

CRISPR/CAS – АДАПТИВНА ІМУННА СИСТЕМА У БАКТЕРІЙ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ У РЕДАГУВАННІ ГЕНОМІВ

Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара (м. Дніпро)

diana40adp@gmail.com

2434868@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дана робота виконана у рамках науково-дослідної теми «Біологічні основи функціонування мікробіоценозів навколишнього середовища та організму людини (№ державної реєстрації 0119U100097), що виконується на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського університету імені Олеся Гончара.

Вступ. Вперше технологія CRISPR виникла в рамках проекту фундаментальних досліджень, метою яких було вивчення того, як бактерії захищаються від проникнення вірусів. Було встановлено, що в клітинах багатьох бактерій існує адаптивна імунна система – CRISPR, що дозволяє їм виявляти та знищувати чужорідну і, перш за все, вірусну ДНК.

На сьогодні технологію CRISPR/Cas9 вважають значним проривом в біології, оскільки вона дозволяє високо точно, економічно та швидко редагувати, нокаутувати та вирізати ділянки генів і навіть цілі гени, що несуть злякисні мутації або ознаки генетичних хвороб, а також замінювати їх на нормальні або корисні для організму.

CRISPR/Cas дозволяє модифікувати метаболічні шляхи еукаріот і прокариот, створювати штами технологічно важливих бактерій, стійких до різних факторів. CRISPR/Cas вже успішно застосовується в генній інженерії багатоклітинних організмів. CRISPR/Cas-технологія може бути застосована для отримання модифікованих тварин і культур рослин. Це дає можливість ученим відкривати нові біотехнологічні стратегії.

Мета роботи: аналіз літературних джерел стосовно CRISPR/Cas9-системи, механізмів її функціонування у бактерій, перспектив та можливостей застосування у редагуванні геномів.

Вперше локус CRISPR, який являє собою повторовані генетичні елементи розділені варіабельними спейсерами, був винайдений у геномі *Escherichia coli* в 1987 р. групою японських вчених на чолі з Йосідзумі Ісіно в університеті Осаки. Перше наукове повідомлення про CRISPR було зроблено ними в 1989 р. у журналі «Journal of bacteriology» [1]. Втім, вчені не надали даному явищу великого значення. Масштабне вивчення CRISPR почав іспанський дослідник Франциско Мохіка, який у 1993 р. також виявив повторювані послідовності, розділені проміжками, в геномі археї *Haloferax mediterranei*. Вчений назвав новий клас послідовностей ДНК «короткі паліндромні повтори регулярно розташовані групами» (від англ. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Мохіка продовжив пошуки CRISPR у геномах інших мікробів і до 2000 р. виявив їх у 20 мікроорганізмів, в тому числі, у чумної палички (*Yersinia pestis*) та ін. [2]. Було зроблено припущення, що подібні за структурою по-

втори, наявні навіть у віддалених груп мікробів, мають виконувати якусь дуже важливу функцію [3].

Отримані різними групами вчених дані дозволили встановити, що локус CRISPR – частина рані невідомого механізму, який спрямований на захист бактерій і архей від чужорідної ДНК і є проявом адаптивного імунітету мікроорганізмів проти ураження вірусами [4].

Типові локуси CRISPR складаються з декількох несуміжних прямих повторів, розділених спейсерами – ділянками варіабельних послідовностей ДНК. Ці спейсери представляють собою сегменти захоплених вірусних або плазмідних послідовностей і мають високу швидкість еволюції [5].

CRISPR-повтор, зазвичай, містить 23-47 пар основ, а спейсер – 21-72 пари. Число груп «повтор/спейсер» може сягати 375, але зазвичай менше 50 [6]. Бактерії можуть містити більше одного локусу CRISPR. Очевидно, кожний локус забезпечує захист від одного певного вірусу. У археї *Methanocaldococcus jannaschii* було ідентифіковано 18 локусів, які складають більш, ніж 1% генома. Зазвичай CRISPR знаходяться в бактеріальній хромосомі, але можуть бути розташовані і в плазмідній ДНК [7].

У 2002 р. були відкриті також cas-гени локусів CRISPR, які зібрані в оперони, що за складом та функціями мають відмінності у різних бактерій. Вони кодуєть синтез Cas-білків – ферментів, що беруть участь у розщепленні чужорідних вірусних ДНК. Кодовані cas-генами ферменти формують велику та неоднорідну родину білків. Серед них виділяють 2 класи, 5 типів і 16 підтипів [8,9]. Системи I класу представлені мультибілковими ефекторними комплексами (Cascade, Csm, Csm) і включають системи типів I (найбільш поширені), III і IV. Системи II класу мають єдиний ефекторний білок і представлені типом II – Csn1 (або Cas9), Csn2 і типом V – Cpf. Системи типу II активно використовують у генній інженерії. Кожний Cas-білок 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, які кодується згаданими cas-генами, є поліфункціональними і здатні виконувати функції всіх перелічених вище ферментів [10]. На **рис. 1** зображена молекулярна структура білка Cas9, виділеного із клітин *Streptococcus pyogenes*. Він складається із 5 доменів (REC I, REC II, HNH, RuvC, PAM) і з'єднуючої місткової спіралі (Bridge Helix) [11,12].

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-interacting 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. Вони гомологічні доменам HNH і RuvC, винайденим в інших білках [11-14].

Як видно з **рис. 2**, у розпізнаванні чужорідної ДНК CRISPR-системою важливу роль грає керуюча РНК (сРНК, 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. Вибірковість Cas9 є наслідком комплементарності керуючої РНК і ДНК-мішені. Для нових ДНК-мішеней можливе вироблення специфічних Cas-білків [11,13,14,15].

В останні роки робляться спроби розшифрувати складний механізм знищення чужорідної ДНК за участю CRISPR/Cas-системи. На **рис. 3** відображений механізм дії CRISPR/Cas-системи при інвазії вірусної або плазмідної ДНК в клітину бактерії *Streptococcus thermophilus* [16,17]. На першій стадії А (Імунізація) активується Cas2 і розщеплює чужорідну ДНК. Утворюється новий спейсер – наприклад, фрагмент вірусної ДНК, що вбудовується в CRISPR-касету. При повторному попаданні вірусу в клітину бактерії (стадія В, Імунітет) відбувається транскрипція на матриці CRISPR-касети з утворенням мРНК, яка несе в собі інформацію про всі спейсери касети. В результаті процесингу під дією Cas2 мРНК гідролізується з утворенням окремих молекул РНК, серед яких вже є РНК-гід для виявлення вірусу, що проник у клітину.

За допомогою специфічного РНК-гіда відбувається націлювання Cas1 на вірусну ДНК, у результаті чого відбувається її деградація. Таким чином формується адаптивний імунітет проти даного вірусу. За допомогою специфічного РНК-гіда відбувається націлювання Cas1 на вірусну ДНК, у результаті чого відбувається її деградація. Таким чином формується адаптивний імунітет проти даного вірусу. Слід відмітити, що Cas1 кодується усіма відомими бактеріальними оперонами.

CRISPR/Cas-система не тільки забезпечує адаптивний імунітет проти чужорідних генетичних елементів, але й діє як обмежувач горизонтального переносу генетичної інформації (вірусів, плазмід, транспозонів) між різними бактеріальними клітинами. Система CRISPR може брати активну участь у регуляції експресії «своїх» бактеріальних генів, а також послідовностей профагів і транспозонів у складі генома. Не виключено, що система CRISPR пригнічує у бактерій вироблення деяких антигенів, що допомагає їм послабити імунну відповідь з боку макроорганізму господаря [18].

Білок Cas9 може виявляти та розщеплювати чужорідні ДНК-мішені як в природних, так і в штучно створених системах CRISPR/Cas, тобто його можна розглядати як інструмент редагування генома. Була визначена можливість застосування Cas9 в генно-ін-

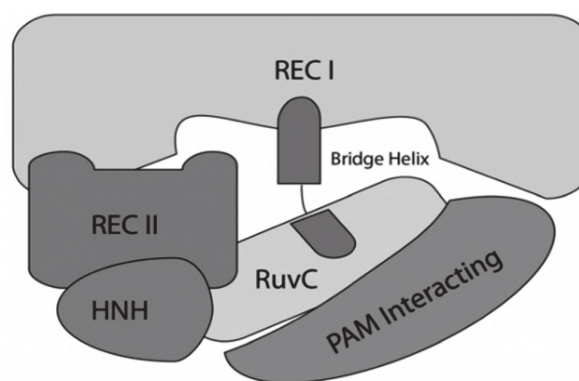


Рис. 1. Схема будови білка Cas9 у *S. pyogenes* [11,12].

женерній технології, що дозволить вченим видаляти та вставляти фрагменти ДНК всередину клітин з неімовірною точністю. Для розрізання ДНК, як *in vivo* (у бактерій), так і в умовах *in vitro* з використанням CRISPR/Cas9 необхідні наступні компоненти: РНК-

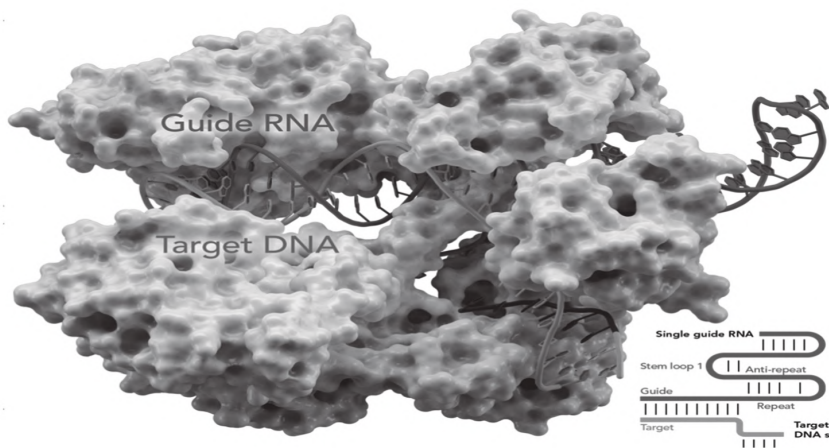


Рис. 2. Кристалічна структура Cas9 у комплексі з РНК-гідом та цільовою ДНК-мішенню у *Staphylococcus aureus* [15].

за III, білок Cas9, CRISPR-РНК (сrRNA) та транскрипційна РНК (tracrRNA помічники для пре-сРНК). Для спрощення використання CRISPR/Cas9 була створена єдина химерна керуюча РНК [18,19].

Загальна стратегія редагування генома включає чотири основні етапи:

1) вибір цільової послідовності в геномі; 2) створення нуклеазної конструкції, спрямованої на обрану мішень; 3) доставка цієї конструкції в клітинне ядро; 4) аналіз отриманих мутацій [19].

Один з найважливіх етапів у даній технології – вибір сайтів для специфічного внесення дволанцюгового розриву. Тут слід уникати повторюваних сайтів (щоб розрізати ДНК тільки в певному місці), а також ділянок, які мають високу гомологію з іншими ділянками геному і тому сильно схожих на цільовий сайт [20].

Відомо, що ендонуклеаза Cas9 реагує на присутність PAM (*protospacer adjacent motif*) з мотивом 5'-NGG-3', де N – будь-який з 4 нуклеотидів. 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. CRISPR/Cas у *Neisseria meningitidis* розпізнає PAM з довгим кон-

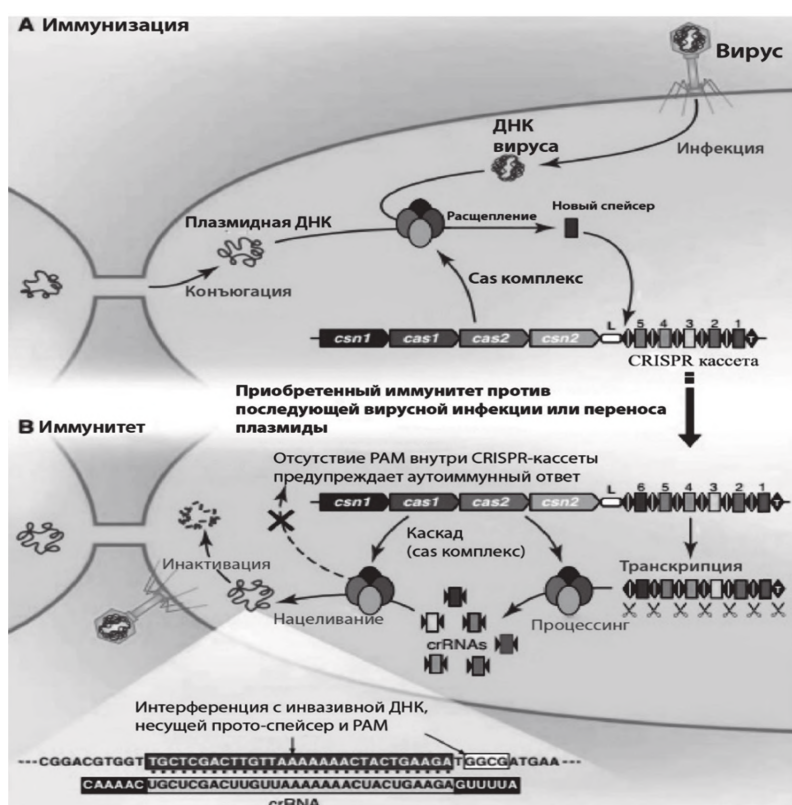


Рис. 3. Схема формирования иммунитета за допомогою системи CRISPR у *Streptococcus thermophilus* при інвазії плазмідної або вірусної ДНК [16,17].

сенсусом 5'-NNNNGATT-3'. Це обмежує можливості у виборі мішені, проте підвищує специфічність її розпізнавання і знижує ймовірність нецільових мутацій. Для пошуку потрібних сайтів пропонується застосування біоінформатики [21].

Варіанти Cas9, які пов'язують ДНК, але не розщеплюють її (dCas9), можуть бути використані для доставки активаторів або репресорів транскрипції до специфічних послідовностей ДНК з метою регулювання транскрипційної активації та репресії [17,18,19].

У даний час методи CRISPR/Cas9 використовуються в генній інженерії різних організмів, як прокариот [22], так і одноклітинних та багатоклітинних еукаріот. Так, шляхом редагування гену риса, який відповідає за довжину і колір проростка, були отримані карликові альбіноси [23].

За допомогою CRISPR/Cas9 вже отримані геномодифіковані рослини: рис, соя, пшениця, кукурудза, томати, апельсини. Досліджуються можливості CRISPR/Cas9 для створення противірусного імунітету рослин [24].

Ведуться роботи з редагування геномів за допомогою CRISPR/Cas у великої рогатої худоби, свиней та інших тварин, що мають важливе господарське значення, наприклад, бджіл [25-27]. У листопаді 2015 року було опубліковано результати експерименту, в ході якого за допомогою технології CRISPR/Cas в геномі свині були разом інактивовані 62 ендегенні ретровіруси. Завдяки цьому в майбутньому стане можливою ксенотрансплантація органів від свині до людини [28]. Розроблено методи редагування геномів за допомогою CRISPR/Cas для модельних організмів. Технологія CRISPR вже використовується для зміни ДНК в клітинах мишей, мавп та інших організмів. Технологию використовують для внесення дуже точних змін ДНК, що дозволяє вивчати їх вплив на тканину та на весь організм. Так, точкова заміна ділянки певного гена призвела до зміни кольору шерсті мишей [29].

Методи, засновані на CRISPR/Cas9, можуть знайти застосування і в медицині для лікування різних захворювань: вірусних, імунологічних (автоімунних, алергії, імунодефіцитів), онкологічних, серцево-судинних захворювань, спадкових розладів – таких, як синдром Дауна, β-таласемія, серповидноклітинна анемія, пігментний ретиніт тощо [30-33]. У 2013 році з'явилася публікація [34] з повідомленням про редагування аномального гену в стовбурових клітинах пацієнта, хворого на муковісцидоз.

28 листопада 2018 р. у The New York Times з'явилось повідомлення про те, що китайським вченим під керівництвом Хе Цзянькуя вдалося за допомогою CRISPR/Cas9 штучно створити стійких до зараження ВІЛ людей. У 2-х дівчинок-близнят було проведено редагування генома з метою зміни гена білку CCR5. Останній є корецептором TCR у Т-хелперів і відповідає за зв'язування з капсидним вірусним білком gp120, що забезпечує проникнення вірусу всередину імунної клітини і блокує імунну відповідь.

Вчені прагнуть розширити розуміння того, як можна контролювати спосіб відновлення ДНК після її розриву, і з'ясувати, як можна контролювати і обмежувати нецільові впливи, або ненавмисні ефекти при використанні цієї технології [35]. Можливість здійснювати редагування генома викликає і різні етичні питання, які потрібно ретельно розглянути. І це накладає на всіх вчених велику відповідальність і необхідність враховувати як небажані наслідки, так і роль навмисного впливу цього наукового прориву [1].

Висновки. CRISPR/Cas система вперше виявлена у бактерій як система адаптивного імунітету проти інвазії вірусів та інших генетичних елементів. CRISPR складається з декількох прямих повторів, розділених спейсерами – ділянками варіабельних послідовностей ДНК. Cas-гени локусів CRISPR, зібрані в оперони. Вони кодують синтез Cas-білків – ферментів, що беруть участь у розщепленні чужорідних вірусних ДНК. Кожний Cas-білок є поліфункціональним і містить декілька доменів: типових ендонуклеаз, хеліказ, полімераза, ДНК-зв'язуючих білків. Вибірковість дії Cas-білків забезпечується PNH-гідом, що є комплементарним ДНК-мішені.

Перспективи подальших досліджень. На сьогодні технологію CRISPR/Cas9 вважають значним проривом в біології, оскільки вона дозволяє точно та швидко редагувати ділянки генів і навіть цілі гени, завдяки чому відкриваються перспективи для терапії важких спадкових, онкологічних, інфекційних (в тому числі СНІД), серцево-судинних хвороб, вад розвитку, а також для створення геномодифікованих організмів з корисними ознаками.

Література

- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 1987;169(12):5429-33. DOI: 0021-9193/87/125429-05\$02.00/0
- Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell*. 2016;164(1-2):18-28. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.041
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005;60(2):174-82. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3
- Datsenko K, Pougach K, Tikhonov A. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR. Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat. Commun.* 2012;3:945. DOI: 10.1038/ncomms1937
- Ki Hyun Nam, Fran Ding, Charles Haitjema, Qingqiu Huang, Matthew PDe Lisa, Ailong Ke. Double-stranded Endonuclease Activity in *Bacillus halodurans* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) – associated Cas2 Protein. *J. Biol. Chem.* 2012;287(43):35943-52. DOI: 10.1074/jbc.M112.382598
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-70. DOI: 10.1126/science.1179555
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21. DOI: 10.1126/science.1225829
- Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biology*. 2015;16:247-57. DOI: 10.1186/s13059-015-0816-9
- Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1311:47-75. DOI: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4
- Makarova S. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467-77. DOI: 10.1038/nrmicro2577
- Jinek M, Jiang F, Taylor DW. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014;343(6176):1247997. DOI: 10.1126/science.1247997
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-49. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.001
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-7. DOI: 10.1038/nature13011
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Martin J. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. 2014;513(7519):569-73. DOI: 10.1038/nature13579
- Hiroshi Nishimasu, Le Cong, Winston XYan, Ryuichiro Ishitani, Feng Zhang, Osamu Nureki, et al. Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*. 2015;162(5):1113-26. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.007
- Garneau JE, Dupuis M, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. 2010;468(7320):67-71. DOI: 10.1038/nature09523
- Erik J. Sontheimer and Luciano A. Marraffini. MICROBIOLOGY: Slicer for DNA. *Nature*. 2010;468(7320):45-6. DOI: 10.1038/468045a
- Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, Tzeng YL, Weiss DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature*. 2013;497(7448):254-7. DOI: 10.1038/nature12048
- Nemudryiy AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakiyan SM. Sistemyi redaktirovaniya genomov TALEN i CRISPR/Cas – instrumentyi otkryitiy. *Acta naturae*. 2014;3(22):20-42. [in Russian].
- Mali Prashant, Esvelt Kevin M, Church George M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*. 2013;10(10):957-63. DOI: 10.1038/nmeth.2649
- Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*. 2014;32(12):1262-7. DOI: 10.1038/nbt.3026
- Mojica F, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733-40. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0
- Elizabeth Pennisi. The CRISPR Craze. *Science*. 2013;341(6148):833-6. DOI: 10.1126/science.341.6148.833
- Zaidi SS, Tashkandi M, Mansoor S, Mahfouz MM. Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance. *Frontiers in plant science*. 2016;7:1673. DOI: 10.3389/fpls.2016.01673
- Wang Zhongde. Genome engineering in cattle: recent technological advancements. *Chromosome Research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2015;23(1):17-29. DOI: 10.1007/s10577-014-9452-6
- Niemann H, Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Research*. 2016;25(3):361-74. DOI: 10.1007/s11248-016-9934-8
- Kohno H, Suenami S, Takeuchi H, Sasaki T, Kubo T. Production of Knockout Mutants by CRISPR/Cas9 in the European Honeybee, *Apis mellifera* L. *Zoological science*. 2016;33(5):505-12. DOI: 10.2108/zs160043
- Yang Luhan, Güell M, Niu Dong, George H, Lesha E, Grishin D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 2015;350(6264):1101-4. DOI: 10.1126/science.aad1191
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;154(6):1370-9. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.022
- Goodman MA, Moradi Manesh D, Malik P, Rothenberg ME. CRISPR/Cas9 in allergic and immunologic diseases. Expert review of clinical immunology. 2016;13(1):5-9. DOI: 10.1080/1746666X.2017.1241711
- Borges TJ, Murakami N, Riella LV. Current status of alloimmunity. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2016;25(6):556-62. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000267
- Yin Hao, Xue Wen, Chen Sidi, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*. 2014;32(6):551-3. DOI: 10.1038/nbt.2884
- Yang Y, Zhang X, Yi L, Hou Z, Chen J, Kou X, et al. Naive induced pluripotent stem cells generated from β -thalassemia fibroblasts allow efficient gene correction with CRISPR/Cas9. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(1):8-19. DOI: 10.5966/sctm.2015-0157
- Schwank G, Koo Bon-Kyoung, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):653-8. DOI: 10.1016/j.stem.2013.11.002
- Jakočiūnas T, Jensen MK, Keasling JD. CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metabolic Engineering*. 2016;34:44-59. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.12.003

CRISPR/CAS – АДАПТИВНА ІМУННА СИСТЕМА У БАКТЕРІЙ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ У РЕДАГУВАННІ ГЕНОМІВ

Сорока Д. С., Соколова І. Є., Гаврилюк В. Г., Скляр Т. В.

Резюме. У даному огляді літератури розглянуті структурно-функціональні особливості та механізм дії системи CRISPR/Cas системи у бактерій, яка визнана системою адаптивного імунітету бактерій проти інвазії віру-

сів та інших генетичних елементів. CRISPR/Cas9 складається з певного фрагменту ДНК, де повтори чергуються зі спейсерами, в якості яких виступають ДНК різних вірусів та плазмід. З CRISPR-блоком зв'язані cas-гени. Вони кодуєть серію Cas-білків (в тому числі Cas9) – поліфункціональних ферментів з декількома активностями (нуклеазною, хеліказною, полімеразною та ін.), що здатні руйнувати чужорідні ДНК. Природний Cas9 може застосовуватись і в штучних системах, але вимагає участі РНК-гіда, який знаходить чужорідну ДНК-мішень завдяки компліментарності та націлює на неї Cas9. Останній спричиняє деградацію ДНК-мішені. Показана можливість застосування CRISPR/Cas системи в генній інженерії для отримання геномодифікованих рослин рису, сої, пшениці, кукурудзи, томатів, цитрусових. Описані спроби застосування CRISPR/Cas для редагування геномів при генетичних, онкологічних, серцево-судинних, інфекційних хворобах.

Ключові слова: CRISPR/Cas9, редагування геномів, імунітет бактерій проти вірусів, РНК-гід, Cas-гени, Cas9.

CRISPR/CAS – АДАПТИВНАЯ ИММУННАЯ СИСТЕМА У БАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЁ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕДАКТИРОВАНИИ ГЕНОМА

Сорока Д. С., Соколова И. Е., Гаврилюк В. Г., Скляр Т. В.

Резюме. В данном обзоре литературы рассмотрены структурно-функциональные особенности и механизм действия системы CRISPR/Cas у бактерий, которая признана системой адаптивного иммунитета бактерий против инвазии вирусов и других генетических элементов. CRISPR/Cas состоит из определенного фрагмента ДНК, где повторы чередуются со спейсерами, в качестве которых выступают ДНК различных вирусов и плазмид. С CRISPR-блоком связаны CAS-гены. Они кодируют серию Cas-белков (в том числе Cas9) – полифункциональных ферментов с несколькими активностями (нуклеазной, хеликазной, полимеразной и др.), которые способны разрушать чужеродные ДНК. Природный Cas9 может применяться и в искусственных системах, но требует участия РНК-гида, который находит чужеродную ДНК-мишень благодаря комплементарности и нацеливает на нее Cas9. Последний приводит к деградации ДНК-мишени. Показана возможность применения CRISPR/Cas9-технологии в генной инженерии для получения геномодифицированных растений риса, сои, пшеницы, кукурузы, томатов, цитрусовых. Описаны попытки применения CRISPR/Cas для редактирования геномов при генетических, онкологических, сердечно-сосудистых, инфекционных заболеваниях.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, редактирование геномов, иммунитет бактерий против вирусов, РНК-гід, Cas-гены, Cas9.

CRISPR/CAS – ADAPTIVE IMMUNE SYSTEM IN THE BATTERIES AND THE PENOMENES OF ITS APPLICATION IN THE EDITING OF GENES

Soroka D. S., Sokolova I. Y., Gavrilyuk V. G., Sklyar T. V.

Abstract. Today CRISPR / Cas9 technology is considered a significant breakthrough in biology, since it allows high-precision, cost-effective and quick editing, knock-out and cutting of genes and even genomes. For the first time, the CRISPR locus, which is a repeat genetic element separated by variable spacers, was invented in the *E. coli* genome in 1987 by a group of Japanese scientists led by Yoshizuki Isino at the University of Osaka (Journal of bacteriology, 1989). In 1993, the same genetic elements were discovered by the Spanish researcher F. Mojica in the genome of the Archaea *Haloferax mediterranei* and named their DNA Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Until 2000, Mojica found their presence in 20 microorganisms, including *Yersinia pestis*. It has been found that the CRISPR locus is part of an unknown mechanism that aims to protect against foreign DNA and is an expression of the adaptive immunity of microorganisms against viruses.

Typical CRISPR locus consist of several direct repeats separated by spacers – regions of variable DNA sequences. The CRISPR repeat contains 23-47 pairs of bases, and the spacer is 21-72 pairs. The number of “repeat / spacer” groups can reach 375, but often less than 50. The bacteria usually contain several CRISPR loci. Each locus provides protection against a particular virus. In the archaea, *Methanocaldococcus jannaschii* identified 18 loci (1% genome). CRISPRs are in the chromosome or in the plasmid DNA.

In 2002, the operon with cas-genes in CRISPR locus were also discovered. They encode the synthesis of Cas-proteins – enzymes involved in the splitting of foreign DNA of viruses. Each Cas-protein carries several domains: typical nucleases, helicase, polymerases, DNA-binding proteins. This Cas-proteins are polyfunctional and capable of performing all of these enzymes.

The Cas9 protein isolated from *Streptococcus pyogenes* cells consists of 5 domains (REC I, REC II, HNH, RuvC, RAM) and the additional Bridge Helix. Rec I is responsible for binding RNA Guide, REC II has not yet been sufficiently studied; Bridge Helix initiates DNA splitting when bound to a target DNA. The PAM-interacting domain provides the specificity of PAM and is responsible for binding to a specific DNA target. HNH and RuvC are endonucleases domains that cut the DNA.

An important role in the recognition of foreign DNA by the CRISPR system is played by the RNA Guide. It, due to complementarity with the Target DNA, forms a duplex, which is recognized by the Cas9 protein and cleaved by its endonuclease activity. Cas9 allows the cleavage of any nucleotide sequence. The selectivity of Cas9 is a consequence of the complementarity of the RNA guide and DNA target.

The mechanism for the formation of adaptive immunity under the action of CRISPR/Cas-system in invasion of viral or plasmid DNA into *S. aureus* cell involves two main stages – A and B. At stage A (Immunization) Cas2 is activated and splits the foreign DNA. A new spacer is created – a fragment of viral DNA inserted in the CRISPR cassette. When a virus hits the bacterium again (stage B – Immunity), transcription is carried out on the matrix of CRISPR cassettes with formation of mRNA, which carries information about all cassette spacers. As a result of processing under action of Cas2 mRNA is hydrolyzed with formation of individual RNA molecules, among which there is already a RNA-guide

to detect the virus that penetrated the cell. With help of a specific RNA guide, Cas1 targets the viral DNA, cause it degradation. The CRISPR/Cas not only provides adaptive immunity against alien genetic elements, but also acts as a limiter for the horizontal transfer of viruses, plasmids, transposons between different bacterial cells.

CRISPR/Cas methods are used in genetic engineering of eukaryotes and prokaryotes. Thus a new variety of rice was obtained, whose sprouts look like dwarf albinos. The possibilities of introducing CRISPR/Cas systems into cultivated plants for the creation of antiviral immunity are explored. Also, the attempts to edit genomes of pigs, cattle, monkeys, mice, bees. The results of the experiment, in which 62 endogenous retroviruses were inactivated with the help of CRISPR/Cas technology in the pig genome, were published. Thanks to these results, in the future, xenotransplantation of organs from pig to person will be possible.

Methods based on CRISPR/Cas9 can also be used in medicine for treatment of various diseases: viral, immune, oncological, cardiovascular, hereditary, including Down's syndrome, sickle cell anemia, pigment retinitis, β -thalassemia and others. In 2013 there was a publication about editing an abnormal gene in stem cells of a patient with cystic fibrosis. In 2015, Chinese scientists led by Junjiu Huang have used CRISPR technology to modify human embryonic genes. The ability to edit the genome also causes various ethical issues that need to be carefully considered.

Key words: CRISPR/Cas9, edition of genome, immunity of bacteria against viruses, RNA guide, Cas-genes, Cas9.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 17.03.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-51-55

УДК 614.2.364

¹Шевчук В. І., ¹Яворовенко О. Б., ¹Беляєва Н. М., ¹Куриленко І. В., ²Андросова Н. С.

ОРГАНІЗАЦІЯ МЕДИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ В ПРОВІДНИХ КРАЇНАХ СВІТУ

¹Науково-дослідний інститут реабілітації осіб з інвалідністю

Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (м. Вінниця)

²Центр медико-соціальної експертизи Вінницької області (м. Вінниця)

reab@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Стаття є фрагментом науково-дослідної роботи «Удосконалити організаційні та методичні аспекти медико-соціальної реабілітації інвалідів з патологією внутрішніх органів», державний реєстраційний номер 0113U000672.

Вступ. В останні десятиліття у багатьох країнах світу розвивається система медичної реабілітації, спрямована на відновлення здоров'я, ліквідацію або зменшення обмежень життєдіяльності (спілкування, навчання, пересування, участі у трудовій діяльності та ін.) і максимальну інтеграцію або реінтеграцію громадян у суспільство.

За визначенням ВООЗ [1], реабілітація – це комбіноване та координоване застосування соціальних, медичних, педагогічних і професійних заходів з метою підготовки та перепідготовки індивідуума для досягнення оптимальної його працездатності.

Метою дослідження було вивчення досвіду організації медичної реабілітації хворих в провідних країнах світу.

Об'єкт і методи дослідження. Проведено аналіз літературних джерел по досвіду організації медичної реабілітації в Австрії, Бельгії, Великої Британії, Ізраїлі, Нідерландах, Франції, Індії, Німеччині, Польщі, РФ, США, Фінляндії, Чехії та Словаччині, Швеції, Японії. Використані методи: монографічний, структурно-логічний аналіз.

Результати дослідження та їх обговорення. Кожна країна в організації медико-соціальної реабілітації орієнтується, перш за все, на свої національні особливості. Слід зазначити декілька загальних особливостей, притаманних організації медичної реабілітації за кордоном:

Формами, які розповсюджені в провідних країнах світу, є [2,3,4,5]:

- стаціонарні установи: клініки реабілітації (розташовані здебільшого в курортних зонах); реабілітаційні центри: спеціалізовані та комплексні (переважно за місцем проживання); центри реабілітації на базі стаціонарних реабілітаційних установ (у великих містах); стаціонарні реабілітаційні відділення; відділення великих лікарень;

- амбулаторні установи: денні клініки, лікарні і профілакторії для хворих з хронічними захворюваннями і інвалідів, що не потребують безперервного добового нагляду; реабілітаційні консультації; центри реабілітації на базі поліклінічних реабілітаційних установ (у великих містах); амбулаторні реабілітаційні відділення (в деяких країнах саме їм надається перевага); санаторно-курортні організації; інститути та кафедри реабілітації – розвивають і пропагують ідеї реабілітації;

- інші форми організації реабілітаційного процесу: «станції відновного лікування» при поліклініках або лікарнях; реабілітаційні групи, які технічно вирішують питання реабілітації; спеціальні бригади (лікар, інструктор ЛФК тощо) забезпечені транспортом для реабілітації в домашніх умовах (в населених пунктах з певною кількістю населення); реабілітаційний сектор максимально наближений до життєвого середовища пацієнтів.

Спеціалізація центрів – проводиться в залежності від етапу реабілітації. Існують реабілітаційні центри 2-х рівнів [6,7]:

- центр I етапу – представляє практично реабілітаційну клініку, куди госпіталізуються хворі в підгострому стані, і де переважає, в основному, медична реабілітація. Проте водночас тут наявні майстерні, зали для навчання роботі на комп'ютерах, кухні, де хворі отримують елементи соціально-побутової і професійної реабілітації;