

STRUCTURI GENETICE DE PALINDROMURI INTERSPĂTIAȚE REGULĂT

CLUSTERED REGULARY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS -CRISPR-

Daniel Calaver, Cezar Adonis Cernat², Laura Floroian

¹*Facultatea de Inginerie Electrică și Știința Calculatoarelor,
Universitatea „Transilvania” din Brașov*

²*Facultatea de Inginerie Mecanică și Electronică, Universitatea Petrol-Gaze din Ploiești*
Autor corespondent: **Laura Floroian**, lauraf@unitbv.ro

Abstract:

CRISPR is a recent discovery regarding adaptive immunity in prokaryotes against viruses and a breakthrough in genetic engineering. With a little help from the scientific community, CRISPR can be used to practically modify any kind of DNA, not just only eliminate viruses' DNA. This method is so precise that it can cut down to a single letter of the DNA strand. The future medicine using CRISPR-based methods can be able to solve any kind of human disease like cancer and could even slow down the aging process. We started with Cas9 and Cpf1 nucleases and better methods are being developed. Who would know that an old immune system like this can have the power to obliterate almost any kind of disease?

Key-words: *genetic engineering, CRISPR, Cas, gARN, Cas9, Cpf1*

Introducere

Editarea genetică este un proces vechi și important pentru dezvoltarea umanității. La început aceasta se făcea fără a cunoaște detalii despre genotip și se efectua doar pe baza fenotipului, reprezentând încă de acum câteva mii de ani soluția ideală pentru supraviețuire. Primele „modificări” genetice s-au efectuat în domeniul agriculturii prin selecția celor mai bune soiuri de plante și clonarea acestora, lucru ce a mărit cantitatea de producție a plantelor cultivate. Un proces asemănător a transformat diferite specii de lupi în speciile canine de astăzi; însă aceste modificări au fost făcute în mare parte neintenționat, fără cunoașterea implicațiilor pe care le vor avea.

Următorul pas a fost simpla descoperire a codului vieții, limbajul genetic format din patru „litere” care reprezintă bazele acidului dezoxi-ribonucleic: A (adenină), C (citozină), G (guarină) și T (timină). Aceste 4 litere codifică toate informațiile unui anumit organism într-o structură spiralată numită ADN. Odată cu această descoperire a apărut și dorința de a putea modifica codul genetic; dacă ADN-ul este „cartea de instrucțiuni” a fiecărui organism. Atunci ce s-ar întâmpla dacă am putea îmbunătăți aceste instrucțiuni?

Înainte de a îmbunătățirea codului genetic uman, preocuparea principală ar fi

repararea atunci când este cazul. Știm deja că există boli cauzate de defecțiuni ale acestor instrucțiuni; de exemplu, există o multitudine de defecțiuni care provoacă cancer, o boală incurabilă care a existat dintotdeauna. În realitate șansele sunt ca însăși îmbătrânirea să fie o măsură de protecție a naturii împotriva cancerului. Astfel au apărut diferite tehnologii de modificare a ADN-ului în mod direct, nu numai prin selecție naturală. Modificarea unui cod atât de complex nu este o sarcină simplă, motiv pentru care s-au făcut prea puține îmbunătățiri cu costuri mult prea mari. Studiarea unei secvențe mai ciudate în codul genetic al unor bacterii a dus la dezvoltarea unei tehnologii noi de modificare a genotipului, prima tehnologie cu potențialul unei rate de succes de 100%!

Această secvență de ADN a primit numele CRISPR locus [6], iar împreună cu genele și cu proteinele Cas (CRISPR associated) formează un sistem de protecție avansat împotriva virusurilor și a plasmidelor.

Imunizarea împotriva unui anumit virus se dobândește în urma unei infecții, astfel: în cazul în care organismul infectat de virus supraviețuiește atacului, acesta copiază și stochează o porțiune din ADN-ul virusului în regiunea CRISPR locus. Diferitele coduri genetice stocate au primit denumirea de

„spațiatoare” (din engleză, spacers) care sunt delimitate de secvențe de ADN denumite repetitoare (din engleză repeats). În cazul unei viitoare invazii a aceluiași virus, sistemul imunitar al bacteriei va folosi spațiatorul respectiv pentru a „încărca” o proteină Cas cu molecule ghid-ARN (gARN) care caută o potrivire cu ADN-ul virusului în cauză. Atunci când găsește o potrivire de aproape 100% gARN va distruge secvența respectivă [5].

De menționat este faptul că moleculele Cas reprezintă de fapt niște nucleaze (enzime care pot degrada moleculele de ADN și ARN) [11].

Vechile metode de modificare a genomului aveau o rată de succes foarte mică, lucru ce ducea la puține rezultate într-un timp îndelungat (cu toate că raportul de cost/acțiune era mic, rata de eșec creștea cantitatea de bani investiți per proiect).

Molecula ADN-ului uman mai are o proprietate interesantă, aceea de a fi cea mai mare moleculă cunoscută. Dacă am putea să desfășurăm molecula de ADN uman aceasta s-ar apropia de trei metri lungime. Este ușor de concluzionat faptul că o astfel de macromoleculă poate fi foarte instabilă și în aceste condiții ne putem gândi la două tipuri de radiație care ar putea crea mutații (modificări în codul genetic, de multe ori apărute în mod accidental). Prima este radiația electromagnetică ionizantă. Acest tip de radiație (reprezentată de lumina ultravioletă, radiațiile X și gama) oferă electronilor de pe ultimele straturi ale atomilor suficientă energie pentru a se elibera de legătura electromagnetică lăsând în urmă ioni pozitivi. Această pierdere de electroni poate tăia legăturile atomice dintr-o moleculă iar cu cât molecula este mai mare, cu atât este mai ușor de nimerit și mai ușor de destabilizat.

Celălalt tip de radiație periculoasă este reprezentată de radiația neutronică. În urma unor reacții nucleare de fisiune un nucleu instabil al unui atom foarte greu se poate transforma într-o structură mult mai stabilă din punct de vedere energetic eliberând particule alpha (nuclei de He formați din $2p^+$ și $2n^0$), neutroni, neutrino și energie. Energia se eliberează sub formă de fotoni sau sub formă de energie cinetică oferită părților rezultante. Cu toate că particulele neutrino au sarcină electrică 0, au dimensiuni extrem de reduse și de obicei

nu afectează mediul prin care trec, particulele alpha sunt încărcate pozitiv și ușor încetinite de materia bogată în electroni prin care încearcă să treacă; radiația neutronică este extrem de periculoasă deoarece este formată din particule relativ mari, cu multă energie cinetică și cu sarcină electrică 0 – asta le face imposibil de încetinit de către forțele electromagnetice, astfel putând transfera energia doar în mod direct (la fel ca un glonț), iar ADN-ul este o țintă foarte mare pentru un astfel de atac.

Folosind astfel de radiații se pot obține mutații în mod aleator, metodă folosită destul de des sub forma iradierii intenționate a plantelor, animalelor sau a procariotelor. Ideea principală ar fi aceea că uneori o mutație aleatorie ar putea să ofere un rezultat interesant.

Virusii sunt entități care sunt reprezentate de obicei de o capsulă proteică (sau capsidă) în care se află genomul viral reprezentat de o moleculă de ADN sau o moleculă de ARN. Datorită dimensiunilor incredibil de mici (8nm-500nm) acestea pot trece prin filtrele construite împotriva patogenilor (de asemenea virusii au putut fi studiați în mod optic abia după inventarea microscopului electronic). Nu pot fi considerate organisme vii datorită faptului că nu au nici un fel de metabolism, dar cu toate acestea au o modalitate de reproducere; au capacitatea de a infecta o celulă gazdă prin injectarea propriului genom care va începe crearea de copii ale virusului folosind resursele celulei infectate, iar în final virusii noi apăruiți părăsesc victima distrugându-i membrana celulară. Fiind totuși entități extrem de simple putem obține virusi cu genom artificial al cărui comportament poate fi manipulat. Rezultatul a fost inventarea unei noi metode de modificare a codului genetic prin folosirea unui virus pentru injectarea unei anumite secvențe de ADN. Cu toate că virusii sunt construiți pentru injectarea propriului genom viral într-o celulă astfel încât să poată transforma celula infectată într-o fabrică de alți virusi, nu se poate ști unde se va introduce secvența de ADN în cauză; astfel de modificări aveau deci o rată de eșec foarte mare.

Probabil cea mai intuitivă metodă primitivă de modificare genetică este efectiv injectarea de ADN în nucleul unei celule. Totuși, introducerea genelor direct în nucleul

celulelor are o rată de eșec chiar mai mare decât metoda virușilor modificați.

O ultimă opțiune referitor la tipurile de modificări genetice posibile este tăierea lanțului genetic, lucru care a oferit rezultate surprinzătoare datorită modului în care celulele afectate pot răspunde pagubelor aduse genomului. Astfel, există două moduri în care o celulă eucariotă ar putea răspunde la o porțiune de ADN lipsă:

1. Sistemul de reparare a ADN-ului va lua cele 2 capete ale ADN-ului tăiat și le va lipi, ignorând complet genele care au fost tăiate; acest răspuns din partea celulelor ne permite să dezactivăm anumite gene definitiv:

2. În locul rămas liber, celula încearcă să repare ADN-ul iar acest lucru se întâmplă adesea copiind o genă asemănătoare pe care o are deja; de exemplu, în cazul genomului uman unde avem două copii ale aceleși gene (de la cei 2 părinți) se va utiliza gena rămasă neatinsă. Acest sistem poate fi păcălit totuși dacă, o dată cu tăierea secvenței țintă se pune la dispoziție o genă injectată care are capetele identice cu secvența ce urmează a fi copiată din cromozomul pereche; acest lucru permite introducerea de gene noi dezvoltate în laborator. Un alt lucru interesant la acest tip de modificare a ADN-ului este faptul că se poate utiliza pe organisme vii.

Una din metodele de modificare genetică bazată pe întreruperea lanțului dezoxiribonucleic o reprezintă nucleaza "Zinc-Finger". ADN-ul lezat se poate modifica prin procesul de „recombinare omogenă” în urma căruia celula va folosi gene asemănătoare ce pot fi introduse artificial. Dezavantajul este reprezentat de crearea unui design complicat, 3D, pentru o anumită proteină care afectează o anumită zonă de ADN cu alte cuvinte pentru fiecare modificare genetică dorită este necesară crearea unei noi proteine; lucru foarte laborios care necesită foarte mult timp. Un astfel de proces poate dura ani pentru obținerea rezultatului dorit. Cu toate acestea această metodă ne-a oferit tehnologia necesară de a folosi recombinarea omogenă în avantajul nostru [2].

CRISPR Associated Protein 9

Cas9 este o endonuclează descoperită în sistemul CRISPR al bacteriei *Streptococcus*

pyogenes, acest sistem fiind mult mai ușor de studiat ca alte sisteme de acest gen [1].

Cas9 funcționează utilizând două molecule de ARN; CRISPR ARN (crARN) și un trans-activ ARN (tracrARN) ce formează împreună un ghid duplex ARN [3]. În 2012 Jennifer Doudna și Emmanuelle Charpentier au reușit să modifice sistemul Cas9, astfel încât acesta să funcționeze utilizând o singură moleculă gARN obținută prin fuziunea crARN și tracrARN. Acesta a fost un avantaj tehnologic imens care a dus la dezvoltarea unei noi metode de modificare genetică intitulată, intuitiv, CRISPR/Cas9 [7].

O altă utilitate oferită de Cas9 este faptul că se poate folosi pentru a dezactiva anumite gene. Astfel, dacă Cas9 este modificată pentru a nu putea tăia secvențe de ADN, aceasta doar se va lipi de ADN-ul țintă dezactivând genele respective, acestea putând fi reactivate mai târziu. Aceasta s-a dovedit astfel a fi metoda ideală pentru a studia modul în care genotipul afectează fenotipul unui organism.

În comparație cu metodele predecesoare, CRISPR/Cas9 oferă o metodă eficientă și rapidă de a modifica codul genetic, reducând timpul de cercetare pentru o anumită genă la câteva săptămâni; permițând și modificări multiple de gene (multiplex).

În prezent, cele mai relevante domenii de studiu sunt reprezentate de aplicarea modificărilor genetice pentru tratarea cancerului, crearea medicamentelor împotriva virușilor pentru care nu există încă tratament și rezolvarea majorităților bolilor genetice. Toate acestea sunt posibile mai ales datorită posibilității de a face multiplexări [9].

Dacă am analiza alte domenii în care s-au făcut astfel de descoperiri pentru a putea face predicții ale viitorului (lucru ușor de făcut datorită noutății domeniului genetic și experienței în alte domenii mai vechi) descoperirea este comparabilă cu inventarea microcontrolerelor în domeniul electronicii. Astfel, la început, atunci când se dorea îndeplinirea unei anumite sarcini de către un circuit electric, era necesară construirea sau modificarea acestuia în mod fizic, lucru ce limita foarte mult testarea diferitelor posibilități datorită timpului necesar și a costurilor relativ

crescute. Introducerea microcontrolerelor a dus la posibilitatea programării unor circuite electronice folosind un software care poate fi modificat ușor și rapid și care nu necesită niciun cost suplimentar.

Revoluția incredibilă adusă de acest lucru în lumea tehnologiei ne poate forma o idee despre ce ne-ar putea aduce tehnologia modificării genetice utilizând CRISPR care poate fi reprogramat doar prin schimbarea gARN.

Cu toate avantajele pe care le reprezintă, domeniul Ingineriei Genetice se confruntă în continuare cu multe probleme, și anume:

- încă nu știm cu exactitate cum aleg celulele afectate metoda de reparare a ADN-ului lucru care poate duce la unele eșecuri privind adăugarea de gene noi;

- Cas9 își alege ținta aproape de fiecare dată în mod corect, totuși, se poate întâmpla ca atunci când găsește o secvență foarte asemănătoare cu cea oferită de gARN să taie în porțiunea greșită; chiar dacă acest proces are rata de succes foarte mare, dacă considerăm modificarea genetică a unui organism cu număr mare de celule (cum ar fi, un adult), atunci micile defecte se pot acumula, lucru dezastruos în cazul afectării unor celule canceroase care deja au defecte genetice;

- Modificarea genelor în mod treptat în interiorul unui organism poate duce la incompatibilități;

- Cu toate că s-au redus foarte mult costurile și rata de succes a modificărilor genetice, rămâne în continuare un proces destul de costisitor.

CRISPR/Cpf1

Unele din defectele enumerate mai sus referitoare la metoda CRISPR/Cas9 ar putea fi rezolvate prin studierea unui alt sistem CRISPR descoperit mai recent, Cpf1 (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1) descoperită în bacteria *Francisella novicida*.

Spre deosebire de Cas9, Cpf1 oferă flexibilitate mărită prin folosirea în mod natural a unui singur gARN; o metodă de tăiere mai eficientă, deoarece, spre deosebire de Cas9 care taie complet o anumită secvență de ADN; Cpf1 poate tăia doar o jumătate de spirală. Datorită acestui lucru Cpf1 este mult mai eficientă în cazul adăugării secvențelor genetice (în timp ce

Cas9 rămâne ce-a mai bună opțiune pentru tăierea unor gene) iar un ultim avantaj este posibilitatea multiplexării folosind o singură proteină, Cpf1 oferind posibilitatea de a tăia diferite secvențe de ADN [12].

Cu toate acestea cercetările referitoare la Cpf1 sunt necesare iar, cel mai probabil, cele 2 metode vor putea fi folosite împreună astfel Cas9 este mult mai eficient atunci când vine vorba de precizie în tăiere și de viteză, oferind soluția potrivită pentru modificarea la timp a celulelor ce se divid rapid (celule canceroase) iar Cpf1 oferă mai multe posibilități de editare permițând editarea cu succes a celulelor care nu se pot diviza (incluzând celulele nervoase) și introducerea pe viitor a unor însușiri care pot, de exemplu, îmbunătăți sistemul imunitar.

Implicații

Șoarecii de laborator, ca întotdeauna, sunt primii din regnul animalia care testează această metodă modernă de modificare genetică. Pe lângă modificarea cu ușurință a embrionilor șoarecilor pentru activarea unor gene referitoare la culoarea părului; totuși deja se încearcă crearea unui tratament împotriva HIV [8].

CRISPR V.S. HIV

Animalele infectate cu HIV au fost injectate cu proteine Cas9 proiectate pentru distrugerea genomului viral respectiv; injecția s-a efectuat într-o porțiune a cozii și a dus la distrugerea a peste 50% din virusii HIV. Totuși, în doar 2 săptămâni virusul HIV a devenit imun la sistemul CRISPR/Cas9 modificându-și cu succes ADN-ul în zona țintă a gARN. Încă nu se cunosc cauzele exacte, dar cu siguranță HIV se poate adapta mai rapid decât era anticipat; cu toate acestea unii cercetători afirmă că tocmai această adaptabilitate a virusului l-a făcut incurabil, nu numai că la fiecare tratament anti-viral acesta a căpătat imunitate dar reușește cu succes să se adapteze la sistemul imunitar al omului. Dat fiind faptul că CRISPR este o metodă asemănătoare cu interferența ARN din celulele eucariote, probabil că era de așteptat o astfel de înfrângere. Totuși, avem această metodă, avem virusii care au devenit rezistenți în laborator și avem posibilitatea de a dezvolta un arsenal biologic împotriva virusului HIV sau a altor patogeni foarte adaptabili astfel încât secvențe mai mari de genom pot fi atacate până

la punctul în care selecția naturală nu va mai putea face față [13].

CRISPR V.S. Malaria Virus

Oricât de ciudat ar suna, momentan cel mai mare inamic al umanității este: țânțarul. Țânțarii reprezintă un curier excelent pentru virusii care au ca țintă corpul uman. Sunt mici, mulți și se hrănesc cu sângele nostru. O dată mușcat de un țânțar acesta injectează un anticoagulant cu scopul de a păstra sângele proaspăt cât îi este necesar pentru digestie. O dată cu această substanță pot intra în corp diferiți virusi care provoacă boli precum: febra galbenă, Dengue, West Nile, encefalite virale, filorioza limfatică, zika, tularemie, malarie și multe altele. Nu e de mirare deci, faptul că umanitatea consideră eradicarea țânțarilor; în condițiile în care anual se îmbolnăvesc între 300 și 500 milioane de oameni de malarie din care aproximativ 1-3 milioane mor anual iar majoritatea sunt copii. O Genă Drive este o genă modificată care are abilitatea de a avea o rata de succes mai mare de 50% de a se copia în unul din celulele sexuale obținute prin meioză. Aceasta se obține cu ajutorul unor endonucleaze care au rolul de a tăia gena pereche în momentul diviziunii; am văzut că în general această tăiere este urmată de recombinarea omogenă care va permite duplicarea genei dorite. Cu o astfel de metodă s-au obținut rezultate pozitive în peste 95% dintre cazuri (în cazurile de aproximativ 5% mai improbabile genele s-au reparat prin simpla lipire a capetelor tăiate sau nu s-a tăiat la locul potrivit). Genele drive nu țin cont de selecția naturală iar asta ne permite să modificăm o întreagă specie de insecte pe parcursul câtorva ani (deși, o astfel de modificare pe oameni ar dura milenii pentru a putea fi realizată). Și astfel s-au făcut modificări genetice referitoare la 3 gene responsabile pentru reproducerea țânțarilor [4].

Responsabilități

Referitor la acest topic, trebuie într-adevăr să gândim foarte bine acțiunile pe care le luăm. Metodele descrise și existente sunt relativ ușor de folosit dar mai greu de controlat. De exemplu; o dată ce ai eliberat o genă drive într-o populație cel mai probabil nu o să o mai poți opri în timp util, mai ales dacă este vorba de insecte. Avem dreptul de a extermina o rasă de

țânțari? Sau, avem dreptul de a salva milioane de oameni anual? În plus, sunt grupuri de cercetători care analizează posibilitatea imunizării populației de insecte în cauză pentru a nu fi necesar un xenocid. Cu toate acestea nu ar fi prima dată când am vedea o mutație la un astfel de virus care îl face mai puternic.

Alte probleme de etică vor apărea și la oameni: sigur, tratarea bolilor incurabile va fi un pas important al umanității; dar după ce ne obișnuim cu ideea de a modifica genetic embrionul uman, cât de departe am putea merge cu îmbunătățirea caracteristicilor naturale? Dacă se poate să facem un copil rezistent la cancer, de ce să nu îi oferim și un sistem imunitar mai bun? De ce să nu îi oferim și un metabolism astfel încât să nu se confrunte cu problema obezității? Să îi dăm și o construcție mai musculoasă? Mai înalt? Cât de departe putem merge și să ne considerăm încă umani? [10]

În concluzie, „genetic engineering” ar putea curând să devină o nouă ramură a științei cu care vom putea modifica organisme și chiar specii întregi, incluzând umanitatea. Toate acestea sunt posibile datorită unor lungi studii efectuate pe codul genetic care s-au dezvoltat de la crearea de mutații aleatorii, injectarea ADN-ului cu ajutorul unui virus modificat până la tăierea cu precizie chirurgicală a codului genetic efectuată de nucleaze. Analiza sistemului imunitar dezvoltat împotriva virusilor de tip CRISPR descoperit în bacterii și în archaea a făcut ca metoda cea din urmă enumerată să fie efectuată în mod rapid și eficient spre deosebire de predecesorul „Zinc-Finger”.

Avem astfel uneltele necesare pentru a schimba viața așa cum o știm, mai rămân două lucruri de rezolvat: îmbunătățirea lor și responsabilitatea venită cu o astfel de putere.

Mulțumiri: Această lucrare este susținută de fondurile structurale ale proiectului PRO-DD (POS-CCE, O.2.2.1., ID-ul 123, SMIS 2637, ctr. nr 11/2009)

Bibliografie:

- [1] Barrangou R.- Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines, *Genome Biology*, 2015, 16:247-254.
- [2] Carroll D. - Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases, *GENETICS*, 2011 188(4)

- 773-782.
- [3] Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A. - CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III, *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [4] Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Alekos S., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A., Windbichler N., Crisanti A., Nolan T., A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*, *Nature Biotechnology*, 2016, 34:78–83
- [5] Horvath P., Barrangou R. - CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea, *Science*, 2010, 327(5962):167-170.
- [6] Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M. - Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Mol Microbiol.*, 2002, 43(6):1565-75.
- [7] Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. - A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 2012, 337(6096):816-821.
- [8] Henao-Mejia J., Williams A., Rongvaux A., Judith S., Hughes C., Richard A.F., Generation of Genetically Modified Mice Using the CRISPR–Cas9 Genome-Editing System, *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 1-11.
- [9] O'Connell M.R., Oakes B.L., Sternberg S.H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J.A. - Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9, *Nature*, 2014, 516:263–266.
- [10] Sandel M. – Designer babies - The Problem with Genetic Engineering, *Tikkun*, 2007, 22(5):40-85.
- [11] Scorpan V., Lozan A. - Dicționar de termeni biotehnologici, Ed. Ministerul Ecologiei Mold., Chișinău, 2005, 1-181.
- [12] Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. - Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, 2015, 163(3):759–771.
- [13] Zhen W., Qinghua P., Patrick G., Weijun Z., Fei G., Shan C., Mark A.W., Chen L., CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape, 2016, 15(3):481–489.