

8.2 CRISPR-Cas: Od podstaw biologii do narzędzia

Slajd 1.

CRISPR-Cas jest postrzegany jako jeden z największych przełomów w biologii molekularnej od czasu opracowania PCR. W tej prezentacji opowiem, jak ten bakteryjny adaptacyjny układ immunologiczny stał się podstawą do rozwoju nowego, potężnego narzędzia do edycji, regulacji i celowanej modyfikacji genomów. Technologia CRISPR ma obecnie zastosowanie na wszystkich polach inżynierii genomowej. Za sukcesem tej technologii stoi jej prostota, skuteczność i uniwersalność.

Slajd 2.

Technologia CRISPR jest oparta na kierowanych przez RNA nukleazach, które specyficznie przecinają DNA rozpoznając sekwencję. Model działania obejmuje trzy odrębne kroki. W pierwszym etapie – adaptacji – obce kwasy nukleinowe są integrowane jako nowe „spacery” do macierzy CRISPR, oddzielonej sekwencjami powtórzonymi. W następnym kroku, ekspresji, generowane są dojrzałe crRNA, zawierające część sekwencji „spacer’a” połączoną z częścią sekwencji powtórzonej. Dodatkowo, zachodzi ekspresja komplementarnego do regionów powtórzonych transkryptu crRNA tracrRNA oraz białek Cas. W ostatnim etapie, interferencji, poprzez wiązanie się komplementarnych regionów powtórzonych powstaje hybryda crRNA-tracrRNA. Ta hybryda RNA kieruje nukleazę Cas do komplementarnych sekwencji DNA, co prowadzi do przecięcia elementu genetycznego dokonującego inwazji.

Slajd 3.

Właśnie połączenie crRNA i tracrRNA w jedną cząsteczkę sgRNA stanowiło kluczowy krok, który pozwolił na rozwój technologii CRISPR. Najpowszechniej używany w inżynierii genomowej jest obecnie system CRISPR/Cas typu II pochodzący od *Streptococcus pyogenes*. Podobnie jak inne systemu typu II, do cięcia docelowego DNA potrzebuje on pojedynczej endonukleazy, Cas9.

Slajd 4.

CRISPR-Cas9 jest obecnie używany do modyfikowania genomów różnych komórek i organizmów, w tym bakterii, pasożytów, danieli przegowanego, myszy i komórek ludzkich. Jednoczesna ekspresja nukleazy Cas9 z sgRNA zawierającym sekwencję komplementarną skutkuje dwuniciowymi pęknięciami DNA, które są następnie naprawiane na drodze niehomologicznego łączenia końców lub homologicznej rekombinacji.

W przypadku niehomologicznego łączenia końców, dochodzi do insercji lub delecji losowych par zasad, co skutkuje dysrupcją (rozbiciem) genów czyli ich „knock-out’em”. Natomiast homologiczną rekombinację z wykorzystaniem donorowego DNA można wykorzystać do precyzyjnej modyfikacji genu poprzez wprowadzenie określonej mutacji lub do wprowadzenia do genomu zupełnie nowego genu.

Slajd 5.

Możliwość zaprogramowania Cas9 do wiązania dowolnej wybranej sekwencji stwarza potencjał do wielu zastosowań, takich jak kontrolowanie transkrypcji, modyfikowanie epigenomów czy obrazowanie chromosomów.

Zmodyfikowane białko Cas9, określane jako dCas9, zostało skonstruowane w celu obrazowania w żywych komórkach. Domena nukleazowa tego białka została dezaktywowana, dzięki czemu uzyskano białko specyficznie wiążące DNA o określonej sekwencji. Zmodyfikowane białko jest białkiem fuzyjnym, połączonym z fluorescencyjnym znacznikiem – np. eGFP – i razem z odpowiednio zaprojektowanym sgRNA jest używane do wizualizacji genomu pojedynczej komórki. Pozwala to udoskonalić współczesne technologie stosowane w badaniach dynamiki konformacyjnej natywnych chromosomów w żywych komórkach.

Z drugiej strony, zmodyfikowane białko dCas9 może być również użyte w celu regulacji genów w skali całego genomu. W procesie określanym jako CRISPRi dCas9 blokuje dostęp polimerazy RNA do DNA, co skutkuje represją transkrypcji. Co więcej, poprzez wygenerowanie chimerycznych wersji dCas9 sprzężonych z domenami regulatorowymi, jak np. podjednostka ω polimerazy RNA, można efektywnie aktywować ekspresję genów.

Slajd 6.

Odkrycie i rozwój technologii CRISPR jest zasługą wielu naukowców z całego świata. Chociaż jest to stosunkowo niedawne odkrycie, pierwsze doniesienia sięgają 1987 roku. Naukowcy z jednego z japońskich uniwersytetów odkryli nietypowy segment DNA, który składał się z krótkich, bezpośrednich powtórzeń, flankowanych przez krótkie, niepowtarzalne sekwencje. Odnotowali oni, że „biologiczne znaczenie tych sekwencji jest nieznane”. Prawie trzy dekady później, w 2002 roku, powtórzenia te zostały określone mianem CRISPR, a powiązane z nimi białka – Cas. W 2005 roku „spacery” CRISPR zostały dopasowane do obcego DNA.

Slajd 7.

W ciągu kolejnych dwóch lat ustalono, że CRISPR jest adaptacyjnym systemem odpornościowym bakterii, który umożliwia uniknięcie infekcji fagowej. W 2011 roku naukowcy stwierdzili, że ten mechanizm oporności na fagi wymaga powstania dwóch cząsteczek RNA, nazwanych crRNA i tracrRNA. Do 2012 roku biochemiczna charakterystyka systemu CRISPR pokazała, że Cas9 może być ukierunkowana przez crRNA, żeby specyficznie ciąć docelowe DNA *in vitro*. Co więcej, fuzja crRNA i tracrRNA i tym samym stworzenie sgRNA pozwoliła na zredukowanie systemu z trzech do zaledwie dwóch składników. Ten moment zapoczątkował wykorzystanie CRISPR/Cas9 jako nowego narzędzia edycji genów.

Slajd 8.

W kolejnych latach wiele badań ukazało potencjał tej nowej techniki precyzyjnej inżynierii genomowej. W 2013 r. system CRISPR/Cas9 został użyty do ukierunkowanej edycji genów w komórkach ludzkich i mysich z wykorzystaniem zaprojektowanych crRNA. Rok później naukowcy z Chin poinformowali o pierwszych specyficznych mutacjach u zmodyfikowanych małp. Był to duży krok w kierunku stworzenia bardziej precyzyjnych modeli badawczych w badaniach nad chorobami ludzi. Przeprowadzono również pierwsze próby edycji genomu zarodków ludzkich w celu wyeliminowania chorób genetycznych, jednak naukowcom nie udało się skutecznie naprawić wad genetycznych; obserwowano wiele niespecyficznych cięć.

Slajd 9.

W 2016 roku pierwsze badania kliniczne u ludzi wykorzystujące edytowanie genów oparte na CRISPR zostały zatwierdzone w USA. Skala tych pierwszych testów jest niewielka, ponieważ ich celem jest sprawdzenie, czy stosowanie CRISPR u ludzi jest bezpieczne. Później technologia ta może być wykorzystywana do leczenia nowotworów.

Jak widać z osi czasu, CRISPR jest przełomową technologią dla biologii molekularnej i można oczekiwać, że wiele nowych badań i zastosowań pojawi się jeszcze w następnych latach.

Slajd 10.

Wszystkie odniesienia literaturowe wykorzystane w tej prezentacji znajdziecie na poniższej liście.