

Дженнифер Даудна
Сэмюел Стернберг

ТРЕЩИНА В МИРОЗДАНИИ

Редактирование генома:
невероятная технология,
способная управлять эволюцией

Перевод с английского
Светланы Ястребовой



издательство **ACT**

Москва

Глава 3

Взламывая код

Я помню, как в первый раз вошла в настоящую исследовательскую лабораторию, помню звуки, запахи и ощущение открывающихся возможностей — чувства того, как постепенно раскрываются загадки природы. Это был 1982 год, и после первого курса колледжа я приехала к родителям на Гавайи. Мой отец, профессор английского языка в Гавайском университете, договорился со своим коллегой, профессором биологии Доном Хеммесом, о том, чтобы я смогла провести несколько недель в его лаборатории. Вместе с двумя другими студентами я получила возможность исследовать, как гриб *Phytophthora palmivora* заражает папайю. Изучение этого гриба, доставляющего большие неприятности фермерам, выращивающим папайю, оказалось очень интересным. Он быстро и легко рос в лабораторных условиях, и его можно было фиксировать на разных стадиях развития, благодаря чему мы были способны выявить химические изменения, происходящие во время роста. Тем летом я научилась заливать образцы гриба смолой и делать с них тонкие срезы для анализа под электронным микроскопом. Хотя я посвятила этому проекту лишь небольшое время, в результате нашей работы мы обнаружили нечто важное: ионы кальция играют принципиальную роль в развитии гриба, подавая его клеткам сигнал для роста в ответ на наличие питательных

веществ. Тогда я впервые почувствовала трепетное волнение, сопутствующее научному открытию, о котором я столько раз читала раньше, — и теперь мне хотелось испытать его вновь.

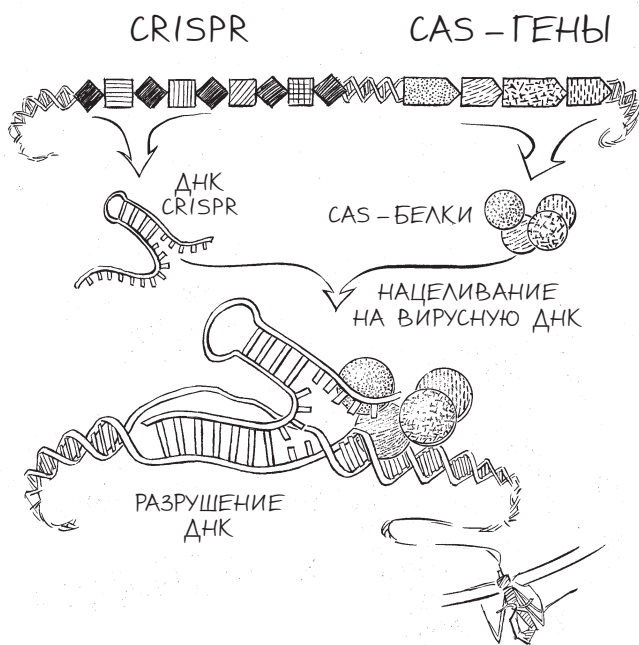
Атмосфера умиротворения и спокойной концентрации, характерная для маленькой исследовательской команды Дона Хеммеса, привлекла меня, однако с годами я осознала, что являюсь частью куда большего сообщества ученых и каждый из нас своим путем идет к открытию законов природы. Каждый крошечный шаг вперед был словно еще одной правильно подобранной деталью огромного пазла, в котором работа одного исследователя строится на работе других ради общей цели — сборки цельной картины.

Проект по изучению CRISPR хорошо символизирует этот аспект научной работы: несколько исследователей по всему миру работали над материалами, из которых в конце концов сложится огромная область исследования со всеми возможными последствиями и вариантами практического применения технологии. Когда мы собирали информацию о CRISPR, нашей маленькой командой двигали те же эмоции, что и множеством других ученых: чувство общности, совместной увлеченности и любопытства, — словом, те чувства, что и привлекли меня изначально в мир науки.

В те дни, когда эта область исследования только начинала развиваться, меня и Блейка заряжала энергией работа наших коллег из компании *Danisco*, из Северо-Западного университета и Вагенингенского университета, и в то же время нас завораживало то, как много фундаментальных вопросов о CRISPR все еще оставались без ответа. Хотя биологи тогда уже понимали, что CRISPR обеспечивает бактерии и археи адаптивным иммунитетом к фагам и что последовательности ДНК фагов, которые соответствуют РНК CRISPR, каким-то образом становятся мишенями для уничтожения, никто на самом деле не знал, *как* это все работает. Мы задались вопросом: каким образом различные молекулы в составе этой системы действуют сообща для уничтожения вирусной ДНК? И что

конкретно происходит на этапах иммунного ответа, связанных с наведением на цель и ее уничтожением?

Мы сконцентрировались на этих вопросах и, соответственно, на задачах, которые необходимо было решить, чтобы найти ответы. Нам нужно было выяснить, каким образом бактерии вытаскивают короткие фрагменты ДНК из генома фага в разгар инфекции и точнейшим образом встраивают их в существующую структуру CRISPR — так что у защитной системы появляется возможность нацеливаться на генетический материал вируса. Также нужно было определить, каким образом молекулы РНК CRISPR вырабатываются внутри клетки и превращаются из длинных нитей в гораздо более короткие, причем каждая из этих последних содержит отдельную последовательность, совпадающую с вирусной. И — что, вероятно,



Нацеливание на ДНК посредством РНК CRISPR и Cas-белков

наиболее важно — нам предстояло выяснить, каким образом фрагмент РНК образует пару с комплементарным ему участком ДНК бактериофага и вызывает разрушение этой ДНК. Это было главным вопросом во всей системе защиты, которую мы изучали, и мы не могли полностью понять CRISPR, не объяснив эту сторону процесса.

Было ясно, что для решения этих вопросов нам нужно выйти за рамки генетического исследования и применить скорее биохимический подход, который позволил бы нам изолировать молекулы, составляющие CRISPR, и изучать их поведение. Кроме того, было необходимо взглянуть на проблему в более широкой перспективе и рассматривать не только сам механизм CRISPR, но и все ассоциированные с CRISPR гены, или *cas*-гены, которые в бактериальных геномах примыкают к областям CRISPR и, видимо, кодируют особые типы белков — ферменты. Если коротко, этот класс белковых молекул отвечает за катализ всех видов межмолекулярных реакций в клетках. Если бы мы выяснили, что именно делают эти белковые ферменты Cas, мы бы значительно приблизились к пониманию того, как работает CRISPR.

Ученые могут многое узнать о функции гена, лишь посмотрев на его химический состав. Фрагменты ДНК, составляющие каждый ген, содержат всю информацию, необходимую клетке для сборки белков из аминокислот. Так как известен генетический код, который используют клетки для перевода четырех “букв” ДНК в двадцать “букв” белка, биологи могут определить последовательность аминокислот в белке, который будет производиться по информации с гена, зная только изначальную последовательность ДНК. Затем, сравнивая полученную последовательность аминокислот со сходными последовательностями у других, лучше изученных белков, ученые могут обоснованно прогнозировать функции многих различных генов.

Выдвигая такие многоступенчатые предположения, специалисты в области вычислительной биологии уже выяснили химический состав сотен различных *cas*-генов, непременно прилегающих к областям CRISPR. Какой бы организм вы ни рассматривали, правило неизменно: если в его геноме содержится ДНК CRISPR, то в непосредственной близости также будут располагаться *cas*-гены. Это выглядит так, словно CRISPR эволюционировал вместе с *cas*-генами, и их невозможно представить друг без друга.

Мы предположили, что белки, кодируемые этими *cas*-генами, должны вплотную работать с ДНК CRISPR — или, возможно, с молекулами РНК CRISPR, или даже с ДНК фагов. Было совершенно очевидно: прежде чем мы сможем разобраться в устройстве иммунной системы CRISPR, нам необходимо выяснить, как работают эти гены, и определить биохимические функции белков, которые они вырабатывают.

Для начала Блейк выбрал два вида бактерий — *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, которые содержат определенные типы систем CRISPR. Бактерия *E. coli*, например, зарекомендовала себя в качестве лучшего друга биохимика. Неважно, чей ген изучает этот биохимик — микроба, растения, лягушки или человека, — работа часто начинается с внедрения этого гена в искусственную мини-хромосому (плазмиду); затем создается специализированный штамм *E. coli*, который примет плазмиду как часть собственного генома. Совмещая интересующий его ген с другими синтетическими ДНК-инструкциями, биохимик может заставить *E. coli* не только создавать десятки копий плазмиды в расчете на одну клетку, но и направлять большинство своих ресурсов на конвертирование информации с изучаемого гена в тысячи копий белка, который тот кодирует. Таким образом биохимик практически превращает *E. coli* в своего рода микроскопический промышленный биореактор, запрограммированный на массовую выработку определенных белков.

Блейк быстро сконструировал плазмиды из отдельных ассоциированных с CRISPR генов, скопировав последние

из геномов *E. coli* и *P. aeruginosa*. Собрав десятки штаммов *E. coli*, которые он “научил” использовать плазмиды как часть своего генетического материала, Блейк начал литрами выращивать культуры каждого из созданных штаммов, чтобы наработать достаточно Cas-белков для своих экспериментов. Давая бактериям ночь на размножение, по утрам Блейк выливал содержимое колб с культурами в большие емкости и отделял клетки от жидкой питательной среды в больших скоростных центрифугах, в которых клетки подвергались воздействию силы, в четыре тысячи раз большей, чем сила земного притяжения. Затем, работая с каждым штаммом по отдельности, он помещал клетки в небольшое количество солевого раствора и подвергал эту жижу воздействию высокоэнергетических звуковых волн, которые резко разрывали клетки, высвобождая их содержимое — в том числе и выработанные ими Cas-белки.

После отделения лишнего материала — разрушенных мембран, вязких ДНК и прочего клеточного “мусора” — у Блейка оставалось несколько тысяч бактериальных белков, из которых ему нужен был только один: Cas-белок. Но благодаря хитроумному строению плазмиды Cas-белок содержал особенный химический ярлык, или придаток, который отличал его от остальных тысяч белков. С помощью определенной стратегии очистки (а также проведя несколько раундов дополнительной очистки) Блейк смог отделить этот молекулярный придаток и получить чистые высококонцентрированные образцы каждого из Cas-белков, которые мы хотели изучить.

Когда Cas-белки оказались в его распоряжении, Блейк наконец смог проводить различные эксперименты для изучения того, что именно делают эти ферменты. Нашим первым вкладом в область изучения CRISPR была публикация о следующем открытии: мы обнаружили, что белковый фермент под названием Cas1 мог разрезать ДНК¹ таким образом, что это, возможно, помогало вставлять новые фрагменты ДНК фага в массив CRISPR на стадии формирования памяти иммун-

ной системы. Это приблизило нас к пониманию того, каким образом CRISPR “ворует” кусочки ДНК у атакующих фагов и встраивает эту генетическую информацию в свою собственную, закладывая основу для двух фаз иммунного ответа: наведения на цель и ее уничтожения.

Приблизительно на этом этапе Блейк привлек к работе над проектом магистрантку Рэйчел Хорвитц, и вместе они сделали еще одно открытие. Работая со вторым белковым ферментом, Cas6, Рэйчел и Блейк обнаружили, что он, как и Cas1, функционирует в качестве своего рода химического колуна². Однако в случае Cas6 задача заключалась в том, чтобы избирательно и методично разрезать длинные молекулы РНК CRISPR на более короткие куски, которые могли бы быть использованы для нацеливания на ДНК фага.

По мере того как мы и другие исследователи собирали детали CRISPR-пазла, медленно, но верно начинала вырисовываться общая картина. В ней мы уже могли различить ответы на некоторые вопросы, которые поставили перед собой в начале работы над проектом. Мы видели, что нам предстоит открыть еще множество функций Cas-белков. В ходе исследования мы обнаруживали все больше и больше таких белков, которые оказывались ферментами, разрезающими ДНК или РНК, — а значит, вероятно, играли в иммунном ответе CRISPR роль, похожую на роль Cas1 и Cas6.

К 2010 году проект по изучению CRISPR расширился, в него вошли еще несколько участников моей команды, включая соавтора этой книги Сэма Стернберга, и атмосфера в лаборатории буквально искрилась от радостного возбуждения. Наше понимание CRISPR, казалось, улучшалось каждую пару недель, а у изучаемых нами ферментов открывались интересные и необычные свойства, которые, как мы понимали, могут иметь практическое применение. К примеру, мы заинтересовались идеей использования новых ферментов, разрезающих РНК, в качестве своего рода диагностического инструмента для выявления отличительных молекул РНК ви-

русов человека, включая вирусы лихорадки Денге и желтой лихорадки; для воплощения этой идеи мы получили грант от фонда Билла и Мелинды Гейтс. Вскоре мы стали сотрудничать с биоинженерной лабораторией в Беркли, чтобы совместить эту технологию с их инновационной системой обработки крошечных количеств жидкости для выявления вирусов в крови или слюне.

Затем в 2011 году мы с Рэйчел основали компанию под названием *Caribou Biosciences*, чтобы начать получать доход от Cas-белков. В то время мы мечтали создать простые наборы инструментов, которыми могли бы пользоваться ученые и даже врачи для выявления вирусной или бактериальной РНК в биологических жидкостях. Для нас обеих этот выход за пределы фундаментальных научных исследований открыл двери в удивительный новый мир. Следующей весной, защитив свою кандидатскую диссертацию, Рэйчел стала президентом и генеральным директором молодой и быстро растущей компании; я стала научным советником — эта должность позволяла мне делать вклад в проекты *Caribou* и вместе с тем успевать выполнять все университетские дела. Позже *Caribou* прославилась благодаря другой технологии, связанной с CRISPR, — куда более продвинутой.

В то время наши с Блейком основные интересы сместились с ферментов, режущих молекулы ДНК или РНК бактериальной системы CRISPR, на белки, разрезающие вирусную ДНК, — то есть в операции “найти и уничтожить”, которую проводит CRISPR, они отвечают за “уничтожить”. Мы полагали, что, как только РНК CRISPR идентифицирует вирусную ДНК и соединяется с ней, специальные ферменты атакуют этот чужеродный генетический материал, разрезают его на части и обезвреживают. Интересные свидетельства в пользу этой гипотезы приходили от наших коллег по изучению CRISPR, среди которых были Сильвен Мойно из Университета Лавала в Канаде и Виргиниус Шикшнис из Вильнюсского университета. Исследование Сильвена показало,

что ДНК фага, на которую нацеливается система CRISPR, разрезается³ в пределах последовательности, совпадающей с РНК CRISPR, а Виргиниус обнаружил, что уничтожение фагов в бактерии зависит от присутствия определенных *cas*-генов⁴. Понимание того, каким образом генетический материал фага в конечном счете разрушается в ходе иммунного ответа, подвело бы нас к пониманию сути всей системы CRISPR в целом.

Исследование Блейка в сочетании с работой наших коллег-лабораторов в лаборатории Джона ван дер Ооста лишь приоткрыло всю сложность этого процесса уничтожения вируса. В двух бактериальных системах, которые мы исследовали, — *E. coli* и *P. aeruginosa* — клеткам нужны были многочисленные Cas-белки для нацеливания на вирусную ДНК и ее расщепления. К тому же скоординированная атака на генетический материал фага проходила в два отдельных этапа. Сначала молекула РНК CRISPR связывалась с куда более крупной структурой, содержащей, как показало исследование ван дер Ооста, около десяти или одиннадцати разных Cas-белков. Этой молекулярной машине исследователи дали яркое название *Cascade* (аббревиатура выражения “связанный с CRISPR комплекс для противовирусной защиты”, *CRISPR-associated complex for antiviral defense*), и она служит чем-то вроде GPS-координат, определяющих точную последовательность вирусной ДНК, подлежащей уничтожению. На втором этапе, после того как *Cascade* определяла и помечала совпадающую последовательность ДНК, подлежащую уничтожению, появлялся белковый фермент под названием Cas3 — еще одна нуклеаза и, собственно, само оружие атаки, — чтобы разрезать целевую ДНК.

Проводя опыты для серии статей, которые мы опубликовали в 2011–2012 годах, мы еще лучше поняли механику этого процесса. Используя мощь электронного микроскопа и тесно сотрудничая с профессором Беркли Эвой Ногалес и ее постдоком Гейбом Ландером, мы получили первые изображения

структуры *Cascade*⁵ в высоком разрешении. Эти изображения показали, что структура Cas-белков и молекул РНК CRISPR спиралеобразная; можно было наблюдать, как микроскопическая машина плотно оборачивалась вокруг вирусной ДНК, подобно питону, обвивающему газель. Мы были поражены, увидев, как красиво менялась ее трехмерная форма для выполнения геометрической задачи, необходимой для нацеливания на ДНК. Мы также осознали важность взаимодействий, способствующих образованию пар оснований и позволяющих “буквам” РНК CRISPR распознавать комплементарные “буквы” вирусной ДНК; мы обнаружили, что *Cascade* действует удивительно точно, прикрепляясь только к тем мишеням на вирусной ДНК, которые полностью или практически полностью совпадают с РНК CRISPR. Столь высокая разборчивость позволяла *Cascade* избегать случайного нацеливания на собственную ДНК бактерии и ее уничтожения — катастрофического аутоиммунного события, которое бы вызвало быструю смерть клетки.

Дополнительные исследования в литовской лаборатории Виргиниуса Шикшниса показали, каким образом фермент Cas3 уничтожает вирусную ДНК, которую *Cascade* выбрала в качестве мишени⁶. В отличие от более простых нуклеаз, Cas3 не надрезал ДНК один раз, а “разжевывал” ее на сотни кусочков. Как только *Cascade* отправляла Cas3 к месту, где последовательности РНК CRISPR и вирусной ДНК совпадают, Cas3 начинал двигаться вперед и назад вдоль генома фага со скоростью свыше трех сотен пар нуклеотидов в секунду, нарезая ДНК и превращая длинный геном фага в беспорядочную кучу обломков. Если более простые нуклеазы можно уподобить секатору, то Cas3 уместно сравнить с механизированными садовыми ножницами. Его скорость и эффективность поражают.