

Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение
«Средняя общеобразовательная школа № 25
г. Челябинска»
454016, г. Челябинск, ул. Университетская Набережная, 30а
тел.(факс) (351) 742-22-75

Индивидуальный проект

Модернизация метода редактирования генов Clustered Regular
Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9

Выполнила:
Манапова Дарья, 10 класс
Руководитель: Степовая Л.А.

Челябинск
2021

Оглавление

Введение	3
Глава 1.1. Понятие Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9. История открытия. Строение.....	4
Глава 1.2. Генетические заболевания и причины их возникновения.....	6
Глава 1.3. Применение метода Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9 на человеке.....	8
Глава 2.1. Разработки модернизаций, обсуждаемые в мире.....	9
Глава 2.2. Социальная значимость проекта.....	10
Глава 2.3. Синтез методов модернизации редактирования генов и его анализ.....	13
Глава 2.4. Этапы внедрения и реализация проекта.....	14
Заключение	17
Литература	18
Приложение 1. Строение Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats- Cas9.....	19
Приложение 2. Существующие методы модернизации	20
Приложение 3. Синтез методов модернизации	21

Введение

В современном мире много проблем, связанных с методами лечения больных с различными генетическими заболеваниями. В связи с этим остро встаёт вопрос о геной инженерии. Именно поэтому тема индивидуального проекта: «Модернизация метода редактирования генов Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9» является актуальной при выборе метода лечения генетических заболеваний. Работа будет интересна студентам медицинских колледжей и вузов, а также практикующим врачам и представителям научного медицинского сообщества.

Цель: модернизация метода редактирования генов Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9

Задачи:

1. Изучение теоретического материала и научных исследований известных ученых.
2. Исследование различных методов модернизации редактирования генов.
3. Разработка нового метода модернизации с наименьшим количеством рисков для человека.

Методы исследования: теоретические, эмпирические, математические.

Объект исследования: редактирование генов Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9

Предмет исследования: метод лечения больных с различными генетическими заболеваниями.

Актуальность проекта: около 5% россиян страдают наследственными и врождёнными заболеваниями разной степени тяжести. Примерно 500 тысяч человек страдают от тяжёлых, прогрессирующих генетических заболеваний, поэтому они все являются инвалидами.

Глава 1.1. Понятие Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9. История открытия. Строение.

CRISPR (Clustered regular interspaced short palindromic repeats. С английского «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами»).

[Издательство Кембриджского университета. Кембриджский словарь четвертое издание – К, 2013. – 1844 с]

В 1987 году японские учёные впервые обнаружили эти необычные последовательности в ДНК кишечной палочки. Вскоре обнаружили подобные фрагменты у других бактерий и архей. К сожалению, в то время учёные не смогли выяснить их биологическое значение. Их функция была загадкой до 2007 года. Специалисты по бактерии, используемой для приготовления кисломолочных продуктов, определили: эти фрагменты – часть иммунной системы организма.

Естественные враги бактерий – вирусы. Для борьбы с ними бактерии производят специальные ферменты, которые называются рестриктаза, и каждый раз, когда бактерии удаётся убить вирус, она разрезает остатки его генетического материала и сохраняет внутри CRISPR-кассеты.

Спейсер – те самые уникальные последовательности (генетический материал вируса) внутри кассеты, которые разделяются друг от друга повторами.

Генетический материал враждебного организма сохраняется для того, чтобы использовать в случае новой атаки. При нападении бактерия производит белки Cas9, которые несут фрагмент генетического материала вируса. При совпадении фрагмента, находящегося в белке, и ДНК вируса, Cas9 разрезает генетический материал врага и нейтрализует угрозу.

В 2011 году биологи Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье обнаружили, что белок Cas9 можно использовать для разрезания любого генома в нужном месте.

В 2013 году обнаружили, что этот метод можно использовать для редактирования генов мышей и человека. К тому же, технология не только вырезает ненужные гены, но и вставляет на их место другие.

[электронный ресурс]-URL: <https://hightech.plus/2018/07/25/crispr-dlya-chainikov-kratkii-putevoditel-po-glavnoi-bitehnologii> (дата обращения: 07.09.2020)

[электронный ресурс]-URL: <https://www.youtube.com/watch?v=opXriPhMEk0&list=..> (дата обращения: 9.09.2020)

Технология состоит из белка Cas9, с которым вступает в комплекс направляющая рибонуклеиновая кислота (РНК), являющаяся спейсером (srRNA). Направляющая РНК связана транс-активирующей РНК (tracrRNA). Этого будет достаточно, чтобы вырезать ненужный ген, но, если требуется заменить его на другой ген, то к комплексу следует добавить ДНК-донора. (Приложение 1. Рисунок а)

Весь этот комплекс присоединяется к ДНК, которую нужно изменить, и ищет участок, идентичный направляющей РНК. Когда-то давно, этот самый участок вражеской ДНК был вырезан и сохранён в CRISPR-кассете. После нахождения идентичного участка, белок Cas9 делает двуцепочный разрез.

Для того чтобы белок не разрезал ДНК своего хозяина, существует защитный механизм, который представляет собой короткую последовательность нуклеотидов, имеющая название «РАМ» (Protospacer adjacent motif. С английского «последовательность, прилегающая к протоспейсеру»).

Протоспейсер – это участок чужеродной ДНК, схожий со спейсером.

Если белок не видит рядом с целевым участком эту последовательность, то ДНК останется нетронутой.

(Приложение 1. Рисунок б)

[электронный ресурс]-

URL: <https://zen.yandex.ru/media/id/5ae194d5bcf1bc97d58f42..> (дата обращения: 8.09.2020)

[электронный ресурс]-

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=opXriPhMEk0&list=..> (дата обращения: 9.09.2020)

Глава 1.2. Генетические заболевания и причины их возникновения.

Для того чтобы говорить о генетических заболеваниях необходимо знать значение слова ген.

Ген (-ы) (греч. *genos* род, рождение, происхождение) — структурная и функциональная единица наследственности, контролирующая образование какого-либо признака, представляющая собой отрезок молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.

[Швырев А.А., Муранова М.И. Словарь медицинских и общемедицинских терминов. – М.: Феникс, 2014.-190 с]

Исходя из определения выше, генетические (наследственные) заболевания – это заболевания, возникающие в связи с изменением генетического материала.

Наследственные заболевания делятся на три типа:

1. Генные, связанные с повреждением структуры или части ДНК
2. Хромосомные, вызванные аномалиями в количестве или дефектом в строении хромосом.
3. Мультифакторные, спящие в организме человека до определённого момента, спровоцированного внешними факторами.

[электронный ресурс]-URL: <https://ustamivrachey.ru/genetika/geneticheskie-zabolevaniya> (дата обращения: 10.09.2020)

Большая часть наследственных болезней происходят в результате генных мутаций, которые являются изменениями ДНК на молекулярном уровне. Мутации возникают внезапно и представляют собой качественные изменения, которые передаются из поколения в поколение. Они не направлены (спонтанны), то есть мутировать может любой участок хромосомы.

Рассмотрим виды мутаций.

1. Геномные: анеуплоидия – изменение числа хромосом в диплоидном ($2n$, где n – количество хромосом) наборе, не кратное гаплоидному ($2n + 1$, $2n - 1$, и так далее).

Полиплоидия - образование организмов, геном которых представлен более чем двумя наборами хромосом. У человека полиплоидия и большинство случаев анеуплоидии являются летальными мутациями.

Наиболее частые геномные мутации это моносомия и трисомия.

Моносомия – наличие только одной из двух гомологичных хромосом. Синдром Шерешевского-Тернера – единственная моносомия, совместимая с жизнью.

Трисомия – наличие трёх гомологичных хромосом (Синдром Дауна, синдром Эдвардса, синдром Патау).

Причиной геномных мутация является нерасхождение хромосом во время мейотического деления. Хромосомы, которые в норме должны делиться во время мейоза, остаются соединенными вместе. Таким образом, возникают две гаметы, одна из которых имеет добавочную хромосому, а другая не имеет этой хромосомы. При оплодотворении гаметы с нормальным набором хромосом гаметой с лишней хромосомой возникает трисомия (т. е. в клетке присутствует три гомологичные хромосомы), при оплодотворении гаметой без одной хромосомы возникает зигота с моносомией.

2. Хромосомные. При таких мутациях происходят крупные перестройки структуры отдельных хромосом, как правило, видимые в световом микроскопе.

Делеция – утрата одного из участка хромосомы (Симптом «кошачьего крика»).

Инверсия – перестройка сегмента хромосомы.

[Мазур О.Ч., Никитинская Т.В. Наглядный школьный курс: биология удобно и понятно. – М.: Эксмо, 2019. – 192 с.]

[Асанов А. Ю., Демикова Н.С., Морозов С.А. Основы генетики и наследственные нарушения развития у детей//под редакцией Асанова А.Ю. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 224 с.]

Глава 1.3. Применение метода Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9 на человеке.

В 2019 году в Китае учёный Хэ Цзянькуй вмешался в геном эмбрионов человека. Он изменил ген, кодирующий белок, который позволяет вирусу иммунодефицита человека попасть в клетку и, следовательно, в организм. Дети родились и теперь у близнецов Лулу и Нана снижен риск заражения вирусом иммунодефицита человека. Но подобные эксперименты запрещены на территории Китая и многих других стран. В некоторых государствах этот запрет подкреплён законом.

CRISPR вызывает серьезные мутации и геномные перестройки в месте, где комплекс сделал двуцепочный молекулярный разрез.

Естественный механизм восстановления клетки зачастую использует метод негомологичного соединения концов, из-за которого может нарушиться ген путём потери или добавления нуклеотидов.

Так же существует «off-target» (с английского «вне цели») эффект, где комплекс вырезает ненужный участок ДНК, который схож с целевым. В итоге получается так, что CRISPR делает разрез не в одном месте, а сразу в нескольких, тем самым вызывая ещё больше мутации, которые нанесут вред организму.

[электронный ресурс]-URL:
<https://zen.yandex.ru/media/id/5ae194d5bcf1bc97d58f4283/redaktirovanie-genoma-chelovek-protiv-evoliucii-5aff187b482677ede39e3eed> (дата обращения: 8.09.2020)

[электронный ресурс]-URL:
<https://www.youtube.com/watch?v=opXriPhMEk0&list=LL&index=10&t=2531s>
(дата обращения: 13.09.2020)

Глава 2.1. Разработки модернизаций, обсуждаемые в мире.

1. Усечение гид-РНК.

Учёные, для повышения специфичности, решили сделать гид-РНК длиннее, однако, количество off-target эффектов стало даже больше, чем при классическом варианте. Тогда было принято решение сделать наоборот: укоротить гРНК. В 2013 году сообщили, что при усечении гРНК целевая специфичность увеличилась до 5000 раз, а случаи нецелевых эффектов стало гораздо меньше.

(Приложение 2. Рисунок а)

2. Cas9 никазы.

Нуклеазные домены можно мутировать независимо друг от друга в никазы Cas9. У них имеется один неактивный домен нуклеазы, что приводит к образованию комплекса, осуществляющий одноцепочный разрез. Никазы Cas9 можно использовать в паре, и они будут выполнять два одноцепочных разреза. Такая стратегия увеличивает шанс гомологичной рекомбинации ДНК и уменьшает шанс негомологичного соединения концов. Так же резко снижается вероятность нецелевых эффектов.

(Приложение 2. Рисунок б)

[электронный ресурс]-URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Off-target_genome_editing (дата обращения: 16.09.2020)

[электронный ресурс]-URL: <https://www.youtube.com/watch?v=opXriPhMEk0&t=2532s> (дата обращения: 13.09.2020)

Глава 2.2. Социальная значимость проекта.

Для того чтобы определить, актуальна ли выбранная тема проекта, было принято решение о создании анкеты и проведении социологического исследования в рамках некоторых интересующих нас вопросов по теме проекта.

Пол
45 ответов

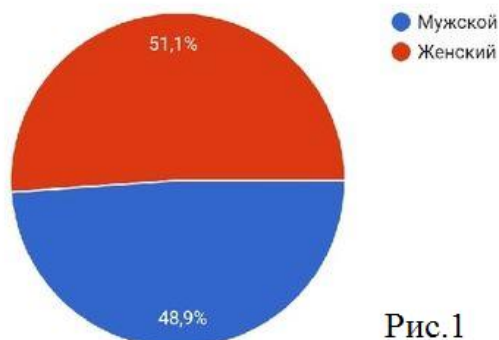


Рис.1

Возрастная категория
45 ответов

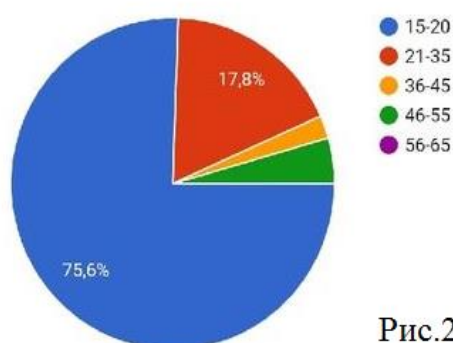


Рис.2

В анкетировании приняло участие 45 респондентов, из которых больший процент 51,1% это представители женского пола.

Наибольшую заинтересованность в опросе вызвало возрастную категорию от 15 до 20 лет. На втором месте от 21 до 35 лет, на третьем месте от 46 до 55 лет, что говорит о большей социальной активности молодого поколения.

Выберите из предложенных заболеваний генные

45 ответов

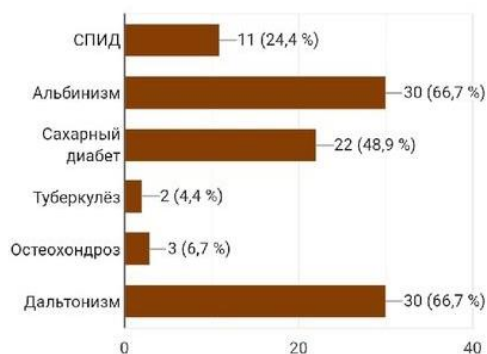


Рис.3

Как Вы думаете, можно ли вылечить генетические заболевания при помощи редактирования генов?

45 ответов

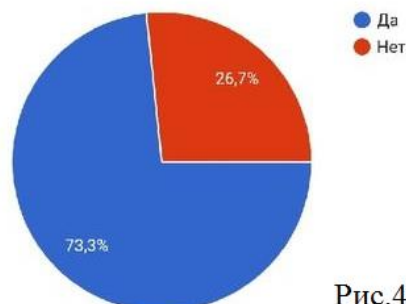


Рис.4

Из предложенных заболеваний к генным относятся: альбинизм, и дальтонизм, а генную предрасположенность к заболеванию сахарный

диабет. В результате опроса 66,7 % респондентов выбрали альбинизм и такой же процент выбрали заболевание дальтонизм. Сахарный диабет считают генным 48,9%. Результаты ответов на данный вопрос говорят, что большинство опрошиваемых обладают знаниями о классификации генных заболеваний. Но, в то же время, небольшая часть респондентов заблуждаются о заболеваниях, являющиеся генными.

Большая часть граждан, участвующих в анкетировании, считают, что можно вылечить генетические заболевания при помощи редактирования генов. Таким образом, опрошиваемые верят в возможность лечения наследственных заболеваний новыми методами исследований медицинских ученых в области генетики.

Знаете ли Вы о способах редактирования генов?

45 ответов

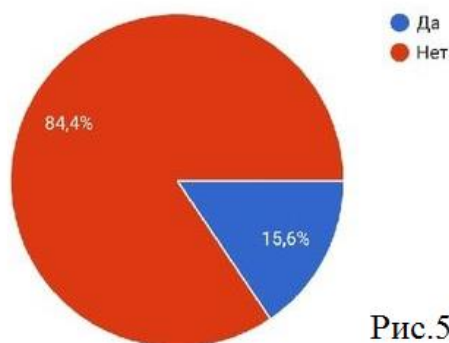


Рис.5

Есть ли у Вас генетическое заболевание?

45 ответов

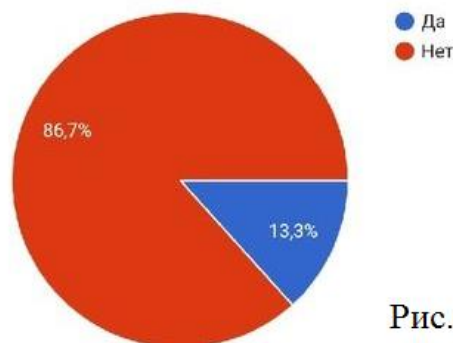


Рис.6

В возможность лечения наследственных заболеваний опрошиваемые респонденты надеются. Но, к сожалению, способы редактирования генов не знают, так как не имеют отношения к медицинским исследованиям и не являются работниками медицинских учреждений.

Большинство опрошиваемых – 86,7% не имеют генетические заболевания, что подтверждает их неосведомленность о способах редактирования генов.

Готовы ли Вы отредактировать свои гены, чтобы вылечиться/не заболеть?

45 ответов

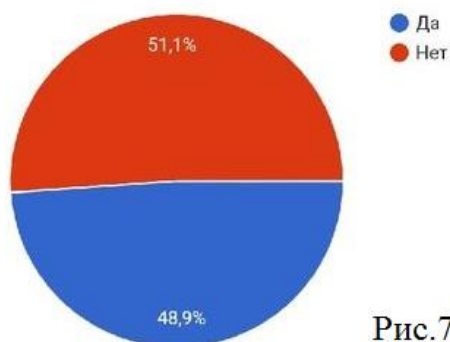


Рис.7

Считаете ли Вы правильным, что человек вмешивается в то, что заложено природой?

45 ответов

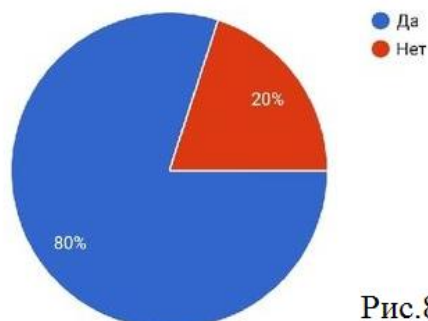


Рис.8

Отредактировать свои гены, чтобы вылечиться или не заболеть 51,1% граждан не готовы к данной процедуре. Можно сделать вывод, что люди боятся последствий вмешательства в их собственный геном, но не против, чтобы эти исследования проводили на животных или людях, которые пожелали участвовать в эксперименте добровольно.

Исходя из вышесказанного, модернизация метода редактирования генов в данном проекте решит множество проблем, связанных с методами лечения больных, имеющих различные генетические заболевания. Решения данного проекта увеличат количество граждан, желающих вылечить свои заболевания, передавшиеся по наследству, и уменьшат количество рисков вмешательства в геном.

Глава 2.3. Синтез методов модернизации редактирования генов и его анализ.

Предлагается создать синтез двух методов, то есть комплекс с усечённой гид-РНК и отсутствующим доменом нуклеазы (приложение 3, рисунок а).

Таблица 1 Достоинства и недостатки методов

Метод усечения гид-РНК	Метод Cas9-никазы
<i>Плюсы:</i>	<i>Плюсы:</i>
1. Уменьшает вероятность нецелевых эффектов.	1. Резко снижает вероятность нецелевых эффектов.
	2. Увеличивает шанс гомологичной рекомбинации ДНК.
<i>Минусы:</i>	<i>Минусы:</i>
1. Есть шанс того, что при двуцепочном разрыве клетка использует негомологичное соединение ДНК.	1. Так как используются два белка, то есть вероятность, что один из них найдёт другую цель для разреза.

Преимущества синтеза двух методов:

- 1) Достаточно снижен риск нецелевых эффектов, что повышает специфичность метода и снижает непредвиденные мутации.
- 2) Благодаря одноцепочным разрезам повышается вероятность гомологичной рекомбинации ДНК.
- 3) Так как мутаций будет гораздо меньше, то точность метода возрастает, что позволяет проводить более достоверные эксперименты.
- 4) Безошибочно вырезая нужный ген, учёные могут открыть новые функции определённых генов и их значение в организме человека и животных.
- 5) С помощью данного метода возрастает шанс выздоровления без рисков навредить пациенту.

Необходимые специалисты для реализации: биологи, химики, генные инженеры, медицинские и научные сотрудники лабораторий.

Время на разработку: от 5 до 10 лет.

Глава 2.4. Этапы внедрения и реализация проекта.

1. Теоретическое исследование.

На первом этапе необходимо изучить, каким образом можно лечить наследственные заболевания. В нашем случае, это редактирование генов. А так же узнать, какие есть методы редактирования генов, и каким образом их можно улучшить. Исследовать методы модернизации, которые уже существуют, а какие находятся на этапе разработки.

2. Прикладные исследования.

Исследуем, насколько важна модернизация и как она может помочь заболевшим людям.

3. Разработка функционала.

Необходимо изучить функции комплекса. У него должна быть усечённая гид-РНК и один мутированный домен нуклеазы. Комплекс должен осуществлять одноцепочный разрез ДНК.

4. Эксперимент на лабораторных животных.

Нужно провести эксперимент на животных, прежде чем переходить к лечению людей. При обнаружении ошибок в функционале метода, следует их исправить и провести исследование ещё раз.

5. Эксперимент на людях.

После проведения удачного опыта над животными, можно переходить на людей. Необходимо согласовать проведение исследования на людях с научно-медицинским сообществом. Так же следует найти добровольцев, которые будут согласны на проведение данного опыта.

6. Поиск инвестора.

Находим компанию или конкретного спонсора, который будет инвестировать наш проект. Договариваемся и согласовываем условия.

7. Тестирование на реальных пациентах.

Производим тестовую партию и передаём врачам, которые проведут тестирование на больных. Анализируем состояние пациентов, их самочувствие. Если во время тестирования были найдены ошибки, то исправляем их.

Экономические расчеты

Экономические расчеты в проекте представлены методикой расчета затрат на проект.

1) Определяем общий фонд зарплаты.

- Прямая зарплата научного сотрудника молекулярной биологии

$$Z_{\text{пр}} = 26000 \text{ (руб.)}$$

- Премия за своевременное выполнение работы и качественные показатели

$$П = 45 \% Z_{\text{пр}} = 11700 \text{ руб}$$

- Фонд основной заработной платы

$$\Phi_{\text{осн}} = Z_{\text{пр}} + П = 26000 + 11700 = 37700 \text{ руб.}$$

- Дополнительная зарплата

$$Z_{\text{д}} = 10\% (Z_{\text{пр}} + П) = 3770 \text{ руб.}$$

- Выплаты по районному коэффициенту

$$P_{\text{к}} = 15\% (Z_{\text{пр}} + П + Z_{\text{д}}) = 6220,50 \text{ руб.}$$

- Дополнительный фонд

$$\Phi_{\text{доп}} = Z_{\text{д}} + P_{\text{к}} = 9990,50 \text{ руб.}$$

- Общий фонд зарплаты

$$\Phi_{\text{общ}} = \Phi_{\text{осн}} + \Phi_{\text{доп}} = 47690,50 \text{ руб.}$$

- $N_{\text{соц}}$ – социальные отчисления

$$N_{\text{соц}} = 30\% \cdot \Phi_{\text{общ}} = 14307,15 \text{ руб.}$$

- Общий фонд зарплаты с социальными отчислениями:

$$\Phi_{\text{общ}} + H_{\text{соц}} = 61997,65$$

2) Расчет накладных расходов.

Накладные расходы включают неучтенные расходы (на электроэнергию, амортизацию оборудования и помещения, зарплату консультантов, разработку функционала, эксперименты, рекламу метода и т.д.). Накладные расходы принимаются, укрупнено в размере (100-200)% от основного фонда зарплаты.

$$НР = 200\% \cdot (З_{\text{пр}} + П) = 75400 \text{ (руб.)}$$

3) Смета затрат.

Таблица 2. Смета затрат

№ п/п	Статьи затрат	Сумма, руб.
1	Общий фонд зарплаты проектировщика с социальными отчислениями	61997,65
2	Накладные расходы	75400
3	Всего расходов	137397,65

Таким образом, расходы на проект в расчете на одного научного сотрудника составляет 137397,65 руб. Расходы увеличиваются в соответствии с количеством сотрудников, необходимых для реализации проекта.

[электронный ресурс]-URL: <http://5fan.ru/wievjob.php?id=78529> (дата обращения: 04.11.2020)

[электронный ресурс]-URL: <https://www.bibliofond.ru/view.aspx?id=469286> (дата обращения: 04.11.2020)

Заключение.

Целью проекта являлось создание новой модернизации для метода редактирования генов CRISPR/Cas9.

Были поставлены задачи, такие как:

- 1) Изучение теоретического материала и научных работ известных учёных.
- 2) Исследование различных методов модернизации редактирования генов.
- 3) Разработка нового метода модернизации с наименьшим количеством рисков для человека.

Во время исследования была создана модернизация метода редактирования генов CRISPR/Cas9. Чтобы его разработать, потребовалось изучить возникновение наследственных заболеваний, как с ними бороться. Исследовать существующие разработки. Также необходимо было проконсультироваться с научными сотрудниками в области медицины и генной инженерии.

Литература.

1. Асанов А. Ю., Демикова Н.С., Морозов С.А. Основы генетики и наследственные нарушения развития у детей//под редакцией Асанова А.Ю. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 224 с.
2. Издательство Кембриджского университета. Кембриджский словарь четвертое издание – К, 2013. – 1844 с.
3. Мазур О.Ч., Никитинская Т.В. Наглядный школьный курс: биология удобно и понятно.- М: Эксмо, 2019. – 192 с.
4. Швырев А.А., Муранова М.И. Словарь медицинских и общемедицинских терминов-М: Феникс, 2014.-190 с.
5. [электронный ресурс]-URL: <https://cont.ws/@vladb/2028332> (дата обращения: 9.09.2020).
6. [электронный ресурс]-URL: <http://5fan.ru/wievjob.php?id=78529> (дата обращения: 04.11.2020)
7. [электронный ресурс]-URL: <https://hightech.plus/2018/07/25/crispr-dlya-chainikov-kratkii-putevoditel-po-glavnoi-bitehnologii> (дата обращения: 07.09.2020).
8. [электронный ресурс]-URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Off-target_genome_editing (дата обращения: 10.09.2020).
9. [электронный ресурс]-URL: <https://ustamivrachey.ru/genetika/geneticheskie-zabolevaniya> (дата обращения: 10.09.2020).
- 10.[электронный ресурс]-URL: <https://www.bibliofond.ru/view.aspx?id=469286> (дата обращения: 04.11.2020)
- 11.[электронный ресурс]-URL: <https://www.youtube.com/watch?v=opXriPhMEk0&t=2532s> (дата обращения: 9.09.2020).
- 12.[электронный ресурс]-URL: <https://zen.yandex.ru/media/id/5ae194d5bcf1bc97d58f4283/redaktirovani-e-genoma-chelovek-protiv-evoliucii-5aff187b482677ede39e3eed> (дата обращения: 8.09.2020).
13. [электронный ресурс]-URL: <https://zen.yandex.ru/media/tibiolog/crispcas9tehnol..> (дата обращения: 9.09.2020).

Приложение 2. Существующие методы модернизации.

Усечение гид-РНК.

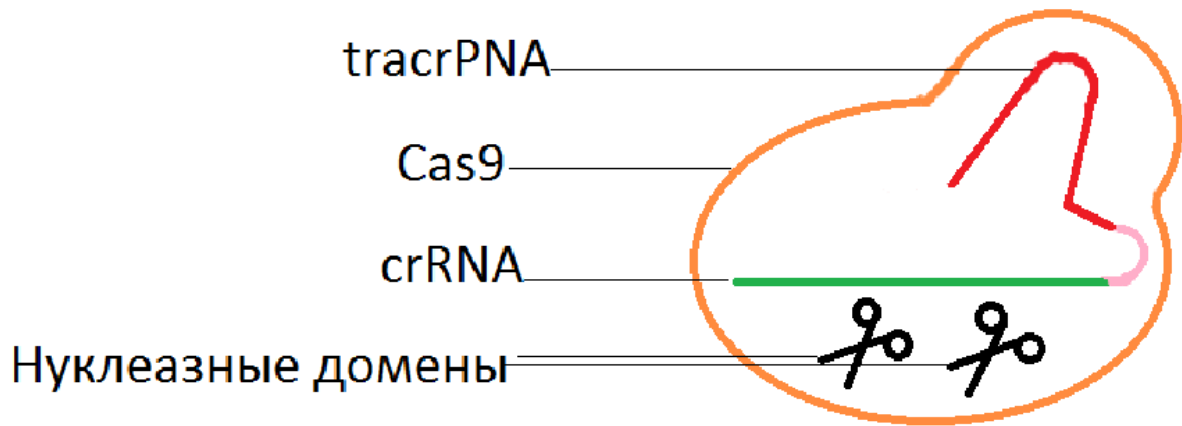


Рис. а

Cas9 никазы.

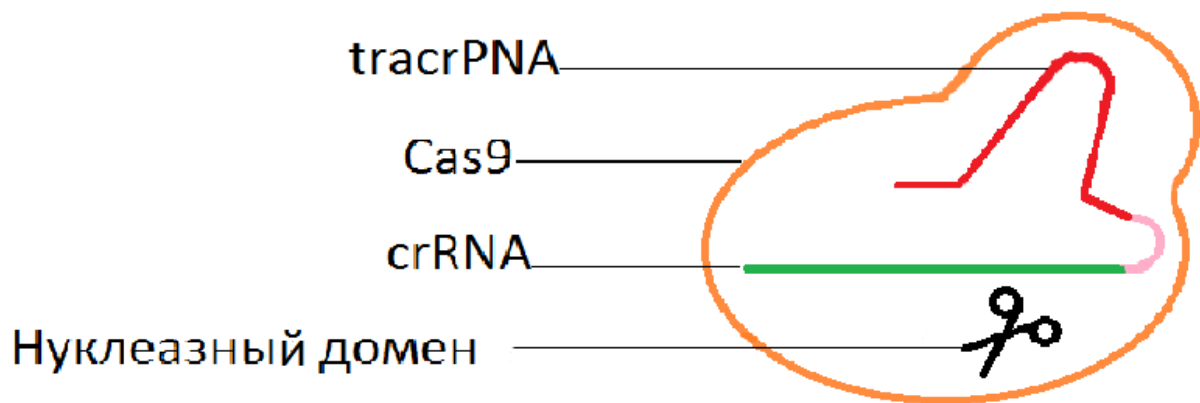


Рис. б

Приложение 3. Синтез методов модернизации.

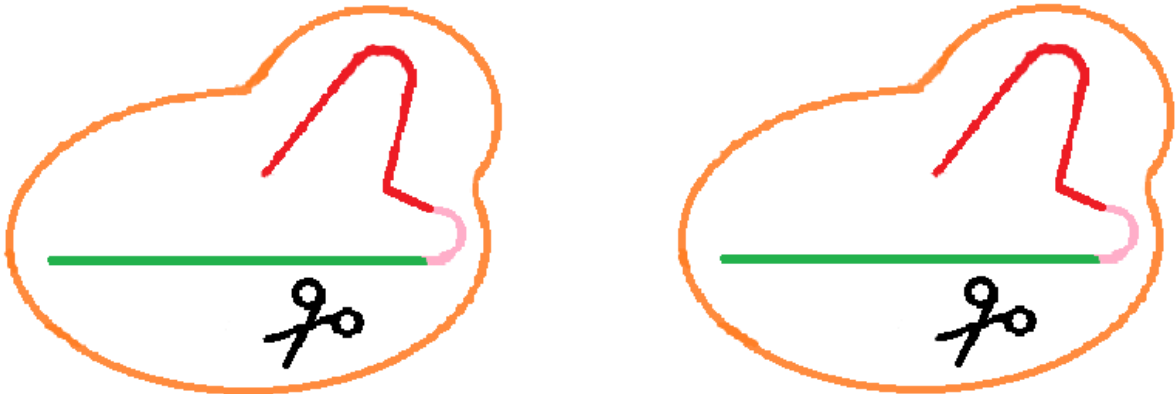


Рис. а