

4.Побел Е. А. Перелом — фактор риска развития и прогрессирования остеопении и остеопороза // Остеопороз и остеопатии. 2013. №3.

5.Трифонова Е.Б., Ганжа А.А., Гюльназарова С.В., Бурматова А.Ю. Особенности маркеров минерального обмена при имплантации спиц в остеопоротически перестроенную костную ткань// Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6-7. – С. 1428-1431.

УДК 575.1:577.213

**Быстрых С. А., Прощенко Д. А.  
МЕТОДЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА**

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

**Bystrykh S. A., Proshenko D. A.  
GENOME EDITING METHODS**

Department of medical biology and genetics  
Ural State Medical University  
Ekaterinburg, Russian Federation

E-mail: batatatat@mail.ru

**Аннотация.** С успехами учёных в области геной инженерии и биологии связано появление в конце XX века методов редактирования генома, которые позволили эффективнее и быстрее лечить широкий спектр заболеваний: генетических, инфекционных и онкологических. Эти методы позволяют человеку заботиться как о своём здоровье, так и о животных, растениях. Кроме того, методы редактирования генома позволяют в сжатые сроки создавать животных с измененным генотипом, что улучшает животноводческий комплекс.

**Annotation.** The success of scientists in the field of genetic engineering and biology associated with the emergence at the end of the XX century methods of editing the genome, which allowed more efficient, fast and convenient to treat a wide range of diseases from genetic to acquired, from infectious to cancer. These methods allow a person to take care of his health, as well as animals and plants. In addition, genome editing techniques allow the creation of animals with a modified genotype in a short time, which improves the livestock complex.

**Ключевые слова:** ген, мутация, редактирование генома, нейродегенеративные заболевания, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9.

**Key words:** Gen, mutation, genome editing, neurodegenerative diseases, induced pluripotent stem cells (IPSCS), ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9.

## **Введение**

В конце XX века в генетике произошло открытие методов редактирования генома, что позволило исправлять мутации различных видов, способность включать или выключать те или иные гены, причем как в человеческом, так и животном организмах. С помощью этих методов люди научились быстро и главное эффективно лечить многие распространенные заболевания, к которым относятся инфекционные, а также наследственные патологии.

Клетки возможно редактировать двумя способами: внутри организма и вне его - *in vivo* и *ex vivo* соответственно [3]. Причем, при помощи последнего способа человек открыл новые способы лечения генетических, онкологических и прочих заболеваний. В статье рассмотрены три основных способа редактирования генома: CRISPR, TALEN, ZFN; указано их значение в современной медицине, а также определена их роль в науке.

Кроме того, успехи в генной инженерии позволили человеку создавать модели Т-лимфоцитов, которые кодируют химерный антигенный рецептор, или CAR (от англ. Chimeric Antigen Receptor) [3]. А это в свою очередь позволило людям бороться с раковой опухолью путём указания на неё Т-лимфоцитов.

**Цель исследования** – описание перспективных технологий редактирования генома ZFN, TALENs и CRISPR/Cas9, возможности их применения в лечении различных заболеваний, а также оценка безопасности и эффективности разрешенных к применению современных методов редактирования.

Научную базу работы составляют статьи, представленные в списке литературы, указанном в конце статьи.

## **Материалы и методы исследования**

Научную базу работы составляет статьи А. А. Немудрого, К. Р. Валетдиновой, С. П. Медведева, С. М. Закияна «Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas - инструменты открытий» из журнала «Acta naturae» [2], А. А. Горяева, М. В. Савкина, К. М. Мефеда, В. П. Бондарева, В. А. Меркулова, В. В. Тарасова «Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность» из журнала «Биопрепараты. профилактика, диагностика, лечение» [3], статья А. А. Малаховой, М. А. Сорокина, А. Е. Сорокиной, Т. Б. Маланхановой, Н. А. Мазурок, С. П. Медведевым, С. М. Закияном «Использование методов редактирования генома для создания изогенных клеточных линий, моделирующих болезнь хантингтона *in vitro*» из журнала «Гены и клетки» [1], статья А. С. Ветчиновой, Е. В. Коноваловой, Е. А. Лунева, С. Н. Иллариошкина «Технология редактирования генома и возможности ее применения в клеточной нейробиологии» из журнала «Анналы клинической и экспериментальной неврологии» [4], статья В. В. Власова, С. П. Медведева, С. М. Закияна. "Редакторы" Геномов. От Цинковых пальцев до Crispr из журнала «Наука из первых рук» [7], статья Д. В. Ребрикова «Редактирование генома человека» из

журнала «Вестник российского государственного медицинского университета» [6], статья Т. А. Ларкиной, А. А. Крутиковой, Л. В. Козиковой «Редактирование генома сельскохозяйственных животных с помощью технологии CRISPR/CAS9» из журнала «Молочнохозяйственный вестник» [5]. Основными методами исследования стали синтез, индукция, анализ.

ретроспективный, сравнительный и проблемно-хронологический методы.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Выделяют следующие три основных метода редактирования генома человека: ZFN или «цинковые пальцы»; TALEN и CRISPR/Cas9. В биотехнологии, зачастую применяются эти три метода, однако кроме них существуют и мегануклеазы («хоуминг»-эндонуклеазы семейства LAGLIDADG) и другие, но такие методы как правило малоэффективны [3].

ZFN (Zinc-finger nucleases) это сайт-специфическая нуклеаза, которая представляет собой белковый Zn-домен и фермент, расщепляющий цепи ДНК в необходимом участке, при помощи связывания нуклеаз с определёнными последовательностями нуклеотидов ДНК. Действие ZFN заключается в разрезании ДНК *in vitro* в определенных участках. Данное явление было описано в 1996 году.

Метод ZFN или «цинковые пальцы» стал основой редактирования культивируемых клеток, а также клеток растений и животных.

Стоит отметить, что ZFN встречаются в составе человеческих факторов транскрипции. При синтезе таких нуклеаз можно смоделировать цепочку «цинковых пальцев», которая будет распознавать определенный участок ДНК. Если синтезированная цепочка будет иметь достаточную длину, то она сможет распознавать протяженные последовательности ДНК. Это, в свою очередь, даст возможность точно воздействовать на конкретные участки ДНК больших геномов.

Однако технология, основанная на ZFN, имеет ряд недостатков, включая сложность и высокую стоимость, вероятность неточного разрезания ДНК-мишени по причине однонуклеотидных замен или неправильного взаимодействия между доменами, поэтому данный метод нельзя признать наилучшим [6].

Конструкции на основе химерных нуклеаз - TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) - представляют собой ДНК-распознающие белковые структуры, где каждый белковый домен определяет только один нуклеотид ДНК. На практике стало возможным получение такой конструкции, которая распознаёт определённые последовательности нуклеотидов ДНК. Такая конструкция, соединённая с ферментом, расщепляющим молекулу ДНК, обладает высокой специфичностью действия.

При сравнительно простой структуре он способен эффективно проводить редактирование генома в клетках животных, растений, человека. В отличие от ZFN или CRISPR/Cas9, каждый белковый домен распознаёт только один нуклеотид, за счёт ДНК-распознающих доменов. В терапии при помощи

TALEN-системы можно фиксировать экспрессию генов, отвечающих за нейродегенеративные заболевания [2].

На рубеже 2012-2013 годов появился новый, инновационный метод редактирования генома CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9, который производит более точное редактирование, чем предыдущие два метода [4]. В отличие от предыдущих нуклеаз, в CRISPR/Cas , распознают ДНК не белки, а молекулы РНК.

Идея создания данного метода появилась при изучении механизмов защиты бактериальных клеток при внедрении в них бактериофагов.

Принцип работы данного механизма обусловлен особыми участками бактериального генома — CRISPR-локусами. Это локусы, состоящие из повторяющихся некодирующих последовательностей бактериальной ДНК. Эти повторы разделены спейсерами — короткими фрагментами чужеродной вирусной ДНК. Фрагменты вирусной ДНК встраиваются в бактериальную ДНК после того, как ДНК вируса рекомбинирует с геномом бактерии. Если в клетку бактерии повторно попадает «известный» вирус, то происходит синтез РНК, закодированной в CRISPR-локусе. В дальнейшем происходит созревание образовавшейся РНК, в которой формируются короткие фрагменты, состоящие из участка, соответствующего спейсеру, и участков, соответствующих повторяющимся фрагментам бактериальной ДНК. Последние участки необходимы для привлечения Cas-белков, а спейсер связывается с комплементарным участком ДНК бактериофага. После взаимодействия с вирусной ДНК Cas-белки разрезают её, тем самым обеспечивая уничтожение вируса [7].

Технология CRISPR/Cas9 имеет явное превосходство над методами, основанными на ZFN и TALEN: ее значительно проще создавать, она обладает более высокой эффективностью, а также характеризуется более упрощенной структурой и поэтому данный метод является более эффективным.

Система TALEN более трудоемкая, она требует больше времени на конструирование, чем CRISPR/Cas9. Однако сейчас существуют методы автоматизированного создания конструкций, экспрессирующих TALEN, что позволяет получать их эффективность в коммерческом масштабе, а поскольку процесс распознавания ДНК достаточно прост, то процесс получения для исследователя необходимой нуклеотидной последовательности не вызывает особых трудностей [4].

Также, методы на основе CRISPR/Cas9 способны эффективно редактировать геномы культивируемых стволовых клеток. Так, применение систем редактирования геномов позволяет исправлять точечные мутации в клетках, полученных от больных. Объектом исследования в данном случае могут быть индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и региональные стволовые клетки [3].

В исследованиях российских учёных Т. А. Ларкиной, А. А. Крутиковой, Л. В. Козиковой был проведен опыт на свиньях, в ходе которого их геном

редактировался методом CRISPR/Cas9. В результате исследователям удалось получить генно-модифицированных свиней. Такие животные, по прогнозам исследователей, приведут к росту качества животноводческого комплекса [5].

#### **Выводы:**

1. Появление методов управления генетическим материалом клеток можно считать действительно важным открытием в области молекулярной биологии, которое имеет огромные перспективы использования на практике в будущем.
2. Представленные в статье генетические манипуляции сегодня активно используются при решении таких биотехнологических задач, как создание модифицированных видов бактерий, растений, животных, обладающих ценными свойствами, и клеточных моделей.
3. Перспективным направлением в данной области является использование существующих и разработка новых методов редактирования генома, которые позволят исправлять врождённые генетические нарушения у человека.

#### **Список литературы:**

1. Горяев А. А., Савкин М. В., Мефед К. М. Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность. – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения, 2018. – С.140 –149.
2. Малахова А. А., Сорокин М. А., Сорокина А. Е.. Использование методов редактирования генома для создания изогенных клеточных линий, моделирующих болезнь хантингтона *in vitro*. – М.: Изд-во ООО «Гены и Клетки», 2016. – С.106 – 113.
3. Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. П.. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas. Инструменты открытий. *Acta naturae* – М.: Изд-во Парк-медиа, 2014. – С.20 – 42.
4. Ветчинова А. С., Коновалова Е. В., Лунев Е. А.. Технология редактирования генома и возможности ее применения в клеточной нейробиологии. – М.: Изд-во ЗАО «РКИ Соверо пресс», 2015. – С.59 – 64.
5. Власов В. В., Медведев С. П., Закиян С. М.. "Редакторы" Геномов. От Цинковых пальцев до Crispr. – Новосибирск: Изд-во ООО «Инфолио». – С.44-53
6. Ребриков Д. В. Редактирование генома человека. – М.: Изд-во РНИМУ им. Н. И. Пирогова, 2016. – С. 4 –15.
7. Ларкина Т. А., Крутикова А. А., Козикова Л. В. Редактирование генома сельскохозяйственных животных с помощью технологии CRISPR/CAS9. – Вологда: Изд-во ВГМХА им. Н. В. Верещагина, 2018. – С.24 –35.

УДК 612.67

**Варлашов Е.М., Щербаков Д.Л., Гаврилов И.В., Мещанинов В.Н.  
КЛЕТОЧНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ  
ГЕРОПРОТЕКТОРОВ ОЛИГОПЕПТИДНОГО ТИПА**

Кафедра биохимии