ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

Пән атауы: Қолданбалы генетика және геномика

Дәріс 6

CRISPR/Cas және геномды редакциялау технологиялары

Лектор: к.б.н., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: Геномды өзгерту технологияларының молекулалық негіздерін, CRISPR/Cas жүйесінің құрылымы мен әсер ету механизмдерін қарастыру, заманауи геномды өзгерту әдістерінің ерекшеліктерін және олардың медицина мен биотехнологиядағы қолданылу мүмкіндіктерін түсіндіру.

Дәрістің жоспары:

1. Геномды редакциялау технологияларының негізгі ұғымдары және даму тарихы.
2. CRISPR/Cas жүйесінің ашылуы, құрылымы және негізгі компоненттері.
3. CRISPR/Cas9 жүйесінің жұмыс істеу принциптері және PAM тізбегінің рөлі.
4. CRISPR/Cas9 арқылы ДНҚ-ны нысаналы өзгерту және NHEJ, HDR репарация механизмдері.
5. Cas9 ферментінің модификацияланған нұсқалары және олардың қолданылу ерекшеліктері.
6. CRISPR/Cas технологиясының медицина, ауыл шаруашылығы және биотехнология салаларындағы қолданылуы.
7. Геномды редакциялау технологияларының қауіпсіздігі, шектеулері және этикалық мәселелері.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгергеннен кейін докторант:

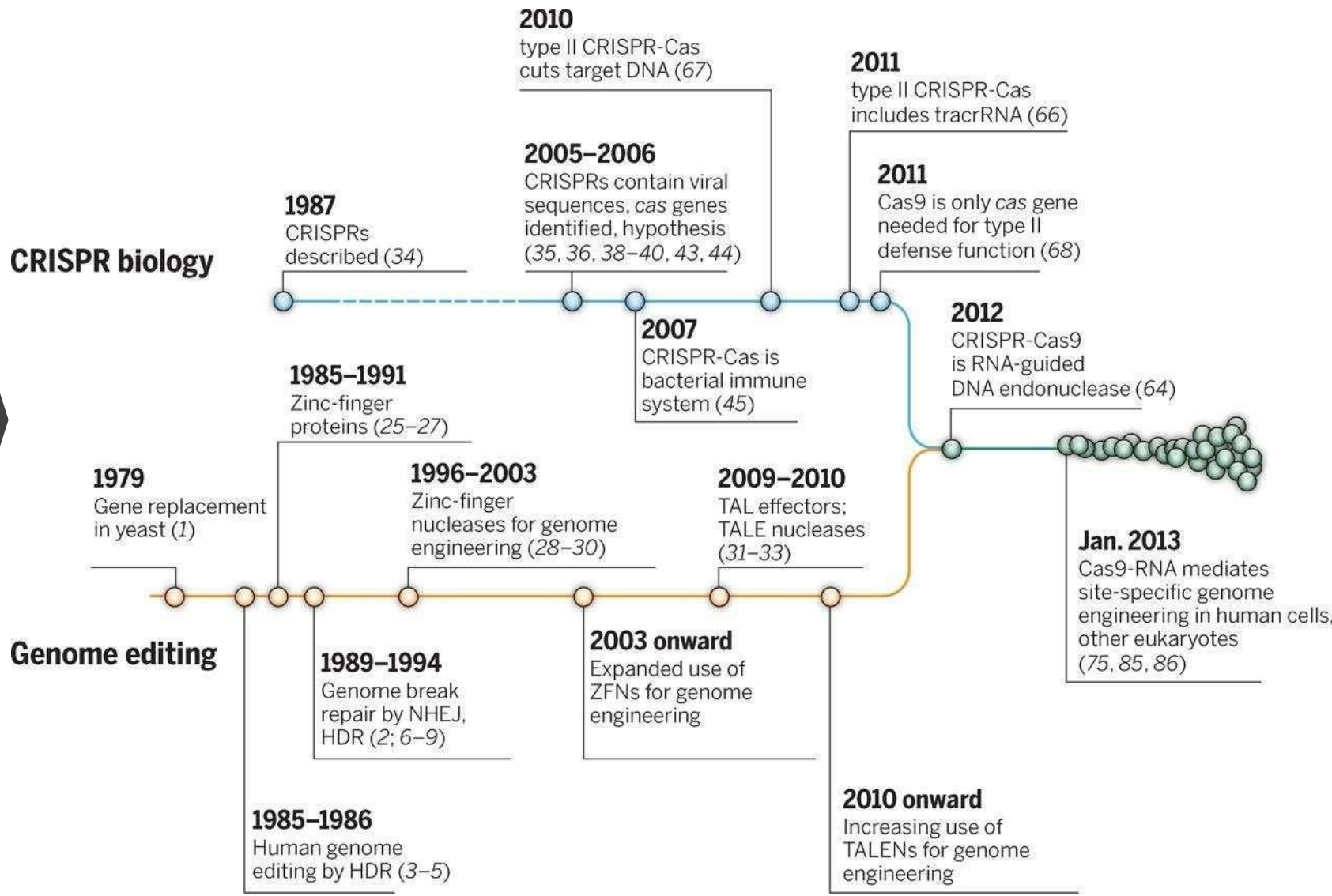
1.Геномды редакциялау технологияларының негізгі ұғымдарын, мақсаттарын және даму кезеңдерін түсіндіре алады.
2.CRISPR/Cas жүйесінің ашылу тарихын және бактериялар мен археялардағы қорғаныс қызметін сипаттай алады.
3.CRISPR/Cas9 жүйесінің негізгі компоненттерін: Cas9 эндонуклеазасын, бағыттаушы РНҚ-ны (gRNA) және PAM тізбегін ажырата алады.
4.CRISPR/Cas9 арқылы ДНҚ-ны нысаналы кесу механизмін түсіндіре алады.
5.ДНҚ-ның қос тізбекті үзілістерін қалпына келтірудегі NHEJ және HDR репарация механизмдерін салыстыра алады.
6.Cas9, nCas9 және dCas9 нұсқаларының функционалдық ерекшеліктерін сипаттайды.
7.CRISPR/Cas технологиясының медицинада, ауыл шаруашылығында және биотехнологияда қолданылу мүмкіндіктерін талдай алады.
8.Геномды редакциялау технологияларының қауіпсіздік мәселелерін, шектеулерін және этикалық аспектілерін бағалай алады.

CRISPR/Cas9 технологиясы

- CRISPR/Cas9 технологиясы генетика және биотехнология саласындағы төңкеріс құралы болып табылады, ол организмдердің геномының қалай түрленетінін қайта анықтайды. Вирустарға қарсы қорғаныс механизмі ретінде бактерияларда табылған бұл жүйе әртүрлі организмдерде, соның ішінде адамдарда ДНҚ-ны дәл және тиімді өңдеу үшін бейімделген және қолданылған.

- CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) - бактериялар мен археялардың геномдарында кездесетін қайталанатын ДНҚ тізбегі. Cas9 (CRISPR-ассоциацияланған ақуыз 9) – CRISPR гидро нұсқауларында көрсетілген реттілікке сәйкес нүктеде қос тізбекті ДНҚ-ны кесуге қабілетті эндонуклеаза. Осы екі компоненттің тіркесімі геномның мақсатты аймақтарын арнайы анықтауға және өңдеуге мүмкіндік береді.

Сурет. 1 CRISPR-Cas және геномдық инженерлік зерттеулердің хронологиясы. Екі саладағы негізгі дамулар көрсетілген. Екі өріс 2012 жылы Cas9-ның РНҚ-бағдарламаланатын ДНҚ эндонуклеазасы екендігі ашылуымен біріктірілді, бұл 2013 жылдан бастап Cas9-ды адам жасушаларындағы, сондай-ақ көптеген басқа жасушалар түрлері мен ағзалардағы гендерді өзгерту үшін пайдаланған қағаздардың жарылуына әкелді.



• **1987** жылы Осака университетінің бір топ жапондық ғалымдар ішекте өмір сүретін микроб ішек таяқшасына жататын гендегі біртүрлі ДНҚ реттілік үлгісін байқады. Ген қысқа, қайталанбайтын «**спейсер**» ДНҚ тізбегі арқылы бөлінген бес қысқа, қайталанатын ДНҚ сегменттерінен тұратыны белгілі болды. Барлық бес қайталанатын сегменттер ДНҚ-ның құрылыс блоктары - 29 негізден тұратын бірдей тізбектерге ие болды. Керісінше, «**спейсер**» тізбегінің әрқайсысының 32 негізден тұратын өзіндік бірегей тізбегі болды. Микробиологтар мұндай үлгіні бұрын-соңды көрмеген.





- ***Ёшизуми Ишино(***(石野良純, *Ishino Yoshizumi*)***)***— жапондық молекулярлық биолог, 1987 жылы *E.coli* құрамындағы «***iap***» генінің нуклеотидтік тізбегін секвенирлеу кезінде, **CRISPR**-ді ашқан алғашқы ғалымдардың бірі.



Франсиско Мохика

- CRISPR кең ауқымды зерттеуін испандық зерттеуші **Франсиско Мохика** бастады, ол 1993 жылы Haloferax mediterranei archaea геномында бос орындармен бөлінген қайталанатын тізбектерді ашты. Ол осы архейлер мен ішек таяқшаларының геномындағы қайталанулар құрылымы жағынан өте ұқсас, бірақ нуклеотидтер тізбегінде ортақ ештеңе жоқ екенін байқады. Мохиканың айтуынша, прокариоттардың жүйелі түрде өте алыс топтарында кездесетін осындай ұқсас құрылымның қайталануы кейбір өте маңызды функцияларды орындауы керек. Ол бастапқыда қайталанудың жаңа сыныбын «**қысқа тұрақты интервалды қайталаулар**» (SRSR) деп атады, бірақ кейінірек оның ұсынысы бойынша бұл атау «**кластерленген қысқа палиндромдық қайталаулар**» деп ауыстырылды. Үнемі интервалды қысқа палиндромдық қайталаулар, CRISPR). Мохика басқа микробтардың геномдарында CRISPR іздеуін жалғастырды және 2000 жылға қарай оларды 20 микроорганизмдерден тапты, соның ішінде Yersinia pestis оба таяқшасы және басқа да қоздырғыштар.

CRISPR Cas9 ашылуы

2002 жылы cas гендері ашылды — Cas протеиндерін кодтайтын CRISPR локус гендері.

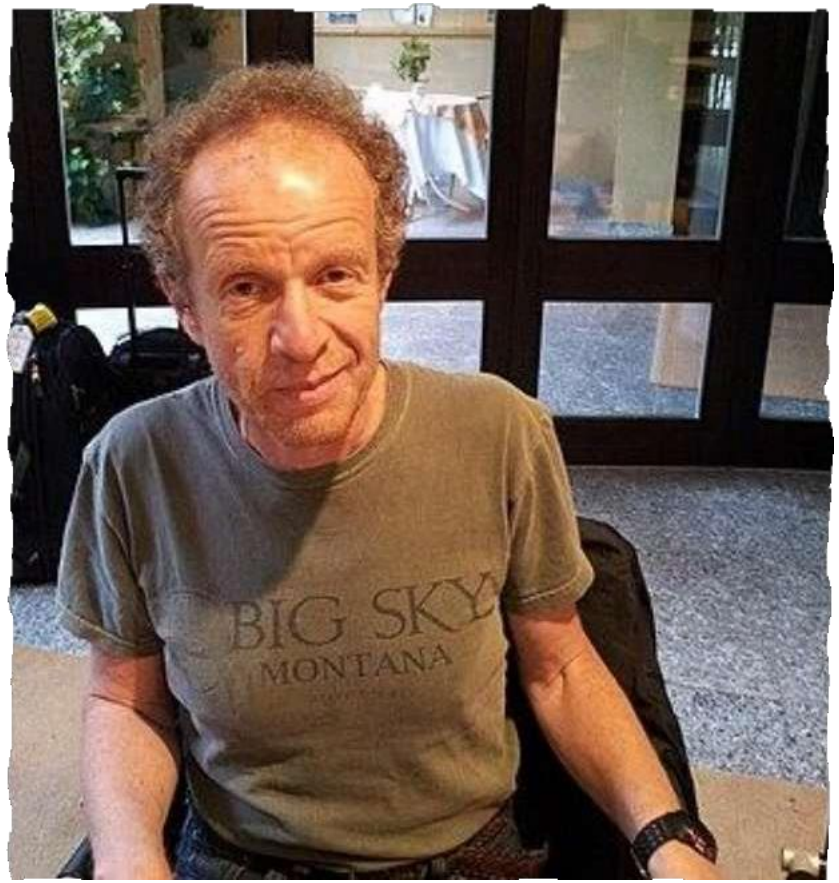
2005 жылға қарай үш ғылыми топ CRISP тізбегі арасындағы «аралық» реттілігі вирустардың ДНҚ-сына ұқсас екенін дербес анықтады және олар бактериялардың қорғаныс механизмінде маңызды рөл атқара алады деп болжайды.

CRISPR Cas9 ашылуы

- CRISPR/Cas 9 жүйесінің қалай жұмыс істейтіні туралы білім 2007 жылы Данискодағы, кейіннен DuPont сатып алған тағам өндіруші Даниско ғалымдары жүргізген эксперименттерден алынған. Ұжым сүтті ашытатын Streptococcus thermophilius микробын вирустың екі штаммымен жұқтырды. Көптеген бактерияларды вирустар өлтірді, бірақ кейбіреулері аман қалды және вирустарға төзімді ұрпақтар берді. Әрі қарай зерттегеннен кейін микробтар вирустық ДНҚ фрагменттерін өздерінің «аралық» тізбегіне енгізіп, жаңа «аралық» тізбектер қиылған сайын тұрақтылығын жоғалтқаны анықталды.



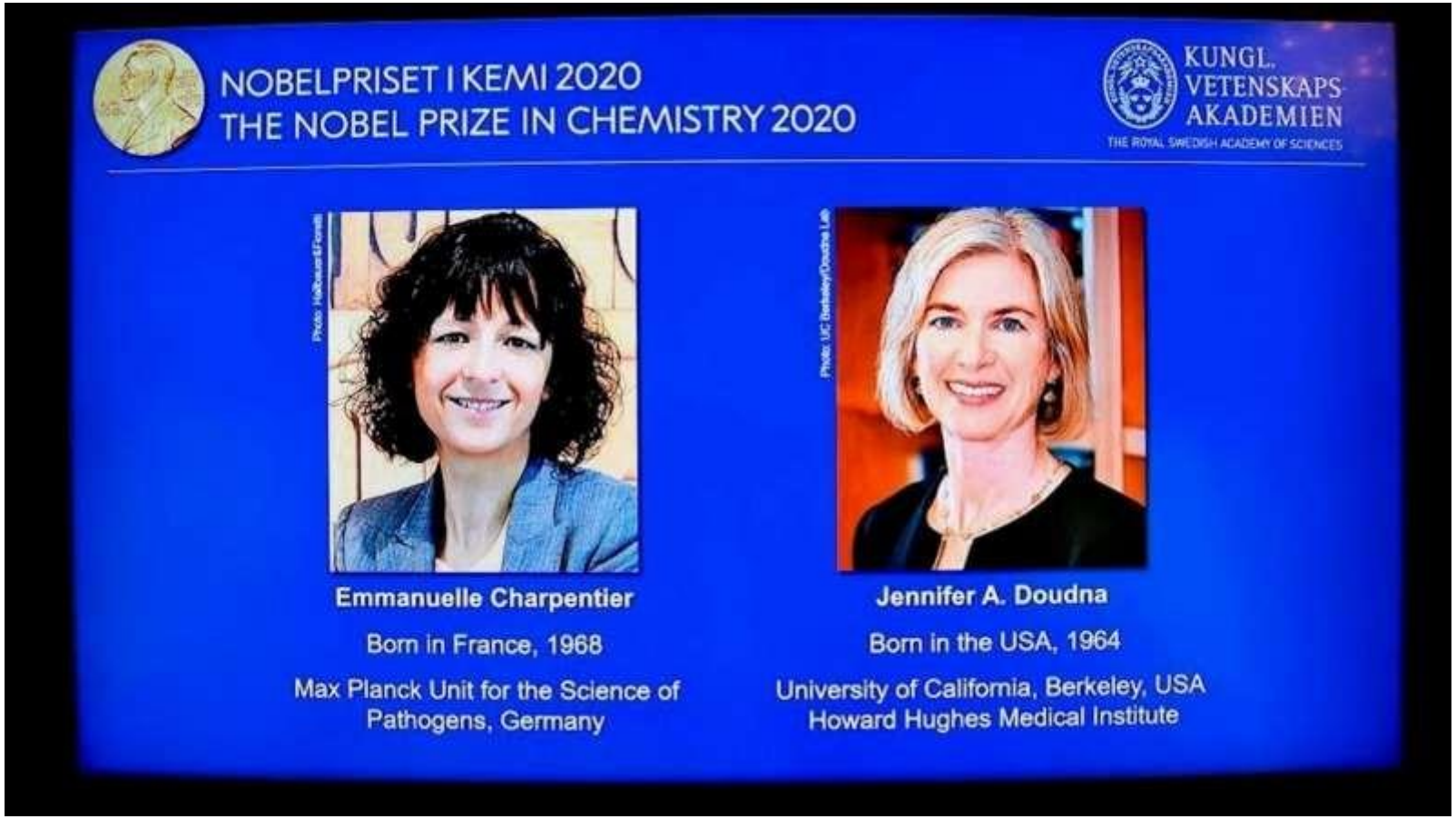
CRISPR Cas9 ашылуы



- 2008 жылы Евгений Кунин және Мэриленд штатының Бетезда қаласындағы Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығының әріптестері CRISPR/cas 9 механизмінің қалай жұмыс істейтінін алғаш рет көрсетті. Бактериялар вирус сияқты басқыншымен кездескенде, олар оның ДНҚ сегменттерін көшіреді және CRISPR-дегі ДНҚ-ның қысқа қайталануы арасындағы "аралық" ретінде геномына қосады. "Аралықтардағы" сегменттер бактериялардың РНҚ молекулаларына келген вирустың кез келген болашақ ДНҚ-сын тануға және вирусты өшіру үшін оны кесу үшін CAS 9 ферментін бағыттауға шаблон ретінде қызмет етеді.

CRISPR Cas9 ашылуы

- Төрт жылдан кейін, 2012 жылдың тамызында Калифорния университетінің Дженнифер Дудна және Умеа университетінің Эммануэль Чарпентиер бастаған шағын топ ғалымдар CRISPR-Cas9 табиғи жүйесін кез келген жіпті кесу құралы ретінде қалай пайдалану керектігін көрсететін мақаланы жариялады. пробиркадағы ДНҚ..



CRISPR Cas9 ашылуы

- 2016 жылы бір топ ғалымдар CRISPR-Cas жүйелері қозғалғыштығын жоғалтып, геномда орныққан транспозондардан пайда болғанын анықтады. Филогенетикалық зерттеу барлық Cas эндонуклеазалары барлық IscB эндонуклеаза тасымалдаушы транспозондар арасында бір транспозоннан шыққанын көрсетті.

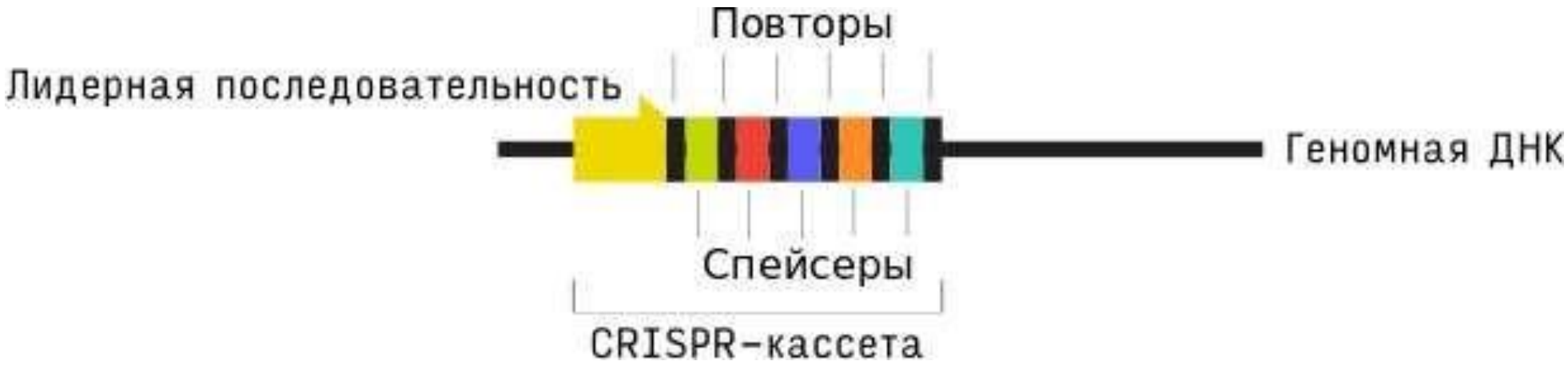
- 2023 жылы алғаш рет CRISPR көмегімен гендік терапия мақұлданды. CRISPR Therapeutics және Vertex Pharmaceuticals әзірлеген exagamglogen autotemcel (саудалық атауы Casgevy) деп аталатын препарат 12 жастан асқан және одан жоғары емделушілерде орақ тәрізді жасушалық ауру мен бета талассемияны емдеуге арналған.



CRISPR/Cas жүйесінің бөліктері

CRISPR-кассеталар

***cas* гені кластерлері**

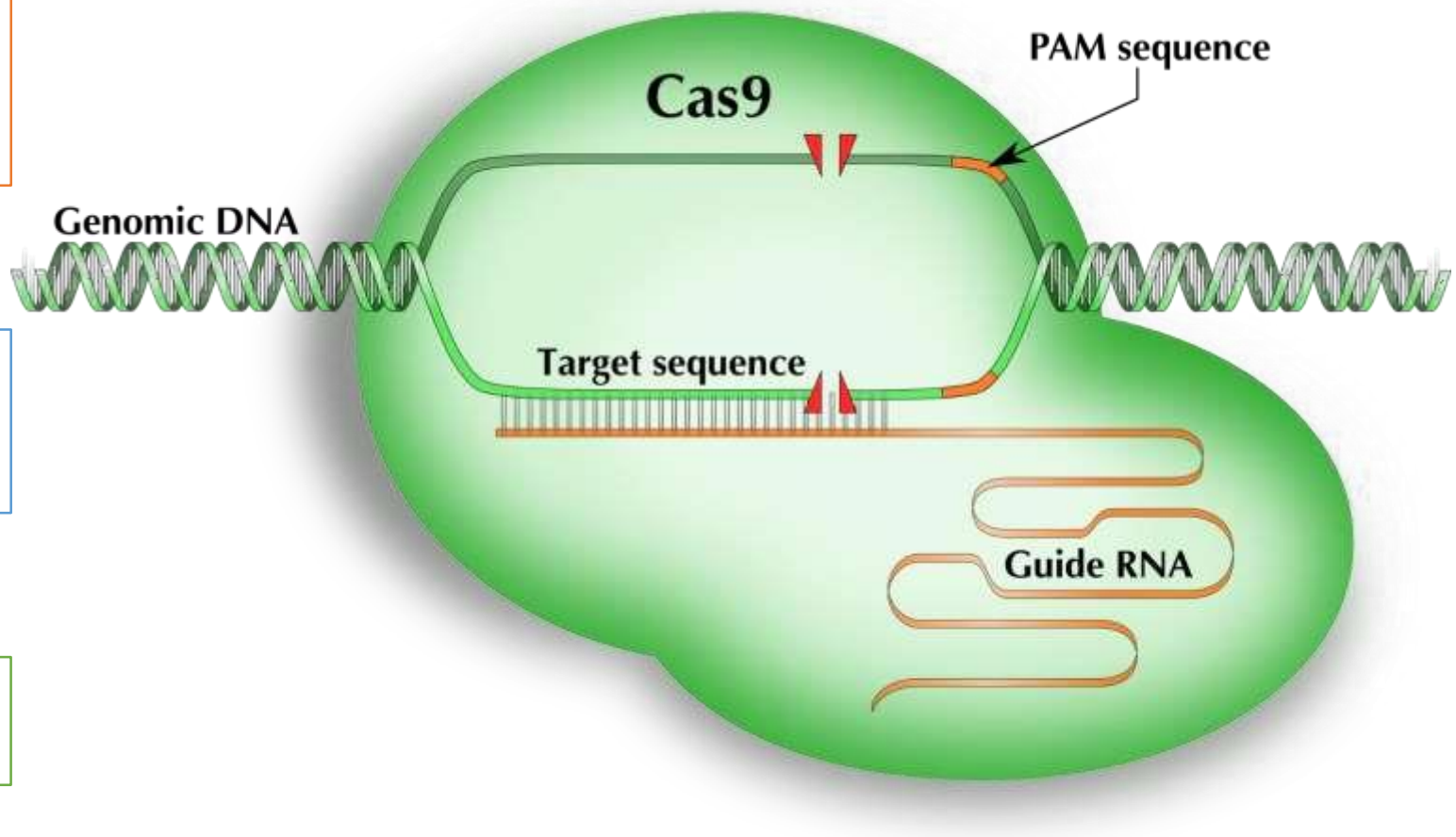


Спейсер – өткен инфекциялар туралы ақпаратты сақтайтын және ұқсас генетикалық элементтердің қайталанатын инвазиясына жауап беретін иммунологиялық жадты құрайды.

Cas9 - бірқатар бактериялардағы CRISPR адаптивті иммундық жүйесімен байланысты бағыттаушы РНҚ-басқарушы эндонуклеаза.

gRNA — Cas байланысы үшін қажетті тірек тізбегінен және спейсерден тұратын қысқа синтетикалық РНҚ.

PAM тізбегі Cas9 байланыстыру сигналы ретінде қызмет етеді.



Структура CRISPR-системы

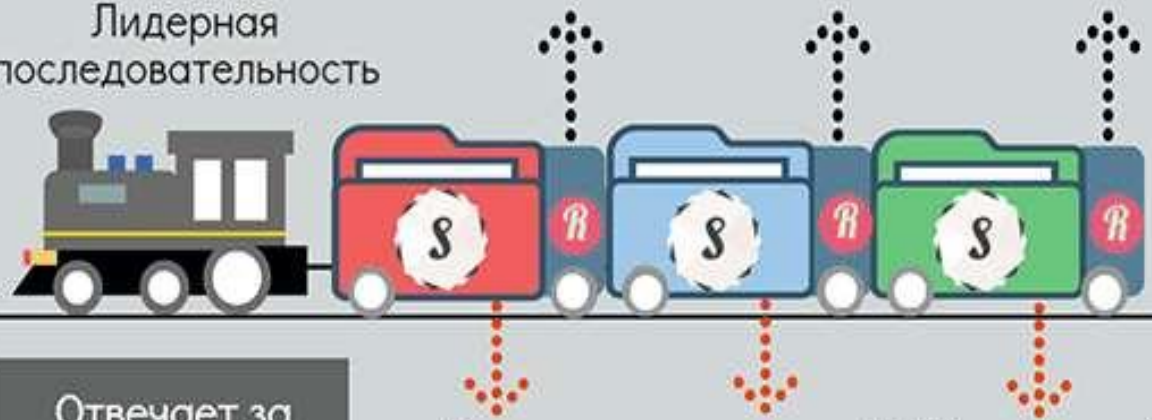
cas-гены



Кодируют белки cas, необходимые для функционирования системы CRISPR/Cas

Лидерная последовательность

Повторяющиеся идентичные участки (повторы)



Уникальные участки ДНК (спейсеры)

Отвечает за увеличение количества спейсеров после вирусных атак

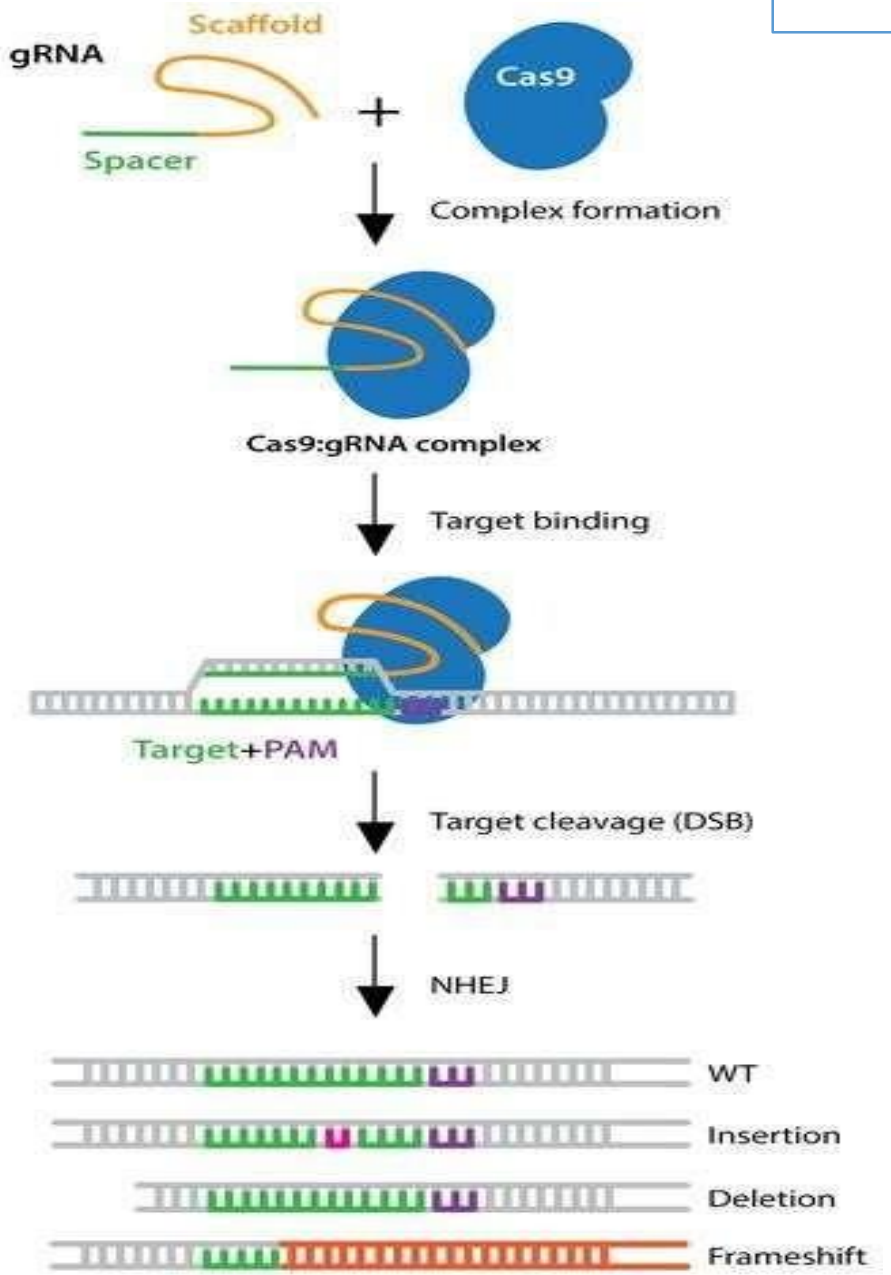
Появляются после вирусных инфекций и необходимы для приобретенного иммунитета.

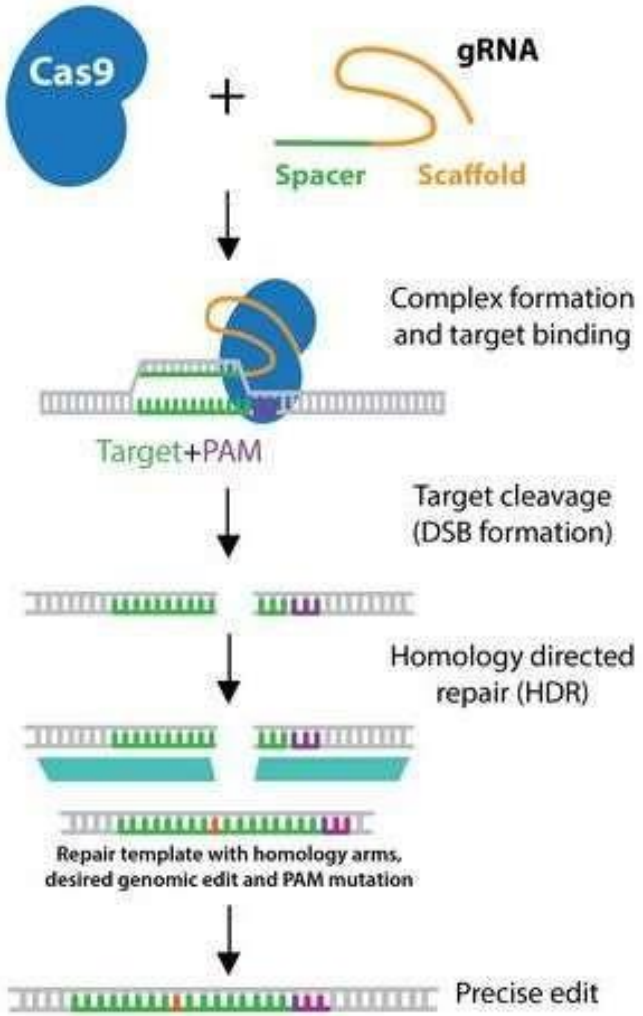
Cas Enzymes and PAM Sequences

Species/Variant of Cas9	PAM Sequence*
Streptococcus pyogenes (SP); SpCas9	3' NGG
SpCas9 D1135E variant	3' NGG (reduced NAG binding)
SpCas9 VRER variant	3' NGCG
SpCas9 EQR variant	3' NGAG
SpCas9 VQR variant	3' NGAN or NGNG
xCas9	3' NG, GAA, or GAT
SpCas9-NG	3' NG
Staphylococcus aureus (SA); SaCas9	3' NNGRRT or NNGRR(N)
Acidaminococcus sp. (AsCpf1) and Lachnospiraceae bacterium (LbCpf1)	5' TTTV
AsCpf1 RR variant	5' TYCV
LbCpf1 RR variant	5' TYCV
AsCpf1 RVR variant	5' TATV
Campylobacter jejuni (CJ)	3' NNNNRYAC
Neisseria meningitidis (NM)	3' NNNNGATT
Streptococcus thermophilus (ST)	3' NNAGAAW
Treponema denticola (TD)	3' NAAAAC
Additional Cas9s from various species	PAM sequence may not be characterized

Әртүрлі ферменттердің PAM тізбегі

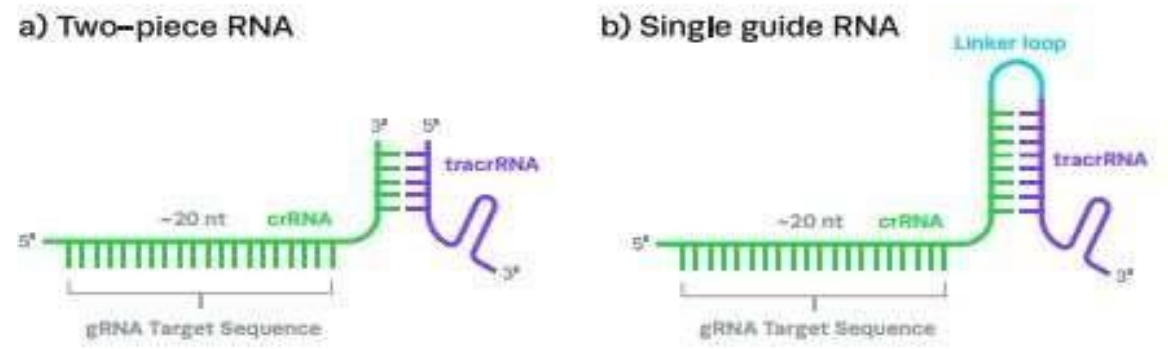
CRISPR/Cas9 жүйесінің реттелу жолдары





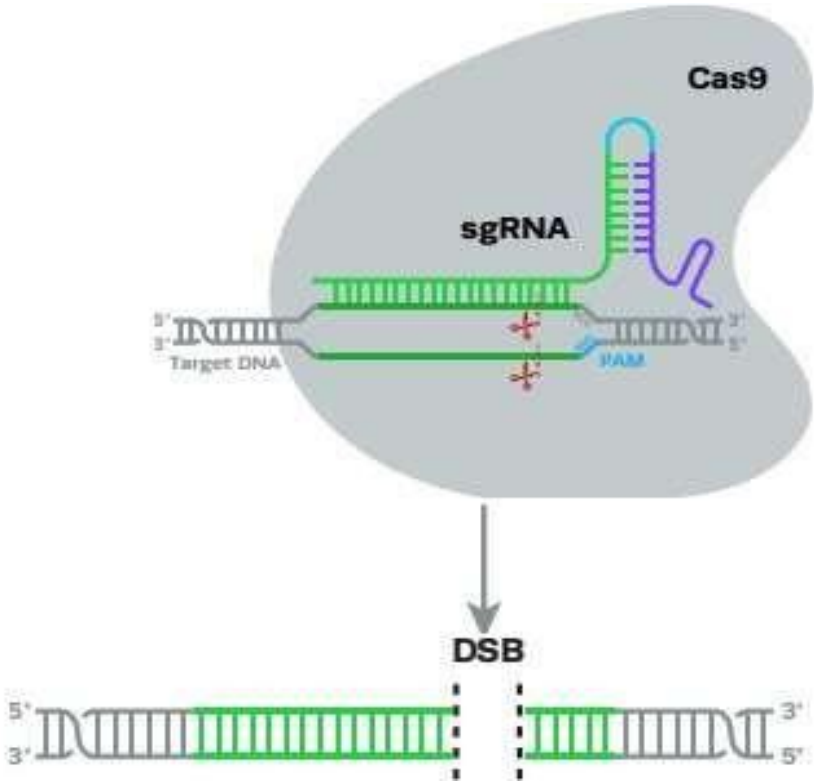
Бағыттаушы РНҚ пішімдері

Табиғи түрінде gRNA екі түрлі РНҚ сегментінен тұрады: CRISPR РНҚ (crRNA) және CRISPR-трансактивті РНҚ (crRNA). crRNA – геномдық нысанмен байланысатын 18-20 жн ұзын тізбек. TracrRNA crRNA-Cas9 әрекеттесуі үшін тірек ретінде қызмет етеді. Табиғи жағдайларда бағыттаушы РНҚ-лар дуплексті молекуланы құрайды, онда crRNA және crRNA сегменттері бірге жасытылып (cr:tracrRNA деп аталады). Дегенмен, бағыттаушы РНҚ-ны енді crRNA мен TracrRNA линкерлік ілмек арқылы жалғанған кезде синтетикалық жолмен жасауға болады. Мұндай біртұтас молекулалар жалғыз бағыттаушы РНҚ (sgRNA) деп аталады (2-сурет).



Қос тізбекті үзілістерді жасау

Көптеген CRISPR-Cas эксперименттерінде Cas9 бактериялар мен археяларда секілді ДНҚ-да DSB құру арқылы генді өңдеуді жеңілдетеді (3-сурет). DSB генерациясы CRISPR өңдеу жолындағы бастапқы қадам болып табылады. Кейінгі репарация механизмі гендік редакциялау түрін анықтайды және өңдеудің қажетті нәтижесіне әсер етеді.



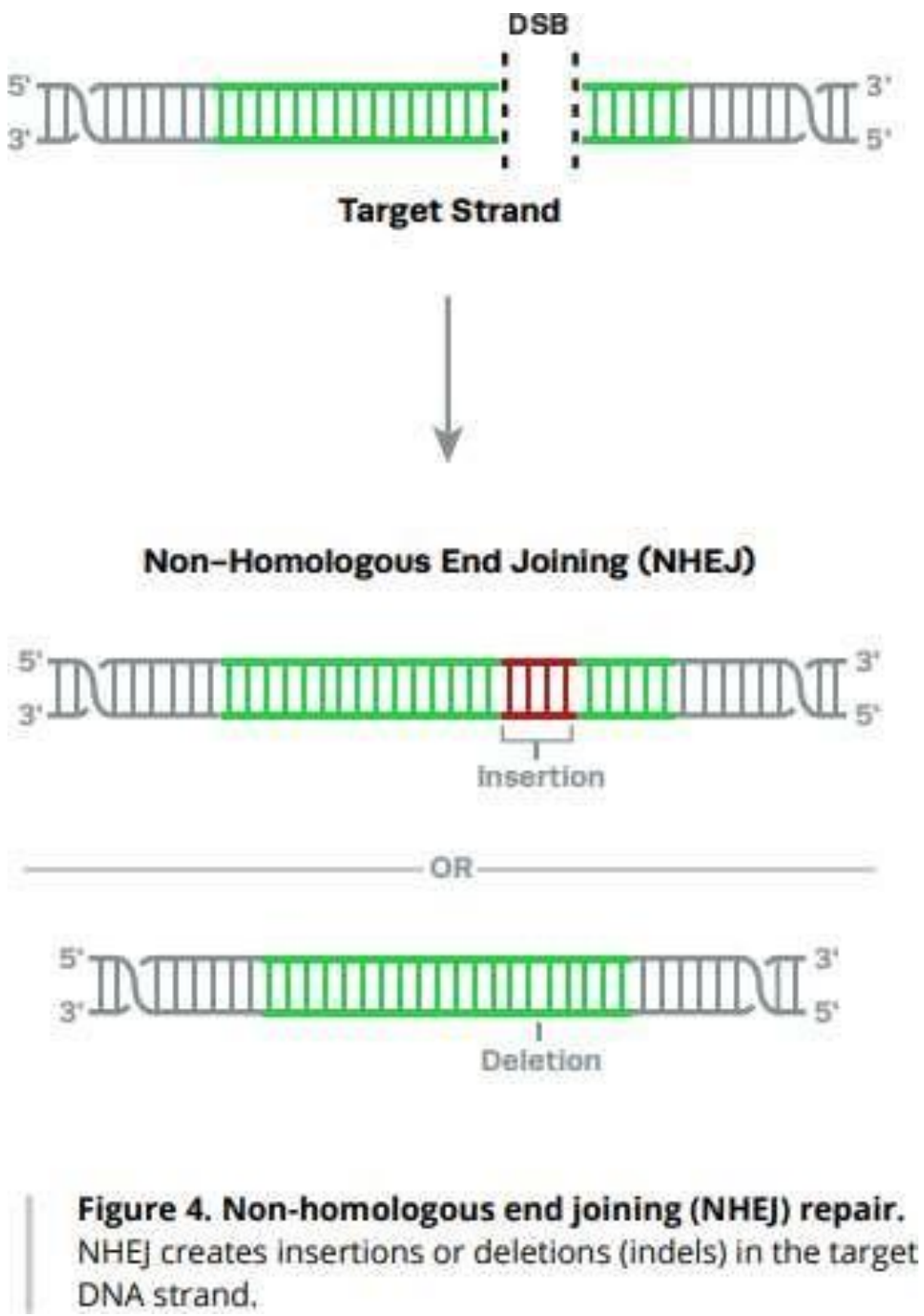


Figure 4. Non-homologous end joining (NHEJ) repair. NHEJ creates insertions or deletions (indels) in the target DNA strand.

CRISPR индукцияланған үзілістерді жөндеу

• Жоғарыда сипатталғандай, CRISPR геномның белгілі бір жерлерінде DSB түзілуіне ықпал етеді. Дегенмен, бұл әрекет өздігінен генді өңдеуге әкелмейді. Керісінше, саңылауларды жөндеу процесі мақсатты гендегі өзгерістерге мүмкіндік береді. DSB туындағаннан кейін жасушада ДНҚ репарациялау механизмдері автоматты түрде іске қосылады.

Гомологты емес соңдарды біріктіру (NHEJ)

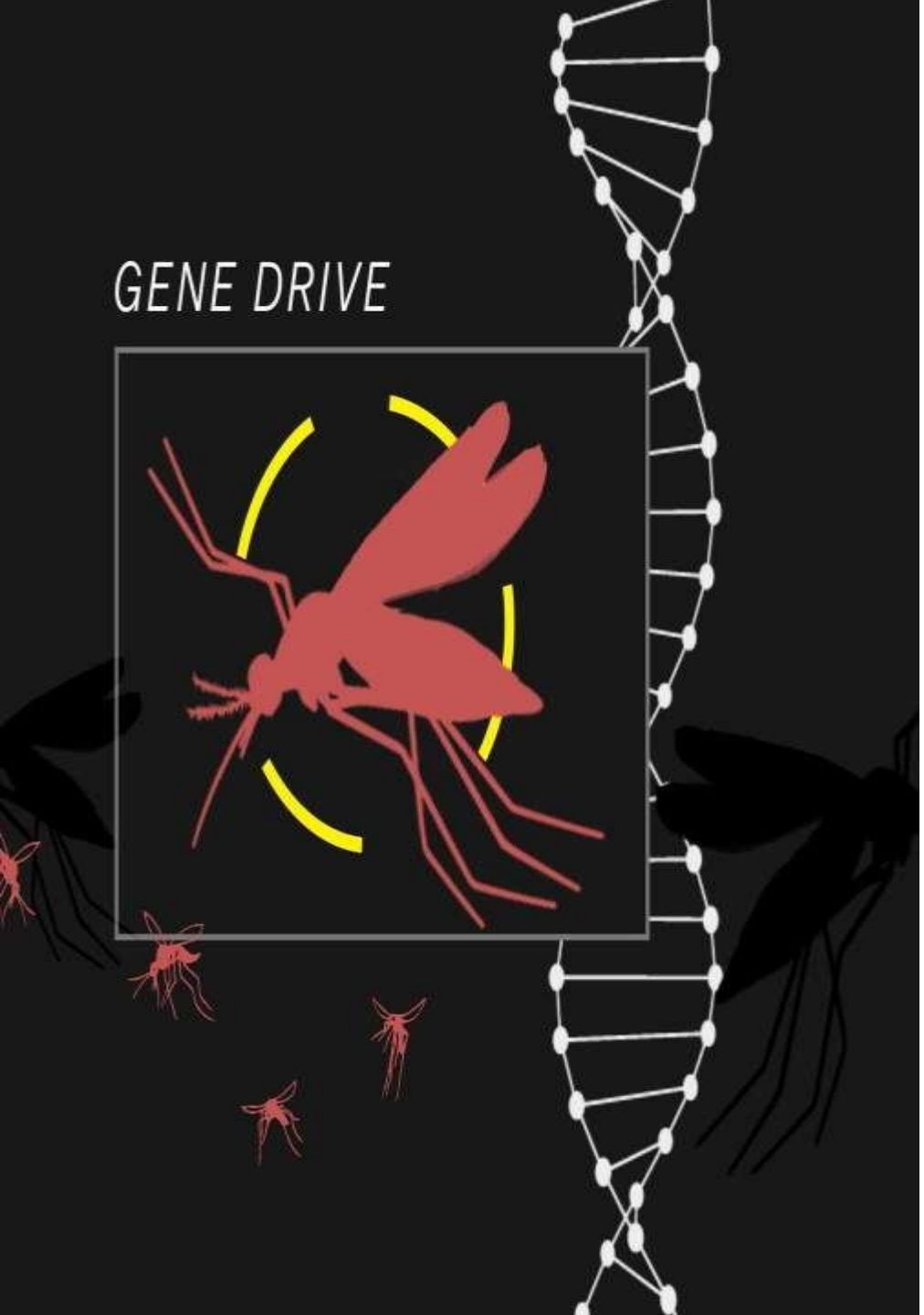
• Егер тәжірибенің мақсаты функционалды ақуыз түзілмейтіндей (нокаут) генді біржолата бұзу болса , онда гомологты емес соңдарды біріктіру (NHEJ) қолданылады (4-сурет, сол жақта). NHEJ ДНҚ-ның ұштарын қайтадан біріктіреді, бірақ ол қателесуге бейім және нуклеотидтерді енгізе немесе алып тастай (индель деп аталады) алады. Егер енгізілген немесе жойылған нуклеотидтер саны үшке бөлінбесе, бұл фреймдік мутацияны тудырады және нәтижесінде алынған ақуыздың жұмысын тоқтатуы мүмкін.


CRISPR-Cas9 қолданылуы
1
Медицина және ауруларды емдеу
2
Ауыл шаруашылығы және мәдени өсімдіктерді жақсарту
3
Организмдердің дамуы мен қызметін зерттеу
4
Терапия және генетикалық материалды өңдеу
5
Биотехнологиялық және индустриялық өнеркәсіп

Қандай мақсатта қолданады?

- **зерттеу үшін**

Егер Cas9 бір нуклеаза доменінен айырылса, онда ақуыз никазаға айналады (nCas9) — тек бір ДНҚ тізбегін кесіп тастайды, ал егер бірден екеуінен айырылса, онда ақуыз инактивацияланады немесе "өлі" болады (dead, dCas9). Мұндай ақуыз ештеңені кеспейді, бірақ CRISPR-dCas9 жүйесін гендердің тұтас жиынтығын репрессиялау үшін немесе неғұрлым күрделі реттеуші және өзгертуші кешендерді жобалау үшін платформа ретінде пайдалануға болады. Мысалы, егер оған белсендіруші домен байланыстырылса, онда мақсатты гендердің экспрессиясы белсендіріледі. Қажетті аймақтарды эпигенетикалық модификациялау үшін модификация доменін қосу жеткілікті. DCas9-ны флуоресцентті ақуыздармен белгілеу арқылы хромосомалардың әртүрлі аймақтарын елестетуге болады.



- **Жануарлар тасымалдайтын инфекциялардың таралуын бақылау үшін**

Мысалы, безгек масаларының табиғи популяцияларына плазмодийге төзімділік гендерін немесе популяцияны бақылау гендерін енгізу туралы ойлануда. Бұл классикалық тұқымқуалауды өзгертуге негізделген "gene drive" технологиясының арқасында түбегейлі мүмкін болды. Оның көмегімен бір дараға енгізілген ген бүкіл популяцияға тез таралады. Технология принципін дрозофилалардағы мутагендік тізбекті реакция көрсетеді.

- **ауылшаруашылық жануарлары мен өсімдіктерінің қасиеттерін жақсарту үшін**

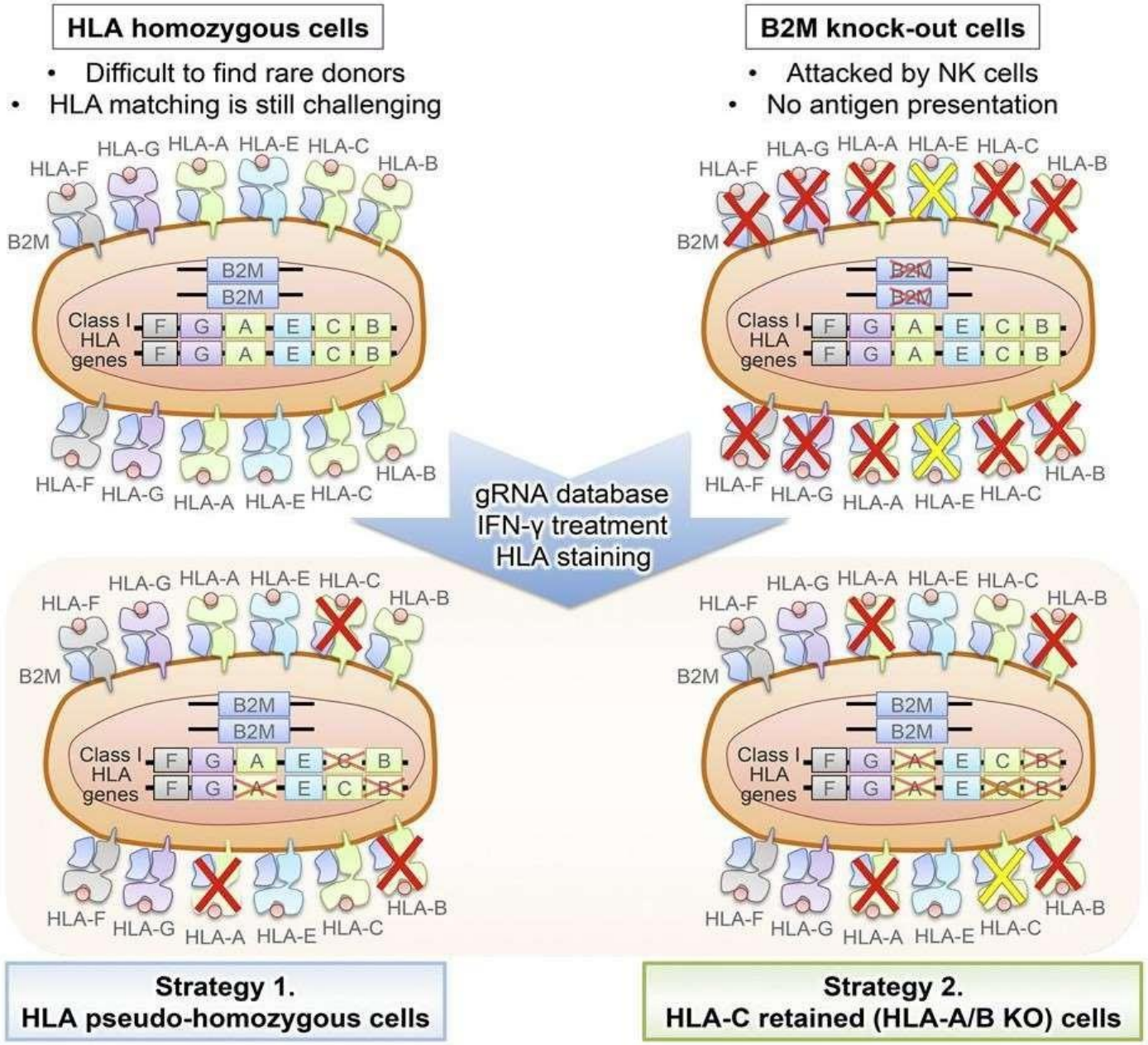
күріш, бидай, жүгері, құмай және басқа да көптеген дақылдарға арналған CRISPR жүйелерін жасап, сынап көрді. Азық — түлік сапасын жақсартудан басқа, мұндай құралдармен дақылдарға зиянкестер мен химиялық заттарға төзімділік беру оңай, ал жануарларды қажетсіз гендерден арылту оңай. Мысалы, жақында шошқа жасушаларында эндогендік ретровирустар инактивацияланды.

- **терапия үшін**

Тұқым қуалайтын аурулар туралы айтатын болсақ, жасуша дақылдарындағы немесе жануарлар үлгілеріндегі CRISPR-Cas9 орақ жасушалы анемия мен β-талассемия, M2ds синдромы және Дюшен миодистрофиясы, муковисцидоз (адамның ішек дің жасушаларындағы мутантты CFTR локусы түзетілді) және тирозинемия, катаракта (тышқандарда Crygc геннің басым мутациясы жойылды) және пигментті ретинит.



гепатит және АИТВ инфекциясы сияқты созылмалы вирустық аурулармен күресу. Егер қоздырғыш организмде провирус түрінде сақталса (жасушалық геномға енгізілген вирустық ДНҚ), онда оны жай кесіп тастауға болады. Адам лимфоциттерін АИТВ-дан арылтып, АҚШ-тың биологтар тобы жақсы нәтижеге жетті.



CRISPR-Cas9 көмегімен HLA гендерінің бағытталған жойылуы иммундық үйлесімділігі жоғары IPSC жасайды

Қорытынды

CRISPR/Cas – геномның белгілі бір аймақтарын нысаналы өзгертуге мүмкіндік беретін заманауи молекулалық-генетикалық технология. Бұл жүйе бастапқыда бактериялар мен археялардың вирустарға қарсы қорғаныс механизмі ретінде қалыптасқан.

CRISPR/Cas9 жүйесінің негізгі компоненттері – Cas9 эндонуклеазасы, бағыттаушы РНҚ (gRNA) және PAM тізбегі. Бағыттаушы РНҚ Cas9 ферментін қажетті ДНҚ аймағына бағыттайды, ал Cas9 нысаналы аймақта қос тізбекті үзіліс түзеді.

ДНҚ-ның қос тізбекті үзілістері NHEJ және HDR репарация механизмдері арқылы қалпына келтіріледі. NHEJ нәтижесінде инсерциялар мен делециялар пайда болуы мүмкін, ал HDR сәйкес донорлық ДНҚ үлгісі болған жағдайда нысаналы өзгерістер енгізуге мүмкіндік береді.

Cas9 ферментінің модификацияланған нұсқалары, соның ішінде nCas9 және dCas9, геномды редакциялау мүмкіндіктерін кеңейтеді. Олар ДНҚ-ны өзгерту, ген экспрессиясын реттеу және молекулалық зерттеулер жүргізу үшін қолданылады.

CRISPR/Cas технологиясы тұқым қуалайтын ауруларды емдеуде, жасушалық модельдер жасауда, ауыл шаруашылығы дақылдарының қасиеттерін жақсартуда және биотехнологиялық зерттеулерде маңызды орын алады. Сонымен қатар, нысанадан тыс өзгерістер, геномдық қауіпсіздік және этикалық мәселелер бұл технологияны қолдануда мұқият бағалауды талап етеді.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар:

1. CRISPR/Cas технологиясы дегеніміз не және оның негізгі қызметі қандай?
2. CRISPR/Cas жүйесінің ашылу тарихындағы негізгі ғылыми кезеңдерді атаңыз.
3. CRISPR/Cas9 жүйесінің негізгі компоненттері қандай және олардың қызметтері неде?
4. Бағыттаушы РНҚ (gRNA) мен PAM тізбегінің айырмашылығы қандай?
5. Cas9 эндонуклеазасы ДНҚ-ның нысаналы аймағын қалай анықтайды және кеседі?
6. NHEJ және HDR репарация механизмдерінің негізгі айырмашылықтары қандай?
7. Cas9, nCas9 және dCas9 ферменттерінің функционалдық ерекшеліктері қандай?
8. CRISPR/Cas технологиясы медицинада және гендік терапияда қандай мақсаттарда қолданылады?
9. CRISPR/Cas технологиясының ауыл шаруашылығы мен биотехнологиядағы қолданылу мүмкіндіктері қандай?
10. Геномды редакциялау технологияларын қолдануда қандай қауіпсіздік және этикалық мәселелер туындайды?

Пайдаланылған әдебиеттер

1. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science, 337*(6096), 816–821. https://doi.org/10.1126/science.1225829
2. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science, 339*(6121), 819–823. https://doi.org/10.1126/science.1231143
3. Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell, 157*(6), 1262–1278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010
4. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science, 346*(6213), 1258096. https://doi.org/10.1126/science.1258096
5. Komor, A. C., Badran, A. H., & Liu, D. R. (2017). CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell, 168*(1–2), 20–36. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044