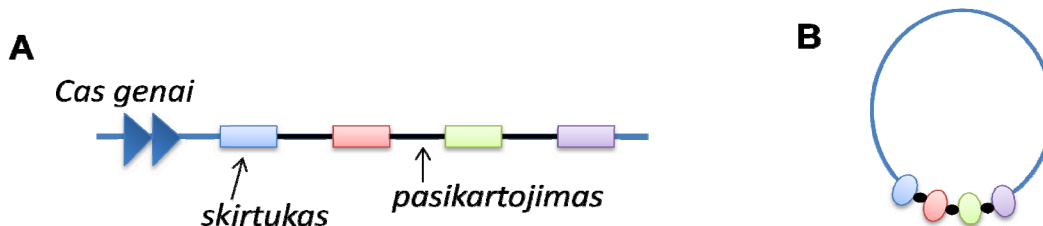


## CRISPR/CAS SISTEMOS – NUO BAKTERIJŲ IMUNITETO IKI GENOMŲ REDAGAVIMO

Klasingi virusai puola visus – tiek žmones, tiek ir bakterijas. Visi žino ne, kad žmonės turi imunitetą, padedantį kovoti organizmui su parazitais, tarp jų – ir virusais, tačiau visai neseniai atrasta ir bakterijų imuninė sistema. Ji labai skiriasi nuo žmonių imuninės sistemos, tačiau jos abi atlieka tą pačią funkciją – apsaugo organizmą nuo nedraugiškų ir pavojingų svetimkūnių.

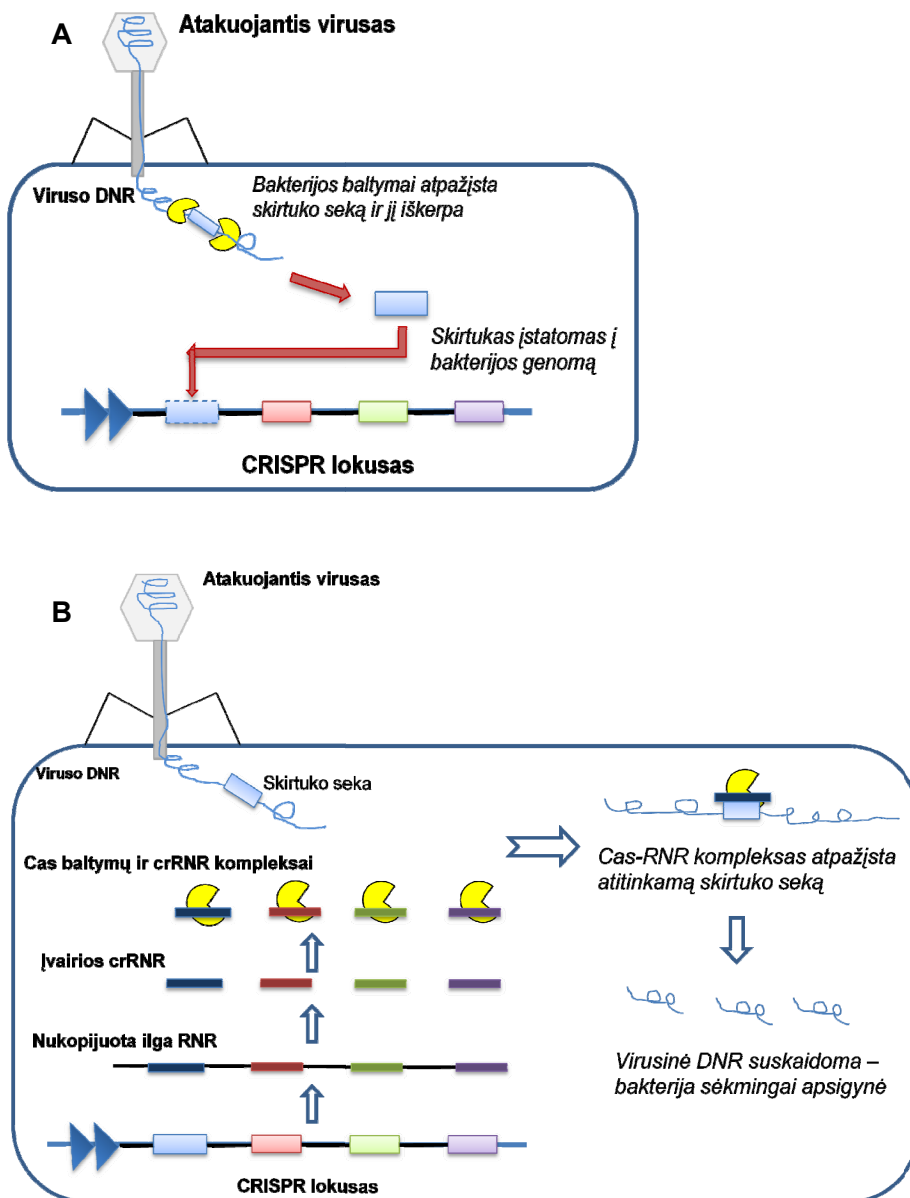
Bakterijos apsaugai nuo virusų naudoja CRISPR/Cas (angl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) sistemą. Ji yra sudaryta iš specifinės DNR sekos, vadinamos CRISPR lokusu, ir Cas genų, nuo kurių sintetinami Cas baltymai. CRISPR lokusas – tai ne įprasta bakterinė DNR – jame tarp bakterinės DNR aptinkama ir viruso DNR gabaliukų. Įdomu tai, kad jų išsidėstymas nėra atsitiktinis – virusinės DNR gabaliukai dėliojami pakaitomis su bakterine DNR, tarsi karoliai iš didesnių ir mažesnių karoliukų. Dėl to sistema taip ir pavadinta – taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę pasikartojimai. Virusinė DNR vadinama skirtuku, o bakterinė – pasikartojimu (1 pav.) Kiekvienas viruso DNR fragmentas yra skirtingas – iš skirtingų bakterijų infekavusių virusų. Ši apsaugos sistema tuo ir ypatinga, jog sukaupia informaciją apie bakteriją atakavusius virusus tam tikroje DNR sekoje ir vėliau, tam pačiam virusui nusitaikius į bakteriją antrą kartą, ši informacija yra panaudojama virusui sunaikinti ir bakterijai apsaugoti. Atrodytų, kad taip turėtų prisidauginti tūkstančiai virusams atsparių bakterijų, tačiau taip nėra. Virusų gvardijai užpuolus bakterijas, didžioji dalis jų žūsta nespėjęs suveikti CRISPR/Cas sistemai, o naują viruso DNR fragmentą įsistatyti į genomą pavyksta tik vienai iš tūkstančio bakterijų. CRISPR/Cas sistema – įgyto bakterijų imuniteto pavyzdys, nes su kiekviena viruso ataka įgyjamas naujas atsparumas.



1 pav. CRISPR/Cas sistemos sandara (A) ir jos panašumas su karoliais (B).

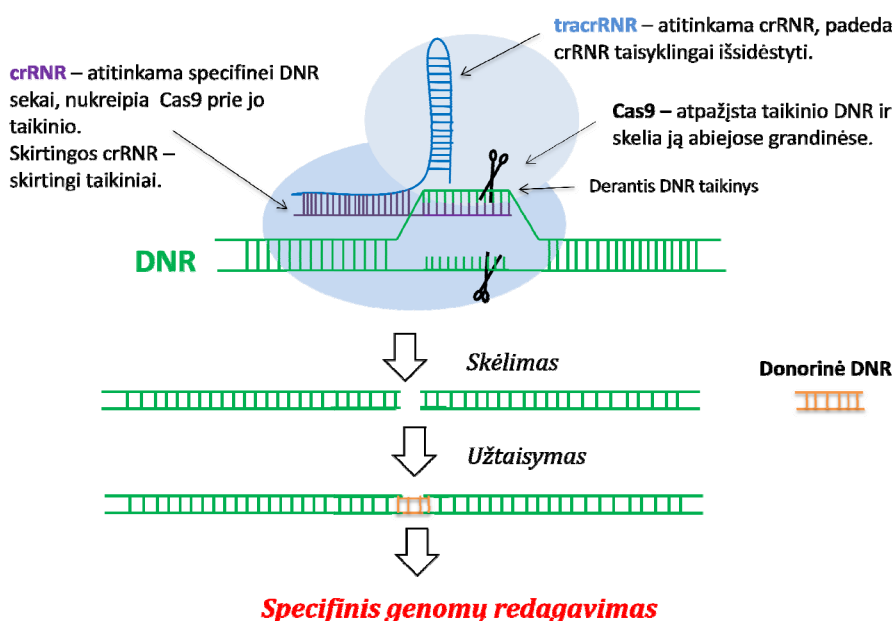
Kaip įgyjama apsauga nuo virusų? Kai virusas atakuoja bakterijos ląstelę, į ją patenka viruso nukleorūgštis, t.y. virusinė DNR. Svetimoje viruso DNR yra speciali seka, kurią bakterijos baltymai atpažįsta ir iškerpa. Taip gaunamas skirtukas. Tada tam tikroje bakterinės DNR vietoje, po paskutinio pasikartojimo, iškirptas skirtukas yra įstatomas (2 pav. A). Tai vyksta pirmą kartą virusui infekuojant bakteriją. Jei bakterija išgyvena viruso ataką, ji įgauna apsaugą nuo šio viruso visam savo gyvenimui, t.y. įgyja imunitetą. Kai virusas bando antrą kartą užvaldyti tokią bakteriją, jos ląstelėje įsijungia mechanizmai, kurių dėka nuo DNR nukopijuojama skirtukų ir pasikartojimų seka – gaunama ilga viengrandinė RNR. Tada ta ilga RNR seka bakterinių baltymų sukarpoma iki mažų gabaliukų, kurių sekos atitinka skirtukų, t.y. infekavusių virusų DNR gabaliukų, sekas. Jos vadinamos crRNR (angl. *CRISPR-derived RNA*). Ir paskutiniame etape šios skirtukams atitinkamos sekos – crRNR – jungiasi su specifiniais Cas baltymais. Susidarę baltymų-RNR kompleksai atpažįsta sekas virusinėje DNR ir ją suskaido – taip virusas inaktyvuojamas nepadaręs bakterijai žalos (2 pav. B).

Skirtingos bakterijos gali turėti kelių skirtingų tipų CRISPR/Cas sistemas, kurios skiriasi Cas baltymais ir jų funkcijomis, tačiau plačiau patyrinėkime *Streptococcus thermophilus* bakterijų CRISPR/Cas sistemą. Šios bakterijos itin plačiai naudojamos pieno pramonėje gaminant jogurtus ar *nocarela* sūrį ir žmonėms yra visiškai nepavojingos. Pagrindinis jų CRISPR/Cas sistemos apsaugos nuo virusų dalyvis – baltymas Cas9. Jis sudaro kompleksus su RNR dupleksu – dviem trumpomis RNR (crRNR ir tracrRNR, 3 pav.). Toks baltymo-RNR kompleksas dalyvauja aukščiau aprašytame virusinės DNR naikimo procese. Cas9-RNR kompleksą



**2 pav.** A. Apsaugos nuo viruso įgijimas – skirtuko, t.y. viruso DNR fragmento, įstatymas į bakterijos genomą. B. Apsaugos mechanizmas virusui pakartotinai bandant infekuoti bakteriją: susidaro Cas baltymų ir įvairių crRNR kompleksai, jie atpažįsta atitinkamą skirtuko seką ir virusinė DNR suskaidoma, o virusas žūsta.

galima išvaizduoti kaip kūną ir smegenis – kaip smegenys valdo kūną ir nurodo, ką jam daryti, taip ir čia – crRNR – smegenys nukreipia Cas9 baltymą, t.y. kūną, prie atitinkamos DNR sekos – taikinio – ir tada Cas9 tarsi žirkles ją perkerpa. Kaip jau buvo minėta, crRNR yra labai įvairios – priklausomai nuo to, kokie virusai atakavo bakteriją anksčiau. Todėl Cas9-RNR kompleksai susidaro labai įvairūs ir gali kirpti skirtingą atitinkamą DNR, t.y. gali turėti daugybę skirtingų taikinių. Ši Cas9 savybė pavadinta programuojamu kirpimu – panaudojant specifinę crRNR galima užprogramuoti Cas9 kirpti DNR norimoje vietoje. Atlikus daugiau tyrimų nustatyta, kad tokios programuojamos molekulinės žirkles gali karpyti taikinio DNR ne tik bakterijų ląstelėse, bet ir mėgintuvėlyje. O tada pagalvota – galbūt jos gali veikti ir kituose organizmuose? Pirmiausia Cas9-RNR kompleksų veikimas buvo išbandytas kitose bakterijose, o pamačius, kad tai veikia – nutarta pereiti ir prie sudėtingesnių objektų, pvz., žinduolių ląstelių.



**3 pav.** *S. thermophilus* Cas9-RNR komplekso sandara ir jo, kaip molekulių žirklių, veikimo mechanizmas. Cas9-RNR kompleksas pagal crRNR atpažįsta taikinį, kuriame įveda trūkį. Jo užtaisymo metu galima specifiskai redaguoti įvairių organizmų genomus. Donorinė DNR gali būti, pvz., veikiantis genas vietoje neveikiančio.

Kaip buvo atliekami šie tyrimai? Kadangi žmogaus genomo DNR seka jau yra nustatyta, pasirinkta tam tikra vieta genome. Pagal jos seką susintetinama ją atitinkanti crRNR ir mėgintuvėlyje surenkamos molekulinės žirklys iš Cas9 baltymo, crRNR bei tracrRNR. Toks kompleksas įterpiamas į žinduolių ląsteles. Ten crRNR nukreipia Cas9 prie atitinkamos DNR sekos ir Cas9 ją perkerpa – įvyksta užprogramuotas genomo kirpimas, t.y. DNR nutrūksta tarsi perkirpus virvutę pusiau. Žinduolių ląstelės yra labai protingos ir iškart pajunta, kad DNR kažkas nutiko – įsijungia DNR taisymo mechanizmai. Vieno iš jų metu galima ląstelei pateikti naują DNR seką (donorinė DNR, 3 pav.), ir ji bus įstatyta trūkio vietoje. Parodyti, jog modelinėse sistemose šis mechanizmas veikia, tad tikimasi, kad ateityje tai bus galima panaudoti „blogiems“ genams taisyti ir genetinėms ligoms, pvz., pjautuvinei anemijai, gydyti. Vietoje geno su mutacijomis, dėl kurio išsivysto liga, į ląsteles įvedus Cas9-RNR kompleksą ir sveiką geno kopiją, šis turėtų atsirasti genome vietoje mutuo, ir žmogus turėtų pasveikti. Kol kas gydymui Cas9-RNR kompleksai dar nėra taikomi, nes reikalinga daugybė tyrimų, pvz., nustatyti kompleksų specifiskumui (ar nekerpa DNR ten, kur nereikia) ar efektyviausiam pristatymui į ląsteles.

Šiuo metu Cas9-RNR kompleksai labai plačiai taikomi įvairiuose moksliniuose tyrimuose, pvz., vaisinių muselių, zebražuvų, javų genomo modifikavimuose – o tai panaudojama vėžio ir kamieninių ląstelių tyrinėjimuose, vystymosi biologijoje bei neurobiologijoje. Kitas potencialus ir itin naudingas CRISPR/Cas sistemų pritaikymas – kovai su antibiotikui meticilinui atspariomis *Staphylococcus aureus* bakterijomis. Panaudojant Cas9-RNR kompleksus, specifinius atsparumą antibiotikams suteikiančiai DNR, būtų galima sunaikinti tą DNR, o kartu sunaikinti ir infekcijas sukeliančias bakterijas.

Paprasta, greita ir pigu – tai pagrindinės savybės, dėl kurių Cas9-RNR pritaikymas per pastaruosius metus labai paplito įvairiausiose mokslinėse bei praktinėse srityse. Galbūt ateityje sugebėsime CRISPR/Cas sistemas pritaikyti net AIDS gydymui.

Lietuvoje CRISPR/Cas sistemų tyrimai vykdomi Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje (vad. prof. dr. V. Šikšnys). Šiame straipsnyje aprašyti Cas9-RNR kompleksų tyrimai žinduolių ląstelėse atlikti *Thermo Fisher Scientific Baltics* Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre (vad. dr. A. Lubys), Ląstelės biologijos grupėje (vad. dr. L. Zaliauskienė). Bendrovė kuria ir gamina molekulines biologijos produktus gyvybės mokslų (angl. *life sciences*) tyrimams ir

diagnostikai. Vilniuje kuriami ir gaminami produktai plačiai naudojami visame pasaulyje, tiriant genų sandarą, raišką ir įvairovę, kuriant naujus įgimtų, paveldimų ir užkrečiamų ligų diagnostikos metodus. „Thermo Fisher Scientific“ yra didžiausia pasaulio kompanija, siūlanti produktus ir paslaugas mokslui. Kompanijos misija – padėti klientams kurti sveikesnį, švaresnį ir saugesnį pasaulį. Į Lietuvą kompanija įžengė 2010 m., kada įsigijo UAB „Fermentas“. „Thermo Fisher Scientific Baltics“ veikiančiame Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centre šiandien dirba apie 90 mokslininkų ir tyrėjų. Mūsų duomenimis, tai yra vienas didžiausių privačių mokslo centrų visame regione. 2013 m. kompanija Vilniaus padaliniui suteikė pasaulinio Molekulinės biologijos kompetencijų centro vardą.

Monika GLEMŽAITĖ,  
*Thermo Fisher Scientific Baltics*,  
patentinės paraiškos WO2013/142578  
„RNA-DIRECTED DNA CLEAVAGE  
BY THE Cas9-crRNA COMPLEX“  
bendraautorė