



# Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 2 / 2017 г.

ISSN 1314-3581  
<http://journal.raredis.org>

### Приложение на CRISPR-Cas9 технология за редактиране на грешки в човешкия геном

Боряна Захариева<sup>1</sup>, Марта Михайлова<sup>2</sup>, Анита Пурова<sup>2</sup>,  
Савина Хаджидекова<sup>2,3</sup>, Драга Тончева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Columbus, Ohio, USA (Comprehensive Cancer Center)

<sup>2</sup> Катедра по медицинска генетика, Медицински университет – София

<sup>3</sup> МБАЛ „Надежда“, София

#### Резюме

Абревиатурата CRISPR произлиза от Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, което представлява отличителен белег на бактериалната защитна система. Тази бактериална система, лежи в основата на CRISPR-Cas9 технологията за редактиране на генома. Тя може да бъде програмирана да таргетира и модифицира специфични области в ДНК молекулата. Crispr-Cas9 е иновативна техника за извършване на корекции в ДНК, като се използва малка синтезирана РНК молекула, насочваща системата към точното дефектно място в генома. Този подход, предоставя възможност на изследователите да коригират гени в клетките на живите организми и в бъдеще, би могъл да се използва като средство за поправка на мутации в човешкия геном при лечение на генетични болести и предразположения. Технологията намира приложение в онкогенетиката, синтетичната биология и генната терапия и ще допринесе за развитие на персонализирана медицина.

**Ключови думи:** CRISPR-Cas9, геномно редактиране, генетични болести и предразположения, персонализирана медицина.

### Editing of human genome errors by CRISPR-Cas9 technology

Boriana Zaharieva<sup>1</sup>, Marta Mihaylova<sup>2</sup>, Anita Gurova<sup>2</sup>,  
Savina Hadjidekova<sup>2,3</sup>, Draga Toncheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Columbus, Ohio, USA (Comprehensive Cancer Center)

<sup>2</sup> Department of Medical Genetics, Medical Faculty, Medical University of Sofia

<sup>3</sup> Woman Health Hospital "Nadezhda", Sofia

#### Abstract

The CRISPR abbreviation is derived from Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, which is a hallmark of the bacterial protective system. This bacterial system lies at the heart of the CRISPR-Cas9 genome editing technology. It can be programmed to target and modify specific domains in the DNA molecule. Crispr-Cas9 is an innovative technique for making DNA corrections using a small synthesized RNA molecule that directs the system to the exact defective location in the genome. This approach enables researchers to correct genes in the cells of living organisms and in the future could be used as a means of repairing mutations in the human genome, in the treatment of genetic diseases and predispositions. The technology will contribute to the development of oncogenetics, synthetic biology, gene therapy and personalized medicine.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, genome editing technology, genetic diseases and predispositions, personalized medicine.

---

#### Кореспонденция:

Чл.-кор. проф. д-р Драга Тончева, гбн  
e-mail: dragatoncheva@gmail.com

#### Correspondence:

Corr. mem. Prof. Draga Toncheva, MD, PhD, DSc  
e-mail: dragatoncheva@gmail.com

## Въведение

Част от системата CRISPR е протеин, наречен Cas9, който притежава способността да локализира, прерязва и да разгражда вирусна ДНК по специфичен начин. Doudna et al установяват, че Cas9 протеинът може да бъде използван за премахване и добавяне на специфични участъци от ДНК в клетките с голяма прецизност, което разкрива потенциал за лечение на генетични заболявания [1].

Технологията CRISPR успешно е използвана за промяна на ДНК в клетките на мишки, маймуни и на други организми. Китайски учени приложиха CRISPR за коригиране на гени в човешки ембриони [2], а екип от учени във Филаделфия показаха, че могат да използват CRISPR за премахване на ДНК на интегриран ХИВ вирус в инфектирани човешки клетки [3].

Изследователите се надяват с помощта на CRISPR-Cas9 системата да могат прецизно да манипулират генома и епигенома на животински модели. Възможността да се извършва промяна в генома, повдига различни етични въпроси, които трябва да бъдат обмислени, защото тази технология може да бъде използвана не само за клетки на възрастни индивиди, но и при ембриони на различни организми, включително човешки. Изследователите призовават за глобално обсъждане на технологията, за да могат да бъдат взети предвид всички етични и обществени последици от внедряването на подобна технология.

## Дискусия

Едно от направленията, в които може да се използва системата CRISPR е редактирането на генома. CRISPR е система от прокариотен адаптивен имунитет [1, 4-6]. Намира се в ~ 50% от бактериите и се е развила като защитен механизъм срещу вируси [7]. От началото на 2013г., много изследвания са показали, че в еукариотни клетки редактирането на специфично място в ДНК може да бъде постигнато чрез ко-експресия на Cas9 ензима от *Streptococcus pyogenes* и къса водеща РНК (gRNA). Силата на Crispr-Cas9 система се състои в нейната простота, лесна употреба, адаптивност и гъвкавост към различни мишени [8]. Cas 9 е ендонуклеаза, която водена от gRNA, действа върху специфична ДНК последователност чрез ДНК – РНК съвояване на комплементарни бази (принцип на комплементарност на Уотсън-Крик). Дизайнът на водещата gRNA последователност се прави в зависимост от специфичното място на действие на Cas 9 ендонуклеаза. Промяната на секвенцията на gRNA е лесен начин за промяна на мястото на действие на системата върху ДНК [9]. Водещата gRNA е проектирана да съдържа последователност от 20 базови двойки, която насочва комплекса Cas9 / gRNA към определената цел и непосредствено след прицелната

последователност съдържа и триплекотидна последователност, известна като Protospacer Adjacent Motif (PAM) последователност. Cas 9 реже двете вериги на ДНК и причинява двуверижно разкъсване (double-strand break – DSB) в точка, която се намира на 3-4 нуклеотида разстояние от PAM. DSBs се ремонтират по механизма не-хомоложно присъединяване на краища (NHEJ - non-homologous end-joining). Тъй като NHEJ корекцията е податлива на грешки и често води до генерирането на инсерции / делеции (InDels) в мястото на DSB, това може да доведе до мутации от типа на frameshifts или образуване на преждевременни стоп-кодонови, които да нарушат отворената рамка на четене (ORF) на прицелния ген. По-точно редактиране на генома може да бъде постигнато по механизма на HDR (homology-directed DNA repair) с помощта на хомоложна донорна ДНК, която осигурява шаблон за въвеждане на нови последователности в прицелния ген [8].

Cas 9 е ендонуклеаза без специфична последователност, а малката gRNA може просто да се получи чрез химически синтез, in vitro транскрипция или чрез експресия в клетката. Това направи възможно използването на системата за хиляди приложения през последните две години и половина [1, 5-6, 10]. Друго предимство на Crispr-Cas9 система е, че е лесно да се постигне мултиплексно насочване чрез използване на множество gRNAs. Например, две gRNAs специфични за места, които ограждат прицелния ген може да се използват за създаване на онкогенни делеции. Освен, че е гъвкава и лесна за използване, Crispr-Cas9 е забележителна с това, че има висока степен на специфичност по отношение на определените мишени за разцепване, което е много важно, като се има предвид големия размер на човешкия геном.

Повечето от дискусиите относно CRISPR-Cas9 системата са около нейният потенциал за третиране на заболявания или за редактиране на гените на човешки ембриони. Механизмите за репарацията на ДНК в човешките ембриони и резултатите от използването на технологии като Crispr-Cas9, са все още неизяснени и се нуждаят от по-нататъшно оптимизиране.

За изследване на Crispr-Cas9-медирано генно редактиране в човешки клетки, Liang et al. използват зиготи с три пронуклеуса (3PN). Те откриват, че Crispr-Cas9 може ефективно да модифицира бета-глобиновия ген (HBB), като същевременно установяват, че ефикасността на репарационния подход HDR на бета-глобиновия ген е ниска, а редактираните ембриони са мозайчни [2]. Това показва нуждата от допълнителни изследвания в областта.

Tang et al. изследват Crispr-Cas9 репарационната система при нормални човешки зиготи с два пронуклеуса (2PN) и демонстрират ефективността ѝ като подход за реда-

ктиране на гени. Чрез въвеждане на Cas9 протеин, свързан с подходящите sgRNAs и хомоложни донори в едноклетъчни човешки ембриони, те демонстрират успешна корекция, медирана от хомоложна рекомбинация в *HBB* и *G6PD* гените. Резултатите обаче разкриват и ограничения на тази технология и подчертават необходимостта от по-нататъшни изследвания [11].

Системата Crispr-Cas9 е била използвана и за коригиране на мутация в гена *RPGR* при плъхове, причиняваща пигментен ретинит – наследствено дегенеративно заболяване, характеризиращо се със загуба на зрението, засягаща над 1,5 милиона души по целия свят [12]. Изследователите са третирали мутирани стволови клетки и са постигнали корекция на дефекта и нормална генна структура. Технологията е използвана успешно и за лечение на чернодробни болести при мишки с наследствена тирозинемия (*FAH* генна мутация, която е идентична при хора) чрез инжектиране на div тип копия на *FAH*, водени от РНК [13]. Други сериозни заболявания, при които се експериментира с цел редакция на генома са хемофилия, сърповидноклетъчна анемия, мускулна дистрофия Дюшен [14-18].

Друго направление, в което би била полезна системата CRISPR са онкологичните заболявания. Известно е, че няма рак без мутации. Развитието на тумори е многостепенен процес, при който са необходими най-малко три до шест мутации, за да се развие злокачествено заболяване [19]. Мутациите възникват в резултат на фактори на околната среда като химични мутагени, или случайно по време на ДНК репликация [20]. Около една пета от раковите заболявания при човека се причиняват от вируси [21-22].

Видовете рак имат множество мутации и това открива възможност за нов мощен подход за борба с рака чрез коригиране или отстраняване на една или повече части от генома.

Раковите клетки се характеризират с постепенно придобиване на множество мутации по време на тяхното развитие и тези мутации могат да бъдат класифицирани в няколко различни групи в зависимост от функцията на гена. Те включват активирани онкогени, инактивиран туморни супресори, мутации в епигенетични фактори и техният контрол локуси, мутации в гените, които придават химиорезистентност и други. Това ги прави мишени за редактиране на генома при ракови заболявания.

Първата мишена за системата CRISPR са онкогените. Онкогените засилват клетъчната пролиферация чрез придобиване на функцията и стимулират клетъчните сигнални пътища по неподходящ начин. Тъй като онкогените са активни в присъствие на div тип алел на протоонкогена, те имат доминантен ефект. Инактивиране на онкоген от генетична система като Crispr-Cas9 може да се постигне

чрез разрушаване на протеин мотив, който е необходим за активността на онкопротеина. Например, фамилията на SRC онкогените изисква тирозин киназна активност за трансформиране и Crispr-Cas9 може да бъде насочена към тирозин киназния домейн [23].

Около една пета от всички ракови заболявания при човека се причиняват от вируси, като някои от тях съдържат вирусни онкогени, които отключват канцерогенеза. Хепатит В вирусът (HBV) може да доведе до хепатоцелуларен карцином (HCC). Геномът на HBV е малък и кодира няколко протеини, включително HBV протеин X (HBx) и HBV повърхностен антиген (HBsAg). Crispr-Cas9 система е добър кандидат за това лечение. Lin и сътр. са изследвали осем gRNAs срещу HBV и са установили, че Crispr-Cas9 е в състояние да намали значително нивата на HBV и HBsAg протеините в Huh-7 хепатоцитни клетъчни карциномни линии, трансфектирани с HBV-експресионен вектор [24]. Seeger and Sohn са тествали HBV-специфична gRNAs върху HepG2 хепатомни клетки с експресиран HBV рецептор и са установили инхибиране на HBV инфекции до осем пъти в резултат от Crispr-Cas9 разцепване [25].

Друга интересна мишена са тумор-супресорните гени. Инактивираните тумор-супресорни гени са толкова важни за канцерогенеза колкото и активирани онкогени. Над 50% от човешките тумори, съдържат *p53* мутация или делеция [26]. За разлика от онкогените, туморните супресори се инактивират при многостепенния процес на развитието чрез мутация водеща до загуба на функция или понижена експресия. За разлика от онкогените, тумор-супресорните гени се инактивират според хипотезата за „двойните мутационни удари“, т.е., двата алела на гена, кодиращ тумор-супресорен протеин трябва да бъдат променени, за да бъде премахната неговата функция. Използването на Crispr-Cas9 системата за корекция на мутирал тумор-супресорен ген изисква прецизно връщане към div тип последователност.

В случаите на вирусна инактивация на туморен супресор, Crispr-Cas9 системата може да бъде полезна чрез инактивиране на критични вирусни протеини. Например, въвеждането на Cas 9 и E6- и E7-специфични gRNAs в HeLa и SiHa цервикални карциномни клетъчни линии, които съдържат HPV18 или HPV16, съответно предизвиква инактивираща делеция в E6 или E7, водеща до реактивиране на *p53* или *pRb* [27].

Освен при вирусна инактивация, туморните супресори могат да станат неактивни в резултат на мутации в клетъчни гени. Те имат огромен потенциал като мишени за лечение на рак при човека чрез тяхното коригиране с Crispr-Cas9. Crispr-Cas9 може да бъде насочена срещу мутиралата форма на тумор-супресорния ген, но

това е предизвикателство, тъй като се изисква прецизна и ефективна генна корекция. Въпреки това, Crispr-Cas9 има потенциал да се развива като специфичен и ефикасен подход за коригиране на промени в тумор-супресорните гени на раковите клетки.

Трета мишена за системата CRISPR са епигенетичните фактори и контролни локуси. Контролът на генната експресия от епигенетични регулатори често е нарушен в раковите клетки [28]. ДНК метилтрансферазите (DNMTs) и ензимите, участващи в хистоновите модификации, например, *LSD1*, *EZH2* и *NSD2*, често се променят при злокачествени клетки. Има доказателства, че тези епигенетични промени са от съществено значение за поддържането на тумори. Епигенетичните регулаторни ензими са подходящи мишени за лечение на рака, което беше доказано наскоро за хистон деацетилазната фамилия на протеини [29]. Един механизъм, чрез който тумор-супресорните гени могат да бъдат инактивирани, е ген-специфично хиперметиране в райони, които често се намират в промоторите на гени, като *p53*, *PTEN*, *BRCA1* и т.н. [30]. Поддържането на ДНК метилиране изисква активни DNMTs ензими, които могат да бъдат подходяща мишена за лечение на рак [31]. Промени в ацетилирането на хистони и диметилиране на пет остатъка в хистони H3 и H4 са установени при рак на простатата [32]. Въз основа на тези доказателства, епигенетичните ензими са привлекателни мишени за лечение на рак. В тази връзка, хистон деацетилазни инхибитори и DNMT инхибитори са показали, че инхибират растежа на раковите клетки. Въпреки това, ограничената специфичност на такива инхибитори означава, че трябва да бъдат разработени по-добри стратегии за насочване [28].

Не на последно място са и химиорезистентните гени. Способността на раковите клетки да развиват резистентност към химиотерапия е основна пречка при много ракови терапии. Основният механизъм, чрез който много карциноми развиват резистентност към химиотерапевтични лекарства е множествената лекарствена резистентност. Най-малко два вида молекулни помпи върху плазмената мембрана са замесени в активното изхвърляне на химиотерапевтика от туморните клетки. Първата от тях, която е открита, представлява Р-гликопротеин, чиято експресия корелира със степента на лекарствена резистентност в няколко клетъчни линии и медира резистентност към лекарства като колхицин, винбластин, доксорубицин, етопозид, таксол и груги [33]. Генът за Р-гликопротеин е MDR-1 и кодира енергийно зависима помпа, която изхвърля малки молекули от клетките [34]. Втора протеинова помпа MRP, заедно с Р-гликопротеина представляват подходящи мишени за Crispr-Cas9 терапия [35].

Ензимите, които активират или деактивират химиотерапевтични лекарства също са важни в химиорезистентността на някои видове рак [36]. Механизмите, които инактивират лекарства, могат да намалят тяхната концентрация в клетката и са потенциални клетъчни терапевтични мишени. Crispr-Cas9 има потенциал да инактивира ген, кодиращ ензим за химиорезистентност на гаген рак, като може да се дава преди или в комбинация с химиотерапия.

## Заклучение

Възможностите на CRISPR-Cas 9 системата показват широкия спектър от приложения на този подход при лечението на редица заболявания, в това число онкологични, моногенни и инфекциозни болести. С нейна помощ е възможно и модифициране на риска от наследствени предразположения, както и редактиране на гени при човешки ембриони и други организми. Поради възникналите етични въпроси, в края на 2015 г., във Вашингтон бе свикана международна среща на учените свързана с възможностите за редактиране на човешкия геном. Целта на форума беше, изследователите да постигнат консенсус по отношение на генното инженерство при човека. За момента препоръките са CRISPR-Cas 9 и подобни технологии да се ограничават до фундаментални научни изследвания, включително промяна на човешки яйцеклетки, сперматозоиди и ембриони, но не и да се използват за забременяване на жени, поради липса на сигурни данни за тяхната безопасност.

Необходимо е отговорно контролиране на приложението на тази технология за да се избегне нежелана евгеника.

## Конфликт на интереси: няма

## Библиография

1. Doudna JA, Charpentier E: Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096.
2. Liang P, Xu Y, Zhang X et al: CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell*. 2015;6(5):363-72.
3. Kaminski R, Chen Y, Fischer T et al: Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep*. 2016;6(22555).
4. Sternberg SH, Redding S, Jinek M et al: DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-7.
5. Hsu PD, Lander ES, Zhang F: Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157(6):1262-78.
6. Sternberg SH, LaFrance B, Kaplan M et al: Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*. 2015;527(7576):110-3.
7. Bhaya D, Davison M, Barrangou R: CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011;45(273-97).
8. Ran FA, Hsu PD, Wright J et al: Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-308.
9. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.

10. White MK, Hu W, Khalili K: The CRISPR/Cas9 genome editing methodology as a weapon against human viruses. *Discov Med*. 2015;19(105):255-62.
11. Tang L, Zeng Y, Du H et al: CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*. 2017;292(3):525-33.
12. Bassuk AG, Zheng A, Li Y et al: Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep*. 2016;6(19969).
13. Yin H, Xue W, Chen S et al: Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014;32(6):551-3.
14. Bengtsson NE, Hall JK, Odom GL et al: Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*. 2017;8(14454).
15. Mendell JR, Rodino-Klapac LR: Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. *Cell Res*. 2016;26(5):513-4.
16. Nguyen TH, Anegon I: Successful correction of hemophilia by CRISPR/Cas9 genome editing in vivo: delivery vector and immune responses are the key to success. *EMBO Mol Med*. 2016;8(5):439-41.
17. Park CY, Kim DH, Son JS et al: Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2015;17(2):213-20.
18. Tasan I, Jain S, Zhao H: Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet*. 2016;135(9):1011-28.
19. Kinzler KW, Vogelstein B: Cancer. A gene for neurofibromatosis 2. *Nature*. 1993;363(6429):495-6.
20. Tomasetti C, Vogelstein B: Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*. 2015;347(6217):78-81.
21. White MK, Pagano JS, Khalili K: Viruses and human cancers: a long road of discovery of molecular paradigms. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):463-81.
22. zur Hausen H: Perspectives of contemporary papillomavirus research. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3(S3/iii-iv).
23. Brown MT, Cooper JA: Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1287(2-3):121-49.
24. Lin SR, Yang HC, Kuo YT et al: The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(e186).
25. Seeger C, Sohn JA: Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(e216).
26. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-31.
27. Kennedy EM, Kornepati AV, Goldstein M et al: Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol*. 2014;88(20):11965-72.
28. Yao S, He Z, Chen C: CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Epigenetic Factors for Cancer Therapy. *Hum Gene Ther*. 2015;26(7):463-71.
29. Chessum N, Jones K, Pasqua E et al: Recent advances in cancer therapeutics. *Prog Med Chem*. 2015;54(1-63).
30. Herman JG, Baylin SB: Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;249(35-54).
31. Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S: DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(8):2989-96.
32. Seligson DB, Horvath S, Shi T et al: Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*. 2005;435(7046):1262-6.
33. Juliano RL: The role of drug delivery systems in cancer chemotherapy. *Prog Clin Biol Res*. 1976;9(21-32).
34. Riordan JR, Deuchars K, Kartner N et al: Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*. 1985;316(6031):817-9.
35. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH et al: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992;258(5088):1650-4.
36. Wilson TR, Longley DB, Johnston PG: Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 10(x315-24).