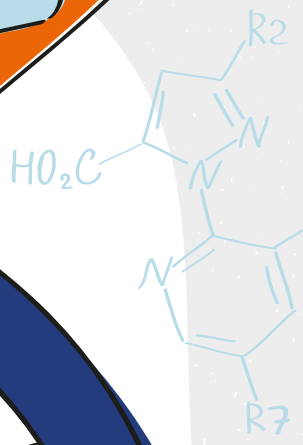
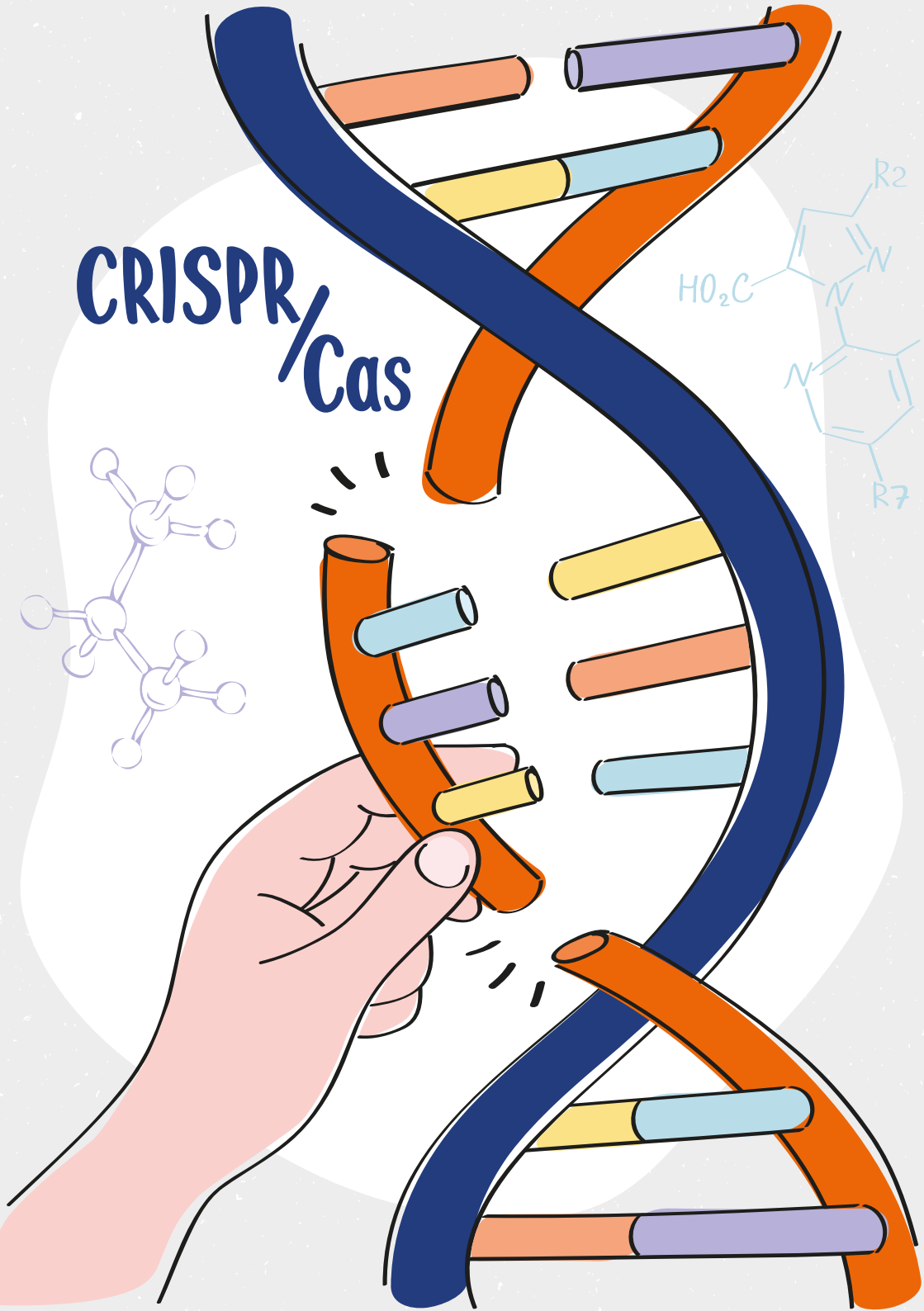
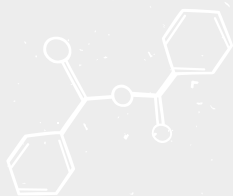


CRISPR/Cas





1

2

3

4

5

СОДЕРЖАНИЕ

1	ЧТО ТАКОЕ CRISPR?	2
	КОРОТКИЕ ПАЛИНДРОМНЫЕ КЛАСТЕРНЫЕ ПОВТОРЫ – CRISPR ..	5
2	ЧТО ТАКОЕ CRISPR/CAS?	6
	НАПРАВЛЯЮЩАЯ РНК.	8
3	КАК РАБОТАЕТ CRISPR?	9
	ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ CRISPR/CAS.	10
4	ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR/CAS.	12
	CRISPR/CAS ДЛЯ ТЕРАПИИ.	13
	CRISPR/CAS ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ.	15
5	ОТНОШЕНИЕ РАЗНЫХ СТРАН К ГЕНЕТИЧЕСКИМ МОДИФИКАЦИЯМ В ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА.	16





ЧТО ТАКОЕ CRISPR?

1

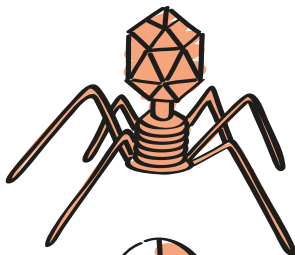
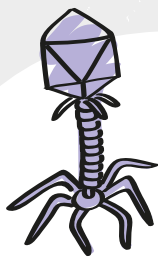
2

3

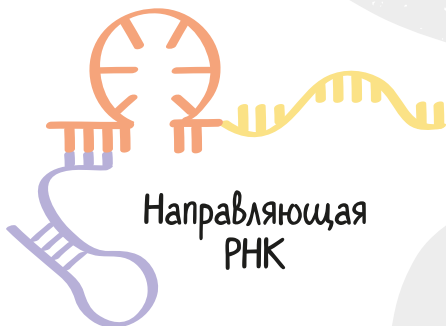
4

5

В природе системы CRISPR/Cas помогают бактериям защищаться от атакующих вирусов (известных как бактериофаг или просто фаг).



Системы CRISPR/Cas состоят из двух компонентов: Cas-белка и направляющей РНК.



ЧТО ТАКОЕ CRISPR?

Clustered

КЛАСТЕРНЫЕ

Short

КОРОТКИЕ

Regularly

РЕГУЛЯРНО

Palindromic

ПАЛИНДРОМНЫЕ

Interspaced

РАСПОЛОЖЕННЫЕ

Repeats

ПОВТОРЫ

ЧТО ТАКОЕ CRISPR?

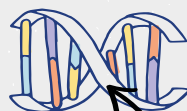
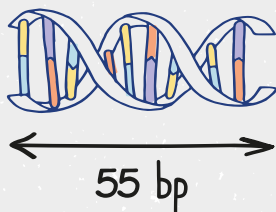
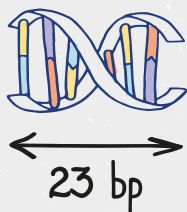
Последовательности CRISPR представляют собой короткие отрезки ДНК (20–55 пар оснований), которые бактерии скопировали у вирусов (последовательность ДНК вирусов), которые атаковали их в прошлом. Эти последовательности затем переводятся в короткие РНК, которые направляют белки Cas к соответствующим вирусным ДНК последовательностям. Белки Cas разрушают соответствующую вирусную ДНК, разрезая её.

SHORT

КОРОТКИЕ

PALINDROMIC

ПАЛИНДРОМНЫЕ



А РОЗА УПАЛА НА ЛАПУ АЗОРА

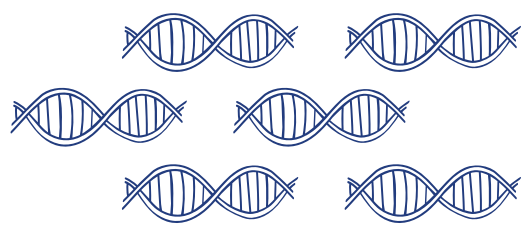
КОРОТКИЕ ПАЛИНДРОМНЫЕ КЛАСТЕРНЫЕ ПОВТОРЫ – CRISPR

В бактериальной ДНК между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК – спейсеры, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью Cas-белков, связанных с CRISPR РНК. Если фрагмент вируса «записан» в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают её, защищая клетку от инфекции.

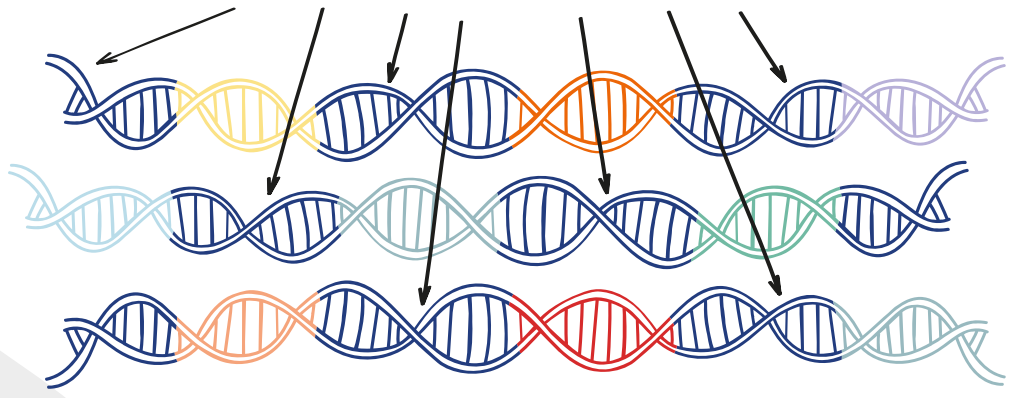
Кластерные Повторы



Регулярно Расположенные

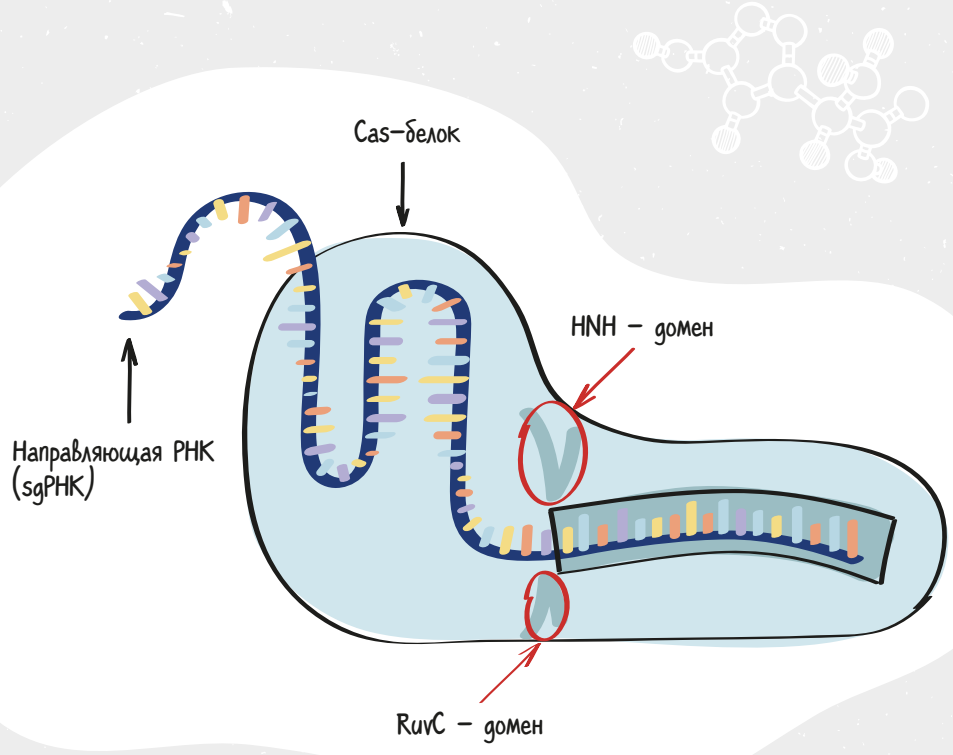


Кластерные Повторы Регулярно Расположенные



ЧТО ТАКОЕ CRISPR/CAS?

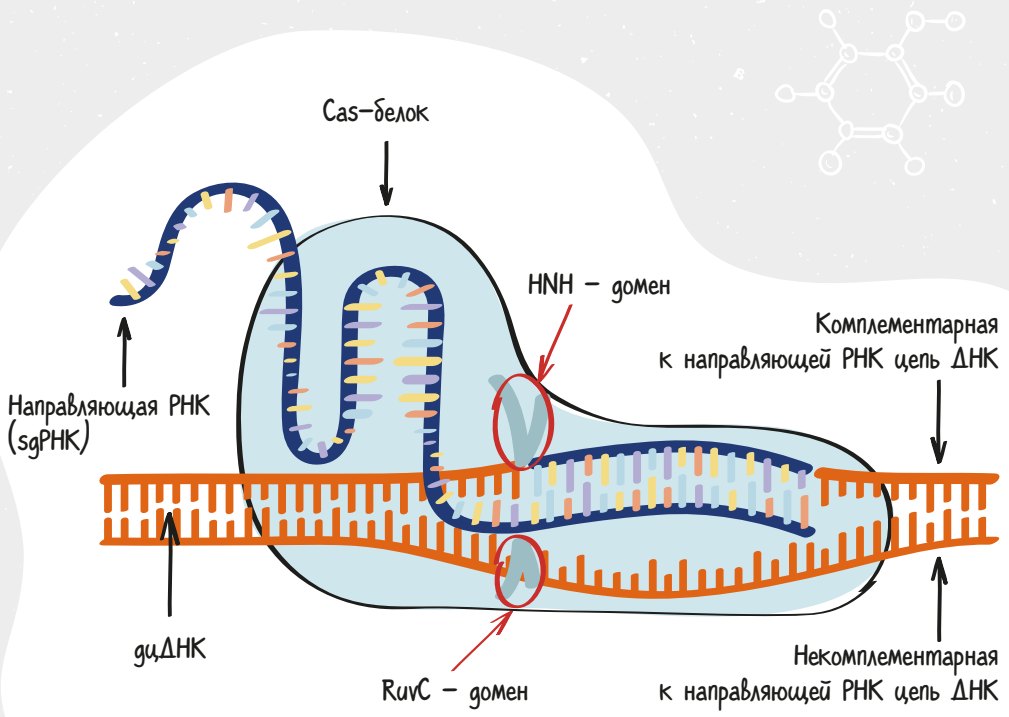
Для специфического нацеливания белка системы CRISPR/Cas используют направляющие РНК.



Наиболее распространённым и наиболее изученным мультидоменным эффекторным белком является Cas9, РНК-зависимая ДНК-эндоуклеаза, состоящая из двух неродственных нуклеазных доменов, RuvC и HNH, которые ответственны за внесение двунитового разрыва в ДНК мишень.

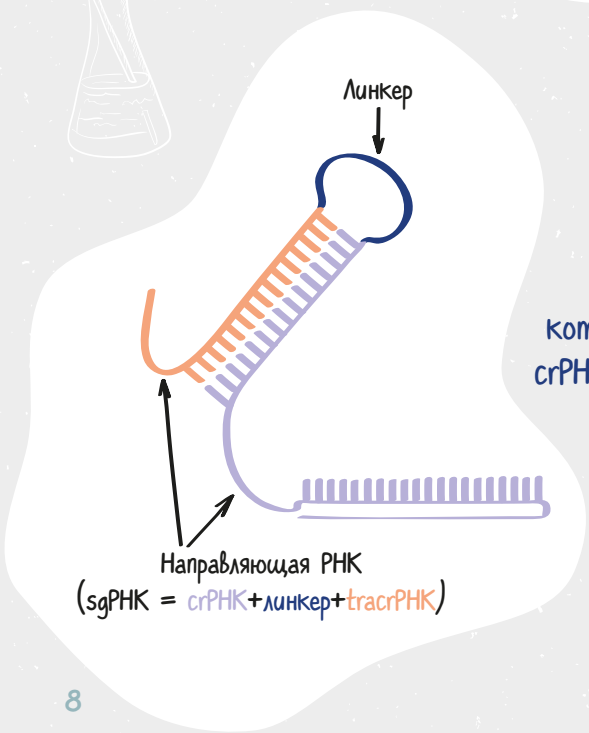
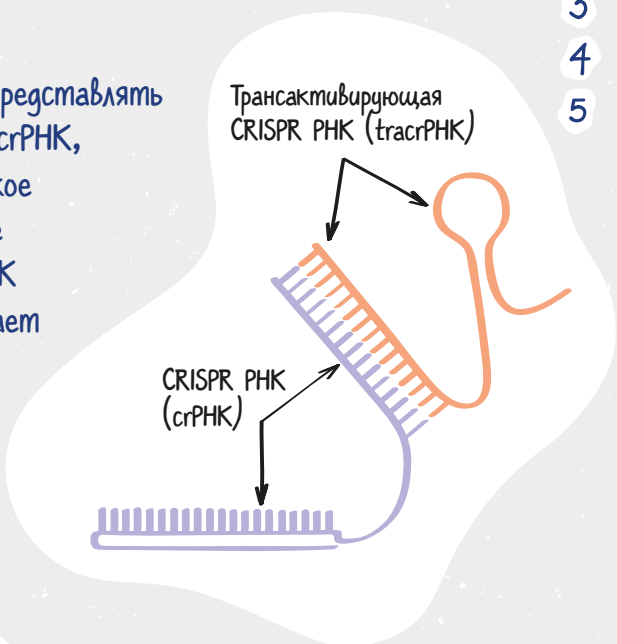
ЧТО ТАКОЕ CRISPR/CAS?

Домен HNH расщепляет комплементарную к направляющей РНК цель, в то время как домен RuvC расщепляет некомплеметарную цель ДНК.

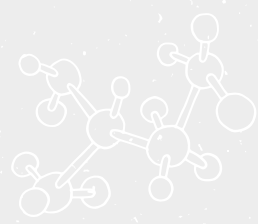


НАПРАВЛЯЮЩАЯ РНК

Направляющая РНК может представлять собой комплекс CRISPR РНК crРНК, отвечающей за специфическое узнавание мишени, а также транскрибирующей tracrРНК CRISPR РНК, которая отвечает за связывание фермента системы CRISPR/Cas.



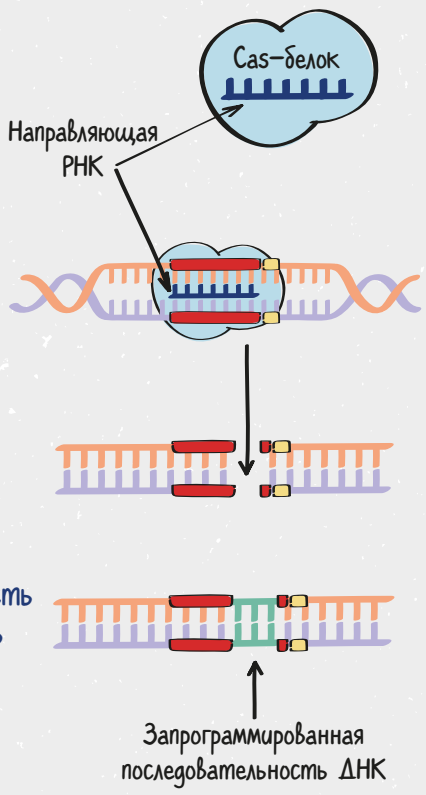
Кроме того, направляющая РНК может представлять собой единицу комбинированную sgРНК (от англ., single guide RNA), которая сочетает в себе свойства crРНК и tracrРНК в одной молекуле.



КАК РАБОТАЕТ CRISPR?

Системы CRISPR/Cas составляют основу технологии редактирования генома. Они могут быть запрограммированы, или «нацелены» на определённые участки генома и могут «редактировать» или изменять ДНК в точных местах. Также Системы CRISPR могут применяться для других целей, например, для диагностики заболеваний. С помощью этих систем исследователи могут модифицировать гены в живых клетках и организмах и, в будущем, могут сделать возможным исправление мутаций в геноме человека для лечения генетических заболеваний.

- ① Cas-белок образует комплекс с направляющей РНК
- ② Данный комплекс связывается со специфичной к направляющей РНК последовательностью ДНК-мишени
- ③ Cas-белок вносит разрыв в последовательность ДНК-мишени



- ④ Запрограммированная последовательность ДНК может быть вставлена в разрыв



ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ CRISPR/CAS

- 1987** Открытие повторяющихся палиндромных повторов у бактерии *E. coli*, которые позднее были названы «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами» (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR).
- 1993** Обнаружены повторяющиеся палиндромные последовательности у археи *Haloferaх mediterranei*.
- 2002** Открыты гены *cas* – гены локусов CRISPR, кодирующие белки Cas.



Ёсидзуми Исино

Первый локус CRISPR был обнаружен у бактерии *Escherichia coli* в 1987 году группой японских учёных во главе с Ёсидзуми Исино. Они заметили в геноме этой бактерии повторяющиеся элементы, разделённые неповторяющимися последовательностями (спейсерами).

Франсиско Мохика в 1993 году обнаружил повторяющиеся последовательности, разделённые промежутками, в геноме археи *Haloferaх mediterranei*. Он обратил внимание, что повторы в геномах этой археи и *E. coli* очень похожи по структуре, однако не имеют ничего общего в последовательностях нуклеотидов. К 2000 году он обнаружил CRISPR в геномах у 20 микроорганизмов. В 2002 году были открыты гены *cas* – гены локусов CRISPR, кодирующие белки Cas.



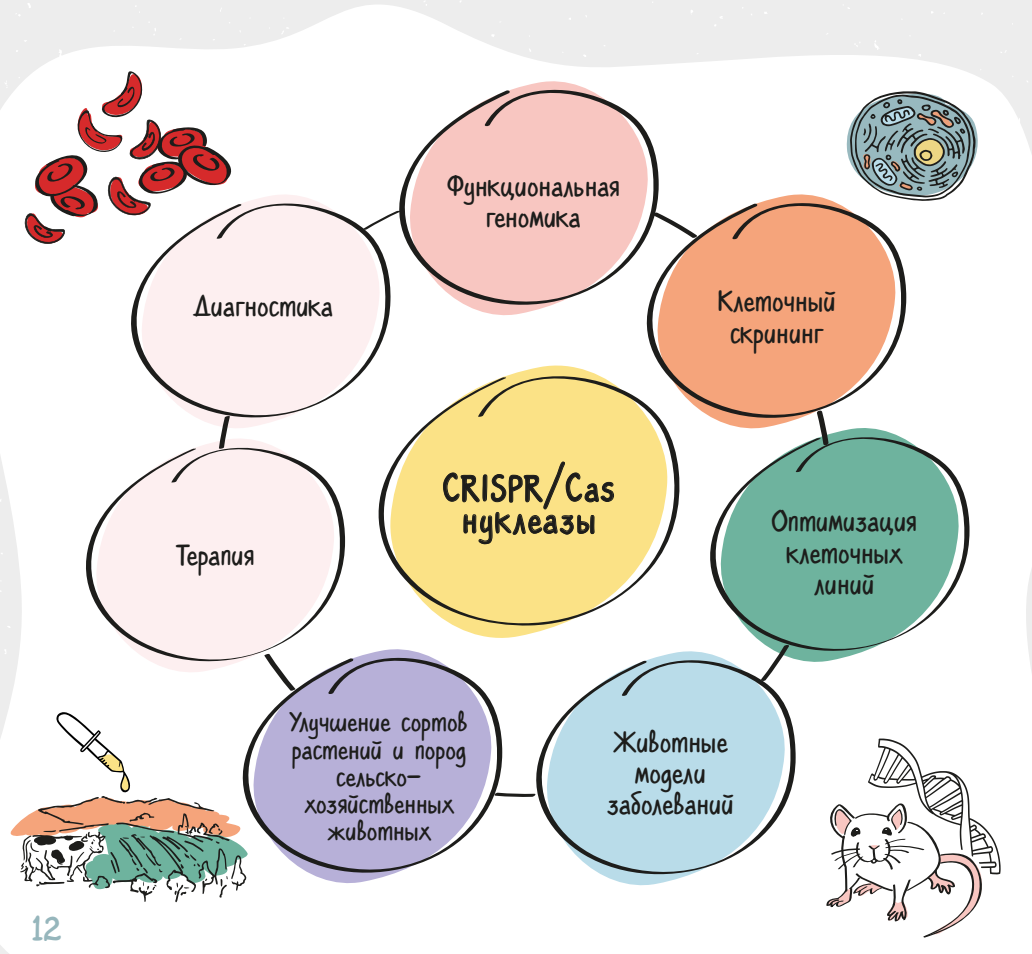
Франсиско Мохика

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ CRISPR/CAS

- 2005** Сделан вывод о связи локусов CRISPR с адаптивным иммунитетом прокариот.
- 2007** Выявлена ключевая роль белков Cas в процессе адаптивного иммунитета.
- 2011** Открытие tracrНК для системы Cas9.
- 2012** Экспериментально опробована первая искусственно разработанная система CRISPR типа II.
- 2013** CRISPR/Cas используется для изменения геномов растений, включая рис, пшеницу, арабидопсис, табак и сорго.
- 2015** Отредактированы геномы человеческих эмбрионов.
- 2016** Запущено первое клиническое испытание CRISPR/Cas9.
- 2017** Национальная Академия Наук и Медицины США одобрила продолжение использования CRISPR в экспериментах на зародышевой линии.
- 2017** Показано, что CRISPR является чувствительным диагностическим инструментом для обнаружения одной мишени молекулы ДНК и РНК.
- 2019** Опубликована новая высокоэффективная методика редактирования ДНК под названием «prime editing».

ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR/CAS

Системы CRISPR/Cas могут применяться в различных областях, связанных с редактированием генов. Начиная от создания клеточных моделей наследственных заболеваний человека и животных, функционального скрининга геномов, изучения и визуализации клеточных процессов до прикладного применения в пищевой промышленности для получения обогащённых продуктов питания, в сельском хозяйстве для создания новых пород животных и сортов растений, а также в медицине.



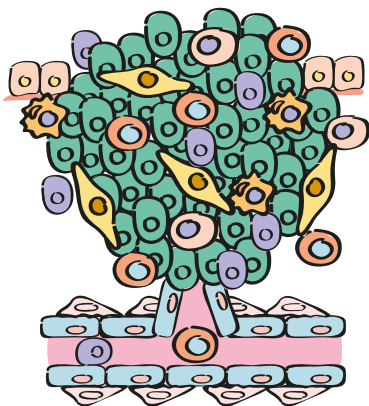
CRISPR/CAS ДЛЯ ТЕРАПИИ

Терапевтические препараты, действующим веществом в которых является CRISPR/Cas нуклеазы, проходящие клинические испытания.*

Солидные новообразования

(рак пищевода, инвазивный рак мочевого пузыря, гормонорезистентный рак простаты, немелкоклеточный рак лёгких и др.)

13 клинических испытаний

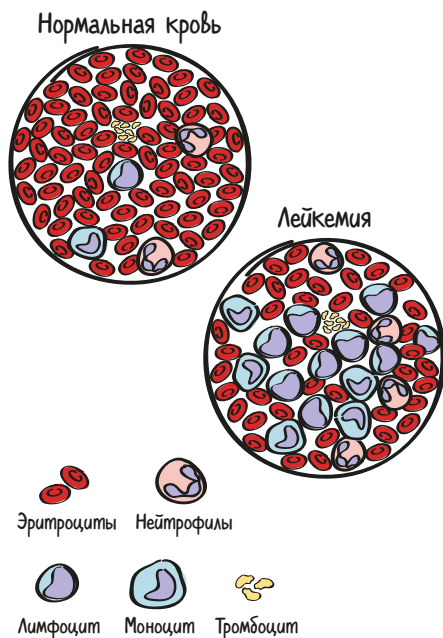


- Раковая клетка
- Раковая стволовая клетка
- Эпителиальные клетки
- Потомки МСК
- Перичит
- Эндотелиальные клетки
- МСК
- МАО
- ОАФ

Гематологические новообразования

(острый лимфобластный лейкоз, неходжкинская лимфома, Т-клеточная острая лимфобластная лимфома и др.)

42 клинических испытания



- Эритроциты
- Нейтрофилы
- Лимфоцит
- Моноцит
- Тромбоцит

*по данным clinicaltrials.gov

CRISPR/CAS ДЛЯ ТЕРАПИИ

Терапевтические препараты, действующим веществом в которых является CRISPR/Cas нуклеазы, проходящие клинические испытания.*

Наследственные заболевания

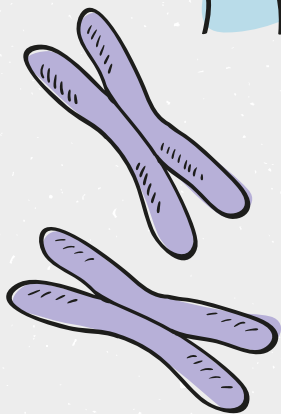
(серповидноклеточная анемия, талассемия, синдромы Кабуки и Рубинштейна-Тейби и др.)

24 клинических испытания

Инфекционные заболевания

(ВИЧ, ВПЧ)

4 клинических испытания



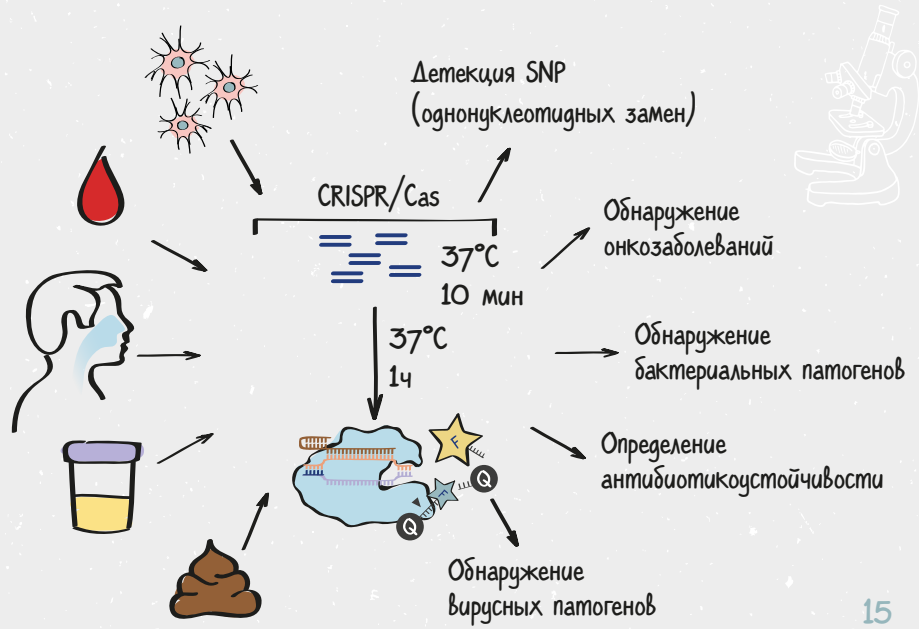
CRISPR/CAS ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ



CRISPR/Cas белки являются инструментом для создания диагностических систем «нового поколения».

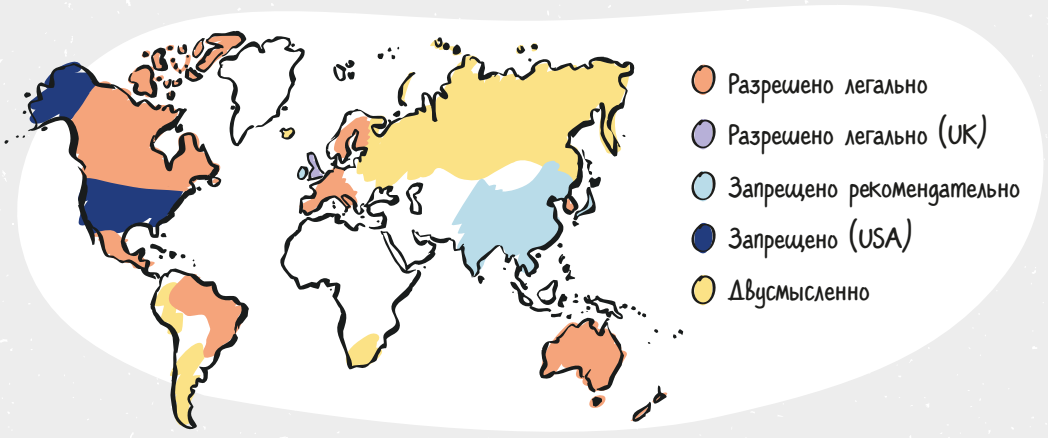
Диагностические системы «нового поколения» будут обладать следующими свойствами:

- Высокая чувствительность (достаточно нуклеиновой кислоты возбудителя);
- Возможность проведения диагностики у постели больного;
- Возможность проведения диагностики в полевых условиях без применения специализированного высокотехнологичного оборудования;
- Скорость анализа;
- Простота анализа;
- Сниженная стоимость анализа;
- Не требует оснащения диагностической лаборатории дорогостоящим оборудованием;
- Не требует проведения выделения нуклеиновых кислот возбудителя.



ОТНОШЕНИЕ РАЗНЫХ СТРАН К ГЕНЕТИЧЕСКИМ МОДИФИКАЦИЯМ В ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

В 2017 году на встрече по функциональной геномике были приведены следующие данные. В большей части европейских стран, Австралии и Канаде генетические модификации в зародышевых клетках человека разрешены легально. В России нет четко сформулированных запретов и ситуация с модификацией зародышевых клеток человека остаётся двусмысленной. В США внесение генетических модификаций в зародышевые клетки человека запрещено законом. В Китае – рекомендательно запрещены.



Огромный резонанс в мире вызывали новости о том, что китайскому учёному-генетику в 2018 году удалось отредактировать геном двух новорождённых девочек-близнецов Лулу и Наны. Этот вопрос бурно обсуждался, но в конце 2019 года стало известно, что китайского учёного-генетика за модификацию зародышевых клеток человека приговорили к трём годам тюрьмы и штрафу в 430 тыс. долларов.

Иллюстрированная брошюра издана при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

Авторы:

Тюменцев А.И., Тюменцева М.А.

Под общей редакцией академика РАН, д.м.н., проф. Акимкина В.Г.

Иллюстратор

Галицкая Д.А.

Ведущий дизайнер

Штоль И.О.



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

8 (495) 974-96-46

www.crie.ru

111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3 А

ИНН 7720024671

Лицензия № 1041-00110-77/00574836 от 01.07.2016

Информация предназначена только для специалистов сферы здравоохранения

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020