

1. Иванова В.В. Функционирование дыхательной цепи митохондрий фибробластов линии Вj в условиях глюкозного голодания и воздействия различных доз ротенона / Иванова В.В., Старостина И.Г., Мартынова Е.В., Перейра С.П., Оливейра П.Дж., Ризванов А.А. // Гены и клетки. – 2015. – № 4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/funktsionirovanie-dyhatelnoy-tsepi-mitohondriy-fibroblastov-linii-bj-v-usloviyah-glyukoznogo-golodaniya-i-vozdeystviya-razlichnyh-doz> (дата обращения: 25.03.2021).

2. Monzio Compagnoni G. et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease // *Molecular neurobiology*. – 2020. – Т. 57. – С. 2959-2980.

3. Weidling I. W., Swerdlow R. H. Mitochondria in Alzheimer's disease and their potential role in Alzheimer's proteostasis // *Experimental neurology*. – 2020. – С. 113321.

4. Gao C. et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells // *International journal of molecular medicine*. – 2018. – Т. 41. – №. 1. – С. 242-250.

УДК 577.24

**Ярошенко А.А., Степанова В.А., Комарова Л.С., Сабирьянова К.А.,
Бачура В. Д., Десятова М.А., Шуман Е.А.
КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ
РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА (CRISPR/CAS-9)**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

**Yaroshenko A.A., Stepanova V.A., Komarova L.S., Sabiryanova K.A.,
Bachura V.D., Desyatova M.A., Shuman E.A.
CLINICAL PERSPECTIVES OF HUMAN GENOME EDITING
SYSTEM (CRISPR/CAS-9)**

Department of medical biology and genetics
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: vicktoriakadulina@yandex.ru

Аннотация. В статье описывается применение системы CRISPR/Cas-9 и клинические перспективы ее применения в редактировании генома человека. А именно использование данной системы для редактирования генома у пациентов с ВИЧ-инфекцией и вирусом герпеса.

Annotation. The literature review examines the mechanism of action of genome editing through the CRISPR interaction system (from the English. clustered

regularly interspaced short palindromic repeats) - a group of regularly separated short palindromic repeats.

Ключевые слова: редактирование генома человека, CRISPR/Cas9, негомологичное соединение концов, вирусные инфекции.

Key words: human Genome Editing, CRISPR/Cas9, NHEJ (non-homologous end joining), viral infections.

Введение

В двадцатом веке генетика продолжает стремительно развиваться. Ученые раскрыли секрет редактирования генома, то есть изменения нуклеотидной последовательности ДНК, определяющие индивидуальные признаки человека.

Цель исследования – понять механизм CRISPR/Cas9 системы и обозначить преимущества и недостатки в сфере медицины и лечения человека.

Материалы и методы исследования

Действие CRISPR/Cas9 системы.

Это эволюционный метод приспособления первых бактериальных и современных форм с целью выживания и защиты от заражения вирусами. Обнаружив фрагменты чужеродной вирусной ДНК или РНК, бактерии запускают синтез собственных коротких цепочек РНК, одна из которых комплементарна вирусу [1]. Эти цепочки называются sgRNA (гидовая РНК). Они связываются со специфическим белком – Cas9, являющимся эндонуклеазой рестрикции, занимающейся разрезанием цепочки ДНК, что приводит к инактивации закодированного гена. SgRNA вместе с Cas9 перемещаются к вирусному геному, и sgRNA начинает сканировать ее целевую последовательность на точечные совпадения. По принципу комплементарности она связывается с вирусной цепочкой, в этот момент активируется рестриктаза, выполняя роль «молекулярных ножниц». Вследствие происходит нарушение целостности генетического материала вируса и его гибель. В настоящее время генетики выяснили, что процесс репарации можно проводить с целью удаления определенного гена в живой клетке. Для этого необходимо изменить sgRNA на интересующую последовательность мутантного или не идентифицированного гена. Введя Cas9 обратно внутрь клетки, он свяжется с PAM (protospacer adjacent motif) – это последовательность, варьирующаяся от 2 до 6 нуклеотидов и прилегающая к протоспейсеру. Прикрепившись, Cas9 «разрезает» нити ДНК и модификационная sgRNA по принципу комплементарности поменяется с ней местами [2].

Существует 2 эндогенных механизма восстановления двухцепочечных разрывов молекулы ДНК. Первый, *NHEJ* – белок регулирует дальнейшие действия, которые основаны либо на вставке или наоборот делеции нескольких нуклеотидов, либо с участием фермента лигазы синтезируется новый пептид. К сожалению, этот метод часто приводит к неожиданным мутациям, но он распространен больше за счет быстроты метода. Второй, *HDR* – проходит с

использованием гомологической модели на месте двойного разрыва. Значительная роль отводится сестринской хроматиде, которая идеально подходит на роль матрицы синтеза новой последовательности, обычно в конце S или G2 фаз интерфазы клеточного цикла. В отличие от NHEJ данный способ является точным и меньше склонен к случайным мутациям и ошибкам, но из-за общей сложности его реализации на практике остается мало применимым [3].

Использование в лечении вирусных инфекций (ВИЧ)

Разработки ученых в области модификации генома дали начало революции в клинической терапии. Однако теперь возможно минимизировать воздействие вирусных инфекций на человека. Например, можно использовать CRISPR/Cas9 в разработке устойчивости иммунной системы против HIV (human immunodeficiency virus). При HIV-инфекции ко-рецептор CCR5 нарушается *ex vivo* для генерации HIV-резистентных Т-клеток, CAR-T-клеток или гемопоэтических стволовых клеток, но основной проблемой остается латентный резервуар зараженных инфекцией клеток [4]. Регуляция активности процесса транскрипции HIV-1 проходит в несколько этапов:

А) активная транскрипция HIV происходит, когда хроматин находится в открытой структуре, позволяя важным факторам связаться и активировать транскрипцию вируса. К ним относятся NF-κB (красные полосы) и Sp1 (оранжевые овалы). Петля TAR также доступна для связывания TAT-белка HIV-1 и дальнейшей активации транскрипции.

Б) Во время латентности HIV-1 несколько механизмов могут предотвратить транскрипцию вируса [5].

Находясь в покоящихся CD4⁺ Т-клетках и миелоидных клетках в различных местах тела таких, как мозг, латентный резервуар не устраняется ART (специфическая антиретровирусная терапия) и обладает способностью реактивировать репликацию вируса до уровня предварительной терапии, когда ART прекращается. CRISPR/Cas9 способна инактивировать интегрированный провирус [9]. Было отмечено, что экспрессия гена HIV-1 индуцируется длинными терминальными повторами (LTRs), которые дублируют идентичные последовательности ДНК и помогают во внедрении ретровирусной ДНК в хромосому хозяина. Также CRISPR/Cas9 может мутировать LTRs в ДНК чужеродного провируса-1, приводя к распаду латентного резервуара этой инфекции. В регуляции отрицательной обратной связи HIV-1 ген Cas9 был помещен под контроль минимального промотора HIV -1 для экспрессии Cas9 в инфекционных клетках. Было сообщено, что CRISPR/Cas9 при редактировании генов может ингибировать несколько этапов инфекции HIV-1 [7]. Современная терапия CRISPR/Cas9 является перспективной в разработке методик лечения HIV: усиливает экспрессию факторов рестрикции хозяина против HIV-инфекции, но генетическая модель sgRNA должна быть тщательно исследована, чтобы свести к минимуму риск нецелевого события и мутированных генов.

Результаты исследования и их обсуждение

Вирус простого герпеса (Herpes Simplex Virus) 1-го типа вызывает оральный герпес и кератит простого герпеса, в то время как HSV-2 отвечает за генитальный герпес, который влечет за собой множественные генитальные проблемы. Герпесвирусы сохраняются в своем хозяине на всю жизнь, создавая латентную инфекцию, прерывающуюся периодическими событиями реактивации, во время которых происходит репликация. Современные противовирусные лекарственные средства нацелены на устранение клинических форм проявления этой продуктивной стадии, но они неэффективны к уничтожению самого вируса у инфицированного хозяина. Ученая Roehm P.C. адаптировала систему CRISPR для лечения инфекции HSV-1. Она и ее коллеги разработали особые sgRNAs, нацеленные на ICP0, важнейший вирусный кодируемый белок, который может регулировать экспрессию и репликацию вирусных генов. Они провели эксперименты и выяснили, что sgRNA, направленная только на ICP0, демонстрировала значительное снижение вирусной продукции, в то время как, sgRNA, направленная на несколько вирусных белков ICP0, ICP4 и ICP27, полностью устраняла вирусную инфекцию HSV. Эти многообещающие результаты предполагают, что CRISPR является возможным решением для лечения HSV-инфекции [8]. Для того, чтобы исследовать эффективность системы CRISPR/Cas9 против HSV-1 в клетках непосредственно человека, были получены клональные клеточные линии, экспрессирующие Cas9 и sgRNAs, из клеточной линии олигодендроглиомы человека, названные TC620. Их инфицировали HSV-1 и стали наблюдать. Вскоре биохимические и флуоресцентные микроскопические исследования показали ингибирование продукции белка ICP0 и подавление HSV-1 инфекции и репликации. Анализ бляшек показал, что вирусные титры и рост были снижены в клетках, экспрессирующих Cas9 и sgRNAs. Экспрессия Cas9 и sgRNAs не оказывала существенного влияния на прогрессирование клеточного цикла, апоптоз или жизнеспособность клеток TC620. ПЦР в реальном времени показала незначительные нетаргетные влияния системы Cas9/sgRNA против HSV-1, поскольку в нескольких репрезентативных генах человека, идентифицированных с помощью биоинформатического скрининга, не было обнаружено индельных мутаций. Эти результаты свидетельствуют о том, что система Cas9/sgRNA проявляет незначительную цитотоксичность и малое нетаргетное воздействие [9].

Таким образом, генная терапия, которая может редактировать и устранять геном герпесвируса, является единственным решением для лечения латентных HSV-инфекций.

Основным недостатком является вопрос, как иммунная система человека будет реагировать на генетически модифицированные клетки *in vivo*. Кроме того, двухцепочечные разрывы, индуцированные нуклеазами Cas9, связаны с клеточной токсичностью и могут в итоге привести к гибели клеток. Также остается неизвестно, могут ли все побочные эффекты быть учтены в терапии, нацеленной на участок в миллиардах триплетов ДНК, включающей

модификацию миллионов клеток и подготовленной для каждого пациента. Преимущества - обеспечивает удобную платформу для легкого нацеливания на геномные локусы. Эндонуклеаза Cas9 может быть направлена в конкретный геномный локус, что вызывают двухцепочечные разрывы ДНК. Результатом можно управлять, предоставляя отредактированным клеткам сконструированную модель гомологически направленной репарации. Также, возможно, данная терапия будет совершенствоваться и человечество сможет на геномном уровне редактировать мутации, вызывающие заболевания.

Выводы:

1. Система CRISPR/Cas9 активно внедряется в исправление мутаций человека, выработке устойчивости к серьезным вирусным, онкологическим и другим болезням.
2. Относительно простое использование и высокая эффективность CRISPR/Cas9 позволяет редактировать геном с высокой точностью, что открывает клинические перспективы в использовании данной технологии.

Список литературы:

1. Amitai G., Sorek R. and CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action / *Nature Reviews Microbiology* - 2016 - V.14, № 2 - P. 67–76.
2. Designed nucleases for targeted genome editing and Lee J., Chung J., Kim H. M, Kim D., Kim H. / *Plant Biotechnology Journal* - 2016 - V. 14, № 2 - P. 448-462
3. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering and Zhang J., Adikaram P., Pandey M., Genis A., Simonds W. / *Bioengineered* - 2016 - V. 7, № 3 - P. 166-174
4. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases and Sharma G., Sharma A., Bhattacharya M., Lee S., Chakraborty C. / *Molecular Therapy* - 2020 - V. 29, № 2, P. 571-586
5. Ready for Repair? Gene Editing Enters the Clinic for the Treatment of Human Disease and Ernst M., Broeders M., Herrero-Hernandez P., Oussoren E., Ploeg, A. T., Pijnappel W.W.M P. / *Mol Ther Methods Clin Dev* - 2020 - V. 18 - P. 532-537
6. Genome editing of CCR5 by AsCpf1 renders CD4 + T cells resistance to HIV-1 infection and Liu Z., Liang J., Chen S., Wang K., Liu X., Liu B., Xia Y., Guo M., Zhang X., Sun G., Tian D. / *Cell Biosci* - 2020 - V. 10
7. Ahlenstiel C. L., Symonds G., Kent S. J., Kelleher A. D. and Block and Lock HIV Cure Strategies to Control the Latent Reservoir / *Front Cell Infect Microbiol* - 2020 - V. 10
8. Chen Y., Sheng J., Trang P., Liu F. and Potential Application of the CRISPR/Cas9 System against Herpesvirus Infections / *Viruses* - 2018 - V. 10
9. A knockdown of the herpes simplex virus type-1 gene in all-in-one CRISPR vectors and Khodadad N., Fani M., Jamehdor S., Nahidsamiei R. I., Makvandi M., Kaboli S., Teimoori A., Thekkiniath J. / *Folia Histochem Cytobiol* - 2020 - V. 58, № 3 - P. 174-181