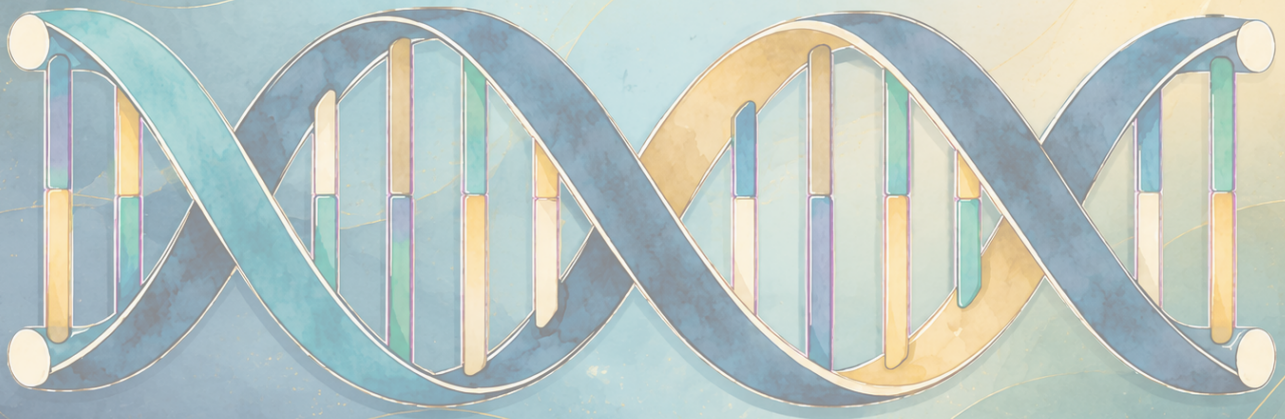




The CLEAN PAPER

WHAT THE PAPER SAYS · WHAT IT DOESN'T · WHY IT MATTERS

RNA-ով ուղղորդվող, DNA թիրախավորող համակարգերի նոր ընտանիք՝ CRISPR-ից տարբեր և դեռ ոչ gene-editing գործիք

Մանրէային գենոմները կառուցվածքով որոնելով՝ հետազոտողները գտել են *TIGR-Tas*-ը՝ RNA-ով ուղղորդվող, DNA կտրող նախկինում անհայտ համակարգերի ընտանիք: Ի տարբերություն CRISPR-ի՝ այն օգտագործում է երկմաս *guide* և «PAM» վայրէջքի *motif* չի պահանջում: Նրանք ցույց են տվել, որ մի տարբերակ կարելի է ծրագրավորել մարդու բջիջներ խմբագրելու համար, քայց միայն ցածր արդյունավետությամբ, և կառուցվածքային տվյալներով կապել են ընտանիքը այլ RNA-guided մեքենաների հետ: Սա RNA-ով ուղղորդվող կենսաբանության իրական ընդլայնում է և ապագա գործիքների հնարավոր մեկնակետ՝ *basic-science* հայտնագործություն և *proof of concept*, ոչ հասուն *gene editor* կամ թերապիա:

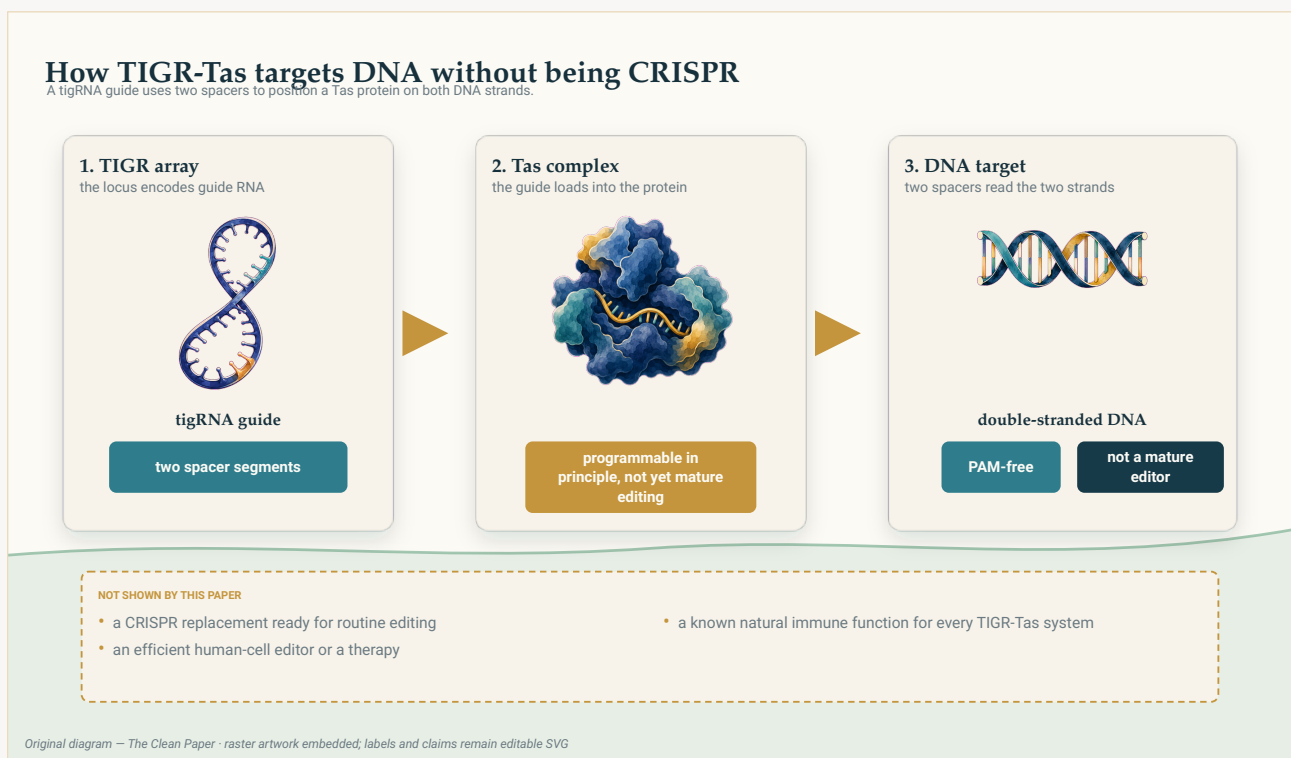
Written by Lucio Vaglio · Cross-checked by Laura Nesso · Edited by Michele Renda · Figures by Laura Nesso and Nova Vela · AI-assisted, human-reviewed

Paper: *TIGR-Tas: A Family of Modular RNA-Guided DNA-Targeting Systems in Prokaryotes and Their Viruses*, Guilhem Faure, Makoto Saito, Max E. Wilkinson et al.; Feng Zhang (corresponding author), *Science* 388, 6746, eadv9789 (2025) · DOI: 10.1126/science.adv9789

Նոր ճյուղ ՌՆԹով ուղղորդվող մեքենաների ծառի վրա

Ժամանակ առ ժամանակ կենսաբանական հոդված է հայտնվում մի վերնագրով, որը ինքը երբեք չի խնդրել: Այս աշխատանքի համար այդ վերնագիրը «նոր CRISPR»-ն էր: Բայց իրական աշխատանքը դրանից ավելի հետաքրքիր է և, ինչպես սովորաբար, ավելի համեստ:

Սկսենք այն բանից, ինչ CRISPR-ը հայտնի դարձրեց՝ *ՌՆԹով ուղղորդվող համակարգից*: Հնարքը այն է, որ սպիտակուցը պարտադիր չէ նախապես «ծրագրավորված» լինի միայն մեկ թիրախ ճանաչելու համար: Փոխարենը այն իր հետ կրում է ՌՆԹի կարճ հատված՝ ուղեցույց, և գնում է այնտեղ, որտեղ այդ ուղեցույցի հաջորդականությունը համընկնում է թիրախի հետ: Փոխեք ուղեցույցը՝ կփոխվի թիրախը: Հենց այս ծրագրավորվողությունն է պատճառը, որ CRISPR-ը գործիք դարձավ: Բայց բնության մեջ CRISPR-ը միակ ՌՆԹով ուղղորդվող համակարգը չէ, և այս հոդվածի հարցը ավելի համբերատար է. ուրիշ ի՞նչ տեսակներ կան, և ի՞նչ կարող են դրանք մեզ սովորեցնել:



TIGR-Tas-ը երկու spacer ունեցող ուղեցույցով կարողում է ԴՆԹի հակադիր շղթաները: Սա նոր ճարտարապետություն է, ոչ պատրաստ գեն-editing գործիք:

Original diagram — The Clean Paper CC BY 4.0

Որոշումը սկսելու համար հեղինակները համընկնող գենային հաջորդականություններ չեն փնտրել. Էվոլյուցիոն ժամանակի ընթացքում դրանք չափազանց շատ են փոխվում, որպեսզի հեռավոր ազգակցությունը հեշտ երևա: Նրանք փնտրել են *ձևեր*:

Սկսելով CRISPR-ի Cas9 սպիտակուցի այն մասից, որը բռնում է ուղեցույց ՌՆԹ-ն, նրանք կանխատեսված սպիտակուցային կառուցվածքների շտեմարաններում որոնել են նույն կերպ կառուցված բաներ: Այդ հետքը՝ բակտերիալ «ցատկող գենի» և սովորական բջիջների՝ իրենց ՌՆԹ-ն քիմիապես փոփոխելու մեքենայի միջով, հասցրել է իսկապես նոր ընտանիքի:

Ինչ արեցին հեղինակները

Կառուցվածքային որոնումը հայտնաբերել է նախկինում չճանաչված սպիտակուցային ընտանիք, որը կոդավորվում է հիմնականում bacteriophage-ներում՝ բակտերիաները վարակող վիրուսներում, archaea-ի վիրուսներում և փոքր մակարոյծ բակտերիաներում: Յուրաքանչյուր այդպիսի սպիտակուցի կողքին կա ԴՆԹ-ի առանձնահատուկ հատված՝ երկար, կրկնվող array, որը հեղինակներն անվանել են **TIGR array**՝ Tandem Interspaced Guide ՌՆԹ: Սպիտակուցներն անվանել են **Tas**՝ TIGR-associated: Որոշ Tas սպիտակուցներ պարզապես ՌՆԹ բռնող հիմնական մասն են, իսկ մյուսների վրա ավելացված է ԴՆԹ կտրող գործիք՝ երկու տեսակի մոլեկուլային «մկրատներից» մեկը՝ RuvC կամ HNH:

Տվյալների բազայում ընտանիքը գտնելուց հետո նրանք այն տարել են լաբորատորիա. համակարգերը արտահայտել են *E. coli*-ում և հաջորդականություն արել առաջացած փոքր ՌՆԹ-ները, պարզել են, թե այդ ՌՆԹ-ները ինչ կանոններով են գտնում ԴՆԹ թիրախը, ստուգել են՝ կտրող տարբերակներն իրականում կտրո՞ւմ են, փորձել են դրանցից մեկը ծրագրավորել մարդու բջիջներ խմբագրելու համար, իսկ վերջում աշխատող համալիրը սառեցրել և պատկերել են գրեթե ատոմային լուծաչափով:

Ինչ գտան

Ուղեցույցը երկու մասից է: TIGR array-ը մշակվում է մոտ 36 նուկլեոտիդ երկարությամբ կարճ ՌՆԹ-ների, որոնցից յուրաքանչյուրն ունի *երկու* առանձին թիրախավորող հատված: Մեկ հատվածը կարդում է թիրախ ԴՆԹ-ի մի շղթան, մյուսը՝ հակադիր շղթան: Երկուսը միասին ամրացնում են համակարգը տվյալ տեղում: Սա CRISPR-ից իրական մեխանիկական տարբերությունն է, որովհետև CRISPR-ի ուղեցույցը սովորաբար մի շարունակական հատվածով համընկնում է մեկ շղթայի հետ:

Եվ նրան «վարկեքի հարթակ» պետք չէ: Շատ CRISPR նուկլեագենը կարող են կտրել միայն այն դեպքում, երբ թիրախի կողքին կա կարճ, որոշակի ԴՆԹ motif՝ «PAM»: Դա սահմանափակում է, թե որտեղ կարող են ուղղվել: TIGR համակարգերը նման պահանջ չեն ցույց տվել. նրանք հենվում էին միայն թիրախային հաջորդականության վրա: PAM չպահանջող համակարգը, սկզբունքորեն, կարող է ուղղվել ավելի շատ վայրեր:

Կտրող տարրերակները իսկապես և ճշգրիտ կտրեցին: Փոքր ՌՆԹ ուղեցույցով առաջնորդվող՝ RuvC կամ HNH պարունակող Tas սպիտակուցները ԴՆԹում ստեղծել են մաքուր, հաջորդականությունն կոնկրետ կտրվածքներ և առանց ուղեցույցի ոչինչ չեն արել:

Մի տարրերակ հնարավոր եղավ ծրագրավորել մարդու բջիջներ խմբագրելու համար՝ բայց հազիվ: Մարդու բջիջների մշակույթ տեղափոխված և վեց տարրեր գենների դեմ ուղղված Tas սպիտակուցը իսկապես խմբագրումներ է կատարել՝ հաստատելով, որ համակարգը ծրագրավորվող է նաև մեր բջիջներում: Բայց արդյունավետությունը ցածր էր՝ լավագույն դեպքում բջիջների մի քանի տոկոս: Համեմատության համար՝ այսօր օպտիմիզացված CRISPR գործիքները սովորաբար խմբագրում են այն բջիջների մեծ բաժինը, որոնց մեջ ներմուծվում են: Սա ապացույց է, որ համակարգը *կարող է աշխատել*, ոչ թե որ այն արդեն *լավ* գործիք է:

Կառուցվածքը բացատրեց մեխանիզմը և հուշեց ծագման մասին: Պատկերված համալիրում երկու հայելային համաչափ սպիտակուցներ բռնում են ութաձև ուղեցույց ՌՆԹ-ն, մինչդեռ թիրախ ԴՆԹ-ն կտրուկ ծալված է: Հատկանշականորեն, այս ճարտարապետությամբ շատ նման է մեր բջիջների ազգակիցներում հանդիպող box C/D **snoRNP** մեքենային, որը ՌՆԹ-ն քիմիապես փոփոխելու համար է ուղեցույց օգտագործում, ոչ թե ԴՆԹ կտրելու:

Բնական գործառնությունը դեռ պարզ չէ: Երբ հեղինակները համակարգերից մեկը արտահայտել են *E. coli*-ում, այն **չի** պաշտպանել ներխուժող վիրուսներից կամ plasmid-ներից՝ CRISPR-ի սովորական «աշխատանքից»: Փոխարենը բազմաթիվ սերունդների ընթացքում աստիճանաբար հեռացրել է թիրախավորված plasmid-ը: Սա հուշում է, որ բնական դերը կարող է կապված լինել շարժական ԴՆԹ տարրերի միջև դանդաղ մրցակցության, ոչ թե առաջին գծի իմունային պաշտպանության հետ: Բայց փորձը արհեստական, փոխառված միջավայրում էր, և ազնիվ պատասխանը դեռ այն է, որ ոչ ոք չգիտի, թե այս համակարգերը բնության մեջ իրականում ինչ են անում:

Ինչ է սա, ամենայն հավանականությամբ, նշանակում

Երկու բան՝ վստահության տարրեր մակարդակներով:

Ավելի ամուր եզրակացությունը սա է. ՌՆԹով ուղղորդվող համակարգերի հայտնի աշխարհը ավելի մեծ ու բազմազան է, քան CRISPR-ը և վերջին տարիներին հայտնաբերված նրա «ազգակիցները»: TIGR-Tas-ը իսկապես առանձին ճյուղ է՝ ԴՆԹ ճանաչելու իր երկմաս, PAM-ից անկախ մեխանիզմով: Դա քարտեզին իրական նոր հավելում է:

Ավելի խոր և ավելի ենթադրական միտքը հետևյալն է. քանի որ TIGR մեքենան կառուցվածքով նման է մեր բջիջների ազգակիցներում ՌՆԹ խմբագրող snoRNP-ին և նաև հայտնի «ցատկող գենի» մեքենային, այն կարող է մատնանշել Էվոյուցիոն

կապ ՌՆԹով ուղղորդվող *ՌՆԹ փոփոխող* համակարգերի և ՌՆԹով ուղղորդվող *ԴՆԹ թիրախավորող* համակարգերի միջև: Հնարավոր է՝ սա programmable ՌՆԹ ուղեցույցների կյանքի ծառում առաջացման պատմության բացակայող մասերից մեկն է:

Ինչ սա չի ապացուցում

- Սա **պատրաստ գեն-editing գործիք չէ**: Մարդու բջիջներում խմբագրումը ցույց է տրվել, բայց շատ թույլ՝ լավագույն դեպքում մի քանի տոկոս: Սա ծրագրավորվողության ապացույց է, ոչ հասուն editor, և կլինիկական կիրառությունից շատ հեռու է:
- Սա **«CRISPR 2.0» չէ**: Եթե այսօր այն գնահատենք որպես գործիք, CRISPR-Cas9-ը անհամեմատ ավելի արդյունավետ է: TIGR-Tas-ը սկզբունքի ապացույցի փուլում գտնվող նոր *ճարտարապետություն* է, ոչ գործող արտադրանքի ավելի լավ տարբերակ:
- Նրա **կենսաբանական դերը անհայտ է**: Մի փորձարկման մեջ այն հակավիրուսային իմունային համակարգի պես չի գործել, հետևաբար «նոր բակտերիալ իմունային համակարգ» պնդումը հաստատված չէ:
- **Հիմնական մեխանիզմի մեծ մասը դեռ բաց հարց է**՝ ներառյալ այն, թե ուղեցույց ՌՆԹն ինչպես է կտրվում վերջնական երկարության, և բնության մեջ համակարգերն իրականում ինչ են թիրախավորում: Դրանց մեծ մասը հանդիպում է մանրէներում, որոնք դժվար է նույնիսկ մշակել:
- Այստեղ **թերապևտիկ արդյունք չկա**: Սա մանրէների և բջջային մշակույթի մեջ հայտնաբերում և բնութագրում է՝ առանց հիվանդության, բուժման կամ հիվանդի:

Որքանո՞վ է ուժեղ ապացույցը

Հայտնագործության հիմքը ամուր է և անսովոր ամբողջական: Այն սկսվում է մեծածավալ կառուցվածքային որոնումից, շարունակվում լաբորատոր հաստատմամբ՝ ՌՆԹն ինչպես է առաջանում և ինչպես է գտնում ու կտրում ԴՆԹն, ներառում է գործող համալիրի գրեթե ատոմային կառուցվածք և նաև մարդու բջջային փորձը: «Սա ՌՆԹով ուղղորդվող, ԴՆԹ թիրախավորող նոր և տարբեր ընտանիք է» պնդումը մի քանի անկախ ուղղություններով լավ է հիմնավորված:

Վաղ փուլում է այն ամենը, ինչ վերաբերում է օգտակարությանը. խմբագրումն աշխատում է, բայց հազիվ, և այն ամբողջ օպտիմիզացումը, որը CRISPR-ը կենսաբանական հետաքրքրությունից գործիք դարձրեց, TIGR-ի համար դեռ առջևում է: Իսկ պատմության մնացած մասը հիմնականում *եզրակացվում* է տվյալներից. բնական դերը արհեստական փորձից ստացված խելամիտ ենթադրություն է, իսկ Էվոյուցիոն կապը, որքան էլ գեղեցիկ լինի, կառուցվածքային նմանությունից արված փաստարկ է, ոչ հաստատված

պատմություն: Հոդվածը այս տարբերությունները բավական զգուշորեն է պահում:

Ինչու է սա կարևոր

ՌՆԹով ուղղորդվող համակարգերի կատալոգի նախկին ընդլայնումները հետագայում երբեմն շատ օգտակար են դարձել: Այսօրվա գործիքների հիմքում գտնվող Cas9, Cas12, Cas13 համակարգերը, իսկ ավելի վերջերս՝ փոքր IscB/OMEGA սպիտակուցներն ու eukaryotic Fanzor-ները, սկզբում պարզապես նոր նկարագրված կենսաբանություն էին: Դրանցից ոչ մեկը պատրաստ գործիքով չի ծնվել: Երկմաս ուղեցույց և PAM-ի կարիք չունեցող համակարգը իսկապես ուրիշ մեկնակետ է, իսկ PAM-ից անկախ թիրախավորումը հենց այն ճկունությունն է, որ գործիք ստեղծողները գնահատում են:

Բայց ավելի հանգիստ արդյունքը կարող է նույնիսկ ավելի կարևոր լինել, քան գործիք դառնալու հեռանկարը: ԴՆԹ կտրող համակարգը կապելով ՌՆԹ խմբագրող snoRNP մեքենայի և «ցատկող գենի» հետ՝ աշխատանքը հնարավոր թել է գծում ՌՆԹով ուղղորդվող շատ տարբեր համակարգերի միջև կյանքի ծառի վրա: Սա այն տեսակի գտածոն է, որը վերադասավորում է մի ամբողջ ոլորտի պատկերացումը այն մասին, թե որտեղից են եկել իր գործիքները: Երկարաժամկետ առումով դա կարող է ավելի արժեքավոր լինել, քան «նոր մկրատի» հերթական վերնագիրը:

Կարճ ամփոփում

Սպիտակուցային ձևեր, ոչ թե հաջորդականություններ որոնելով՝ հետազոտողները հայտնաբերել են TIGR-Tas-ը՝ ՌՆԹով ուղղորդվող, ԴՆԹ թիրախավորող նախկինում անհայտ համակարգերի ընտանիք, որը հիմնականում հանդիպում է բակտերիալ վիրուսներում և մակաբույծ բակտերիաներում: Նրա ուղեցույց ՌՆԹն անսովոր է՝ մոտ 36 նուկլեոտիդ, երկու առանձին թիրախավորող հատվածով, որոնք կարդում են ԴՆԹի հակադիր շղթաները, և CRISPR-ի նման հարակից «PAM» motif չի պահանջում: ԴՆԹ կտրող անդամները ճշգրիտ են կտրում, մի տարբերակ հնարավոր է եղել ծրագրավորել մարդու բջիջներ խմբագրելու համար, թեև միայն մի քանի տոկոսի արդյունավետությամբ, իսկ գրեթե ատոմային կառուցվածքը ցույց է տվել համալիր, որը հիշեցնում է մեր բջիջներում ՌՆԹ խմբագրող snoRNP մեքենան: Դա հուշում է ՌՆԹ փոփոխող և ԴՆԹ թիրախավորող ՌՆԹով ուղղորդվող համակարգերի միջև խորը էվոլյուցիոն կապի մասին: Սա ՌՆԹով ուղղորդվող կենսաբանության իրական ընդլայնում է և ապագա գործիքների հնարավոր նոր հիմք՝ հիմնականգիտություն հայտնագործություն և գաղափարի գործունակության ցուցադրում, **ոչ** հասուն գեն editor, ոչ «CRISPR 2.0» և ոչ թերապիա: Բնական գործառույթը վայրի պայմաններում դեռ անհայտ է:

Առանց չափազանցության

Ինչ է ցույց տալիս հոդվածը. պրոկարիոտներում և նրանց վիրուսներում ՌՆԹով ուղղորդվող, ԴՆԹ թիրախավորող նոր և առանձին TIGR-Tas ընտանիք՝ հայտնաբերված կառուցվածքային որոնմամբ, երկհատված PAM-free ուղեցույց ՌՆԹ (~36 nt), որը միասին թիրախավորում է ԴՆԹի երկու շղթաները, նուկլեազ ունեցող անդամների ճշգրիտ ՌՆԹ-guided ԴՆԹ cleavage, մարդու բջիջներում ցածր արդյունավետությամբ ծրագրավորվող խմբագրում, գրեթե ատոմային cryo-EM կառուցվածք և կառուցվածքային/Էվոյուցիոն կապեր box C/D snoRNP-ների ու IS110 transposon-ների հետ:

Ինչն է հավանական, բայց ապացուցված չէ. համակարգերի բնական կենսաբանական դերը՝ մեկ արհեստական փորձը հուշում է շարժական տարրերի մրցակցության հետ կապված ոչ պաշտպանական դեր, և ՌՆԹ փոփոխող ու ԴՆԹ թիրախավորող ՌՆԹ-guided համակարգերի միջև առաջարկվող Էվոյուցիոն կամուրջը՝ որը կառուցվածքային փաստարկ է:

Ինչ սա չի ցույց տալիս. հասուն կամ բարձր արդյունավետությամբ գեն-editing գործիք, CRISPR-ի նկատմամբ գործիքային գերազանցություն, հաստատված բնական գործառույթ, ուղեցույց ՌՆԹի վերջնական հասունացման մեխանիզմ կամ որևէ թերապևտիկ կիրառություն:

Հիմնական սահմանափակումները. մարդու բջիջների խմբագրման արդյունավետությունը ցածր է՝ միայն գաղափարի գործունակության ցուցադրում, համակարգերի մեծ մասը գտնվում է դժվար ուսումնասիրվող metagenome-ներում, ուստի բնական թիրախները հիմնականում անհայտ են, կենսաբանական դերի և Էվոյուցիոն ծագման պնդումները եզրակացական են, իսկ բնութագրումը կատարվել է մանրէներում և բջջային մշակությամբ, ոչ հիվանդության համատեքստում:

Որքա՞ն վստահություն պետք է ունենա ընդհանուր ընթերցողը: Բարձր՝ որ սա ՌՆԹով ուղղորդվող, ԴՆԹ թիրախավորող իսկապես նոր և առանձին ընտանիք է՝ նոր երկմաս, PAM-free մեխանիզմով, և որ կառուցվածքային տվյալները իրական են: Բարձր՝ նաև այն հարցում, որ սա **պատրաստ գեն-editing գործիք չէ**, «CRISPR 2.0» չէ և թերապիա չէ: Ցածր՝ բնական դերի և այն հարցում, թե որքան հաջող գործիք կդառնա: Ճիշտ դիրքորոշումը նոր կենսաբանության և հնարավոր Էվոյուցիոն բացակայող օղակի նկատմամբ իրական հետաքրքրությունն է, բայց կիրառությունների հարցում՝ համբերությունը. դրանք դեռ սկզբնական փուլում են:

Աղբյուրներ

Science 388, eadv9789 (2025)

<https://doi.org/10.1126/science.adv9789>

PubMed Central (PMC12045711)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12045711/>