CRISPR-CAS:
ПРОГРАМУВАННЯ БАЖАНИХ ОЗНАК У СЕЛЕКЦІЇ

Багато бактерій захищають самі себе від вірусів, які вбудовуються в їхні клітини за допомогою адаптивної імунних механізмів, відомих як CRISPR-Cas. Останні можуть розпізнавати генетичні послідовності, специфічні для цих «загарбників» і видаляти їх.

Джефрі Сандер,
Марк Йешке,
матеріали надано
компанією
DuPont Pioneer

CRISPR-Cas можна використовувати для створення трансгенних культур

CRISPR-Cas має численні потенційні сільськогосподарські переваги, зокрема — підвищення урожайності та стійкості рослин до хвороб, толерантність до посухи й ліпші зовнішні характеристики.

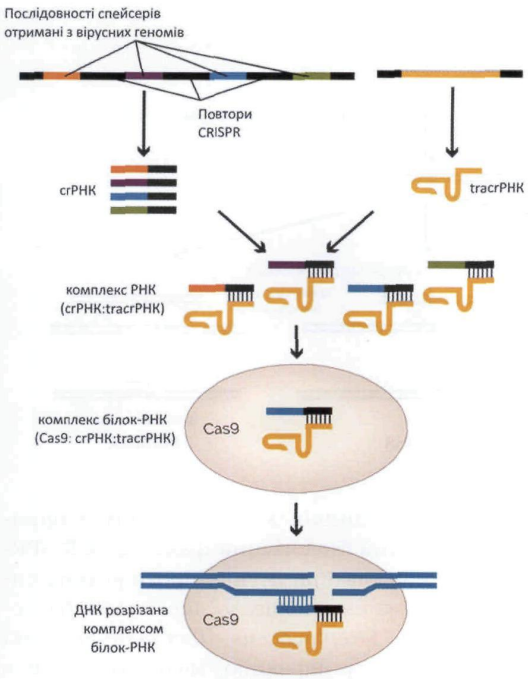
На думку вчених, нині прориви в галузі редагування геному підводять до третьої біотехнологічної революції, спрямованої на поліпшення рослин, що стане ефективним доповненням до вже наявних технологій. Редагування геному — це процес внесення точних цільових змін у нитку ДНК, що складається з послідовностей із чотирьох базових нуклеотидів (цитозину, гуаніну, аденіну і тиміну), які входять до складу генів та інших геномних ознак і визначають характеристики й різноманітність рослин. Водночас застосування CRISPR-Cas усе ще є складним: за своєю концепцією воно подібне до редагування документа за допомогою текстового процесора. В цій аналогії інструмент CRISPR-Cas є курсором, який можна встановити в потрібному місці. Позиціонування цього курсора робить можливим видаляти, міняти або вставляти літери чи навіть слова в обране місце і поліпшувати таким чином текст. У такий самий спосіб за допомогою CRISPR-Cas можна виокремлювати наявні в рослині генетичні послідовності й вносити зміни, забезпечуючи бажані характеристики. Ймовірно, ця революційна технологія допоможе вченим у створенні інноваційних та екологічно раціональних рішень для фермерів, подібних до тих, яких досягають

традиційними методами селекції, але ще кращої якості, точності та часової ефективності.

Редагування геному CRISPR-Cas є одним із найзахопливіших методів, який був дуже швидко пристосований завдяки таким перевагам над іншими методами, як якість, ефективність та технічна гнучкість. CRISPR-Cas має величезний потенціал застосування, що виходить далеко за межі сільського господарства, і в останні кілька років привернув до себе значну увагу світових ЗМІ після того, як кількість досліджень у цьому напрямі суттєво збільшилась.

Історія CRISPR-Cas

Уперше дослідження щодо CRISPR-Cas оприлюднили в 1987 р. дослідники з Японії, які вивчали ділянки геному *E. coli*. Вони ідентифікували наявність п'яти тотожних послідовностей ДНК-повторів, відділених неповторюваними послідовностями ДНК одного й того самого розміру. Тоді це сприйняли як курйоз та залишили без пояснень. Утім, що більше геномів секвенували, то більше виявляли таких повторюваних ознак у бактерій, включаючи ті, що беруть участь у виробництві йогурту та сиру й які живуть у кишківнику людини. Загадковості дослідженню додавало, зокрема те, що ці повторення регулярних інтервалів супроводжувалися тими самими групами генів. Тож зрештою повторювані ділянки назвали «CRISPR» (скороченням від короткі

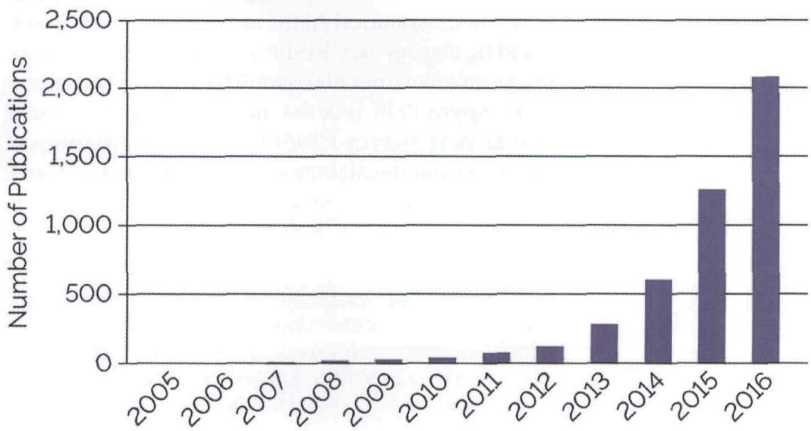


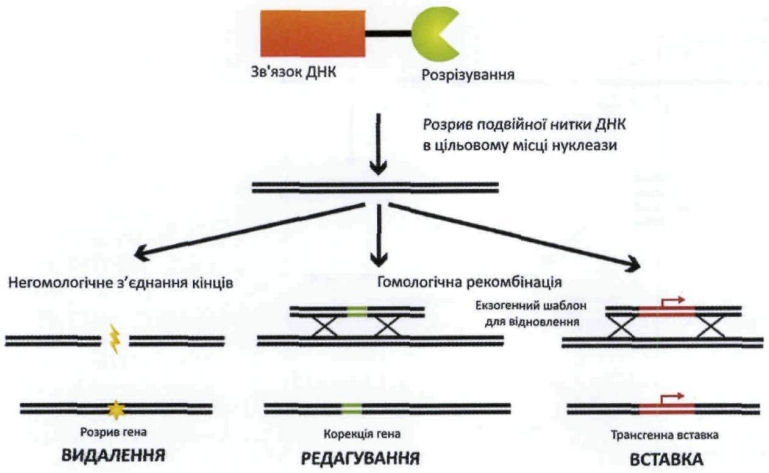
Ілюстрація природної роботи системи CRISPR. Вірусні ДНК-послідовності вбудовуються в масиви CRISPR бактерій, які потім продукують crRNA комплементарні до чужорідної ДНК-ділянки. crRNA гібридизуються до tracrRNAs і зв'язуються з протеїном Cas9. Комбінований комплекс розпізнає й вирізає чужорідну ДНК, яка відповідає послідовності раніше інкорпорованій у масив CRISPR бактерії

паліндромні повтори, регулярно розташовані групами), а супутні гени отримали назву «Cas» (скорочено від асоційовані з CRISPR або CRISPR-associated genes). Фахівці усвідомили, що послідовності між повторами мають риси, спільні з вірусами, які інфікують ці бактерії подібно до записів про імунізацію, та те, що деякі з генів, асоційованих із Cas, кодують білкові ділянки, пов'язані з розрізанням ДНК.

На той час уже було добре відомо, що для розрізання ДНК бактеріофагів (вірусів, які інфікують бактерії) бактерії використовують білки. Тож одразу з'явилася гіпотеза, що CRISPR був свого роду послідовністю, асимільованою з геному вірусів-окупантів у спейсерні послідовності та протеїни Cas для вирізання ДНК інфікуючих вірусів.

Наукові публікації в PubMed, пов'язані з CRISPR, за період з 2005 по 2016 рр. (згідно з 12.09.16, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)





CRISPR-Cas полегшує відновлення ДНК. Відновлення без шаблону відбувається через негомологічне з'єднання кінців (NHEJ) і може бути використане для руйнування функції гену, ефективно видаляючи її. Відновлення з використанням шаблону через гомологічну рекомбінацію (HDR) уможливлює точну заміну й вставку в геном послідовності з ДНК-шаблону

Команда дослідників компанії Danisco оприлюднила перший біологічний факт, що CRISPR-Cas створює в бактерії імунну противірусну систему. Дослідження показало, що штами бактерій йогурту *Streptococcus thermophilus*, які пережили вірусну інфекцію, мали вбудовані в своїх CRISPR-локусах послідовності з геному вірусів, що їх уражували. Після цього ці штами бактерій ставали стійкими до наступних інфікувань цим вірусом.

Згодом ідентифікували численні системи CRISPR-Cas з індивідуальними характеристиками. З цієї низки виокремлюється одна із серій відкриттів, яка й висунула системи CRISPR-Cas на «передній фронт» революції в редагуванні геному. Згідно з цим відкриттям, три складники цієї системи характеризуються як необхідні й достатні, щоб специфічно зчитати і розрізати ДНК-молекулу, яка створює геном та кодує «інструкції життя».

Першим складником є білок Cas9 — білок, закодований геном Cas9. Додатково до механізму розрізання молекули ДНК він також розпізнає дуже короткий відрізок поблизу послідовності ДНК, яка відповідає за ініціацію процесу зчитування ДНК. Другим складником є РНК (споріднена з ДНК). Вона походить із локусу CRISPR, що містить послідовність, завданням якої є встановлення послідовності ДНК, що потрібно розрізати. Ця РНК відома як CRISPR РНК (crРНК) і відповідає за зв'язування цільової ДНК. Третім складником є друга РНК (відома як tracrРНК), яка також походить із локусу CRISPR і слугує зв'язкою для асоціювання послідовності crРНК із білком Cas9.

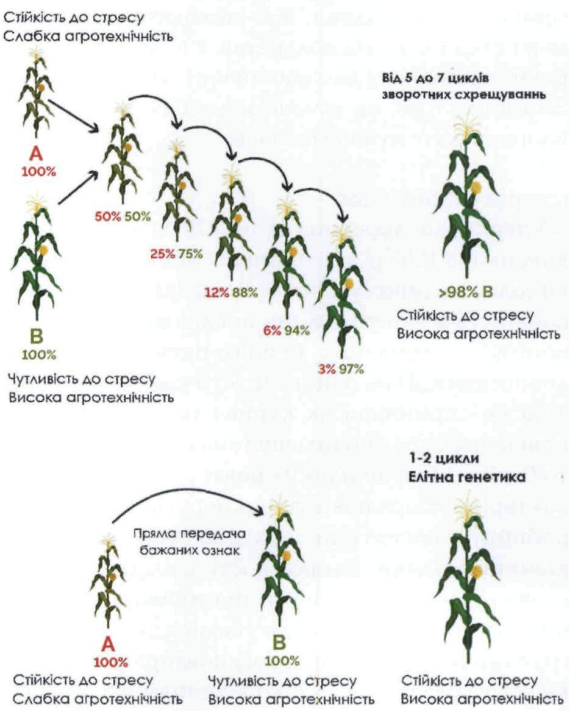
У 2012 р. кілька наукових журналів опублікували звіти про те, що цих трьох складників достатньо для зчитування й розрізання ДНК, і що crРНК можна змінити так, аби вона розпізнавала практично будь-яку послідовність ДНК із будь-якого організму. Щоб спростити систему та поліпшити її ефективність, було визначено, що crРНК і tracrРНК можуть бути скомбіновані в просту РНК. Ця легко програмована двокомпонентна система Cas9, керована РНК, є на сьогодні інструментом CRISPR-Cas, який найбільше використовують у всіх галузях біологічних наук.

CRISPR-Cas полегшує вдосконалення рослин

Білок CRISPR-Cas, Cas9, полегшує редагування геному, функціонуючи як точні й програмовані молекулярні ножиці, які розрізають ДНК у визначеному місці. Після розрізування цільової послідовності ДНК система CRISPR-Cas за допомогою природних клітинних механізмів відновлення ДНК видаляє, редагує або вставляє гени.

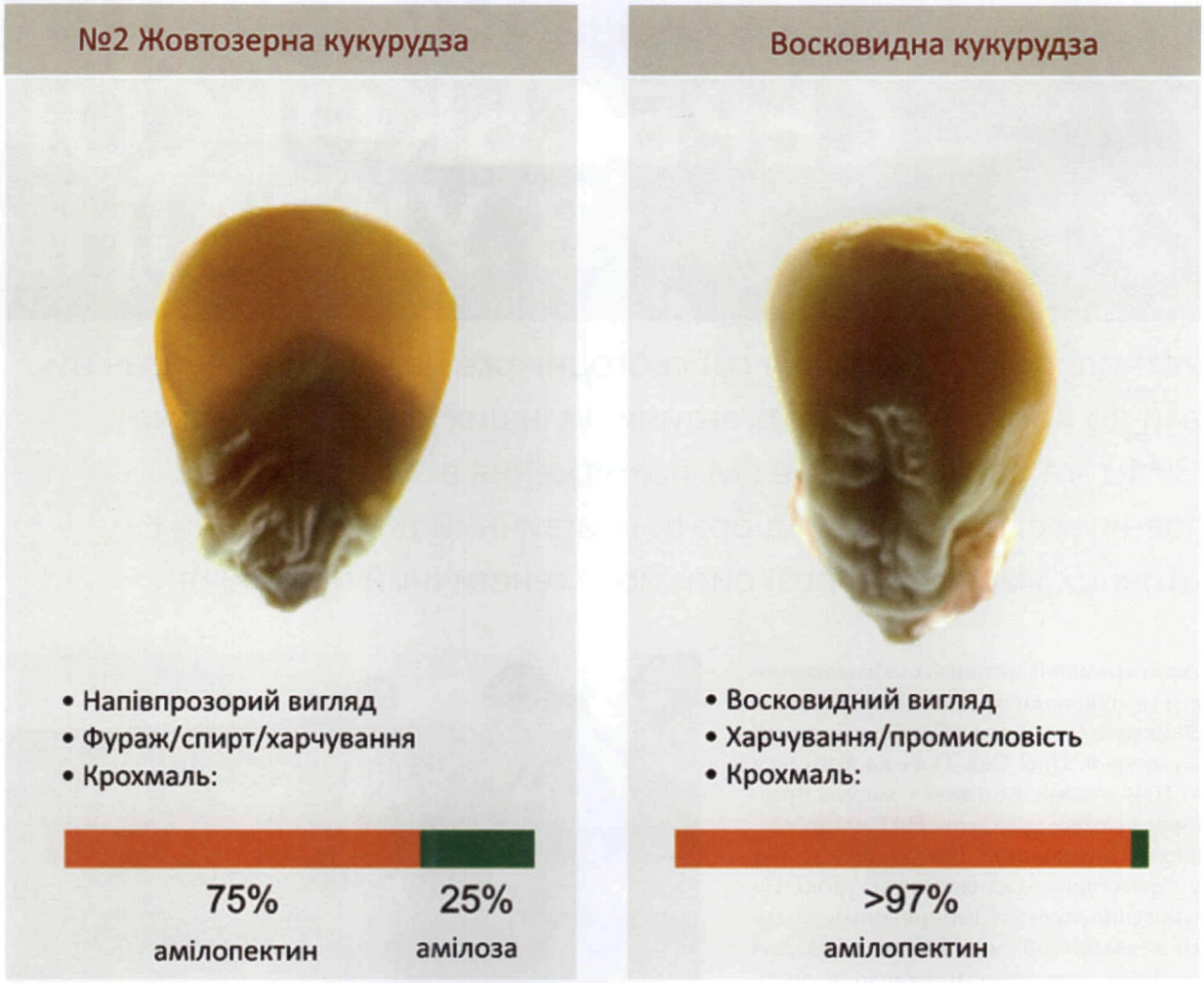
Багатоклітинні організми, включаючи рослини, постійно потерпають від розривів ДНК, викликаними зовнішніми чинниками, такими як сонячне світло, а також внутрішніми процесами, зокрема вивільнення вільних молекулярних радикалів. Щоб вижити ці організми виробили ефективні механізми відновлення численних ДНК-розривів, які відбуваються щодня в кожній клітині. Відновлення ДНК можна класифікувати двома способами: негомологічні з'єднання кінців та гомологічні рекомбінації.

Негомологічні з'єднання кінців (NHEJ) є основним способом відновлення ДНК у рослин. Вони не використовують шаблон ДНК для процесу від-



Порівняння традиційної інтрогресії з керованою селекцією. Традиційна інтрогресія потребує до семи поколінь зворотних схрещувань і все ще несе в собі деяку неелітну генетику. Керована селекція потребує лише два цикли репродукції та містить лише елітну генетику

Воскоподібна кукурудза, збагачена амілопектином, є бажаним продуктом для харчової, целюлозно-паперової, текстильної та клейової галузей



новлення, а просто ідентифікують два розірваних кінці ДНК та вставляють їх назад. Цей процес відновлення ДНК може часто призводити до вставлення або видалення випадкових послідовностей ДНК у місці відновлення. Якщо розірвана ДНК-послідовність представляє ген рослини, то його функція порушується і видаляється.

Гомологічні рекомбінації (HDR) використовують другу нерозірвану нитку ДНК, яка містить послідовність ідентичну до розірваної частини, а також бажану зміну (редагування, специфічна і цільова заміна послідовності або додатковий генетичний матеріал для вставлення). Нерозірвана ДНК-нитка слугує для них шаблоном для відновлення ДНК.

Видалення генів

За допомогою Cas9 можна видаляти певні гени, вирізаючи їх із геному. Відновлення способом NHEJ можна використовувати, щоб розірвати послідовність ДНК, яка кодує гени, або в разі двох розрізів із боків гена, щоб повністю його видалити.

Керована селекція

CRISPR-Cas робить можливим пряме передавання ознак між членами одного виду, наприклад різними інбредами кукурудзи. Гомологічної рекомбінації можна досягти в цільовому інбреді кукурудзи, використовуючи шаблон відновлення, що походить із послідовності ДНК, яка нас цікавить в іншому інбреді. Це — пряме цільове передавання потрібної ознаки кукурудзи (наприклад стійкість до стресу). Завдяки CRISPR-Cas, на відміну від традиційної селекції, передається тільки ця ознака — з більшою ефективністю та без «доважок» у вигляді додаткового генетичного матеріалу від інбреда-джерела.

Трансгенні ознаки

HDR, полегшений через CRISPR-Cas, можна також використовувати для інтродукції ознак зі сторонніх джерел (наприклад трансгени). Здатність CRISPR-Cas зробити це цільовим способом забезпечує значну перевагу над трансгенними методами введення, які сьогодні використовують для створення трансгенних продуктів. Завдяки CRISPR-Cas можливе поєднання кількох трансгенів разом та виокремлення їх в окремий селекційний локус, що, своєю чергою, істотно спрощує процес інтрогресії ознаки. ■