерії від розрізання системою CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas у Neisseria meningitidis розпізнає PAM з довгим консенсусом 5’-NNNNGATT-3’. Це обмежує можливості у виборі мішені, проте підвищує специфічність її розпізнавання і знижує ймовірність нецільових мутацій.

**Еммануель Шарпентьє і Дженніфер Дудна отримали Нобелівську премію з хімії у 2020 р. за відкриття технології редагування геному за допомогою CRISPR/Cas9.** Однак у сучасній науці вже неможливо відкрити щось одноосібно. Історія відкриття, яке спричинило революцію в генній інженерії, тривала 25 років, і багато вчених зробили у неї свій внесок.

У 1987 р. група японських дослідників на чолі з Йосідзумі Ісіно випадково клонували досить великий фрагмент геному кишкової палички *Escherichia* *coli*, що не кодував жоден з протеїнів. Це було дуже дивно, оскільки бактерії, як правило, не мають зайвих послідовностей. Ділянка складалася з послідовностей ДНК, що повторювалися, та варіабельних фрагментів ДНК між ними — спейсерів.

У 1993 р. науковці з Нідерландів під керівництвом Яна ван Ембдена дослідили різноманітність таких перериваних прямих повторів серед різних штамів збудника туберкульозу (Mycobacterium tuberculosis) і розробили на основі цього новий метод диференціювання штамів, який використовується й дотепер. Пізніше іспанець Франсиско Хуан Мартінес Мохіка знайшов подібні ділянки в інших видів бактерій і архей та в 2000 р. запропонував об’єднати їх у родину під назвою SRSRs (від англ. short regularly spaced repeats — короткі регулярно розташовані повтори), яку через два роки перейменували на CRISPR.

Тоді ж, у 2002 р., група вчених з Нідерландів на чолі з Рууд Янсен відкрила гени протеїнів Cas, які були розташовані поруч з ділянкою CRISPR.

А в 2005 р. відразу три дослідницькі групи незалежно одна від одної з’ясували, що між повторами CRISPR часто є послідовності, ідентичні послідовностям ДНК вірусів-бактеріофагів і плазмід.

Ці результати та припущення про виконання CRISPR функції противірусного захисту не викликали тоді особливого інтересу.

Все змінила наукова стаття, що вийшла в журналі Science в 2007 р. Її авторами були вчені на чолі з Філіпом Хорватом з компанії Danisco (США), яка виробляє відомі йогурти Danone Справа в тому, що при виробництві кисломолочних продуктів є небезпека зараження молочнокислих бактерій вірусами-бактеріофагами, що може призвести до величезних збитків. Тому в компанії Danisco вирішили відібрати для виробництва клони молочнокислих бактерій, стійких до вірусу. А оскільки компанія використовувала CRISPR для класифікації своїх комерційних штамів, то вчені одразу помітили, що в ділянках CRISPR відібраних клонів з’являлися нові спейсери, які були тотожні ділянкам вірусного геному. Тоді дослідники штучно вставили спейсер з послідовністю ДНК вірусу в ділянку CRISPR бактерії, що одразу ж зробило її стійкою до вірусу.

У 2007–2008 рр. було відкрито важливі деталі механізму роботи CRISPR. Група під керівництвом Джона ван дер Ооста, наприклад, показала, що захист CRISPR реалізується через малі РНК. Лучіано Марраффіні та Ерік Сонтгеймер з Північно-Західного університету в Еванстоні (США) довели, що система CRISPR спрямована на розрізання ДНК.

Згодом стало відомо, що для виконання захисної функції CRISPR необхідна взаємодія з багатьма протеїнами Cas, одні з яких зв’язуються з малими РНК, інші — розпізнають ДНК вірусу, а треті — розрізають її. Однак Еммануель Шарпентьє, яка тоді працювала в Університеті Умео (Швеція), виявила різновид системи CRISPR, який для повноцінного захисту потребував лише одного дуже великого протеїну Cas — Cas9. У цей час Дженніфер Дудна з Каліфорнійського університету в Берклі досліджувала функціонування системи CRISPR зі структурної точки зору.

Е. Шарпентьє і Дж. Дудна познайомилися у 2011 р. на конференції в Пуерто-Рико. Дж. Дудна, зацікавившись протеїном Cas9, намагалася відтворити роботу системи CRISPR/Cas9 у пробірці, але безуспішно. Того ж року Е. Шарпентьє відкрила tracrРНК, що відіграє вирішальну роль у CRISPR-опосередкованому захисті від вірусів. Після додавання до пробірки tracrРНК Дж. Дудні нарешті вдалося домогтися розщеплення ДНК за допомогою системи CRISPR/Cas9.

У 2012 р. Мартін Джінек з групи Дженніфер Дудни об’єднав tracrРНК і crРНК в одну єдину молекулу **ѕgРНК** (від англ. **single-guide RNA** — єдина РНК-гід) і створив вектор для клонування цієї РНК. Виявилося, що така синтетична ѕgРНК коректно працює в клітині у комплексі з протеїном Cas9. Тоді ж наукові групи Еммануель Шарпентьє і Дженніфер Дудни опублікували статтю в Science, в якій описали спосіб використання системи CRISPR/Cas9 для розрізання обраних дослідником ДНК- «мішеней» у клітині та в експериментах in vitro і продемонстрували можливість такого підходу.

На початку 2013 р. групи Джорджа Черча і його колишнього аспіранта Фена Чжана з Інституту Броуд у Кембриджі (штат Массачусетс) показали, що штучна crРНК і протеїн Cas9 повноцінно функціонують у клітинах вищих організмів. Практично водночас ефективність такого підходу було підтверджено вченими з Південної Кореї в експериментах із культурою клітин людини. Одразу після цього всі забули про проблеми бактерій в їх непростій боротьбі з вірусами. Здавалося, що наукові та громадські видання «вибухнули» публікаціями виключно на одну тему: про CRISPR/Cas9 як фантастичний інструмент для редагування геномів вищих організмів.

Відкриття CRISPR/Cas9 зчинило справжній ажіотаж, адже ця технологія виявилася набагато кращою за попередні методи генної інженерії. Технологія CRISPR/Cas9 запропонувала простий спосіб вбудовувати ген-вставку в певну послідовність ДНК і дала можливість працювати в клітинах усіх організмів від бактерій до ссавців. Систему CRISPR/Cas9 можна використовувати не лише в пробірці, як рестриктази, а й безпосередньо в живій клітині. Можна одночасно редагувати необмежену кількість генів у геномі, а також вводити компоненти системи не тільки в окремі клітини, а й у різні тканини або весь організм.

Звичайно, є інші інструменти для редагування геному, а саме: мегануклеази, генно-інженерні протеїни TALEN (на основі домену ефектору, подібного до активатора транскрипції — TALE) і нуклеази з «цинковими пальцями» ZFN (що містять домен еукаріотичного фактора транскрипції). Проте застосування цих систем для редагування геному вимагає створення окремого штучного протеїну для кожної нової ДНК-мішені. На відміну від них, система CRISPR використовує універсальний протеїн Cas9, а змінювати необхідно лише едину хімерну штучно створену **ѕgРНК** (single guide RNA). Це набагато простіше і дешевше, оскільки будь-які РНК можна легко синтезувати. Ще однією перевагою системи CRISPR/ Cas9 є можливість застосування її до РНК, що надає більш гнучкі можливості для впливу на біохімічні процеси в клітині.

Усвідомивши беззаперечні переваги CRISPR/Cas9, вчені всього світу кинулися використовувати технологію для редагування геномів вірусів, бактерій, рослин і тварин. Відкрилися практично безмежні перспективи створення ГМО для боротьби з хворобами, поліпшення порід сільськогосподарських тварин і сортів рослин, створення моделей для вивчення генетичних захворювань людини та тварин, тестування нових методів лікування і навіть створення домашніх улюбленців.

Технологія CRISPR/Cas9 здатна підвищити ефективність сільського господарства та допомогти прогодувати зростаюче населення планети, зменшивши при цьому негативний вплив людини на навколишнє середовище. За останні чотири роки Міністерство сільського господарства США дало дозвіл на вирощування шести організмів, модифікованих за допомогою CRISPR, зокрема печериць садових (Agaricus bisporus), які позбавлені здатності темнішати при механічних ушкодженнях і втрачати товарний вигляд; рижію посівного (Camelina sativa) — олійної культури, що містить більше омега-3 жирних кислот, а також стійкого до посухи сорту сої. Дослідники планують вирощувати курей, м’ясо яких не викликає алергії у людини, відновити чисельність медоносних бджіл, які потерпають у всьому світі від хвороб та паразитів, а також застосувати CRISPR для контролю статі сільськогосподарських тварин. Однак, оскільки при редагуванні геному CRISPR може змінювати нецільові гени, висловлюється припущення, що це може вплинути на здоров’я тварин, на склад м’яса та молока. Тому поки що споживачі вимагають обережності у застосуванні нових технологій для тварин, які є джерелом продуктів харчування.

Можливість модифікації геномів екзотичних і маловивчених тварин спричинила «хвилю» масового створення нових модельних організмів. У березні 2019 р. за допомогою CRISPR було створено першу генетично модифіковану рептилію — коричневого аноліса (Anolis sagrei). Технологія CRISPR стала цінним інструментом фундаментальних досліджень, який дозволяє «вимикати» певні гени та встановлювати їх біологічну функцію в організмі.

**Інактивувати ген** без його пошкодження можна за допомогою CRISPR-інтерференції (CRISPRi). При застосуванні цього методу мутантний протеїн dCas9, в якого не функціонують обидва нуклеазних центри, зв’язується з ДНК-мішенню і заважає просуванню РНКполімерази, що приводить до припинення транскрипції.

Якщо до протеїну dCas9 «прив’язати» домен фактора транскрипції, який підвищує або знижує активність генів, можна безпосередньо впливати на функціонування генів і роботу всього організму. **Регулювати активність експресії генів** можна також, впливаючи на епігеномні процеси (наприклад, на метилювання ДНК чи ацетилювання гістонів). Для цього можна використати штучні протеїни, які складаються з dCas9іа каталітичного домену відповідного ензиму (ДНК-метилтрансферази чи ацетилтрансферази гістонів). Мішенню системи CRISPR/Cas9 можуть бути також довгі некодуючі РНК (lncRNA) або енхансерні РНК (eRNA), які регулюють експресію генів і епігенетичні процеси. Це дуже важливо для дослідження функцій регуляторних РНК і встановлення їх ролі в патогенезі захворювань, оскільки при понад 90 % захворювань, пов’язаних з одиничною нуклеотидною заміною, ця заміна відбувається в некодуючих ділянках ДНК. А приєднавши до протеїну dCas9 флуоресцентний протеїн GFP, можна позначити певну ділянку в хромосомі живої клітини і спостерігати за нею під мікроскопом протягом клітинного циклу або візуально визначати довжину теломер.

У 2019 р. було створено **біосенсор CRISPRChip** на основі ультрачутливого графену та системи CRISPR/Cas9, який дозволяє протягом 15 хв виявляти певні послідовності ДНК без її ампліфікації з чутливістю 1,7 fM (1,7 × × 10–15 моль). Подібні біосенсори, що використовують різні типи ензиму Cas, можуть бути націлені на виявлення специфічних послідовностей в одно- або дволанцюговій ДНК і РНК збудників інфекційних захворювань. Така система, наприклад, здатна визначати кількість РНК коронавірусу, його тип (SARS-CoV або SARS-CoV-2) і навіть диференціювати окремі заміни у РНК. Отже, можливості системи CRISPR/Cas9 не обмежуються лише розрізанням певних послідовностей ДНК. Ця система є універсальним механізмом доставки будь-яких молекул у будь-яку «точку» геному, що відкриває фантастичні можливості для медицини та фундаментальної науки.

У січні 2014 р. за допомогою системи CRISPR/Cas9 китайські вчені модифікували геном макак. Після успіху з мавпами всі зрозуміли, що настала черга людини. Справді, дуже заманливо, виправивши всього одну нуклеотидну основу в ДНК, звільнити людину від важкої спадкової хвороби, наприклад гемофілії. Однак невідомо, як відреагує організм людини на втручання в геном. Тому можливість редагування генів людини одразу порушила низку етичних проблем, особливо гострих у випадку редагування генів ембріону людини. Дженніфер Дудна та інші провідні вчені неодноразово заявляли про небезпеку бездумного використання технології CRISPR/ Cas9 і закликали до мораторію на клінічні експерименти з генетичної модифікації людини доти, доки не будуть зрозумілі наслідки і введені правила. Адже простота технології і доступність у США реактивів для її реалізації дали можливість біохакерам здійснювати втручання в геном живих організмів у домашніх умовах, навіть без спеціальних навичок і обладнання. Проте експертний консультативний комітет ВООЗ на своєму засіданні в серпні 2019 р. оминув питання про мораторій, хоча і створив глобальний реєстр для відстеження всіх видів досліджень з редагування генів людини і запропонував консультації щодо управління такими технологіями.

Незважаючи на заклики до заборони експериментів з генетичної модифікації людини, 14 квітня 2015 р. в журналі Protein&Cell з’явилася стаття китайських генетиків під керівництвом Цзюньцзю Хуана з Університету Сунь Ятсена в Гуанчжоу, в якій описувався експеримент з використання системи CRISPR/Cas9 для редагування геному людського ембріону. Метою роботи було виправлення мутації в одному з генів гемоглобіну, яка призводить до хвороби крові — бетаталасемії. Це була перша в історії спроба генетично модифікувати людину. В результаті з 86 запліднених яйцеклітин мутація була виправлена лише в 4 ембріонах (це приблизно 5 %). Крім того, в усіх клітинах ембріонів з’явилася значна кількість нових мутацій в інших генах у результаті неспецифічної взаємодії crРНК з іншими подібними послідовностями ДНК, а також внаслідок помилок ензимів репарації. Такі результати викликали небезпідставні побоювання, що систему CRISPR/Cas9 взагалі ніколи не можна буде використовувати для експериментів на людині.

Для підвищення точності CRISPR/Cas9 пропонували різні ідеї. Наприклад, було отримано **Cas9-ніказу** — модифікований протеїн Cas9, у якого працює лише один нуклеазний центр, і тому він робить лише одноланцюгові розрізи ДНК. Використовуючи дві такі нікази з різними ѕgРНК, можна значно підвищити точність розрізання ДНК у потрібному місці. У серпні 2017 р. було опубліковано обнадійливі результати досліджень, проведених під керівництвом Шухрата Міталіпова. Вдалося збільшити до 72,4 % вихід ембріонів з виправленою мутацією гена MYBPC3, що викликає гіпертрофічну кардіоміопатію — спадкове захворювання серця, без появи інших мутацій.

У листопаді 2018 р. китайський дослідник Хе Цзянькуй з Південного університету науки і техніки у Шеньчжені несподівано заявив, що він створив перших у світі генетично відредагованих дітей — дівчат-близнюків Лулу і Нану, які не здатні заразитися вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) через модифікацію гена CCR5. Останній є корецептором ТCR у Т-хелперів і відповідає за зв’язування з капсидним вірусним білком gp120, що забезпечує проникнення вірусу всередину імунної клітини і блокує імунну відповідь. У 2019 р. в рамках цього проєкту народилася ще одна модифікована дитина. Ці заяви спровокували скандал і поліцейське розслідування в Китаї та обурення світової наукової громадськості. На закритому суді Хе Цзянькуй було засуджено до трьох років ув’язнення та оштрафовано на 3 млн юанів ($430 тис) за проведення «незаконної медичної практики». До речі, Хе Цзянькуй зізнався, що спроба редагування виявилася не дуже вдалою: система редагування внесла мутацію, але не ту, на яку очікували. Що зараз відбувається з модифікованими дітьми, невідомо — влада Китаю їх приховує.

У 2019 р. ще двоє вчених заявили про наміри створити немовлят з редагованими генами: Денис Ребриков з Російського національного дослідницького університету ім. М.І. Пирогова в Москві і Джанпієро Палермо з Нью-Йорка. Невідомо, наскільки ці плани близькі до втілення, але такі заяви є попередженням, що найближчим часом знайдуться й інші люди, які намагатимуться ввести в геном людини зміни, здатні успадковуватися майбутніми поколіннями]. Вчені, які готові створювати дітей з редагованими генами, можливо, мріють покращити світ, позбавити людство від небезпечних захворювань. Однак внесені мутації, позбавляючи від однієї небезпеки, можуть наражати організм на інші через багатофункціональність більшості генів, яка у разі мутації гена приводить до зміни цілого комплексу ознак, не завжди бажаних і корисних.

Тому вчені зосередилися на інших перспективних напрямах застосування технології CRISPR/Cas9, таких як редагування геному бактерій або дріжджів з метою синтезу абсолютно нових речовин, створення тваринних моделей захворювань людини, боротьба з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів, знешкодження комах-шкідників і переносників інфекцій, вирішення проблеми нестачі донорських органів для трансплантації, захисту від небезпечних вірусів, лікування онкологічних захворювань тощо.

Експериментально підтверджено, що систему CRISPR/Cas9 можна успішно застосовувати для руйнування генів ензимів, що забезпечують стійкість бактерій до дії антибіотиків. Навіть отримано бактеріофаги, що вибірково знешкоджують бактерії, стійкі до антибіотиків. Біотехнологічна компанія Oxitec (Велика Британія) використовує CRISPR/ Cas9 для створення генно-модифікованих комах, які після спарювання зі своїми дикими родичами спричиняють загибель частини їхніх нащадків. У жовтні 2019 р. у м. Індаятуба (Бразилія) було успішно проведено випробування модифікованих комарів, створених для боротьби з лихоманкою денге та іншими захворюваннями, а також модифікованих діамантових молей, які є шкідниками різних видів капусти.

У серпні 2017 р. група вчених під керівництвом Джорджа Черча з Гарвардського університету оприлюднила приголомшливі результати досліджень з клонування генно-модифікованих за допомогою CRISPR/Cas9 свиней, у яких повністю інактивовано віруси PERV (62 ендогенні ретровіруси). Інактивація цих вірусів відкриває можливості використання для трансплантації людям органів свиней, які мають штучно створені ідентичні певній людині трансплантаційні антигени . Дослідники з Університету Алабами (США) використали редагування генів та клонування для створення свиней без специфічних вуглеводів на поверхні їхніх органів. Бабуїни, яким було пересаджено серця та нирки від цих свиней, прожили більше року. Поєднавши технологію CRISPR/Cas9 і антиретровірусну терапію тривалої дії, в липні 2019 р. було повністю видалено ВІЛ з Т-клітин 30 % трансгенних «гуманізованих» мишей, які були попередньо інфіковані ВІЛ. Після випробування цієї методики на мавпах у 2020 р. заплановано перші випробування за участі людей.

Система CRISPR/Cas9 є також цінним інструментом для створення вірусів з певними властивостями, наприклад ослаблених вірусів для вакцин або онколітичних вірусів. За допомогою цієї системи можна вдосконалити імунотерапевтичні підходи до лікування раку, зокрема створити генно-модифіковані Т-клітини з химерними антигенними рецепторами (CAR-T), до складу яких входить scFv-антитіло проти певного антигена ракових клітин. Так, у 2017 р. FDA схвалило препарат Kymriah (Tisagenlecleucel) виробництва Novartis (Швейцарія), який успішно лікує В-клітинну лімфому за допомогою Т-клітин з химерними рецепторами проти антигена CD19. Зараз досліджуються та проходять клінічні випробування понад 300 різних варіантів терапії CAR-T. Поза тим, технологія CRISPR/ Cas9 відкриває реальні можливості усунення мутацій, що спричиняють онкологічні захворювання.

Найпростішим варіантом для застосування CRISPR/Cas9 у практичній медицині для лікування спадкових захворювань, спричинених одиничною мутацією в певному гені, є захворювання крові, для яких технології клітинної терапії вже добре відпрацьовано. Наприкінці минулого року група вчених з Каліфорнійського університету в Берклі повідомила про успішне використання CRISPR/Cas9 для виправлення генетичної мутації в стовбурових клітинах пацієнтів із серпоподібноклітинною анемією. Не дивно, що біотехнологічні компанії вкладають все більше і більше коштів у розроблення технології CRISPR/Cas9 і реалізацію ідей щодо її медичного застосування.

Вчені, які зробили найбільший внесок у винахід технології CRISPR/Cas9, стали співзасновниками перших семи компаній, що розвивають застосування цієї технології у медичній практиці. Еммануель Шарпентьє є співзасновником двох компаній: CRISPR Therapeutics та ERS Genomics. Дженніфер Дудна є співзасновником п’яти компаній: Caribou Biosciences (розробляє терапевтичні модифіковані клітини та бактерії кишечника), Editas Medicine (препарати і модифіковані клітини для терапії), Intellia Therapeutics (підходи до терапії раку, генетичних і аутоімунних захворювань), Mammoth Biosciences (діагностичні тестсистеми з використанням нових протеїнів Cas12-14), Scribe Therapeutics (підходи до терапії нейродегенеративних захворювань, зокрема з використанням протеїну CasХ).

Тривалий час FDA не дозволяло проведення за федеральні кошти клінічних випробувань системи CRISPR/Cas9. Однак на початку 2019 р. нарешті було офіційно схвалено проведення першого клінічного випробування системи CRISPR/Cas9 на людях за межами Китаю, де подібні випробування проводять протягом двох останніх років. Цього року фармацевтичні компанії CRISPR Therapeutics і Vertex розпочали випробування терапії CTX001, призначеної для лікування бета-таласемії та серпоподібної анемії, що зумовлені мутацією в одному гені. Ця терапія передбачає модифікацію стовбурових клітин пацієнта внесенням єдиної генетичної зміни, що приведе до підвищення рівня гемоглобіну в еритроцитах плоду.

У США зараз проводять понад 20 клінічних випробувань терапевтичних препаратів на основі CRISPR для низки захворювань, зокрема рідкісних моногенних гематологічних та очних, а також полігенних онкологічних захворювань. Серед спадкових хвороб, зумовлених точковою мутацією, увагу вчених привертають передусім такі захворювання, як вроджений амавроз Лебера 10 (ураження сітківки ока), синдром Ушера (глухота з поступовою втратою зору), м’язова дистрофія Дюшена, муковісцидоз (кістозний фіброз, що вражає дихальну і травну системи), дефіцит транстиретину (ураження периферичної нервової системи), амілоїдоз альфа-1 та первинна гіпероксалурія І типу (ураження нирок). Однак висока вартість препаратів на основі CRISPR може стати перешкодою для їх широкого використання: ні державні бюджети, ні страхові компанії не готові до таких витрат. Крім того, поки що CRISPR/Cas9 має низку недоліків, головними з яких є велика кількість помилок редагування, неефективність редагування ДНК поза межами клітини і значний розмір ензиму Cas9, що ускладнює його доставку в клітину та зумовлює сильні імуногенні властивості.

Водночас немає жодних сумнівів, що технологія CRISPR/Cas9 є революційною і на неї чекає велике майбутнє. З відкриттям CRISPR/ Cas9 з’явилося безліч можливостей для вирішення наболілих проблем людства, з якими наука досі не могла впоратися. Однак, щоб реалізувати всі ці можливості повною мірою, необхідно зробити технологію безпечною: виключити всі побічні ефекти, а також вдосконалити системи доставки компонентів CRISPR/Cas9 до клітин. Коли це буде зроблено, ідея застосування CRISPR/Cas9 до ембріонів людини для позбавлення від тяжких захворювань, ймовірно, вже не буде видаватися такою сумнівною.

До речі, Дженніфер Дудна вважає, що редагування геному людського зародку не можна забороняти повністю. Цю технологію слід детально дослідити і вдосконалити, а її клінічне використання потрібно обмежити випадками серйозних генетичних захворювань, коли інших варіантів лікування немає. Втім, такі випадки є рідкісними, адже значно простіше позбавитися генетичних дефектів не за допомогою редагування геному, а завдяки скринінгу та відбору ембріонів після запліднення у пробірці. На думку Дж. Дудни, більш перспективним напрямом розвитку технології CRISPR/Cas9 є її використання для регулювання експресії протеїнів і контролю функціонування клітин. Також є багато інших можливостей для застосування CRISPR/Cas9. У найближчому майбутньому лабораторія Дж. Дудни планує досліджувати функціонування системи CRISPR у різних мікроорганізмів, а також можливості редагування геному в природних мікробних спільнотах і маніпулювання певними мікробами. Одна з її компаній — Mammoth Biosciences, що займається розробленням діагностичних тестів на основі CRISPR/Cas9, планує провести випробування тесту для діагностики COVID-19.

Ми зараз переживаємо сплеск захоплення технологією CRISPR/Cas9. Протягом останніх восьми років опубліковано близько 17 тис. наукових статей на цю тему, виділено мільйони доларів на дослідження, а кількість стартап-компаній невпинно зростає. Не дивно, що авторитетний науковий журнал Science випустив огляд досягнень у цій галузі під назвою The CRISPR Craze («Криспер-божевілля»). Очікується, що у світі до 2025 р. на розвиток технології CRISPR/Cas9 та редагування геномів за її допомогою буде витрачено понад $5,3 млрд.

Головною заслугою Дженніфер Дудни і Еммануель Шарпентьє є те, що відкрита ними технологія редагування геному CRISPR/Cas9 стала початком нової ери в історії генної інженерії та стимулювала її подальший розвиток. Адже прогрес не стоїть на місці: вчені намагаються вдосконалити технологію CRISPR/ Cas9, поєднати її з іншими методами та безперервно шукають нові способи редагування геному.

Одним з напрямів вдосконалення технології став пошук інших протеїнів Cas, які можуть виявитися більш ефективними. Так, було відкрито протеїни ScCas9 [60], CasX і CasY [61], Cas12a (Cpf1) [62], Cas13 (a, b, c, d) [63–65], Cas14(a, b, c) [66], які мають унікальні властивості і здатні зробити редагування геному на основі CRISPR ефективнішим і безпечнішим. Ці зусилля привели до розроблення трьох нових методів редагування геному, в яких використовують такі інструменти, як транспозази/рекомбінази, редактори основ та праймредактори.

**Транспозази** — це ензими, здатні зв’язувати одноланцюгову ДНК і вбудовувати її в геномну ДНК. **Рекомбінази** — ензими, що беруть участь у процесах гомологічної рекомбінації — обміну генетичним матеріалом між двома молекулами ДНК, що мають гомологічні нуклеотидні послідовності та містять певні специфічні сайти. Відкриття у деяких організмів транспозаз, асоційованих з CRISPR, а також злиття транспозаз і рекомбіназ з протеїнами Cas та проведення їх штучної еволюції дозволило використовувати ці ензими для редагування геномів. Так, нещодавно група під керівництвом Фена Чжана відкрила нову техніку редагування генів, яка дозволяє вставляти гени в ДНК без її розрізання за допомогою CRISPR-асоційованої транспозази з ціанобактерій *Scytonema* *hofmanni* (ShCAST), що складається з Tn7-подібних субодиниць транспозази та ензиму Cas12k.

Дослідники з Гарвардського університету під керівництвом Девіда Лю запропонували новий метод редагування геному — **редагування основ** (base editing), що дозволяє змінювати нуклеотидну послідовність ДНК живих клітин шляхом хімічного перетворення однієї основи на іншу, не здійснюючи дволанцюгових розрізів ДНК, які через некоректну репарацію призводять до помилок редагування. В основі методу лежить поєднання системи CRISPR і злитих протеїнів, що складаються з Cas9-нікази (Cas9, що розрізає лише один ланцюг ДНК) і ензиму, який модифікує певну нуклеотидну основу. Використовують ензим цитидиндезаміназу, що забезпечує у 15–75 % ДНК клітини пряме перетворення цитозину в урацил у складі відповідних нуклеозидів, здійснюючи тим самим заміщення цитозину на тимін (або гуаніну на аденін), а також так звані редактори основи аденіну (ABE) — ензими, отримані внаслідок штучної еволюції на основі аденозиндезамінази тРНК, що забезпечують у 50 % ДНК клітини зворотне перетворення тиміну на цитозин (або аденіну на гуанін).

Аналогічний підхід можна використовувати і для **редагування РНК**. У 2019 р. неабияку зацікавленість (понад 400 наукових публікацій) викликав метод, розроблений ще у 2012 р. німецькими вченими Торстеном Стаффорстом і Маріусом Шнайдером із Тюбінгенського університету, який тоді залишився без уваги, оскільки був затьмарений сенсаційним відкриттям CRISPR/Cas9. Цей метод дозволяє змінювати протеїни шляхом редагування РНК, що вирішує проблему ризиків, пов’язаних із внесенням постійних змін у ДНК людини та ймовірністю обтяження її помилками редагування. Зміни у мРНК вносять за допомогою аденозинових дезаміназ ADAR (adenosine deaminases acting on RNA), які знаходяться в комплексі з РНК-гідами (adRNAs — ADAR guide RNAs) і здатні в утвореній дволанцюговій РНК змінювати аденозин на інозин, який при синтезі протеїну зчитується як гуанозин. Важливою перевагою використання людських ензимів ADAR порівняно з протеїном Cas9, що має бактеріальне походження, є відсутність небажаних реакцій з боку імунної системи. Зараз уже відомі інші засоби редагування РНК: цитидинові дезамінази APOBEC і певні ензими винограду змінюють у складі нуклеозидів цитозин на урацил, а деякі ензими пухлин можуть змінювати гуанін на аденін тощо. Незважаючи на обмеженість способів зміни послідовності РНК та проблеми з доставкою РНК до клітин, кілька стартап-компаній вже почали використовувати системи редагування РНК для розроблення засобів лікування раку, м’язової дистрофії та інших захворювань (не лише генетичних), а також для корекції різних патологічних станів, таких як гострий біль або високий рівень холестерину.

Згадана вище група вчених під керівництвом Девіда Лю створила новий універсальний метод редагування геному — **праймуюче редагування** (priming editing), яке також не потребує дволанцюгових розрізів ДНК, але дає змогу здійснювати будь-які перетворення, зокрема вставки та делеції фрагментів ДНК, з високою точністю (частота помилок 10 %) і більшою ефективністю (20–50 %) порівняно з класичною системою CRISPR/Cas9 (3–20 %). В основі методу лежить поєднання CRISPR, злитого протеїну, що складається з Cas9-нікази та ензиму зворотної транскриптази, здатної на основі РНК будувати ДНК. Причому замість gРНК використовують pegРНК, яка не лише спрямовує злитий протеїн до потрібного сайту в геномі, а й містить «праймер» — послідовність, необхідну для самостійної добудови ензимом ланцюга ДНК (в системі CRISPR/Cas9 ДНК добудовують ензими репарації, часто роблячи помилки). На прикладі серпоподібноклітинної анемії, хвороби Тея–Сакса (рання дитяча амавротична ідіотія) та пріонової інфекції було продемонстровано можливості праймуючого редагування: дослідники внесли в геном клітин людини мутації, що зумовлюють ці захворювання, а потім їх виправили. Аналіз ними бази даних шкідливих мутацій людини, які спричиняють виникнення різних захворювань, показав, що за допомогою праймуючого редагування можна виправити 89 % цих мутацій]. Цей метод викликав шалений інтерес не тільки в наукових колах, а його першовідкривач Девід Лю став співзасновником кількох компаній — Editas Medicine, Beam Therapeutics та Prime Medicine, що займаються розробленням терапевтичних засобів на основі праймуючого редагування.

Можливо, що мікроорганізми, які подарували нам CRISPR/Cas9, приховують ще багато маловивчених і зовсім невідомих молекулярних механізмів, які ми можемо використати у власних цілях, зокрема для редагування геномів. Так, нещодавно було з’ясовано біологічну функцію відкритих ще у 1980-х роках **ретронів** — природних елементів ДНК бактерій, що кодують зворотну транскриптазу, яка на основі РНК-шаблону синтезує багато копій одноланцюжкового продукту ДНК з утворенням комплексів ДНК–РНК–ензим. Виявилося, що ретрони, як і CRISPR, виконують функцію противірусного захисту бактерій і в разі інактивації бактеріофагами інших систем захисту активують протеїн, що пошкоджує клітинну мембрану інфікованої бактерії та призводить до її загибелі до того, як фаги встигнуть розмножитися і поширитися. Оскільки ретрони здатні перетворювати будь-яку бажану РНК-послідовність на ДНК, навіть у клітинах дріжджів і ссавців, вчені зі Стенфордського університету на чолі з Хантером Фрейзером, поєднавши ретрони і CRISPR/Cas9, розробили новий метод редагування геному — **CRISPEY** (від англ. Cas9 Retron precISe Parallel Editing via homology — точне паралельне редагування Cas9 за допомогою гомології). Цей метод продемонстрував високу ефективність (92 %), пропускну здатність та точність (4,6 % помилок) і дозволив отримати десятки тисяч клонів дріжджів-мутантів, кожен з яких відрізнявся лише однією основою в нуклеїновій послідовності гена.

Незважаючи на те, що наявні сьогодні системи редагування мають певні недоліки та обмеження, а способи їх доставки в клітини потребують вдосконалення, ясно, що в найближчому майбутньому технології редагування геномів досягнуть більшої ефективності та безпечності, а втручання в геном людини може стати буденною справою. Повірити в це змушує висловлювання Девіда Лю: «Якщо CRISPR схожий на ножиці, редактори основ нагадують олівець, то прайм-редактори — це текстовий процесор, придатний для точного пошуку та заміни. Всі інструменти редагування геному відіграватимуть власні ролі... Це лише початок, а не кінець» [76].