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, բայց 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:

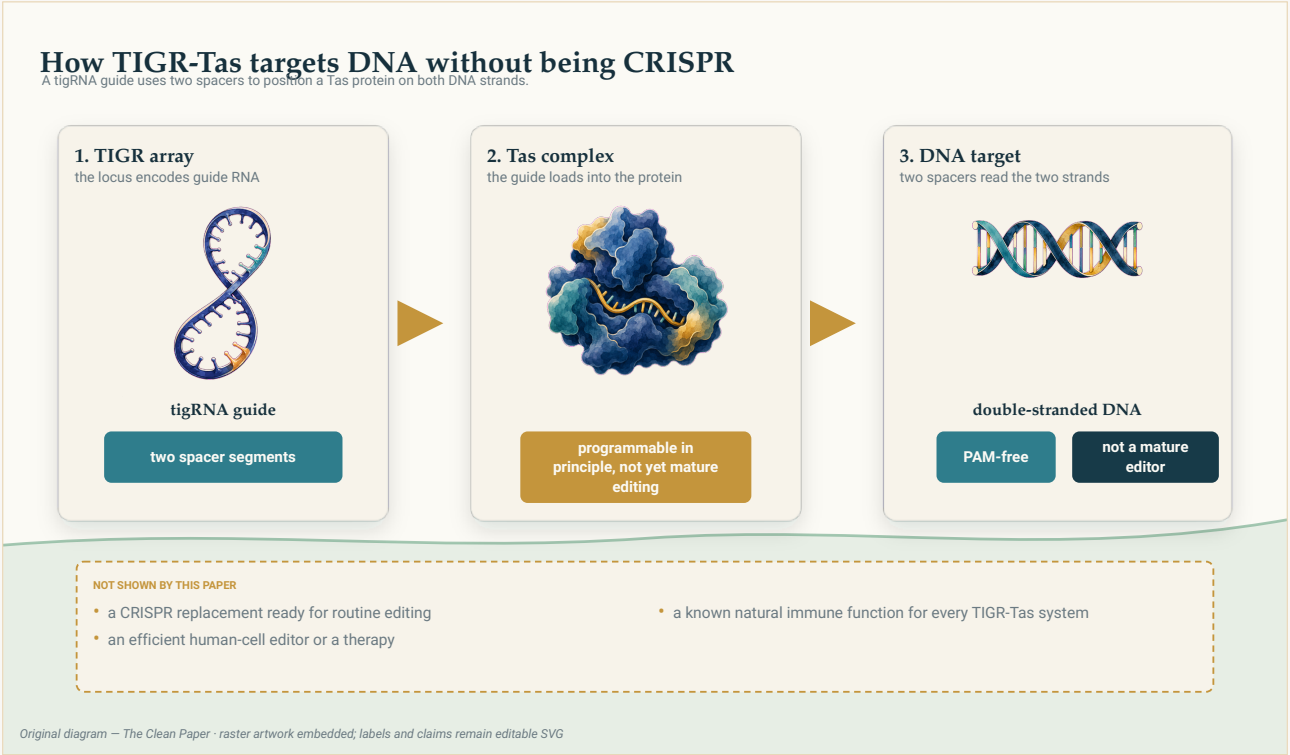
Written by Lucio Vaglio · Cross-checked by Laura Nesso · Edited by Michele Renda · Figures by Laura Nesso and Nova Vela · AI-assisted, human-reviewed

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 կարդում է ԴՆԹի հակադիր շղթաները: Սա նոր ճարտարապետություն է, ոչ պատրաստ գեն-editing գործիք:

Original diagram — The Clean Paper CC BY 4.0

Որոնումը 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 ՌՆԹն, նրանք կանխատեսված սպիտակուցային կառուցվածքների շտեմարաններում որոնել են նույն կերպ կառուցված բաներ: Այդ հետքը՝ բակտերիալ «ցատկող գենի» և սովորական բջիջների՝ իրենց ՌՆԹն 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 մակաբույծ բակտերիաներում: Յուրաքանչյուր այդպիսի սպիտակուցի կողքին կա ԴՆԹի 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 ՌՆԹները, պարզել են, թե այդ ՌՆԹները 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 ՌՆԹների, որոնցից յուրաքանչյուրն ունի *երկու* առանձին թիրախավորող հատված: Մեկ հատվածը կարդում է թիրախ ԴՆԹի մի շղթան, մյուսը՝ հակադիր շղթան: Երկուսը միասին ամրացնում են համակարգը տվյալ տեղում: Սա CRISPR-ից իրական մեխանիկական տարբերություն է, որովհետև CRISPR-ի ուղեցույցը սովորաբար մի շարունակական հատվածով համընկնում է մեկ շղթայի հետ:

Եվ նրան «վայրէջքի հարթակ» պետք չէ: Շատ CRISPR նուկլեազներ 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 տարբերակները իսկապես և ճշգրիտ կտրեցին: Փոքր ՌՆԹ ուղեցույցով առաջնորդվող՝ RuvC կամ HNH պարունակող Tas սպիտակուցները ԴՆԹում ստեղծել են մաքուր, հաջորդականությունկոնկրետ կտրվածքներ և առանց ուղեցույցի ոչինչ չեն արել:

Մի տարբերակ հնարավոր եղավ ծրագրավորել մարդու բջիջներ խմբագրելու համար՝ բայց հազիվ: Մարդու բջիջների մշակույթ տեղափոխված և վեց տարբեր գեների 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 ՌՆԹն, մինչդեռ թիրախ ԴՆԹն կտրուկ ծալված է: Հատկանշականորեն, այս ճարտարապետությ շատ նման է մեր բջիջների ազգակիցներում հանդիպող box C/D **snoRNP** մեքենային, որը ՌՆԹն քիմիապես փոփոխելու համար է ուղեցույց օգտագործում, ոչ թե ԴՆԹ կտրելու:

Բնական գործառույթը 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 տարբեր 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 էվոլյուցիոն

կապ ՌՆԹով ուղղորդվող *ՌՆԹ փոփոխող* համակարգերի և ՌՆԹով ուղղորդվող *ԴՆԹ թիրախավորող* համակարգերի միջև: Հնարավոր է՝ սա programmable ՌՆԹ ուղեցույցերի 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 էվոլյուցիոն 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/էվոլյուցիոն 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 էվոլյուցիոն 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 էվոլյուցիոն ծագման պնդումները եզրակացական են, իսկ բնութագրումը կատարվել է մանրէներում և բջջային մշակույթում, 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 էվոլյուցիոն 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/