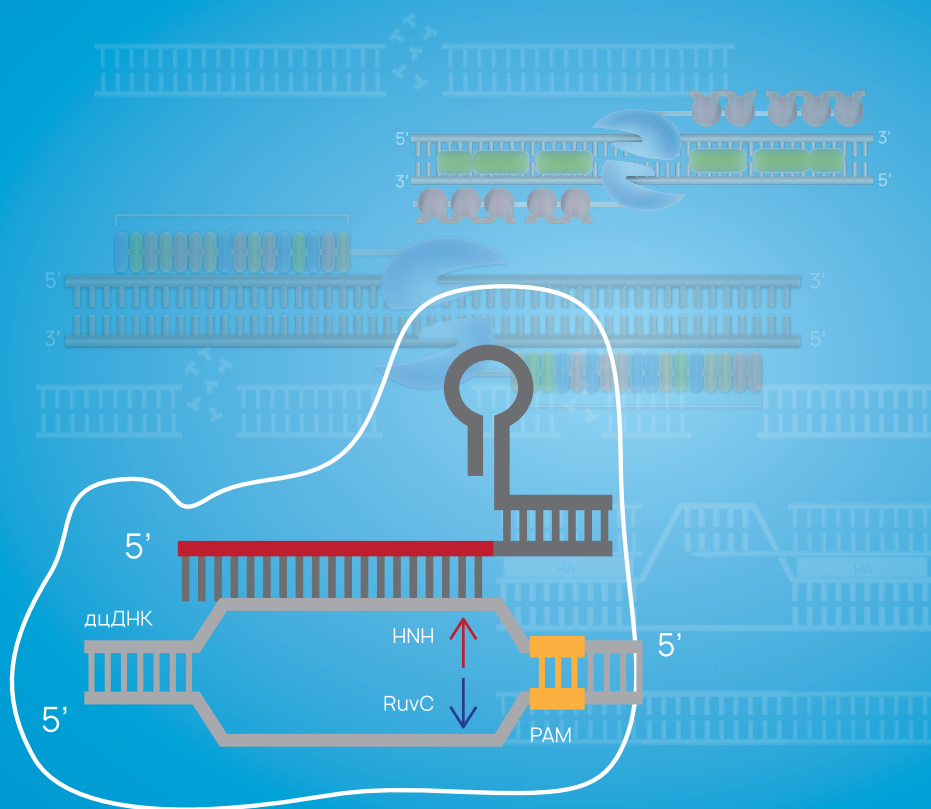


# ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ



ФБУН Центральный НИИ  
Эпидемиологии  
Роспотребнадзора  
НАУКА НА СЛУЖБЕ ВАШЕГО ЗДОРОВЬЯ

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека  
ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

# **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ**

Под редакцией  
академика РАН **В.Г. Акимкина**

Москва  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора  
2020

УДК 575  
ББК 28.04  
Г 34

**Рецензенты:**

*Виктор Васильевич Малеев*, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственной премии и премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники, советник директора по научной работе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

*Арег Артемович Тотолян*, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Г 34 **Генетические технологии** / Ю.В. Михайлова, А.М. Нагорных, В.В. Петров, А.Е. Судына, А.И. Тюменцев, М.А. Тюменцева, А.А. Шеленков; под общей редакцией академика РАН В.Г. Акимкина. — М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. — 200 с.

ISBN 978-5-6045286-0-0

Книга «Генетические технологии» освещает широкий спектр вопросов в области генетических технологий, касающихся направленного редактирования генома, и охватывает последние научные сведения о применении программируемых нуклеаз в различных областях, связанных с модификацией генома. Монография будет интересна и полезна студентам биологических и медицинских вузов, аспирантам, молодым ученым, научным сотрудникам, руководителям и работникам практического здравоохранения и поможет сформировать понимание и систематизировать знания в стремительно развивающейся области генетических технологий и направленного редактирования генома. Можно надеяться, что описанные в книге инновационные технологии послужат научным заделом для создания диагностических и терапевтических препаратов для борьбы с ныне неизлечимыми заболеваниями.

Книга «Генетические технологии» издана при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.



DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-0-0>  
ISBN 978-5-6045286-0-0

УДК 575  
ББК 28.04

© Коллектив авторов, 2020  
© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020

Federal Service for Surveillance  
on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing  
Central Research Institute for Epidemiology

# **GENETIC TECHNOLOGIES**

Edited by  
**Vasily G. Akimkin**  
Full Member of the Russian Academy of Sciences

Moscow  
Central Research Institute for Epidemiology  
2020



**Reviewers:**

*Victor V. Maleev*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Professor, laureate of the State Prize and the Prize of the Government of the Russian Federation in the field of science and technology, advisor to the director of the Central Research Institute for Epidemiology for science

*Areg A. Totlian*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Medicine), Professor, director of the Saint-Petersburg Pasteur Institute

**Genetic Technologies** / Yu.V. Mikhaylova, A.M. Nagornykh, V.V. Petrov, A.E. Sud'ina, A.I. Tyumentsev, M.A. Tyumentseva, A.A. Shelenkov; edited by V.G. Akimkin, RAS Full Member. — Moscow: Central Research Institute for Epidemiology, 2020. — 200 p.

ISBN 978-5-6045286-0-0

The book «Genetic Technologies» covers a wide range of topics in the field of genetic technologies related to genome editing, and summarizes the latest scientific data on the use of programmable nucleases in various fields related to genome modification. The monography «Genetic Technologies» will be interesting and useful for students of biological and medical universities, graduate students, young scientists, researchers, healthcare professionals and will help them to systematize knowledge in the rapidly developing field of genetic technologies and genome editing. It is believed that the innovative technologies described in the book will serve as a scientific basis for the development of diagnostic and therapeutic agents to fight against currently incurable diseases.

The book «Genetic Technologies» was published with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of a grant in the form of a subsidy for the creation and development of the «World Class Genomic Research Center for Ensuring Biological Safety and Technological Independence under the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies», agreement No. 075-15-2019-1666.



DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-0-0>

ISBN 978-5-6045286-0-0

© Mikhaylova Yu.V., Nagornykh A.M., Petrov V.V., Sud'ina A.E.,  
Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Shelenkov A.A., 2020  
© Central Research Institute for Epidemiology, 2020

## Список сокращений

ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки  
МДД — миодистрофия Дюшенна  
МПС — мукополисахаридоз  
НЧП — нечеловекообразные приматы  
CRISPR — короткие палиндромные повторы, регулярно  
расположенные группами  
HBV — вирус гепатита В  
NGF — фактор роста нервов  
NGS — секвенирование следующего поколения  
NHEJ — негомологичное соединение концов  
NLS — сигнал ядерной локализации  
PBS — последовательность для связывания праймера  
RVD — высоковариабельные аминокислотные остатки  
TALE — эффекторы, подобные активатору транскрипции  
TALEN — эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции  
ZFN — нуклеазы на основе белков, содержащих «цинковые пальцы»

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Предисловие</b> (академик РАН <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">В.И. Покровский</span> ) .....	9
<b>ГЛАВА 1. Искусственные нуклеазы с «цинковыми пальцами»</b> (А.Е. Судьина) .....	12
1.1. История развития нуклеаз с «цинковыми пальцами» .....	13
1.2. Структура и функции нуклеаз с «цинковыми пальцами» .....	14
1.3. Применение нуклеаз с «цинковыми пальцами» .....	19
<b>ГЛАВА 2. TALE-нуклеазы</b> (В.В. Петров) .....	37
2.1. Открытие TALE .....	37
2.2. Структура TALE .....	38
2.3. Специфичность RVD .....	40
2.4. Эффективность RVD .....	42
2.5. Количество повторов TALE .....	43
2.6. Устойчивость к заменам .....	43
2.7. Изменчивость структуры повторов .....	44
2.8. Белки семейства TALE .....	45
2.9. Создание TALEN .....	46
2.10. Доставка TALEN .....	47
2.11. Применение TALEN в науке, биотехнологии и генной терапии .....	47
2.12. Онлайн-ресурсы для разработки TALEN .....	50
<b>ГЛАВА 3. CRISPR нуклеазы</b> (М.А. Тюменцева, А.И. Тюменцев) .....	58
3.1. История открытия CRISPR/Cas .....	58
3.2. Белки системы CRISPR/Cas .....	63
3.3. Разнообразие и классификация систем CRISPR/Cas .....	64
3.4. Системы CRISPR/Cas для направленного редактирования генома .....	66
3.4.1. Cas9 .....	66
3.4.2. Никазы Cas9 .....	69
3.4.3. dCas9 .....	71

3.4.4. Направленное редактирование азотистых оснований.....	77
3.4.5. Cas9 для «праймированного» редактирования .....	79
3.4.6. Cas12.....	80
3.4.7. Cas13.....	81
3.4.8. Cas14.....	81
3.5. Применение CRISPR/Cas.....	85
3.5.1. CRISPR/Cas в пищевой промышленности .....	86
3.5.2. Типирование микроорганизмов.....	86
3.5.3. Конструирование штаммов микроорганизмов, устойчивых к бактериофагам и нежелательным плазмидным ДНК.....	87
3.5.4. Модификация микроорганизмов .....	89
3.5.5. Антимикробная активность.....	90
3.5.6. Терапия ВИЧ-инфекции .....	91
3.5.7. Борьба с персистирующими вирусными инфекциями .....	92
3.5.8. Разработка терапевтических подходов для лечения моногенных заболеваний .....	93
3.5.9. Разработка терапевтических подходов для лечения рака.....	94
3.6. Клинические испытания .....	94
3.7. Системы доставки CRISPR/Cas .....	94
3.8. Диагностика инфекционных заболеваний.....	104
3.8.1. Диагностика с использованием CRISPR/Cas9 .....	111
3.8.2. Диагностика с использованием CRISPR/Cas12 и CRISPR/Cas13.....	112
3.9. Ресурсы для работы с CRISPR/Cas.....	114

**ГЛАВА 4. Способы определения неспецифической активности систем редактирования генома (Ю.В. Михайлова, А.А. Шеленков)...** 138

4.1. Методы подтверждения нецелевых мутаций в предсказанных сайтах .....	138
4.2. Методы скрининга нецелевых мутаций по всему геному.....	139
4.2.1. Полногеномное секвенирование.....	139
4.2.2. Секвенирование полного экзона .....	140
4.2.3. Хроматин-иммунопреципитационное секвенирование (ChIP-seq) .....	140

4.2.4. Лентивирусные векторы, дефицитные по интегразе .....	142
4.2.5. Полногеномное определение двунитевых разрывов с помощью секвенирования .....	143
4.2.6. Прямое мечение разрывов <i>in situ</i> , обогащение с помощью стрептавидина и NGS .....	144
4.2.7. Полногеномное секвенирование транслокаций, опосредованное линейной амплификацией.....	144
4.2.8. Секвенирование полного генома, «расщепленного» Cas9 <i>in vitro</i> .....	146
4.2.9. Селективное обогащение и идентификация меченых концов геномной ДНК с помощью секвенирования .....	148
4.2.10. Циркуляризация для определения двуцепочечных разрывов и секвенирование .....	149
4.2.11. Полногеномный анализ нецелевых сайтов с помощью инъекции двухклеточного эмбриона.....	151
<b>ГЛАВА 5. Нозологические и терапевтические аспекты редактирования генома животных (А.М. Нагорных) .....</b>	<b>157</b>
5.1. Рыбы .....	162
5.2. Грызуны .....	164
5.3. Кролики .....	171
5.4. Свины .....	172
5.5. Крупный рогатый скот .....	174
5.6. Мелкий рогатый скот .....	174
5.7. Лошади .....	175
5.8. Кошки .....	176
5.9. Собаки .....	178
5.10. Нечеловекообразные приматы .....	182
<b>Заключение .....</b>	<b>193</b>
<b>Приложение .....</b>	<b>195</b>



## Предисловие

---

На протяжении тысячелетий люди пытались развивать и улучшать полезные свойства различных организмов. В результате было обнаружено, что если изменить генетический код организма, то можно изменить и сам организм. Еще до открытия ДНК Льюис Джон Стадлер в конце 1920-х гг. облучал растения радиацией, чтобы вызвать в них случайные мутации. Более чем через десятилетие ученые смогли добиться значительных улучшений благодаря случайному мутагенезу и селективному размножению. Только открытие Уотсоном и Криком молекулярной структуры ДНК в 1953 г. произвело революцию в способах конструирования и генетической модификации организмов. Последовавшее за этим открытие ферментов рестрикции ДНК и разработка методов трансформации позволили Рудольфу Йенишу в 1974 г. создать первую генетически модифицированную мышь.

Первая рекомбинантная ДНК, содержащая фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и кишечной палочки *Escherichia coli*, была создана в 1972 г. Полом Бергом, Стэнли Коэном и Гербергом Бойером с сотрудниками. После чего в 1976 и 1978 гг. появились первые генетически модифицированные бактерии, которые могли продуцировать такие важные человеческие белки, как гормон соматостатин и инсулин.

Все описанные события привели к возникновению новой области знаний — геной, или генетической, инженерии. Генная инженерия представляет собой совокупность методов, позволяющих создавать в пробирке, то есть *in vitro*, рекомбинантные молекулы ДНК с последующей передачей этих новых генетических структур из одного организма в другой. Целью геной инженерии является получение клеток (в первую очередь бактериальных), способных в промышленных масштабах синтезировать «человеческие» белки. Генная инженерия делает возможным преодоление межвидовых барьеров и передачу

отдельных наследственных признаков одних организмов другим, что активно используется в селекции растений и животных.

В распоряжении генной инженерии — множество инструментов, среди которых полимеразы, предназначенные для амплификации ДНК, рестриктазы и лигазы для молекулярного клонирования и получения рекомбинантных ДНК и многие другие ферменты и белки, которые позволяют оперировать молекулами ДНК малых и средних размеров. Однако с помощью такого набора инструментов оказалось крайне трудно манипулировать большими сложными геномами высших организмов. Проблема заключалась в том, что ферменты рестрикции могут «узнавать» только относительно короткие последовательности ДНК. Такой специфичности вполне достаточно для работы с короткими ДНК вирусов и бактерий, поскольку в пределах той же бактериальной ДНК конкретные короткие нуклеотидные последовательности встречаются не слишком часто. Однако специфичности рестриктаз совершенно недостаточно для работы с геномами растений и животных. Такие геномы содержат множество коротких последовательностей нуклеотидов, которые узнаются рестриктазами, поэтому направленное воздействие на один определенный участок становится невозможным. Для решения большого числа важнейших задач биотехнологии и фундаментальной медицины требовались эффективные и точные инструменты для осуществления точечного воздействия на определенные участки ДНК в составе геномов высших организмов, в том числе человека.

С тех пор было достигнуто много впечатляющих изменений в организмах, которые были очень сложными, дорогостоящими и требовали много времени. Эти проблемы в области генной инженерии подтолкнули ученых к изучению более эффективных методов, что привело к открытию новых инструментов и появлению нового направления генной инженерии — редактирования генов.

Редактирование генов, или редактирование геномов — это тип генной инженерии, при котором ДНК вставляется, удаляется или заменяется в геноме организма с использованием специализированных программируемых нуклеаз или «молекулярных ножниц». Технологии направленного редактирования генома на основе программируемых нуклеаз предоставляют возможность эффективной и точной модификации ДНК путем образования двунитевых разрывов в интересующих сайтах-мишенях высокоспецифичными нуклеазами и репарирования концов в генетическом локусе после внесения желаемых изменений. Индуцируемые нуклеазами разрывы могут быть подвергнуты репарации по одному из двух возможных механизмов — негомологичному воссоединению концов и гомологичной репарации.

Чаще всего создать сайт-специфический двунитевой разрыв в целевой ДНК можно с помощью таких программируемых нуклеаз, как нуклеазы с «цинковыми пальцами», эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, и белки системы CRISPR/Cas (где CRISPR расшифровывается как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами»).

Направленное геномное редактирование с использованием программируемых нуклеаз за короткое время заняло передовые позиции среди технологий мо-

дификаций генома. Данный подход стал успешно применяться в исследованиях в области функциональной геномики, в задачи которой входят идентификация функции генов и генетических элементов, регулирующих экспрессию генов, расшифровка механизмов координации работы генов в клетке. Кроме того, программируемые нуклеазы часто применяют для валидации генов-мишеней заболеваний человека. С их помощью нередко создают нокаут генов в нескольких клеточных линиях и изучают эффект. Важным достижением применения программируемых нуклеаз можно считать возможность обеспечивать полный нокаут генов, которые не поддаются РНК-интерференции — еще одному распространенному методу функциональной геномики.

Помимо функциональной геномики, программируемые нуклеазы успешно применяются для клеточного скрининга, который позволяет создавать модифицированные клеточные линии с встраиваемыми промоторами, метками или репортерными элементами, интегрированными в гены или межгенные регионы. Нередко программируемые нуклеазы используют для создания и оптимизации клеточных линий с заданными функциями, например, суперпродуцентов белков или антител биотехнологического и фармакологического назначения.

Со времен первой полученной в 2009 г. нокаутной крысы, программируемые нуклеазы успешно применяются на уровне целых организмов — чаще всего для создания животных моделей заболеваний человека и для улучшения сортов растений и пород сельскохозяйственных животных.

И, наконец, программируемые нуклеазы применяются для разработки терапевтических препаратов. В 2014 г. было инициировано первое клиническое испытание кандидатного терапевтического препарата на основе нуклеаз с «цинковыми пальцами»; в 2016 г. — на основе CRISPR/Cas; а в 2017 г. — на основе TALE-нуклеаз.

Авторы данного издания постарались осветить широкий спектр вопросов в области генетических технологий, касающихся направленного редактирования генома, и можно надеяться, что данная монография найдет своего читателя и послужит хорошим учебным пособием для студентов биологических и медицинских вузов, а также молодых ученых. Кроме того, данная монография позволит исследователям, руководителям и работникам практического здравоохранения, студентам и аспирантам сформировать понимание в стремительно развивающейся области генетических технологий и направленного геномного редактирования.

*Академик РАН, лауреат Государственной премии и премий  
Правительства Российской Федерации в области науки и техники,  
именных премий АМН СССР и РАМН, доктор медицинских наук,  
профессор В.И. Покровский*



## ГЛАВА 1

# Искусственные нуклеазы с «цинковыми пальцами»

---

Большинство подходов направленной модификации последовательностей ДНК в геноме основано на внесении в определенный участок ДНК двуцепочечного разрыва, репарация которого может проходить по одному из двух возможных механизмов. В результате негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) происходит быстрое лигирование концов ДНК. При этом ДНК может восстанавливать первоначальную структуру или может происходить внесение мутаций типа инсерций или делеций различной длины, что, как правило, приводит к нарушению транскрипции генов [1]. Этот процесс может быть использован для «нокаутирования» необходимого гена-мишени. Гомологическая рекомбинация происходит в присутствии гомологичной ДНК, которая может иметь эндогенное или экзогенное происхождение. Таким образом, гомологичная рекомбинация может быть использована для внесения направленных точечных мутаций (например, для корректировки генома) или введения желаемой последовательности посредством рекомбинации мишени с ДНК-матрицей [2].

Первым реально работающим инструментом для направленного геномного редактирования стало конструирование химерных (гибридных) нуклеаз с заданной специфичностью действия [3]. Подобные нуклеазы состоят из двух доменов, один из которых катализирует расщепление ДНК, а второй способен избирательно связываться с определенными нуклеотидными последовательностями в ДНК.

В генетической инженерии описаны четыре основных класса гибридных нуклеаз, которые могут быть запрограммированы на получение двуцепочечного разрыва [4–6]:

- мегануклеазы — высокоспецифичные хоуминг-эндонуклеазы, узнающие последовательности более 14 пар нуклеотидов. Почти всегда под термином «мегануклеазы» подразумевают хоуминг-эндонуклеазы семейства LAGLIDADG;
- нуклеазы на основе белков, содержащих «цинковые пальцы» (ZFN) [7];

- эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN);
- нуклеазы, ассоциированные с короткими регулярно расположенными палиндромными повторами (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR).

В данной главе будут более подробно описаны история создания и структура нуклеаз с ДНК-связывающим доменом типа «цинковые пальцы», их основные характеристики и возможности применения для направленного геномного редактирования.

## 1.1. История развития нуклеаз с «цинковыми пальцами»

Первое упоминание о создании химерного белка, состоящего из гидролизующего домена эндонуклеазы рестрикции FokI и ДНК-связывающего домена с мотивом «цинковые пальцы», относится к 1996 г. [8]. Появление подобных гибридных нуклеаз стало возможным с открытием в 1985 г. при изучении транскрипционного фактора TFIIIA из *Xenopus oocytes* нового типа ДНК-связывающих доменов [9], получивших в дальнейшем название «цинковые пальцы», т.к. каждый такой домен («палец») содержит в своей структуре ион цинка [10]. Анализ в 1991 г. трехмерной структуры комплекса транскрипционного фактора Zif268 с ДНК продемонстрировал прямое взаимодействие каждого из «цинковых пальцев» с определенными триплетами в ДНК [11], а позднее был сформулирован код распознавания последовательности ДНК белками, содержащими мотив «цинковые пальцы» [12, 13].

В 1992 г. при изучении эндонуклеазы рестрикции FokI обнаружено, что ДНК-связывающий и нуклеазный домены фермента могут действовать независимо друг от друга [14]. Предположение, что действие нуклеазного домена может быть перенаправлено на другой участок рестрикции путем замены ДНК-связывающего домена в белке, позднее подтвердилось [15], что явилось вторым фактором, давшим импульс к созданию гибридных нуклеаз. Последующие работы по получению гибридов нуклеазного домена рестриктазы FokI с различными ДНК-связывающими доменами, в том числе «цинковыми пальцами», подтвердили возможность направленного программирования нуклеазной специфичности таких химерных белков [8, 16].

Впервые практическое применение гибридных ZFN удалось продемонстрировать в 2002 г. на примере направленного геномного редактирования плодовой мушки *Drosophila melanogaster* [17, 18]. С тех пор ZFN были успешно использованы для геномного редактирования более сотни генов различных растений [19–21], животных [22–25] и даже человеческих клеточных линий [26–28].

Наиболее перспективным является применение ZFN для генной терапии. Созданы гибридные нуклеазы, действие которых направлено на коррекцию мутаций, вызывающих разнообразные генетически детерминированные заболевания человека: серповидноклеточную анемию [29, 30], гемофилию [31], различные нейродегенеративные заболевания [32–34], мышечные дистрофии [35].

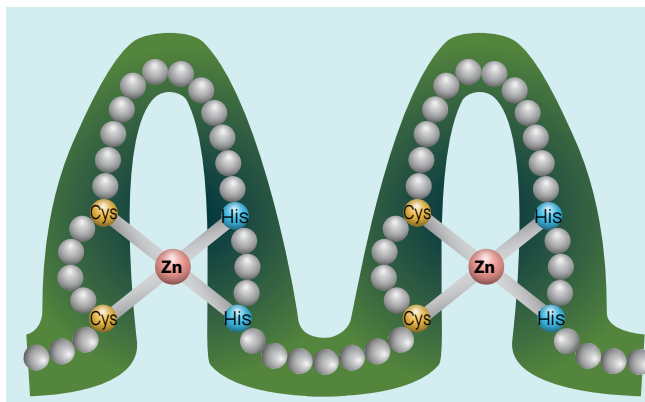


Рис. 1.1. Структура типичных белковых мотивов ZF типа C2H2.

Еще одним направлением применения гибридных ZFN является генная терапия при ВИЧ-инфекции. Основным подходом при этом является инициализация нарушения или удаление генов рецепторов, через которые вирус проникает в Т-лимфоциты, что не позволяет вирусу заражать лимфоциты, и популяция Т-клеток пациента восстанавливается [7, 36, 37]. Результаты оказались настолько успешными, что технология использования CCR5-специфичной нуклеазы SB-728 («Sangamo Therapeutics») для генотерапии ВИЧ-инфекции сейчас проходит испытания сразу в нескольких клинических исследованиях<sup>1</sup>.

## 1.2. Структура и функции нуклеаз с «цинковыми пальцами»

ZFN представляют собой гибридные белки, состоящие из домена эндонуклеазы рестрикции FokI с неспецифической гидролизующей активностью и ДНК-связывающего домена с мотивом «цинковые пальцы». ДНК-связывающий домен имеет модульное строение и обычно включает 3–6 мотивов ZF.

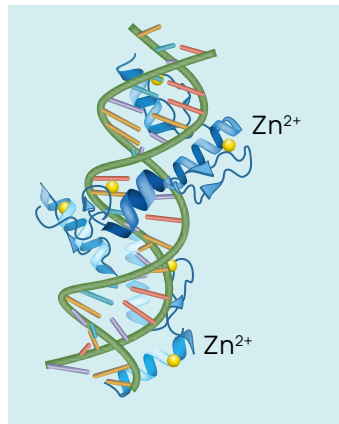
### *ДНК-связывающий домен ZF*

Наиболее распространенным типом ZF является C2H2 — модуль из примерно 30 аминокислот, которые координируют 1 ион цинка с 2 цистеинами и 2 гистидинами (Cys2His2). Домен C2H2 входит в состав многих факторов транскрипции. Каждый C2H2-домен складывается в компактную пространственную структуру антипараллельный β-лист–α-спираль, или ββα, которая стабилизируется молекулой цинка (рис. 1.1). В повторе 25 из 30 аминокислот складываются вокруг цинка, образуя «палец», а остальные 5 аминокислот (TGЕК(R)P) обеспечивают короткий линкер между последовательными пальцами [38]. Ион цинка тетраэдрически координируется между 2 остатками цистеина и 2 остатками гистидина, что стабилизирует «пальцы».

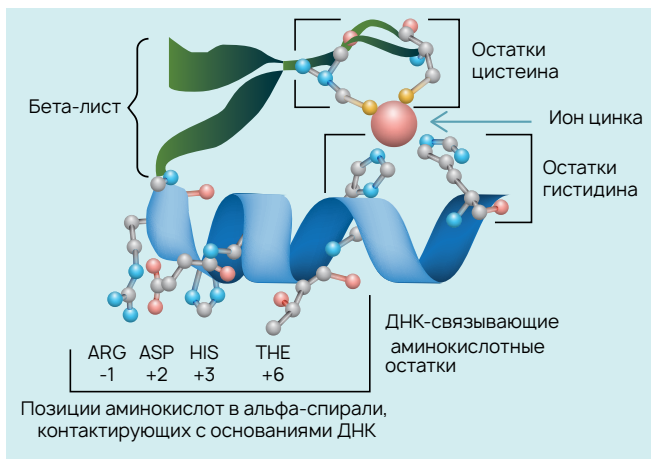
<sup>1</sup> URL: <https://aidsinfo.nih.gov/clinical-trials/search?q=ZFN&c=clinicaltrials&curID=161581>

Многочисленные данные структурного анализа ZF-белков позволили выявить ключевые моменты взаимодействия ZF с ДНК. Как видно на примере кристаллической структуры ZF-белка Aart, связывание  $\alpha$ -спирали ZF происходит в большой бороздке ДНК (**рис. 1.2**) [39]. ZF-белок Aart представляет собой искусственно созданный белок из 6 мотивов ZF, соединенных между собой линкерами из 5 аминокислотных остатков каждый. ZF-белок Aart узнает в ДНК последовательность из 18 п.н.

Каждый «палец» избирательно распознает 3 нуклеотида в ДНК. За взаимодействие в большинстве случаев отвечают три аминокислотных остатка, расположенных в позициях -1, 3 и 6 на  $\alpha$ -спирали, которые вступают в контакт с 3'-концевым, средним и 5'-концевым нуклеотидами узнаваемого триплета соответственно (**рис. 1.3**). Для некоторых ZF характерно также кросс-цепочечное взаимодействие аминокислотного остатка в положении 2  $\alpha$ -спирали с нуклеотидами



**Рис. 1.2.** Структура комплекса ZF-белка Aart с ДНК (PDB ID 2113).



**Рис. 1.3.** Строение домена «цинковые пальцы» типа C2H2.

из противоположной цепи двойной спирали. Кроме того, аминокислотные остатки в позициях -2, 1 и 5  $\alpha$ -спирали образуют прямые или опосредованные водой связи с фосфатным остовом ДНК [40].

Следует отметить, что модуль из нескольких ZF кодирует в ДНК непрерывный участок узнавания, состоящий из соответствующих триплетов [41]. Таким образом, комбинирование ZF-мотивов с известной специфичностью позволяет запрограммировать узнавание практически любой последовательности в ДНК. Для идентификации ZF для каждого из 64 возможных ДНК-триплетов и создания библиотеки ZF-мотивов с известной специфичностью было применено несколько подходов: как простой поиск среди уже известных ZF-белков [42, 43], так и отбор синтетических вариантов типа Zif268 при помощи метода фагового дисплея [44, 45]. Мульти-ZF могут быть сконструированы путем сборки известных ZF в любом порядке для распознавания любой желаемой последовательности ДНК модульным способом, который называется модульной сборкой [46]. Многие из ZF-доменов, построенных с помощью модульной сборки, имеют более высокую специфичность по сравнению с естественными ZF-доменами [47]. Поскольку модульная сборка является одним из самых популярных методов построения ZF-белков, она широко используется при создании гибридных нуклеаз, транспозаз, рекомбиназ, интеграз и пр. [48–50].

Тем не менее известные на данный момент ZF-модули охватывают в большинстве своем в качестве участка узнавания только все триплеты типа GNN, большинство ANN, многие CNN и некоторые TNN (где N может быть любым из четырех нуклеотидов) [51–53]. Данный факт, а также наличие кросс-цепочечного взаимодействия ZF со второй цепью ДНК и возможное влияние соседних ZF на специфичность узнавания триплетов-мишеней ограничивают создание полной библиотеки ZF-модулей [54, 55].

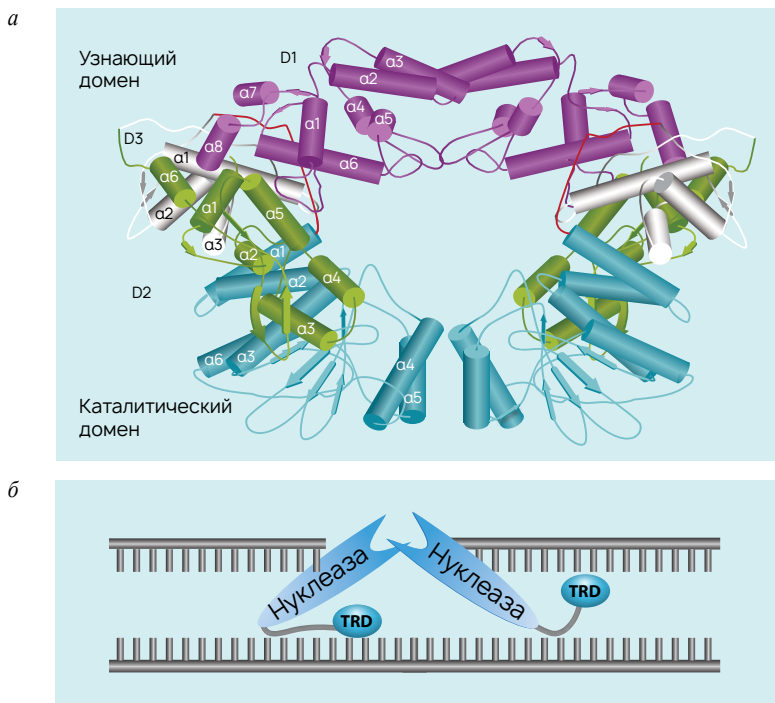
Перспектива создания программируемых ZF-белков привела в конце 1990-х гг. к созданию двух коммерческих компаний. Компания «Sangamo BioSciences» была основана Эдвардом Ланфьером в 1995 г., ее деятельность на первых порах была сосредоточена на конструировании синтетических транскрипционных факторов на основе ZF. Компания «Gendaq Ltd» была создана Аароном Клугом и Йеном Чу в 1999 г. и продолжила работы по созданию библиотек ZF широкого спектра специфичности. В 2001 г. «Sangamo BioSciences» приобрела компанию «Gendaq Ltd» и ее базу данных ZF-модулей. В дальнейшем «Sangamo BioSciences» добилась значительных успехов в создании гибридных ZF-транскрипционных факторов и ZFN для генной терапии, в том числе при ВИЧ-инфекции.

### ***Нуклеазный домен FokI***

В качестве нуклеазного домена в химерных ZFN чаще всего используется каталитический домен фермента рестрикции FokI, относящегося к эндонуклеазам рестрикции подтипа IIS. Ферменты данного подтипа узнают асимметричную последовательность нуклеотидов и гидролизуют хотя бы одну цепь ДНК-субстрата на некотором расстоянии от участка узнавания. При этом расщепление второй цепи может происходить как внутри, так и вне узнаваемой последова-

тельности [56]. Большинство ферментов данного подтипа гидролизуют обе цепи ДНК вне участка узнавания, тем самым оставляя последний незатронутым.

Наиболее изученным представителем данной группы является FokI [56, 57]. В структуре эндонуклеазы рестрикции FokI можно выделить два домена: N-концевой домен является ДНК-связывающим, тогда как С-концевой отвечает за катализ. На примере рестриктазы FokI для ферментов IIS типа показано, что кофакторами димеризации являются ионы двухвалентного металла, а при образовании активного комплекса происходит координация двух участков узнавания [58].  $\alpha$ -Спирали FokI, формирующие димеризационный модуль, расположены в С-концевом каталитическом домене фермента (рис. 1.4, а) [59]. На первом этапе действия FokI происходит связывание мономера с участком узнавания в ДНК. После связывания первого мономера с участком узнавания происходит связывание второго мономера FokI за счет взаимодействия двух ДНК-гидролизующих доменов. ДНК-связывающий домен второго мономера при этом может либо находиться в растворе, либо быть связанным с другим участком узнавания в ДНК [60]. Координированное действие двух белковых молекул приводит к внесению двуцепочечного разрыва в ДНК (рис. 1.4, б) [61]. Мономер, связывающийся первым с участком узнавания, вносит одноцепочечный разрыв



**Рис. 1.4.** Структура димера эндонуклеазы рестрикции FokI (а) и схематическое изображение взаимодействия эндонуклеазы рестрикции FokI с ДНК (б).

а: голубым цветом обозначен каталитический домен, фиолетовым — узнающий домен.  
б: TRD (target recognition domain) — домен, отвечающий за субстратную специфичность.

в «нижнюю» цепь ДНК, а второй мономер — в «верхнюю» цепь ДНК [62]. Таким образом, для FokI димеризация напрямую необходима для образования активного центра фермента [57, 61].

### Строение ZFN

Для создания высокоспецифичных ZF-химерных нуклеаз используют ДНК-гидролизующий домен FokI и ДНК-связывающий ZF-домен. Нуклеазный домен FokI не вносит вклада в субстратную специфичность ZF-нуклеазы, но он должен димеризоваться на ДНК, чтобы стимулировать ее целенаправленный гидролиз [61]. Чтобы обеспечить подобную димеризацию, используют два химерных белка на основе FokI и ZF-доменов, узнающих непалиндромную последовательность ДНК. Нуклеазный домен FokI присоединен к С-концу ZF-домена. Цепочка ZF состоит из одно- или двухпальцевых мотивов, связанных спейсерами. Количество ZF-мотивов в каждом из доменов может колебаться от 3 до 6. Участки узнавания ZF должны находиться в противоположных цепях ДНК в инвертированной ориентации на расстоянии 5–7 п.н. друг от друга. Это необходимо для правильной ориентации активных центров доменов FokI и максимальной эффективности разрезания ДНК (рис. 1.5) [63].

Однако при применении подобных гетеродимерных ZFN, с учетом некоторой вырожденности кода узнавания, может возникнуть нежелательная и потенциально токсичная для клетки побочная реакция — расщепление нецелевых участков генома гомодимерами, состоящими из двух «левых» или «правых» нуклеаз. Более того, высокая степень нецелевого расщепления, с которым уже не может справиться система репарации, приводит к генерации нежелательных мутаций или летальности клеток [17, 22, 64]. Этого можно избежать путем замены ряда аминокислотных остатков в нуклеазном домене таким образом, чтобы гетеродимеризация оказалась намного предпочтительнее гомодимеризации [65–68]. Это не только привело к значительному снижению цитотоксичности

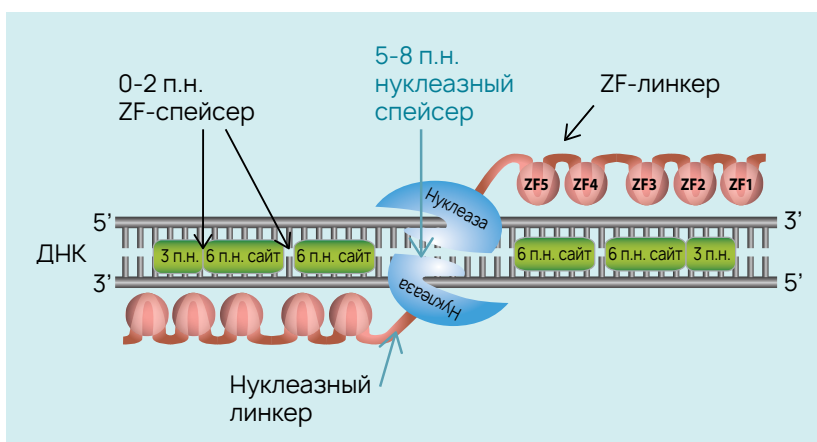


Рис. 1.5. Схематическое изображение стандартной модели ZFN.

ZFN, что является серьезной проблемой при их применении в терапии, но и продемонстрировало отсутствие нуклеазной активности на участках возможных палиндромов для гомополимерных ZFN [67, 69–72].

### 1.3. Применение нуклеаз с «цинковыми пальцами»

#### *Репарация двуцепочечного разрыва ДНК*

Благодаря ДНК-связывающему домену ZFN с высокой специфичностью связываются с интересующей ДНК-мишенью протяженностью до 18 п.н., что делает их удобным инструментом для направленного геномного редактирования, поскольку позволяет вводить в большой геном в строго определенной точке единственный двуцепочечный разрыв ДНК. В ответ на повреждение ДНК активируются клеточные системы репарации. На **рис. 1.6** продемонстрированы возможные механизмы репарации двуцепочечных разрывов, вносимых ZFN.

NHEJ представляет собой прямое соединение вносимого разрыва лигазой и, в отличие от гомологичной рекомбинации, не требует наличия ДНК-донора. Сам термин NHEJ был предложен в 1996 г. Дж.К. Муром и Дж.Е. Хабером [73]. NHEJ-репарация — значительно менее точный процесс, чем гомологичная рекомбинация, и часто приводит к потере нуклеотидов, коротким вставкам или мутациям. Возможны два варианта протекания NHEJ-репарации. В первом случае после внесения разрыва прямое восстановление (лигирование) последовательности на целевом участке приводит к нокауту гена за счет внесения делеции или инсерции. В другом случае, одновременном использовании двух пар ZFN, вероятно внесение протяженных делеций [28].

Процесс NHEJ-репарации является основным путем репарации двуцепочечных разрывов в клетке [74] и широко применяется при использовании ZFN, в том числе в генно-инженерной практике и для терапии [37]. Основные варианты его использования — разрушение кодирующих последовательностей

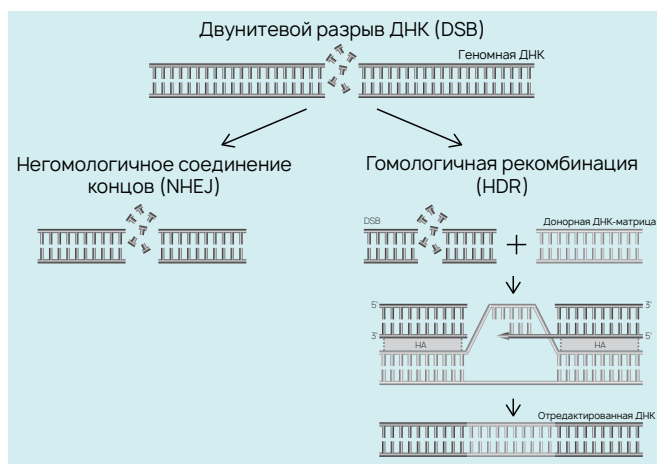
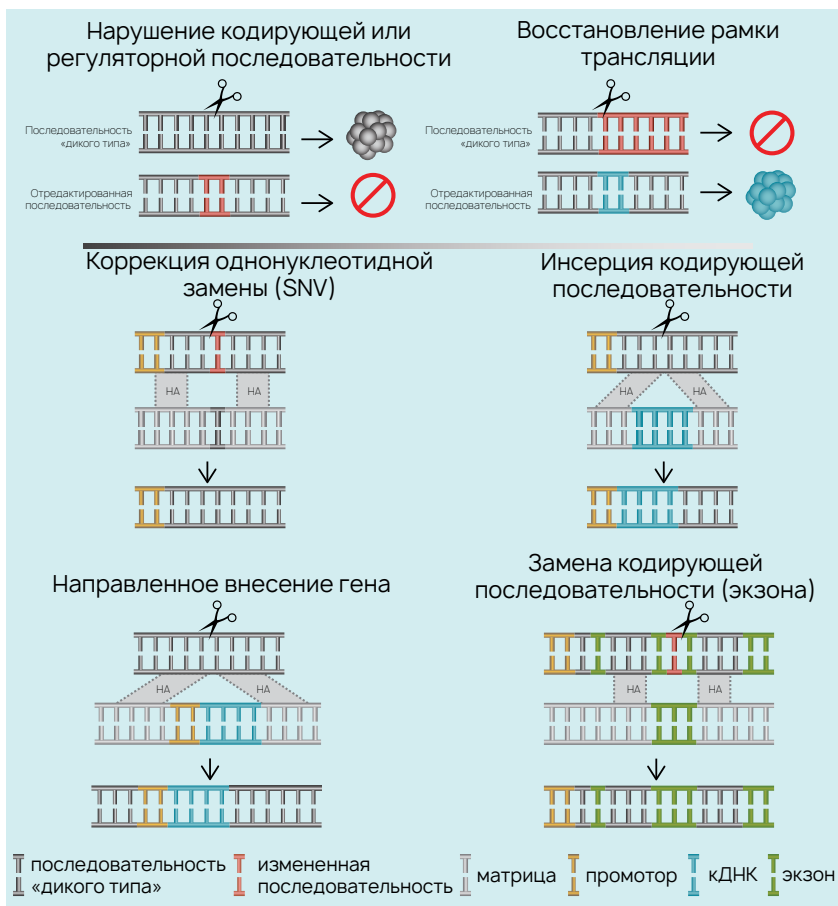


Рис. 1.6. Механизмы репарации двуцепочечного разрыва в ДНК.



(нокаут генов) или восстановление рамки считывания (**рис. 1.7**). Тем не менее NHEJ-репарация является случайным и неконтролируемым процессом и не может быть использована для направленной модификации генома.

Процесс гомологичной рекомбинации, наоборот, обеспечивает точное редактирование целевой последовательности в присутствии гомологичной хромосомы или экзогенной ДНК (**рис. 1.6**) [75, 76]. Данный подход рекомендуется применять, когда требуется направленная специфическая модификация ДНК. Как видно на **рис. 1.7**, при введении ZFN вместе с ДНК-донором в зависимости от дизайна ДНК-донора можно добиться устранения генетической мутации путем коррекции единичных нуклеотидов, внесения протяженных фрагментов в ДНК (трансгенов) в нужной ориентации, добавления генов (промотор + кДНК) в требуемый локус и замены кодирующих последовательностей (экзонов). Основным недостатком использования ZFN для индукции гомологичной рекомбинации является низкая степень модификации ДНК-мишени, что на-



**Рис. 1.7.** Виды модификации генома и их терапевтическое применение.

кладывает ограничения на применение такого подхода для генной терапии без предварительного обогащения модифицированных клеток [77].

### ***Разработка и применение ZFN для терапии***

С момента первого применения в начале 2000-х гг. технология ZFN успешно развивается и используется для модификации геномов широкого спектра растительных и животных организмов. Несмотря на универсальность конструкции, существует ряд серьезных ограничений использования ZFN, особенно в клинической практике:

- повышение специфичности и минимизация побочных эффектов за счет новых подходов к дизайну;
- повышение эффективности и безопасности использования и снижение иммуногенности за счет улучшения методов доставки.

Создание ZFN представляет собой довольно трудоемкий, долгий и затратный процесс. Основные трудности связаны с проблемой дизайна ДНК-связывающего домена для повышения специфичности узнавания целевой последовательности ДНК. Кроме ограниченного набора охарактеризованных ZF-доменов лимитирующими факторами выступают отсутствие универсального алгоритма построения ZF-модульной сборки и наличие позиционных эффектов соседних ZF-модулей [78]. Поэтому большой интерес вызывает разработка различных методических подходов для конструирования ZF-модулей с заданными характеристиками и высокой субстратной специфичностью. Данные подходы сочетают в себе составление наиболее подходящих модульныхборок из 3–6 ZF с последующей селекцией различными методами, например, при помощи бактериофагов или методом двугибридной бактериальной селекции. К наиболее распространенным подходам для конструирования ZFN относятся методы OPEN [54] и CoDA [79].

Требование к высокой специфичности ZFN привело к тому, что наибольшее распространение получили нуклеазы, содержащие в своей структуре 4–6 ZF. Как уже говорилось, связывание ZF-нуклеаз сиквенс-специфично. Однако для столь протяженных участков связывания характерно наличие определенного сходства между целевой и нецелевыми последовательностями, что может вызывать нецелевое расщепление ДНК, так называемый off-target-эффект [80, 81]. Обнаружено, что нецелевое расщепление ДНК ZFN наблюдается уже при степени гомологии 66% [82]. Подобная нецелевая активность ZFN может привести к повреждению ДНК, и затем к цитотоксичности, апоптозу и грубым хромосомным перестройкам в клетках [83], и она тем выше, чем протяженнее участок узнавания. Поэтому при создании искусственных ZFN исследователям необходимо находить разумный баланс между обеспечением высокой специфичности за счет увеличения количества ZF-модулей и уменьшением off-target-эффекта при их сокращении.

Еще одним фактором, который увеличивает частоту расщепления нецелевой последовательности ДНК, является способность ZFN образовывать гомодимеры [84]. Для снижения подобного эффекта нуклеазный домен был модифицирован таким образом, чтобы гетеродимеризация была предпочти-

тельным или даже единственным способом образования активного димера ZFN [67].

Эффективность и безопасность геномного редактирования и, как следствие, терапии ограничивается доставкой молекул для редактирования непосредственно к клеткам-мишеням [85, 86]. Подходы к доставке аппарата для геномного редактирования для терапии можно разделить на *in vivo* и *ex vivo* стратегии (рис. 1.8).

Используемый подход к доставке будет зависеть от типа инструмента для геномного редактирования. Гибридные нуклеазы доставляются в клетку в виде генно-инженерной конструкции, с помощью которой внутри клетки происходит наработка соответствующих белков (рис. 1.9). При этом система доставки должна обеспечивать высокую эффективность проникновения такой генно-инженерной конструкции в клетку, устойчивость к деградации в клетке при транспорте в ядро и поддержание необходимого уровня экспрессии. Например, при стратегии *in vivo* инструменты геномного редактирования будут подвергаться воздействию иммунной системы хозяина. При этом потенциальный иммунный ответ будет зависеть от типа используемого для доставки «транспортного средства». Использование вирусных векторов может привести к долговременной экспрессии гибридных нуклеаз, что может вызвать обширное повреждение генома человека и длительный иммунный ответ.

Разработаны разнообразные вирусные и невирусные системы доставки генно-инженерных конструкций в клетки организма [87, 88]. Среди вирусных систем наиболее распространенными являются системы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и вируса простого герпеса. Например, различные серотипы аденоассоциированных вирусов обеспечивают повышенную эффективность доставки для определенных типов клеток, тем

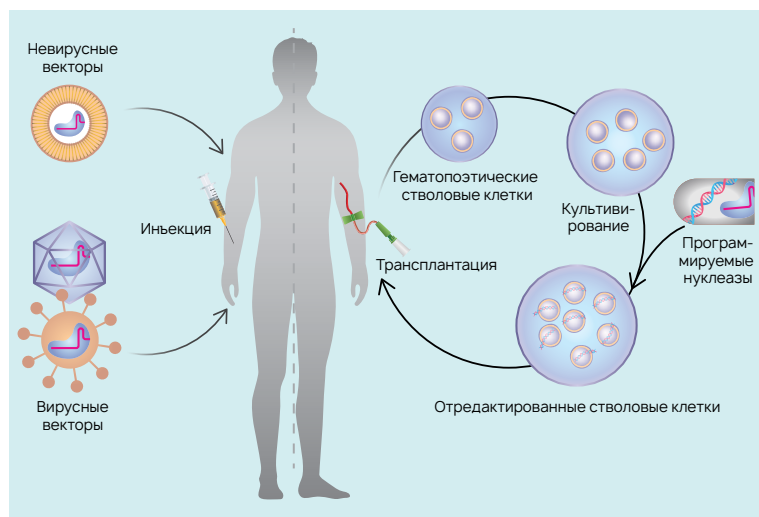


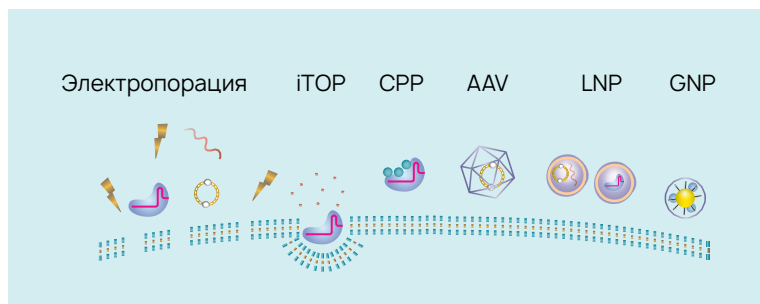
Рис. 1.8. Стратегии доставки терапевтического аппарата для геномного редактирования.

самым позволяя сделать ее тканеспецифичной [89]. Стратегия *in vivo*-доставки гибридных нуклеаз с использованием аденоассоциированных вирусов была успешно продемонстрирована на различных животных модельных системах с метаболическими заболеваниями [90, 91], с инфекцией, вызванной вирусом иммунодефицита человека [92], мышечными дистрофиями [93], расстройствами сетчатки [94, 95], дегенеративными расстройствами [96] и пр.

Использование вирусных векторов способствует высокой эффективности доставки и долговременной экспрессии инструментов для геномного редактирования, что выглядит многообещающе для клинического применения. Однако индуцированные вирусными системами доставки иммунные реакции могут в значительной мере ограничить терапевтический потенциал доставляемого аппарата для геномного редактирования [97, 98]. Особенно это актуально, если стратегия геномного редактирования подразумевает повторное (или многократное в течение долгого времени) введение генотерапевтического препарата. Некоторые из этих ограничений могут быть преодолены с помощью комбинированной иммуносупрессивной терапии [99].

Невирусные системы включают прямое введение ДНК/РНК в клетки и ткани, используя электропорацию, липосомы, катионные полимеры и др. [100]. Разработанные в последние годы наночастицы на липидной основе получили одобрение для терапевтического использования [101], наночастицы золота были успешно использованы в моделях грызунов для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) [102] и синдрома Мартина–Белла [103].

Сходные системы доставки используются и для обеспечения точного геномного редактирования *ex vivo*. В зависимости от типа клеток, используемых для стратегии *ex vivo*, средства для геномного редактирования могут быть доставлены как при помощи вирусных векторов, так и с помощью электропорации, микроинъекций, проникающих в клетки пептидов или наночастиц. Плюрипотентные стволовые клетки также широко используются для геномной инженерии *ex vivo* [104]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляют



**Рис. 1.9.** Физико-химические методы доставки генно-инженерных конструкций в клетки организма.

iTOP — индуцированная трансдукция; CPP — пептиды, проникающие в клетки; AAV — векторные системы, в том числе на основе аденоассоциированных вирусов; LNP — липидные наночастицы; GNP — наночастицы золота.

большой интерес как потенциальные модельные системы, поскольку они могут быть дифференцированы в любой тип клеток, имеющих отношение к интересующему исследователей заболеванию, например, в клетки скелетных мышц [105–107], гепатоциты [108, 109], кардиомиоциты [110, 111] и многие другие.

Каждая система доставки имеет свои преимущества и недостатки, поэтому в большинстве случаев наиболее перспективным вариантом представляется сочетание как вирусных, так и невирусных систем [112]. Кроме того, продемонстрировано, что ZFN обладают способностью проникать через клеточную мембрану и вызывать целенаправленный нокаут генов в клетках человека [113]. При этом степень off-target-расщепления ДНК при прямой доставке ZFN была значительно ниже, чем при экспрессии ZFN непосредственно в клетке. Снижение частоты нецелевого расщепления генома может быть связано с уменьшением времени нахождения нуклеазы в клетке. Однако при применении данного подхода высокий уровень нокаута генов может быть достигнут только после повторяющейся обработки клеток ZFN, что существенно ограничивает использование данного метода для геномного редактирования *ex vivo*. Тем не менее включение тандемных NLS-повторов (nuclear localization signals, NLS — сигнал ядерной локализации) в структуру ZFN до 13 раз повышает проницаемость клеток для ZFN [114]. Более того, уже однократная обработка приводила к высокоэффективному нокауту генов во многих типах клеток человека, включая CD4+ Т-клетки и ИПСК. При этом скорость геномной модификации мульти-NLS ZFN, вводимыми непосредственно в клетки, превышала те, которые достигались при использовании вирусных векторных систем доставки или плазмидной ДНК.

### **ZFN в клинических испытаниях**

В последнее десятилетие внимание исследователей сосредоточено на поиске возможных вариантов использования гибридных нуклеаз (ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9) для геномного редактирования. Основными направлениями их терапевтического применения являются генотерапия ВИЧ-инфекции, раковые заболевания и генетические нарушения. В **табл. 1.1** суммирована информация о препаратах на основе ZFN, которые находятся на разных этапах клинических испытаний (по данным портала [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

Впервые применение направленного геномного редактирования *ex vivo* с использованием ZFN в клеточной терапии у человека заключалось в «выключении» гена ко-рецептора ВИЧ CCR5 в CD4+ Т-клетках больных ВИЧ (NCT00842634) [37]. CCR5 является трансмембранным, β-хемокиновым рецептором, экспрессируемым на поверхности активированных Т-клеток, основным ко-рецептором для инвазии ВИЧ-1 [115]. Обнаружение у лиц с естественной резистентностью к ВИЧ-1-инфекции 32-нуклеотидной делеции части гена CCR5 (CCR5-Δ32), которая давала мутантный белок, не экспрессируемый на поверхности Т-клеток, выявило идеальную мишень для генотерапии ВИЧ-инфекции — «нокаут» CCR5-рецептора, аналогичный генотипу Δ32 [116, 117].

**Таблица 1.1.** Перечень препаратов для геномного редактирования на основе ZFN, которые находятся на разных этапах клинических испытаний

Заболевание	Название исследования	Сроки исследования	Описание препарата	Компания-разработчик	Идентификатор
ВИЧ-инфекция	A Phase I Study of Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728 in HIV-Infected Patients	Январь 2009 г. – январь 2013 г.	SB-728-Г — аутологичные CD4+ Т-клетки, отредактированные <i>ex vivo</i> при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи AdV векторной системы	University of Pennsylvania	clinicaltrials.gov NCT00842634
	A Phase I Dose Escalation, Single Dose Study of Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-278 in HIV-Infected Patients Who Have Exhibited Suboptimal CD4+ T-Cell Gains During Long-Term Antiretroviral Therapy	Декабрь 2009 г. – декабрь 2014 г.	SB-728-Г — аутологичные CD4+ Т-клетки, отредактированные <i>ex vivo</i> при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи AdV векторной системы	«Sangamo Therapeutics»	NCT01044654
	A Phase 1/2, Open Label, Single Infusion Study of Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases (SB-728-Г) in HIV Infected Subjects	Ноябрь 2010 г. – май 2015 г.	SB-728-Г — аутологичные CD4+ Т-клетки, отредактированные <i>ex vivo</i> при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи AdV векторной системы	«Sangamo Therapeutics»	NCT01252641
	Long-Term Follow-up of HIV-Infected Subjects Treated With Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases (SB-728-Г or SB-728mR-Г)	Март 2011 г. – декабрь 2031 г.	Пациенты, получающие терапию SB-728-Г или SB-728mR-Г	«Sangamo Therapeutics»	NCT04201782

Продолжение табл. 1.1 см. на стр. 26.

Заболевание	Название исследования	Сроки исследования	Описание препарата	Компания-разработчик	Идентификатор clinicaltrials.gov
	A Phase I, Open-Label Study to Assess the Effect of Escalating Doses of Cyclophosphamide on the Engraftment of SB-728-T in Aviremic HIV-Infected Subjects on HAART	Декабрь 2011 г. – июль 2017 г.	SB-728-T — аутологичные CD4+ T-клетки, отредактированные ex vivo при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи AdV векторной системы	«Sangamo Therapeutics»	NCT01543152
	A Phase I Study of T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases SB-728mR in HIV-Infected Patients, With or Without the CCR5 Delta-32 Mutation, Pre-treated With Cyclophosphamide	Апрель 2015 г. – март 2019 г.	SB-728mR-T — аутологичные CD4+ T-клетки, отредактированные ex vivo при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи электропорации SB-728 мРНК	University of Pennsylvania	NCT02388594
	A Pilot Study to Evaluate the Feasibility, Safety and Engraftment of Zinc Finger Nucleases (ZFN) CCR5 Modified CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells (SB-728mR-HSPC) in HIV-1 (R5) Infected Patients	Июль 2015 г. – апрель 2022 г.	SB-728mR-HSPC — аутологичные CD34+ гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки, отредактированные ex vivo при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи электропорации SB-728 мРНК	City of Hope Medical Center	NCT02500849

Продолжение табл. 1.1 см. на стр. 27.

Заблевание	Название исследования	Сроки исследования	Описание препарата	Компания-разработчик	Идентификатор clinicaltrials.gov
	T-Cell Reinfusion After Interfering With Lymphocyte Binding Location of AIDS Virus Through Zinc Finger Nucleases Elimination of CCR5 Receptors: The TRAILBLAZER Study	Июнь 2019 г. – февраль 2024 г.	SB-728-T — аутологичные CD4+ T-клетки, отредактированные <i>ex vivo</i> при помощи ZFN SB-728; доставка при помощи AdV векторной системы	Case Western Reserve University	NCT03666871
	A Pilot Study of T Cells Genetically Modified by Zinc Finger Nucleases SB-728mR and CD4 Chimeric Antigen Receptor in HIV-infected Subjects	Июль 2019 г. – декабрь 2025 г.	CD4 CAR+CCR5 ZFN T-cells — клетки SB-728mR-T, экспрессирующие CD4-рецептор	University of Pennsylvania	NCT03617198
Трансфузионно-зависимая $\beta$ -талассемия	A Phase 1/2, Open-label, Single-arm Study to Assess the Safety, Tolerability, and Efficacy of ST-400 Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant for Treatment of Transfusion-Dependent Beta-thalassemia (TDT)	Март 2018 г. – март 2023 г.	ST-400 — аутологичные CD34+ гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки, отредактированные <i>ex vivo</i> по гену <i>BCL11A</i> ; доставка при помощи электропорации ST-400 мРНК	«Sangamo Therapeutics», «SanoBi»	NCT03432364

Окончание табл. 1.1 см. на стр. 28.



Заблевание	Название исследования	Сроки исследования	Описание препарата	Компания-разработчик	Идентификатор clinicaltrials.gov
Серповидно-клеточная болезнь	A Phase 1/2, Open-Label, Multicenter, Single-Arm Study to Assess the Safety, Tolerability, and Efficacy of BIVV003 for Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients With Severe Sickle Cell Disease	Июнь 2019 г. – апрель 2023 г.	BIVV003 — аутологичные CD34+ гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки, отредактированные ex vivo по гену <i>BCL11A</i> ; доставка при помощи электропорации BIVV003 мРНК	«Bioverativ», «SanoFi»	NCT03653247
Гемофилия В	A Phase I, Open-Label, Ascending Dose Study to Assess the Safety and Tolerability of AAV2/6 Factor IX Gene Therapy Via Zinc Finger Nucleases (ZFN) Mediated Targeted Integration of SB-FIX in Adult Subjects With Severe Hemophilia B	Ноябрь 2016 г. – январь 2021 г.	SB-FIX — ZFN1, ZFN2 и донорская кДНК	«Sangamo Therapeutics»	NCT02695160
МПС I типа	A Phase I / 2, Multicenter, Open-label, Single-dose, Dose-ranging Study to Assess the Safety and Tolerability of SB-318, a rAAV2/6-based Gene Transfer in Subjects With Mucopolysaccharidosis I (MPS I)	Май 2017 г. – январь 2022 г.	SB-318 — ZFN1, ZFN2 и донорская ДНК (hIDUA)	«Sangamo Therapeutics»	NCT02702115
МПС II типа	A Phase I / 2, Multicenter, Open-label, Single-dose, Dose-ranging Study to Assess the Safety and Tolerability of SB-913, a rAAV2/6-based Gene Transfer in Subjects With Mucopolysaccharidosis II (MPS II)	Май 2017 г. – февраль 2022 г.	SB-913 — ZFN1, ZFN2 и донорская ДНК (hIDS)	«Sangamo Therapeutics»	NCT03041324

В результате доклинических исследований была обнаружена пара ZFN (позднее названная SB-728), способная продуцировать двуцепочечный разрыв в трансмембранном домене, располагаемый выше естественной мутации CCR5-Δ32, характерной для CD4+ Т-клеток человека, и приводящая к набору делеций, которые предотвращали экспрессию гена CCR5 [36]. После этого в 2009 г. компания «Sangamo Therapeutics» инициировала первое клиническое испытание (NCT00842634) для оценки терапевтической безопасности аутологических CD4+ Т-клеток, отредактированных *ex vivo* при помощи ZFN SB-728. В качестве системы доставки была использована векторная система на основе аденовируса. В результате было показано, что отредактированные Т-клетки безопасны у пациентов; кроме этого, сообщалось о частичной приобретенной резистентности к ВИЧ, детектируемый уровень ДНК ВИЧ снижался у большинства пациентов, что свидетельствует об эффективности подобной генотерапии [37]. Таким образом, нокаут CCR5-рецептора в клетках пациентов с ВИЧ-инфекцией в настоящее время является самым распространенным подходом терапевтического геномного редактирования.

На сегодняшний день на разных стадиях клинических испытаний суммарно находятся 10 терапевтических препаратов против ВИЧ-инфекции, полученных с использованием ZFN (табл. 1.1). Модификации первоначального подхода включали:

- варьирование дозы отредактированных клеток при инфузии (NCT01044654);
- предварительная лимфодеплеция (при помощи циклофосфида) у пациентов перед инфузией отредактированных Т-клеток с целью снижения числа неотредактированных Т-клеток и улучшения приживления инфузированных Т-клеток (NCT01543152);
- повторяющаяся инфузия отредактированных клеток (NCT02225665);
- использование метода электропорации мРНК для доставки ZFN в Т-клетки (NCT02388594);
- использование модифицированных ZFN аутологических CD34+ CCR5-негативных гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (NCT02500849).

Ранее было установлено, что ZFN могут быть использованы для нокаута CCR5 в CD34+ гемопоэтических стволовых и прогениторных клетках, что также даст CCR5-негативное потомство [118]. Кроме того, метод электропорации мРНК для доставки ZFN обладает меньшей цитотоксичностью по сравнению с аденовирусными векторными системами доставки и лучше масштабируется до уровней, необходимых для терапии [119].

На протяжении нескольких лет использование ZFN SB-728 для терапии ВИЧ-инфекции (в различных модификациях) было единственным прецедентом применения ZFN для геномного редактирования достигшим стадии клинических испытаний. Тем не менее бурное развитие технологий TALEN и, в особенности, CRISPR гибридных нуклеаз способствовало появлению потенциальных терапевтических ZFN для лечения различных гемоглобинопатий, вызванных мутациями в гене β-глобина, например, при трансфузионно-зависимой β-талассемии или серповидноклеточной болезни. В компании «Sangamo Therapeutics» совместно с компанией

«Bioverativ Therapeutics Inc.» были разработаны ZFN, мишенью для которых являлся ген *BCL11A*, который участвует в подавлении продукции фетального гемоглобина у взрослых [120, 121]. Индукция экспрессии фетального гемоглобина у взрослых позволяет компенсировать «неправильный» гемоглобин при серповидноклеточной болезни или пониженный уровень  $\beta$ -гемоглобина при трансфузионно-зависимой  $\beta$ -талассемии. Таким образом, целью ZFN являлось редактирование генома для подавления экспрессии энхансера *BCL11A* в аутологичных CD34+ гемопоэтических стволовых и прогениторных клетках [122, 123]. Инфузия пациентам подобных трансформированных клеток приведет к повышению уровня экспрессии эндогенного гемоглобина, что облегчит в дальнейшем переливание крови у пациентов с трансфузионно-зависимой  $\beta$ -талассемией и серповидноклеточной анемией. В настоящее время препараты на основе ZFN для терапии трансфузионно-зависимой  $\beta$ -талассемии ST-400 (NCT03432364) и серповидноклеточной анемии BIV003 (NCT03653247) находятся на первом этапе клинических испытаний.

В разной степени готовности к клиническому применению также находятся препараты для терапии моногенных нарушений при гемофилии В и мукополисахаридозе (МПС) I и II типов. Гемофилия В — заболевание крови, вызываемое дефицитом в ней фактора свертывания IX или фактора Кристмаса. МПС I и II типов — это метаболическое заболевание соединительной ткани, связанное с нарушением обмена кислых гликозаминогликанов, вызванное дефицитом ферментов, участвующих в лизосомальной деградации гликозаминогликанов. Механизм действия препаратов для генотерапии гемофилии В и МПС I и II типов основан на инъекции аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), экспрессирующего ZFN, для направленной интеграции копии дефицитного гена в локус альбумина в клетках печени, которые секретируют недостающий фермент в кровотоки [124]. С использованием данного подхода авторам удалось достичь физиологического уровня экспрессии некоторых белков, включая  $\alpha$ -галактозидазу А (болезнь Фабри), фактор свертывания IX (гемофилия) и  $\alpha$ -L-идуронидазу, или IDUA (МПС II типа). Последующее тестирование на животных моделях МПС I и II типов направленного введения генов ферментов идуронат-2-сульфатазы (IDS) и IDUA соответственно в локус альбумина продемонстрировало стабильное повышение уровня IDS и IDUA в крови [125]. В настоящее время на этапе клинических испытаний находятся два препарата ZFN для терапии МПС I (NCT02702115) и II типов (NCT03041324). Однако следует отметить, что оба препарата предназначены только для пациентов с легкими формами заболевания, характеризующимися незначительным или отсутствием поражения центральной нервной системы, поскольку ферменты, вырабатываемые печенью, не могут пересекать гематоэнцефалический барьер. Находящийся на I фазе клинических испытаний препарат ZFN SB-FIX для терапии пациентов с тяжелой гемофилией В (NCT02695160) в случае успешного завершения позволит обеспечить постоянный уровень экспрессии фактора IX в печени в течение всей жизни пациента.

Таким образом, расширение спектра практического применения ZFN (помимо терапии ВИЧ-инфекции) и позитивные результаты I/II фаз клинических исследований терапевтических препаратов для геномного редактирования на

основе ZFN указывают на то, что ZFN играют значимую роль в клинической практике. Переход к III фазе исследований тем не менее потребует как временных, так и финансовых затрат для сбора, редактирования и накопления достаточного количества трансформированных клеток для каждого пациента.

## Литература

1. Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79: 181-211.
2. Moynahan M.E., Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11(3): 196-207.
3. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZNF, TALEN and CRISPR/CAS-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(7): 397-405.
4. Waryah C.B., Moses C., Arooj M., et al. Zinc fingers, TALEs, and CRISPR systems: A comparison of tools for epigenome editing. In: Jeltsch A., Rots M., eds. *Epigenome Editing. Methods in Molecular Biology. Volume 1767*. New York: Humana Press; 2018.
5. Pâques F., Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2007; 7(1): 49-66.
6. Stoddard B. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure.* 2011; 19(1): 7-15.
7. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11(9): 636-46.
8. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93(3): 1156-60.
9. Miller J., McLachlan A.D., Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 1985; 4(6): 1609.
10. Klug A., Rhodes D. Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1987; 52: 473-82.
11. Pavletich N.P., Pabo C.O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å resolution. *Science.* 1991; 252(5007): 809-17.
12. Rebar E. J., Pabo C.O. Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA binding specificities. *Science.* 1994; 263(5147): 671-3.
13. Pabo C.O., Peisach E., Grant R.A. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70: 313-40.
14. Li L., Wu L.P., Chandrasegaran S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89(10): 4275-9.
15. Kim Y.G., Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91(3): 883-7.
16. Kim Y.G., Smith J., Durgesha M., et al. Chimeric restriction enzyme: Gal4 fusion to Fok I cleavage domain. *Biol. Chem.* 1998; 379(4-5): 489-95.
17. Bibikova M., Golic M., Golic K.G., et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics.* 2002; 161(3): 1169-75.
18. Bibikova M., Beumer K., Trautman J.K., et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science.* 2003; 300(5620): 764.
19. Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature.* 2009; 459(7245): 442-5.
20. Osakabe K., Osakabe Y., Toki S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(26): 12034-9.

21. Curtin S.J., Zhang F., Sander J.D., et al. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol.* 2011; 156(2): 466-73.
22. Beumer K., Bhattacharyya G., Bibikova M., et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc finger nucleases. *Genetics.* 2006; 172(4): 2391-403.
23. Meng X., Noyes M.B., Zhu L.J., et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(6): 695-701.
24. Geurts A.M., Cost G.J., Freyvert Y., et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science.* 2009; 325(5939): 433.
25. Carbery I.D., Ji D., Harrington A., et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics.* 2010; 186(2): 451-9.
26. Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 2005; 435(7042): 646-51.
27. Carroll D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther.* 2008; 15(22): 1463-8.
28. Lee H.J., Kim E., Kim J.S. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res.* 2010; 20(1): 81-9.
29. Sebastiano V., Maeder M.L., Angstman J.F., et al. *In situ* genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells.* 2011; 29(11): 1717-26.
30. Tasan I., Jain S., Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum. Genet.* 2016; 135(9): 1011-28.
31. Li H., Haurigot V., Doyon Y., et al. *In vivo* genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature.* 2011; 475(7355): 217-21.
32. Garriga-Canut M., Agustin-Pavon C., Herrmann F., et al. Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(45): 3136-45.
33. Kiskinis E., Sandoe J., Williams L., et al. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell.* 2014; 14(6): 781-95.
34. Soldner F., Laganier J., Cheng A.W., et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early-onset Parkinson point mutations. *Cell.* 2011; 146(2): 318-31.
35. Ousterout D.G., Kabadi A.M., Thakore P.I., et al. Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol. Ther.* 2015; 23(3): 523-32.
36. Perez E.E., Wang J., Miller J.C., et al. Establishment of HIV<sub>1</sub> resistance in CD4<sup>+</sup> T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26(7): 808-16.
37. Tebas P., Stein D., Tang W.W., et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(10): 901-10.
38. Moore M., Klug A., Choo Y. Improved DNA binding specificity from polyzinc finger peptides by using strings of two-finger units. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98(4): 1437-41.
39. Segal D.J., Crotty J.W., Bhakta M.S., et al. Structure of Aart, a designed six-finger zinc finger peptide, bound to DNA. *J. Mol. Biol.* 2006; 363(2): 405-21.
40. Segal D.J., Beerli R.R., Blancafort P., et al. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry.* 2003; 42(7): 2137-48.
41. Liu Q., Segal D.J., Ghiara J.B., et al. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94(11): 5525-30.
42. Bae K.H., Kwon Y.D., Shin H.C., et al. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(3): 275-80.

43. Jantz D., Amann B.T., Gatto J.G.J., et al. The design of functional DNA-binding proteins based on zinc finger domains. *Chem. Rev.* 2004; 104(2): 789-99.
44. Wu H., Yang W.P., Barbas C.F. Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92(2): 344-8.
45. Beerli R.R., Barbas C.F. Engineering polydactyl zinc finger transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20(2): 135-41.
46. Bhakta M.S., Segal D.J. The generation of zinc finger proteins by modular assembly. *Methods Mol. Biol.* 2010; 649: 3-30.
47. Gersbach C.A., Gaj T., Barbas C.F. Synthetic zinc finger proteins: the advent of targeted gene regulation and genome modification technologies. *Acc. Chem. Res.* 2014; 47(8): 2309-18.
48. Kolb A.F., Coates C.J., Kaminski J.M., et al. Site-directed genome modification: nucleic acid and protein modules for targeted integration and gene correction. *Trends Biotechnol.* 2005; 23(8): 399-406.
49. Camenisch T.D., Brilliant M.H., Segal D.J. Critical parameters for genome editing using zinc finger nucleases. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008; 8(7): 669-76.
50. Gordley R.M., Gersbach C.A., Barbas C.F. Synthesis of programmable integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(13): 5053-8.
51. Segal D.J., Dreier B., Beerli R.R., et al. Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(6): 2758-63.
52. Dreier B., Beerli R.R., Segal D.J., et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(31): 29466-78.
53. Dreier B., Fuller R.P., Segal D.J., et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-CNN-3' family DNA sequences and their use in construction of artificial transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(42): 35588-97.
54. Maeder M.L., Thibodeau-Beganny S., Osiaik A., et al. Rapid «open-source» engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol. Cell.* 2008; 31(2): 294-301.
55. Gupta A., Christensen R.A., Rayla A.L., et al. An optimized two-finger archive for ZFN-mediated gene targeting. *Nat. Methods.* 2011; 9(6): 588-90.
56. Szybalski W., Kim S.C., Hasan N., et al. Class-II restriction enzymes – a review. *Gene.* 1991; 100: 13-26.
57. Kovall R.A., Matthews B.W. Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999; 3(5): 578-83.
58. Vanamee E.S., Santagata S., Aggarwal A.K. FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J. Mol. Biol.* 2001; 309(1): 69-78.
59. Wah D.A., Bitinaite J., Schlidkraut I., et al. Structure of the restriction endonuclease FokI has implications for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(18): 10564-9.
60. Halford S.E., Catto L.E., Pernstich C., et al. The reaction mechanism of FokI excludes the possibility of targeting zinc finger nucleases to unique DNA sites. *Biochem. Soc. Trans.* 2011; 39(2): 584-8.
61. Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K., et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(18): 10570-5.
62. Sanders K.L., Catto L.E., Bellamy S.R., et al. Targeting individual subunits of the FokI restriction endonuclease to specific DNA strands. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(7): 2105-15.

63. Pingoud A., Wende W. Generation of novel nucleases with extended specificity by rational and combinatorial strategies. *Chembiochem*. 2011; 12(10): 1495-500.
64. Porteus M.H., Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*. 2003; 300(5620): 763.
65. Doyon Y., Vo T.D., Mendel M.C., et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat. Methods*. 2011; 8(1): 74-9.
66. Miller J.C., Holmes M.C., Wang J., et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol*. 2007; 25(7): 778-85.
67. Ramalingam S., Kandavelou K., Rajenderan R., et al. Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity. *J. Mol. Biol*. 2011; 405(3): 630-41.
68. Szczepek M., Brondani V., Buchel J., et al. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol*. 2007; 25(7): 786-93.
69. Cornu T.I., Thibodeau-Beganny S., Guhl E., et al. DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol. Ther*. 2008; 16(2): 352-8.
70. Gupta A., Meng X., Zhu L.J., et al. Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the in vivo off-target activity of zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(1): 381-92.
71. Radecke S., Radecke F., Cathomen T., et al. Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: wanted and unwanted target locus modifications. *Mol. Ther*. 2010; 18(4): 743-53.
72. Handel E.M., Cathomen T. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Curr. Gene Ther*. 2011; 11(1): 28-37.
73. Moore J.K., Haber J.E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol*. 1996; 16(5): 2164-73.
74. Delacote F., Lopez B.S. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: The trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle*. 2008; 7(1): 33-8.
75. Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985; 317(6034): 230-4.
76. Capecchi M.R. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989; 244(4910): 1288-92.
77. Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu. Rev. Biochem*. 2014; 83: 409-39.
78. Lee C.M., Cradick T.J., Fine E.J., et al. Nuclease target site selection for maximizing on-target activity and minimizing off-target effects in genome editing. *Mol. Ther*. 2016; 24(3): 475-87.
79. Sander J.D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., et al. Selection-free zinc finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat. Methods*. 2011; 8(1): 67-9.
80. Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Hackett P.B. Targeting DNA with fingers and TALENs. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2012; 1(1): e3.
81. Pattanayak V., Guilinger J.P., Liu D.R. Determining the specificities of TALENs, Cas9, and other genome editing enzymes. *Methods Enzymol*. 2014; 546: 47-78.
82. Fine E.J., Cradick T.J., Bao G. Identification of offtarget cleavage sites of zinc finger nucleases and TAL effector nucleases using predictive models. *Methods Mol. Biol*. 2014; 1114: 371-83.
83. Hendel A., Fine E.J., Bao G., et al. Quantifying on and off-target genome editing. *Trend Biotechnol*. 2015; 33(2): 132-40.

84. Chandrasegaran S., Carroll D. Origins of programmable nucleases for genome engineering. *J. Mol. Biol.* 2016; 428(5 Pt. B): 963-89.
85. Cox D., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* 2015; 21(2): 121-31.
86. Carroll D. Genome editing: progress and challenges for medical applications. *Genome Med.* 2016; 8(1): 120.
87. Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2014; 15(8): 541-55.
88. Just S., Büning H. Key to delivery: The (Epi-)genome editing vector toolbox. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1767: 147-66.
89. Colella P., Ronzitti G., Mingozzi F. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2018; 8: 87-104.
90. Rossidis A.C., Stratigis J.D., Chadwick A.C., et al. In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes. *Nat. Med.* 2018; 24(10): 1513-8.
91. Villiger L., Grisch-Chan H.M., Lindsay H., et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice. *Nat. Med.* 2018; 24(10): 1519-25.
92. Yin C., Zhang T., Qu X., et al. In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Mol. Ther.* 2017; 25(5): 1168-86.
93. Amoasii L., Hildyard J.C.W., Li H., et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2018; 362(6410): 86-91.
94. Huang X., Zhou G., Wu W., et al. Genome editing abrogates angiogenesis *in vivo*. *Nat. Commun.* 2017; 8(1): 4-11.
95. Maeder M.L., Stefanidakis M., Wilson C.J., et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat. Med.* 2019; 25(2): 229-33.
96. Santiago-Fernandez O., Osorio F.G., Quesada V., et al. Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* 2019; 25(3): 423-6.
97. Mingozzi F., High K.A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12(5): 341-55.
98. Mingozzi F., High K.A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood.* 2013; 122(1): 23-36.
99. Louis Jeune V., Joergensen J.A., Hajjar R.J., et al. Pre-existing anti-adenovirus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum. Gene Ther. Methods.* 2013; 24: 59-67.
100. Li L., Hu S., Chen X. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: challenges and opportunities. *Biomaterials.* 2018; 171: 207-18.
101. Glass Z., Lee M., Li Y., et al. Engineering the delivery system for CRISPR based genome editing. *Trends Biotechnol.* 2018; 36(2): 173-85.
102. Lee K., Conboy M., Park H.M., et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat. Biomed. Eng.* 2017; 1: 889-901.
103. Lee B., Lee K., Panda S., et al. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat. Biomed. Eng.* 2018; 2: 497-507.
104. Jang Y., Ye Z. Gene correction in patient-specific iPSCs for therapy development and disease modeling. *Hum. Genet.* 2016; 135: 1041-58.
105. Chal J., Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development.* 2017; 144(12): 2104-22.



106. Magli A., Perlingeiro R.R.C. Myogenic progenitor specification from pluripotent stem cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017; 72: 87-98.
107. van der Wal E., Herrero-Hernandez P., Wan R., et al. Large-Scale expansion of human iPSC-derived skeletal muscle cells for disease modeling and cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Reports.* 2018; 10(6): 1975-90.
108. Fiorotto R., Amenduni M., Mariotti V., et al. Liver diseases in the dish: iPSC and organoids as a new approach to modeling liver diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019; 1865(5): 920-8.
109. Hannoun Z., Steichen C., Dianat N., et al. The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *J. Hepatol.* 2016; 65(1): 182-99.
110. Brandão K.O., Tabel V.A., Atsma D.E., et al. Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Dis. Model. Mech.* 2017; 10(9): 1039-59.
111. Devalla H.D., Passier R. Cardiac differentiation of pluripotent stem cells and implications for modeling the heart in health and disease. *Sci. Transl. Med.* 2018; 10(435): eaah5457.
112. Genovese P., Schirotti G., Escobar G., et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014; 510(7504): 235-40.
113. Gaj T., Guo J., Kato Y., et al. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods.* 2012; 9(8): 805-7.
114. Liu J., Gaj T., Wallen M.C., et al. Improved cell-penetrating zinc-finger nuclease proteins for precision genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2015; 4(3): e232.
115. Loetscher P., Ugucioni M., Bordoli L., et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature.* 1998; 391(6665): 344-5.
116. Samson M., Libert F., Doranz B.J., et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996; 382(6593): 722-5.
117. Huang Y., Paxton W.A., Wolinsky S.M., et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 1996; 2(11): 1240-3.
118. Li L., Krymskaya L., Wang J., et al. Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases. *Mol. Ther.* 2013; 21(6): 1259-69.
119. DiGiusto D.L., Cannon P.M., Holmes M.C., et al. Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2016; 3: 16067.
120. Liu N., Hargreaves V.V., Hong J., et al. Fetal hemoglobin (HbF) silencer BCL11A Acts through a novel DNA-motif in the gamma-globin promoters, simplifying the model for hemoglobin switching. *Blood.* 2017; 130(Suppl. 1): 283.
121. Xu J., Bauer D.E., Peng C., et al. Identification of BCL11A structure-function domains for fetal hemoglobin silencing. *Blood.* 2013; 122(21): 435.
122. Holmes M.C., Reik A., Rebar E.J., et al. A potential therapy for beta-thalassemia (ST-400) and sickle cell disease (BIVV003). *Blood.* 2017; 130(Suppl. 1): 2066.
123. Moran K., Ling H., Lessard S., et al. *Ex vivo* gene-edited cell therapy for sickle cell disease: disruption of the BCL11A erythroid enhancer with zinc finger nucleases increases fetal hemoglobin in plerixafor mobilized human CD34+ cells. *Blood.* 2018; 132(Suppl. 1): 2190.
124. Sharma R., Anguela X.M., Doyon Y., et al. *In vivo* genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood.* 2015; 126(15): 1777-84.
125. Ou L., DeKaveler R.C., Rohde M., et al. ZFN-mediated *in vivo* genome editing corrects murine Hurler syndrome. *Mol. Ther.* 2019; 27(1): 178-87.

## ГЛАВА 2

### TALE-нуклеазы

---

Подобные активатору транскрипции эффекторы (transcription activator-like effector, TALE) были впервые обнаружены при изучении бактерий рода *Xanthomonas*, паразитирующих на многих сельскохозяйственных растениях. Установлено, что эти бактериальные белки участвуют в регуляции экспрессии генов растений, меняя работу генов растительных клеток, подобно транскрипционным факторам эукариот [1–3]. В 2009 г. был расшифрован механизм узнавания TALE специфической последовательности ДНК [4, 5]. Это открытие привело к созданию новых TALE, распознающих заданную исследователем последовательность ДНК. Соединение полученных TALE с каталитическим доменом нуклеаз привело к появлению нового инструмента для направленного редактирования ДНК — TALE-нуклеаз, или TALEN.

#### 2.1. Открытие TALE

Изучение TALE началось с исследования растительных патогенных бактерий. При попадании в ядро растительной клетки TALE взаимодействует с целевой последовательностью и включает гены клетки-хозяина. Такое взаимодействие облегчает распространение бактерий. Растения выработали защитные механизмы в ответ на попадание TALE патогенных бактерий. Таким образом, TALE может быть как фактором вирулентности, так и распознаваемым растением фактором авирулентности, или тем и другим сразу [6, 7]. Изучение патогенной для перца и томата бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* привело к открытию гена *avrBs3*, связанного с гиперчувствительностью растений, имеющих ген устойчивости *Bs3*. Гиперчувствительность заключается в быстром апоптозе клеток растений в области поражения бактерией. Это локализует возбудителя, препятствуя его дальнейшему распространению, и защищает растение от гибели.

Ген *avrBs3* стал первым геном в семействе так называемых генов авирулентности (*avr*), выделенных позже из различных патогенных для растений

бактерий и связанных с доминантными генами резистентности растений [8]. Обнаружение новых генов семейства *avr* в патогенных линиях *Xanthomonas*, связанных с патогенными симптомами и не связанных с родственными доминантными генами резистентности соответствующих растений, привело к появлению термина «патогенность» («*pathogenicity*», *pth*) для некоторых представителей семейства, включая обнаружение гена *pthA* [9]. Таким образом, к данному семейству генов обычно относят представителей *avrBs3/pthA*-подобных генов.

Нуклеотидные последовательности данного семейства генов стали обнаруживать у разных представителей рода *Xanthomonas*, например, *X. citri*, поражающих цитрусовые [10], *X. oryzae* pv. *oryzae* и *X. campestris* pv. *Malvacearum*, вызывающих гниль риса [11] и гоммоз хлопчатника [12] соответственно. Гипотеза о связи с транскрипцией появилась после открытия сигнала ядерной локализации на С-конце белков, кодируемых данными генами [13].

По мере быстрого роста количества открываемых эффекторов, в основном с неизвестными функциями или фенотипом, возникала необходимость в новом термине, в том числе чтобы избежать путаницы с определением «авирулентность» в отношении растительных и животных патогенов. Благодаря открытию в С-концевой области таких эффекторов кислого домена, подобного эукариотическим активаторам транскрипции (acidic activator domain — AAD), появился термин TALE. Необходимость AAD-домена для проявления «авирулентности» была показана для генов *AvrXa10* и *AvrXa7* [1, 14].

Эти свойства TALE привели к гипотезе о некоем влиянии или взаимодействии с транскрипционным аппаратом растительных клеток. Одним из предположений было связывание с ДНК, и, действительно, было показано, что *AvrXa7* взаимодействует с двуцепочечной ДНК в АТ-богатых областях [14]. Однако никаких специфических промоторов или сайтов связывания с ДНК в клетках растений не обнаруживалось.

Вторым наблюдением было обнаружение *AvrBs3*-зависимых транскриптов в перце, устойчивом к циклогексимиду, и зависящих от свойств TALE [15]. Считалось, что устойчивость к циклогексимиду указывает на немедленный эффект, а не на синтез эндогенных транскриптов *de novo*. В то же время специфические TALE-зависимые гены растений еще не были открыты, т.е. соответствующих доказательств причинно-следственной связи с ассоциированными фенотипами не было. Позже была показана активация экспрессии генов растений при взаимодействии с фактором транскрипции ТФИА [16]. Прямое доказательство связывания TALE с ДНК появилось с открытием генов *Bs3* и *Ura20* как мишеней для *AvrBs3* [17, 18].

## 2.2. Структура TALE

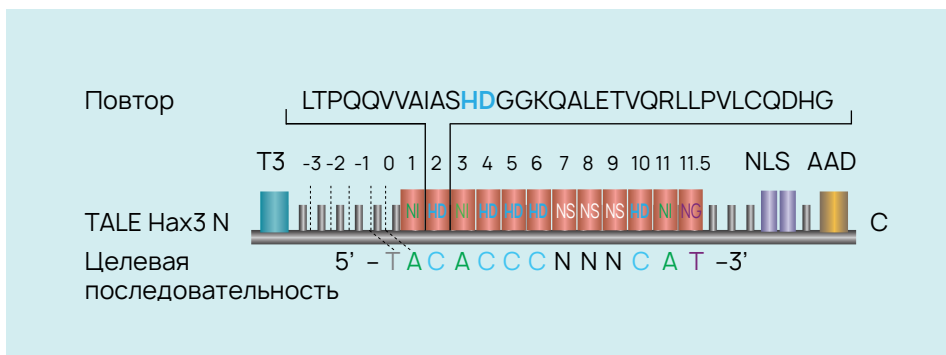
В связывании белков со специфической последовательностью ДНК могут участвовать разнообразные белковые структуры. Обычно нуклеопротеидные взаимодействия обусловлены несколькими аминокислотами, которые вместе определяют специфическое узнавание последовательности ДНК. Соответственно, специфичность связывания белков с ДНК обычно чрезвычайно сложно

изменить. В противоположность этому для решения задач в биотехнологии необходимо иметь возможность менять специфичность связывания с ДНК в широких пределах. Кроме того, в случае редактирования ДНК эукариот *in vivo* нужно доставить конструктор в ядро клетки. Использование TALE позволяет решать эти задачи. В структуре TALE выделяют 3 домена (**рис. 2.1**).

N-концевой сигнал секреции III типа (T3, голубой цвет) отвечает за перенос в растительную клетку сигнальной системой III типа *Xanthomonas spp.* На C-конце находятся сигнал ядерной локализации (NLS, синий цвет) и кислый активирующий транскрипцию домен (AAD, оранжевый цвет). Центральный ДНК-связывающий домен состоит из высококонсервативных тандемных повторов размером 34 аминокислотных остатка (красный цвет). Каждый повтор распознает один соответствующий нуклеотид кодирующей цепи целевой последовательности, аминокислоты в 12-й и 13-й позициях обеспечивают специфичность взаимодействия. Распознавание дополнительного тимина на 5'-конце обусловлено редуцированным повтором в -1 положении в N-концевой части.

N-концевой домен содержит сигнал секреции III типа, а также важен для инициации связывания с ДНК [19, 20]. C-концевой домен содержит сигнал ядерной локализации и домен активации транскрипции. Центральный домен является ДНК-связывающим и состоит из повторов, которые и отвечают за специфическое узнавание целевой последовательности ДНК. Повторы расположены тандемно по 33–35 аминокислотных остатков (**рис. 2.1**). Расположенный ближе к C-концу повтор содержит только 20 аминокислотных остатков и обозначается как «полуповтор». Среди TALE рода *Xanthomonas* центральный домен очень консервативен и, в основном, отличается по количеству повторов (от 1,5 до 30). Позиции 12 и 13 в последовательности аминокислотных остатков повторов являются гипервариабельными, эти позиции называют Repeat Variable Di-residue (RVD). Количество повторов в TALE определяет количество нуклеотидов в распознаваемой им целевой последовательности ДНК, а каждый RVD соответствует определенному нуклеотиду [4, 5].

Для большинства TALE в начале целевой последовательности стоит тимин, являясь иницирующим основанием ( $T_0$ ). В ряде случаев это правило не явля-



**Рис. 2.1.** Структура природного TALE Naх3.

ется обязательным [21–23]. Например, для одного из гомологов TALE бактерии *Ralstonia solanacearum* иницирующим является гуанидин [24, 25], а для африканской *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) линия ВА13 — цитозин [26]. Открытие принципов узнавания последовательности ДНК позволило создавать искусственные TALE с необходимой специфичностью связывания.

### 2.3. Специфичность RVD

Сегодня известно 25 природных RVD, среди них наиболее часто используемые — HD (гистидин, аспарагиновая кислота), NI (аспарагин, изолейцин) и NG (аспарагин, глицин) — являются высокоспецифичными для оснований цитозин, аденин и тимин соответственно (рис. 2.2). Для гуанина используются несколько RVD: NH (аспарагин, гистидин), NK (аспарагин, лизин) и NN (аспарагин, аспарагин), распознающий гуанин и в меньшей степени аденин [27]. Некоторые RVD распознают более 2 оснований, например, NS (аспарагин, серин) и NA (аспарагин, аланин) могут использоваться почти как неспецифические универсальные RVD.

На сегодняшний день проанализированы все 400 теоретически возможных комбинаций RVD [28]. Кроме обнаруженных в природе было открыто несколько новых функционально активных RVD.

Активность, сходную с природными, чаще всего демонстрировали RVD с гистидином (H), лизином (K), аспарагином (N) и аргинином (R) в позиции 12. Специфичность аминокислоты, находящейся в позиции 13, совпадает с известными естественными RVD, например, KI, NI, RI специфичны для аденина (рис. 2.2).

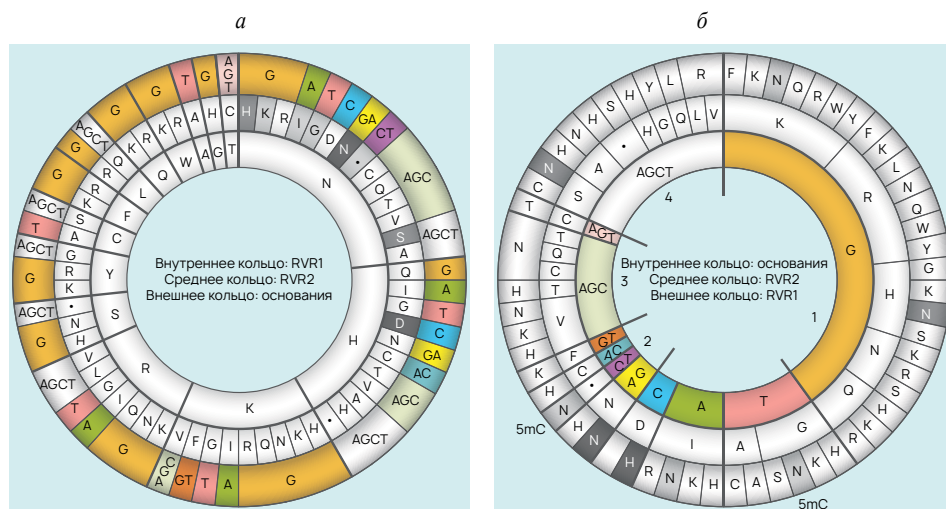


Рис. 2.2. Специфичность RVD.  
а — по RVD; б — по основанию.



Кроме специфического взаимодействия RVD с ДНК каждый повтор связывается с сахаро-фосфатным скелетом (остовом) смысловой ДНК посредством 14–17 аминокислотных остатков.

Взаимодействие RVR2 с основанием зависит от 2 параметров: связывание RVR2 с основанием с помощью водородных связей или ван-дер-ваальсовых взаимодействий, стерические затруднения, возникающие для некоторых комбинаций RVR2+основание. В некоторых повторах RVR2 отсутствует, тогда RVR2 в таком RVD обозначают звездочкой, например, Н\*. В силу стерических затруднений такие RVD взаимодействуют с пиримидинами в ДНК. Дополнительно Н\* способен взаимодействовать с 5-метилцитозином. RVD NG также способен взаимодействовать с 5-метилцитозином. Это позволяет создавать TALE для участков генома, где имеется метилирование цитозина и стандартный RVD, специфичный для цитозина (HD), уже не подходит [31–34].

## 2.4. Эффективность RVD

Исследования эффективности различных RVD показали, что существуют «слабые» и «сильные» RVD. TALE, составленные только из «слабых» RVD, не влияли на экспрессию целевых генов: ни в случае когда один и тот же RVD повторялся в тандеме, ни при использовании разных «слабых» RVD [27]. Наличие как минимум трех «сильных» RVD (HD и NN) восстанавливало функциональную активность TALE. Эффективность RVD определяют следующие параметры:

1. Схожая специфичность, но различия в RVR2, например, такие RVD как NN, NH и NK распознают гуанин с сильной, средней и слабой аффинностью соответственно, причем отличие между сильной и слабой аффинностью может достигать 1000 раз [35].

2. Схожая специфичность, но различия в RVR1: в противоположность высокой вариабельности аминокислот RVR2 в RVR1 встречается лишь несколько разных аминокислот, в основном, это аспарагин (N) и гистидин (H) [28, 36]. Поскольку RVR1 связан со стабильностью внутри повтора, это может опосредованно влиять на взаимодействие RVD с ДНК, т.е. RVD с одинаковой специфичностью могут значительно отличаться по эффективности, например, HD (гистидин, аспарагиновая кислота) сильнее, чем ND (аспарагин, аспарагиновая кислота) [27].

3. RVD, распознающие разные основания с разной эффективностью: например, NN распознает оба пуриновых основания, но предпочтительней аденин, чем гуанин, поскольку распределение его отрицательного заряда — более подходящее для взаимодействия [37, 38]. Таким образом, NN является сильным RVD для гуанина и слабым — для аденина [4, 27, 35]. NS – универсальный RVD для всех 4 оснований, тем не менее RVR2 в виде серина предпочтительней взаимодействует с пуринами (A, G), чем с пиримидинами (T, C).

Таким образом, при создании искусственных TALE должны приниматься в расчёт специфичность и эффективность RVD. Большинство созданных TALE

содержат не менее 3 сильных RVD [27, 39]. За счет возможности варьировать специфичность для каждой позиции в сайте посадки TAL-эффекторы и создаваемые на их основе TALEN являются более гибким инструментом геномного редактирования, чем системы CRISPR/Cas.

## 2.5. Количество повторов TALE

Природные TALE бактерий рода *Xanthomonas* содержат 1,5–33,5 повтора, но не известно, все ли они функционально активны [36]. В искусственных TALE для активации генов в растениях необходимо не менее 6,5 повтора, для сильной активации необходимо не менее 10,5 повтора, итоговый минимум повторов зависит от состава RVD [4]. Например, TALE, содержащий 10,5 повтора только слабых и средней силы RVD (NI, NG, NH), не запускает экспрессию целевого гена. Добавление в структуру TALE сильных RVD или увеличение количества повторов до 17,5 восстанавливает активность [27]. В некоторых случаях четкой зависимости активности TALE от числа повторов не наблюдается, в этом случае выбор места посадки TALE влияет на функциональность TALE сильнее, чем количество повторов [40]. Получается, что активность TALE зависит от суммарного вклада каждого повтора в связывание с ДНК, но лишь до тех пор, пока максимум активности не достигнут.

Чем меньше повторов в структуре TALE, тем больше возможных мест связывания в геноме может быть найдено, и чем больше геном, тем больше таких мест. В случае генома человека уникальной последовательностью должен обладать фрагмент длиной порядка 16 п.н. Поскольку для большинства биотехнологических инструментов требуется высокая специфичность связывания TALE, при дизайне TALE следует выбирать длину, позволяющую находить уникальную последовательность в геноме. Например, для генома человека длина желательна не менее 20 п.н., что соответствует 18,5 повтора, учитывая тимин в начале. Также необходимо, чтобы TALE не содержал RVD, специфичных к нескольким основаниям. В случае RVD с разной эффективностью связывания предпочтительней выбирать наиболее сильный, например, для связывания с гуанином использовать NK вместо NN [41]. Такой подход для дизайна TALE обеспечивает их высокую специфичность для геномного редактирования.

## 2.6. Устойчивость к заменам

Свойство некоторых RVD связываться с несколькими основаниями в ДНК-цепи приводит к тому, что TALE имеет определенный запас прочности по отношению к заменам в целевой последовательности. Однако в некоторых случаях несколько замен в целевой последовательности могут сделать TALE полностью нефункциональным [42, 43]. Порог, при котором связывание TALE критически нарушается, вероятно, зависит от общей эффективности связывания TALE (количества и эффективности RVD), расположения замен и влияния



отдельных замен на 3D-структуру TALE. В ряде экспериментов показано большее влияние замен для N-концевых повторов [35, 41, 44]. Меньшее количество повторов делает TALE менее устойчивым к заменам [44]. Отрицательное влияние на общее связывание одной замены заметно превосходит положительный вклад одной совпадающей пары повтор–основание. Искусственные TALE, центральный домен которых содержит 17,5 повтора, не распознают большинство мишеней с 3 заменами либо активируют репортерный ген только на 10% [44]. Искусственные TALE, содержащие 13,5 повтора, при 3 заменах в целевой последовательности активируют репортерный ген лишь на 1% от максимального уровня, а TALE, состоящий из 9,5 повтора, уже при одной замене не распознает целевую последовательность [44].

В противоположность вышеизложенному, устойчивость к заменам в целевой последовательности парных TALEN может быть выше, чем в случае единичного TALE-производного. Первый мономер TALEN, садясь на целевую последовательность, может выступать в роли якоря, и димеризация нуклеазных доменов стабилизирует связывание второго мономера TALEN даже при значительно хуже совпадающей целевой последовательности. Анализ нецелевого связывания показал, что TALEN, содержащий 14,5 повтора, сохраняет функциональность до 6 замен в целевой последовательности [45]. В другой работе TALEN, содержащий 17,5 повтора, сохранял 30% активности при 4 заменах [44]. Кроме того, TALEN с 3 заменами на 3'-конце целевой последовательности был активным, в отличие от соответствующего TALE [46]. Это свидетельствует о том, что связывание удаленных повторов более значимо для TALE, но не для TALEN, возможно, из-за того, что димеризация нуклеазных доменов не требует полного связывания всех повторов с ДНК. Все эти примеры указывают на большую устойчивость к заменам парных TALEN по сравнению с TALE.

В недавней работе было показано влияние двухвалентных катионов металлов ( $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ) на специфичность TALE [47]. В присутствии этих катионов степень неспецифического связывания TALE значительно снижалась за счет снижения степени связывания N-концевой области TALE, отвечающей за неспецифическое взаимодействие с ДНК, и в то же время повышения связывания центрального домена с повторами, отвечающего за специфическое взаимодействие с ДНК. Этот эффект был наиболее выражен для TALE длиной 21,5 повтора в сравнении с более короткими TALE длиной 11,5 и 15,5 повтора.

## 2.7. Изменчивость структуры повторов

Наиболее изменчивыми позициями аминокислот в повторах являются позиции 12 и 13, остальные позиции редко отличаются друг от друга среди TALE бактерий рода *Xanthomonas*. Но все же если рассмотреть вариацию позиций, не входящих в RVD, то наиболее изменчивы позиции 4 и 24 [46], в которых чаще всего находятся заряженная, полярная или гидрофобная аминокислота. Например, для позиции 4 — D (аспарагиновая кислота), E (глутаминовая кис-

лота) и А (аланин), для позиции 24 — R (аргинин) и А (аланин). Отрицательно и положительно заряженные аминокислоты формируют электронегативные или электропозитивные полосы соответственно на противоположных сторонах сферического TALE [29, 48]. В исследовании с искусственно сконструированным TALE с повторяющимися RVD (NN), содержащим в позиции 4 каждого повтора заряженную аспарагиновую кислоту (D) или полярный глутамин (Q), более активным *in planta* был TALE с аспарагиновой кислотой [27]. В другой работе показано влияние аминокислот в позициях 4, 5 и 32 на эффективность связывания с ДНК [49].

Кроме этого структура повторов может отличаться по количеству аминокислот. Чаще всего повторы TALE состоят из 34 аминокислот, но также нередко встречаются варианты 33 и 35 аминокислот. В случае 33 аминокислот отсутствует аминокислота в 13 положении (например, N\*), при длине повтора в 35 аминокислот после позиции 32 находится дополнительный пролин (P) [36, 50]. Оба варианта длины функционально идентичны повторам длиной 34 аминокислоты [4, 27].

В природе реже встречаются TALE с длиной повторов 30, 39, 40 и 42 аминокислоты [36]. Данные повторы обладают интересным свойством, отличающим их от обычных повторов длиной 33–35 аминокислот. Один удлинённый или укороченный повтор в массиве повторов длиной 34 аминокислоты позволяет TALE или TALEN эффективно распознавать две разных последовательности: одну — соответственно обычному правилу связывания «один повтор — одно основание» и другую — с делецией основания в непосредственной близости от нестандартного повтора [46]. Такая пластичность позволяет создавать TALE и TALEN с двойной специфичностью для аллельных вариантов с мутациями типа «инсерция/делеция».

## 2.8. Белки семейства TALE

Кроме *Xanthomonas spp* белки семейства TALE встречаются у некоторых других видов [51]. TALE-подобные активаторы генов у растительной патогенной бактерии *Ralstonia solanacearum* содержат очень схожую область с повторами по 35 аминокислот, но N- и C-концевые домены отличаются от TALE рода *Xanthomonas*. TALE-повторы *Ralstonia* отличаются от повторов *Xanthomonas* некоторыми аминокислотами, расположенными вне RVD, а также между повторами (**рис. 2.5**) [24, 25, 27]. Несмотря на это специфичность RVD TALE-белков *R. solanacearum* при распознавании ДНК почти идентична с RVD TALE-белков *Xanthomonas*. Вариация аминокислот вне RVD, по-видимому, влияет только на структуру массива повторов, предпочтительное основание и эффективность RVD [24]. Белки семейства TALE с повторами длиной 33 аминокислоты и очень короткими N- и C-концевыми доменами обнаружены у симбиотической бактерии *Burkholderia rhizoxinica*, живущей в гифах зигомицетного гриба *Rhizopus microsporus* [51–53]. Повторы у TALE этой бактерии очень изменчивы, различия достигают более 50% [54] и совпадают только по некоторым аминокислотным позициям вне RVD с TALE у *Xanthomonas* или *Ralstonia*.

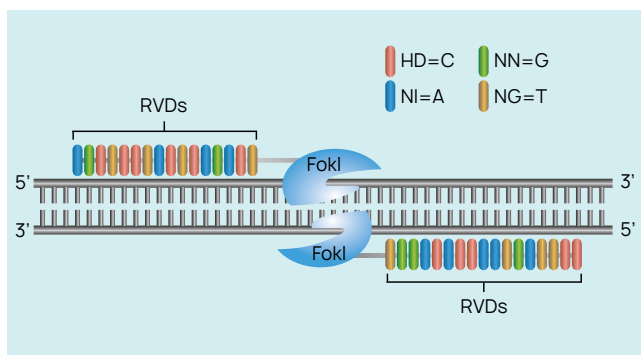
Несмотря на это область повтора формирует TALE-подобную суперскрученную структуру, и повторы связываются с ДНК по точно такому же коду, как и TALE-белки *Xanthomonas*. Таким образом, они классифицируются вместе с TALE-белками *Xanthomonas* и *Ralstonia* в семейство белков с ярко выраженными свойствами связывания с ДНК.

TALE могут быть использованы для создания специфических нуклеаз и искусственных активаторов генов, но с помощью добавления соответствующих функциональных доменов, поскольку TALE самостоятельно не активируют гены [54–56]. Стоит также отметить, что невозможно использовать повторы в отдельности без потери общей активности [54], предположительно, из-за того, что изменчивость аминокислотных позиций вне RVD приводит к значительной взаимозависимости архитектуры соседних повторов. Тем не менее, несмотря на отличия позиций вне RVD у *Xanthomonas*, *Ralstonia* и *Burkholderia* для белков TALE-семейства, ключевую роль в специфичности при связывании с ДНК играет стандартный код RVD.

## 2.9. Создание TALEN

Для внесения двуцепочечного разреза в ДНК необходима димеризация доменов *FokI* пары TALEN, расположенных на комплементарных цепях и ориентированных навстречу друг другу (рис. 2.5). Такое расположение дополнительно увеличивает специфичность TALEN при редактировании. Нуклеазный домен располагается обычно на расстоянии 12–24 п.н. от сайта узнавания [57–59].

Имеются исследования, в которых показано, что укорочение С-концевой области TALE увеличивало нуклеазную активность TALEN. Такое укорочение позволяет сократить расстояние между двумя мономерами, снижая вероятность неспецифической рестрикции. Также в этих исследованиях показано, что удаление домена ядерной локализации не влияет на нуклеазную активность [58, 59].



**Рис. 2.5.** Структура и модель TALEN.

Димер TALEN: ДНК-связывающий домен, состоящий из массива RVD, распознающего заданную последовательность, С-концевой домен связан с доменом эндонуклеазы *FokI* (синий цвет).

В качестве альтернативного нуклеазного домена при дизайне TALEN можно использовать каталитический домен мегануклеаз, повышая их специфичность [60]. Также можно найти примеры использования мономера TALEN, состоящего из TALE и модифицированной нуклеазы I-SceI, распознающей 18-нуклеотидную последовательность, такой мономер TALEN распознает последовательность длиной 33 нуклеотида гена  $\beta$ -глобина человека рядом с мутацией, связанной с бета-талассемией, кроме того высокоспецифичная нуклеаза обеспечивает более низкую генотоксичность для клеток [61].

Произвольные TALE в течение нескольких дней могут быть созданы с помощью библиотек плазмид, используя технологию молекулярного клонирования «Golden Gate» [62, 63], технологию ULtiMATE (USER-based Ligation-Mediated Assembly of TAL Effector) [64], химического синтеза [65, 66] или клонирования без использования лигазы [67].

## 2.10. Доставка TALEN

Мономеры TALEN легко доставляются в ядро в виде экспрессирующих ДНК-кассет или мРНК с помощью классических методов трансфекции, например, микроинъекции или электропорации [68]. В то же время размеры TALEN и большое количество повторов RVD являются препятствием для вирус-ассоциированной доставки. В качестве подходящего вектора для доставки конструкторов, содержащих оба мономера TALEN, используют аденовирус [69]. Доставка TALEN в виде готового белка может осуществляться с помощью ковалентного присоединения транспортных пептидов, проникающих через мембрану клетки [70]. В этом случае нет риска спонтанной интеграции TALEN-экспрессирующего ДНК-конструкта в геном, которая может происходить при доставке ДНК. Также такой способ доставки может снижать нецелевую нуклеазную активность благодаря ограниченной во времени активности введенных TALEN [71].

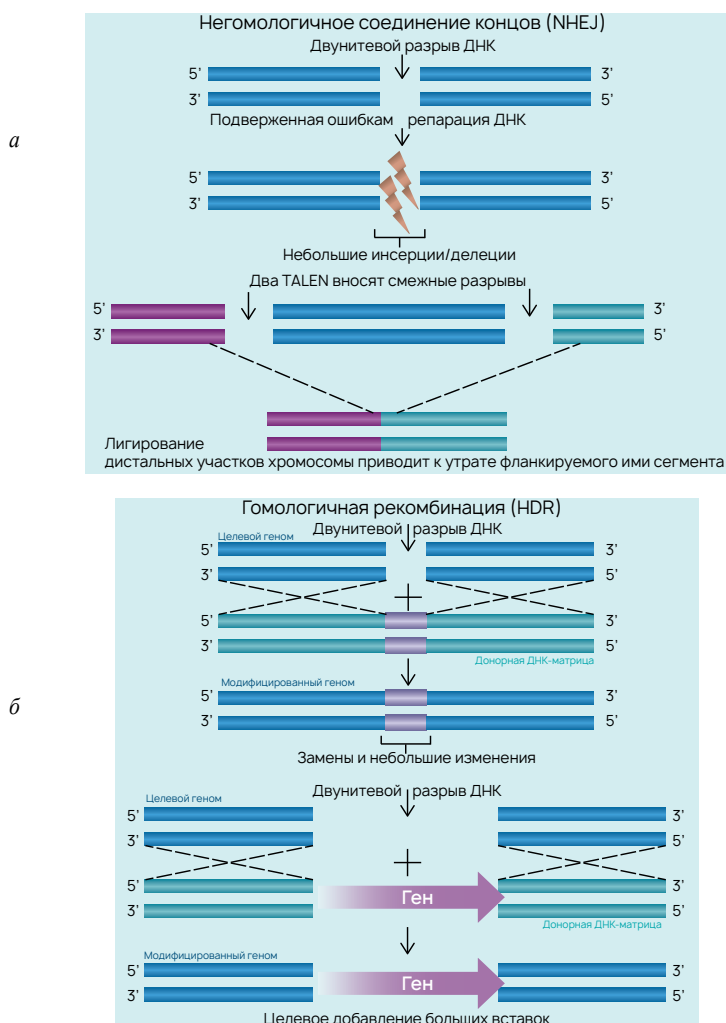
## 2.11. Применение TALEN в науке, биотехнологии и генной терапии

Библиотека TALEN, нацеленных на белок-кодирующие гены человека, насчитывает 18 740 вариантов [72].

Технология редактирования с помощью TALEN может использоваться для создания клеточных моделей заболеваний человека, для исследования мутаций или генов, связанных с заболеваниями [73, 74]. Простота технологии TALEN позволила исследователям быстро создавать крупные геномные делеции для изучения функций микроРНК [75, 76]. Высокопроизводительные комплексы TALEN также использовались для исследования большого спектра генов эпигенетической регуляции рака, успешность модификации целевых генов была более 85% [65]. Таким образом, можно сказать, что TALEN являются универсальным средством для изучения как малых, так и больших генетических элементов в сложных геномах.

TALE могут применяться для исследования эпигенетической регуляции генов, например, уровня метилирования цитозина. Это возможно благодаря наличию специфических для метилцитозина [33] или карбоксиметилцитозина [77] RVD, что позволяет обнаруживать даже одиночные сайты метилирования [78].

TALE используют для эффективной и быстрой модификации генов с целью создания трансгенных видов или для выключения определенного гена (создание



**Рис. 2.6.** Механизм репарации двуцепочечного разрыва ДНК.

*а* — в отсутствие гомологичного образца ДНК разрыв репарируется посредством NHEJ, такой процесс репарации подвержен ошибкам и может приводить к инсерциям и делециям. Но такой способ позволяет вырезать ненужную часть ДНК из генома.

*б* — при наличии образца ДНК, гомологичного целевому участку, вокруг разрыва происходит гомологичная репарация. В этом случае можно вводить некоторые изменения в последовательности ДНК или вставку целых экспрессирующихся конструкций в нужную область генома.

нокаутных организмов). Нуклеазы приводят к появлению двуцепочечного разрыва в целевой ДНК, что стимулирует репарацию ДНК в клетке, которая может происходить по пути гомологичной рекомбинации или NHEJ [79, 80] (рис. 2.6).

В работах с использованием TALEN с помощью гомологичной рекомбинации удавалось встраивать флюоресцентный репортерный ген длиной 0,7–1,5 тыс. п.н. с частотой передачи зародышевой линии 1,5–11,0% [81, 82]. Это позволяет изучать функции множества генов различных организмов: мыши [83–85], крысы [86, 87], свиньи [88], коровы [89], обезьяны [90], аквариумной рыбки данио-рерио [91–93], *O. latipes* [94], *C. elegans* [95, 96], тритона [97], шелкопряда [98, 99], дрозофилы [100, 101], комара [102, 103], лягушки [104], *T. gondii* [105]. Также геномная инженерия является отличным методом для решения проблем в области инженерии растений [106, 107]. Множество генов растений организованы в массивы, что создает трудности для выборочного изменения одного гена при изучении его функции. Способность TALEN различать относительно небольшие несовпадения нуклеотидных последовательностей делает эту технологию мощным инструментом для изменения определенных генов в массивах. Примеры такого подхода: применение TALEN для быстрой модификации множества генов у *Brachypodium* и риса, а также создание устойчивости к заболеваниям у риса [108, 109], модификация генов у *Arabidopsis thaliana* [110] и ячменя [111]. На примере сахарного тростника с помощью одной пары TALEN удалось модифицировать 107 из 109 копий гена *COMT* — метилтрансферазы кофейной кислоты, отвечающего за синтез лигнина. Подавление экспрессии этого гена с помощью РНК-интерференции приводило к увеличению наработки биоэтанола из лигноцеллюлозной биомассы. У полевых растений после редактирования с помощью TALEN на 16,7% снижалась наработка лигнина и на 43,8% увеличивалась эффективность осахаривания, при этом наработка биомассы значительно не отличалась от исходного сорта тростника [112]. Таким образом, TALEN позволяет проводить модификации растений с высокой степенью полиплоидии. Модификации могут подвергаться не только ядерные, но и митохондриальные гены. Например, с помощью TALEN можно удалить часть последовательности генов, связанных с цитоплазматической мужской стерильностью, тем самым восстановив нормальный фенотип [113].

Использование искусственных нуклеаз в генной терапии для лечения генетических заболеваний человека выглядит очень перспективным. Геномное редактирование позволяет напрямую исправлять мутации, связанные с заболеванием. Например, в рамках поиска метода лечения МДД разработаны TALEN для создания небольших инсерций и делеций, восстанавливающих рамку считывания гена дистрофина [114, 115]. Также подобраны TALEN для гомологичной рекомбинации, способной исправлять мутации, связанные с буллезным эпидермолизом [45], серповидно-клеточной анемией [116, 117], бета-талассемией [118], пигментной ксеродермой [119], дефицитом  $\alpha_1$ -антитрипсина [120], для исправления митохондриальной ДНК за счет удаления дефектных последовательностей [121]. С помощью TALEN можно эффективно вводить мутации в ген *CCR5*, кодирующий один из ко-рецепторов ВИЧ [58, 122–124]. Созданы TALEN для эли-

минации из человеческих клеток генома гепатита В [125, 126]. Для изучения свойств гена миостатина применены TALEN, нарушающие его структуру [127]. Нарушение работы гена миостатина приводит к гипертрофии мышц скелета. Такой подход может быть использован для лечения ряда заболеваний, в том числе мышечных дистрофий. В исследованиях на клетках человека TALEN были использованы для создания геномных транслокаций, ассоциированных с преобразованием нормальных клеток в раковые [128], линии эмбриональных клеток, гомозиготных по мутантному аллелю гена *p53* [129]. Созданы TALEN для редактирования онкогена E7 вируса папилломы, в результате которого значительно увеличивался некроз клеток SiHa, содержащих интегрированную в геном копию вируса папилломы человека 16-го типа [130]. Данный подход рассматривается авторами как перспективный для лечения цервикального рака.

## 2.12. Онлайн-ресурсы для разработки TALEN

Для подбора и анализа TALEN существует довольно много программ, в том числе доступных онлайн. Ниже приведены некоторые из них.

CHOPCHOP (URL: <https://chopchop.cbu.uib.no>) — веб-интерфейс, разрабатываемый, в основном, сотрудниками Университета Бергена, Норвегия, — позволяет задать диапазон дистанции между мономерами TALEN, размер TALEN, количество несовпадений для поиска нецелевых участков и выбор RVD для гуанина (NN или NH). Также интерфейс позволяет подобрать специфические олигонуклеотиды для амплификации целевой области.

E-TALEN (URL: <http://www.e-talen.org>) — веб-интерфейс Германского онкологического исследовательского центра (Deutsches Krebsforschungszentrum) — позволяет подбирать TALEN для нокаутных мутаций, эндогенного мечения, целевой эксцизионной репарации. Можно подобрать TALEN для 1 мишени или для 50 целевых генов параллельно. Можно осуществлять подбор *de novo* либо оценивать существующие TALEN [131].

TALE-NT (URL: <https://tale-nt.cac.cornell.edu>) — веб-интерфейс лаборатории профессора А. Богданова Корнеллского Университета (Cornell University), автора одной и первых статей о расшифровке RVD кода TALE [5]. На сайте доступны несколько функций: подбор TALEN (учет off-target только для целевых последовательностей не более 1000 оснований), поиск наилучшего соответствия для выбранной последовательности RVD сайтов в ДНК (Target Finder), поиск наилучшего соответствия для пары RVD (Paired Target Finder), используется для поиска потенциальных неспецифических сайтов посадки TALEN [132].

TALENoffer (URL: [http://galaxy.informatik.uni-halle.de/root?tool\\_id=TALE-Noffer](http://galaxy.informatik.uni-halle.de/root?tool_id=TALE-Noffer)) — веб-интерфейс Галле-Виттенбергского университета им. Мартина Лютера позволяет исследовать загруженные последовательности ДНК на предмет неспецифических сайтов посадки заданного TALE.

Mojo Hand (URL: <http://talendesign.org>) — веб-интерфейс сети частных клиник «Mayo Clinic». Пользователь имеет возможность выбрать производителя ферментов рестрикции для сайтов в целевой последовательности.

PROGNOS (URL: <http://bao.rice.edu/cgi-bin/prognos/prognos.cgi>) — веб-интерфейс лаборатории биомолекулярного инжиниринга и биомедицины Университета Райса (Rice University). Веб-версия программы позволяет обрабатывать не более 30 000 потенциальных сайтов рестрикции, для обработки большого количества сайтов можно скачать программу на собственный компьютер.

QueTAL (URL: <http://bioinfo-web.mpl.ird.fr/cgi-bin2/quetal/quetal.cgi>) — веб-интерфейс для проведения сравнительного функционального и эволюционного анализа различных TALE [133].

## Литература

1. Zhu W., Yang B., Chittoor J.M., et al. AvrXA10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1998; 11(8): 824-32.
2. Schornack S., Meyer A., Romer P., Jordan T., Lahaye T.J. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Plant Physiol.* 2006; 163: 256-72.
3. Yang B., Sugio A., White F.F. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(27): 10503-8.
4. Boch J., Scholze H., Schornack S., et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009; 326(5959): 1509-12.
5. Moscou M.J., Bogdanove A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 2009; 326(5959): 1501.
6. White F.F., Yang B., Johnson L.B. Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000; 3(4): 291-8.
7. Bogdanove A.J., Schornack S., Lahaye T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010; 13(4): 394-401.
8. Bonas U., Stall R.E., Staskawicz B.J. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 1989; 218(1): 127-36.
9. Swarup S., De Feyter R., Brlansky R.H., et al. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Mol. Plant. Path.* 1991; 81(7): 802-9.
10. Swarup S., Yang Y., Kingsley M.T., et al. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1992; 5: 204-13.
11. Hopkins C.M., White F.F., Choi S., et al. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1992; 5(6): 451-9.
12. De Feyter R., Yang Y., Gabriel D.W. Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* avr genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1993; 6(2): 225-37.
13. Yang Y., Gabriel D.W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1995; 8(4): 627-31.
14. Yang B., Zhu W., Johnson L.B., et al. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway dependent, nuclear-localized, double-stranded DNA binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(17): 9807-12.
15. Marois E., van den Ackerveken G., Bonas U. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2002; 15(7): 637-46.



16. Iyer A.S., McCouch S.R. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2004; 17(12): 1348-54.
17. Kay S., Hahn S., Marois E., et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science.* 2007; 318(5850): 648-51.
18. Romer P., Hahn S., Jordan T., et al. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science.* 2007; 318(5850): 645-8.
19. Szurek B., Rossier O., Hause G., et al. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas AvrBs3* protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* 2002; 46(1): 13-23.
20. Gao H., Wu X., Chai J., et al. Crystal structure of a TALE protein reveals an extended N-terminal DNA binding region. *Cell Res.* 2012; 22(12): 1716-20.
21. Lamb B.M., Mercer A.C., Barbas C.F. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(21): 9779-85.
22. Tsuji S., Futaki S., Imanishi M. Creating a TALE protein with unbiased 5'-T binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 441(1): 262-5.
23. Doyle E.L., Hummel A.W., Demorest Z.L., et al. TAL effector specificity for base 0 of the DNA target is altered in a complex, effector- and assay-dependent manner by substitutions for the tryptophan in cryptic repeat -1. *PLoS One.* 2013; 8(12): e82120.
24. de Lange O., Schreiber T., Schandry N., et al. Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytol.* 2013; 199(3): 773-86.
25. Li L., Atef A., Piatek A., et al. Characterization and DNA-binding specificities of *Ralstonia* TAL-like effectors. *Mol. Plant.* 2013; 6(4): 1318-30.
26. Schreiber T., Bonas U. Repeat 1 of TAL effectors affects target specificity for the base at position zero. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(11): 7160-9.
27. Streubel J., Blücher C., Landgraf A., et al. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(7): 593-5.
28. Yang J., Zhang Y., Yuan P., et al. Complete decoding of TAL effectors for DNA recognition. *Cell Res.* 2014; 24(5): 628-31.
29. Deng D., Yan C., Pan X., et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science.* 2012; 335(6069): 720-3.
30. Mak A.N., Bradley P., Cernadas R.A., et al. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science.* 2012; 335(6069): 716-9.
31. Valton J., Dupuy A., Daboussi F., et al. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(46): 38427-32.
32. Deng D., Yin P., Yan C., et al. Recognition of methylated DNA by TAL effectors. *Cell Res.* 2012; 22(10): 1502-4.
33. Zhang Y., Liu L., Guo S., et al. Deciphering TAL effectors for 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine recognition. *Nat. Commun.* 2017; 8(1).
34. Liu L., Zhang Y., Liu M., et al. Structural Insights into the Specific Recognition of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by TAL Effectors. *J. Mol. Biol.* 2020; 432(4): 1035-47.
35. Meckler J.F., Bhakta M.S., Kim M.S., et al. Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(7): 4118-28.
36. Boch J., Bonas U. *Xanthomonas AvrBs3* family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2010; 48: 419-36.

37. Wicky B.I.M., Stenta M., Dal Peraro M. TAL effector specificity stems from negative discrimination. *PLoS One*. 2013; 8(11): e80261.
38. Deng D., Yan C., Wu J., et al. Revisiting the TALE repeat. *Protein Cell*. 2014; 5: 297-306.
39. Christian M.L., Demorest Z.L., Starker C.G., et al. Targeting G with TAL effectors: a comparison of activities of TALENs constructed with NN and NK repeat variable di-residues. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45383.
40. Maeder M.L., Linder S.J., Reyon D., et al. Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nat. Methods*. 2013; 10(3): 243-6.
41. Garg A., Lohmueller J.J., Silver P.A., et al. Engineering synthetic TAL effectors with orthogonal target sites. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(15): 7584-95.
42. Römer P., Strauß T., Hahn S., et al. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiol*. 2009; 150(4): 1697-712.
43. Strauß T., van Poecke R.M., Strauß A., et al. RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(47): 19480-5.
44. Mali P., Aach J., Stranges P.B., et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol*. 2013; 31(9): 833-8.
45. Osborn M.J., Starker C.G., McElroy A.N., et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol. Ther*. 2013; 21(6): 1151-9.
46. Richter A., Streubel J., Blücher C., et al. A TAL effector repeat architecture for frame shift binding. *Nat. Commun*. 2014; 5: 3447.
47. Cuculis L., Zhao C., Abil Z., et al. Divalent cations promote TALE DNA-binding specificity. *Nucleic Acids Res*. 2020; 48(3):1406-1422.
48. Stella S., Molina R., Yefimenko I., et al. Structure of the AvrBs3-DNA complex provides new insights into the initial thymine-recognition mechanism. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 2013; 69(Pt. 9): 1707-16.
49. Tochio N., Umehara K., Uewaki J.I., et al. Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy. *Sci. Rep*. 2016; 6: 37887. doi: 10.1038/srep37887
50. Kay S., Boch J., Bonas U. Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. *Mol. Plant Microbe Interact*. 2005; 18(8): 838-48.
51. Schornack S., Moscou M.J., Ward E.R., et al. Engineering plant disease resistance based on TAL effectors. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2013; 51: 383-406.
52. Partida-Martinez L.P., Hertweck C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*. 2005; 437(7060): 884-8.
53. Lackner G., Moebius N., Partida-Martinez L., et al. Complete genome sequence of *Burkholderia rhizoxinica*, an Endosymbiont of *Rhizopus microsporus*. *J. Bacteriol*. 2011; 193(3): 783-4.
54. de Lange O., Wolf C., Dietze J., et al. Programmable DNA-binding proteins from *Burkholderia* provide a fresh perspective on the TALE-like repeat domain. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(11): 7436-49.
55. Juillerat A., Bertonati C., Dubois G., et al. BurrH: a new modular DNA binding protein for genome engineering. *Sci. Rep*. 2014; 4: 3831.
56. Stella S., Molina R., Lopez-Mendez B., et al. BuD, a helix-loop-helix DNA-binding domain for genome modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 2014; 70(Pt. 7): 2042-52.

57. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 2010; 186(2): 757-61.
58. Miller J.C., Tan S., Qiao G., et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2011; 29(2): 143-8.
59. Mussolino C., Morbitzer R., Lütge F., et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(21): 9283-93.
60. Boissel S., Jarjour J., Astrakhan A., et al. megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(4): 2591-601.
61. Lin J., Chen H., Luo L., et al. Creating a monomeric endonuclease TALE-I-SceI with high specificity and low genotoxicity in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(2): 1112-22.
62. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(12): e82.
63. Zhang F., Cong L., Lodato S., et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat. Biotechnol.* 2011; 29(2): 149-53.
64. Yang J., Yuan P., Wen D., et al. ULtimate system for rapid assembly of customized TAL effectors. *PLoS One*. 2013; 8(9): e75649.
65. Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(5): 460-5.
66. Briggs A.W., Rios X., Chari R., et al. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15): e117.
67. Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., et al. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(1): 76-81.
68. Wefers B., Meyer M., Ortiz O. et al. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(10): 3782-87.
69. Holkers M., Maggio I., Liu J., et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(5): e63.
70. Liu J., Gaj T., Patterson J.T., et al. Cellpenetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One*. 2014; 9(1): e85755.
71. Gaj T., Guo J., Kato Y., et al. Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 805-7.
72. Kim Y., Kweon J., Kim A., et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(3): 251-8.
73. Ding Q., Lee Y.K., Schaefer E.A., et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem. Cell*. 2013; 12(2): 238-51.
74. Alexeeva V., Aydin I.T., Schaniel C., Stranahan A.W., et al. A human H1-HBB11-GFP reporter embryonic stem cell line (WAe001-A-2) generated using TALEN-based genome editing. *Stem Cell Res.* 2020; 45: 101837.
75. Kim Y.K., Wee G., Park J., et al. TALEN-based knockout library for human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013; 20(12): 1458-64.
76. Zhang Z., Xiang D., Heriyanto F., et al. Dissecting the roles of miR-302/367 cluster in cellular reprogramming using TALE-based repressor and TALEN. *Stem. Cell Reports*. 2013; 1(3): 218-25.

77. Maurer S., Giess M., Koch O., Summerer D. Interrogating key positions of size-reduced TALE repeats reveals a programmable sensor of 5-carboxylcytosine. *ACS Chem. Biol.* 2016; 11: 3294–9.
78. Kubik G., Schmidt M.J., Penner J.E., Summerer D. Programmable and highly resolved *in vitro* detection of 5-methylcytosine by TALEs. *Angew Chem. Int. Ed.* 2014; 53: 6002-06.
79. Rouet P., Smih F., Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14(12): 8096-106.
80. Rouet P., Smih F., Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91(13): 6064-8.
81. Zu Y., Tong X., Wang Z. et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat. Methods.* 2013; 10: 329–31.
82. Shin J., Chen J., Solnica-Krezel L. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases. *Development.* 2014; 141(19): 3807-18.
83. Kato T., Miyata K., Sonobe M., et al. Production of *Sry* knockout mouse using TALEN via oocyte injection. *Sci. Rep.* 2013; 3: 3136.
84. Wang H., Hu Y.C., Markoulaki S., et al. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(6): 530-2.
85. Szczerkowska K.I., Petrezselyova S., Lindovsky J. et al. Myopia disease mouse models: a missense point mutation (S673G) and a protein-truncating mutation of the *Zfp644* mimic human disease phenotype. *Cell. Biosci.* 2019; 9: 21.
86. Tesson L., Usal C., Menoret S., et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 2011; 29(8): 695-6.
87. Zhou X., Zhang R., Zou Z. et al. Hypoglycaemic effects of glimepiride in sulfonylurea receptor 1 deficient rat. *Br. J. Pharmacol.* 2019; 176(3): 478-90.
88. Montag J., Petersen B., Flögel A.K. et al. Successful knock-in of hypertrophic cardiomyopathy-mutation R723G into the *MYH7* gene mimics HCM pathology in pigs. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 4786.
89. Su X., Wang S., Su G. et al. Production of microhomologous-mediated site-specific integrated LacS gene cow using TALENs. *Theriogenology.* 2018; 119: 282-8.
90. Chu C., Yang Z., Yang J., et al. Homologous recombination-mediated targeted integration in monkey embryos using TALE nucleases. *BMC Biotechnol.* 2019; 19(1): 7.
91. Bedell V.M., Wang Y., Campbell J.M., et al. In vivo genome editing using a highefficiency TALEN system. *Nature.* 2012; 491(7422): 114-8.
92. Kise R., Okasato R., Kano K., et al. Identification and biochemical characterization of a second zebrafish autotaxin gene. *J. Biochem.* 2019; 165(3): 269-275.
93. Völkel P., Bary A., Raby L., et al. *Ezh1* arises from *Ezh2* gene duplication but its function is not required for zebrafish development. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4319.
94. Matsuzaki Y., Sakuma T., Yamamoto T., Saya H. Establishment of *pten* knockout medaka with transcription activator-like effector nucleases (TALENs) as a model of PTEN deficiency disease. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0186878.
95. Wood A.J., Lo T.W., Zeitler B., et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science.* 2011; 333(6040): 307.
96. Lo T.W., Pickle C.S., Lin S., et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. *Genetics.* 2013; 195(2): 331-48.
97. Hayashi T., Sakamoto K., Sakuma T., et al. Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev. Growth Differ.* 2014; 56(1): 115-21.

98. Ma S., Zhang S., Wang F., et al. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45035.
99. Xu J., Dong Q., Yu Y., et al. Mass spider silk production through targeted gene replacement in *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 115(35):8757-8762.
100. Liu J., Li C., Yu Z., et al. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J. Genet. Genomics*. 2012; 39(5): 209-15.
101. Beumer K.J., Trautman J.K., Christian M., et al. Comparing zinc finger nucleases and transcription activator-like effector nucleases for gene targeting in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)*. 2013; 3(10): 1717-25.
102. Aryan A., Myles K.M., Adelman Z.N. Targeted genome editing in *Aedes aegypti* using TALENs. *Methods*. 2014; 69(1): 38-45.
103. Smidler A.L., Terenzi O., Soichot J., et al. Targeted mutagenesis in the malaria mosquito using TALE nucleases. *PLoS One*. 2013; 8(8): e74511.
104. Lei Y., Guo X., Liu Y., et al. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(43): 17484-9.
105. Chen H., Guo Y., Qiu Y., et al. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using the TALEN technique. *Parasit Vectors*. 2019; 12(1):112.
106. Mahfouz M.M., Li L., Shamimuzzaman M., et al. *De novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108(6): 2623-8.
107. Voytas D.F. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013; 64: 327-50.
108. Shan Q., Wang Y., Chen K., et al. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol. Plant*. 2013; 6(4): 1365-8.
109. Han J., Xia Z., Liu P., et al. TALEN-based editing of *TFIIA5* changes rice response to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 2036.
110. Christian M., Qi Y., Zhang Y., et al. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3 (Bethesda)*. 2013; 3(10): 1697-705.
111. Wendt T., Holm P.B., Starker C.G., et al. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant. Mol. Biol.* 2013; 83(3): 279-85.
112. Kannan B., Jung J.H., Moxley G.W., et al. TALEN-mediated targeted mutagenesis of more than 100 COMT copies/alleles in highly polyploid sugarcane improves saccharification efficiency without compromising biomass yield. *Plant. Biotechnol. J.* 2018; 16(4): 856-66.
113. Kazama T., Okuno M., Watari Y. et al. Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing. *Nat. Plants*. 2019; 5(7): 722-30.
114. Ousterout D.G., Perez-Pinera P., Thakore P.I., et al. Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Mol. Ther.* 2013; 21(9): 1718-26.
115. Li H.L., Fujimoto N., Sasakawa N. et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. 2015; 4(1): 143-54.
116. Sun N., Liang J., Abil Z., et al. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol. Biosyst.* 2012; 8(4): 1255-63.

117. Voit R.A., Hendel A., Pruett-Miller S.M., et al. Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(2): 1365-78.
118. Ma N., Liao B., Zhang H., et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free beta-thalassemia induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(48): 34671-9.
119. Dupuy A., Valton J., Leduc S., et al. Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALEN. *PLoS One.* 2013; 8(11): e78678.
120. Choi S.M., Kim Y., Shim J.S., et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology.* 2013; 57(6): 2458-68.
121. Bacman S.R., Williams S.L., Pinto M., et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat. Med.* 2013; 19(9): 1111-3.
122. Mussolino C., Alzubi J., Fine E.J., et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(10): 6762-73.
123. Ye L., Wang J., Beyer A.I., et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(26): 9591-6.
124. Jin L., Deng Y., He N., et al. Polyethylenimine-mediated CCR5 gene knockout using transcription activator-like effector nucleases. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2018; 14(3): 546-52.
125. Bloom K., Ely A., Mussolino C., et al. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol. Ther.* 2013; 21(10): 1889-97.
126. Chen J., Zhang W., Lin J., et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol. Ther.* 2014; 22(2): 303-11.
127. Xu L., Zhao P., Mariano A., et al. Targeted myostatin gene editing in multiple mammalian species directed by a single pair of TALE nucleases. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2013; 2(7): e112.
128. Piganeau M., Ghezraoui H., De Cian A., et al. Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res.* 2013; 23(7): 1182-93.
129. Zhou R., Xu A., Wang D., et al. A homozygous p53 R282W mutant human embryonic stem cell line generated using TALEN-mediated precise gene editing. *Stem Cell Res.* 2018; 27: 131-5.
130. Shankar S., Prasad D., Sanawar R., et al. TALEN based HPV-E7 editing triggers necrotic cell death in cervical cancer cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 5500.
131. Heigwer F., Kerr G., Walther N., et al. E-TALEN: a web tool to design TALENs for genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(20): e190.
132. Doyle E.L., Booher N.J., Standage D.S., et al. TAL effector-nucleotide targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids. Res.* 2012; 40(Web Server issue): W117-22.
133. Pérez-Quintero A.L., Lamy L., Gordon J.L., et al. QueTAL: a suite of tools to classify and compare TAL effectors functionally and phylogenetically. *Front. Plant. Sci.* 2015; 6: 545.

## ГЛАВА 3

# CRISPR нуклеазы

---

CRISPR — это сокращение от англ. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, что переводится как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами». Это название относится к уникальной организации коротких палиндромных повторяющихся последовательностей ДНК, обнаруженных в большинстве археальных геномов и примерно в половине бактериальных геномов, что делает их наиболее распространенным семейством повторяющихся последовательностей у прокариот. Системы CRISPR/Cas в настоящее время находятся в центре активных исследований в биологии, например, в 2019 г. было опубликовано свыше 5000 работ, посвященных разработке, изучению и применению CRISPR/Cas нуклеаз (**рис. 3.1**).

Система направленного редактирования генома CRISPR/Cas состоит из двух функциональных элементов: направляющей РНК и белка Cas. Направляющая РНК, в свою очередь, состоит из спейсера, который специфичен к ДНК мишени, и консервативной части, отвечающей за связывание с белком Cas. Белок Cas обладает нуклеазной активностью. Когда направляющая РНК и белок Cas образуют рибонуклеопротеиновый комплекс, специфичный к последовательности-мишени, белок Cas вносит разрыв в последовательность ДНК мишени.

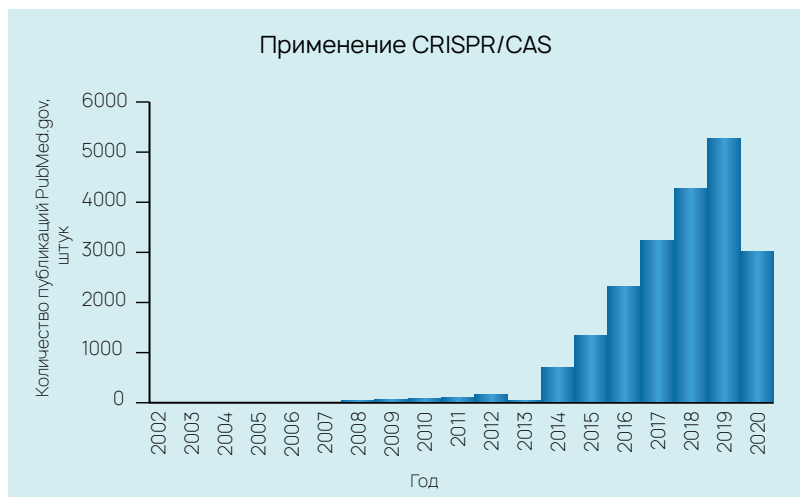
### 3.1. История открытия CRISPR/Cas

Первое описание того, что позже будет называться CRISPR, было получено от исследователя Университета Осаки Йошизуми Ишино и его коллег в 1987 г. Они случайно клонировали часть последовательности CRISPR вместе с целевым геном, ответственным за превращение изоэнзима в щелочную фосфатазу у *Escherichia coli* [1], и обнаружили необычную организацию повторов — повторяющиеся последовательности чередовались с другими последовательностями. Биологическая функция этих необычных повторяющихся последовательностей оставалась неясной до середины 2000-х гг.

В 1993 г. первые CRISPR были обнаружены у архей *Haloferax mediterranei* [2], а впоследствии их находили во все большем количестве бактериальных геномов и геномов архей. Франциско Мохики был первым исследователем, который охарактеризовал то, что сейчас называется локусом CRISPR. Он продолжал работу над изучением локусов CRISPR в течение 1990-х гг., а в 2000 г. он сообщил, что то, что, казалось, представляло собой разрозненные повторяющиеся последовательности, на самом деле имело общий набор характеристик:

- локусы CRISPR расположены в межгенных регионах;
- они содержат множество коротких прямых повторов с очень небольшими вариациями в последовательности;
- повторы перемежаются с неконсервативными последовательностями;
- повторы имеют общую лидерную последовательность, состоящую из нескольких сотен пар оснований, которая расположена на одной стороне кластера повторов.

Анализ отсекуированных геномов бактерий и архей позволил ученым выявить геномный контекст, окружающий локусы CRISPR, во многих организмах, что привело к открытию четырех консервативных генов, регулярно присутствующих рядом с областями CRISPR. Гены были обозначены как CRISPR-ассоциированные или *cas* гены (*cas1-cas4*) [3]. Белки Cas1 и Cas2 не имели сходства с функциональными доменами каких-либо известных белков, тогда как Cas3 содержал 7 мотивов, характерных для геликаз суперсемейства 2, а Cas4 имел сходство с экзонуклеазами RecB, которые работают как часть комплекса RecBCD при репарации двунитевых разрывов в ходе



**Рис. 3.1.** Количество публикаций по применению CRISPR/Cas по данным электронного ресурса PubMed (URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>).



гомологичной рекомбинации. Следовательно, было предсказано, что Cas3 и Cas4 участвуют в метаболизме ДНК, включая репарацию и рекомбинацию ДНК, регуляцию транскрипции и сегрегацию хромосом. Из-за их связи с CRISPR было высказано предположение, что белки Cas участвуют в формировании локусов CRISPR [3].

При изучении генома *Streptococcus thermophilus* Александр Болотин и коллеги обнаружили необычный локус CRISPR [4]. Он был похож на ранее описанные системы, но в нем отсутствовали некоторые из известных генов *cas*. Вместо этого локус содержал новые гены *cas*, в том числе один ген, кодирующий большой белок, который предположительно должен был обладать нуклеазной активностью. В настоящее время этот белок известен как Cas9. Кроме того, они отметили, что спейсеры, которые гомологичны вирусным генам, имеют общую последовательность на одном конце. Позже было установлено, что эта последовательность, которая была названа PAM (protospacer adjacent motif), требуется для распознавания последовательности-мишени.

Примерно в то же время К.С. Макарова и коллеги независимо провели систематический анализ контекстов консервативных генов во всех прокариотических геномах, доступных в то время в базах данных, и обнаружили несколько кластеров генов, соответствующих генам *cas* (кодирующим предполагаемую ДНК-полимеразу, геликазу и RecB-подобную нуклеазу), в геномах гипертермофильных архей и двух гипертермофильных бактерий с доступными последовательностями генома, *Aquifex* и *Thermotoga* [5]. Эти консервативные гены не были обнаружены в то время у мезофильных и умеренно теплолюбивых архей и бактерий. На основании этого наблюдения было предсказано, что эти белки могут быть частью системы репарации ДНК, специфичной для термофильных организмов.

В 2005 г. Ф. Мохика сообщил, что последовательности, располагающиеся между короткими повторами в локусах CRISPR, так называемые спейсерные области CRISPR или спейсеры, соответствуют фрагментам из геномов бактериофагов [6]. Примерно в то же время другие группы ученых, работая независимо, опубликовали аналогичные результаты [4, 6, 7]. Важно отметить, что, основываясь на обзоре литературы, Ф. Мохика и К. Паурсель указали, что фаги и плазмидные ДНК не заражают клетки штаммов-хозяев, несущих гомологичные спейсерные последовательности в локусах CRISPR. Исходя из этих наблюдений, они независимо друг от друга предположили, что последовательности CRISPR функционируют в рамках системы биологической защиты, подобной системе РНК интерференции у эукариотических организмов, которая защищает клетки от проникновения этих чужеродных мобильных генетических элементов. Кроме того, было высказано предположение, что CRISPR могут каким-то образом инициировать захват фрагментов чужеродной ДНК, чтобы образовать «память» о прошлых генетических «вторжениях» [6, 7]. А. Болотин и коллеги подтвердили эти наблюдения, также отметив корреляцию между количеством спейсеров фагового происхождения и степенью устойчивости штамма-хозяина к фаговой инфекции [4]. В двух работах 2005 г. авторы признали предыдущее

открытие генов *cas*, предполагая, что белки, кодируемые этими генами, должны участвовать в функционировании этой новой предполагаемой прокариотической иммунной системы [4, 7].

В марте 2006 г. Е. Кунин изучал кластеры ортологичных групп белков с помощью компьютерного анализа и предложил гипотетическую схему для CRISPR-каскадов в качестве бактериальной иммунной системы, основанную на вставках, гомологичных фаговой ДНК, в природном спейсерном массиве, отказавшись от предыдущей гипотезы о том, что белки Cas могут включать в себя новую систему репарации ДНК [5].

Гипотеза о функции системы CRISPR/Cas в качестве приобретенной прокариотической иммунной системы была окончательно экспериментально подтверждена в 2007 г. в ходе экспериментов, проведенных с молочнокислой бактерией *Streptococcus thermophilus* [8]. Было показано, что введение участков фаговой ДНК в спейсерную область CRISPR *S. thermophilus* делало этот штамм устойчивым к соответствующему фагу. С другой стороны, эта бактериальная устойчивость к фаговой инфекции исчезала при удалении последовательности из спейсерной области CRISPR *S. thermophilus*. Кроме того, было экспериментально продемонстрировано, что система CRISPR/Cas способна ограничивать трансформацию плазмид, несущих последовательности, соответствующие спейсерам CRISPR [9].

Вскоре ученые начали выяснять некоторые подробности о том, как именно системы CRISPR/Cas «мешают» вторгающемуся фагу. Первая важная информация была получена от Джона ван дер Оста и его коллег, которые воссоздали «иммунную систему», используя CRISPR *E. coli*, открытый в 1987 г. Они выявили, что спейсерные последовательности *E. coli*, приобретенные от фага, транскрибируются в небольшие РНК, называемые CRISPR РНК (сРНК), которые направляют белки Cas к ДНК-мишени [10]. Кроме того, они показали, что Cas9, вероятно, является единственным белком, необходимым для инактивации вторгающегося фага, однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, еще не были известны.

Еще один ключевой факт в понимании механизма действия системы CRISPR/Cas был описан Л. Марраффини и Е. Сонтхаймером, которые продемонстрировали, что целевой молекулой системы CRISPR/Cas9 является ДНК, а не РНК [9]. Это было несколько удивительно, т.к. многие считали систему CRISPR/Cas во многом схожей с системой РНК-интерференции у эукариот, которая нацелена именно на РНК. Авторы прямо указали, что эта система могла бы стать мощным инструментом, если бы ее можно было перенести на небактериальные системы. Однако, забегая вперед, следует отметить, что другой тип системы CRISPR может быть нацелен на РНК [11].

С. Мойно и его коллеги продемонстрировали, что CRISPR/Cas9 создает двуцепочечные разрывы в ДНК-мишени в точных положениях, на 3 нуклеотида выше PAM [12]. Они также подтвердили, что Cas9 является единственным белком, необходимым для расщепления в системе CRISPR/Cas9. Это является отличительной чертой систем CRISPR II типа, в которых интерференция

опосредуется одним большим белком (в случае CRISPR/Cas9 это белок Cas9) в сочетании с направляющей РНК.

Последняя часть головоломки в механизме естественного вмешательства CRISPR/Cas9 поступила от группы Эммануэль Шарпантье. Они выполнили небольшое секвенирование РНК *Streptococcus pyogenes*, который имеет Cas9-содержащую систему CRISPR/Cas, и обнаружили, что в дополнение к сгРНК существует вторая малая РНК, которую они назвали транс-активирующей РНК CRISPR (tracrРНК) [13]. Оказалось, что tracrРНК образует дуплекс с сгРНК, и именно этот дуплекс направляет Cas9 к его мишеням.

Вскоре было доказано, что очищенный комплекс Cas9–CRISPR РНК (сгРНК) способен расщеплять целевую ДНК *in vitro* [14, 15]. Используя преимущества своей гетерологичной системы, В. Сикснис и его команда очистили Cas9 в комплексе с сгРНК из штамма *E. coli*, созданного для переноса локуса CRISPR *S. thermophilus*, и провели серию биохимических экспериментов для того, чтобы охарактеризовать механизм действия Cas9 [14]. Они проверили сайт расщепления и требования к РАМ и, используя точечные мутации, показали, что домен RuvC расщепляет некомплементарную цепь, в то время как домен HNH расщепляет комплементарный сайт. Они также отметили, что сгРНК может быть сокращена до размера 20 нуклеотидов, достаточного для эффективного расщепления. Наиболее впечатляющим было то, что была продемонстрирована возможность перепрограммирования Cas9 для нацеливания на сайт по своему выбору, изменяя последовательность сгРНК. Результаты, аналогичные тем, которые приведены в работах Гедриса Гасюнаса и коллег, почти одновременно сообщили Э. Шарпантье в сотрудничестве с Дженнифер Дудна из Калифорнийского университета в Беркли [15]. Они выявили, что сгРНК и tracrРНК могут быть объединены для создания единой синтетической направляющей РНК, что еще больше упростит систему.

Затем система CRISPR/Cas была применена для редактирования генома в нервных клетках человека и почках мыши [16, 17]. Ф. Чжан и его команда разработали два разных ортолога Cas9 (из *S. thermophilus* и *S. pyogenes*) и продемонстрировали целевое расщепление генома в клетках человека и мыши. Они также показали, что система может быть запрограммирована для нацеливания на несколько геномных локусов, и что она может управлять гомологичным восстановлением [17].

Таким образом, CRISPR/Cas стала широко известна как прокариотическая система приобретенного иммунитета [18, 19].

В 2013 г. система направленного редактирования генома CRISPR/Cas была использована для создания первых модифицированных геномов растений, включая рис, пшеницу, арабидопсис, табак и сорго [20–23]. В 2015 г. впервые были отредактированы геномы человеческих эмбрионов, и уже в 2016 г. запущено первое клиническое испытание CRISPR/Cas9 [24]<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>

Знаковым событием в истории CRISPR/Cas стало открытие 2017 г., показавшее, что CRISPR является чувствительным диагностическим инструментом для обнаружения единичных молекул ДНК- или РНК-мишеней. Для других систем редактирования генома такая особенность не описана.

С каждым годом систему CRISPR/Cas совершенствуют и модифицируют. Так, в 2019 г. была опубликована новая высокоэффективная методика редактирования ДНК под названием «праймированное редактирование» (prime editing), которая позволяет с высокой точностью редактировать гены [25].

## 3.2. Белки системы CRISPR/Cas

Белки системы CRISPR/Cas многообразны и участвуют в различных стадиях прокариотического иммунитета CRISPR; они обладают множеством предсказанных активностей в отношении нуклеиновых кислот, таких как нуклеазная, геликазная и полимеразная активности [26–29].

Белки Cas1 и Cas2 сохраняются в большинстве известных типов систем CRISPR/Cas и образуют комплекс, представляющий собой модуль адаптации, необходимый для интеграции новых спейсеров в массивы CRISPR. На стадии экспрессии locus CRISPR транскрибируется, и транскрипт пре-crРНК обрабатывается специфичными для каждого типа Cas эндонуклеазами в зрелые crРНК. Во время стадии интерференции crРНК связываются с эффекторными Cas-эндонуклеазами, и соответствующие комплексы рекрутируются и расщепляют целевую ДНК или РНК зависимым от последовательности образом. Примечательно, что, в отличие от адаптационного модуля, ферменты Cas, участвующие в стадиях экспрессии и интерференции, варьируют от одного типа CRISPR/Cas к другому, и одни и те же ферменты могут участвовать в обеих стадиях иммунитета.

Белок Cas1, который работает в комплексе с Cas2, осуществляет захват ДНК атакующего бактериофага. Cas1 действует как «молекулярная линейка», отмеряя фрагмент ДНК правильной длины. После захвата ДНК атакующего бактериофага комплекс Cas1–Cas2 внедряет этот фрагмент ДНК в массив CRISPR в качестве нового «спейсера». Каждый спейсер действует как «память» о конкретной фазовой инфекции для дальнейшего использования [30].

Как уже упоминалось, Cas2 работает в комплексе с белком Cas1. Две копии белка Cas2 образуют комплекс с 4 копиями Cas1. Этот комплекс перемещается по клетке в поисках инвазивной ДНК бактериофага и/или плазмидной ДНК [31].

Как только система CRISPR/Cas идентифицировала мишень — двуцепочечную ДНК, к комплексу привлекается белок Cas3, который, используя энергию АТФ, «разматывает» инвазивную ДНК атакующего бактериофага и разрушает ее. Известно, что CRISPR/Cas3 может эффективно удалить длинные участки ДНК с целевого сайта в геноме человека, что нелегко достичь в более традиционных системах CRISPR/Cas9 [32].

Белок Cas4 отвечает за распознавание правильных PAM и нуклеотидных мотивов протоспейсеров, определяет длину спейсера, а также его ориентацию. Cas4 позволяет системе CRISPR/Cas интегрировать в массив CRISPR (геном-

ный локус, содержащий несколько tandemно расположенных CRISPR) только пригодные для использования новые спейсеры [33].

Белок Cas5 связывается с одним концом crPHK, блокируя конец комплекса. Кроме того, Cas5 в комплексе с Cas6 процессирует или стабилизирует пре-crPHK в отдельные crPHK. Cas6 необходим для генерации crPHK в системах CRISPR/Cas I и III типов [34].

Каркас комплекса CRISPR/Cas сформирован из 6 копий белка Cas7. Каждый мономер Cas7 оплетает crPHK и связывает целевую ДНК [35].

Cas8 в составе комплекса CRISPR/Cas распознает ДНК атакующего бактериофага путем идентификации последовательности PAM, помогает раскрутить целевую ДНК и привлечь Cas3, чтобы уничтожить ее [36].

Cas9 представляет собой мультидоменный белок, обладающий ДНК-связывающей и гидролизующей активностью, направляемый комплексом crPHK—tracrPHK. tracrPHK отвечает за связывание с белком, а crPHK образует пары с комплементарной ДНК последовательности-мишени. Как только целевая ДНК связана, Cas9 вносит в последовательность-мишень двунитевой разрыв.

Cas10 входит в состав системы CRISPR/Cas подтипа IIIA *Staphylococcus epidermidis* и может использоваться в качестве инструмента для геной инженерии бактериофагов, в том числе их конструирования [37].

Три белка Cas11 формируют основу комплекса Cmr—Csm, ориентируя РНК-мишень, что облегчает взаимодействие crPHK с ДНК-мишенью и расщепление ДНК-мишени субъединицами комплекса [38].

Cas12 (также известный как Cpf1) — РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза. В отличие от Cas9, после того как Cas12 находит свою цель, он начинает неспецифически гидролизовать одноцепочечную ДНК. Например, Cas12a после активации молекулой-мишенью, соответствующей ее спейсерной последовательности, неспецифически гидролизует оцДНК, что делает ее привлекательным инструментом для обнаружения единичных копий целевой ДНК.

Cas13 — РНК-направляемая РНК-эндонуклеаза, что выделяет его среди прочих белков Cas. После активации Cas13 начинает неспецифически гидролизовать РНК. Как и Cas12, Cas13 может быть использован для диагностики [40].

Cas14 — это относительно небольшой белок Cas, примерно вдвое меньше, чем другие белки Cas в системах CRISPR класса 2. В отличие от других ферментов Cas, Cas14 встречается не у бактерий, а у архей, что позволяет предположить, что Cas14 является более примитивной версией более сложных систем Cas9 и Cas12. Cas14 может связывать и расщеплять целевую одноцепочечную ДНК и, в отличие от Cas9, не требует наличия PAM. Кроме того, Cas14 можно использовать для выявления (диагностики) оцДНК [41].

### 3.3. Разнообразие и классификация систем CRISPR/Cas

Поразительно, что близкородственные штаммы могут значительно различаться по содержанию и распространению CRISPR. Например, у микобактерий (род *Mycobacterium*) CRISPR существует у *M. tuberculosis*, но не у *M. leprae*.

С другой стороны, филогенетически отдаленные *E. coli* и *Mycobacterium avium*, а также *Methanothermobacter thermautotrophicus* и *Archaeoglobus fulgidus* несут почти идентичные последовательности CRISPR [3, 42].

На основании базы данных CRISPR2<sup>2</sup> по состоянию на июнь 2019 г. проанализировано 16 650 полных геномов бактерий и 340 полных геномов архей. Локусы CRISPR обнаружены у 39,6% (6595 из 16 650) бактерий и у 79,4% (270 из 340) архей. Интересно, что 3,7% (608 из 16 650) бактерий не имели белков Cas, и 3,7% (614 из 16 650) геномов бактерий имели белки Cas, но не имели массивов CRISPR. В то же время 4,1% (14 из 340) архей не имели белков Cas, и 1,2% (4 из 340) — имели белки Cas, но не имели массивов CRISPR.

Количество массивов CRISPR в геномах архей может варьировать от 1 до 48, а количество кластеров белков Cas — от 1 до 6. В то же время в геномах бактерий количество массивов CRISPR — от 1 до 121, а количество кластеров белков Cas — от 1 до 9. Достоверно ( $p < 0,01$ ) чаще множественные кластеры белков Cas (от 2 до 5) системы CRISPR/Cas встречаются в геномах архей<sup>3</sup>.

Интересно, что анализ 1724 геномов показал, что системы CRISPR/Cas гораздо менее распространены в микробных сообществах окружающей среды (10,4% у бактерий и 10,1% у архей). Это большое различие между распространенностью, оцененной по полным геномам культивируемых микробов, по сравнению с некультивированными микроорганизмами объясняется отсутствием систем CRISPR/Cas в основных бактериальных линиях, которые не имеют культивируемых представителей [43].

Последняя классификация систем CRISPR/Cas включает в себя два класса на основе кодируемых эффекторных белков [44]. Системы CRISPR/Cas класса 1 работают с мультисубъединичными эффекторными комплексами, состоящими из 4–7 белков Cas, присутствующих в неравномерной стехиометрии. Эта система широко распространена у бактерий и архей, в том числе у всех гипертермофилов, и составляет около 90% всех идентифицированных локусов CRISPR/Cas. Остальные 10% относятся к классу 2, используют один мультидоменный эффекторный белок и встречаются почти исключительно у бактерий [45].

Каждый класс в настоящее время включает три типа: типы I, III и IV входят в класс 1, а типы II, V и VI — в класс 2. Типы I, II и III легко различимы благодаря наличию уникальных сигнатурных белков: Cas3 для типа I, Cas9 для типа II и Cas10 для типа III. Мультисубъединичные эффекторные комплексы систем типа I и типа III, известные как CRISPR-ассоциированные комплексы для противовирусной защиты и комплексы Csm–Cmr соответственно, архитектурно схожи и эволюционно связаны [46–51]. В отличие от других известных систем CRISPR/Cas, функционально неохарактеризованные системы типа IV не содержат адаптационного модуля, состоящего из нуклеаз Cas1 и Cas2 [46, 52].

<sup>2</sup>URL: <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>

<sup>3</sup>URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>

Примечательно, что эффекторные модули систем подтипа IIIВ используют спейсеры, созданные системами типа I, что свидетельствует о модульности систем CRISPR/Cas [53]. Хотя многие из геномов, кодирующих системы типа IV, не имеют идентифицируемых локусов CRISPR, не исключено, что системы типа IV, аналогичные системам подтипа IIIВ, используют crPHK из разных массивов CRISPR, как только они становятся доступными [52].

Каждый тип систем CRISPR/Cas в свою очередь подразделяется на несколько подтипов на основе дополнительных сигнатурных генов и характерного расположения этих генов (тип I подразделяется на подтипы А–Е, F1–F3, тип III — на подтипы А–F, тип IV — на подтипы А–С в классе 1; тип II — на подтипы А, В, C1–C2, тип V — на подтипы А, В1–В2, С–Е, F1–F3, G, U1–U5, тип VI подразделяется на подтипы А, В1–В2, С, D в классе 2) [44, 54]. Интересно, что системы CRISPR/Cas IF, IIA, IIB, IIC, VIB, VIA, VIB1, VIB2 и VIC встречаются только у бактерий<sup>4</sup>. Системы CRISPR/Cas IA, IB, ID, IIIВ, IIIC и IIID достоверно ( $p < 0,01$ ) чаще встречаются у архей, а системы IC и IE — у бактерий.

### 3.4. Системы CRISPR/Cas для направленного редактирования генома

Простота устройства эффекторных комплексов сделала системы CRISPR/Cas класса 2 привлекательными для разработки на их основе нового поколения технологий редактирования генома. Сообщалось о нескольких различных эффекторах класса 2, пригодных для направленного редактирования генома, включая Cas9 в типе II, Cas12a (ранее Cpf1), Cas12b (C2c1) в типе V и Cas13a (C2c2) и Cas13b (C2c3) в типе VI [44, 50].

#### 3.4.1. Cas9

Наиболее распространенным и наиболее изученным мультидоменным эффекторным белком является Cas9, РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза, состоящая из двух неродственных нуклеазных доменов — RuvC и HNH, которые ответственны за внесение двунитевого разрыва в ДНК-мишень. Для специфического нацеливания белка системы CRISPR/Cas9 используются различные типы направляющих РНК. Например, направляющая РНК может представлять собой комплекс crPHK, отвечающей за специфическое узнавание мишени, а также tracrPHK, которая отвечает за связывание фермента системы CRISPR/Cas9 и важна для процессинга пре-crPHK и распознавания мишеней в системах типа II. Кроме того, направляющая РНК может представлять собой единую комбинированную sgPHK (single guide RNA), которая сочетает в себе свойства crPHK и tracrPHK в одной молекуле. Молекулярный механизм расщепления ДНК-мишени комплексом Cas9-crPHK + tracrPHK показан на **рис. 3.2** [55].

<sup>4</sup>URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/StrainList>

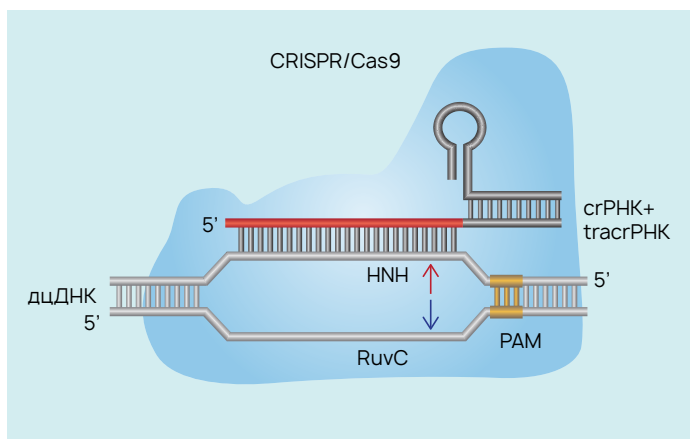


Рис. 3.2. Схема расщепления ДНК-мишени комплексом Cas9-crPНК+tracrPНК.

### Ортологи Cas9

Белок Cas9 обнаруживается в 8,3% (1375 из 16 650) бактериальных геномов. В настоящее время лучше всего охарактеризован и наиболее широко применяется в качестве молекулярного инструмента для редактирования генома белок Cas9 из системы CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Вскоре после того, как Cas9 получил широкое распространение в качестве инструмента для редактирования генома, были описаны и охарактеризованы ортологи Cas9 из других бактерий: *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9) и *Neisseria meningitidis* (NmCas9) [56], *Staphylococcus aureus* (SaCas9) [57], *Francisella novicida* (FnCas9) [58], *Campylobacter jejuni* (CjCas9) [59] и др. (табл. 3.1).

Ортологи различаются по требованию к PAM, размеру (молекулярной массе) и специфичности. Каждый ортолог связывает специфичную направляющую РНК, узнавая ее по уникальной части («шпильке»). Важно отметить, что разные ортологи и их направляющие РНК, ко-экспрессируемые в одной клетке, не мешают друг другу, что первоначально использовалось для многоцветной визуализации областей генома [60].

### Высокоточные варианты Cas9

Неспецифическая активность Cas9 была серьезной проблемой, т.к. Cas9 может редактировать ДНК-мишень, несущую до 5 несоответствий с ее направляющей РНК [69–71]. Этот нецелевой эффект был тщательно проанализирован различными подходами *in vitro* и *in vivo* [72–74], и критерии специфичности системы CRISPR/Cas9 можно описать следующим образом:

1) в большинстве случаев система не может распознать сайт ДНК, несущий более 3 несоответствий;

2) система CRISPR/Cas9 не может распознать и редактировать сайт ДНК с любым количеством несоответствий рядом с PAM (в пределах 10–12 п.н.);



Таблица 3.1. Ортологи Cas9 *Streptococcus pyogenes* из других бактерий

№ п/п	Системы CRISPR/Cas9	PAM последовательность	Источник
1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG	[61]
2	<i>Streptococcus thermophilus</i> CRISPR1	NNAGAAW NNAAAAW	[56, 62, 63]
3	<i>Streptococcus thermophilus</i> CRISPR3	NGGNG	[62]
4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	NGG	[61]
5	<i>Listeria monocytogenes</i>	NGG	[61]
6	<i>Streptococcus mutans</i>	NGG	[64]
7	<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT	[56, 65]
8	<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNNACA	[63]
9	<i>Francisella novicida</i>	NG	[63]
10	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG18311	NNGYAAA NNNGYAAA	[66]
11	<i>Treponema denticola</i>	NAAAAAN	[56]
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	NNGRRT NNGRR(N)	[57]
13	<i>Enterococcus faecalis</i>	NGRNW	[67]
14	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	NGG	
15	<i>Lactobacillus paracasei</i>	TNNAA	
16	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	NNNWR	
17	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	NGG YG	[58]
18	<i>Corynebacter diphtheriae</i>	NNRHHHY	[68]
19	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	–	Бактериальные белки-ортологи Cas9, полученные в лаборатории Ф. Чжана (неопубликованные данные)
20	<i>Legionella pneumophila</i> str. <i>Paris</i>	–	
21	<i>Filifactor alocis</i>	–	
22	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	–	
23	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	–	
24	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	–	
25	<i>Lactobacillus farciminis</i>	–	
26	<i>Mycoplasma mobile</i>	–	
27	<i>Bacteroides coprophilus</i>	–	
28	<i>Fluviicola taffensis</i>	–	
29	<i>Flavobacterium columnare</i>	–	
30	<i>Sphaerochaeta globus</i> str. <i>Buddy</i>	–	
31	<i>Azospirillum</i> B510	–	
32	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	–	
33	<i>Neisseria cinerea</i>	–	
34	<i>Roseburia intestinalis</i>	–	
35	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	–	
36	<i>Nitratifactor salsuginis</i> str. <i>DSM 16511</i>	–	
37	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> str. <i>F</i>	–	
38	<i>Campylobacter lari</i> CF89-12	–	
39	<i>Pasteurella multocida</i>	–	

3) чем выше концентрация комплекса CRISPR/Cas9, тем выше вероятность проявления неспецифической активности;

4) некоторые 5'-NAG-3'-PAM сайты могут быть мишенью для системы CRISPR/Cas9 в бактериях и в экспериментах *in vitro*, но Cas9 имеет гораздо меньшее сродство к NAG-PAM, чем к NGG-PAM.

Кроме того, методы, основанные на секвенировании следующего поколения, такие как GUIDE-seq [75], Digenome-seq [76] и ChIP-seq [77], могут идентифицировать нецелевые сайты для системы CRISPR/Cas9. Эти высокопроизводительные методы анализа подтвердили, что Cas9 обладает нецелевой активностью, и аккуратный дизайн направляющей РНК необходим для снижения риска неспецифической активности Cas9.

Для повышения точности направленного геномного редактирования Cas9 был модифицирован в никазу Cas9 (создающую односторонний разрыв в цепи ДНК) с заменой D10A или H804A и dCas9-FokI (каталитически неактивный белок Cas9, слитый с нуклеазой FokI) [78–80]. Этим никазам нужна пара направляющих РНК для редактирования одного сайта, таким образом, требуется последовательность протяженностью в 40 п.н., что снижает вероятность нежелательных эффектов (неспецифического редактирования). Слияние Cas9 с дополнительными ДНК-связывающими доменами также уменьшает нецелевое редактирование [81]. Такие модификации действительно способны уменьшать риск неспецифического редактирования. Следует отметить, что укорочение спейсерной последовательности направляющей РНК до 17–18 нуклеотидов повышает точность нацеливания [82].

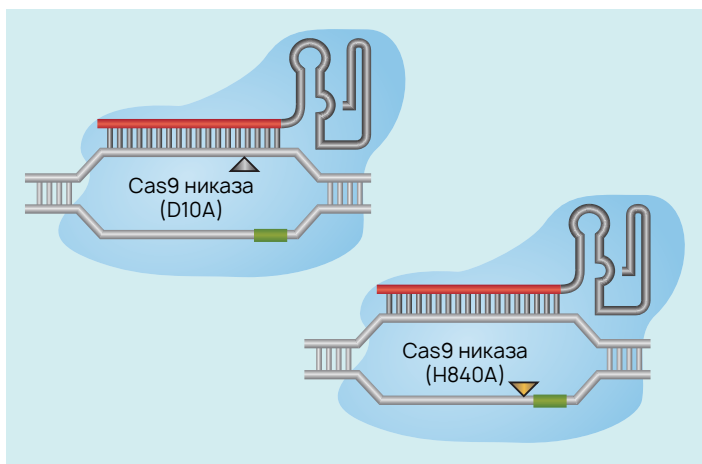
Проблема неспецифического редактирования была решена с помощью более элегантного подхода. Новые варианты Cas9, которые более чувствительны к несоответствиям, были созданы путем замены нескольких аминокислотных остатков в Cas9 [83, 69] (**табл. 3.2**).

### 3.4.2. Никазы Cas9

Внося мутацию в один из двух нуклеазных доменов Cas9, исследователи создали никазы CRISPR. Отличительной особенностью никаза является то, что в отличие от нуклеазы Cas9, они создают односторонний разрыв (ник, от англ. nick) в цепи ДНК. Показано, что направленное редактирование с одновременным использованием двух направляющих РНК и никазы Cas9 (nCAs9) снижает вероятность неспецифического редактирования [78]. Поскольку односторонние разрывы обычно быстро восстанавливаются с помощью гомологичной рекомбинации с использованием неповрежденной комплементарной цепи ДНК в качестве матрицы для репарации, нецелевые эффекты никазы Cas9 сводятся к минимуму. В случае Cas9 *Streptococcus pyogenes* мутация D10A инактивирует нуклеазный домен RuvC, поэтому эта никаза расщепляет только целевую цепь (комплементарную sgРНК). И наоборот, мутация H840A в нуклеазном домене HNH расщепляет нецелевую цепь (**рис. 3.3**) [89].

**Таблица 3.2.** Высокоточные варианты Cas9

№ п/п	Системы CRISPR/Cas9	PAM последовательность	Источник
1	Cas9 дикого типа	NGG, NAG	[16, 84–86]
2	Cas9 с аминокислотной заменой D1135E (уменьшенное связывание с NAG)	NGG	[86]
3	Cas9 37R3-2 (интеин 37R3-2 интегрирован в Cas9), обладающий большей специфичностью	NGG	[87]
4	Cas9 с аминокислотными заменами N497A-R661A-Q695A-Q926A, нет значимых внецелевых эффектов	NGG	–
5	Cas9 VRER вариант	NGCG	[86]
6	Cas9 EQR вариант	NGAG	[86]
7	Cas9 VQR вариант	NGAN, NGNG	[86]
8	Cas9 с аминокислотными заменами N497A-R661A-Q695A-Q926A, также известный как Cas9-HF1, нет значимых внецелевых эффектов	NGG	[83]
9	Cas9 с аминокислотными заменами K810A-K1003A-R1060A, также известный как eSpCas9 (1.0), уменьшенное количество внецелевых эффектов и устойчивое расщепление последовательности-мишени	NGG	[88]
10	Cas9 с аминокислотными заменами K848A-K1003A-R1060A, также известный как eSpCas9 (1.1), нет значимых внецелевых эффектов	NGG	[88]



**Рис. 3.3.** Схема расщепления ДНК-мишени комплексом nCas9–sgРНК.

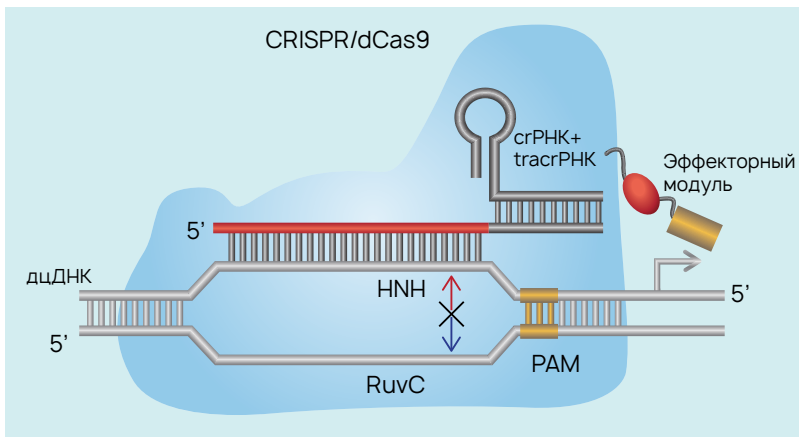
### 3.4.3. dCas9

В 2013 г. был проведен мутагенез в каталитических нуклеазных доменах белка Cas9 из *S. pyogenes* [90]. В результате проделанной работы были внесены 2 мутации: N840A в домене HNH и D10A в домене RuvC (**рис. 3.4**). Таким образом был получен каталитически неактивный белок Cas9, также называемый dCas9 или нуль-мутант dCas9. dCas9 не способен расщеплять ДНК-мишень, однако он сохраняет способность РНК-опосредованно (sgРНК) нацеливаться и связывать интересующую последовательность ДНК с той же точностью, как и каталитически активный Cas9. В отличие от Cas9, dCas9 не вызывает необратимого изменения генома, а лишь влияет на транскрипцию сайта-мишени, что приводит к обратимому «молчанию» гена.

Использование самого dCas9 в качестве инактиватора (блокатора) транскрипции было только началом. Вскоре после этого исследователи начали создавать химерные dCas9 с эффекторными доменами белков-репрессоров или активаторов, чтобы использовать способности нацеливания dCas9 для обратимой активации генов, эпигеномного редактирования и многого другого. Будь то промоторная область, регуляторная область или кодирующая область, ученые могут использовать dCas9 в качестве модульного каркаса для легкого прикрепления эффектора, позволяя контролировать любой ген без введения необратимых мутаций, повреждающих ДНК.

#### *Использование системы CRISPR/Cas9 для активации генов*

Чтобы наделить dCas9 способностью активировать гены, dCas9 был впервые слит с классическими активаторами транскрипции, такими как VP64 (синтетический тетрамер белка вируса простого герпеса 16) или р65 (фактор транскрипции, участвующий во многих клеточных процессах). Хотя эти системы продемонстрировали способность активировать транскрипцию генов в различ-



**Рис. 3.4.** Схема взаимодействия ДНК-мишени с комплексом dCas9-crРНК+tracrРНК.

ных эукариотических клетках, была достигнута только умеренная активация (в 2–5 раз) [91].

В целях повышения степени активации была разработана система синергетических посредников активации (synergistic activation mediator, SAM) [92]. Эта система основана на базовой структуре dCas9-VP64, но включает направляющую РНК (sgРНК), модифицированную для привлечения дополнительных активаторов транскрипции для достижения синергетического эффекта активации. Эта модифицированная sgРНК содержит два шпилечных РНК аптамера, которые способны связываться с димерами белков оболочки бактериофага MS2. Слияние белков оболочки бактериофага MS2 с дополнительными активаторами, такими как р65 и фактор 1 теплового шока человека (HSF1) [91], приводит к привлечению 13 активирующих молекул на одну молекулу dCas9. Эта новая система dCas9–SAM может надежно усиливать экспрессию генов от 10 до нескольких тысяч раз, в зависимости от уровня базальной экспрессии [91].

Система dCas9–SAM — это элегантный и простой метод, позволяющий исследователям избирательно активировать экспрессию генов-мишеней в их естественном хромосомном контексте, что делает ее важным инструментом для развития фундаментальных исследований. Благодаря своей способности активации эта система может стать незаменимым инструментом при разработке терапевтических препаратов, для проведения генетического скрининга и транскрипционных манипуляций с эндогенными и синтетическими генетическими последовательностями в различных типах клеток [93, 94]. Исследователи уже используют систему dCas9–SAM для активации транскрипции ВИЧ-1 для индукции апоптоза и последующего разрушения инфицированных клеток, а также для индукции транскрипции провирусной ДНК ВИЧ-1, интегрированной в геном клеточных резервуаров, для ее полной элиминации [95, 96].

Также была разработана система, которая состоит из комбинации 3 активаторов — VP64, р65 и RTA, так называемую систему dCas9–VPR [97]. Для эффективной активации dCas9–VPR не требуется использования модифицированной аптамерами sgРНК, что значительно упрощает процесс разработки. Достигнутая за счет использования предложенной системы степень активации генов была сравнимой с таковой при использовании dCas9–SAM [94]. В сочетании с библиотекой sgРНК dCas9–VPR может быть использована для крупномасштабных поисковых исследований и функциональных скрининговых исследований, что делает ее мощным инструментом для изучения биологических процессов и сигнальных путей [92].

### ***Модификация системы CRISPR/Cas9 для репрессии транскрипции***

Способность dCas9, связываясь с сайтом-мишенью, приводит к возникновению стерического затруднения, препятствующего нормальному функционированию транскрипционного аппарата, лежит в основе метода, называемого CRISPR-интерференция (CRISPR Interference, CRISPRi). CRISPRi может приводить к 1000-кратной репрессии транскрипции, эффективно снижая экспрессию генов в клетках [93]. Она довольно хорошо работает в бактериальных, дрож-

жевых и других прокариотических клетках, менее эффективна для подавления экспрессии генов в клетках млекопитающих [98].

Ограничения в применении CRISPRi привели к разработке системы dCas9–KRAB, в которой dCas9 объединен с функциональным доменом репрессора транскрипции KRAB (Krüppel associated box) [98]. Эта система обеспечивает репрессию транскрипции за счет способности KRAB привлекать разнообразный набор модификаторов гистонов, которые обратимо подавляют экспрессию генов посредством образования гетерохроматина. Используя эту систему, во время транзиторной (временной) трансфекции было достигнуто снижение экспрессии высокоспецифичных эндогенных эукариотических генов на 60–80% [98]. Кроме того, стабильно интегрированный в геном dCas9–KRAB в клетках HeLa вызывал устойчивую 5–10-кратную репрессию эндогенных генов и промоторных областей [98], причем 100-кратный эффект наблюдался, когда сайт-мишень находился в 50–100 п.н. ниже сайта инициации транскрипции [90]. Наличие dCas9–KRAB также не оказывало влияния на рост и жизнеспособность клеток [99].

В отличие от других классических подходов к инактивации генов, таких как РНК-интерференция (метод, который снижает экспрессию генов посредством деградации транскрибированной мРНК в цитоплазме) [100], система dCas9–KRAB обеспечивает обратимое ингибирование на уровне ДНК. Это обеспечивает высокоспецифичную репрессию генов, а также ингибирование некодирующих РНК, микроРНК, антисмысловых транскриптов и локализованных в ядре РНК [98].

### *Эпигенетическое редактирование, опосредованное dCas9*

С появлением технологий инженерии и редактирования генома мы смогли лучше понять, как гены порождают определенные фенотипы. Кроме генома, на фенотип в той или иной степени могут влиять эпигенетические модификации, которые включают в себя модификации как нуклеосом, так и самой ДНК. Эпигенетическая регуляция воздействует на структуру участков хроматина, либо сжимая его в компактное и транскрипционно-неактивное состояние (гетерохроматин), либо открывая его для экспрессии (эухроматин). Годы усилий в области функциональной геномики позволили нанести на карту и охарактеризовать миллионы эпигенетических регуляторных элементов в различных тканях и типах клеток, однако современные методы изучения каждого локуса трудоемки, дороги и могут быть токсичны для живых клеток.

Для исследования эпигенома в отдельных локусах были созданы химерные dCas9 с различными отключаемыми эффекторными доменами (табл. 3.3). Этот набор молекулярных инструментов для изучения эпигенетики позволяет ученым изучать регуляцию генов и манипулировать ими, не изменяя сами последовательности генов. Такие химерные dCas9-системы могут помочь нам лучше понять роль эпигенетических изменений в различных молекулярных механизмах и заболеваниях и, возможно, даже предложить терапевтические стратегии для лечения таких заболеваний.

**Таблица 3.3.** Молекулярные инструменты CRISPR/dCas9 для эпигенетических модификаций

Показатель	Инструмент	Функция	Экспрессия генов
Модификация гистонов	dCas9–p300	Ацетилирование	Активация
	dCas9–LSD1	Деметилирование	Супрессия
Метилирование ДНК	dCas9–TET1CD	Деметилирование	Активация
	dCas9–DNMT3A	Метилирование	Супрессия

***dCas9–p300 — эпигенетическая активация с помощью модифицированной системы CRISPR/Cas9***

Для получения более четкого представления о механизмах регуляции генов необходимы инструменты, которые могут модулировать эпигенетические метки с высокой специфичностью. Для модификации эпигенома посредством целевого деметилирования и деацетилирования были созданы химерные белки гистоновых деацетилаз или ДНК-метилтрансфераз, слитые с белками с «цинковыми пальцами», или эффекторами, подобными активаторам транскрипции (TALE) [101]. Однако не было создано химерных белков, позволяющих ацетилировать гистоны, в то время как ацетилирование гистонов является одной из самых мощных систем, усиливающих экспрессию генов. Для удовлетворения этой потребности И. Хилтон и соавторы разработали систему dCas9–p300 [102], позволяющую напрямую модифицировать состояние хроматина, вовлеченного в широкий спектр клеточных путей и процессов.

В этой системе dCas9 объединяется с каталитическим доменом человеческого E1A-ассоциированного белка p300, ключевого компонента, который ацетирует гистоны. Получившаяся система успешно активирует экспрессию генов при нацеливании на кодирующие или регуляторные области, демонстрируя свою эффективность в качестве трансактиватора нижестоящих генов [102]. Активация составляла от 50 до 10 000 раз при нацеливании на промоторы или энхансеры и была высокоспецифичной, что было подтверждено профилированием транскриптома [101, 102]. Поскольку в этой системе используется p300 млекопитающих, она также обладает минимальным потенциалом иммуногенности, что делает ее привлекательным для применения *in vivo*.

Таким образом, dCas9–p300 — это простой и уникальный инструмент для картирования сложных взаимосвязей между эпигеномом, регуляторными элементами и экспрессией целевого гена в исследованиях функциональной геномики. Комбинируя dCas9–p300 с индуцибельным контролем, исследователи смогут активировать гены в режиме реального времени, и проводить исследования активности регуляторных элементов в масштабах всего генома.

***dCas9–LSD1 — эпигенетическая репрессия с помощью модифицированной системы CRISPR/Cas9***

dCas9–LSD1 является системой репрессии генов. В этой системе dCas9 объединен с лизин-специфической гистон-деметилазой 1 (LSD1) [103]. dCas9–LSD1

обладает способностью репрессировать нижестоящие гены, при нацеливании на область дистального энхансера гена, но не его промотора [103], что делает dCas9–LSD1 перспективным инструментом для изучения регуляторной активности энхансеров.

Поскольку многие области генома, связанные с заболеваниями человека, обнаруживаются в областях энхансеров, способность dCas9–LSD1 к функциональному картированию элементов энхансеров очень специфическим образом делает его незаменимым инструментом в исследовании взаимодействий энхансер–ген. Применение dCas9–LSD1 в сочетании с библиотеками направляющих РНК, специфичных к энхансерным элементам, может обеспечить высокопроизводительный и систематический способ идентификации всех энхансеров, связанных с геном.

### ***dCas9–TET1CD — система CRISPR/Cas9 для целевого деметилирования ДНК***

Целевое метилирование ДНК в клетках млекопитающих преимущественно происходит на пятом углероде цитозинов в динуклеотидных последовательностях CpG. Многие процессы, начиная от клеточного развития, дифференцировки и онкогенеза, могут регулироваться метилированием ДНК, причем известно, что гиперметилирование — это явление, тесно связанное с онкотрансформацией и неврологическими заболеваниями [104]. Технология, которая может обеспечить легкую модуляцию метилирования ДНК, открыла бы возможности для прямого исследования функциональных связей между статусом метилирования и экспрессией генов.

Система dCas9–TET1CD является одной из технологий, способных редактировать эпигеном путем целевого деметилирования. В этой системе каталитически неактивный Cas9 объединен с каталитическим доменом (catalytic domain, CD) белка TET1 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1, Tet метилцитозиндиоксигеназа 1), фермента, запускающего деметилирование ДНК [104]. Направляющая РНК может быть дополнительно модифицирована для привлечения белков оболочки бактериофага MS2, которые дополнительно несут еще два модуля TET1CD каждый [105]. Такая система продемонстрировала способность увеличивать транскрипцию в массиве генов специфичным для локуса образом с небольшими отклонениями от цели в разных клеточных линиях человека и мыши [105].

Способность dCas9–TET1CD быть специфически и легко нацеленной на выбранный ген(ы) поможет в исследовании роли метилирования (функциональности) ДНК в регуляции экспрессии генов в конкретных геномных контекстах. Система dCas9–TET1CD была успешно использована для эпигенетического редактирования в области промотора гена-супрессора опухолей *BRCA1*, избыточная репрессия которого через гиперметилирование связана с возникновением рака молочной железы и яичников [106]. Такая система также может быть использована для восстановления функциональной активности других генов-супрессоров опухолей, необходимых для борьбы с раком и другими заболеваниями.



### ***dCas9–DNMT3A — метилирование ДНК с помощью модифицированной системы CRISPR/Cas9***

В отличие от гистонового контроля клеточных фенотипов, метилирование ДНК является более стабильным и долгосрочным воздействием на экспрессию генов. Системы метилирования на основе dCas9 не только обладают межвидовой активностью, они не чувствительны к метилированию CpG. Это отличает их от систем на основе TALE, которые не подходят для эпигенетических манипуляций с промоторами млекопитающих из-за их чувствительности к метилированию CpG [107].

dCas9–DNMT3A является метилирующим аналогом ранее описанной системы dCas9–TET1CD. Эта система объединяет через гибкий глицин-сериновый линкер (Gly<sub>4</sub>Ser) dCas9 с каталитическим доменом DNMT3A, активной ДНК-метилтрансферазой, которая способна метилировать сайты CpG *in vivo*. Показано, что dCas9–DNMT3A успешно индуцировала сайт-специфическое метилирование CpG дистально и проксимально от промотора с самой высокой активностью метилирования (60%) в 27 п.н. ниже последовательности PAM. При использовании нескольких направляющих РНК эффект dCas9–DNMT3A был синергетическим [108].

dCas9–DNMT3A также использовалась для прямого метилирования промоторов генов-супрессоров опухолей, гиперметилирование которых коррелирует с возникновением нескольких видов рака [109]. Таким образом, система dCas9–DNMT3A, как и другие системы для эпигенетического редактирования на основе dCas9, может применяться для исследований функциональной геномики, редактирования и регулирования эпигенома.

### ***Визуализация геномных локусов с использованием флуорофоров***

Кроме приложений, связанных с задачами эпигенетического редактирования, каталитически неактивный Cas9, слитый с флуоресцентным маркером, таким как GFP, может быть использован для визуализации геномных локусов в живых клетках, а также *in vivo*. Для усиления эффекта флуоресцентного мечения в ходе визуализации целевых локусов в системе dCas9–GFP могут быть использованы направляющие РНК с аптамерами, которые способны привлекать специфические РНК-связывающие белки, меченные флуоресцентными белками. По сравнению с такими методами, как флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescent hybridization *in situ*, FISH), визуализация CRISPR предлагает уникальный метод определения динамики хроматина в живых клетках.

CRISPR-визуализация может быть многоцветной и позволяет одновременно отслеживать несколько геномных локусов в живых клетках и *in vivo*. В одном методе используются ортологичные dCas9 (например, *S. pyogenes* dCas9 и *S. aureus* dCas9), меченные различными флуоресцентными белками.

Альтернативно используются направляющие РНК, содержащие аптамеры, специфичные ортологичным РНК-связывающим белкам, с различными флуоресцентными белками (CRISPRainbow) [110]. Технология CRISPR-Sirius для визуализации геномных локусов позволяет модифицировать направляющие РНК

8 различными аптамерами [111], которые обеспечивают лучшую стабильность и усиление сигнала для визуализации геномных локусов.

Система визуализации CRISPR может быть использована для динамического отслеживания повторяющихся и неповторяющихся геномных локусов, а также для окрашивания хромосом в живых клетках. Визуализация определенного геномного локуса требует привлечения множества копий меченых белков в выбранную область. Например, специфичные для хромосомы повторяющиеся локусы могут быть эффективно визуализированы в живых клетках с использованием одной направляющей РНК, которая имеет несколько целевых последовательностей, располагающихся в непосредственной близости. В то же время уникальный геномный локус может быть помечен путем одновременной доставки множества направляющих РНК, которые «перекрывают» целевой локус полностью. Для окрашивания хромосом требуется доставка сотен направляющих РНК с сайтами-мишенями, распределенными по всей хромосоме [110, 112].

#### ***Выделение целевых геномных регионов с помощью dCas9***

Идентификация молекул, связанных с интересующей областью генома *in vivo*, важна для понимания функций локуса. Используя CRISPR/dCas9, исследователи усовершенствовали технологию иммунопреципитации хроматина (chromatin immunoprecipitation, ChIP), чтобы обеспечить очистку любой геномной последовательности, на которую нацелена направляющая РНК [113–115].

Технология enChIP (DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation, иммунопреципитация хроматина, опосредованная ДНК-связывающей молекулой) предполагает использование каталитически неактивного Cas9 для очистки геномной ДНК, связанной с направляющей РНК. Эпитопная метка (метки), используемая для выделения, может находиться в составе химерного белка dCas9 или в составе направляющей РНК. Различные эпитопы, включая метки 3×FLAG, PA и биотин, могут быть использованы для enChIP. Кроме того, для выделения целевых геномных регионов с помощью dCas9 могут быть использованы антитела, специфичные к Cas9. Локус, связанный dCas9, выделяют методом аффинной очистки в соответствии с использованным эпитопом [113–118].

После выделения целевого геномного локуса все молекулы, связанные с ним, могут быть идентифицированы с помощью масс-спектрометрии (белки), РНК-секвенирования (РНК) и секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) (другие области генома) [115, 119–121]. По сравнению с обычными методами, применяемыми для выделения целевых геномных локусов, методы очистки на основе CRISPR более просты и позволяют напрямую идентифицировать молекулы, связанные с интересующей областью генома *in vivo*.

#### **3.4.4. Направленное редактирование азотистых оснований**

Два класса редакторов азотистых оснований ДНК — редакторы цитозиновых оснований (cytosine base editors, CBEs) и редакторы аденозиновых осно-

ваний (adenosine base editors, ABEs) — могут быть использованы для внесения однопараметрических изменений в ДНК без введения дупнитевых разрывов (рис. 3.5).

Редакторы цитозиновых оснований создаются путем объединения нуклеазы Cas9 или каталитически неактивного Cas9 с цитидин-дезаминазой, например, АРОВЕС (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like). Редакторы СВЕ нацеливают на необходимый локус ДНК с помощью направляющей РНК, и они могут преобразовывать цитидин в уридин на небольшом расстоянии рядом с сайтом РАМ. Впоследствии уридин репарируется в тимидин по механизму эксцизионной репарации оснований, создавая замену С на Т (или G на А в комплементарной цепи) [122–125].

Аналогичным образом, редакторы адениновых оснований были разработаны для преобразования аденозина в инозин, который клеткой репарируется в гуанозин, создавая замену А на G (или Т на С в комплементарной цепи). Аденин-ДНК-дезаминазы не существуют в природе, но были созданы путем направленной эволюции тРНК аденин-дезаминазы TadA *Escherichia coli*. Как и редакторы цитозиновых оснований, домен TadA объединен с белком Cas9 для создания редактора оснований аденина [126–129].

Оба типа редакторов азотистых оснований ДНК доступны с несколькими вариантами Cas9, включая модифицированные варианты Cas9. Технология была усовершенствована путем оптимизации экспрессии химерных белков, в том числе за счет изменения линкерной последовательности между белком Cas9 и дезаминазой для настройки области редактирования или применения химерных белков, повышающих чистоту продукта, таких как ингибитор ДНК-гликозилазы (UGI) или белок, полученный из бактериофага Му (MuGAM) [130, 131].

Хотя многие редакторы азотистых оснований ДНК предназначены для работы в очень узком диапазоне, располагающемся в непосредственной

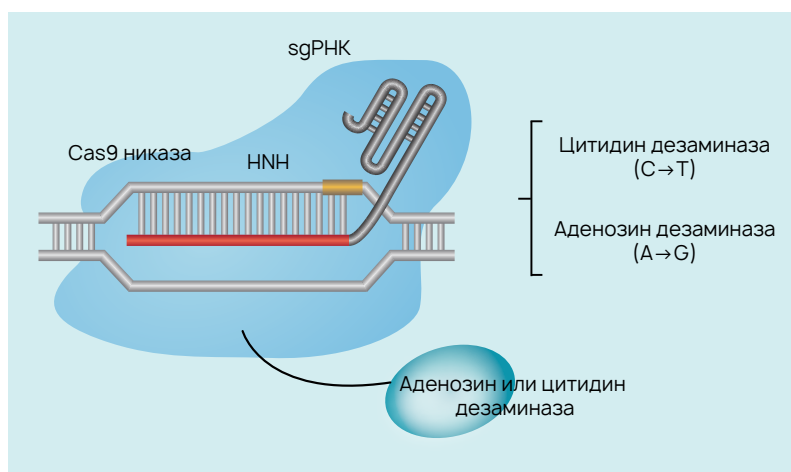


Рис. 3.5. Схема действия редакторов азотистых оснований на основе комплексов pCas9–sgРНК.

близости от РАМ, некоторые способны создавать широкий спектр однонуклеотидных вариантов в процессе соматической гипермутации и в более широком диапазоне редактирования, в связи с чем могут применяться для направленной эволюции [132].

### 3.4.5. Cas9 для «праймированного» редактирования

В октябре 2019 г. Эндрю Анзалоне и соавт. представили новую технологию геномного редактирования под названием «праймированное» редактирование [25] — метод направленного редактирования, который позволяет точно вносить в редактируемую последовательность ДНК небольшие целевые вставки, удалять и заменять азотистые основания. Праймированное редактирование позволяет целенаправленно изменять ДНК без создания двунитевых разрывов. Вставка целевых последовательностей достигается за счет использования донорных ДНК-матриц. Кроме того, праймированное редактирование расширяет ограниченный диапазон текущих возможностей редакторов азотистых оснований ДНК [133].

Как и в процессе стандартного редактирования генома, праймированное редактирование требует присутствия РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазы Cas и направляющей РНК. Вместо Cas9 этот метод использует никазу Cas9 — вариант Cas9, который разрезает только одну цепь ДНК, а не генерирует двунитевые разрывы. Никаза Cas9 объединена с обратной транскриптазой [25].

В настоящее время есть три варианта химерных белков, применяемых для праймированного редактирования генома. Первая версия химерного белка обладала невысокой эффективностью редактирования; второй химерный белок был термостабильным и содержал дополнительные модификации, которые привели к улучшению связывания с ДНК-мишенью. Последние варианты химерных белков для праймированного редактирования имеют возможность исправления ошибок, возникших в процессе редактирования [25].

Направляющая РНК, применяемая в процессе праймированного редактирования, значительно больше стандартных направляющих РНК, обычно используемых для редактирования в системе CRISPR/Cas. Эта РНК представляет собой направляющую РНК, содержащую последовательность для связывания праймера (primer binding site, PBS) и донорную матрицу с желаемой последовательностью, добавленную на 3'-конце РНК [25]. В настоящее время такие направляющие РНК получают с использованием плазмидных ДНК и метода транскрипции *in vitro*.

В ходе праймированного редактирования комплекс химерной никазы Cas9 и направляющей РНК связывается с ДНК-мишенью и образует одностебельный разрыв. После этого PBS, гомологичный ДНК-мишени, расположенный на направляющей РНК, связывается с фрагментом ДНК-мишени, в то время как донорная РНК-матрица подвергается обратной транскрипции (обратной транскриптазой, входящей в состав химерного белка для праймированного редактирования) [25]. Целевая ДНК восстанавливается с помощью новой обратно

транскрибированной ДНК, тогда как исходный сегмент ДНК удаляется клеточной эндонуклеазой. В результате одна цепь ДНК становится отредактированной, а другая — неотредактированной.

Химерные белки третьего поколения могут корректировать неотредактированную цепь ДНК в присутствии дополнительной стандартной направляющей РНК. В таком случае в неотредактированную цепь ДНК никаза Cas9 вносит разрыв, который затем репарируется с использованием отредактированной цепи ДНК в качестве матрицы для восстановления ника, тем самым завершая редактирование [25].

Хотя расширение набора инструментов для редактирования генома полезно, реальный вопрос заключается в том, могут ли эти новые инструменты применяться для терапии? Э. Анзалоне и коллеги продемонстрировали возможность моделировать и исправлять общие генетические заболевания с помощью праймированного редактирования [25]. В качестве доказательства концепции были выбраны два заболевания: серповидно-клеточная анемия и болезнь Тея–Сакса. Методом праймированного редактирования исследователи создали клеточные линии, несущие мутации, ответственные за эти заболевания. Затем они использовали систему праймированного редактирования с направляющими РНК, содержащими донорные последовательности дикого типа для обоих генетических заболеваний, чтобы эффективно исправить мутации. Важно, что эти исследования демонстрируют возможности использования праймированного редактирования для исправления однонуклеотидных мутаций (как в случае с серповидно-клеточной анемией) и более длинных нуклеотидных коррекций (как в случае болезни Тея–Сакса, где для коррекции патологического состояния требуется вставка 4 п.н.) [25].

Как и в случае всех новых технологических достижений, необходимо провести дополнительные исследования, чтобы понять, как работает праймированное редактирование. Исследователи продолжают оптимизировать технологию и пытаются определить, можно ли использовать праймированное редактирование в различных терапевтически значимых типах клеток, каковы долгосрочные эффекты (если они есть), а также количество нецелевых эффектов редактирования.

### 3.4.6. Cas12

Ген, первоначально обозначенный как *cpf1*, присутствует в нескольких бактериальных и археальных геномах, где он соседствует с генами *cas1*, *cas2* и массивом CRISPR [44]. Cas12a (Cpf1) является прототипом эффекторов мультидоменных белков Cas типа V, содержит два RuvC-подобных нуклеазных домена, но не имеет домена HNH. Структурный анализ комплекса ДНК-мишени Cas12a–crРНК выявил второй нуклеазный домен (Nuc) с уникальной структурой, функционально аналогичный домену HNH Cas9 [134] (**рис. 3.6**). Cas12a является РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазой, для которой не требуется tracrРНК, которая необходима для активности Cas9 [135]. Белок также отличается от Cas9

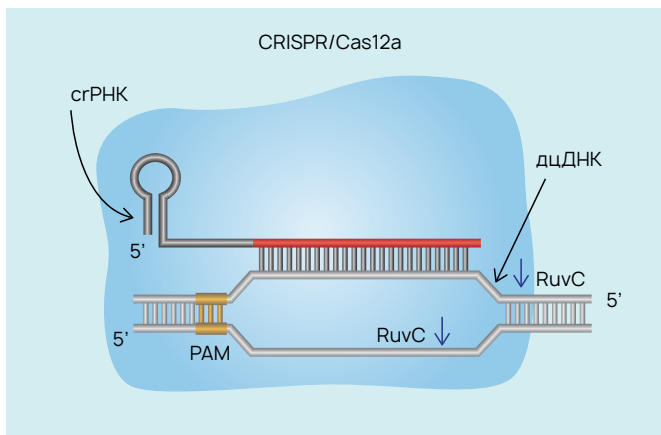
по характеру расщепления и распознаванию PAM, который определяет целевые цепи. Разнообразие белков Cas12 представлено в **табл. 3.4**.

### 3.4.7. Cas13

Открытие двух отдаленно связанных эффекторных белков класса 2 — Cas9 и Cas12a — позволило предположить, что могут существовать другие варианты таких систем. Действительно, вскоре среди эффекторов класса 2 путем направленного поиска (биоинформатический анализ) были обнаружены белки Cas12b (тип V), Cas13a и Cas13b (тип VI), которые отличаются от Cas9 и Cas12a, и их активность была подтверждена [135]. Эффекторы типа V, подобно Cas9, используют tracrRNA для целевой активности. До настоящего времени сообщалось, что большинство функционально охарактеризованных систем CRISPR/Cas нацелены на ДНК, и только многокомпонентные системы типов IIIA и IIIB могут расщеплять РНК [142]. Эффекторы типа VI Cas13a и Cas13b специфически нацелены на РНК, тем самым опосредуя РНК-интерференцию. В отличие от эффекторов типа II и типа V, Cas13a и Cas13b не имеют характерных RuvC-подобных нуклеазных доменов и вместо этого содержат пару доменов HEPN (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain, нуклеотидсвязывающий домен высших эукариот и прокариот) [143] (**рис. 3.7**). Разнообразие белков Cas13 представлено в **табл. 3.5**.

### 3.4.8. Cas14

В 2018 г. было обнаружено семейство систем CRISPR/Cas, содержащих *cas1*, *cas2*, *cas4* и новый ген *cas14*. Cas14 кодирует небольшой белок Cas (молекулярная масса 40–70 кДа), который в 2 раза меньше других белков Cas, обнаруженных в так называемых CRISPR/Cas системах класса 2 [148].



**Рис. 3.6.** Схема взаимодействия ДНК-мишени с комплексом Cas12a-crRNA.

Таблица 3.4. Разнообразие белков Cas12

№ п/п	Системы CRISPR/Cas12a	РАМ последовательность	Источник
1	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> ND2006 (LbCpf1)	TTTN	[135, 136]
2	<i>Acidaminococcus</i> sp. BV3L6 (AsCpf1)	TTTN	[135, 136, 137]
3	<i>Francisella novicida</i> U112 (FnCpf1)	TTTN	[138]
4	<i>Candidatus Methanomethylophilus alvus</i> Mx1201 (CMaCpf1)	TTTV, TTV	[139]
5	<i>Sneatia amnii</i> (SaCpf1)	–	[139]
6	<i>Parcubacteria group bacterium</i> GW2011 (PgCpf1)	–	[139]
7	<i>Candidatus Roizmanbacteria bacterium</i> GW2011 (CRbCpf1)	–	[139]
8	<i>Candidatus Peregrinbacterium bacterium</i> GW2011 (CPbCpf1)	–	[139]
9	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> MA2020 (Lb5Cpf1)	TTTV, TTV	[139]
10	<i>Butyrivibrio</i> sp. NC3005 (BsCpf1)	TTN, TTTN	[139, 140]
11	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (BfCpf1)	TTTV	[139]
12	<i>Prevotella bryantii</i> B14 (Pb2Cpf1)	TTTV	[139]
13	<i>Bacteroidetes oral taxon</i> 274 (BoCpf1)	TTTV, TTV	[139]
14	<i>Flavobacterium brachiophilum</i> FL-15 (FbCpf1)	–	[139]
15	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> MC2017 (Lb4Cpf1)	–	[139]
16	<i>Moraxella lacunata</i> (MlCpf1)	TTTV, TTV	[139]
17	<i>Moraxella bovoculi</i> AAX08_00205 (Mb2Cpf1)	TTTV, TTN	[139]
18	<i>Moraxella bovoculi</i> AAX11_00205 (Mb3Cpf1)	TTTV, TTN	[139]
19	<i>Thiomicrospira</i> sp. XS5 (TsCpf1)	TTTV, TTV	[139]
20	<i>Firmicutes bacterium</i> ADurb.Bin193 (Adurb193Cas12a)	TTTV	[141]
21	<i>Archaeon</i> ADurb.Bin336 (Adurb336Cas12a)	TTTV	[141]
22	<i>Francisella novicida</i> (Fn3Cas12a)	YTV	[141]
23	<i>Prevotella ihumii</i> (PiCas12a)	KKYV	[141]
24	<i>Prevotella disiens</i> (PdCas12a)	TTTV	[141]
25	<i>Helcococcus kunzii</i> ATCC 51366 (HkCas12a)	YYV, YYN, TTTN, YTN, TYN, TTYN, TCCN	[140, 141]
26	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> CF1b (PrCas12a)	TTN, TTTN	[140]
27	<i>Agathobacter rectalis</i> strain 2789STDY5834884 (ArCas12a)	TTN, TTTN	[140]
28	<i>Lachnospira pectinoschiza</i> strain 2789STDY5834886 (LpCas12a)	TTN, TTTN	[140]
29	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> strain DSM 10317 (PxCas12a)	TTN, TTTN	[140]

**Примечание:** N = A, T, G или C; V = A, C, или G; Y = C или T; K = G или T.

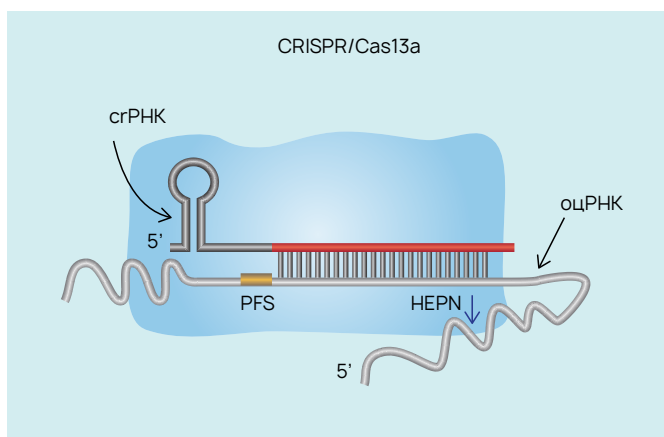


Рис. 3.7. Схема взаимодействия РНК-мишени с комплексом Cas13a-crPHK.

Таблица 3.5. Разнообразие белков Cas13

№ п/п	Системы CRISPR/Cas13	PFS (proto-spacer flanking motif, мотив, фланкирующий протоспейсер)		Источник
		5'	3'	
1	<i>Leptotrichia shahii</i> (LshCas13a)	–	H	[40, 144]
2	<i>Leptotrichia wadei</i> (LwaCas13a)	–	H	[40, 144]
3	<i>Listeria seeligeri</i> (LseCas13a)	–	–	[40]
4	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> (LbmCas13a)	–	–	[40]
5	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> (LbnCas13a)	–	–	[40]
6	<i>Clostridium aminophilum</i> (CamCas13a)	–	–	[40]
7	<i>Carnobacterium gallinarum</i> (CgaCas13a)	–	–	[40]
8	<i>Carnobacterium gallinarum</i> (Cga2Cas13a)	–	–	[40]
9	<i>Paludibacter propionigenes</i> (Pprcas13a)	–	–	[40]
10	<i>Listeria weihenstephanensis</i> (LweCas13a)	–	–	[40]
11	<i>Listeriaceae bacterium</i> (LbfCas13a)	–	–	[40]
12	<i>Leptotrichia wadei</i> (Lwa2cas13a)	–	–	[40]
13	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (RcsCas13a)	–	–	[40]
14	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (RcrCas13a)	–	–	[40]
15	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (RcdCas13a)	–	–	[40]
16	<i>Leptotrichia buccalis</i> (LbuCas13a)	–	H	[40, 145]
17	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i> (HheCas13a)	–	–	[40]
18	<i>Eubacterium rectale</i> (EreCas13a)	–	–	[40]

Окончание табл. 3.5 см. на стр. 84.



№ п/п	Системы CRISPR/Cas13	PFS (proto-spacer flanking motif, мотив, фланкирующий протоспейсер)		Источник
		5'	3'	
19	<i>Eubacteriaceae bacterium</i> (EbaCas13a)	–	–	[40]
20	<i>Blautia</i> sp. (BmaCas13a)	–	–	[40]
21	<i>Leptotrichia</i> sp. (LspCas13a)	–	–	[40]
22	<i>Bergeyella zoohelcum</i> (BzoCas13b)	ND	NNNN	[40]
23	<i>Prevotella intermedia</i> (PinCas13b)	DD	NNNN	[40]
24	<i>Prevotella buccae</i> (PbuCas13b)	ND	NDNN	[40]
25	<i>Alistipes</i> sp. (AspCas13b)	DR	NDDN	[40]
26	<i>Prevotella</i> sp. (PsmCas13b)	VD	DNNN	[40]
27	<i>Riemerella anatipestifer</i> (RanCas13b)	ND	MDDN	[40]
28	<i>Prevotella aurantiaca</i> (PauCas13b)	NR	NNNN	[40]
29	<i>Prevotella saccharolytica</i> (PsaCas13b)	DN	NNNN	[40]
30	<i>Prevotella intermedia</i> (Pin2Cas13b)	DN	NNNN	[40]
31	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> (CcaCas13b)	ND	NHHA	[40]
32	<i>Porphyromonas gulae</i> (PguCas13b)	ND	MHHA	[40]
33	<i>Prevotella</i> sp. (PspCas13b)	DD	GBKN	[40]
34	<i>Flavobacterium branchiophilum</i> (FbrCas13b)	KR	NNNG	[40]
35	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (PgiCas13b)	ND	NNNN	[40]
36	<i>Prevotella intermedia</i> (Pin3Cas13b)	ND	NNNN	[40]
37	<i>Fusobacterium necrophorum</i> (FnsCas13c)	–	–	[40]
38	<i>Fusobacterium necrophorum</i> (FndCas13c)	–	–	[40]
39	<i>Fusobacterium necrophorum</i> (FnbCas13c)	–	–	[40]
40	<i>Fusobacterium necrophorum</i> (FnfCas13c)	–	–	[40]
41	<i>Fusobacterium perfoetens</i> (FpeCas13c)	–	–	[40]
42	<i>Fusobacterium ulcerans</i> (FulCas13c)	–	–	[40]
43	<i>Anaerosalibacter</i> sp. (AspCas13c)	–	–	[40]
44	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (RfxCas13d)	–	–	[146]
45	<i>Eubacterium siraeum</i> DSM 15702 (EsCas13d)	–	–	[146]
46	<i>Ruminococcus</i> sp. N15.MGS-57 (RspCas13d)	–	–	[147]
47	Anaerobic digester metagenome (AdmCas13d)	–	–	[146]
48	<i>Ruminococcus albus</i> (RaCas13d)	–	–	[146]
49	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD1 (RffCas13d)	–	–	[146]

**Примечание:** D = A, G, T (U); R = A, G; M = A, C; K = G, T (U); B = C, G, T (U); H = A, C, T (U).

Существуют 24 варианта гена *cas14*, которые группируются в 3 подгруппы (*cas14a–c*). Все варианты содержат предсказанный нуклеазный RuvC-домен, характерный для ряда ферментов CRISPR/Cas. В отличие от других ферментов Cas, Cas14 не был обнаружен в бактериальных геномах, а только в геноме группы архей. Соответственно, предполагают, что Cas14 может быть более примитивной версией более крупных и более сложных белков Cas9 и Cas12 (рис. 3.8).

Cas14 может связывать и расщеплять целевую последовательность одноцепочечной ДНК. В отличие от Cas9, Cas14 не требует наличия последовательности PAM. В дополнение к этому специфическому РНК-направляемому расщеплению, после активации Cas14 может неспецифически гидролизовать одноцепочечную ДНК [148].

### 3.5. Применение CRISPR/Cas

Направленное геномное редактирование с использованием программируемых нуклеаз за короткое время заняло передовые позиции среди технологий модификаций генома. На сегодняшний день самой популярной системой для направленного редактирования генома является CRISPR/Cas [149–151]. Использование CRISPR/Cas-нуклеаз обладает рядом преимуществ, среди которых — высокая эффективность, возможность множественного редактирования, невысокая стоимость, а также скорость разработки [152, 153].

Системы CRISPR/Cas могут применяться в различных областях, связанных с редактированием генов, — начиная от создания клеточных моделей наследственных заболеваний человека и животных, функционального скрининга геномов, изучения эпигеномов и визуализации клеточных процессов до прикладного применения в пищевой промышленности для получения обогащенных продуктов питания, в сельском хозяйстве для создания новых пород животных и сортов растений, а также в медицине. Кроме того, системы CRISPR/Cas возможно

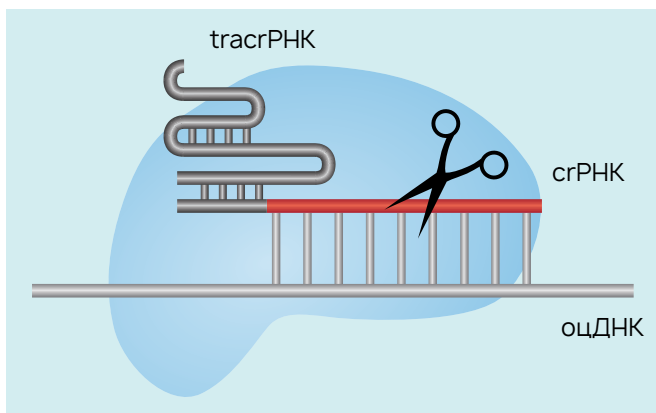


Рис. 3.8. Схема взаимодействия оцДНК-мишени с комплексом Cas14-crPNC+tracrPNC.

использовать для диагностики заболеваний путем идентификации генетических последовательностей, например, вирусов или онкогенов, профилактики инфекционных заболеваний за счет модификации генов не человека, а переносчиков болезней, например, малярии, и лечения социально значимых заболеваний — как наследственных, так и приобретенных, среди которых рак, аутоиммунные, орфаные заболевания, инфекционные заболевания и многие другие.

### 3.5.1. CRISPR/Cas в пищевой промышленности

Ферментированные продукты являются неотъемлемой частью современного рациона питания, причем наиболее распространенными субстратами являются молоко, мясо, огурцы, зерновые и капуста. Стартовые культуры играют важную роль в превращении этих субстратов в соответствующие продукты [154]. Другие микробы играют роль пробиотиков, определяемых как «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина» [155]. Пробиотики могут быть добавлены в качестве добавок в ферментированные продукты или другие пищевые матрицы или могут быть доступны в качестве самостоятельных пищевых добавок. Несмотря на то, что в течение тысячелетий практиковались процессы ферментации с использованием этих полезных микроорганизмов, они по-прежнему сталкиваются с такими проблемами, как надежность и качество продукта, чистота и состав культуры, а также сбой ферментации из-за атаки бактериофагов.

Микробы, продуцирующие молочную кислоту, распространенные как в заквасочных культурах, так и в пробиотиках, имеют особенно высокий уровень встречаемости систем CRISPR/Cas, локусы которых встречаются в 62,9% проанализированных геномов лактобацилл и 77% геномов бифидобактерий [156, 157]. Распределение систем CRISPR/Cas в этих микробах и разнообразие этих систем обеспечивают исторический взгляд на фагомикробные экосистемы крупномасштабного брожения. Кроме того, CRISPR/Cas может быть мощным инструментом в управлении процессами ферментации с приложениями для типирования штаммов, устойчивости к фагам, вакцинации плазмидами, редактирования генома и антимикробной активности.

### 3.5.2. Типирование микроорганизмов

Адаптивный характер CRISPR/Cas позволяет получить динамическую картину эволюционного развития определенного штамма микроорганизма во времени. При обнаружении внешних угроз новые спейсеры встраиваются в массив CRISPR в хронологическом порядке на проксимальном конце лидерной последовательности [8, 158, 159]. Поскольку «приобретение» спейсера в первую очередь обусловлено угрозами, присутствующими в конкретное время, местоположение спейсера в массиве CRISPR генома хозяина может дать важную историческую, географическую и экологическую информацию о конкретном штамме [159–161]. Эта особенность делает CRISPR/Cas мощным инструментом

не только для типирования штаммов, но также для изучения дивергенции и родства штаммов, микробной экологии и эволюции, получения эпидемиологических представлений и понимания генотипов на уровне популяции в сложных пробах из окружающей среды [162, 163].

Для точной идентификации штаммов, входящих в состав заквасок и пробиотиков, пищевой промышленности необходимы соответствующие методы типирования. Это необходимо для обеспечения постоянного состава конкретной стартовой культуры, а также для оптимизации процессов выделения и идентификации потенциальных новых стартовых штаммов для использования в промышленности.

С целью найти быстрый и экономически эффективный метод определения видов и вариаций штамма (типирования) был исследован ряд методов, в том числе гель-электрофорез в импульсном поле (пульс-электрофорез), ПЦР-анализ повторов и секвенирование 16S рДНК [164]. Типирование посредством амплификации и секвенирования массивов повторяющихся спейсеров CRISPR является новым и эффективным инструментом, который можно добавить к уже существующему арсеналу методов. Очевидно, что отсутствие CRISPR/Cas в интересующих штаммах является самым большим ограничением его использования в этом приложении. Тем не менее из-за необычно высокой распространенности CRISPR/Cas во многих микроорганизмах, участвующих в процессе ферментации, пищевая промышленность может использовать CRISPR/Cas-типирование для определения видов, входящих в состав стартовых культур и пробиотиков (табл. 3.6) [162].

Помимо этого, CRISPR может быть полезным инструментом для отслеживания вредоносных микроорганизмов. Скорость и легкость, с которой может выполняться CRISPR/Cas-типирование, делают его идеальным методом для идентификации штаммов в случае проблемы загрязнения или вспышки того или иного заболевания.

CRISPR/Cas-типирование может быть использовано как самостоятельный метод и в сочетании с традиционными методами типирования микроорганизмов, при этом применение CRISPR/Cas может обеспечить дополнительную дискриминационную силу при идентификации конкретных изолятов, присутствующих в стартовых культурах, пробиотиках, применяемых в пищевой промышленности. Кроме того, информация, полученная в ходе CRISPR/Cas-типирования гнилостных микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов питания, и пищевых патогенов, может в дальнейшем быть использована для разработки стратегий обеспечения безопасности и качества пищевых продуктов.

### **3.5.3. Конструирование штаммов микроорганизмов, устойчивых к бактериофагам и нежелательным плазмидным ДНК**

Фаги являются наиболее распространенными биологическими объектами на Земле, превосходя по численности бактерий [193]. Поскольку литические фаги реплицируются посредством уничтожения своих бактериальных хозяев,

Таблица 3.6. CRISPR/Cas-типирование микроорганизмов

№ п/п	Микроорганизм	Источник
Пищевая промышленность (закваски/пробиотики)		
1	<i>S. thermophilus</i>	[62]
2	<i>Lactobacillus casei</i>	[165]
3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	[166]
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	[167]
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	[168]
6	<i>Bifidobacterium</i> genus	[156]
7	<i>Lactobacillus gasseri</i>	[169]
Гнилостные микроорганизмы		
8	Гнилостные микроорганизмы	[163]
9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	[170]
Патогенные микроорганизмы		
10	<i>Salmonella</i>	[171–182]
11	<i>Campylobacter jejuni</i>	[183]
12	<i>Clostridium difficile</i>	[184]
13	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	[185]
14	<i>E. coli</i>	[186]
15	<i>Legionella pneumophila</i>	[187]
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	[188]
17	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[189]
18	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[190, 191]
19	<i>Yersinia pestis</i>	[7, 192]

неудивительно, что они представляют проблему для процессов ферментации в пищевой промышленности. Пытаясь свести к минимуму экономические потери, которые влечет за собой каждая фаговая инфекция, пищевая промышленность предложила несколько способов ограничения воздействия фагов, включая изменение конструкции производственных помещений, санитарные меры, системы вентиляции, технологические протоколы, исходные питательные среды и процедуры смены культур. Тем не менее фаговая инфекция заквасочных культур остается основной причиной медленной или неудачной ферментации в промышленности [194]. Поскольку фаги часто присутствуют в сырье и устойчивы к различным видам обработки, включая термическое воздействие, высокое давление, ионизирующее излучение и пастеризацию, их практически невозможно полностью устранить [195]. Бактерии эволюционировали, чтобы справиться с этой проблемой, и многие из них содержат естественные механизмы защиты от бактериофагов [196–201]. CRISPR/Cas — это еще один защитный механизм. Учитывая преобладание фагов в процессах ферментации, высокая распространенность систем CRISPR/Cas в ферментационных микроорганизмах не удивительна. CRISPR/Cas позволяет микроорганизмам приобретать устойчивость к фагам. Когда включается новый спейсер, который соответствует фагу, которым он был заражен, штамм эффективно вакцинируется против любых

будущих встреч с этим фагом или с любыми другими родственными фагами, несущими ту же последовательность протоспейсера [159].

Помимо воздействия на бактериофаги, системы CRISPR/Cas также предотвращают поглощение плазмид посредством расщепления ДНК [9, 12]. При встрече с плазмидой микроорганизм, имеющий систему CRISPR/Cas, приобретает соответствующий спейсер и впоследствии вакцинируется против поглощения этой плазмиды. Основным преимуществом, полученным от такого рода вакцинации, является то, что она ограничивает поглощение нежелательных элементов ДНК, таких как островки патогенности или гены устойчивости к антибиотикам, которые часто переносятся через плазмиды [202–205]. Хотя вакцинация против таких элементов может происходить естественным путем, система CRISPR/Cas также может быть искусственно разработана для воздействия на такие генетические элементы.

Особую озабоченность специалистов пищевой промышленности вызывает распространение среди микроорганизмов устойчивости к антибиотикам. Надзор за переносом генов этих элементов антибиотикоустойчивости в метаболической цепи считается приоритетом для демонстрации безопасности применения таких микроорганизмов [206].

Сходным с программированием устойчивости к фагам у штаммов, содержащих нативные системы CRISPR/Cas, образом можно запрограммировать и устойчивость к плазмидам, несущим гены антибиотикоустойчивости, что делает модифицированный таким образом микроорганизм устойчивым к поглощению или распространению генов антибиотикоустойчивости [12, 207].

#### 3.5.4. Модификация микроорганизмов

Известно, что CRISPR/Cas9 вносит двунитевой разрыв в назначенном месте генома (программируется посредством выбора соответствующей направляющей РНК). Редактирование генома происходит именно тогда, когда клетка восстанавливает повреждение, используя эндогенные пути восстановления (репарации) ДНК, такие как негомологичное соединение концов или гомологичная рекомбинация, которые часто вызывают изменения в сайте расщепления CRISPR/Cas. Однако при работе с прокариотическими организмами подход к использованию CRISPR/Cas в качестве инструмента для редактирования генома должен учитывать физиологию бактерий и механизмы ДНК-гомеостаза. Например, двунитевой разрыв бактериального генома чаще всего приводит к гибели клеток из-за отсутствия надежных путей эндогенной репарации ДНК, в связи с чем редактирование генома у бактерий должно быть обусловлено событиями рекомбинации [208]. Интерес к применению технологии CRISPR/Cas для редактирования бактериального генома, нокаута генов и скрининга основных генов в геномах бактерий и архей непрерывно растет [209–213].

Важно отметить, что CRISPR/Cas является исключительно подходящим инструментом как для скрининга и отбора низкочастотных желаемых генотипов [214, 215], так и при отборе конкретных генотипов в ферментационном

организме *S. thermophilus* и пробиотике *Lactobacillus reuteri* [211, 215]. Кроме того, была разработана методика CRISPR/Cas-опосредованного редактирования генома в сочетании с рекомбинацией и использованием линейных одноцепочечных или двуцепочечных ДНК-матриц, которая успешно применяется для кишечной палочки [216].

Теоретически, CRISPR/Cas может использоваться для выбора любого числа встречающихся в природе генотипов для дальнейшего изучения их функциональных возможностей в соответствующих отраслях, что делает высокопроизводительные инструменты редактирования генома полезными для селекции экономически ценных штаммов.

### 3.5.5. Антимикробная активность

Системы CRISPR/Cas типов I и II могут быть использованы в качестве программируемых противомикробных препаратов, при этом их можно легко направить на целевые нежелательные последовательности, такие как гены антибиотикоустойчивости и вирулентности, с целью уничтожения патогенных бактерий или в качестве средства для уничтожения нежелательных плазмид, которые они иногда несут [217, 218].

Способность уничтожать популяцию бактерий на основе ее последовательности с использованием системы CRISPR/Cas типа II из *S. pyogenes* была использована в качестве средства отбора для введения мутаций [209], представляя первые доказательства CRISPR-опосредованного редактирования генома у бактерий. Системы типа I из *E. coli* и *Salmonella*, а также система типа II из *S. thermophilus* тоже использовались для селективного уничтожения даже близкородственных организмов (до 99% гомологии) путем нацеливания на уникальные последовательности в сложной микробной популяции [219]. При использовании стратегии «самонацеливания», когда для уничтожения бактериальной популяции используется эндогенная система CRISPR/Cas, удается достичь элиминации подавляющего большинства бактериальной популяции (эффективность уничтожения варьирует в пределах от 2 до 5 порядков при использовании единичных спейсеров) [217].

Хотя «самонацеливание» CRISPR является мощным программируемым противомикробным средством, основной проблемой его использования для уничтожения бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, является доставка к целевой популяции. Для достижения клинически значимой эффективности доставка должна быть специфичной и эффективной. Несколько исследований показали, как ДНК, кодирующая бактерицидные белки, отличные от нуклеаз Cas, может доставляться в бактериальные популяции с использованием фаговых частиц в качестве векторов. Например, фагида M13 использовалась для доставки различных токсинов или рестриктаз в *E. coli* [220–222], а фаг Pf3 также используется для доставки рестриктазы и успешного лечения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, у мышей [223]. С помощью предложенной стратегии «самонаводящиеся» системы CRISPR/Cas успешно были доставлены в *E. coli*

и *S. aureus* с использованием фаговых капсидов в качестве векторов доставки [224, 225]. Кроме того, системы CRISPR/Cas с набором спейсеров, нацеленных на гены устойчивости к антибиотикам, успешно применяются для повторной сенсбилизации клеток, которые изначально переносят плазмиды с целевыми последовательностями генов устойчивости к антибиотику [226].

Таким образом, системы CRISPR/Cas представляют собой привлекательный вариант для создания программируемых и специфичных противомикробных препаратов. Уникальное преимущество противомикробных препаратов на основе CRISPR над всеми другими стратегиями (фаготерапия, антимикробные пептиды, антитела или вакцины) заключается в их способности убивать бактерии, несущие строго определенные последовательности. Это может оказаться полезным в тех случаях, когда желательно уничтожить только избранную группу бактерий в пределах вида, что было бы трудно достичь с помощью действующих стратегий. Применение систем CRISPR/Cas позволит решить две основные задачи, связанные с доступными в настоящее время антибиотиками. Во-первых, предотвратит неизбирательное уничтожение бактерий, которые могут быть полезными, а, во-вторых, уменьшит избирательное давление на устойчивость, позволяя нецелевой популяции «процветать» и занимать экологическую нишу. Таким образом, системы CRISPR/Cas — это новый инструмент для контроля состава микробных сообществ, а не традиционный антибиотик широкого спектра действия.

### 3.5.6. Терапия ВИЧ-инфекции

Системы CRISPR/Cas используются для исследования генов-мишеней и процессов модификации генома [227], механизмов сплайсинга [228], транскрипции [229] и эпигенетической регуляции [230]. Кроме того, системы CRISPR/Cas применяются для изучения и разработки терапевтических подходов для лечения генетических [231, 232], инфекционных, онкологических [233] и иммунологических заболеваний [234–236].

Направленное редактирование генома с использованием систем CRISPR/Cas применяется в качестве противовирусной терапии для лечения инфекционных заболеваний. Терапевтический эффект достигается либо за счет изменения генов организма-хозяина, важных для жизненного цикла вируса, либо путем нацеливания на вирусные гены, необходимые для репликации [237]. На сегодняшний день одним из подходов к терапии ВИЧ на основе технологии направленного редактирования генома является модификация генов, связанных с инфекцией (в первую очередь, с проникновением ВИЧ в Т-клетки), для создания устойчивых к ВИЧ CD4<sup>+</sup>-Т-клеток и последующей реинфузии отредактированных клеток пациентам.

Для проникновения в клетки организма-хозяина ВИЧ-1 необходимо одновременно связаться с молекулой CD4 и ко-рецепторами CCR5 (C-C chemokine receptor type 5, хемокиновый C-C-рецептор 5-го типа) или CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4, хемокиновый C-X-C-рецептор 4-го типа). Следовательно,



тропизм ВИЧ во многом обусловлен паттернами экспрессии этих двух ко-рецепторов [238]. Существуют два типа штаммов ВИЧ: ВИЧ, тропные к Т-клеткам, и ВИЧ, тропные к макрофагальным клеткам (макрофагам). ВИЧ, тропный к макрофагальным клеткам, использует в качестве ко-рецептора хемокиновый рецептор CCR5 при инфекции макрофагов и первичных Т-клеток и составляет до 90% первичных инфекций. ВИЧ, тропный к Т-клеткам, использует в качестве ко-рецептора CXCR4 [239–240]. Однако важно отметить, что существуют вирусы двойной тропности [238].

Система CRISPR/Cas9 была использована для индукции сайт-специфической модификации генома клеток человека *in vitro* и *in vivo* на мышиных моделях ВИЧ-инфекции [241–245]. Многочисленные группы ученых успешно проводили нокаут рецептора CCR5 CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, используя CRISPR/Cas9, нацеленный на открытые рамки трансляции гена, кодирующего CCR5. Данный подход приводил к ингибированию ВИЧ-1-инфекции без значительных побочных эффектов [244]. Редактирование CCR5 как в популяции гемопоэтических стволовых клеток, так и в популяции CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов является перспективной стратегией для создания устойчивых к ВИЧ клеток и последующей реинфузии отредактированных клеток пациентам.

Тем не менее такой подход неэффективен в отношении CXCR4-тропных штаммов ВИЧ. Было показано, что с помощью CRISPR/Cas9 можно с высокой точностью и эффективностью проводить редактирование гена, кодирующего CXCR4. Нокаут ко-рецептора ВИЧ CXCR4 сопровождается незначительными нецелевыми эффектами и обеспечивает устойчивость к ВИЧ-инфекции, вызванной CXCR4-тропными штаммами ВИЧ [242, 246–248]. Такой подход может быть использован для создания экспериментальных и терапевтических первичных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток человека, обеспечивая альтернативный способ лечения ВИЧ-1 X4-инфекции. В то же время одновременный нокаут обоих ко-рецепторов ВИЧ — CCR5 и CXCR4 — приводит к снижению экспрессии CCR5 и CXCR4, что делает модифицированные клетки устойчивыми к инфекции R5- и X4-тропными вирусами, даже при использовании вирусов двойной тропности [242].

### 3.5.7. Борьба с персистирующими вирусными инфекциями

После острой фазы инфекции многие вирусные патогены продолжают персистировать в организме человека, интегрируя свой геном в хромосомную ДНК или поддерживая ее эписомальную форму в клетках организма-хозяина. Вирусные патогены, которые вызывают персистирующую инфекцию, включают ВИЧ, вирусы гепатита, герпесвирусы, папилломавирусы и др. В последние годы технология CRISPR успешно использовалась для уменьшения или устранения постоянных вирусных инфекций *in vitro* и на животных моделях *in vivo*, что дает надежду на возможность ее применения для лечения латентных и хронических вирусных инфекций [249].

После острой ВИЧ-инфекции провирусная ДНК интегрируется в геном клеток организма-хозяина, что приводит к хронической инфекции, несмотря

на применяемую антиретровирусную терапию. Системы CRISPR/Cas были использованы для борьбы с ВИЧ-инфекцией *in vitro* на различных клеточных линиях. При этом удалось не только достичь подавления экспрессии генов ВИЧ в инфицированных Т-клетках и клетках микроглии, но и удалить провирусную ДНК ВИЧ из множества других клеточных линий, в том числе из нейрональных клеток-предшественников, которые представляют собой латентные резервуары ВИЧ-инфекции [250–252].

Системы CRISPR/Cas также показали свою эффективность при борьбе с ВИЧ-инфекцией *in vivo*. Так, провирусная ДНК ВИЧ была элиминирована из селезенки, легких, сердца, толстой кишки и головного мозга животных в гуманизированной модели хронической ВИЧ-инфекции [252]. Кроме этого, с помощью системы CRISPR/Cas провирусная ДНК ВИЧ была удалена из инфицированных мононуклеарных клеток периферической крови человека на модели трансгенных мышей [253].

На сегодняшний день во всем мире более 250 млн человек инфицированы вирусом гепатита В (HBV), и около 900 тыс. человек ежегодно погибают от этой инфекции [254]. Присутствие ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (сccDNA) HBV наряду с интегрированной в геном хозяина формой ДНК создает риск вирусной реактивации и может привести к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. Нуклеозидные/нуклеотидные аналоги сами по себе имеют небольшую способность или вообще не способны устранять репликативные формы HBV, состоящие из сccDNA или интегрированной ДНК HBV. В 2017 г. система CRISPR/Cas9 была использована для удаления полноразмерного фрагмента ДНК HBV, который был хромосомально интегрирован и эписомально локализован в виде сccDNA в хронически инфицированных клетках. Данный подход позволил полностью уничтожить HBV в стабильной инфицированной клеточной линии *in vitro*. Это позволяет предположить, что система CRISPR/Cas9 является потенциально мощным инструментом для уничтожения хронической инфекции HBV и полного излечения от HBV [255, 256].

Кроме того, система CRISPR/Cas была успешно использована для борьбы с инфекциями, вызванными герпесвирусами, *in vitro*. Одновременное использование нескольких направляющих РНК позволяло существенно уменьшить репликацию вируса простого герпеса 1 в клетках [257, 258]. Применяя CRISPR/Cas, можно элиминировать до 95% ДНК вируса Эпштейна–Барр и цитомегаловируса на протяжении 11 дней, после чего появляются мутантные формы вируса, устойчивые к действию CRISPR/Cas [257]. Эффективность систем CRISPR/Cas была также показана для элиминации других вирусных патогенов *in vitro*, таких как вирус Джона Каннингема и папилломавирус человека-16 и -18 [259, 260].

### 3.5.8. Разработка терапевтических подходов для лечения моногенных заболеваний

Моногенные заболевания возникают из-за дефекта в одном гене и наследуются по традиционным менделевским законам [261]. Эти расстройства

затрагивают миллионы людей, в эту категорию попадают более 10 тыс. заболеваний человека. Моногенные заболевания в основном классифицируются как доминантные, рецессивные и X-сцепленные [261]. Лечение большинства из этих заболеваний по-прежнему заключается в управлении симптомами без устранения самого генетического дефекта. Появление инструментов редактирования генома, таких как система CRISPR/Cas, открывает перспективы разработки терапевтических стратегий для лечения моногенных заболеваний (табл. 3.7) [262].

### 3.5.9. Разработка терапевтических подходов для лечения рака

Рак поражает миллионы людей во всем мире, и исследователи десятилетиями работают над поиском эффективных методов лечения. Новые лекарства, химио- и лучевая терапия использовались на протяжении многих лет для лечения пациентов, но ни один из предложенных подходов не лишен побочных эффектов. Внедрение революционного инструмента для редактирования генома CRISPR/Cas открыло новые перспективы для разработки препаратов для терапии рака. CRISPR/Cas обладает огромным потенциалом для разработки новых методов генной и клеточной терапии злокачественных новообразований (табл. 3.8).

## 3.6. Клинические испытания

На сегодняшний день в мире проводится около 30 клинических испытаний кандидатных терапевтических препаратов, для создания которых использованы CRISPR/Cas-нуклеазы. Эффективность CRISPR/Cas исследуют в борьбе с гематологическими и солидными новообразованиями, такими как острый лимфобластный лейкоз, неходжкинская лимфома, лимфобластная лимфома, рак пищевода, инвазивный рак мочевого пузыря, гормонорезистентный рак простаты, немелкоклеточный рак легких, а также в борьбе с наследственными заболеваниями, такими как серповидноклеточная анемия, талассемия, синдромы Кабуки и Рубинштейна–Тейби. И наконец, на июнь 2020 г. активны два клинических исследования CRISPR/Cas, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями, такими как ВИЧ и вирус папилломы человека (табл. 3.9).

Нет никаких сомнений, что клинических исследований лекарственных препаратов, созданных с применением CRISPR/Cas, с каждым годом будет становиться все больше и больше, т.к. множество кандидатных терапевтических препаратов проходят доклинические испытания по показаниям: инфекционные заболевания, орфанные заболевания, онкологические заболевания.

## 3.7. Системы доставки CRISPR/Cas

Эффективная доставка элементов системы редактирования генома CRISPR/Cas к модифицируемым клеткам имеет решающее значение для применения инструментов CRISPR/Cas в терапии [310].

**Таблица 3.7.** Терапевтические подходы на основе системы CRISPR/Cas для лечения моногенных заболеваний человека

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
Муковисцидоз			
1	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>CFTR</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>Успешное редактирование мутации DeltaF508 гена <i>CFTR</i> в легкодоступных базальных стволовых клетках верхних дыхательных путей, полученных от пациентов с муковисцидозом. Достигнуто 30–50% аллельной коррекции в стволовых клетках и эпителиальных клетках бронхов у 10 пациентов (функция <i>CFTR</i> восстановлена до уровня 20–50% относительно контроля без муковисцидоза в дифференцированном эпителии). Модифицированные клетки сохранили способность к дифференцировке, что показано на животной модели <i>in vivo</i> (свинья)</p>	[263]
2	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>CFTR</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: плазмидная ДНК</p>	<p>CRISPR/Cas9 с помощью гомологичной рекомбинации успешно корректирует мутантный аллель F508del в стволовых клетках кишечника, полученных от двух пациентов с муковисцидозом. Функциональность исправленного аллеля показана в органоидной системе</p>	[264]
3	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>CFTR</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: плазмидная ДНК</p>	<p>Делеция F508 в гене <i>CFTR</i> исправлена с использованием CRISPR в ИПСК от пациентов с муковисцидозом.</p> <p>Показано, что модифицированные ИПСК не теряли способность дифференцироваться в зрелые эпителиальные клетки дыхательных путей, при этом <i>CFTR</i> нормально экспрессировался и функционировал</p>	[265]
Серповидноклеточная анемия			
4	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>HBB</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: рибонуклеопротеиновый комплекс</p>	<p>Показано что HiFi Cas9 обеспечивает высокоэффективную коррекцию (гомологичная рекомбинация) мутации Glu6Val гена <i>HBB</i>, вызывающей серповидноклеточную анемию, в CD34<sup>+</sup>-клетках, полученных от пациентов с серповидноклеточной анемией</p>	[266]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 96.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
5	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 (hGemCas9), направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>HBB</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: мРНК</p>	<p>Модифицированная версия Cas9 (hGemCas9), обладающая пониженной нуклеазной активностью в G1-фазе клеточного цикла, и синхронизация мобилизованных стволовых клеток периферической крови в фазах S/G2 привели к 4-кратному увеличению частоты гомологичной рекомбинации <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i></p>	[267]
6	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>HBB</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: нет информации</p>	<p>Новая технология редактирования в плюрипотентных клетках человека с использованием белка Cas9 в комплексе с химически модифицированными направляющими РНК и рекомбинантными векторами AAV6 для доставки донорных матриц для гомологичной рекомбинации позволяет проводить интеграцию целевой экспрессионной кассеты ДНК размером 2,2 тыс. п.н. с эффективностью до 94% в локусе <i>HBB</i>. Разработанная технология позволяет отредактировать 63% ИПСК, полученных от пациентов, страдающих серповидноклеточной анемией</p>	[268]
Талассемия			
7	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности HbE мутации.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: плазмидная ДНК</p>	<p>Мутация в гене бета-глобина (<i>HBB</i>) в ИПСК, полученных от пациентов с HbE/<math>\beta</math>-талассемией, была скорректирована системой CRISPR/Cas9. Модифицированные клоны были дифференцированы в эритроидные клетки, которые содержали корректный ген <i>HBB</i> и экспрессировали функциональный белок HbE</p>	[269]
8	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности <i>HBB</i><sup>IVS-110(G&gt;A)</sup> мутации.</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов.</p> <p>Доставка: рибонуклеопротеиновый комплекс</p>	<p>CRISPR/Cas9 с эффективностью 95% приводит к удалению мутации <i>HBB</i><sup>IVS-110(G&gt;A)</sup> в CD34<sup>+</sup>-<i>HBB</i><sup>IVS-110(G&gt;A)</sup>-гомозиготных эритроблестах, полученных от пациентов</p>	[270]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 97.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
9	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности <i>HBB CD41/42(-CTTT)</i> мутации.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: лентивирусный вектор</p>	<p>CRISPR/Cas9-ssODN успешно корректируют мутацию CD41/42 (-CTTT) гена <math>\beta</math>-глобина (<i>HBB</i>) в ИПСК, полученных от пациентов с <math>\beta</math>-талассемией. Модифицированные клоны сохраняют полную плюрипотентность и обладают нормальным кариотипом. Эритроциты дифференцированные из модифицированных ИПСК, экспрессируют <i>HBB</i></p>	[271]
Болезнь Хантингтона			
10	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности мутантного хантингтина (mHTT).</p> <p>Механизм: нокдаун.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>Разработана стратегия аллель-специфического редактирования последовательности mHTT, основанную на технологии CRISPR/Cas9, которая использует преимущества высокораспространенных SNP в локусе HTT для направления мутантного аллель-специфического расщепления и показывает его эффективность в снижении экспрессии мутантного белка в фибробластах HD человека, страдающего болезнью Хантингтона, <i>in vitro</i> и в головном мозге мышей <i>in vivo</i></p>	[272]
11	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности мутантного хантингтина (mHTT).</p> <p>Механизм: нокдаун.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>Снижение экспрессии mHTT в полосатых нейрональных клетках у взрослых мышей (специализированная модель болезни Хантингтона) не влияло на жизнеспособность, но уменьшало моторный дефицит. Исследования показали, что аллель-неспецифическое редактирование, опосредованное CRISPR/Cas9, можно использовать для эффективного устранения нейрональной токсичности, опосредованной наличием полиглутаминового тракта, в мозге взрослого человека</p>	[273]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 98.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
12	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 KamiCas9 (самоактивирующаяся система редактирования для достижения кратковременной экспрессии белка Cas9 и высокой эффективности редактирования), направляющая РНК sgHTT1, нацеленная на область, близкую к месту начала трансляции гена <i>HTT</i> человека, с целью постоянной блокировки экспрессии <i>HTT</i>.</p> <p>Механизм: нокаут.</p> <p>Доставка: лентивирусный вектор</p>	<p>KamiCas9 обладает высокой эффективностью при редактировании геномов нейрональных и глиальных клеток головного мозга мыши и в культурах ИПСК, полученных от пациентов с болезнью Хантингтона. Молекулярный анализ продемонстрировал улучшенный профиль безопасности KamiCas9, который необходим в контексте применения в ЦНС и, в частности, медленно прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Хантингтона</p>	[274]
13	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 из <i>Staphylococcus aureus</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности мутантного хантингтина (mHTT).</p> <p>Механизм: нокаут.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>Нуклеаза Cas9 из <i>Staphylococcus aureus</i>, упакованная вместе с одной направляющей РНК в аденоассоциированный вектор, может быть использована для нарушения экспрессии мутантного гена <i>HTT</i> в мышиной модели болезни Хантингтона после ее доставки <i>in vivo</i> в стриатум. Обнаружено, что CRISPR/Cas9-опосредованное разрушение mHTT приводит к 50% уменьшению количества включений в нейронах и значительно увеличивает продолжительность жизни и улучшает некоторые двигательные функции</p>	[275]
Мышечная дистрофия Дюшенна			
14	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 из <i>Staphylococcus aureus</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности интронов 22 и 23 (для удаления экзона 23 из гена <i>Dmd</i> в мышиной MDX модели МДД).</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>AAV-CRISPR/Cas9 успешно удаляет мутированный экзон 23 из гена дистрофина. Удаление экзона 23 приводит к экспрессии модифицированного гена дистрофина, частичному восстановлению функций белка дистрофина в скелетных миофибрилах и сердечной мышце, улучшению биохимии мышц и значительному увеличению мышечной силы модельных животных</p>	[276]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 99.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
15	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 из <i>Staphylococcus aureus</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности интронов 22 и 23 (для удаления экзона 23 из гена <i>Dmd</i> в мышинной MDX модели МДД).</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	AAV-CRISPR восстанавливает экспрессию дистрофина в мышинной модели миодистрофии Дюшенна, которая продолжается в течение длительного периода (1 год). AAV-CRISPR не вызывает в течение одного года признаков токсичности в мышинной модели	[277]
16	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 из <i>Streptococcus pyogenes</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательностям сплайсинговых акцепторных или донорных сайтов экзона 43 и 45 гена <i>Dmd</i> в мышинной модели МДД.</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	Разработана простая и эффективная стратегия коррекции делеционных мутаций экзона 44 путем редактирования гена с помощью CRISPR/Cas9 в кардиомиоцитах, полученных из ИПСК пациентов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	[278]
17	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 из <i>Streptococcus pyogenes</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>Dmd</i>.</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов, гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	AAV-CRISPR/Cas9 редактирует ген <i>Dmd</i> в мышинной mdx4cv модели. Обработанные мышцы демонстрируют устойчивую экспрессию дистрофина после локальной и системной доставки, что приводит к значительному морфометрическому и патофизиологическому улучшению дистрофического фенотипа. AAV-CRISPR/Cas9 индуцирует коррекцию гена <i>Dmd in vivo</i> путем гомологичной рекомбинации	[279]
18	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 из <i>Streptococcus pyogenes</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>Dmd</i> (акцепторный сайт сплайсинга экзона 51).</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	AAV-CRISPR/Cas9 восстанавливает экспрессию дистрофина у собак через 6 недель после внутримышечной доставки или через 8 недель после системной доставки. После системной доставки в скелетных мышцах дистрофин восстанавливался до уровней в пределах от 3 до 90% от нормы, в зависимости от типа мышц. В сердечной мышце уровни дистрофина у собаки, получавшей самую высокую дозу, достигли 92% от нормы	[280]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 100.



№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
19	<p>Действующее начало: CRISPR/Cpf1 из <i>Lachnospiraceae bacterium u Acidaminococcus</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>Dmd</i>.</p> <p>Механизм: негомологичное соединение концов, гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>Cpf1 эффективно корректирует мутации, опосредующие МДД, <i>in vitro</i> в клетках человека и <i>in vivo</i> в мышинной модели</p>	[281]
Гемофилия			
20	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена <i>ROSA26</i>, кодирующего фактор свертываемости <i>FIX</i>.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация</p> <p>Доставка: аденовирусный вектор</p>	<p>Аденовирусная доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 и матриц для гомологичной рекомбинации обеспечивает корректное восстановление гена, кодирующего FIX, что приводит к долговременному увеличению активности FIX и фенотипической коррекции в мышинной модели ювенильной гемофилии</p>	[282]
21	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности гена, кодирующего фактор свертываемости <i>FVIII</i> (экзон 14).</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: плазмидная ДНК</p>	<p>CRISPR/Cas9-ssODN эффективно корректирует ген, кодирующий <i>FVIII</i>, в ИПСК, полученных от пациентов с гемофилией (HA-iPSCs). Экспрессия и активность <i>FVIII</i> восстанавливались <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> в эндотелиальных клетках-предшественниках, полученных из модифицированных HA-iPSC</p>	[283]
22	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности локуса интеграции аденоассоциированного вируса (AAVS1).</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: плазмидная ДНК</p>	<p>Кодирующую последовательность F9 человека интегрировали в локус AAVS1 ИПСК, полученных от пациента с гемофилией В, с использованием системы CRISPR/Cas9. Гепатоциты, полученные при дифференцировке модифицированных ИПСК, стабильно экспрессировали F9, в том числе после имплантации животным <i>in vivo</i></p>	[284]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 101.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
23	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9 <i>Staphylococcus aureus</i>, направляющая РНК, специфичная к последовательности интрона 13 локус специфического для печени альбумина (Alb).</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: аденоассоциированный вектор</p>	<p>Разработана технология редактирования генома с использованием двух векторов AAV, кодирующих <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9, направляющую РНК (SaCas9-gRNA) и кодон-оптимизированный ген, кодирующий FVIII человека с делецией В-домена человека (BDD-F8). BDD-F8 сайт-специфическим образом интегрируется в локус специфического для печени альбумина (Alb), что приводит к выработке FVIII в печени. В модели мышей, нокаутированных по FVIII (F8KO, модель гемофилии А), редактирование приводило к повышению уровня белка FVIII, активность которого сохранялась в печени в течение 7 мес, без заметной токсичности для печени</p>	[285]
Сахарный диабет			
24	<p>Действующее начало: dCas9/sgFabp4.</p> <p>Механизм: CRISPRi.</p> <p>Доставка: адипоцит-специфичный пептид SKGGRAKDC и полиаргинин (9 остатков) — ATS-9R</p>	<p>Целевая доставка системы CRISPRi против Fabp4 в белые адипоциты с помощью ATS-9R приводила к эффективному нокауту Fabp4, что приводило к снижению массы тела, уменьшению воспаления и восстановлению печени при стеатозе печени у мышей с ожирением. Применение системы CRISPRi против Fabp4 облегчало ожирение и диабет 2 типа, вызванный ожирением, путем подавления экспрессии Fabp4</p>	[286]
25	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9+ssODN.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: нет информации.</p>	<p>β-Клетки поджелудочной железы, полученные из ИПСК, модифицированные с помощью CRISPR/Cas9 для коррекции патологии, вызывающей диабет при синдроме Вольфрама 1-го типа (WFS1), секретировали инсулин <i>in vitro</i> в ответ на глюкозу и останавливали развитие стрептозоцин-индуцированного диабета после трансплантации мышам</p>	[287]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 101.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
26	Действующее начало: CRISPR/Cas9/sgDPP-4. Механизм: нокаут. Доставка: наночастицы	Доставка рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9/sgDPP-4, специфичных к гену дипептидилпептидазы-4, модулирует функцию глюкагоноподобного пептида 1. При инъекции комплексов в составе наночастиц модельным мышам с инсулинозависимым диабетом 2-го типа происходит снижение уровня глюкозы в крови, нормализация реакции на инсулин и уменьшение повреждений печени и почек	[288]
27	Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющие РНК, специфичные к последовательностям, кодирующим пептидилглицин-альфа-амидирующую монооксигеназу (PAM), инсулин (INS) и фермент, разлагающий инсулин (IDE). Доставка: лентивирусный вектор	Успешное создание нокаутных линий $\beta$ -клеток поджелудочной железы EndoC- $\beta$ H1 демонстрирует возможность редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 в таких типах клеток и открывает дополнительные возможности для использования CRISPR-интерференции (CRISPRi), CRISPR-активации (CRISPRa), систем геномного скрининга CRISPR, систем модификации эпигенома и система редактирования азотистых оснований CRISPR	[289]
Сердечно-сосудистые заболевания			
28	Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющие РНК, специфичные к последовательностям, кодирующим TNNI3K (TNNI3 взаимодействующая киназа). Механизм: нокаут. Доставка: плазмидная ДНК	Избыточную и/или нормальную экспрессию TNNI3K связывают с восприимчивостью к дилатационной кардиомиопатии. Предполагается, что нокаутирование TNNI3K может предотвратить возникновение дилатации желудочков, что будет клинически выгодно для пациентов, страдающих заболеванием	[290]
29	Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющие РНК, специфичные к последовательностям, кодирующим рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR). Механизм: гомологичная рекомбинация. Доставка: аденоассоциированный вектор	AAV-CRISPR/Cas9 обеспечивает коррекцию гена <i>Ldlr in vivo</i> и обеспечивает частичное восстановление экспрессии LDLR, что приводит к уменьшению проявлений атеросклероза у модельных животных. AAV-CRISPR/Cas9 может быть эффективным терапевтическим подходом для лечения пациентов с семейной гиперхолестеринемией	[291]

Продолжение табл. 3.7 см. на стр. 103.

№ п/п	Воздействие	Результат	Источник
30	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности локуса интеграции аденоассоциированного вируса (AAVS1).</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: плазмидная ДНК</p>	<p>С помощью CRISPR/Cas9 успешно восстанавливается экспрессия <i>LDLR</i> дикого типа (нормальный фенотип) в модели ИПСК. Полученные модельные клетки могут быть использованы для изучения регуляции метаболизма холестерина. Показано, что <i>LDLR</i> играет роль на поздних стадиях цикла инфекции HCV — в сборке или секреции вирусного потомства. <i>LDLR</i><sup>-</sup>-ИПСК могут быть использованы в качестве платформы для скрининга лекарств для лечения дислипидемии и инфекции, вызванной HCV</p>	[292]
31	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, направляющая РНК, специфичная к последовательности, кодирующей пропротеиновую конвертазу субтилизин-кексинового типа 9 (<i>Pcsk9</i>).</p> <p>Механизм: нокаут.</p> <p>Доставка: аденовирусный вектор</p>	<p>Показана эффективность и безопасность применения системы CRISPR/Cas9, нацеленной на человеческий ген <i>Pcsk9</i> в гепатоцитах человека <i>in vivo</i> (химерные мыши с гуманизированной печенью)</p>	[293]

Как правило, используются три стратегии доставки элементов системы CRISPR/Cas — *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, и различные методы, такие как физические методы, доставка с использованием вирусных и невирусных векторов и т.д. Физические методы доставки подразумевают кратковременное разрушение мембраны модифицируемой клетки и включают в себя электропорацию, сонопорацию, наноинъекцию, микроинъекцию и гидродинамическую инъекцию [311]. Вирусные векторы — самый ранний молекулярный инструмент для переноса генов в клетки человека, подразумевает перенос нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты системы CRISPR/Cas, в модифицируемые клетки в оболочке вируса, например, аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, лентивируса, вируса Эпштейна–Барр, вируса простого герпеса и бактериофагов [312, 313]. Кроме того, недавно были рассмотрены альтернативные (невирусные) методы доставки CRISPR/Cas, в частности, с помощью липидных наночастиц, полимерных наночастиц и наночастиц гидрогеля, гибридных наноматериалов на основе золота, оксида графена, металлоорганических каркасов, нанослоев черного фосфора и т.д. [314].

Элементы системы CRISPR/Cas в живую клетку можно доставлять в виде комплекса плазмидных ДНК, кодирующих Cas-белок и направляющую РНК,

**Таблица 3.8.** Терапевтические подходы на основе CRISPR/Cas для лечения онкологических заболеваний человека

№ п/п	Воздействие	Результат	Ссылка
1	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, соответствующие направляющие РНК.</p> <p>Механизм: молекулы TCR, B2M и PD-1 удалялись одновременно для усиления противоопухолевой активности. Другие гены, такие как <i>CTLA-4</i>, <i>LAG-3</i>, <i>TIM-3</i> и <i>Fas</i>, также разрушались вместе с TCR и B2M.</p> <p>Доставка: различными способами</p>	Создание CAR-T клеток — Т-клеток с химерным рецептором антигена, обладающих высокой противоопухолей активностью, в том числе «универсальных» CAR-T — аллогенных Т-клеток, на которых устранены эндогенные TCR и HLA	[294–304]
2	<p>Действующее начало: CRISPR/Cas9, соответствующие направляющие РНК.</p> <p>Механизм: гомологичная рекомбинация.</p> <p>Доставка: различными способами</p>	CAR-T клетки, в которые CAR или TCR-кассета введена в эндогенный локус гена <i>TCR</i> , чтобы смягчить реакцию «трансплантат против хозяина», что делает невозможной случайную интеграцию кассет и обеспечивает равномерную экспрессию CAR (химерного антигенного рецептора)	[305–309]

или в виде смеси мРНК, кодирующей Cas-белок, и направляющей РНК. Третий вариант доставки системы CRISPR/Cas предполагает введение в клетку готового белкового комплекса, представляющего собой смесь Cas-белка и направляющей РНК (табл. 3.10). Доставка системы CRISPR/Cas в виде готового белкового комплекса имеет ряд преимуществ, среди которых высокая эффективность редактирования; низкая неспецифическая активность; редактирование сразу после доставки в клетку; возможность быстрого скрининга эффективности направляющих РНК в пробирке; сниженная иммуногенность ввиду непродолжительного времени пребывания элементов системы CRISPR/Cas в клетке-мишени. Именно поэтому наиболее перспективным направлением в редактировании генома с использованием систем CRISPR/Cas является работа с готовыми белковыми комплексами.

### 3.8. Диагностика инфекционных заболеваний

Для решения эпидемиологических задач по расшифровке вспышек инфекционных болезней, выявления и идентификации возбудителя, а также детекции специфических бактериальных генов необходимы разработка

**Таблица 3.9.** Клинические испытания кандидатных терапевтических препаратов, для создания которых использованы CRISPR/CAS-нуклеазы

№ п/п	Наименование исследования	Идентификатор портала ClinicalTrials.gov	Объект терапии	Дата начала/одобрения	Страна проведения испытания
<b>Онкология</b>					
1	Испытание T-клеток, нокаутированных по рецептору PD-1, для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого (фаза I с эскалацией дозы)	NCT02793856	Метастатический немелкоклеточный рак легких	Август 2016 г.	Китай
2	Исследование безопасности и эффективности CRISPR/Cas9 в лечении ВПЧ-связанной цервикальной интраэпителиальной неоплазии (фаза I)	NCT03057912	Цервикальная интраэпителиальная неоплазия	Июль 2017 г.	Китай
3	Испытание T-клеток, нокаутированных по рецептору PD-1, для лечения рака пищевода (фаза II)	NCT03081715	Рак пищевода	Март 2017 г.	Китай
4	Испытание T-клеток, нокаутированных по рецептору PD-1, для лечения рака мочевого пузыря, метастазирующего в мышцы (фаза I с эскалацией дозы)	NCT02863913	Рак мочевого пузыря, метастазирующих в мышцы	Сентябрь 2016 г.	Китай
5	Испытание T-клеток, нокаутированных по рецептору PD-1, для лечения рака простаты (фаза I с эскалацией дозы)	NCT02867345	Рак простаты	Ноябрь 2016 г.	Китай
6	Испытание T-клеток, нокаутированных по рецептору PD-1, для лечения метастатической почечно-клеточной карциномы (фаза I с эскалацией дозы)	NCT02867332	Метастатическая почечно-клеточная карцинома	Ноябрь 2016 г.	Китай
7	Изучение безопасности и целесообразности аллотрансплантации гематопозитических стволовых клеток CD34+ (клеток-предшественников), модифицированных с помощью CRISPR/Cas9 (нокаут рецептора CCR5) ВИЧ-инфицированным пациентам с гематологическими новообразованиями	NCT03164135	Гематологические новообразования	Май 2017 г.	Китай

Продолжение табл. 3.9 см. на стр. 106.

№ п/п	Наименование исследования	Идентификатор портала ClinicalTrials.gov	Объект терапии	Дата начала/одобрения	Страна проведения испытания
8	Исследование безопасности, переносимости, биологической активности и эффективности универсальных клеток CAR-T (Т-клетки с химерным рецептором антигена), нацеленных на CD19 (UCART019), полученных с помощью CRISPR/Cas9, у пациентов с рецидивирующим или резистентным CD19+ лейкозом и лимфомой (фаза I/II)	NCT03166878	Лейкоз и лимфома	Май 2017 г.	Китай
9	Оценка эффективности лечения с помощью CAR-T (Т-клетки с химерным рецептором антигена), нокаутированных с помощью CRISPR/Cas9 по рецептору PD-1 и Т-клеточному рецептору, у пациентов с мезотелин-положительными множественными солидными опухолями (фаза I)	NCT03545815	Солидные опухоли	Март 2018 г.	Китай
10	Изучение лечения с помощью CAR-T (Т-клетки с химерным рецептором антигена), направленных против мезотелина, нокаутированных с помощью CRISPR/Cas9 по рецептору PD-1, с режимом кондиционирования паклитакселом и циклофосфамидом у пациентов с мезотелин-положительными множественными солидными опухолями (фаза I)	NCT03747965	Солидные опухоли	Ноябрь 2018 г.	Китай
11	Исследование безопасности CAR-T (Т-клетки с химерным рецептором антигена), направленных против CD19, нокаутированных с помощью CRISPR/Cas9 по рецептору НРК1, для лечения рецидивирующих или рефрактерных гемопозитических злокачественных новообразований (фаза I)	Нет информации	Гемопозитические злокачественные новообразования CD19-положительные	Август 2019 г.	Китай

Продолжение табл. 3.9 см. на стр. 107.

№ п/п	Наименование исследования	Идентификатор портала ClinicalTrials.gov	Объект терапии	Дата начала/одобрения	Страна проведения испытания
12	Испытания цитотоксических Т-клеток, направленных против EBV, нокаутированных с помощью CRISPR/Cas9 по рецептору PD-1, для лечения злокачественных новообразований, связанных с EBV, на поздней стадии (фаза I/II)	NCT03044743	IV стадия рака желудка, IV стадия рака носоглотки, IV стадия Т-клеточной лимфомы, IV стадия лимфомы Ходжкина у взрослых, IV стадия диффузной В-крупноклеточной лимфомы	Март 2017 г.	Китай
13	Исследование безопасности и эффективности аллогенных Т-клеток CTX120, направленных против BCMA (модифицированных с помощью CRISPR/Cas9), у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (фаза I с эскалацией дозы и когортным расширением)	NCT04244656	Множественная миелома	Январь 2020 г.	Много-центровое: США, Австралия, Испания
14	Исследование безопасности и эффективности аллогенных Т-клеток CTX130, модифицированных с помощью CRISPR/Cas9, у пациентов с прогрессирующим, рецидивирующим или рефрактерным почечно-клеточным раком с четкой дифференцировкой клеток (фаза I с эскалацией дозы и когортным расширением)	NCT04438083	Почечно-клеточный рак	Июнь 2020 г.	Австралия
15	Исследование безопасности и эффективности аллогенных Т-клеток CTX110, модифицированных с помощью CRISPR/Cas9, у субъектов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями (фаза I/II с эскалацией дозы и когортным расширением)	NCT04035434	В-клеточные новообразования, неходжкинская лимфома, В-клеточная лимфома	Июль 2019 г.	Много-центровое: США, Австралия, Германия

Продолжение табл. 3.9 см. на стр. 108.



№ п/п	Наименование исследования	Идентификатор портала ClinicalTrials.gov	Объект терапии	Дата начала/одобрения	Страна проведения испытания
16	Исследование целесообразности и безопасности универсальной иммунотерапии CAR-T, направленной против CD19 и CD20 или CD22 с двойной специфичностью при рецидивирующей или рефрактерной лейкоемии и лимфоме (фаза I/II)	NCT03398967	В-клеточная лейкоемия, В-клеточная лимфома	Январь 2018 г.	Китай
17	Клеточная терапия Т-клеточных злокачественных новообразований с высоким риском с использованием аутологичных CAR-T, направленных против CD7, нокаутированных по рецептору CD7 с помощью CRISPR/Cas9 (CRIMSON)	NCT03690011	Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, Т-клеточная острая лимфобластная лимфома, Т-неходжкинская лимфома	Октябрь 2018 г.	США
18	Оценка безопасности и эффективности транскатетерной артериальной химиоэмболизации в комбинации с аутологичными Т-клетками, нокаутированными по рецептору PD-1, при черепножонной инфузии у пациентов с прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномой (фаза I)	NCT04417764	Гепатоцеллюлярная карцинома	Июнь 2020 г.	Китай
19	Исследование безопасности и эффективности модифицированных инфилтрирующих опухоли лимфоцитов, нокаутированных с помощью CRISPR/Cas9 по гену, кодирующему цитокининдуцированный белок SH2, для лечения пациентов с раком желудочно-кишечного тракта (фаза I/II)		Рак желудочно-кишечного тракта	Май 2020 г.	США

Продолжение табл. 3.9 см. на стр. 109.

№ п/п	Наименование исследования	Идентификатор портала ClinicalTrials.gov	Объект терапии	Дата начала/одобрения	Страна проведения испытания
<b>Моногенные заболевания</b>					
20	Исследование безопасности и эффективности однократного введения аутологичных модифицированных с помощью CRISPR/Cas9 CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и клеточ-предшественников человека у субъектов с трансфузионно-зависимой $\beta$ -талассемией (фаза I/II)	NCT03655678	$\beta$ -Талассемия	Сентябрь 2018 г.	Много-центровое: Великобритания, Германия
21	Исследование безопасности и эффективности однократного введения аутологичных модифицированных с помощью CRISPR/Cas9 CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и клеточ-предшественников человека (CTX001) у пациентов с тяжелой серповидно-клеточной анемией	NCT03745287	Серповидно-клеточная анемия	Октябрь 2018 г.	Много-центровое: Германия, Италия, Великобритания, Франция, Бельгия
22	Исследование безопасности, переносимости и эффективности препарата AGN-151587 (EDP-101) у взрослых и детей с врожденным амаврозом Лебера типа 10 (LCA10), с центросомным белком 290 (SER290), связанным дегенерацией сетчатки, вызванной гетеро- или гомозиготной мутацией (фаза I/II)	NCT03872479	Слепота, врожденный амавроз Лебера 10 типа, нарушения зрения, глазные болезни, наследственные нарушения зрения, заболевания сетчатки, дегенерация сетчатки	Сентябрь 2019 г.	США

Окончание табл. 3.9 см. на стр. 110.

№ п/п	Наименование исследования	Идентификатор портала ClinicalTrials.gov	Объект терапии	Дата начала/одобрения	Страна проведения испытания
23	Наименование исследования Диагностика синдрома Рубинштейна–Тейби: идентификация профилей ацетилирования как эпигенетических маркеров для оценки значимости вариантов CREBBP (GENEPI), в том числе транскриптомный анализ с использованием RNA-Seq изогенных клонов стволовых клеток, полученных путем коррекции мутаций CREBBP у пациентов с синдромом Рубинштейна–Тейби с помощью CRISPR/Cas9	Нет информации	Синдром Рубинштейна–Тейби	Октябрь 2019 г.	Франция
24	Долгосрочное исследование пациентов с $\beta$ -талассемией или серповидно-клеточной анемией, которых лечили аутологичными гематопозитивскими стволовыми клетками, модифицированными CRISPR/Cas9 (CTX001)	NCT04208529	$\beta$ -Талассемия, серповидно-клеточная анемия, гематологические заболевания, гемоглобинопатии, врожденные генетические заболевания	Декабрь 2019 г.	Много-центровое: США, Германия, Италия
25	Исследование безопасности и эффективности коррекции гена <i>HBB</i> с использованием CRISPR/Cas9 в стволовых клетках (iHSC), полученных от пациента, для лечения $\beta$ -талассемии (фаза I)	NCT03728322	$\beta$ -Талассемия	Январь 2019 г.	Не указана
26	Использование редактирования эпигенома для лечения синдрома Кабуки: новый путь к генной терапии редких генетических заболеваний	NCT03855631	Синдром Кабуки	Февраль 2019 г.	Франция

**Таблица 3.10.** Системы доставки CRISPR/Cas

Метод доставки	Элементы системы CRISPR/Cas доставляются в виде		
	ДНК	мРНК	белок
Электропорация	+	+	+
Псевдовирусные частицы	±	±	–
Липофильная трансфекция	+	+	+
Липидные наночастицы	–	+	+
Полимерные наночастицы	–	–	+
Гидрогелевые наночастицы	–	–	+
Золотые наночастицы	–	–	+
Оксид графена	–	–	+
Металлорганические соединения	–	–	+
Нанослой черного фосфора	–	–	+
Пептиды, отвечающие за проникновение в клетку	–	–	+
ДНК наноструктуры	–	–	+

и внедрение в практику работы надзорных и мониторинговых служб современных технологий молекулярной эпидемиологии. Одной из таких технологий является использование элементов генетического редактирования системы CRISPR/Cas. Данная технология развивается достаточно эффективно в отношении создания средств лечения некоторых болезней, несмотря на ряд трудностей, связанных с возникновением непредвиденных мутаций. При углубленных исследованиях в области применения системы CRISPR/Cas было выяснено, что она может быть использована для тонких диагностических процедур при выявлении возбудителя(ей) инфекции у человека, а также их генотипирования.

### 3.8.1. Диагностика с использованием CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 был использован несколькими исследователями, разрабатывающими диагностические наборы для выявления инфекционных заболеваний. Например, К. Парди с коллегами разработали технологию выявления вируса Зика на основе изотермической амплификации NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification — реакция транскрипционной амплификации), комбинированной с системой CRISPR/Cas9, которая позволяла точно дифференцировать близкородственные штаммы вируса по наличию/отсутствию специфичного для штамма PAM [315].

В 2016 г. для прямой идентификации генов устойчивости к антибиотикам была предложена технология, основанная на оптическом картировании последовательностей ДНК отдельных плазмид, несущих гены антибиотикоустойчивости, бактериальных изолятов в наножидкостных каналах. Предложенный анализ позволяет идентифицировать гены антибиотикоустойчивости

с использованием CRISPR/Cas9 и направляющих РНК, специфических к генам антибиотикоустойчивости, таким как *blaCTX-M* группа 1, *blaCTX-M* группа 9, *blaNDM* и *blaKPC*. В ходе анализа рибонуклеопротеиновый комплекс CRISPR/Cas9 линеаризует кольцевые плазмиды в районе гена антибиотикоустойчивости, а полученные линейные молекулы ДНК идентифицируются с помощью оптического картирования ДНК. В перспективе предложенный анализ сможет быть применен к образцам с низкой концентрацией для выявления генов антибиотикоустойчивости [316].

Позже CRISPR/Cas9 был совмещен с FISH (fluorescence *in situ* hybridization, флуоресцентная гибридизация *in situ*) для выявления метициллинустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA). В этом методе используется система dCas9, в которой рибонуклеопротеиновый комплекс в сочетании с флуоресцентным зондом SYBR распознает ген *mecA Staphylococcus aureus*. Предложенный метод позволяет обнаружить MRSA в концентрации 10 КОЕ/мл и может различать изоляты *S. aureus* с геном *mecA* и без него [317].

Кроме перечисленных выше технологий в 2019 г. была анонсирована новая технология, совмещающая применение NGS и возможностей CRISPR/Cas9. Предложенная технология была названа FLASH (Finding Low Abundance Sequences by Hybridization — обнаружение последовательностей низкой представленности путем гибридизации) и позволяет проводить целевое обогащение во время NGS. Технология FLASH использует набор направляющих РНК, предназначенных для расщепления интересующих последовательностей на фрагменты, подходящие по размеру для секвенирования на платформе «Illumina». Исходная геномная ДНК или кДНК на первом этапе блокируется обработкой фосфатазой, а затем расщепляется с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов Cas9, запрограммированных набором направляющих РНК. Полученные продукты расщепления лигируются с универсальными адаптерами для секвенирования. При последующей амплификации целевые последовательности обогащаются относительно фона и подготавливаются для связывания с секвенирующей проточной ячейкой. Этот метод выходит за рамки других диагностических инструментов на основе CRISPR, обеспечивая высокий уровень мультиплексирования, позволяя одновременно анализировать до 1000 мишеней, точности и идентичности последовательностей (что присуще традиционному считыванию NGS). FLASH-NGS была успешно использована для изучения и диагностики лекарственно-устойчивых инфекций для оценки наличия генов устойчивости к противомикробным препаратам у вызывающих пневмонию грамположительных бактерий и лекарственной устойчивости у паразита, вызывающего малярию [318].

### 3.8.2. Диагностика с использованием CRISPR/Cas12 и CRISPR/Cas13

В 2018 г. было показано, что один из ферментов CRISPR системы — Cas12 после распознавания своей целевой ДНК-мишени начинает неспецифически

гидролизовать одноцепочечную ДНК. Такое свойство Cas12 можно использовать в качестве индикатора присутствия определенной мишени, например, генома вируса или бактерии. Исследователи использовали это открытие для создания технологической платформы обнаружения нуклеиновых кислот, известной как DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter — ДНК-нацеленная эндонуклеаза CRISPR трансрепортер). Предложенная платформа объединяет нуклеазу Cas12a, ее направляющую РНК, специфичную к нуклеиновой кислоте, и флуоресцентную репортерную молекулу. Впервые технология DETECTR была использована для выявления и генотипирования вируса папилломы человека. DETECTR в течение 1 ч позволила дифференцировать HPV16 и HPV18 в неочищенных экстрактах ДНК из культивируемых клеток человека и клинических образцов. При этом DETECTR корректно (сопоставимо с результатами ПЦР-анализа) идентифицировала HPV16 в 25 и HPV18 — в 23 из 25 клинических образцов [319].

Не менее важным приложением системы CRISPR/Cas является идентификация патогенов и детекция специфических бактериальных генов с помощью платформы SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking — ферментативная специфическая высокочувствительная разблокировка репортера). Предложенная платформа объединяет нуклеазу Cas13a, ее направляющую РНК, специфичную к нуклеиновой кислоте, и флуоресцентную репортерную молекулу. Комплекс Cas13a связывает и расщепляет предварительно амплифицированную нуклеиновую кислоту-мишень с высокой специфичностью. С помощью SHERLOCK удалось корректно дифференцировать близкородственные штаммы вируса Зика и Денге, генотипировать ряд штаммов *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* при низкой перекрестной реактивности. Кроме того, платформа SHERLOCK использована для дифференциации клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с двумя различными генами антибиотикоустойчивости, что открывает значительные перспективы к созданию мультиплексных систем для одновременной идентификации бактериальных патогенов и выявления у них генов антибиотикоустойчивости [144].

SHERLOCK была усовершенствована (SHERLOCKv2) и позволила выявлять в одном анализе до 4 мишеней. Мультиплексирование было достигнуто путем объединения нескольких нуклеаз Cas13 и нуклеазы Cas12 со специфичными флуоресцентными репортерными комплексами, которые обеспечивали детекцию сигнала на разных длинах волн. Количественное обнаружение было достигнуто путем оптимизации концентраций олигонуклеотидов, используемых на этапе предварительной амплификации, чтобы входной сигнал и интенсивность сигнала тесно коррелировали в широком диапазоне концентраций образца. Повышенная чувствительность была достигнута путем добавления Csm6 для увеличения интенсивности расщепления флуоресцентного репортера. Стоит отметить, что SHERLOCKv2 является портативным анализом за счет того, что обнаружение показаний флуоресценции в предложенной технологии заменено на визуальную детекцию на тест-полосках [320].

На основе SHERLOCK была разработана технология HUDSON (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases — нагревание неэкстрагированных диагностических образцов для уничтожения нуклеаз), которая устраняет необходимость в экстракции нуклеиновых кислот и позволяет обнаруживать патогены непосредственно в биологических образцах пациента (образец крови, сыворотки или плазмы крови, клеток крови, слюны, мокроты, лимфоидных тканей, тканей кроветворных органов и других биологических материалов). В HUDSON нагревание и химическое восстановление инактивируют нуклеазы, присутствующие в высоких концентрациях в биологических образцах пациента, после чего вирусные частицы лизируются, высвобождая нуклеиновые кислоты в раствор. HUDSON позволяет в течение 2 ч с высокой чувствительностью обнаружить вирус Денге в образцах цельной крови, сыворотки и слюны пациентов. Кроме того, HUDSON позволяет дифференцировать четыре серотипами вируса Денге и выявлять 6 наиболее распространенных мутаций обратной транскриптазы ВИЧ [321].

Таким образом, CRISPR/Cas открывает значительные перспективы к созданию диагностических систем, в том числе мультиплексных, для идентификации бактериальных и вирусных патогенов, выявления генов антибиотикоустойчивости у бактериальных патогенов, а также дифференциации близкородственных штаммов/изолятов бактериальных и вирусных патогенов.

### 3.9. Ресурсы для работы с CRISPR/Cas

Система CRISPR/Cas была адаптирована как мощный инструмент для редактирования генома(ов) и получила широкое применение в области исследования генома благодаря простоте использования и экономичности. Эффективность системы CRISPR/Cas зависит от грамотно разработанной направляющей РНК (sgРНК), поэтому было предложено множество биоинформационных инструментов, помогающих создать высокоактивную и специфическую sgРНК. Эти инструменты различаются по дизайну, параметрам, предлагаемым референсным геномам и т.д. Некоторые из биоинформационных инструментов приведены в **табл. 3.11**, другие можно найти на сайте BioinfoGP<sup>5</sup>.

**Таблица 3.11.** Биоинформационные инструменты для работы с системой CRISPR/Cas

№ п/п	Название ресурса	Ссылка на ресурс	Применение ресурса	Ссылки
Дизайн направляющих РНК для системы CRISPR/Cas				
1	CRISPR Guide RNA Design	<a href="https://www.benchling.com/crispr/">https://www.benchling.com/crispr/</a>	Для разработки направляющих РНК возможно импортировать целевую последовательность, есть возможность	—

Продолжение табл. 3.11 см. на стр. 115.

<sup>5</sup>URL: <https://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/wereview/crisprtools>

№ п/п	Название ресурса	Ссылка на ресурс	Применение ресурса	Ссылки
			<p>указать координаты гена в пределах выбранного генома, и Benchling автоматически аннотирует их (внесет всю информацию об экзонах и кодирующих последовательностях, необходимую для разработки направляющих РНК). Возможен импорт напрямую из более чем 160 эталонных геномов.</p> <p>Benchling дает оценку разработанным направляющим РНК по специфичности и эффективности, используя новейшие алгоритмы, что позволяет выбрать лучшие варианты</p>	
2	GPP sgRNA Designer	<a href="https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design">https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design</a>	Инструмент ранжирует и выбирает кандидатные последовательности направляющих РНК для выбранных генов-мишеней, одновременно пытаясь максимизировать эффективность и минимизировать неспецифическую активность	[322–325]
3	CHOPCHOP	<a href="http://chopchop.cbu.uib.no">http://chopchop.cbu.uib.no</a>	Инструмент ранжирует и выбирает кандидатные последовательности направляющих РНК для выбранных генов-мишеней, анализируя их эффективность	[326–328]
4	CRISPOR	<a href="http://crispor.tefor.net">http://crispor.tefor.net</a>	Программа помогает разрабатывать, оценивать эффективность и клонировать последовательности, кодирующие направляющие РНК системы CRISPR/Cas9	[329]
5	E-CRISP	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html</a>	Инструмент предлагает кандидатные последовательности направляющих РНК для выбранных генов-мишеней, одновременно предоставляя информацию об их расчетной эффективности и неспецифической активности	[330]

Продолжение табл. 3.11 см. на стр. 116.



№ п/п	Название ресурса	Ссылка на ресурс	Применение ресурса	Ссылки
<b>Предсказание и анализ неспецифической активности системы CRISPR/Cas</b>				
6	Cas-OFFinder	<a href="http://www.rgenome.net/cas-offinder/">http://www.rgenome.net/cas-offinder/</a>	Быстрый и универсальный алгоритм поиска потенциальных нецелевых сайтов РНК-управляемых эндонуклеаз Cas9 (сайтов неспецифической активности)	[331]
7	COSMID	<a href="https://crispr.bme.gatech.edu/">https://crispr.bme.gatech.edu/</a>	Инструмент для выявления и проверки внецелевых сайтов редактирования (неспецифическая активность)	[332]
8	CRISPR-offinder-v1-2	<a href="https://sourceforge.net/projects/crispr-offinder-v1-2/">https://sourceforge.net/projects/crispr-offinder-v1-2/</a>	Учитывая заданные целевые сайты, на основе эталонного генома, этот автономный инструмент будет определять предполагаемые сайты внецелевой активности и назначать прогнозируемую активность на основе моделирования	[333]
<b>Поиск новых элементов системы CRISPR/Cas</b>				
9	CRISPRCasFinder	<a href="https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index">https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index</a>	Программа CRISPRCasFinder позволяет легко обнаруживать CRISPR-локусы и <i>cas</i> -гены в предоставленных пользователем последовательностях	[334–338]
10	CRISPRTarget	<a href="http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html">http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html</a>	Программа для идентификации обнаруженных CRISPR/Cas систем (последовательности бактериофагов, плазмид)	[339]
11	CRISPRmap	<a href="http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CRISPRmap/Input.jsp">http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CRISPRmap/Input.jsp</a>	Программа позволяет быстро и подробно анализировать повторы CRISPR как бактериальных, так и архейных систем. Он включает самый большой на сегодня набор данных CRISPR и позволяет проводить всесторонний независимый кластерный анализ, чтобы определить семейства консервативных последовательностей, потенциальные структурные мотивы и эволюционные связи	[340–342]
12	CRISPRviz	<a href="https://github.com/CRISPRlab/CRISPRviz">https://github.com/CRISPRlab/CRISPRviz</a>	Программа идентифицирует и извлекает повторы и спейсеры из последовательностей генома, затем отображает эту информацию через локальный веб-сервер для дополнительных манипуляций	[343]

Окончание табл. 3.11 см. на стр. 117.

№ п/п	Название ресурса	Ссылка на ресурс	Применение ресурса	Ссылки
13	CRISPRStudio	<a href="https://github.com/moineaulab/CRISPRStudio">https://github.com/moineaulab/CRISPRStudio</a>	Программа, разработанная для упрощения и ускорения визуализации CRISPR-массивов в анализируемых последовательностях (геномах)	[344]
Постэкспериментальный анализ				
14	CRISPResso2	<a href="https://crispresso.pinellolab.partners.org">https://crispresso.pinellolab.partners.org</a>	Анализ результатов редактирования генома по данным глубокого секвенирования (целевые и внецелевые эффекты)	[345]
15	Cas-Analyzer	<a href="http://www.rgenome.net/cas-analyzer/#!">http://www.rgenome.net/cas-analyzer/#!</a>	Инструмент мгновенной оценки результатов редактирования на основе JavaScript для данных высокопроизводительного секвенирования для геномов/фрагментов генома отредактированных клеток	[346]
16	CRISPR Genome Analyzer	<a href="http://crispr-ga.net/">http://crispr-ga.net/</a>	Анализ результатов редактирования генома по данным высокопроизводительного секвенирования	[347]
17	TIDE/TIDER	<a href="https://tide.nki.nl/">https://tide.nki.nl/</a>	Анализ результатов редактирования генома по данным секвенирования по Сэнгеру	[348, 349]

## Литература

- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987; 169(12): 5429-33. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI site. *Mol. Microbiol.* 1993; 9(3): 613-21. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x
- Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002; 43(6): 1565-75. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*. 2005; 151(Pt. 8): 2551-61. doi: 10.1099/mic.0.28048-0
- Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct.* 2006; 1: 7. doi: 10.1186/1745-6150-1-7

6. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005; 60(2): 174-82. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
7. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading)*. 2005; 151(Pt. 3): 653-63. doi: 10.1099/mic.0.27437-0
8. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315(5819): 1709-12. doi: 10.1126/science.1138140
9. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008; 322(5909): 1843-5. doi: 10.1126/science.1165771
10. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008; 321(5891): 960-4. doi: 10.1126/science.1159689
11. Hale C.R., Zhao P., Olson S., et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*. 2009; 139(5): 945-56. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.040
12. Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010; 468(7320): 67-71. doi: 10.1038/nature09523
13. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011; 471(7340): 602-7. doi: 10.1038/nature09886
14. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(39): E2579-86. doi: 10.1073/pnas.1208507109
15. 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. doi: 10.1126/science.1225829
16. Cong L., Ran F.A., Cox D., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339(6121): 819-23. doi: 10.1126/science.1231143
17. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339(6121): 823-6. doi: 10.1126/science.1232033
18. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010; 327(5962): 167-70. doi: 10.1126/science.1179555
19. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012; 482(7385): 331-8. doi: 10.1038/nature10886
20. Miao J., Guo D., Zhang J., et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*. 2013; 23(10): 1233-6. doi: 10.1038/cr.2013.123
21. Shan Q., Wang Y., Li J., et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(8): 686-8. doi: 10.1038/nbt.2650
22. Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., et al. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)*. 2013; 3(12): 2233-8. doi: 10.1534/g3.113.008847
23. Jiang W., Zhou H., Bi H., et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(20): e188. doi: 10.1093/nar/gkt780
24. Liang P., Xu Y., Zhang X., et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015; 6(5): 363-72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5
25. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019; 576(7785): 149-57. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4

26. Jackson S.A., McKenzie R.E., Fagerlund R.D., et al. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. 2017; 356(6333): eaal5056. doi: 10.1126/science.aal5056
27. Tamulaitis G., Venclovas Č., Siksnys V. Type III CRISPR-Cas immunity: major differences brushed aside. *Trends Microbiol.* 2017; 25(1): 49-61. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.012
28. Mohanraju P., Makarova K.S., Zetsche B., et al. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*. 2016; 353(6299): aad5147. doi: 10.1126/science.aad5147
29. Charpentier E., Richter H., van der Oost J., et al. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015; 39(3): 428-41. doi: 10.1093/femsre/fuv023
30. Xiao Y., Ng S., Nam K.H., et al. How type II CRISPR-Cas establish immunity through Cas1-Cas2-mediated spacer integration. *Nature*. 2017; 550(7674): 137-41. doi: 10.1038/nature24020
31. He Y., Wang M., Liu M., et al. Cas1 and Cas2 from the type II-C CRISPR-Cas system of *Riemerella anatipestifer* are required for spacer acquisition. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8: 195. doi: 10.3389/fcimb.2018.00195
32. Dolan A.E., Hou Z., Xiao Y., et al. Introducing a spectrum of long-range genomic deletions in human embryonic stem cells using type I CRISPR-Cas. *Mol. Cell*. 2019; 74(5): 936-50.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.014
33. Zhang Z., Pan S., Liu T., et al. Cas4 nucleases can effect specific integration of CRISPR spacers. *J. Bacteriol.* 2019; 201(12): e00747-18. doi: 10.1128/JB.00747-18
34. Brendel J., Stoll B., Lange S.J., et al. A complex of Cas proteins 5, 6, and 7 is required for the biogenesis and stability of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (crispr)-derived rnas (crrnas) in *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(10): 7164-77. doi: 10.1074/jbc.M113.508184
35. Kalwani P., Rath D., Ballal A. Novel molecular aspects of the CRISPR backbone protein 'Cas7' from cyanobacteria. *Biochem. J.* 2020; 477(5): 971-83. doi: 10.1042/BCJ20200026
36. Cass S.D., Haas K.A., Stoll B. et al. The role of Cas8 in type I CRISPR interference. *Biosci. Rep.* 2015; 35(3): e00197. doi: 10.1042/BSR20150043
37. Nayeemul Bari S.M., Hatoum-Aslan A. CRISPR-Cas10 assisted editing of virulent staphylococcal phages. *Methods Enzymol.* 2019; 616: 385-409. doi: 10.1016/bs.mie.2018.10.023
38. Shmakov S.A., Makarova K.S., Wolf Y.I., et al. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 115(23): E5307-16. doi: 10.1073/pnas.1803440115
39. Strohkendl I., Saifuddin F.A., Rybarski J.R., et al. Kinetic basis for DNA target specificity of CRISPR-Cas12a. *Mol. Cell*. 2018; 71(5): 816-24.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.043
40. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 2017; 358(6366): 1019-27. doi: 10.1126/science.aaq0180
41. Aquino-Jarquín G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic. *Nanomedicine*. 2019; 18: 428-31. doi: 10.1016/j.nano.2019.03.006
42. Koonin E.V., Makarova K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2019; 374(1772): 20180087. doi: 10.1098/rstb.2018.0087
43. Burstein D., Sun C.L., Brown C.T., et al. Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. *Nat. Commun.* 2016; 7: 10613. doi: 10.1038/ncomms10613
44. Shmakov S., Smargon A., Scott D., et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15(3): 169-82. doi: 10.1038/nrmicro.2016.184

45. Burstein D., Harrington L.B., Strutt S.C., et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*. 2017; 542(7640): 237-41. doi: 10.1038/nature21059
46. Rouillon C., Zhou M., Zhang J., et al. Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. *Mol. Cell*. 2013; 52(1): 124-34. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.020
47. Jackson R.N., Wiedenheft B. A conserved structural chassis for mounting versatile CRISPR RNA-guided immune responses. *Mol. Cell*. 2015; 58(5): 722-8. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.023
48. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(6): 467-77. doi: 10.1038/nrmicro2577
49. Koonin E.V., Makarova K.S. CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol.* 2013; 10(5): 679-86. doi: 10.4161/rna.24022
50. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017; 37: 67-78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008
51. Venclovas Č. Structure of Csm2 elucidates the relationship between small subunits of CRISPR-Cas effector complexes. *FEBS Lett.* 2016; 590(10): 1521-9. doi: 10.1002/1873-3468.12179
52. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(11): 722-36. doi: 10.1038/nrmicro3569
53. Garrett R.A., Vestergaard G., Shah S.A. Archaeal CRISPR-based immune systems: exchangeable functional modules. *Trends Microbiol.* 2011; 19(11): 549-56. doi: 10.1016/j.tim.2011.08.002
54. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020; 18(2): 67-83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
55. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014; 156(5): 935-49. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
56. Esvelt K.M., Mali P., Braff J.L., et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat. Methods*. 2013; 10(11): 1116-21. doi: 10.1038/nmeth.2681
57. Nishimasu H., Cong L., Yan W.X., et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*. 2015; 162(5): 1113-26. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.007
58. Hirano H., Gootenberg J.S., Horii T., et al. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*. 2016; 164(5): 950-61. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.039
59. Yamada M., Watanabe Y., Gootenberg J.S., et al. Crystal structure of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* reveals the molecular diversity in the CRISPR-Cas9 systems. *Mol. Cell*. 2017; 65(6): 1109-21.e3. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.007
60. Ma H., Naseri A., Reyes-Gutierrez P., et al. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(10): 3002-7. doi: 10.1073/pnas.1420024112
61. Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009; 155(Pt. 3): 733-40. doi: 10.1099/mic.0.023960-0
62. Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.C., et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 2008; 190(4): 1401-12. doi: 10.1128/JB.01415-07
63. Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K., et al. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(4): 2577-90. doi: 10.1093/nar/gkt1074

64. van der Ploeg J.R. Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology*. 2009; 155(Pt. 6): 1966-1976. doi: 10.1099/mic.0.027508-0
65. Zhang Y., Heidrich N., Ampattu B.J., et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Cell*. 2013; 50(4): 488-503. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.001
66. Chen H., Choi J., Bailey S. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *J. Biol. Chem*. 2014; 289(19): 13284-94. doi: 10.1074/jbc.M113.539726
67. Mendoza B.J., Trinh C.T. In silico processing of the complete CRISPR-Cas spacer space for identification of PAM sequences. *Biotechnol. J*. 2018; 13(9): e1700595. doi: 10.1002/biot.201700595
68. Hirano S., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., et al. Structural basis for the promiscuous PAM recognition by *Corynebacterium diphtheriae* Cas9. *Nat. Commun*. 2019; 10(1): 1968. doi: 10.1038/s41467-019-09741-6
69. Ding Y., Li H., Chen L.L., et al. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci*. 2016; 7: 703. doi: 10.3389/fpls.2016.00703
70. Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., et al. CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(20): 9584-92. doi: 10.1093/nar/gkt714
71. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol*. 2013; 31(9): 822-6. doi: 10.1038/nbt.2623
72. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol*. 2013; 31(9): 827-32. doi: 10.1038/nbt.2647
73. Mali P., Aach J., Stranges P.B., et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol*. 2013; 31(9): 833-8. doi: 10.1038/nbt.2675
74. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol*. 2013; 31(9): 839-43. doi: 10.1038/nbt.2673
75. Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N.T., et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol*. 2015; 33(2): 187-97. doi: 10.1038/nbt.3117
76. Kim D., Bae S., Park J., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods*. 2015; 12(3): 237-43. doi: 10.1038/nmeth.3284
77. Kuscu C., Arslan S., Singh R., et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol*. 2014; 32(7): 677-83. doi: 10.1038/nbt.2916
78. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013; 154(6): 1380-9. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021
79. Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol*. 2014; 32(6): 577-82. doi: 10.1038/nbt.2909
80. Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol*. 2014; 32(6): 569-76. doi: 10.1038/nbt.2908

81. Bolukbasi M.F., Gupta A., Oikemus S., et al. DNA-binding-domain fusions enhance the targeting range and precision of Cas9. *Nat. Methods*. 2015; 12(12): 1150-6. doi: 10.1038/nmeth.3624
82. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(3): 279-284. doi: 10.1038/nbt.2808
83. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016; 529(7587): 490-5. doi: 10.1038/nature16526
84. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(3): 227-9. doi: 10.1038/nbt.2501
85. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8(11): 2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
86. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015; 523(7561): 481-5. doi: 10.1038/nature14592
87. Davis K.M., Pattanayak V., Thompson D.B., et al. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* 2015; 11(5): 316-8. doi: 10.1038/nchembio.1793
88. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016; 351(6268): 84-8. doi: 10.1126/science.aad5227
89. Trevino A.E., Zhang F. Genome editing using Cas9 nickases. *Methods Enzymol.* 2014; 546: 161-74. doi: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8
90. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013; 152(5): 1173-83. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
91. La Russa M.F., Qi L.S. The new state of the art: Cas9 for gene activation and repression. *Mol. Cell Biol.* 2015; 35(22): 3800-9. doi: 10.1128/MCB.00512-15
92. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2015; 517(7536): 583-8. doi: 10.1038/nature14136
93. Jusiak B., Cleto S., Perez-Piñera P., et al. Engineering Synthetic Gene Circuits in Living Cells with CRISPR Technology. *Trends Biotechnol.* 2016; 34(7): 535-47. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.014
94. Chavez A., Tuttle M., Pruitt B.W., et al. Comparison of Cas9 activators in multiple species. *Nat. Methods*. 2016; 13(7): 563-7. doi: 10.1038/nmeth.3871
95. Zhang Y., Yin C., Zhang T., et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16277. doi: 10.1038/srep16277
96. Bialek J.K., Dunay G.A., Voges M., et al. Targeted HIV-1 latency reversal using CRISPR/Cas9-derived transcriptional activator systems. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0158294. doi: 10.1371/journal.pone.0158294
97. Chavez A., Scheiman J., Vora S., et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods*. 2015; 12(4): 326-8. doi: 10.1038/nmeth.3312
98. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013; 154(2): 442-51. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044
99. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014; 159(3): 647-61. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.029
100. Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 2015; 16(5): 299-311. doi: 10.1038/nrg3899

101. Köeferle A., Stricker S.H., Beck S. Brave new epigenomes: the dawn of epigenetic engineering. *Genome Med.* 2015; 7(1): 59. doi: 10.1186/s13073-015-0185-8
102. Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 2015; 33(5): 510-7. doi: 10.1038/nbt.3199
103. Kearns N.A., Pham H., Tabak B., et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods.* 2015; 12(5): 401-3. doi: 10.1038/nmeth.3325
104. Rudolph T., Beuch S., Reuter G. Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin. *Biol. Chem.* 2013; 394(8): 1019-28. doi: 10.1515/hsz-2013-0119
105. Robertson K.D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6(8): 597-610. doi: 10.1038/nrg1655
106. Xu X., Tao Y., Gao X., et al. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov.* 2016; 2: 16009. doi: 10.1038/celldisc.2016.9
107. Choudhury S.R., Cui Y., Lubecka K., et al. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget.* 2016; 7(29): 46545-56. doi: 10.18632/oncotarget.10234
108. Valton J., Dupuy A., Daboussi F., et al. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(46): 38427-32. doi: 10.1074/jbc.C112.408864
109. Vojta A., Dobrinić P., Tadić V., et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(12): 5615-28. doi: 10.1093/nar/gkw159
110. Ma H., Tu L.C., Naseri A., et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34(5): 528-30. doi: 10.1038/nbt.3526
111. Ma H., Tu L.C., Naseri A., et al. CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging. *Nat. Methods.* 2018; 15(11): 928-31. doi: 10.1038/s41592-018-0174-0
112. Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell.* 2013; 155(7): 1479-91. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.001
113. Fujita T., Yuno M., Fujii H. enChIP systems using different CRISPR orthologues and epitope tags. *BMC Res. Notes.* 2018; 11(1): 154. doi: 10.1186/s13104-018-3262-4
114. Fujita T., Yuno M., Fujii H. An enChIP system for the analysis of bacterial genome functions. *BMC Res. Notes.* 2018; 11(1): 387. doi: 10.1186/s13104-018-3486-3
115. Fujita T., Fujii H. Purification of specific DNA species using the CRISPR system. *Biol. Methods Protoc.* 2019; 4(1): bpz008. doi: 10.1093/biomethods/bpz008
116. Fujita T., Kitaura F., Oji A., et al. Transgenic mouse lines expressing the 3xFLAG-dCas9 protein for enChIP analysis. *Genes Cells.* 2018; 23(4): 318-25. doi: 10.1111/gtc.12573
117. Fujita T., Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 439(1): 132-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.013
118. Fujita T., Fujii H. Isolation of specific genomic regions and identification of associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1288: 43-52. doi: 10.1007/978-1-4939-2474-5\_4



119. Schmidtman E., Anton T., Rombaut P., et al. Determination of local chromatin composition by CasID. *Nucleus*. 2016; 7(5): 476-84. doi: 10.1080/19491034.2016.1239000
120. Tsui C., Inouye C., Levy M., et al. dCas9-targeted locus-specific protein isolation method identifies histone gene regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 115(12): E2734-41. doi: 10.1073/pnas.1718844115
121. Gao X.D., Tu L.C., Mir A., et al. C-BERST: defining subnuclear proteomic landscapes at genomic elements with dCas9-APEX2. *Nat. Methods*. 2018; 15(6): 433-6. doi: 10.1038/s41592-018-0006-2
122. Molla K.A., Yang Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications. *Trends Biotechnol.* 2019; 37(10): 1121-42. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008
123. Li X., Wang Y., Liu Y., et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 2018; 36(4): 324-7. doi: 10.1038/nbt.4102
124. Yang B., Yang L., Chen J. Development and Application of Base Editors. *CRISPR J.* 2019; 2(2): 91-104. doi: 10.1089/crispr.2019.0001
125. McGrath E., Shin H., Zhang L., et al. Targeting specificity of APOBEC-based cytosine base editor in human iPSCs determined by whole genome sequencing. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 5353. doi: 10.1038/s41467-019-13342-8
126. Xin X., Li J., Zhao D., et al. Double-check base editing for efficient A to G conversions. *ACS Synth. Biol.* 2019; 8(12): 2629-34. doi: 10.1021/acssynbio.9b00284
127. Yang L., Zhang X., Wang L., et al. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell.* 2018; 9(9): 814-9. doi: 10.1007/s13238-018-0568-x
128. Li C., Zong Y., Wang Y., et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol.* 2018; 19(1): 59. doi: 10.1186/s13059-018-1443-z
129. Gaudelli N.M., Lam D.K., Rees H.A., et al. Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(7): 892-900. doi: 10.1038/s41587-020-0491-6
130. Wu Y., Xu W., Wang F., et al. Increasing cytosine base editing scope and efficiency with engineered Cas9-PmCDA1 fusions and the modified sgRNA in rice. *Front. Genet.* 2019; 10: 379. doi: 10.3389/fgene.2019.00379
131. Komor A.C., Zhao K.T., Packer M.S., et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci. Adv.* 2017; 3(8): eaao4774. doi: 10.1126/sciadv.aao4774
132. Liu L.D., Huang M., Dai P., et al. Intrinsic nucleotide preference of diversifying base editors guides antibody ex vivo affinity maturation. *Cell Rep.* 2018; 25(4): 884-92.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.090
133. Ledford H. Super-precise new CRISPR tool could tackle a plethora of genetic diseases. *Nature.* 2019; 574(7779): 464-5. doi: 10.1038/d41586-019-03164-5
134. Yamano T., Nishimasu H., Zetsche B., et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 2016; 165(4): 949-62. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.003
135. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015; 163(3): 759-71. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038
136. Kim D., Kim J., Hur J.K., et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34(8): 863-8. doi: 10.1038/nbt.3609

137. Ma S., Liu Y., Liu Y., et al. An integrated CRISPR *Bombyx mori* genome editing system with improved efficiency and expanded target sites. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2017; 83: 13-20. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.02.003
138. Endo A., Masafumi M., Kaya H., et al. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using CpfI from *Francisella novicida*. *Sci. Rep.* 2016; 6: 38169. doi: 10.1038/srep38169
139. Zetsche B., Strecker J., Abudayyeh O.O., et al. A survey of genome editing activity for 16 Cas12a orthologs. *Keio J. Med.* 2019; 10.2302/kjm.2019-0009-OA. doi: 10.2302/kjm.2019-0009-OA
140. Teng F., Li J., Cui T., et al. Enhanced mammalian genome editing by new Cas12a orthologs with optimized crRNA scaffolds. *Genome Biol.* 2019; 20(1): 15. doi: 10.1186/s13059-019-1620-8
141. Jacobsen T., Ttofali F., Liao C., et al. Characterization of Cas12a nucleases reveals diverse PAM profiles between closely-related orthologs. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(10): 5624-38. doi: 10.1093/nar/gkaa272
142. Jiang W., Samai P., Marraffini L.A. Degradation of phage transcripts by CRISPR-associated RNases enables type III CRISPR-Cas immunity. *Cell.* 2016; 164(4): 710-21. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.053
143. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science.* 2016; 353(6299): aaf5573. doi: 10.1126/science.aaf5573
144. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017; 356(6336): 438-42. doi: 10.1126/science.aam9321
145. Tambe A., East-Seletsky A., Knott G.J., et al. RNA binding and HEPN-nuclease activation are decoupled in CRISPR-Cas13a. *Cell Rep.* 2018; 24(4): 1025-36. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.105
146. Konermann S., Lotfy P., Brideau N.J., et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell.* 2018; 173(3): 665-76.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.033
147. Yan W.X., Chong S., Zhang H., et al. Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol. Cell.* 2018; 70(2): 327-39.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.028
148. Harrington L.B., Burstein D., Chen J.S., et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science.* 2018; 362(6416): 839-42. doi: 10.1126/science.aav4294
149. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., et al. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae.* 2014; 6(3): 19-40.
150. German D.M., Mitalipov S., Mishra A., et al. Therapeutic genome editing in cardiovascular diseases. *JACC Basic Transl. Sci.* 2019; 4(1): 122-31. doi: 10.1016/j.jacbts.2018.11.004
151. Kwarteng A., Ahuno S.T., Kwakye-Nuako G. The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. *AIDS Res Ther.* 2017; 14(1): 32. doi: 10.1186/s12981-017-0157-8
152. Loureiro A., da Silva G.J. CRISPR-Cas: Converting a bacterial defence mechanism into a state-of-the-art genetic manipulation tool. *Antibiotics (Basel).* 2019; 8(1): 18. doi: 10.3390/antibiotics8010018
153. Karimian A., Azizian K., Parsian H., et al. CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. *J. Cell Physiol.* 2019; 234(8): 12267-77. doi: 10.1002/jcp.27972
154. Caplice E., Fitzgerald G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 1999; 50(1-2): 131-49. doi: 10.1016/s0168-1605(99)00082-3
155. Hill C., Guarner F., Reid G., et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate

- use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11(8): 506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
156. Briner A.E., Lugli G.A., Milani C., et al. Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus bifidobacterium. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0133661. doi: 10.1371/journal.pone.0133661
  157. Sun Z., Harris H.M., McCann A., et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 2015; 6: 8322. doi: 10.1038/ncomms9322
  158. Arslan Z., Hermanns V., Wurm R., et al. Detection and characterization of spacer integration intermediates in type I-E CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(12): 7884-93. doi: 10.1093/nar/gku510
  159. Barrangou R., Coûté-Monvoisin A.C., Stahl B., et al. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochem. Soc. Trans.* 2013; 41(6): 1383-91. doi: 10.1042/BST20130160
  160. Andersson A.F., Banfield J.F. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science.* 2008; 320(5879): 1047-50. doi: 10.1126/science.1157358
  161. Tyson G.W., Banfield J.F. Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(1): 200-7. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01444.x
  162. Barrangou R., Horvath P. CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3: 143-62. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101134
  163. Barrangou R., Dudley E.G. CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2016; 7: 395-411. doi: 10.1146/annurev-food-022814-015729
  164. Selle K., Barrangou R. CRISPR-based technologies and the future of food science. *J. Food Sci.* 2015; 80(11): R2367-72. doi: 10.1111/1750-3841.13094
  165. Broadbent J.R., Neeno-Eckwall E.C., Stahl B., et al. Analysis of the Lactobacillus casei supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics.* 2012; 13: 533. doi: 10.1186/1471-2164-13-533
  166. Smokvina T., Wels M., Polka J., et al. Lactobacillus paracasei comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PLoS One.* 2013; 8(7): e68731. doi: 10.1371/journal.pone.0068731
  167. Douillard F.P., Ribbera A., Kant R., et al. Comparative genomic and functional analysis of 100 Lactobacillus rhamnosus strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genet.* 2013; 9(8): e1003683. doi: 10.1371/journal.pgen.1003683
  168. Hullahalli K., Rodrigues M., Schmidt B.D., et al. Comparative analysis of the orphan CRISPR2 locus in 242 Enterococcus faecalis strains. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0138890. doi: 10.1371/journal.pone.0138890
  169. Sanozky-Dawes R., Selle K., O'Flaherty S., et al. Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in Lactobacillus gasseri. *Microbiology.* 2015; 161(9): 1752-61. doi: 10.1099/mic.0.000129
  170. Briner A.E., Barrangou R. Lactobacillus buchneri genotyping on the basis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) locus diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(3): 994-1001. doi: 10.1128/AEM.03015-13
  171. DiMarzio M., Shariat N., Kariyawasam S., et al. Antibiotic resistance in Salmonella enterica serovar typhimurium associates with CRISPR sequence type. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(9): 4282-9. doi: 10.1128/AAC.00913-13

172. Fabre L., Zhang J., Guigon G., et al. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of Salmonella infections. *PLoS One*. 2012; 7(5): e36995. doi: 10.1371/journal.pone.0036995
173. Fricke W.F., Mammel M.K., McDermott P.F., et al. Comparative genomics of 28 Salmonella enterica isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. *J. Bacteriol.* 2011; 193(14): 3556-68. doi: 10.1128/JB.00297-11
174. Liu F., Barrangou R., Gerner-Smidt P., et al. Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of Salmonella enterica subsp. Enterica. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(6): 1946-56. doi: 10.1128/AEM.02625-10
175. Liu F., Kariyawasam S., Jayarao B.M., et al. Subtyping Salmonella enterica serovar enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(13): 4520-6. doi: 10.1128/AEM.00468-11
176. Pettengill J.B., Timme R.E., Barrangou R., et al. The evolutionary history and diagnostic utility of the CRISPR-Cas system within Salmonella enterica ssp. Enterica. *PeerJ*. 2014; 2: e340. doi: 10.7717/peerj.340
177. Shariat N., Kirchner M.K., Sandt C.H., et al. Subtyping of Salmonella enterica serovar Newport outbreak isolates by CRISPR-MVLST and determination of the relationship between CRISPR-MVLST and PFGE results. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(7): 2328-36. doi: 10.1128/JCM.00608-13
178. Shariat N., Sandt C.H., DiMarzio M.J., et al. CRISPR-MVLST subtyping of Salmonella enterica subsp. enterica serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 254. doi: 10.1186/1471-2180-13-254
179. Shariat N., Dudley E.G. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(2): 430-9. doi: 10.1128/AEM.02790-13
180. Shariat N., DiMarzio M.J., Yin S., et al. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis. *Food Microbiol.* 2013; 34(1): 164-73. doi: 10.1016/j.fm.2012.11.012
181. Timme R.E., Pettengill J.B., Allard M.W., et al. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen Salmonella enterica subsp. enterica inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome Biol. Evol.* 2013; 5(11): 2109-23. doi: 10.1093/gbe/evt159
182. Wehnes C.A., Rehberger T.G., Barrangou R., et al. Short communication: Determination of Salmonella clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) diversity on dairy farms in Wisconsin and Minnesota. *J. Dairy Sci.* 2014; 97(10): 6370-7. doi: 10.3168/jds.2013-7595
183. Kovanen S.M., Kivistö R.I., Rossi M., et al. A combination of MLST and CRISPR typing reveals dominant Campylobacter jejuni types in organically farmed laying hens. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 117(1): 249-57. doi: 10.1111/jam.12503
184. Hargreaves K.R., Flores C.O., Lawley T.D., et al. Abundant and diverse clustered regularly interspaced short palindromic repeat spacers in Clostridium difficile strains and prophages target multiple phage types within this pathogen. *mBio*. 2014; 5(5): e01045-13. doi: 10.1128/mBio.01045-13
185. Mokrousov I., Vyazovaya A., Kolodkina V., et al. Novel microarray-based method of Corynebacterium diphtheriae genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 28(6): 701-3. doi: 10.1007/s10096-008-0674-4

186. Jiang Y., Yin S., Dudley E.G., et al. Diversity of CRISPR loci and virulence genes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from various sources. *Int. J. Food Microbiol.* 2015; 204: 41-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.025
187. D'Auria G., Jiménez-Hernández N., Peris-Bondía F., et al. *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics.* 2010; 11: 181. doi: 10.1186/1471-2164-11-181
188. Kinnevey P.M., Shore A.C., Brennan G.I., et al. Emergence of sequence type 779 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring a novel pseudo staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)-SCC-SCCCRISPR composite element in Irish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(1): 524-31. doi: 10.1128/AAC.01689-12
189. Sun H., Li Y., Shi X., et al. Association of CRISPR/Cas evolution with *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors and genotypes. *Foodborne Pathog. Dis.* 2015; 12(1): 68-73. doi: 10.1089/fpd.2014.1792
190. Groenen P.M., Bunschoten A.E., van Soolingen D., et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 1993; 10(5): 1057-65. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x
191. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(4): 907-14.
192. Cui Y., Li Y., Gorgé O., Platonov M.E., et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS One.* 2008; 3(7): e2652. doi: 10.1371/journal.pone.0002652
193. Edmond E., Moineau S. Bacteriophages and food fermentations. In: McGrath S., van Sinderen D., eds. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Poole, UK: Caister Acad.; 2007: 93-124.
194. Marcó M.B., Moineau S., Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage.* 2012; 2(3): 149-58. doi: 10.4161/bact.21868
195. Samson J.E., Moineau S. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2013; 4: 347-68. doi: 10.1146/annurev-food-030212-182541
196. Djordjevic G.M., O'Sullivan D.J., Walker S.A., et al. A triggered-suicide system designed as a defense against bacteriophages. *J. Bacteriol.* 1997; 179(21): 6741-8. doi: 10.1128/jb.179.21.6741-6748.1997
197. Durmaz E., Klaenhammer T.R. Abortive phage resistance mechanism *AbiZ* speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 2007; 189(4): 1417-25. doi: 10.1128/JB.00904-06
198. Higgins D.L., Sanozky-Dawes R.B., Klaenhammer T.R. Restriction and modification activities from *Streptococcus lactis* ME2 are encoded by a self-transmissible plasmid, pTN20, that forms cointegrates during mobilization of lactose-fermenting ability. *J. Bacteriol.* 1988; 170(8): 3435-42. doi: 10.1128/jb.170.8.3435-3442.1988
199. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5): 317-27. doi: 10.1038/nrmicro2315
200. Sanders M.E., Klaenhammer T.R. Evidence for Plasmid Linkage of Restriction and Modification in *Streptococcus cremoris* KH. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981; 42(6): 944-50.
201. Sanders M.E., Klaenhammer T.R. Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: Evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 46(5): 1125-33.

202. Edgar R., Qimron U. The Escherichia coli CRISPR system protects from  $\lambda$  lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J. Bacteriol.* 2010; 192(23): 6291-4. doi: 10.1128/JB.00644-10
203. Nozawa T., Furukawa N., Aikawa C., et al. CRISPR inhibition of prophage acquisition in Streptococcus pyogenes. *PLoS One.* 2011; 6(5): e19543. doi: 10.1371/journal.pone.0019543
204. Palmer K.L., Gilmore M.S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio.* 2010; 1(4): e00227-10. doi: 10.1128/mBio.00227-10
205. Shimomura Y., Okumura K., Murayama S.Y., et al. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics.* 2011; 12: 17. doi: 10.1186/1471-2164-12-17
206. Bourdichon F., Casaregola S., Farrokh C., et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 154(3): 87-97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030
207. Sapranauskas R., Gasiunas G., Fremaux C., et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(21): 9275-82. doi: 10.1093/nar/gkr606
208. Selle K., Barrangou R. Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing. *Trends Microbiol.* 2015; 23(4): 225-32. doi: 10.1016/j.tim.2015.01.008
209. Jiang W., Bikard D., Cox D., et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(3): 233-9. doi: 10.1038/nbt.2508
210. Jiang Y., Chen B., Duan C., et al. Multigene editing in the Escherichia coli genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015; 81(7): 2506-14. doi: 10.1128/AEM.04023-14
211. Oh J.H., van Pijkeren J.P. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in Lactobacillus reuteri. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(17): e131. doi: 10.1093/nar/gku623
212. Charpentier E., Marraffini L.A. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.* 2014; 19: 114-9. doi: 10.1016/j.mib.2014.07.001
213. Gophna U., Allers T., Marchfelder A. Finally, archaea get their CRISPR-Cas toolbox. *Trends Microbiol.* 2017; 25(6): 430-432. doi: 10.1016/j.tim.2017.03.009
214. Barrangou R., van Pijkeren J.P. Exploiting CRISPR-Cas immune systems for genome editing in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 37: 61-8. doi: 10.1016/j.copbio.2015.10.003
215. Selle K., Klaenhammer T.R., Barrangou R. CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(26): 8076-81. doi: 10.1073/pnas.1508525112
216. Mougias I., Bosma E.F., de Vos W.M., et al. Next generation prokaryotic engineering: The CRISPR-Cas toolkit. *Trends Biotechnol.* 2016; 34(7): 575-87. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.004
217. Bikard D., Barrangou R. Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017; 37: 155-60. doi: 10.1016/j.mib.2017.08.005
218. Goren M., Yosef I., Qimron U. Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system. *Drug Resist. Updat.* 2017; 30: 1-6. doi: 10.1016/j.drup.2016.11.001
219. Gomaa A.A., Klumpe H.E., Luo M.L., et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *mBio.* 2014; 5(1): e00928-13. doi: 10.1128/mBio.00928-13
220. Hagens S., Bläsi U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003; 37(4): 318-23. doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01400.x
221. Moradpour Z., Sephehrizadeh Z., Rahbarizadeh F., et al. Genetically engineered phage harbouring the lethal catabolite gene activator protein gene with an inducer-independent promoter for

- biocontrol of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009; 296(1): 67-71. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01620.x
222. Westwater C., Kasman L.M., Schofield D.A., et al. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(4): 1301-7. doi: 10.1128/aac.47.4.1301-1307.2003
223. Hagens S., Habel A., von Ahsen U., et al. Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(10): 3817-22. doi: 10.1128/AAC.48.10.3817-3822.2004
224. Citorik R.J., Mimee M., Lu T.K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(11): 1141-5. doi: 10.1038/nbt.3011
225. Bikard D., Euler C.W., Jiang W., et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(11): 1146-50. doi: 10.1038/nbt.3043
226. Yosef I., Manor M., Kiro R., et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(23): 7267-72. doi: 10.1073/pnas.1500107112
227. Oakes B.L., Fellmann C., Rishi H., et al. CRISPR-Cas9 circular permutants as programmable scaffolds for genome modification. *Cell.* 2019; 176(1-2): 254-67.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.052
228. Yuan J., Ma Y., Huang T., et al. Genetic modulation of RNA splicing with a CRISPR-guided cytidine deaminase. *Mol. Cell.* 2018; 72(2): 380-94.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.09.002
229. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature.* 2017; 550(7675): 280-4. doi: 10.1038/nature24049
230. Xie N., Zhou Y., Sun Q., et al. Novel epigenetic techniques provided by the CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 7834175. doi: 10.1155/2018/7834175
231. Wu S.S., Li Q.C., Yin C.Q., et al. Advances in CRISPR/Cas-based gene therapy in human genetic diseases. *Theranostics.* 2020; 10(10): 4374-82. doi: 10.7150/thno.43360
232. Papasavva P., Kleanthous M., Lederer C.W. Rare opportunities: CRISPR/Cas-based therapy development for rare genetic diseases. *Mol. Diagn. Ther.* 2019; 23(2): 201-22. doi: 10.1007/s40291-019-00392-3
233. Kennedy E.M., Cullen B.R. Gene editing: a new tool for viral disease. *Annu. Rev. Med.* 2017; 68: 401-11. doi: 10.1146/annurev-med-051215-031129
234. Xiong X., Chen M., Lim W.A., et al. CRISPR/Cas9 for human genome engineering and disease research. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2016; 17: 131-54. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022258.
235. Ferdosi S.R., Ewaisha R., Moghadam F., et al. Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 1842. doi: 10.1038/s41467-019-09693-x
236. Li H., Yang Y., Hong W., et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct. Target Ther.* 2020; 5: 1. doi: 10.1038/s41392-019-0089-y
237. Chen S., Yu X., Guo D. CRISPR-Cas Targeting of host genes as an antiviral strategy. *Viruses.* 2018; 10(1): 40. doi: 10.3390/v10010040
238. Doms R.W. Chemokine receptors and HIV entry. *AIDS.* 2001; 15(Suppl. 1): S34-5. doi: 10.1097/00002030-200102001-00051
239. O'Brien S.J., Moore J.P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev.* 2000; 177: 99-111. doi: 10.1034/j.1600-065x.2000.17710.x

240. Rose J.D., Rhea A.M., Weber J., et al. Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2009; 4(2): 136-42. doi: 10.1097/COH.0b013e328322f973
241. Koujah L., Shukla D., Naqvi A.R. CRISPR-Cas based targeting of host and viral genes as an antiviral strategy. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019; 96: 53-64. doi: 10.1016/j.semdb.2019.04.004
242. Liu Z., Chen S., Jin X., et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-1 infection. *Cell Biosci.* 2017; 7: 47. doi: 10.1186/s13578-017-0174-2
243. Xu L., Yang H., Gao Y., et al. CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance in vivo. *Mol. Ther.* 2017; 25(8): 1782-9. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.04.027
244. Li C., Guan X., Du T., et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4<sup>+</sup> T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(8): 2381-93. doi: 10.1099/vir.0.000139
245. Cho S.W., Kim S., Kim Y., et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 2014; 24(1): 132-41. doi: 10.1101/gr.162339.113
246. Hou P., Chen S., Wang S., et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci. Rep.* 2015; 5: 15577. doi: 10.1038/srep15577
247. Schumann K., Lin S., Boyer E., et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(33): 10437-42. doi: 10.1073/pnas.1512503112
248. Liu S., Wang Q., Yu X., et al. HIV-1 inhibition in cells with CXCR4 mutant genome created by CRISPR-Cas9 and piggyBac recombinant technologies. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 8573. doi: 10.1038/s41598-018-26894-4
249. Strich J.R., Chertow D.S. CRISPR-Cas biology and its application to infectious diseases. *J. Clin. Microbiol.* 2019; 57(4): e01307-18. doi: 10.1128/JCM.01307-18
250. Hu W., Kaminski R., Yang F., et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(31): 11461-6. doi: 10.1073/pnas.1405186111
251. Wang G., Zhao N., Berkhout B., et al. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res.* 2018; 244: 321-32. doi: 10.1016/j.virusres.2017.07.020
252. Yin C., Zhang T., Qu X., et al. In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Mol. Ther.* 2017; 25(5): 1168-86. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.012
253. Bella R., Kaminski R., Mancuso P., et al. Removal of HIV DNA by CRISPR from patient blood engrafts in humanized mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2018; 12: 275-82. doi: 10.1016/j.omtn.2018.05.021
254. World Health Organization; 2018. Finding a cure for hepatitis B: are we close? Available at: <http://www.who.int/hepatitis/news-events/hbv-cure-overview/en>
255. Li H., Sheng C., Wang S., et al. Removal of integrated hepatitis B virus DNA using CRISPR-Cas9. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7: 91. doi: 10.3389/fcimb.2017.00091
256. Scott T., Moyo B., Nicholson S., et al. ssAAVs containing cassettes encoding SaCas9 and guides targeting hepatitis B virus inactivate replication of the virus in cultured cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 7401. doi: 10.1038/s41598-017-07642-6
257. van Diemen F.R., Kruse E.M., Hooykaas M.J., et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. *PLoS Pathog.* 2016; 12(6): e1005701. doi: 10.1371/journal.ppat.1005701



258. Roehm P.C., Shekarabi M., Wollebo H.S., et al. Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy. *Sci. Rep.* 2016; 6: 23146. doi: 10.1038/srep23146
259. Wollebo H.S., Bellizzi A., Kaminski R., et al. CRISPR/Cas9 system as an agent for eliminating polyomavirus JC infection. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0136046. doi: 10.1371/journal.pone.0136046
260. Kennedy E.M., Kornepati A.V., 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. doi: 10.1128/JVI.01879-14
261. Rodwell C., Aymé S. 2014 Report on the state of the art of rare disease activities in Europe. Part II: Key developments in the field of rare diseases in Europe in 2013. European Union, Brussels, Belgium; 2014.
262. Porteus M.H. Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biol.* 2015; 16: 286. doi: 10.1186/s13059-015-0859-y
263. Vaidyanathan S., Salahudeen A.A., Sellers Z.M., et al. High-efficiency, selection-free gene repair in airway stem cells from cystic fibrosis patients rescues CFTR function in differentiated epithelia. *Cell Stem Cell.* 2020; 26(2): 161-71.e4. doi: 10.1016/j.stem.2019.11.002
264. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013; 13(6): 653-8. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002
265. Firth A.L., Menon T., Parker G.S., et al. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell Rep.* 2015; 12(9): 1385-90. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062
266. Vakulskas C.A., Dever D.P., Rettig G.R., et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* 2018; 24(8): 1216-24. doi: 10.1038/s41591-018-0137-0
267. Lomova A., Clark D.N., Campo-Fernandez B., et al. Improving gene editing outcomes in human hematopoietic stem and progenitor cells by temporal control of DNA repair. *Stem Cells.* 2019; 37(2): 284-94. doi: 10.1002/stem.2935
268. Martin R.M., Ikeda K., Cromer M.K., et al. Highly efficient and marker-free genome editing of human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 donor-mediated homologous recombination. *Cell Stem Cell.* 2019; 24(5): 821-8.e5. doi: 10.1016/j.stem.2019.04.001
269. Wattanapanitch M., Damkham N., Potirat P., et al. One-step genetic correction of hemoglobin E/beta-thalassemia patient-derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 system. *Stem Cell Res. Ther.* 2018; 9(1): 46. doi: 10.1186/s13287-018-0779-3
270. Patsali P., Turchiano G., Papasavva P., et al. Correction of IVS I-110(G>A)  $\beta$ -thalassemia by CRISPR/Cas-and TALEN-mediated disruption of aberrant regulatory elements in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Haematologica.* 2019; 104(11): e497-501. doi: 10.3324/haematol.2018.215178
271. Niu X., He W., Song B., et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in  $\beta$ -thalassemia-induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(32): 16576-85. doi: 10.1074/jbc.M116.719237
272. Monteys A.M., Ebanks S.A., Keiser M.S., et al. CRISPR/Cas9 editing of the mutant huntingtin allele in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 2017; 25(1): 12-23. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.010
273. Yang S., Chang R., Yang H., et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J. Clin. Invest.* 2017; 127(7): 2719-24. doi: 10.1172/JCI92087
274. Merienne N., Vachey G., de Longprez L., et al. The self-inactivating KamiCas9 system for the editing of CNS disease genes. *Cell Rep.* 2017; 20(12): 2980-91. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.075

275. Ekman F.K., Ojala D.S., Adil M.M., et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a Huntington's disease mouse model. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2019; 17: 829-39. doi: 10.1016/j.omtn.2019.07.009
276. Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G., et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2016; 351(6271): 403-7. doi: 10.1126/science.aad5143
277. Nelson C.E., Wu Y., Gemberling M.P., et al. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 2019; 25(3): 427-32. doi: 10.1038/s41591-019-0344-3
278. Min Y.L., Li H., Rodriguez-Caycedo C., et al. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci. Adv.* 2019; 5(3): eaav4324. doi: 10.1126/sciadv.aav4324
279. Bengtsson N.E., Hall J.K., Odom G.L., et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14454. doi: 10.1038/ncomms14454
280. Amoasii L., Hildyard J.C.W., Li H., et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*. 2018; 362(6410): 86-91. doi: 10.1126/science.aau1549
281. Zhang Y., Long C., Li H., et al. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice. *Sci. Adv.* 2017; 3(4): e1602814. doi: 10.1126/sciadv.1602814
282. Stephens C.J., Lauron E.J., Kashentseva E., et al. Long-term correction of hemophilia B using adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *J. Control. Release*. 2019; 298: 128-41. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.02.009
283. Hu Z., Zhou M., Wu Y., et al. ssODN-mediated in-frame deletion with CRISPR/Cas9 restores FVIII function in hemophilia A-patient-derived iPSCs and ECs. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2019; 17: 198-209. doi: 10.1016/j.omtn.2019.05.019
284. Lyu C., Shen J., Wang R., et al. Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells from patients with hemophilia B using the CRISPR-Cas9 system. *Stem Cell Res. Ther.* 2018; 9(1): 92. doi: 10.1186/s13287-018-0839-8
285. Chen H., Shi M., Gilam A., et al. Hemophilia A ameliorated in mice by CRISPR-based in vivo genome editing of human Factor VIII. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 16838. doi: 10.1038/s41598-019-53198-y
286. Chung J.Y., Ain Q.U., Song Y., et al. Targeted delivery of CRISPR interference system against *Fabp4* to white adipocytes ameliorates obesity, inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Genome Res.* 2019; 29(9): 1442-52. doi: 10.1101/gr.246900.118
287. Maxwell K.G., Augsornworawat P., Velazco-Cruz L., et al. Gene-edited human stem cell-derived  $\beta$  cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci. Transl. Med.* 2020; 12(540): eaax9106. doi: 10.1126/scitranslmed.aax9106
288. Cho E.Y., Ryu J.Y., Lee H.A.R., et al. Lecithin nano-liposomal particle as a CRISPR/Cas9 complex delivery system for treating type 2 diabetes. *J. Nanobiotechnology*. 2019; 17(1): 19. doi: 10.1186/s12951-019-0452-8
289. Grotz A.K., Abaitua F., Navarro-Guerrero E., et al. A CRISPR/Cas9 genome editing pipeline in the EndoC- $\beta$ H1 cell line to study genes implicated in beta cell function. *Wellcome Open Res.* 2020; 4: 150. doi: 10.12688/wellcomeopenres.15447.2
290. Olivaes J., Bonamino M.H., Markoski M.M. CRISPR/Cas 9 system for the treatment of dilated cardiomyopathy: A hypothesis related to function of a MAP kinase. *Med. Hypotheses*. 2019; 128: 91-3. doi: 10.1016/j.mehy.2019.05.013

291. Zhao H., Li Y., He L., et al. In vivo AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 2020; 141(1): 67-79. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042476
292. Caron J., Pène V., Tolosa L., et al. Low-density lipoprotein receptor-deficient hepatocytes differentiated from induced pluripotent stem cells allow familial hypercholesterolemia modeling, CRISPR/Cas-mediated genetic correction, and productive hepatitis C virus infection. *Stem Cell Res. Ther.* 2019; 10(1): 221. doi: 10.1186/s13287-019-1342-6
293. Wang X., Raghavan A., Chen T., et al. CRISPR-Cas9 targeting of PCSK9 in human hepatocytes *in vivo* — brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016; 36(5): 783-6. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307227
294. Liu X., Zhang Y., Cheng C., et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res.* 2017; 27(1): 154-7. doi: 10.1038/cr.2016.142
295. Choi B.D., Yu X., Castano A.P., et al. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *J. Immunother. Cancer.* 2019; 7(1): 304. doi: 10.1186/s40425-019-0806-7
296. McGowan E., Lin Q., Ma G., et al. PD-1 disrupted CAR-T cells in the treatment of solid tumors: promises and challenges. *Biomed. Pharmacother.* 2020; 121: 109625. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109625
297. Guo X., Jiang H., Shi B., et al. Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: 1118. doi: 10.3389/fphar.2018.01118
298. Liu J., Zhou G., Zhang L., et al. Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing. *Front. Immunol.* 2019; 10: 456. doi: 10.3389/fimmu.2019.00456
299. Nakazawa T., Natsume A., Nishimura F., et al. Effect of CRISPR/Cas9-mediated PD-1-disrupted primary human third-generation CAR-T cells targeting EGFRvIII on *in vitro* human glioblastoma cell growth. *Cells.* 2020; 9(4): 998. doi: 10.3390/cells9040998
300. Ren J., Zhang X., Liu X., et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget.* 2017; 8(10): 17002-11. doi: 10.18632/oncotarget.15218
301. Ren J., Liu X., Fang C., et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23(9): 2255-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300
302. Zhang Y., Zhang X., Cheng C., et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front. Med.* 2017; 11(4): 554-62. doi: 10.1007/s11684-017-0543-6
303. Blaeschke F., Willier S., Stenger D., et al. Leukemia-induced dysfunctional TIM-3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> bone marrow T cells increase risk of relapse in pediatric B-precursor ALL patients. *Leukemia.* 2020. doi: 10.1038/s41375-020-0793-1
304. Stadtmayer E.A., Fraietta J.A., Davis M.M., et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science.* 2020; 367(6481): eaba7365. doi: 10.1126/science.aba7365
305. Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T., et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017; 543(7643): 113-7. doi: 10.1038/nature21405
306. Dai X., Park J.J., Du Y., et al. One-step generation of modular CAR-T cells with AAV-Cpf1. *Nat. Methods.* 2019; 16(3): 247-54. doi: 10.1038/s41592-019-0329-7
307. MacLeod D.T., Antony J., Martin A.J., et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR alpha chain locus streamlines production of allogeneic gene-edited CAR T Cells. *Mol. Ther.* 2017; 25(4): 949-61. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.02.005

308. Liu X., Zhao Y. CRISPR/Cas9 genome editing: Fueling the revolution in cancer immunotherapy. *Curr. Res. Transl. Med.* 2018; 66(2): 39-42. doi: 10.1016/j.retram.2018.04.003
309. Roth T.L., Puig-Saus C., Yu R., et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* 2018; 559(7714): 405-9. doi: 10.1038/s41586-018-0326-5
310. Song X., Liu C., Wang N., et al. Delivery of CRISPR/Cas systems for cancer gene therapy and immunotherapy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2020; S0169-409X(20)30030-2. doi: 10.1016/j.addr.2020.04.010
311. Wang H.X., Li M., Lee C.M., et al. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem. Rev.* 2017; 117(15): 9874-906. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00799
312. Kotterman M.A., Chalberg T.W., Schaffer D.V. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2015; 17: 63-89. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104938
313. Xu C.L., Ruan M.Z.C., Mahajan V.B., et al. Viral delivery systems for CRISPR. *Viruses.* 2019; 11(1): 28. doi: 10.3390/v11010028
314. Wan T., Niu D., Wu C., et al. Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: current status and future outlook. *Mater. Today.* 2019; 26: 40-66. doi: 10.1016/j.mattod.2018.12.003
315. Pardee K., Green A.A., Takahashi M.K., et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell.* 2016; 165: 1255-1266. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.059.
316. Müller V., Rajer F., Frykholm K., et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Sci. Rep.* 2016; 6: 37938. doi: 10.1038/srep37938
317. Guk K., Keem J.O., Hwang S.G., et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosens Bioelectron.* 2017; 95: 67-71. doi: 10.1016/j.bios.2017.04.016
318. Quan J., Langelier C., Kuchta A., et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(14): e83. doi: 10.1093/nar/gkz418
319. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* 2018; 360(6387): 436-9. doi: 10.1126/science.aar6245
320. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science.* 2018; 360(6387): 439-44. doi: 10.1126/science.aaq0179
321. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science.* 2018; 360(6387): 444-8. doi: 10.1126/science.aas8836
322. Doench J.G., Fusi N., Sullender M., et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34(2): 184-91. doi: 10.1038/nbt.3437
323. Sanson K.R., Hanna R.E., Hegde M., et al. Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. *Nat. Commun.* 2018; 9(1): 5416. doi: 10.1038/s41467-018-07901-8
324. Kim H.K., Min S., Song M., et al. Deep learning improves prediction of CRISPR-Cpf1 guide RNA activity. *Nat. Biotechnol.* 2018; 36(3): 239-41. doi: 10.1038/nbt.4061

325. Sanson K.R., DeWeirdt P.C., Sangree A.K., et al. Optimization of AsCas12a for combinatorial genetic screens in human cells. *bioRxiv*. 2020. doi.org: 10.1101/747170
326. Montague T.G., Cruz J.M., Gagnon J.A., et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Web Server issue): W401-7. doi: 10.1093/nar/gku410
327. Labun K., Montague T.G., Gagnon J.A., et al. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1): W272-6. doi: 10.1093/nar/gkw398
328. Labun K., Montague T.G., Krause M., et al. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(W1): W171-4. doi: 10.1093/nar/gkz365
329. Haeussler M., Schönig K., Eckert H., et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 2016; 17(1): 148. doi: 10.1186/s13059-016-1012-2
330. Heigwer F., Kerr G., Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods.* 2014; 11(2): 122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812
331. Bae S., Park J., Kim J.S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics.* 2014; 30(10): 1473-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btu048
332. Cradick T.J., Qiu P., Lee C.M., et al. COSMID: a web-based tool for identifying and validating CRISPR/Cas off-target sites. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2014; 3(12): e214. doi: 10.1038/mtna.2014.64
333. Zhao C., Zheng X., Qu W., et al. CRISPR-offfinder: a CRISPR guide RNA design and off-target searching tool for user-defined protospacer adjacent motif. *Int. J. Biol. Sci.* 2017; 13(12): 1470-8. doi: 10.7150/ijbs.21312
334. Kurtz S., Schleiermacher C. REPuter: fast computation of maximal repeats in complete genomes. *Bioinformatics.* 1999; 15(5): 426-7. doi: 10.1093/bioinformatics/15.5.426
335. Abouelhoda M.I., Kurtz S., Ohlebusch E. Replacing suffix trees with enhanced suffix arrays. *J. Discrete Algorithms.* 2004; 2: 53-86. doi: 10.1016/S1570-8667(03)00065-0
336. Biswas A., Fineran P.C., Brown C.M. Accurate computational prediction of the transcribed strand of CRISPR non-coding RNAs. *Bioinformatics.* 2014; 30(13): 1805-13. doi: 10.1093/bioinformatics/btu114
337. Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F., et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11: 119. doi: 10.1186/1471-2105-11-119
338. Abby S.S., Néron B., Ménager H., et al. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS One.* 2014; 9(10): e110726. doi: 10.1371/journal.pone.0110726
339. Biswas A., Gagnon J.N., Brouns S.J., et al. CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biol.* 2013; 10(5): 817-27. doi: 10.4161/rna.24046
340. Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., et al. CRISPRstrand: predicting repeat orientations to determine the crRNA-encoding strand at CRISPR loci. *Bioinformatics.* 2014; 30(17): i489-96. doi: 10.1093/bioinformatics/btu459
341. Lange S.J., Alkhnbashi O.S., Rose D., et al. CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(17): 8034-44. doi: 10.1093/nar/gkt606

342. Raden M., Ali S.M., Alkhnbashi O.S., et al. Freiburg RNA tools: a central online resource for RNA-focused research and teaching. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1): W25-9. doi: 10.1093/nar/gky329
343. Nethery M.A., Barrangou R. CRISPR Visualizer: rapid identification and visualization of CRISPR loci via an automated high-throughput processing pipeline. *RNA Biol.* 2019; 16(4): 577-84. doi: 10.1080/15476286.2018.1493332
344. Dion M.B., Labrie S.J., Shah S.A., et al. CRISPRStudio: a user-friendly software for rapid CRISPR array visualization. *Viruses.* 2018; 10(11): 602. doi: 10.3390/v10110602
345. Clement K., Rees H., Canver M.C., et al. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat. Biotechnol.* 2019; 37(3): 224-6. doi: 10.1038/s41587-019-0032-3
346. Park J., Lim K., Kim J.S., et al. Cas-analyzer: an online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics.* 2017; 33(2): 286-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw561
347. Güell M., Yang L., Church G.M. Genome editing assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA). *Bioinformatics.* 2014; 30(20): 2968-70. doi: 10.1093/bioinformatics/btu427
348. Brinkman E.K., Chen T., Amendola M., et al. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(22): e168. doi: 10.1093/nar/gku936
349. Brinkman E.K., Chen T., de Haas M., et al. Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Mol. Cell.* 2018; 70(5): 801-13.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.016

## ГЛАВА 4

# Способы определения неспецифической активности систем редактирования генома

---

Все исследователи, применяющие в своей работе те или иные системы редактирования генома (программируемые нуклеазы), независимо от организма-мишени, сталкиваются с одинаковыми проблемами: подтверждение желаемой мутации в целевой последовательности и выявление нежелательных, но предсказуемых мутаций за пределами целевого участка (off-target сайты).

На сегодняшний день все программируемые нуклеазы, которые применяют для направленного редактирования/изменения генома (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas), генерируют мутации за пределами целевого локуса в сайтах, которые могут отличаться от целевой последовательности несколькими нуклеотидами. Образование двунитевых разрывов в нецелевых локусах генома может привести к инсерции или делеции, а также транслокации, которые нужно тщательно контролировать [1]. Понимание и предотвращение эффектов неспецифического редактирования важно как для фундаментальных, так и для прикладных целей.

Для выявления мутаций, не являющихся целевыми (мишенями), специально были разработаны методы, большинство из которых основаны на определенном варианте скрининга для выявления мутаций либо в предварительно выбранных областях, либо в масштабе всего генома.

### 4.1. Методы подтверждения нецелевых мутаций в предсказанных сайтах

Одна из стратегий определения нецелевых сайтов системы CRISPR/Cas основывается на поиске потенциальных локусов, связывающихся с направляющей РНК, с помощью биоинформатических методов, так называемое предсказание *in silico*. Предсказанные *in silico* нецелевые сайты узнавания системы CRISPR/Cas затем анализируются с помощью стандартных методов, таких как ПЦР и анализ образования гетеродуплексов или высокопроизводительное секвенирование ПЦР-продуктов. Различные исследовательские группы представили обширные

данные о возможных нецелевых изменениях, вносимых разными системами CRISPR/Cas. На основе полученных данных были разработаны более точные алгоритмы для определения потенциальных нецелевых сайтов off-target: Cas-OFFinder ([www.genome.net/cas-offinder](http://www.genome.net/cas-offinder)) [2], Feng Zhang Lab's Target Finder (<http://crispr.mit.edu>), CasFinder (<http://arep.med.harvard.edu/CasFinder/>), CRISPR Design Tool (<http://www.genome-engineering.org>) [3], E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP>) [4], Breaking-cas (<http://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/breakingcas>) [5] и др. Данные алгоритмы использовались несколькими исследовательскими группами для определения потенциальных нецелевых сайтов. Так, например, Ю. Чен и соавт. выявили потенциальные (кандидатные) гены в человеческих плюрипотентных стволовых клеточных линиях, которые могут подвергаться неспецифическому редактированию. Авторы применили алгоритм Feng Zhang Lab's Target Finder и проанализировали 114 потенциальных нецелевых off-target сайтов, ни в одном из которых не было обнаружено делеций и инсерций [6]. Другие авторы с помощью анализа данных, полученных в ходе глубокого секвенирования, направленного на выявление ограниченного числа нецелевых сайтов, пришли к выводу, что редактирование происходит даже в местах, сильно отличающихся от предполагаемого целевого сайта [3, 7, 8].

Оптимальной последовательностью PAM (protospacer adjacent motif), распознаваемой Cas9, является 5'-NGG-3', однако этот белок может распознавать и расщеплять сайты, оканчивающиеся на 5'-NAG-3' или 5'-NGA-3'. Расщепление вблизи данных последовательностей происходит менее эффективно, но данные последовательности могут выступать в роли PAM-подобного мотива. Стоит отметить, что расщепление ДНК происходит даже при наличии несоответствия до 6 нуклеотидов в последовательности протоспейсера, а также однонуклеотидных инсерций и/или делеций. Такие несоответствия меньше влияют на эффективность работы системы CRISPR/Cas, когда располагаются ближе к 5'-концу последовательности протоспейсера.

Проведенные исследования показали достаточно сложную картину специфичности Cas9. Эффекты одного несоответствия не всегда предсказуемы только на основании их положения в направляющей РНК. Кроме того, на частоту расщепления оказывает влияние не только геном, но и эпигеномные факторы, что, в свою очередь, очень затрудняет разработку алгоритма, способного идентифицировать все потенциальные нецелевые сайты. Можно сделать вывод, что использование вышеупомянутых методов должно сопровождаться дополнительными исследованиями, которые позволят достоверно определять нецелевые off-target сайты.

## 4.2. Методы скрининга нецелевых мутаций по всему геному

### 4.2.1. Полногеномное секвенирование

Наряду с широким распространением применения полногеномного секвенирования (Whole genome sequencing, WGS), особенно учитывая скрининговый потенциал данного метода, возможность его использования для определения



нецелевых мутаций, возникающих в ходе редактирования генома, вполне очевидна. Однако этот метод является дорогостоящим и может быть использован для относительно небольшого количества клонов. С помощью секвенирования полного генома можно определить не только инсерции, делеции и однонуклеотидные замены, но и структурные варианты, такие как инверсии, перестройки (транслокации), дупликации и крупные делеции [9]. Ограничение применения метода WGS с использованием небольшого количества клонов для анализа означает, что большинство нецелевых редких мутаций могут быть пропущены [10]. Тем не менее данный метод был применен для определения нецелевых мутаций, возникающих при редактировании генома с использованием CRISPR/Cas9, для ряда видов, включая человека (плюрипотентные стволовые клетки) [11, 12], мышь [13], нематоду [14] и растения [15, 16].

#### 4.2.2. Секвенирование полного экзома

Секвенирование полного экзома изначально было разработано как компромисс между таргентным секвенированием и секвенированием всего генома для изучения вариаций в генах человека. Секвенирование всех белок-кодирующих областей в геноме позволяет идентифицировать релевантные варианты нецелевых мутаций в экземе, и значительно дешевле секвенирования полного генома [17]. В зависимости от организма в этом подходе должен быть охвачен только небольшой процент генома, но мутации в регуляторных или некодирующих областях, таких как интроны, не обнаруживаются. Таким образом, секвенирование экзома ограничено высокой частотой ложноотрицательных результатов, а многие нецелевые мутации могут быть пропущены [18, 19].

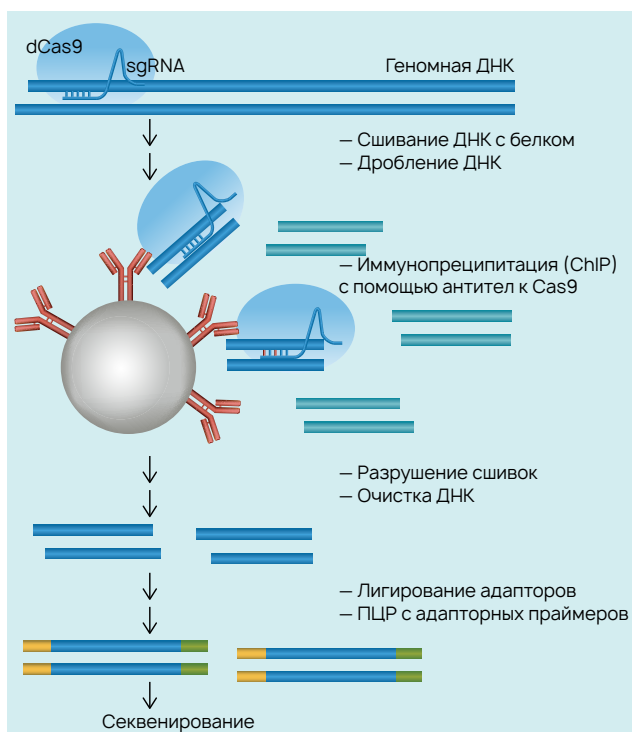
#### 4.2.3. Хроматин-иммунопреципитационное секвенирование (ChIP-seq)

Хроматин-иммунопреципитационное секвенирование — метод, применяемый для поиска потенциальных нецелевых сайтов, — позволяет определить все сайты связывания рибонуклеопротеинового комплекса, содержащего конкретную направляющую РНК и белок Cas, с ДНК. Этот непрямой метод предполагает, что наличие рибонуклеопротеинового комплекса в каждом локусе генома свидетельствует о внесенном двуниевом разрыве (double strand breaks, DSB).

Известно, что иммунопреципитация хроматина — наиболее предпочтительная технология для изучения фрагментов ДНК, которые связаны с белками [20, 21]. Метод включает обработку живых клеток формальдегидом, что вызывает образование ковалентных сшивок между ДНК и близко расположенными участками белков, а также белок-белковых сшивок. После такой обработки хроматин «дробится» (расщепляется, гидролизуются), и с помощью иммунопреципитации со специфическими антителами выделяются районы ДНК, с которыми связываются интересующие исследователя белки [22]. Комбинация иммунопреципита-

ции хроматина и высокопроизводительного секвенирования (ChIP-seq) позволяет определять сайты, где конкретные белки связаны с ДНК на уровне всего генома (полногеномное распределение сайтов связывания).

Подобно факторам транскрипции, белки Cas, в том числе Cas9, могут узнавать и связываться с участком ДНК, связанным направляющей РНК (**рис. 4.1**). В данном методе белок Cas9 заменяется на его каталитически неактивную форму (dCas9), которая в комплексе с одной направляющей РНК может связываться более чем с 1000 локусов ДНК, хотя менее чем 50% этих сайтов достоверно гидролизуются белком Cas9 [23]. Ряд исследований подтвердили расщепление в сайтах связывания dCas9, тогда как другие обнаружили, что редактирование генома в сайтах, связанных с Cas9, практически отсутствует. Например, Р. Ченчик и соавторы обнаружили, что из 43 локусов, предсказанных с помощью метода ChIP-seq для направляющей РНК системы CRISPR/Cas, нацеленной на локус Trp53, двунитевые разрывы были подтверждены только по одному сайту в целевой и нецелевой последовательностях [24]. В другом исследовании К. Куску и соавторы картировали сайты связывания dCas9 по всему геному для 12 различных направляющих РНК и обнаружили значительное расщепление в 50% предсказанных нецелевых сайтов [25]. Таким об-



**Рис. 4.1.** Схема метода ChIP-seq.

разом, этот метод может дать важную информацию о потенциальных сайтах связывания системы CRISPR/Cas9, но его результаты не всегда соответствуют реальной активности нуклеаз в сайтах вне целевой последовательности.

#### 4.2.4. Лентивирусные векторы, дефицитные по интегразе

Технология с применением лентивирусных векторов, дефицитных по интегразе (Integrase-Defective Lentiviral Vectors, IDLV), была одной из первых для определения целевой и нецелевой активности ZFN на уровне полного генома [26]. Векторы типа IDLV, как и их интеграза-компетентные лентивирусные гомологи, могут встраиваться в большинство клеток с высокой эффективностью. Однако, поскольку IDLV являются дефицитными по интегразе, они остаются в ядрах клеток-мишеней в качестве эписомальной ДНК. Такие эписомальные векторы могут быть интегрированы в сайты двуниевых разрывов, что легло в основу их применения для оценки неспецифической активности не только ZFN, но и TALE- и CRISPR/Cas-нуклеаз [27].

Для анализа потенциальных нецелевых сайтов векторы IDLV трансдуцируются в клетки одновременно с системой редактирования генома, например, ZFN (рис. 4.2). Как только образуется двуниевый разрыв, IDLV интегрируется в это место. Затем выделяется геномная ДНК, которая фрагментируется до необходи-

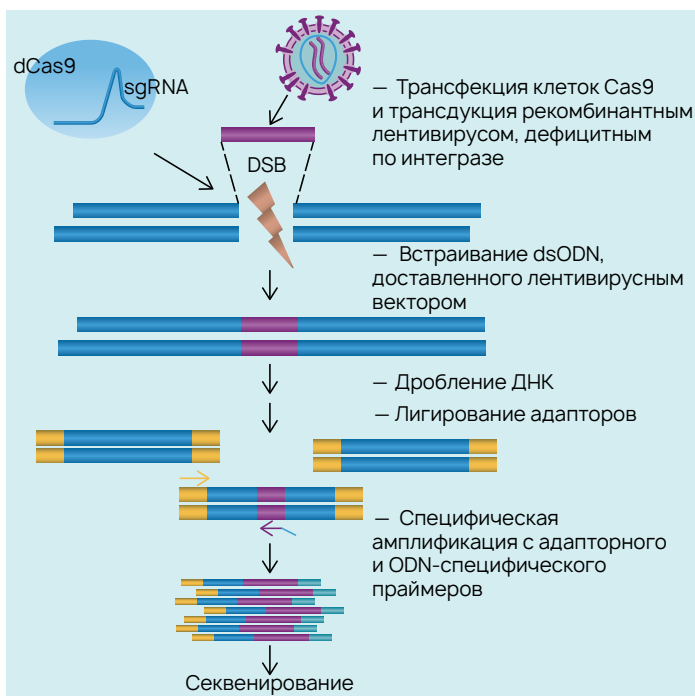


Рис. 4.2. Схема метода IDLV.

мого размера, и полученные фрагменты лигируются с адапторами. С помощью ПЦР и последующего секвенирования определяется геномное распределение сайтов встраивания IDLV, которые и представляют собой потенциальные нецелевые локусы генома [26].

Основное преимущество данной технологии объясняется высокой эффективностью встраивания векторов IDLV в ядра клеток-мишеней, включая трудно трансфецируемые первичные клетки человека. Однако этот метод требует постановки соответствующих контрольных образцов, т.к. не исключено случайное встраивание IDLV в геном клеток-мишеней [28].

#### 4.2.5. Полногеномное определение двуниевых разрывов с помощью секвенирования

Метод полногеномного определения двуниевых разрывов с помощью секвенирования (Genome-wide Unbiased Identification of DSBs Enabled by sequencing, GUIDE-seq) основан на включении в двуниевые разрывы, внесенные Cas9, коротких двуцепочечных олигонуклеотидов (dsODN), защищенных фосфотиоатной связью (рис. 4.3) [30]. Такие dsODN служат меткой для дальнейшей амплификации участков генома, содержащих двуниевые разрывы, которые затем идентифицируются с помощью высокопроизводительного секвенирования. Определение двуниевых разрывов происходит путем картирования полученных прочтений на референсный геном. GUIDE-seq достаточно

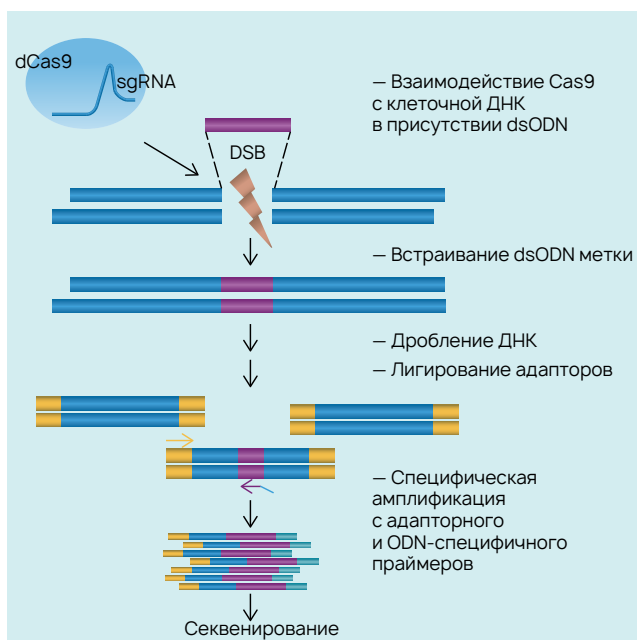


Рис. 4.3. Схема метода GUIDE-seq.

чувствителен и способен обнаруживать нецелевые сайты, встречающиеся с частотой 0,1% на клеточную популяцию.

Впервые данный метод был использован для выявления нецелевых сайтов 10 различных направляющих РНК, соответствующих разным генам клеток двух типов. Авторам удалось обнаружить нецелевые локусы, содержащие до 6 несоответствий между предполагаемыми сайтами связывания направляющей РНК и последовательностью мишени (т.е. в последовательности прото-спейсера) [29]. С помощью метода GUIDE-seq было показано, что расщепление некоторых нецелевых сайтов встречается гораздо чаще, чем образуются двунитевые разрывы в целевых локусах.

Принципиальным преимуществом данной технологии является точность, с которой встраивание dsODN может определять нецелевые сайты, а также прямая корреляция между количеством прочтений в том или ином сайте и частотой образования двунитевых разрывов, внесенных системой CRISPR/Cas. Основное ограничение данного метода связано с низкой эффективностью трансфекции клеток-мишеней [28].

#### **4.2.6. Прямое мечение разрывов *in situ*, обогащение с помощью стрептавидина и NGS**

Технология прямого мечения разрывов *in situ*, обогащения с помощью стрептавидина и NGS (direct *in situ* Breaks Labeling, Enrichment on Streptavidin, and next-generation Sequencing, BLESS) предполагает картирование двунитевых разрывов по всему геному с помощью лигирования к свободным концам этих разрывов биотинилированного линкера с последующей гибридизацией биотинилированных фрагментов со стрептавидином (рис. 4.4). Меченные таким образом фрагменты затем лигируются с баркодирующим линкером; после чего проводят ПЦП с праймерами, специфичными к использованным меткам, и секвенирование [30].

Преимуществом данного метода по сравнению с другими, основанными на мечении двунитевых разрывов, является то, что сами разрывы мечаются легче, чем белки, ассоциированные с ними. Несколько исследовательских групп, применивших BLESS для определения разрывов, внесенных разными вариантами Cas9, на мышях и человеческих клетках наблюдали низкую частоту нецелевой активности [31, 32]. Несмотря на то, что данный метод позволяет картировать разрывы по всему геному, с его помощью можно определить только те двунитевые разрывы, которые имеются в момент их мечения, но не так называемые ранние разрывы, которые уже подверглись репарации [33].

#### **4.2.7. Полногеномное секвенирование транслокаций, опосредованное линейной амплификацией**

Для определения («отслеживания») геномных транслокаций, полученных вследствие репарации двунитевых разрывов, внесенных программируемыми нуклеазами (TALEN и Cas9), разработана технология полногеномного секвенирова-

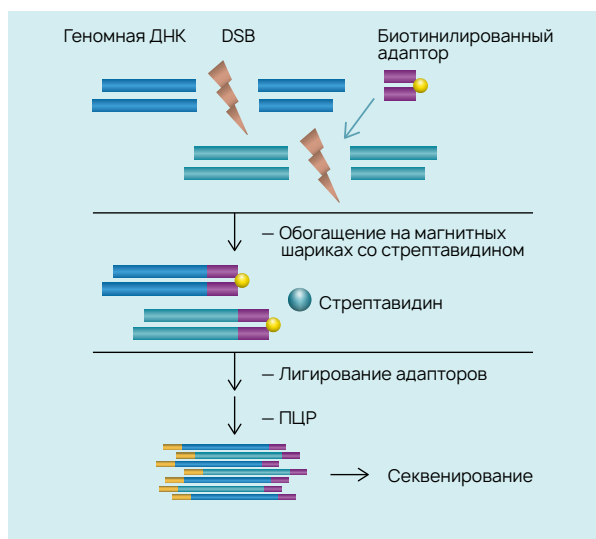


Рис. 4.4. Схема метода BLESS.

ния транслокаций, опосредованного линейной амплификацией (Linear Amplification-Mediated High-Throughput Genome-wide Translocation Sequencing, LAM-HT-GTS) [34]. Согласно этому методу, введенная в клетку программируемая нуклеаза расщепляет последовательность затравки (DSB-затравки), полученный разрыв репарируется путем лигирования с другим двунитевым разрывом (рис. 4.5). В результате этого процесса могут возникать хромосомные транслокации в случае, если разрывы расположены в разных хромосомах или в разных локусах одной хромосомы. Затем геномная ДНК выделяется и фрагментируется с помощью ультразвука. Ввиду того, что последовательность затравки известна, с помощью линейной ПЦР с биотинилированным олигонуклеотидом, специфичным к затравке, можно амплифицировать область транслокации, включающую неизвестный двунитевой разрыв. Биотинилированная одноцепочечная ДНК очищается с помощью магнитных частиц с иммобилизованным на поверхности стрептавидином. К концу очищенной биотинилированной ДНК лигируются адаптеры и проводится ПЦР. Полученные амплифицированные фрагменты подвергаются пробоподготовке для последующего высокопроизводительного секвенирования. Репарированные двунитевые разрывы, которые не подверглись транслокации, несут сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции, который может быть использован для селективного расщепления, и не будут амплифицированы и секвенированы.

С помощью стандартной технологии LAM-HTGTS не удастся идентифицировать маленькие инсерции, делеции или однонуклеотидные замены, но она может быть модифицирована в соответствии с такими задачами. В этом случае потребуется большая глубина секвенирования, что позволит компенсировать большое число прочтений нетранслоцированных мутаций и самой затравки.

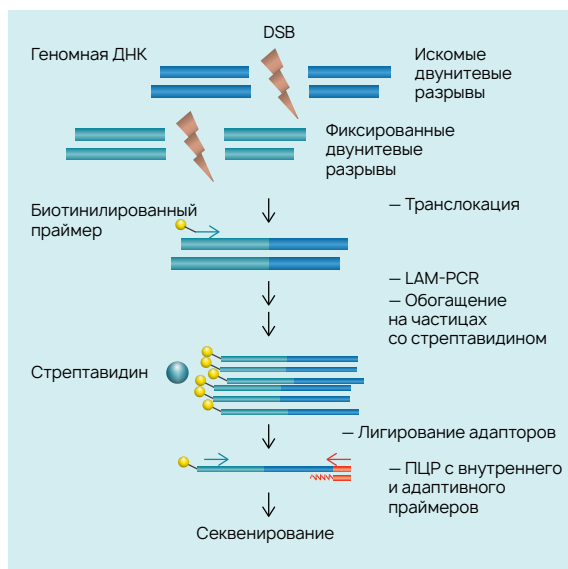


Рис. 4.5. Схема метода LAM-HTGTS.

Технология LAM-HTGTS представляет собой качественный метод для скринирования клеток на крупные геномные перестройки, произошедшие в результате действия программируемых нуклеаз как в целевых, так и нецелевых последовательностях. Однако следует отметить, что после образования двунитевых разрывов транслокации возникают с достаточно низкой частотой, по некоторым оценкам, — 1 транслокация на 300 клеток, что говорит об ограничениях применения данного метода для достоверного определения всех нецелевых локусов [35].

#### 4.2.8. Секвенирование полного генома, «расщепленного» Cas9 *in vitro*

Белок Cas9 может выступать не только в роли инструмента редактирования генома, но также может быть использован *in vitro* в качестве нуклеазы для профилирования off-target эффектов выбранных направляющих РНК. Это и лежит в основе технологии секвенирования полного генома, «расщепленного» Cas9 *in vitro* (*in vitro* Cas9-digested whole genome sequencing, Digenome-seq), согласно которой внеклеточная геномная ДНК расщепляется белком Cas9 *in vitro*, и полученные фрагменты секвенируются с помощью NGS (рис. 4.6). Геномная ДНК выделяется из трансфицированных клеток двух типов — как с введенными нуклеазами, так и без них. Полученная ДНК подвергается модификации с использованием CRISPR/Cas9 *in vitro*. Для немодифицированных генов двунитевые разрывы будут внесены в точных (конкретных) позициях, таким образом, представляя профили прямого выравнивания после секве-

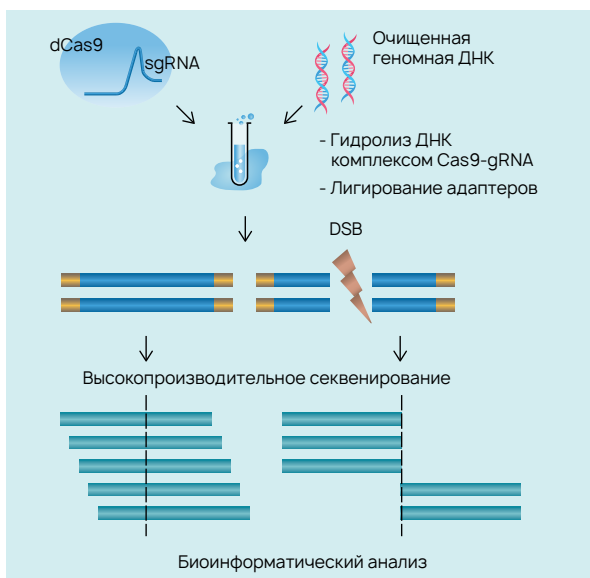


Рис. 4.6. Схема метода Digenome-seq.

нирования [36]. Последовательности генов с мутациями будут отличаться от таковых у немодифицированных генов, которые не могут быть распознаны Cas9 *in vitro*, что приводит к ступенчатому выравниванию после секвенирования. Таким образом, технология Digenome-seq дает возможность на основе профилей выравниваний последовательностей создать список потенциальных нецелевых сайтов распознавания нуклеазы CRISPR/Cas.

Технологию Digenome-seq можно применять и в формате мультиплексирования, что позволяет анализировать до 10 направляющих РНК одновременно. Преимуществом данного метода является то, что для Digenome-seq не требуется амплификация, а разрывы, полученные *in vitro*, не подвергаются репарации. Также с помощью данной технологии не определяются двунитевые разрывы ДНК, возникающие в клетке случайным образом [37]. Однако искусственная среда внеклеточной геномной ДНК, в свою очередь, порождает потенциальный недостаток технологии Digenome-seq: различия между активностью *in vitro* и *in vivo* и специфичностью Cas9 могут привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам [38].

Чтобы выяснить, влияет ли структура хроматина в эукариотических клетках на мишень и на активность CRISPR/Cas9, авторы технологии Digenome-seq сначала идентифицировали серию идентичных эндогенных последовательностей ДНК, присутствующих в областях как с высокой, так и с низкой степенью компактизации хроматина, а затем измерили частоты мутаций для этих сайтов в клетках человека с помощью Cas9 в комплексе с полностью комплементарными (точными) и содержащими замены на-



правляющими РНК [39]. В отличие от точных направляющих РНК, те, что содержали замены, были очень чувствительными к состояниям хроматина. Это позволило предположить, что хроматин препятствует расщеплению ДНК вне цели. Затем с помощью методики Digenome-seq, проведенной параллельно на бесклеточной хроматиновой ДНК и не содержащей гистонов геномной ДНК, было показано, что в хроматиновой ДНК можно идентифицировать лишь небольшую часть двуцепочечных разрывов, обнаруженных в геномной ДНК. Это свидетельствует о том, что хроматин может ингибировать нецелевые эффекты Cas9 по всему геному в клетках в пользу его специфичности.

#### 4.2.9. Селективное обогащение и идентификация меченых концов геномной ДНК с помощью секвенирования

Технология селективного обогащения и идентификации меченых концов геномной ДНК с помощью секвенирования (Selective enrichment and Identification of Tagged genomic DNA Ends by sequencing, SITE-seq), как и BLESS, основывается на мечении двунитевых разрывов. Выделенная геномная ДНК подвергается модификации с помощью CRISPR/Cas9 *in vitro* (рис. 4.7), что приводит к возникновению двунитевых разрывов как в целевых, так и в нецелевых областях. К свободным концам разрывов лигируется биотинилированный адаптер, после

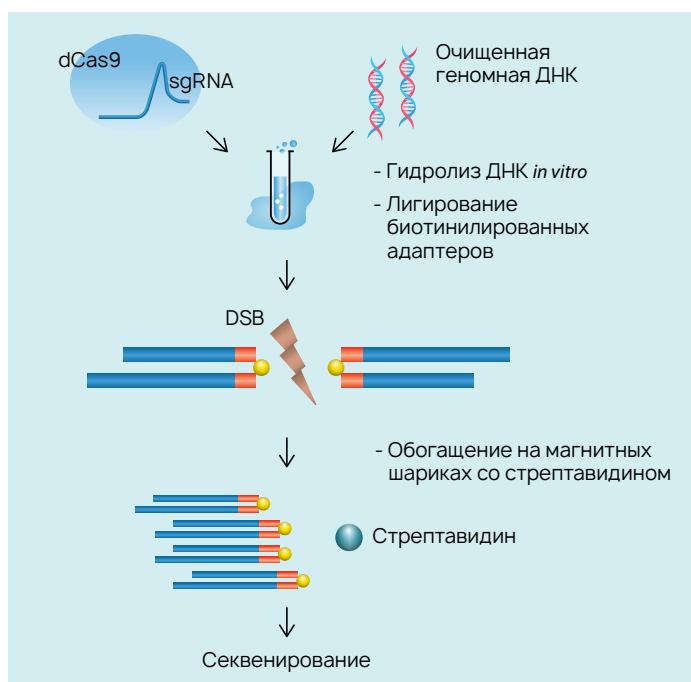


Рис. 4.7. Схема метода SITE-seq.

фрагментации ДНК следуют лигирование второго адаптера и гибридизация на магнитных частицах с иммобилизованным на поверхности стрептавидином. Полученные фрагменты амплифицируются, и проводится секвенирование [40].

В отличие от технологии BLESS, SITE-seq не зависит от эндогенной репарации. Таким образом, с помощью данной технологии можно выявлять большее число нецелевых сайтов, которые, в свою очередь, определяются в соответствии с профилями (паттернами) выравнивания, благодаря чему величина покрытия анализируемых последовательностей может быть значительно снижена [37].

#### 4.2.10. Циркуляризация для определения двуцепочечных разрывов и секвенирование

Технология циркуляризации для определения двуцепочечных разрывов и секвенирования (Circularisation for *in vitro* reporting of cleavage effects by sequencing, CIRCLE-seq) характеризуется большей чувствительностью по сравнению с описанной ранее Digenome-seq [41]. Для применения CIRCLE-seq выделенная фрагментированная геномная ДНК замыкается в ковалентно замкнутое кольцо (т.е. циркуляризуется) и подвергается расщеплению с помощью CRISPR/Cas9 *in vitro* (рис. 4.8). При взаимодействии нуклеазы Cas9 как с целевыми, так и с нецелевыми локусами кольцевые ДНК превращаются в линейные структуры со свободными концами, к которым лигируются адаптеры, затем проводится ПЦП с последующим секвенированием.

Следует отметить, что авторы данной технологии при ее разработке применяли стратегии, не зависящие от эндонуклеаз рестрикции, для генерации

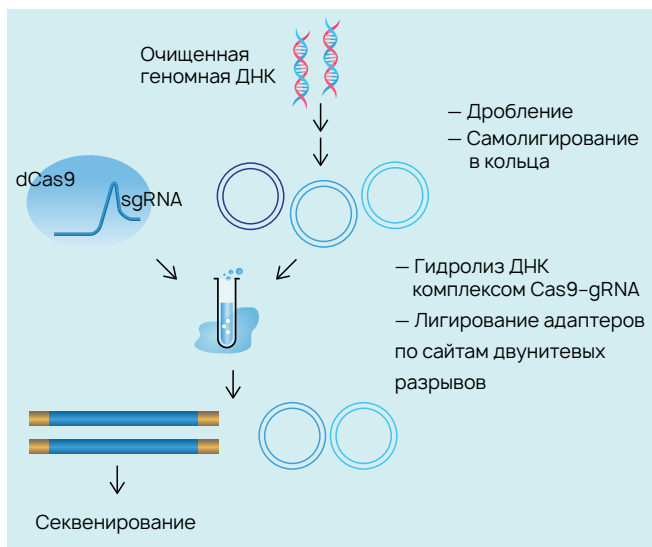


Рис. 4.8. Схема метода CIRCLE-seq.

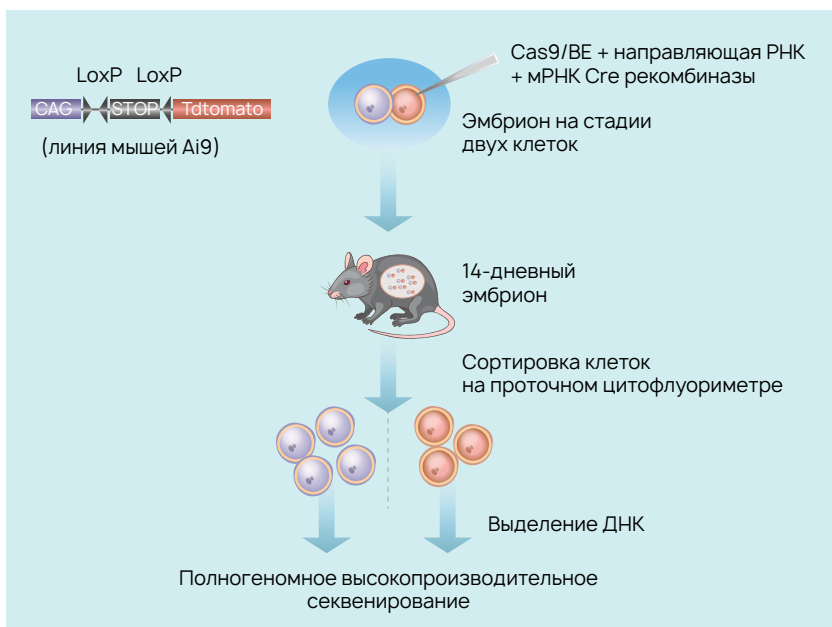


Рис. 4.9. Схема метода GOT1.

и последующего ферментативного отбора одного из двух типов ковалентно замкнутых структур ДНК: присоединение «шпильки» к концам ДНК или циркуляризация линейных фрагментов ДНК. Сравнение этих двух подходов показало, что циркуляризация на несколько порядков более эффективна в обогащении фрагментов геномной ДНК, расщепленной Cas9-нуклеазой. Важно отметить, что почти все идентифицированные сайты, обнаруженные при использовании линейных фрагментов ДНК с концами, замкнутыми в шпильки, также были определены по циркуляризованной ДНК, и число прочтений в обоих случаях строго коррелировало. Это позволило предположить, что циркуляризация не смещает диапазон или частоту идентифицированных нецелевых сайтов.

Технология CIRCLE-seq характеризуется достаточно низкой частотой фоновых прочтений (ридов), занимающих небольшую долю (~1,7%) от общего числа полученных прочтений, что позволяет с ее помощью достоверно идентифицировать нецелевые сайты. Полученные результаты с помощью данного метода можно анализировать и без референсной последовательности.

На сегодняшний день метод CIRCLE-seq является высокочувствительным и наиболее эффективным, с точки зрения секвенирования, подходом *in vitro* для полногеномного определения нецелевых сайтов расщепления нуклеаз CRISPR/Cas9 [41]. По сравнению с CIRCLE-seq, прочтения SITE-seq и Digenome-seq дают только половину сайтов расщепления. По сравнению с Digenome-seq, CIRCLE-seq практически исключает высокий фон случай-

ных прочтений. Для обнаружения off-target сайтов CIRCLE-seq является более чувствительным, чем основанные на клетках методы. В большинстве случаев CIRCLE-seq может идентифицировать все нецелевые сайты в человеческой геномной ДНК, найденные с помощью GUIDE-seq — одного из наиболее чувствительных клеточных методов. Кроме того, CIRCLE-seq также идентифицировал новые «достоверные» нецелевые сайты, которые встречаются в клетках человека, демонстрируя, что он может обнаруживать новые нецелевые локусы, которые находятся ниже пределов обнаружения GUIDE-seq [42].

Стоит отметить, что каждый образец для проведения CIRCLE-seq требует относительно большого количества геномной ДНК для «циркуляризации» (~25 мкг), что может быть ограничивающим фактором, в зависимости от доступности исследуемых клеток.

#### 4.2.11. Полногеномный анализ нецелевых сайтов с помощью инъекции двуклеточного эмбриона

Авторы технологии полногеномного анализа нецелевых сайтов с помощью инъекции двуклеточного эмбриона (Genome-wide Offtarget analysis by Two-cell embryo Injection, GOTI) редактировали одну бластомеру двуклеточного эмбриона с помощью CRISPR/Cas9 и поместили ее красным флуоресцентным белком (**рис. 4.9**). На 14-е сутки развития мышинный эмбрион был разделен на отдельные клетки. Сортировка отредактированных клеток и клеток дикого типа осуществлялась с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные группы клеток были секвенированы с помощью NGS с последующим биоинформатическим сравнительным анализом [43].

Следует отметить, что данный анализ *in vivo* позволяет максимально избежать «шумовых эффектов», вызванных экспансией клеток *in vitro*. Более того, поскольку как экспериментальная, так и контрольная группа относятся к одной оплодотворенной яйцеклетке, это может исключить влияние генетического фона.

Высокая эффективность редактирования, удобство применения и низкая стоимость являются основными причинами популярности систем CRISPR/Cas как в академических, так и в трансляционных приложениях. Тем не менее, важно отметить, что самым большим ограничивающим фактором для клинического использования программируемых нуклеаз (CRISPR/Cas, TALEN, ZFN) является наличие нецелевых эффектов. Определение как целевых, так и нецелевых сайтов расщепления имеет решающее значение не только для того, чтобы понимать потенциальные побочные эффекты технологий редактирования генома, но и для создания новых систем, характеризующихся большей специфичностью.

Наиболее часто применяемые методы для оценки нецелевой активности нуклеаз представлены в **табл. 4.1**. Все эти методы можно разделить на две большие категории: клеточный (cell-based) и *in vitro* подходы.

Таблица 4.1. Методы оценки нецелевой активности нуклеаз

Метод	Описание	Преимущества	Ограничения
IDLV	Метод, использующий клеточные культуры, в котором дефектные по интегразе лентивирусные векторы встраивают селективный маркер в сайты индуцированных нуклеазой двуцепочечных разрывов. Сайты интеграции векторов обогащаются с помощью линейной амплификации с последующим высокопроизводительным секвенированием	Некоторые типы клеток могут эффективнее инфицироваться лентивирусными частицами, чем трансфицироваться двуцепочечной олигодезоксинуклеотидной (dsODN) меткой	Относительно нечувствителен из-за невысокой эффективности интеграции и необходимости обогащения для преодоления этого. Высокий уровень фона, поскольку IDLV все еще сохраняют способность случайной интеграции в клеточный геном в отсутствие нуклеазоиндуцированных двуцепочечных разрывов. Интеграция IDLV может происходить на некотором расстоянии от разрыва, вызванного нуклеазой, поэтому может быть сложнее картировать соответствующие сайты
GUIDE-seq	Основан на эффективной интеграции олигонуклеотидных меток (dsODN) в двуцепочечные разрывы в живых клетках с последующей амплификацией и высокопроизводительным секвенированием	Высокая эффективность интеграции меток (dsODN) в двуцепочечные разрывы повышает чувствительность. Количественная корреляция между числом ридов GUIDE-seq и частотой мутаций в живых клетках	Требуется эффективная трансфекция клеток dsODN меткой, что может быть затруднительно для чувствительных типов клеток или <i>in vivo</i>
HTGTS	Обнаруживает нецелевые двунитевые разрывы, индуцированные нуклеазой, путем наблюдения транслокационных соединений между двумя нуклеазоиндуцированными двунитевыми разрывами	Может применяться для обнаружения off-target активности нуклеаз, когда нуклеазы доставляются <i>in vivo</i>	Индукцированные нуклеазой транслокации редки. Транслокации происходят чаще с сайтами в одной и той же хромосоме или между хромосомами, расположенными в ядре в непосредственной близости
BLESS	Основан на лигировании <i>in situ</i> адаптеров к концам нуклеазо-индуцированных двуцепочечных разрывов в фиксированных клетках	Не требует доставки и включения экзогенной ДНК	Потеря информации о нуклеазоиндуцированных двуцепочечных разрывах, которые были ранее восстановлены с помощью репарационных систем клеток

Окончание табл. 4.1 см. на стр. 153.

Метод	Описание	Преимущества	Ограничения
DIGE-NOME-seq	<i>In vitro</i> метод, основанный на обнаружении Cas9-расщепленной геномной ДНК путем секвенирования всего генома	Не требует ПЦР	Нет обогащения для расщепленных нуклеазой последовательностей и требуется большое количество ридов (~400 млн). Высокий уровень фона. Не дает информации о том, как клеточные факторы влияют на off-target активность нуклеаз
SITE-seq	Метод <i>in vitro</i> , основанный на расщеплении высокомолекулярной ДНК с помощью Cas9, с последующей ферментативной фрагментацией, лигированием биотинилированного адаптера, обогащением и секвенированием	Обогащаются расщепленные нуклеазой фрагменты. Уменьшает количество необходимого числа ридов	Прочтения содержат только половину расщепленного сайта. Не дает информации о том, как клеточные факторы влияют на off-target активность нуклеаз
CIRCLE-seq	Метод <i>in vitro</i> , в котором геномная ДНК случайно фрагментируется, циркуляризуется с образованием ковалентно замкнутых молекул двуцепочечной ДНК. Полученные кольца расщепляются с помощью Cas9 как по целевым, так и по off-target-сайтам. Это позволяет селективно секвенировать двуцепочечные разрывы, индуцированные нуклеазой	Высокое обогащение, поэтому требуется меньше прочтений (3–5 млн прочтений); прочтения содержат обе половины сайтов расщепления	Отсутствует информация о том, как клеточные факторы влияют на off-target активность нуклеаз. Требуется большое количество геномной ДНК

В целом, с помощью клеточных подходов можно непосредственно обнаружить нецелевые сайты, которые расщепляются в конкретном типе клеток; однако такие методы отличаются повышенными требованиями к исследуемым клеткам, а именно, их способности к культивированию и трансфекции. Напротив, подходы (методы) *in vitro* могут быть более чувствительными и более масштабируемыми, чем клеточные. Оба подхода, в конечном счете, требуют последующей валидации *in vivo*, чтобы подтвердить, приводят ли нецелевые сайты, идентифицированные этими методами, к «достоверному» (настоящему) мутагенезу в клетках или тканях, модифицированных геном-редактирующими нуклеазами [42].

Все методы, рассмотренные в данной главе, имеют сильные и слабые стороны, и необходим тщательный отбор, чтобы найти лучший для конкретного эксперимента по редактированию генома. Методы *in vitro*, такие как CIRCLE-

seq, Digenome-seq и SITE-seq, являются наиболее полными, тем не менее, обнаруженные с их помощью нецелевые мутации должны быть подтверждены в последующих экспериментах на клетках. Методы, подобные GUIDE-seq, напрямую и количественно оценивают нецелевые мутации в клетках, но имеют ограничения для последовательного обнаружения сайтов с низкой частотой мутаций (<0,1%). Методы, основанные на лигировании, могут быть полезны для понимания кинетики целевого и нецелевого редактирования генома.

Алгоритмы для конструирования направляющих РНК будут совершенствоваться с ростом знаний о механизмах активности на мишени и вне ее, а сочетание нуклеаз с высокой точностью воспроизведения с оптимально сконструированными направляющими РНК еще больше повысит точность системы CRISPR/Cas9.

## Литература

1. Sander J.D., Joung J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 2014, 32(4): 347-55.
2. Bae S., Park J., Kim J.S. Cas-offinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics.* 2014, 30(10): 1473-5.
3. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., et al. DNA targeting specificity of RNA-guided CAS9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013, 31(9): 827-32.
4. Heigwer F., Kerr G., Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods.* 2014; 11(2): 122-3.
5. Oliveros J.C., Franch M., Tabas-Madrid D., et al. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ensembl genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(W1): W267-71.
6. Chen Y., Cao J., Xiong M., et al. Engineering human stem cell lines with inducible gene knockout using CRISPR/Cas 9. *Cell Stem. Cell.* 2015; 17(2): 233-44.
7. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9): 822-6.
8. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., et al. Double nicking by RNA-guided CRISPRCas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013; 154(6): 1380-9.
9. Veres A., Gosis B.S., Ding Q., et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem. Cell.* 2014; 15(1): 27-30.
10. Wu X., Kriz A.J., Sharp P.A., et al. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant. Biol.* 2014; 2(2): 59-70.
11. Yang L., Grishin D., Wang G., et al. Targeted and genomewide sequencing reveal single nucleotide variations impacting specificity of Cas9 in human stem cells. *Nat. Commun.* 2014; 5: 5507.
12. Smith C., Gore A., Yan W., et al. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell.* 2014; 15(1): 12-3.
13. Iyer V., Shen B., Zhang W., et al. Offtarget mutations are rare in Cas9-modified mice. *Nat. Methods.* 2015; 12(6): 479.
14. Paix A., Wang Y., Smith H.E., et al. Scalable and versatile genome editing using linear DNAs with microhomology to Cas9 sites in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2014; 198(4): 1347-56.

15. Feng Z., Mao Y., Xu N., et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(12): 4632-7.
16. Zhang H., Zhang J., Wei P., et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J*. 2014; 12(6): 797-807.
17. Ng S.B., Turner E.H., Robertson P.D., et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009; 461(7261): 272-6.
18. Cho S.W., Kim S., Kim Y., et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 2014; 24(1): 132-41.
19. Karakoc E., Alkan C., O’Roak B.J., et al. Detection of structural variants and indels within exome data. *Nat. Methods*. 2012; 9(2): 176-8.
20. Solomon M.J., Larsen P.L., Varshavsky A., et al. Mapping protein DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*. 1988; 53(6): 937-47.
21. Mundade R., Ozer H.G., Wei H., et al. Role of chip-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle*. 2014; 13(18): 2847-52.
22. Dedon P.C., Soultz J.A., Allis C.D., et al. A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Anal. Biochem*. 1991; 197(1): 83-90.
23. Wu X., Scott D.A., Kriz A.J., et al. Genomewide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol*. 2014; 32(7): 670-6.
24. Cencic R., Miura H., Malina A., et al. Protospacer adjacent motif (PAM)-distal sequences engage CRISPR Cas9 DNA target cleavage. *PLoS One*. 2014; 9(10): e109213.
25. Kuscü C., Arslan S., Singh R., et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol*. 2014; 32(7): 677-83.
26. Gabriel R., Lombardo A., Arens A., et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat. Biotechnol*. 2011; 29(9): 816.
27. Wang X., Wang Y., Wu X., et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENS using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat. Biotechnol*. 2015; 33(2): 175-8.
28. Martin F., Sanchez-Hernandez S., Gutierrez-Guerrero A., et al. Biased and unbiased methods for the detection of off-target cleavage by CRISPR/Cas9: an overview. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17(9): 1507.
29. Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N.T., et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol*. 2015; 33(2): 187-97.
30. Crosetto N., Mitra A., Silva M.J., et al. Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat. Methods*. 2013; 10(4): 361-5.
31. Ran F.A., Cong L., Yan W.X., et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*. 2015; 520(7546): 186-91.
32. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016; 351(6268): 84-8.
33. Tsai S.Q., Joung J.K. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat. Rev. Genet*. 2016; 17(5): 300-12.
34. Hu J., Meyers R.M., Dong J., et al. Detecting DNA double-stranded breaks in mammalian genomes by linear amplification-mediated high-throughput genome-wide translocation sequencing. *Nat. Protoc*. 2016; 11(5): 853-71.
35. Roukos V., Voss T.C., Schmidt C.K., et al. Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science*. 2013; 341(6146): 660-4.



36. Kim D., Bae S., Park J., et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods*. 2015; 12(3): 237.
37. Kim D., Kim S., Kim S., et al. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Res*. 2016; 26(3): 406-15.
38. Fu B.X.H., St. Onge R.P., Fire A.Z., et al. Distinct patterns of Cas9 mismatch tolerance in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(11): 5365-77.
39. Kim D., Kim J.S. DIG-seq: a genome-wide CRISPR off-target profiling method using chromatin DNA. *Genome Res*. 2018; 28(12): 1894-900.
40. Cameron P., Fuller C.K., Donohoue P.D., et al. Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage. *Nat. Methods*. 2017; 14(6): 600-6.
41. Tsai S.Q., Nguyen N.T., Malagon-Lopez J., et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat. Methods*. 2017; 14(6): 607.
42. Lazzarotto C.R., Nguyen N.T., Tang X., et al. Defining CRISPR-Cas9 genome-wide nuclease activities with CIRCLE-seq. *Nat. Protoc*. 2018; 13(11): 2615-42.
43. Zuo E., Sun Y., Wei W., et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*. 2019; 364(6437): 289-92.

## ГЛАВА 5

### Нозологические и терапевтические аспекты редактирования генома животных

---

Процедуры генной терапии, как и любое другое внедрение в обращение нового лекарственного препарата, должны пройти тестирование, в том числе на животных моделях на стадии доклинических испытаний.

Как и во всех животных моделях, для изучения эффективности генной терапии наиболее ценными считаются те из них, которые максимально точно воспроизводят физиологические и патологические процессы, возникающие и протекающие в организме человека.

В большинстве своем животные, используемые для моделирования, являются в той или иной степени генетически модифицированными организмами. Не редки случаи, когда для моделирования того или иного заболевания в ходе одного эксперимента производится скрещивание различных линий, например, грызунов. В последние годы учащаются примеры создания трансгенных животных под конкретные цели и направления исследовательской деятельности. Для этого питомники, занимающиеся разведением лабораторных животных, предлагают трансгенные, нокаутные линии грызунов с «выключенными» по выбору заказчика генами, животных с гиперэкспрессией (нок ин) или со сниженной экспрессией (нокдаун) какого-либо гена. Помимо этого, по мере необходимости многие исследователи самостоятельно создают животных с генными мутациями в зависимости от тематики их научных изысканий.

Учитывая разнообразие заболеваний, лечение которых допустимо посредством генной терапии, для создания моделей используются разнообразные виды животных — от плодовых мух (*Drosophila melanogaster*) до крупного рогатого скота или лошадей.

Сравнительные исследования показали, что геном человека примерно на 70–90% гомологичен геному мышей, но с большим количеством ключевых вариаций (например, некоторые мышьиные и человеческие генные продукты практически идентичны, в то время как другие почти не распознаются как близкородственные), на 75% — геному собак и на 71% — геному свиней. Кошки

и приматы имеют гомологию с геномом человека на 73%. Среди 768 известных генов крупного рогатого скота 638 (83%) могут быть идентифицированы как идентичные генам человека. Все кроличьи хромосомные окраски, кроме окраски Y, гибридизуются с хромосомами человека, и все хромосомные окраски человека, кроме окраски Y, гибридизуются с хромосомами кролика. Последовательность ДНК шимпанзе на 98,8% идентична нашей, в то время как геном плодовой мухи и геном человека имеют 60% общих генов. Кроме того, мы разделяем около 50% наших генов с бананом [1].

И все же, несмотря на сходство последовательностей генома с человеком, большинство модельных организмов обычно не страдают от тех же генетических заболеваний, что и люди. Поэтому ученые должны находить способы вносить изменения в геномы животных, чтобы вызвать патологические состояния, свойственные человеку. Таким образом, для того, чтобы попытаться создать генетическую животную модель для человеческого заболевания, важно знать, какая мутация вызывает заболевание, чтобы внести ее в соответствующий ген животного.

Трансгенные животные используются для моделирования различных заболеваний человека, таких как нейродегенерация, артериосклероз, онкологические и инфекционные заболевания, а также многие другие.

Исследователи подходят к задаче создания животных моделей двумя основными способами: один направлен и обусловлен заболеваниями, а другой не направлен и не подвержен мутациям. Направленный подход, основанный на заболевании, может использовать любой из нескольких способов в зависимости от конкретного типа мутации, вовлеченной в исследуемое заболевание. Общие направленные методы включают трансгенез, нокин, нокдаун или нокаут по одному гену, условные модификации генов и хромосомные перестройки. Ненаправленный, управляемый мутациями способ генерирования мутации подразумевает использование радиационного излучения или химических веществ. Одним из распространенных приемов, связанных с этим методом, является крупномасштабный мутационный скрининг [2].

Наиболее эффективными методами получения мутаций, относящимся к крупномасштабному мутационному скринингу, являются воздействие рентгеновского излучения и химического мутагена — N-этил-N-нитрозомочевины. Рентгеновские лучи часто вызывают большие делеционные и транслокационные мутации, в которые вовлекается множество генов. В свою очередь, применение N-этил-N-нитрозомочевины связано с мутациями внутри отдельных генов, например, точечными мутациями, и поэтому ее зачастую используют при моделировании на таких организмах, как данио-рерио (*Danio rerio*). Такие модели считаются особенно полезными для выявления новых путей и генов, которые способствуют развитию заболевания. Таким образом, данные методы заключаются в скрининге с целью определения родства фенотипов полученных моделей с заболеваниями человека посредством использования косвенных подходов для провоцирования мутаций в геномах животных моделей.

Вставка полных человеческих генов в геномы соответствующих видов животных представляет собой привлекательное объединение соответствующ-

щих сильных сторон для каждой системы, которое может быть особенно полезным для тестирования специфических для человека элементов функции гена, регуляции или реакции на потенциальные терапевтические средства для заболевания или состояния. Этот подход часто включает вставку протяженных последовательностей ДНК с промоторами, нетранслируемыми фланкирующими областями и интронами, которые чаще всего превышают пропускную способность обычно используемых плазмидных и вирусных систем. Трансгенез может быть произведен как путем внесения чужеродной ДНК непосредственно в эмбрион, так и путем внедрения трансгена в ДНК организма посредством ретровирусного вектора. Впервые переносы генов мышей были выполнены ещё в 1980 г., однако в то время методы трансгенеза были далеки от оптимальных. В результате чужеродная ДНК внедрялась в небольшое количество эмбрионов и непоследовательно передавалась следующему поколению. Также небольшие трансгены могли встроиться в случайные сайты генома, и, в зависимости от их расположения, они не всегда экспрессировались. Недавно был разработан способ увеличения размеров фрагментов ДНК, используемых в трансгенезе, путем их клонирования в бактериальных (bacterial artificial chromosome, BAC) или дрожжевых (yeast artificial chromosome, YAC) искусственных хромосомах. Для доставки BAC- или YAC-ДНК к зародышевой линии мышей могут быть использованы три различных метода: пронуклеарная инъекция очищенной ДНК, липофекция ДНК в эмбриональные стволовые клетки или слияние сферобластов дрожжей с эмбриональными стволовыми клетками. Среди этих трех методов микроинъекция выделенной BAC- или YAC-ДНК в зиготу является наиболее распространенным методом получения трансгенных животных [3].

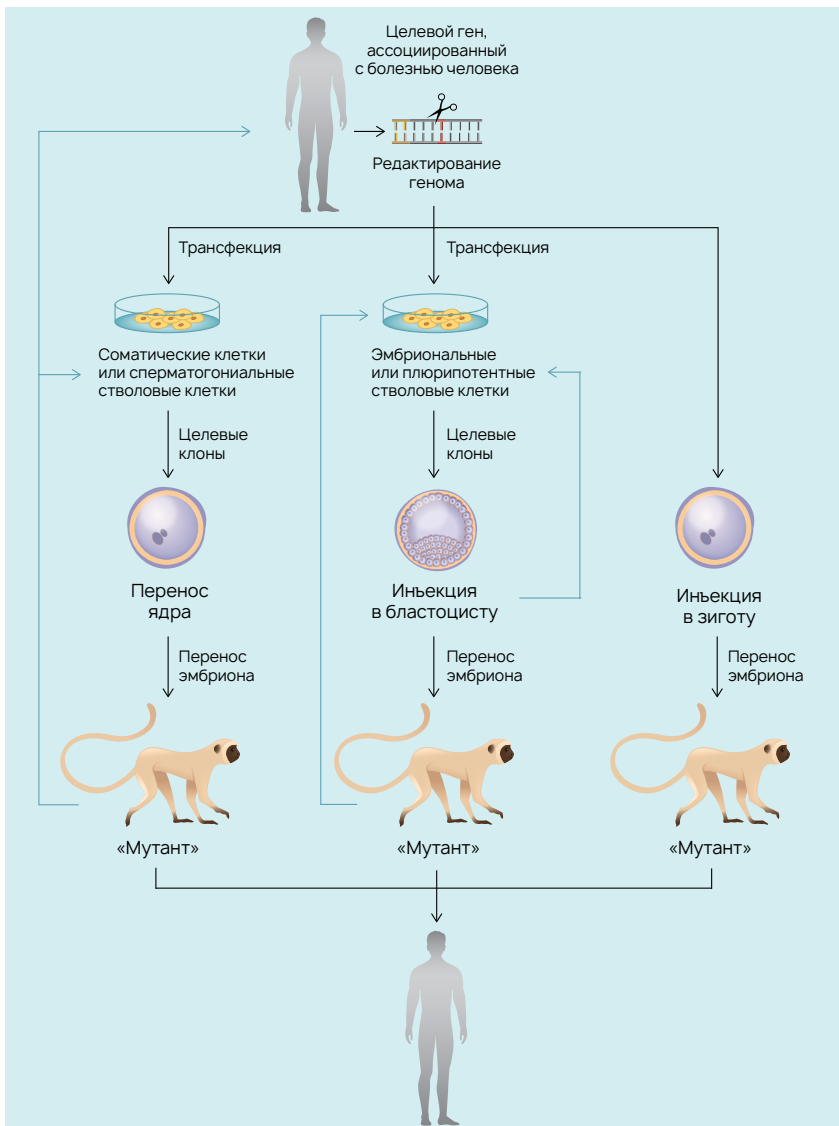
Модели нокаут и нокин являются способами нацеливания мутации на определенный локус гена. Эти методы особенно полезны, если доказано, что основной причиной заболевания является один ген. Нокаутированные мыши несут ген, который был инактивирован, что создает меньшую экспрессию и потерю функции; мышей нокин получают путем введения трансгена в точное место, где он гиперэкспрессируется. За эти годы у мышей было «нокаутировано» более 3000 генов, и большинство этих генов были связаны с заболеваниями [4].

Принцип создания нокаут и нокин животных одинаков: специфическая мутация вносится в эндогенный ген, а затем она передается следующему поколению посредством селекции. В некоторых случаях для этой процедуры требуется использование эмбриональных стволовых клеток (рис. 5.1), а в некоторых проще и удобнее применять современную технологию направленного редактирования генома CRISPR/Cas (рис. 5.2). Одна из особенностей эмбриональных стволовых клеток заключается в их способности вносить изменения во все клеточные популяции при инъекции в бластоцисты, и они могут быть генетически модифицированы и отобраны для желаемых изменений гена.

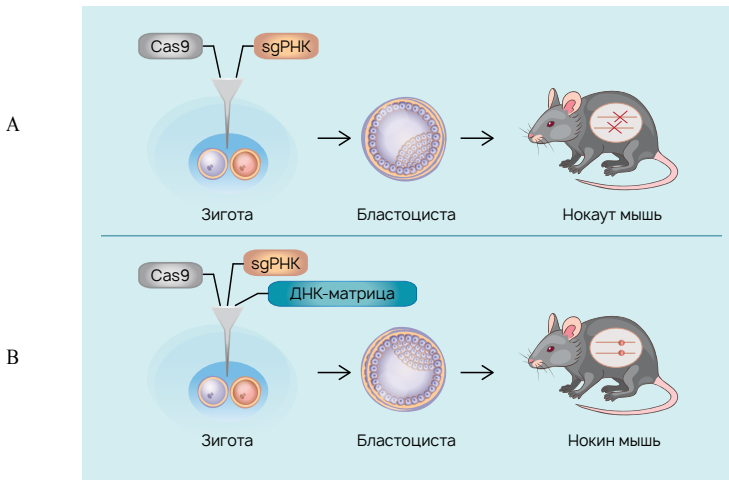
В ходе гомологичной рекомбинации происходят мутации. Это процесс, который физически перестраивает две нити ДНК для обмена генетическим материалом. Таким образом, в модельный ген могут быть введены многие типы мутаций, включая нулевые или точечные мутации, а также сложные хромосомные

перестройки, такие как большие делеции, транслокации или инверсии. Многие нокаут и нокин мыши имеют очень сходные фенотипы с людьми и, следовательно, являются хорошими моделями для заболеваний человека.

Одним из недостатков использования трансгенных, нокаут и нокин мышей для изучения заболеваний человека является то, что многие нарушения



**Рис. 5.1.** Способы модификации генов у приматов для изучения заболеваний человека посредством инъекций эмбриональных или плюрипотентных стволовых клеток в бластоцисты, переносом ядер соматических стволовых клеток или внутрицитоплазматической инъекцией сперматогониальных стволовых клеток в цитоплазму зиготы.



**Рис. 5.2.** Схема получения нокаут и нокин мышей посредством технологии CRISPR/Cas9. А — инъекция направляющей РНК (gRNA) и Cas9 приведет к возникновению инсерций/делеций, которые могут привести к сдвигу рамок трансляции и ранней остановке синтеза белка (за счет возникновения стоп-кодона), тем самым создавая нокаутных (КО) мышей. В — добавление высокоомологичной ДНК-матрицы, содержащей специфическую мутацию, приведет к созданию нокин (KI) мышей в процессе гомологичной репарации. Реагенты вводятся в цитоплазму зиготы. Альтернативно они могут быть введены в пронуклеус зиготы, но цитоплазматическая инъекция является более простой и менее токсичной.

возникают в позднем возрасте, и когда гены изменяются для моделирования таких заболеваний, мутации могут оказывать глубокое влияние на развитие и вызывать раннюю смерть. Эти эффекты исключают использование животных моделей для изучения заболеваний взрослых людей. К счастью, новая технология позволила генерировать мутации в определенных тканях и на разных стадиях развития, включая взрослое состояние. Для этого нужны мыши с двумя различными типами генетических изменений: одна — содержащая условный вектор, который похож на «включенный переключатель» для мутации, и другая — содержащая определенные сайты, называемые *loxP*, вставленные по обе стороны от целого гена или части гена, который кодирует определенный компонент белка, который будет удален. Условный вектор для гена получают, вставляя последовательности распознавания для бактериальной Cre-рекомбиназы (сайты *loxP*) с использованием гомологичной рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках. Вектор содержит устойчивый к препарату (чаще всего антибиотику) маркерный ген, который позволяет выживать только целевым эмбриональным стволовым клеткам при воздействии препарата. Таким образом, мутантные эмбриональные стволовые клетки могут быть отобраны и введены в эмбрион мыши-хозяина, который имплантируется суррогатной матери.

Полученное потомство является химерами и имеет множество популяций генетически отличных клеток. Химерное потомство затем скрещивают, и полу-

ченное поколение имеет рекомбинантный эффекторный ген. Мышей, содержащих Cre-рекомбиназу под контролем тканеспецифичных или индуцибельных регуляторных элементов, скрещивают с мышами, имеющими необходимые сайты *loxP*. Когда Cre экспрессируется, рекомбинация происходит в сайтах *loxP*, которые удаляют промежуточные последовательности, и результирующая мутация индуцируется в определенное время в определенных областях [5].

Вышеупомянутые достижения в использовании эмбриональных стволовых клеток и условных мутаций *Cre/loxP* помогли проложить путь к созданию моделей для сложных заболеваний человека, включающих хромосомные перестройки. Мышинные модели этих расстройств могут быть созданы с использованием косвенных подходов, таких как облучение, но их полезность ограничена, поскольку патологические конечные точки непредсказуемы и не определены. Использование системы рекомбинации *Cre/loxP* преодолевает эти недостатки за счет внесения сайт-специфических мутаций, необходимых для получения точных моделей дефектов, вызванных хромосомными перестройками человека. Эти мутации могут включать делеции хромосом, дубликации, инверсии и транслокации, а также хромосомные инсерции.

При всем разнообразии видов животных, на которых возможно моделирование посредством создания точечных мутаций, те или иные из них более подходят для создания модели конкретного заболевания. Отдельно можно выделить моделирование на рыбах и нечеловекообразных приматах. Первые применяются, в основном, в качестве исходных моделей доставки генов. Тем не менее показана возможность их использования в качестве животных моделей заболеваний печени или рака [6]. Также были получены данные о создании на основе данио-рерио моделей для имитации развития сосудов [7, 8] и сердца [9, 10], регенерации сердца [11] и наследственной кардиомиопатии [12]. В свою очередь, моделирование заболеваний на нечеловекообразных приматах, если это необходимо, обычно происходит на завершающих этапах исследований, после получения положительных результатов на других животных моделях. Это связано с высокой стоимостью данных моделей, т. к. манипулирование генами у обезьян гораздо сложнее, чем у других животных.

## 5.1. Рыбы

Рыбка данио-рерио является хорошей моделью для понимания патогенеза врожденных заболеваний человека, таких как ахроматопсия, кампомелическая дисплазия или нарушение развития нервного гребня. Одной из причин врожденной ахроматопсии являются мутации в трансдуцине колбочек глаза *GNAT2*. С помощью рыбок-мутантов, у которых смоделировано отсутствие оптокинетического ответа  $f^{w21}$  (*nof*), была продемонстрирована возможность терапии данного нарушения с помощью направленной экспрессии белка дикого типа. В качестве вектора в данном исследовании использовались плазмидные ДНК [13].

Другим примером может служить синдром Ваарденбурга (СВ), клинически проявляющийся телекантом, гетерохромией радужки, врожденной тугоухостью и отсутствием пигментации отдельных прядей волос. Известно, что данные нарушения вызваны мутациями в генах *PAX3*, *MITF*, *WS2B*, *WS2C*, *SNAI2*, *SOX10*, *EDNRB*, *EDN3*. Однако для моделирования проявления каждого клинического признака было необходимо создать конкретную животную модель. Так, для моделирования частичного дальтонизма использовались *poF*-мутанты данио-рерио, для моделирования глухоты — мутанты японской оризии (*Oryzias latipes*), полученные химическим способом в результате крупномасштабного мутационного скрининга [14]. В свою очередь Н. Хомма и соавторы использовали CRISPR/Cas9 для разрушения длинноволнового опсина оризии и производили рыб-дальтоников [15]. Помимо этого, на основе японской оризии создаются модели для изучения органогенеза, метаболизма гемоглобина-билирубина и многих других процессов.

Для моделирования болезни Ниманна–Пика типа С1 (NPC1), относящейся к группе лизосомных болезней накопления и характеризующейся аутосомально-рецессивным наследованием, В.Ч. Тсенг и команда, используя CRISPR/Cas9, сгенерировали двух *npc1*-null-мутантов. Поскольку NPC1 характеризуется патологическим накоплением неэтерифицированного холестерина и гликолипидов в поздних эндосомах и лизосомах, а общие признаки заболевания выражаются в желтухе новорожденных, гепатоспленомегалии, судорогах, мозжечковой атаксии и снижении когнитивных функций, одна из моделей демонстрировала раннее поражение печени, а вторая представляла собой неврологический фенотип. Посредством CRISPR/Cas9 индуцировались разрывы двуцепочечной ДНК: на одноклеточной фазе развития в эмбрионы рыбок дикого типа (F0) инъектировали *npc1*-специфическую направляющую РНК (sgРНК) и мРНК, кодирующую Cas9. Полученных таким образом рыбок выращивали до половозрелого состояния и скрещивали с особями дикого типа, получая эмбрионов F1. Посредством ПЦР и фрагментного анализа эмбрионы F1 исследовались на возможность передачи зародышевой линии мутации *npc1*. В свою очередь, особи F0, несущие потенциальные мутации в зародышевой линии, были скрещены с особями дикого типа. Полученные от этого второго скрещивания рыбки F1 выращивались до взрослого состояния и исследовались на наличие мутаций в гене *npc1*. В результате были идентифицированы два мутантных аллеля: *npc1* y535 и *npc1* hg37. Наблюдения показали задержку роста и преждевременную летальность *npc1*-мутантов, а гистологические исследования подтвердили содержание большого количества неэтерифицированного холестерина в печени молоди рыб [16].

Достаточно точную модель X-сцепленной аденолейкодистрофии (ALD), взяв за основу данио-рерио, удалось создать Л. Р. Страчан и его команде. Это заболевание относится к группе пероксисомных болезней с X-сцепленным рецессивным типом наследования и обусловлено мутациями гена *abctl*, что приводит к поражению миелина периферической и центральной нервных систем, а также надпочечников. Ген *abctl* кодирует трансмембранный белок ALDP, необходи-



мый для метаболизма очень длинноцепочечных жирных кислот. Показано, что аминокислотная последовательность гена *abcd1* данио-рерио на 70% идентична последовательности гена *abcd1* человека, и в процессе онтогенеза экспрессируется в гомологичных областях. Для генерации мутантных аллельных линий *abcd1* данио-рерио использовалась технология TALEN, с помощью которой в экзоне 1 генерировались мутации, приводящие к возникновению преждевременных стоп-кодонов. Наблюдения показали у мутантных особей повышение концентрации в организме очень длинноцепочечных жирных кислот, развитие гипомиелинизации, снижение выживаемости, нарушение двигательной моторики и задержки развития межпочечного органа (аналог надпочечников) [17].

## 5.2. Грызуны

Особенности биологии мышей позволили им стать излюбленными основами для моделей самых разных патологических состояний и процессов, даже с учетом того, что биология мелких грызунов значительно отличается от биологии более крупных видов животных, не говоря уже о человеке. Основная проблема состоит в том, что продолжительность жизни мышевидных грызунов коротка, поэтому изучение эффективности генной терапии обычно дополняется исследованиями на более крупных животных моделях. В связи с этим исследования генетических заболеваний на моделях крупных животных дополняют исследования на мышах, поскольку они имеют более протяженную продолжительность жизни, их размеры более схожи с размерами новорожденных младенцев или детей, их фоновая генетическая гетерогенность сходна с таковой у людей, и они генетически более тесно связаны с людьми, чем мыши.

Несмотря на это мыши и крысы относительно недороги, половое созревание у них происходит быстро, плодовитость достаточно высока. Они неприхотливы к условиям содержания и кормления, а небольшие размеры позволяют содержать большое количество животных на сравнительно небольшой площади. Именно доступность мышинных моделей, а также наличие обширной базы знаний в отношении генетики и иммунологии позволяют проверить влияние генетических манипуляций и экспериментальной терапии на физиологические и патологические процессы, протекающие в организмах-моделях. В свою очередь крысы значительно крупнее мышей, а следовательно, проводить с ними манипуляции и наблюдать развитие требуемого патологического процесса гораздо удобнее.

Пептидный гормон лептин, относящийся к адипокинам, регулирует липидный обмен, оказывая анорексигенное действие, поэтому снижение его концентрации ведет к ожирению. Ю. Чен и коллеги в 2017 г. представили методику получения модели крыс, страдающих ожирением, взяв за основу крыс линии Sprague Dawley. Нокаутирование рецептора лептина (*LepR*) происходило посредством прямой инъекции транскрибированных *in vitro* мРНК, кодирующих пару TALEN, в зиготы крыс, в результате чего у 2 из 3 полученных детенышей были индуцированы соматические мутации, с высокой эффективностью передающиеся по зародышевой линии [18].

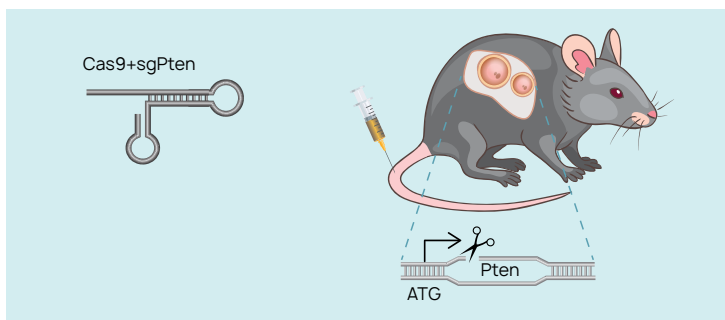
Т. Ларчер и соавторы для изучения МДД сгенерировали  $Dmd^{MDX}$ -крыс посредством TALEN, направленных на экзон 23 гена *Dmd* [19]. Эти модифицированные крысы демонстрировали значительное снижение мышечной силы и снижение спонтанной двигательной активности.  $Dmd^{MDX}$ -крысы могут стать новой адекватной некрупной животной моделью МДД.

Мышиные модели продолжают использоваться при изучении некоторых клинических проявлений муковисцидоза, неврологических и онкологических заболеваний, тяжелого комбинированного иммунодефицита, гемофилии, МДД, болезни Хантингтона,  $\beta$ -гемоглинопатий, болезней обмена и многих других заболеваний, возможность генной терапии которых пока еще не доказана.

При экспериментальной генной терапии заболеваний внутреннего уха (глухота, вестибулярная дисфункция) на мышах-мутантах была показана возможность частичного восстановления утраченных функций посредством замены гена, увеличения гена, а также нокаута и нокадауна генов [20]. К.Дж. Кэрролл и соавторы инъецировали плазмидные ДНК, кодирующие Cas9, экспрессия которого регулировалась промотором *Muh6*, в зиготы мыши для получения трансгенных мышей. Этот тип мышей устойчиво экспрессировал Cas9 исключительно в кардиомиоцитах сердца. Авторы доставили *sgPHK*, нацеленные на *Muh6*, с помощью аденоассоциированного вируса (AAV) и индуцировали редактирование специфичного для сердца гена. В итоге они вызывали гипертрофическую кардиомиопатию у трансгенных мышей [21]. Внедрив миссенс-мутацию в локусы *Scn8a*, команда Дж. М. Джонс создала мышиную модель эпилептической энцефалопатии с ранним началом, используя TALEN. Данные показали, что эта мышинная модель будет полезна для изучения развития патогенеза и терапии ранних приступов [22].

В 2014 г. группа исследователей под руководством В. Ксю описала новую методику создания модели злокачественных новообразований печени *in vivo* у мышей дикого типа с помощью системы CRISPR/Cas, демонстрируя возможность индукции прямой мутации генов-супрессоров опухолей и онкогенов в печени. Для этого плазмидная ДНК, кодирующая Cas9 и *sgPHK*, непосредственно нацеленные на гены-супрессоры опухолевой активности *Pten* и *p53*, вводились сочетанно и по отдельности посредством гидродинамической инъекции непосредственно в печень (рис. 5.3) [23].

В том же году Р. Платт и его коллеги продемонстрировали прямое редактирование генома посредством AAV-обусловленной экспрессии Cre и *sgPHK* в мозге Cre-зависимых трансгенных нокин Cas9-мышей. Спустя 3 недели после инъекции глубокое секвенирование локуса *NeuN* показало, что белок Cas9 был функционален и способствовал образованию инсерций/делеций на мишени. На основании полученных результатов эта же группа исследователей провела эксперимент по AAV-доставке кассет U6-*sgPHK* для супрессоров неоплазий KRAS, *p53* и LKB1 (AAV-KPL). Спустя 2 мес после инокуляции вируса с помощью компьютерного томографического исследования у всех обработанных AAV-KPL мышей в легких обнаружили узелки, средняя опухолевая нагрузка которых за 2 мес составила приблизительно 10% объема легких. Гистологическое и генетическое исследо-



**Рис. 5.3.** Гидродинамическая инъекция плазмид рХ330, экспрессирующих Cas9 и sgРНК, нацеленных на последовательность гена *Pten*, мышам дикого типа для индукции временной экспрессии компонентов системы CRISPR/Cas в гепатоцитах.

вания этих новообразований показали, что это аденокарциномы легкого, развившиеся из множественных альвеолярных аденом, возникших в течение первого месяца после инокуляции векторной конструкции [24].

Для фармакологических и токсикологических исследований особенно востребованы гуманизированные модели — трансгенные животные, содержащие функционирующие гены, клетки, ткани или иные морфофункциональные структуры организма человека. Так, были созданы модели мышей, несущие мутантный или человеческий ген  $\beta$ -гемоглобина, позволившие изучить и улучшить понимание нормальной регуляции генов гемоглобина, а также основы развития серповидно-клеточной анемии или  $\beta$ -талассемии [25].

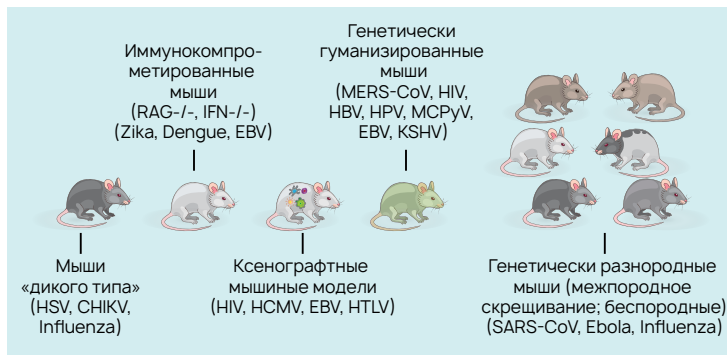
Вначале проводились исследования по получению *in vivo* гуманизированных моноклональных антител, ценность которых заключается в большей терапевтической эффективности по сравнению с оригинальными антителами грызунов [26, 27]. Еще в конце XX в. были созданы гомозиготные гуманизированные мыши, у которых был заменен оригинальный ген константной области легкой цепи каппа на ген каппа-С человека. Причем полученные мыши продуцировали нормальные концентрации сывороточных антител, большинство из которых несли химерные легкие каппа-цепи и проявляли нормальные иммунные ответы [26]. В 2014 г. было сделано сообщение о крупномасштабной генетической гуманизации *in situ* генов мышинового иммуноглобулина. Процедура выполнялась с помощью специально сконструированных рекомбинантных таргетирующих векторов на основе ВАС, сочетающих ВАС человека и мыши, посредством пронуклеарной инъекции бластоцисты или восьмиклеточной морулы мышей. В результате 6 млн пар нуклеотидов мышинных генов иммунной системы были точно и *in situ* заменены ортологичными генами человека, причем функционально и морфологически сама иммунная система гуманизированных мышей была неотличима от таковой у мышей дикого типа [28]. Результаты этого исследования открыли возможность для гуманизации других массивных локусов, например, основных локусов гистосовместимости или локусов, кодирующих Т-клеточный рецептор [29].

Такие животные особенно востребованы для моделирования инфекционных заболеваний (**рис. 5.4**), при которых размножение патогена в организме грызунов невозможно, или ввиду отсутствия способности вызывать у мышей иммунный ответ, аналогичный человеческому.

Для репликации возбудителей заболеваний, таких как корь или коронавирусная инфекция ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), в организме мыши достаточно внесения одного или небольшого числа провирусных генов. Так, путем экспрессии на всю длину человеческого варианта белка вирусного рецептора дипептидилпептидазы IV или CRISPR/Cas-опосредованным внесением аминокислотных изменений в мышиную молекулу дипептидилпептидазы IV мышь сделали перmissive для репликации возбудителя MERS-CoV [30, 31].

В другом докладе сообщалось о создании полностью иммунокомпетентной мышинной модели заболевания вирусом Зика путем адаптации возбудителя через замену гена *stat2* мыши геном *stat2* человека (**рис. 5.5**) [32].

Несмотря на подобные успехи в редактировании генома, некоторым вирусным патогенам требуется целый ряд генов в организме хозяина, способствующих внедрению и репликации вирионов, а также индукции заболевания. И, конечно, не стоит забывать об ограничениях, накладываемых различиями в иммунной системе человека и грызунов, при использовании стандартных или генетически гуманизированных линий мышей. Поэтому для преодоления этих осложнений, препятствующих моделированию ответной реакции человеческого организма на патоген, используются мыши с ксенотрансплантированными тканями человека. За основу таких моделей берутся линии мышей с функционально отсутствующей адаптивной иммунной системой (например, мыши, нокаутированные по генам *rag-1* или *IL2RG*). Эти мыши являются перmissive для приживания клетками иммунной системы человека при условии удаления некоторых других мышинных генов (например, обычной гамма-цепи рецептора IL-2). Мышей с ксенотрансплантированной



**Рис. 5.4.** Примеры мышинных моделей, используемых при исследованиях инфекционных заболеваний человека.

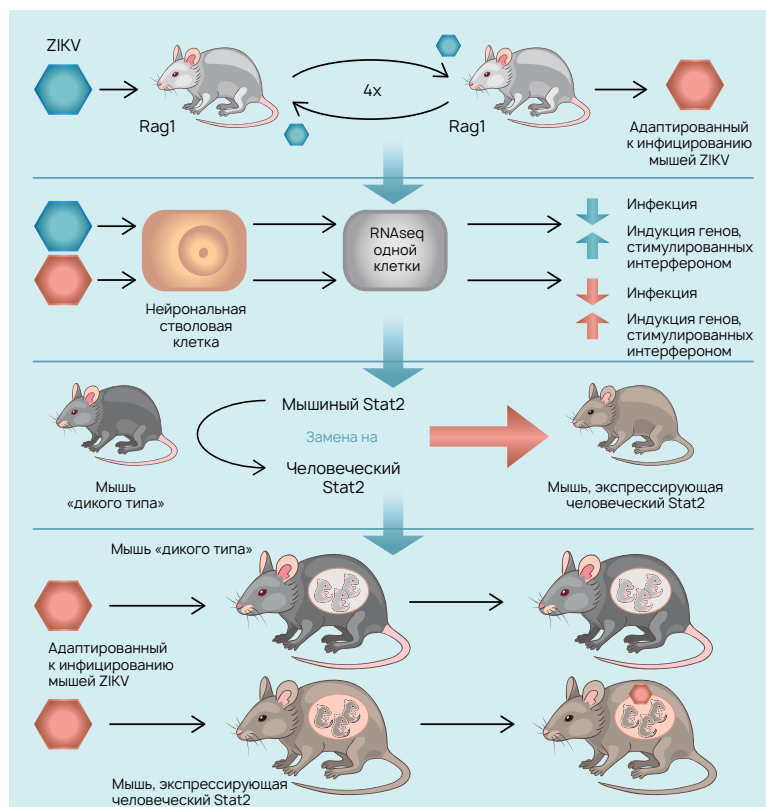


Рис. 5.5. Создание иммунокомпетентной мышиной модели вирусной инфекции Зика.

иммунной системой человека используют для изучения терапии широкого спектра заболеваний, включая малярию, лихорадку Денге, туберкулез и вирус гриппа. Особую пользу принесли эти модели при изучении патогенеза ВИЧ и эффективности антиретровирусной терапии ВИЧ, имитируя процессы, происходящие в организме человека. Надо учитывать, что до появления в 1988 г. мышей с привитой иммунной системой человека CB17 единственной моделью для изучения ВИЧ были шимпанзе [33].

В настоящее время популярны три основных метода внедрения иммунной системы человека в организм иммунодефицитных мышей (рис. 5.6).

Первая из них — модель Nu-PBL-SCID — создана посредством внутривенной инъекции лейкоцитов периферической крови человека. Эта модель прекрасно подходит для изучения функции Т-клеток человека *in vivo*, т.к. приводит к приживлению CD3+ Т-клеток в течение первых 7 дней после инъекции, вследствие развития летальной ксеногенной болезни в течение 4–8 нед имеет короткое экспериментальное окно.

Вторая модель — Nu-SRC-SCID — представляет собой внутримышечное (в область бедра) или внутривенное введение CD34+ гемопоэтических стволо-

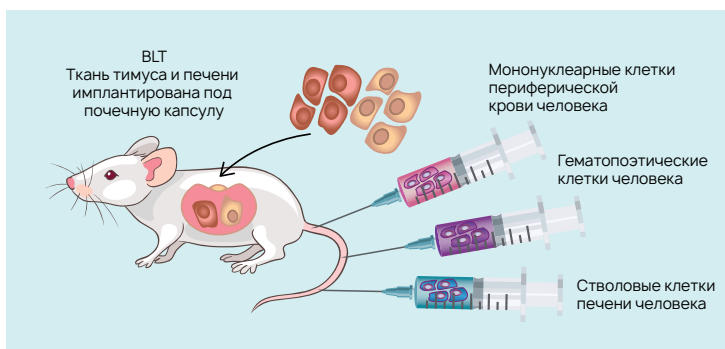


Рис. 5.6. Основные способы внедрения иммунной системы человека в организм иммунодефицитных мышей.

вых клеток, полученных из костного мозга, пуповинной крови, печени плода или периферической крови. Эта модель поддерживает полное приживание иммунной системы человека, демонстрируя присутствие В-клеток, Т-клеток, миелоидных клеток и антигенпрезентирующих клеток в периферических кроветворных тканях. Однако образующиеся в костном мозге гранулоциты, эритроциты и тромбоциты детектируются в цельной крови только в небольших количествах. BLT-модель является продуктом третьего варианта внедрения иммунной системы человека в мышинный организм. Модель создана в результате трансплантации клеток печени и тимуса плода человека под капсулу почки мыши в сочетании с внутривенной инъекцией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток печени плода. Как и у предыдущей модели, у BLT-модели развиваются все линии кроветворных клеток человека, и помимо этого, надежная мукозальная иммунная система. Кроме того, Т-клетки образуются в тимусе, аутологичном человеческом, и ограничены человеческим лейкоцитарным антигеном. Несмотря на это, данная модель также имеет ограниченные временные рамки для эксперимента по причине развития синдрома «трансплантат против хозяина» [34].

Несмотря на свою полезность, животные модели ксенотрансплантатов человека имеют ограничения, основными из которых является эффективность приживания и отторжение ткани и невозможность полностью предсказать иммунные реакции человека, такие как ответы антигенспецифических антител. Однако не стоит забывать, что именно благодаря этим моделям был осуществлен прорыв в изучении патогенеза и терапии чумы в XX в.

Необходимость создания трансгенных животных, несущих высококодифференцированные человеческие гепатоциты, возникла для моделирования инфицирования вирусом гепатита В человека в связи с тем, что обычные мыши оказались невосприимчивы к HBV (cccDNA не встроена в мышинные гепатоциты). Еще в середине 1980-х гг. первые HBV-трансгенные мыши могли применяться только с целью изучения роли белков HBsAg, HBeAg, HBx и их онкогенного потенциала. Полученные данные оказались противоречивы, но они заложили основу для дальнейших исследований HBV.

В 1995 г. Ф.В. Чисари с коллегами продемонстрировали способность человеческих вирионов HBV воспроизводиться в мышинных гепатоцитах. При этом повреждения гепатоцитов у самих мышей не наблюдались, таким образом показывая, что HBV не обладает цитопатическими свойствами. Данные мышинные модели были получены с использованием терминально избыточной конструкции вирусной ДНК, которая начинается непосредственно перед энхансером HBV, полностью покрывает вирусный геном и заканчивается чуть ниже уникального сайта полиаденилирования в HBV [35]. Несколькими годами ранее было продемонстрировано, что адоптивный перенос цитотоксических Т-лимфоцитов трансгенным мышам приводит к острому гепатиту [36]. Таким образом, HBV-трансгенные мыши оказались полезны для тестирования противовирусных веществ, препятствующих репликации вируса. Поэтому для изучения механизмов патогенеза HBV и вирусного клиренса были разработаны мышинные модели, основанные на передаче генома вируса мышам посредством трансдукции вирусными векторами или гидродинамической инъекцией вирусного генома гепатита В.

Вирусные векторы на основе аденовирусов или аденоассоциированных вирусов, содержащих геномы HBV, трансдуцируют гепатоциты с высокой эффективностью, однако при использовании аденовирусных векторов у мышей происходит бурный иммунный ответ на сам вектор. Данный недостаток удалось частично компенсировать использованием аденоассоциированных вирусных векторов, но это привело к устойчивости мышей против вирусных антигенов, сопровождающейся персистентной виремией у мышей без HBV-специфического гуморального иммунного ответа [37].

Метод гидродинамической инъекции заключается в быстрой инъекции мышам через хвостовую вену большого объема жидкости, содержащей нативную ДНК, что приводит к поглощению ДНК в гепатоцитах и дальнейшей транзientной экспрессии генов. Несмотря на некоторые недостатки данного метода, способные нарушать экспрессию генов хозяина или сигнальные пути, преимущества метода гидродинамической инъекции заключаются в том, что различные генотипы и варианты HBV или мутанты могут быть инъецированы мышам и проанализированы *in vivo* за относительно короткое время. Также благодаря методу гидродинамической инъекции появилась возможность исследования иммунных реакций при острой форме течения инфекционных заболеваний.

Обнаружение системы CRISPR/Cas9 вселило надежду на использование ее для селективного удаления cccDNA, однако, в связи с тем, что наличие cccDNA в гепатоцитах мышей не установлено, направленность нуклеаз CRISPR/Cas9 на cccDNA не может быть протестирована. Кроме того, основное беспокойство представляет нарушение последовательностей HBV, которое может привести к нестабильности генома и появлению новообразований. В целом, все вышеперечисленные модели не выдерживают критики при оценке их с точки зрения генотерапевтических вмешательств, поэтому для достижения долгосрочной выживаемости высокодифференцированных гепатоцитов человека, перmissивных для инфицирования HBV *in vivo*, были созданы гуманизированные мыши,

имеющие гепатоциты человека, стабильно интегрированные в паренхиму печени мышей.

Для изучения гепатотропных вирусных инфекций сегодня доступны три модели химерной печени. Основой создания uPA-модели стало свойство трансгена uPA (активатора плазминогена типа урокиназы) сверхэкспрессировать под контролем промотора альбумина мыши, что, в свою очередь, приводит к высоким уровням uPA в плазме, гипофибриногенемии и подострой печеночной недостаточности у молодых мышей. Чтобы осуществить приживание ксеногенных гепатоцитов, uPA-мышей подвергали обратному скрещиванию с мышинными линиями, имеющими генетический иммунодефицит (*Rag2<sup>-/-</sup>*; *Scid*). Уровни химерности оценивали путем измерения уровня сывороточного альбумина человека в крови мышей [38].

Другая гуманизованная модель основана на использовании мышей с дефицитом фумарилацетоацетата гидролазы [39].

Третья модель выполняется на мышах ТК-NOG, которые несут трансген тимидинкиназы вируса простого герпеса под контролем специфичного для печени промотора альбумина и тройного иммунного дефекта, потому что были получены методом обратного скрещивания с мышами NOG. К недостаткам данной модели можно отнести то, что самцы данной популяции бесплодны [40].

### 5.3. Кролики

В отличие от мышей, получение трансгенных кроликов длительное время затруднялось низкой эффективностью методов использования эмбриональных стволовых клеток и переноса ядер соматических клеток. Только в 2011 г. посредством ZFN был получен первый генетически модифицированный кролик с нарушенным локусом генов *IgM* [41]. Однако уже в 2017 г. с помощью технологии TALEN были получены животные с нокаутами генов *Ragl*, *Rag2* [42] и *Fah* [43]. Использование технологии CRISPR/Cas9 позволило создавать модели кроликов с нокаутом не только одного, но и нескольких генов одновременно, причем возможность одновременного нокаута нескольких генов достигала приблизительно 100% [44]. Недавно команда Т. Сюэ создала кроличью модель МДД путем совместной инъекции мРНК, кодирующей Cas9, и sgРНК в зиготы кролика. Эта система CRISPR предназначалась для модификации экзона 51 *mdd*, и кролики, нокаутированные по *mdd*, имели типичные фенотипы МДД. Более того, специфическая патология в диафрагме и сердце была похожа на таковую у пациентов с МДД. Эта новая модель может быть более ценной для доклинических исследований, чем предыдущие модели грызунов [45].

Благодаря кроликам результаты других исследований наводят на мысль, что ген *GJA8*, кодирующий белок разрыва соединения 50, связан с аутосомно-доминантной врожденной катарактой [46, 47]. Л. Юан и соавторы совместно инъектировали мРНК, кодирующую Cas9, и sgРНК в зиготу кролика, чтобы сконструировать нокаутированную модель кролика *GJA8* [48]. В результате эффективность генной мутации участка *GJA8* достигла 98,7% и 100% в эмбрио-



нах и тканях молодого кролика соответственно. Они добились эффективного редактирования генов кроличьего генома с помощью системы CRISPR/Cas9 и предоставили хорошую модель заболевания для исследований, связанных с катарактой.

Командой исследователей под руководством Д. Жао были продемонстрированы интересные результаты, связанные с применением генной терапии для регенерации костных дефектов посредством сочетанного воздействия рекомбинантной плазмиды pcDNA3.1-VEGF 165, кодирующей фактор роста эндотелия сосудов, и желатиновой губки. Посттерапевтическое гистологическое исследование показало наличие большого количества вновь образованных кровеносных сосудов спустя 2 нед после начала лечения, ряд костных трабекул с пролиферацией остеобластов через 4 нед, свежую надкостницу и преобразованную медуллярную полость спустя 12 нед, в то время как в контрольной группе эти структуры сформировались в более поздние сроки [49].

Болезнь Вильсона является аутосомно-рецессивным наследственным нарушением метаболизма меди, вызванным вариациями последовательности гена *ATP7B*. *ATP7B* является важным белком, способствующим трансмембранному транспорту меди. Недавно на основе одиночной аминокислотной замены, внесенной с помощью CRISPR/Cas9, В. Йианг и соавторы создали кроличью модель болезни Вильсона. В начале заболевания содержание меди в печени модифицированных кроликов увеличилось в 9 раз по сравнению с кроликами дикого типа, однако срок выживаемости этих моделей составил примерно 3 мес. Таким образом, эту модель можно считать потенциальной моделью болезни Вильсона для применения в патологическом анализе, клиническом лечении и исследованиях эффективности генной терапии [50].

Учитывая, что последовательности генов кроликов имеют большую гомологию с генами человека, чем у грызунов, а многие заболевания сопоставимы с теми, что встречаются у человека, использование кроликов в качестве животной модели ставит их в более выгодное положение по сравнению с мышевидными грызунами [51].

## 5.4. Свиньи

Свиньи физиологически, анатомически и генетически схожи с людьми. Таким образом, они кажутся идеальной моделью для изучения сердечно-сосудистой системы. В 2011 г. исследование объединило применение ZFN с технологией переноса ядер соматических клеток для создания свиней с мутацией в  $\gamma$ -рецепторе, активируемом пролифератором пероксисом (Prag- $\gamma$ ). PPAR- $\gamma$ -нокаутированная модель свиньи предоставила полезный инструмент для изучения роли PPAR- $\gamma$  в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [52].

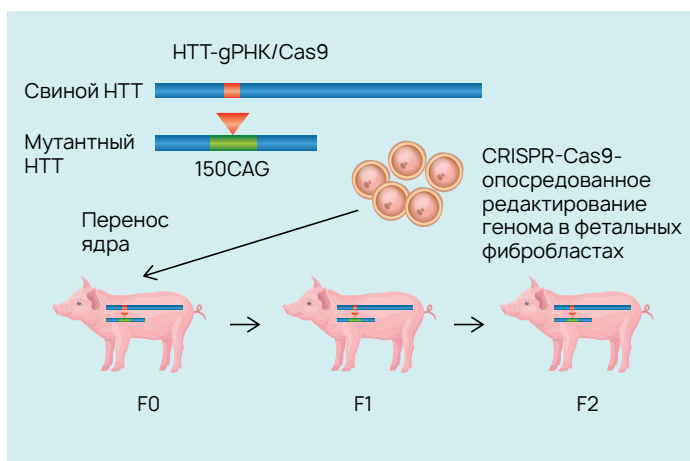
Синдром Марфана является аутосомно-доминантным заболеванием соединительной ткани, вызванным мутациями в гене *FBN1*, проявляется симптомами сердечно-сосудистых и скелетных нарушений. К. Умеяма и соавторы успешно получили *FBN1*-мутантных свиней с помощью ZFN. Фенотипы полученных

животных, такие как сколиоз, замедление минерализации эпифиза, воронкообразная деформация грудной клетки и нарушение структуры эластических волокон медианной ткани аорты, указывают на ценность *FBN1*-модифицированных свиней в качестве модели для лучшего понимания патогенеза синдрома Марфана и разработки методов лечения [53].

Для лучшего понимания механизмов болезни Хантингтона в 2018 г. С. Ян и соавторы применили технологию CRISPR/Cas9 для точной интеграции мутации, опосредующей болезнь Хантингтона человека, содержащей повтор 150CAG, в эндогенный локус гена *htt* свиней. Таким образом были созданы модифицированные нокин свиньи, экспрессирующие мутантный ген человеческого хантингтина (*mHTT*) посредством трансплантации ядер соматических клеток (рис. 5.7). Более того, данная мутация оказалась наследуемой. Это была первая в мире модель крупного животного, созданная для воспроизведения генетических мутаций у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [54].

Важным прорывом в области изучения нейродегенеративных заболеваний является создание свиней, способных к образованию гена *htt*, которые могли бы способствовать разработке новых лекарственных средств для терапии нейродегенеративных заболеваний.

Технологии редактирования генома позволяют создавать в том числе модели болезней обмена веществ. Патогенез одного из них — семейной гиперхолестеринемии — берет свое начало из нарушений в генах рецепторов аполипопротеина Е (ApoE) и липопротеинов низкой плотности (*LDLR*), способных вызвать атеросклероз. В 2012 г. Д.Ф. Карлсон и соавторы опубликовали результаты исследований по клонированию TALEN-модифицированных свиней. Клонирование осуществлялось путем переноса хроматина. В результате супоросности 6 свиноматок были получены 18 жизнеспособных клонов, 8 из которых содержали моноаллельные



**Рис. 5.7.** Создание нокин свиней посредством переноса ядер фетальных фибробластов, отредактированных с помощью CRISPR/Cas, для изучения болезни Хантингтона.

мутации, а 10 — двуаллельные модификации гена *LDLR* [55]. Несколькими годами позже, в связи с распространением технологии CRISPR/CAS, Л. Хуанг и команда сообщили о создании двуаллельных нокаутных свиней с отсутствующими генами *ApoE* и *LDLR*. Хотя *ApoE<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>*-мыши широко использовались для изучения атеросклероза, исследования показали, что профили липопротеинов и метаболизм мышечей, помимо невозможности воспроизведения других важных признаков атеросклероза, отличаются от таковых у людей и свиней. Биохимические исследования сыворотки крови полученных нокаутных поросят подтвердили повышение общего холестерина почти на 57%, а триглицеридов — на 120%, причем данные свойства сохранялись на протяжении длительного времени [56].

### 5.5. Крупный рогатый скот

Крупный рогатый скот редко используется в исследованиях, связанных с генной терапией, ввиду своих размеров, и, следовательно, потребности в больших количествах препаратов рекомбинантного белка или вирусного вектора. В то же время размеры и масса тела молодых особей делают их подходящими основами для моделирования детских заболеваний. Поэтому основными типами заболеваний, которые можно моделировать на крупном рогатом скоте, являются заболевания опорно-двигательного аппарата и нарушение цикла мочевины.

Одним из таких заболеваний является цитруллинемия, возникающая вследствие мутаций в гене *ASS1* либо в гене *SLC25A13*. Цитруллинемия является основной причиной гипераммониемии у детей и приводит к серьезным неврологическим заболеваниям и гибели. У крупного рогатого скота цитруллинемия вызывается нонсенс-мутацией в гене, кодирующем аргиносукцинат-синтетазу. Для исследования этого дефекта цикла мочевины новорожденные телята, как наиболее подходящие модели для растущих детей, получали аденовирусный вектор, содержащий интактную копию гена аргиносукцинат-синтетазы. Спустя неделю в сыворотке телят были повышены концентрации аргиносукцинат-синтетазы, в то время как все остальные печеночные показатели оставались в норме [57].

### 5.6. Мелкий рогатый скот

Овцы и козы имеют близкие к людям подросткового возраста массу и размеры. Однако вследствие особенностей их физиологии, а также высокой стоимости их содержания, их использование в качестве основ для моделирования заболеваний человека ограничено, хотя доказана сопоставимость некоторых заболеваний овец с человеческими аналогами [58]. Еще в 2000-х гг. сообщалось о попытках использования овец в качестве доноров роговицы для человека. Поскольку эндотелий роговицы является основной мишенью при отторжении роговичного трансплантата у человека, были опробованы варианты генной терапии на основе трансдукции вирусом простого герпеса I типа (HSV-I) и аденовирусного вектора, каждый из которых кодирует репортерный ген *lacZ E. coli*. В результате исследования было показано, что вектор HSV-I не обладал способностью эффективно

трандуцировать эндотелий роговицы овцы, в то время как с помощью аденовирусного вектора возможность трандукции достигала 70% эндотелиоцитов [59].

Кроме того, овцы являются единственной экспериментальной моделью болезни Тея–Сакса, относящейся к лизосомным болезням накопления, обусловленной мутацией в гене *HEXA*. Он кодирует  $\alpha$ -субъединицу фермента гексоамидазы А, что приводит к ее дефициту и, следовательно, поражениям центральной нервной системы. На TSD-овцах проводили оценочную генную терапию посредством внутримозговой инъекции моноцистронных векторов AAVrh8, кодирующих  $\alpha$ -субъединицу Hex, и объединенных векторов, кодирующих как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -субъединицы по отдельности, инъецированных в высоких и низких дозах. Отсрочка появления клинических признаков или уменьшение выраженности уже существующих проявлений были отмечены у всех животных, получавших аденоассоциированную вирусную терапию, однако лучшее распределение HexA и векторного генома в головном мозге животных моделей было достигнуто в случае объединения двух векторов, хотя распределение по спинному мозгу оставалось низким во всех группах [60].

Другим достаточно редким заболеванием, относящимся к лизосомным болезням накопления, является гликогеноз V типа (болезнь Мак-Ардля), выражающаяся в деформации мышц, мышечных болях и усталости при мышечных нагрузках, вызванных отложением значительного количества гликогена в мышечной ткани вследствие нарушения каталитической функции мышечной фосфорилазы (миофосфорилазы). Используя аденовирусный вектор AdV5, аденоассоциированный вектор AAV2 и плазмидные ДНК, были проведены исследования по генной терапии для доставки ДНК, кодирующей миофосфорилазы, и репортерного гена *LacZ* (кодирует фермент  $\beta$ -галактозидазу) в мышцы пораженных овец. Плазмиды доставлялись как методами электропорации или сонопорации, так и без них. Среди вирусных векторов было выявлено большее количество трандуцированных мышечных волокон, которые более длительное время сохранялись после использования AdV5, а плазмиды, доставленные методом электропорации, приводили к большему уровню трансфекции по сравнению с другими плазмидами [61].

## 5.7. Лошади

Наиболее распространенным общим и экономически значимым заболеванием для лошади и человека является остеоартрит. С помощью общепринятой модели остеоартрита лошадей, имитирующей клинический остеоартрит, Д. Д. Фрисби и соавторы исследовали терапевтические эффекты, возникающие в результате внутрисуставной гиперэкспрессии гена-антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) лошади аденовирус-опосредованным переносом гена. По окончании исследования клиническое обследование лошадей показало, что терапевтическая экспрессия IL-1Ra значительно уменьшала признаки боли в суставах, измеренные по степени хромоты [62].

Другое заболевание, исследование генной терапии которого проводили Л.М. Хейнзерлинг с коллегами [63], — меланома. Согласно статистическим данным, заболевание поражает до 80% лошадей серой масти старше 12 лет. При этом форма и течение заболевания имеют мало общего с аналогичными характеристиками у человека, однако гистологические и иммуногистохимические особенности демонстрируют многие схожие черты с человеческими неоплазиями. Это дало возможность использовать лошадь серой масти в качестве адекватной модели для генной терапии меланомы. Результаты исследований показали, что инъекция плазмидной ДНК, кодирующей интерлейкин-12 человека, в метастазы меланомы вызывала значительную регрессию во всех очагах поражения. Более того, в одном из обработанных очагов наблюдалось полное исчезновение метастазов без рецидива по прошествии 6 мес. Во время лечения и в посттерапевтический период ни у одного из животных не наблюдалось побочных эффектов [63].

## 5.8. Кошки

Считается, что кошки реже страдают наследственными заболеваниями, но особенности анатомии и физиологии кошек позволили выбрать их в качестве адекватных моделей для исследования органов зрения и нервной системы. Кошки обладают крупными глазами, их головной мозг анатомически сходен с человеческим. Это делает их наиболее привлекательными для моделирования таких заболеваний, как лизосомные болезни накопления и спонтанные заболевания сетчатки. О том, что некоторые породы кошек являются своего рода готовыми моделями для некоторых заболеваний глаз, стало известно благодаря генетическому картированию.

Для изучения дегенерации сетчатки было предложено использование кошек абиссинской породы — *rdAc*-модель и *Rdy*-модель [64]. К сожалению, информация о начале исследований по терапии данного заболевания на генетическом уровне отсутствует.

С другой стороны, постоянно поступают сообщения об успешных результатах экспериментальной терапии различных лизосомных болезней накопления. Наследственный  $\alpha$ -маннозидоз вызывается недостаточной активностью фермента  $\alpha$ -маннозидазы и приводит к накоплению богатых маннозой олигосахаридов в лизосомах. Основными симптомами данного заболевания у человека являются умственная отсталость, атаксия, гепатоспленомегалия, гиперплазия десен, потеря слуха, патологии скелета и др. У кошек персидской породы данное заболевание может наследоваться и выражается в прогрессирующей атаксии мозжечка, поликистозе почек, гепатомегалии, скелетных аномалиях и других клинических признаках, схожих с человеческими. Результаты серии исследований на кошках выглядят весьма обнадеживающими: после 6 инъекций аденоассоциированного вируса, несущего корректную копию гена  $\alpha$ -маннозидазы, в каждое роstralное полушарие головного мозга и роstralный ствол головного мозга, а также 2 инъекций в мозжечок отмечалось уменьшение выраженности признаков дисфункции

мозжечка, в то время как в контрольной группе животных, не получавших лечения, наблюдалось усиление дисфункции мозжечка. Положительную динамику показал и анализ лизосомальных хранилищ, хотя их количество увеличивалось вместе с увеличением расстояния от места введения иглы. Ни в одном из участков мозга кошек, подвергшихся терапии, не отмечалось такого существенного количества лизосомальных хранилищ, как у контрольных животных [65].

Эксперименты по генной терапии ганглиозидоза GM1 проводились на GM1-моделях кошек посредством доставки AAV вектора, экспрессирующего  $\beta$ -Gal ( $\beta$ -галактозидазу), путем билатеральной инъекции в таламус и глубокие ядра мозжечка. Долгосрочные наблюдения за GM1-кошками показали статистически значимое увеличение выживаемости по меньшей мере в 5 раз по сравнению с GM1-моделями, не получавшими терапевтического средства [66]. Кошачий ганглиозидоз GM2, обусловленный одной из четырех мутаций в гене *HEXB*, вызывающий дефицит как ферментов HexA, так и HexB, является истинной моделью ганглиозидоза GM2 человека (болезнь Сандхоффа). Терапия подобных моделей проводилась также посредством двусторонних интраталамических инъекций AAV-векторов, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -Hex-субъединицы, что привело сначала к удвоению продолжительности жизни животных, а после модификации методики — к увеличению в 4 раза продолжительности жизни животных, получавших лечение, по сравнению с контрольной группой [65].

МПС типа I (МПС I) у человека характеризуется дефицитом лизосомального фермента  $\alpha$ -L-идурунидазы (IDUA; фермент, гидролизующий концевые остатки  $\alpha$ -L-идуруновой кислоты двух гликозаминогликанов — дерматансульфата и гепарансульфата), влекущим за собой накопление в лизосомах частично разложившихся дерматансульфата и гепарансульфата. Это служит причиной проявлений клинических признаков, чаще всего выражающихся в сочетании запаздывающего умственного и физического развития, помутнения роговицы, органомегалии, высокого содержания гликозаминогликанов в моче и др. Кошачья модель МПС I по клиническим проявлениям наиболее близка к тяжелой форме МПС I человека. Успешное клонирование последовательности кДНК кошачьего IDUA (fIDUA) командой К. Хиндерера позволило проводить исследование генной терапии не только на собачьих моделях, но и на моделях кошек. Ранние исследования на кошках проводились путем применения генетического продукта собачьего IDUA, что приводило к развитию цитотоксического Т-лимфоцитарного иммунного ответа. Обобщенные результаты терапевтической интратекальной доставки AAV9-fIDUA показали глобальную трансдукцию ЦНС, нормализацию вторичных лизосомальных ферментов и уменьшение повреждений, связанных с накоплением гликозаминогликанов, холестерина и GM3-ганглиозида [67], несмотря на присутствие иммунного ответа. Результаты дальнейших исследований при внутривенной доставке AAV9-fIDUA показали полную коррекцию сердечно-сосудистых поражений, связанных с МПС I, у кошачьих моделей [68].

Говоря о заболеваниях инфекционной этиологии, в первую очередь следует остановиться на кошачьей модели ВИЧ. Все представители семейства кошачьих подвержены собственному иммунодефицитному заболеванию

(FIV), вызываемому лентивирусом из семейства *Retroviridae* и приводящему к прогрессирующему истощению иммунитета и, в конечном итоге, к синдрому приобретенного иммунодефицита. По структурной и последовательной организации FIV очень близок к ВИЧ, который также относится к роду *Lentivirus*, морфологически представляет собой сферический вирион диаметром около 120 нм (против 100 нм у FIV), содержащий диплоидный набор генов — пару копий одноцепочечной позитивной смысловой РНК, упакованной вместе с нуклеокапсидом (p7) и дополнительными белками (обратная транскриптаза, интеграз, протеаза). По аналогии с FIV в плотном ядре капсидного белка (p24) вириона ВИЧ содержится рибонуклеопротеиновый комплекс, окруженный сферической оболочкой матричного белка (p17) [69]. Как и FIV, ВИЧ требуется исходное взаимодействие с первичным связывающим рецептором. Однако, в отличие от FIV, рецептором для прикрепления которого служит поверхностная молекула CD134, что позволяет инфицировать В-клетки и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки в дополнение к лимфоцитам CD4<sup>+</sup>, макрофагам или моноцитам, ВИЧ использует CD4<sup>+</sup> в качестве основного связывающего рецептора, а CCR5 — в качестве основного рецептора проникновения. Кроме того, ген *orfA*, кодирующий белок OrfA, ошибочно считавшийся трансактиватором транскрипции FIV, имеет схожую локализацию с геном, кодирующим трансактиватор ВИЧ, — *Tat* [70]. Было показано, что вирионы FIV, как и ВИЧ, в острой фазе течения проникают в ЦНС посредством инфицированных лимфоцитов и моноцитов, либо свободный вирус проходит сквозь гематоэнцефалический барьер, в дальнейшем распространяясь на микроглию и астроциты, которые затем служат резервуаром латентной вирусной персистенции [71].

Такие особенности не могли не привлечь внимание исследователей к подобной «естественной» модели для изучения иммунодефицита человека, поэтому FIV-инфицированные кошки используются для изучения патогенеза ВИЧ, например, неврологической или иммунной дисфункции, а также ВИЧ-ассоциированных заболеваний [71]. В свою очередь, результаты исследований по созданию вакцины против FIV с перспективой дальнейшего получения данных, способных стать базисом для разработки стратегии вакцинации против ВИЧ, неоднозначны. Установлено, что созданная вакцина не обеспечивает иммунитет против некоторых штаммов FIV. В то же время другие разработанные вакцины против FIV либо не вызывали защитный иммунитет, либо приводили к повышенной восприимчивости к возбудителю посредством антитело-зависимого усиления или общей иммунной активации [72, 73]. Несмотря на это, модель FIV обладает значительным потенциалом в качестве надежного носителя для оценки эффективности новых методов терапии ВИЧ.

## 5.9. Собаки

Многие составляющие иммунной системы собак аналогичны с таковыми у людей. Кроме того, их размеры и продолжительность жизни сопоставимы

с детьми. Поэтому неудивительно, что более 50% генетических заболеваний собак вызываются мутациями в тех же генах, что и у человека.

Для оценки эффективности и безопасности экспериментальной генной терапии МПС на моделях собак исследовали влияние на головной мозг аденоассоциированных вирусных векторов, посредством которых осуществлялась доставка IDUA. Исследования проводились на известных моделях МПС типа ШВ (синдром Сан-Филиппо В) и упомянутого ранее МПС I. В ходе исследования показано, что для эффективного воздействия терапевтических комплексов на функции головного мозга необходимо поддержание собак в состоянии иммуносупрессии, т.к. ее отсутствие у некоторых МПС ШВ-моделей приводило к низкому числу копий векторов, отсутствию определяемой активности N-ацетил-альфа-глюкозаминидазы (фермента, расщепляющего гепарансульфат путем гидролиза концевых остатков N-ацетил-D-глюкозамина в N-ацетил-альфа-D-глюкозаминидах), незначительным улучшениям степени тяжести патологии и выраженному воспалительному ответу [74].

МДД первоначально была выявлена у молодого золотистого ретривера (GRMD), поэтому, несмотря на наличие мышинных моделей, GRMD-модель является клинически более близкой моделью этого заболевания у человека. Текущие исследования генной терапии на животных моделях МДД включают терапию на основе плазмидных ДНК и вирусных векторов. Прямые внутримышечные инъекции плазмиды, кодирующей дистрофин человека, генерировали несколько дистрофин-позитивных клеток, в то время как электроперенос плазмид, кодирующих и полноразмерный вариант дистрофина, и микродистрофин, вызывал ограниченную экспрессию и увеличение клеточных инфильтратов. Использование аденовирусных (AdV) и AAV-векторов также давало положительные результаты, однако побочным эффектом было проявление первичного клеточного ответа против капсидных и трансгенных белков, что, впрочем, было решено посредством создания у животных иммунной супрессии.

Несколько многообещающие данные позволили получить пропуск мультиэкзонов с использованием антисмысловых нуклеотидов для восстановления рамки считывания и получения более коротких, но функциональных белков дистрофина. Исследования векторной доставки этих РНК посредством AAV или AAV-U7 в мышцы предоставили данные о безопасности и эффективности для доклинических исследований посредством дозозависимого ответа, который увеличил экспрессию дистрофина и уменьшил степень патологии в скелетной мышце, подвергшейся терапии [75].

Наиболее часто встречающейся формой гемофилии является гемофилия А, вызванная врожденным дефицитом белка фактора свертывания крови VIII (FVIII), связанным с рецессивной мутацией в X-хромосоме. Поскольку режим терапии посредством введения больным рекомбинантных или полученных из плазмы белков FVIII по прошествии времени становится неэффективным вследствие появления FVIII-специфических антител, а также дороговизны самого лечения, методы генной терапии становятся привлекательными способами поддержания стабильности здоровья пациентов с гемофилией А (ГА).



Выбор собак в качестве основы для моделирования гемофилий был особенно удачен не только потому, что физиологически они близки к детям, но и потому, что данные модели являются естественными (собаки оказались подвержены трем типам заболевания: А, В и С).

Первые шаги по генной терапии ГА-моделей собак, хотя и имели некоторый успех, однако введение человеческой кДНК, кодирующей FVIII, посредством AdV-векторов было малоэффективным ввиду кратковременности экспрессии [76], вызванной, по утверждению некоторых авторов [77, 78], двухфазной токсичностью векторов более раннего поколения. В связи с этим все последующие исследования были связаны с уменьшением токсичности векторных вирусов. В.М. МакКормак и коллеги сообщали, что, сконструировав аденовирусный вектор HDV-PEPCK/BDD-cFVIII/WPRE для доставки собачьей кДНК FVIII (cFVIII), они наблюдали временное дозозависимое повышение уровня печеночных ферментов и тромбоцитопению, нивелировавшееся в течение 2 нед. При этом показатели, по которым проводилась оценка эффективности терапии (время свертывания цельной крови, концентрация и активность cFVIII в плазме, активированное частичное тромбопластиновое время), у всех экспериментальных животных значительно улучшились, а у 2 животных, получавших повышенную дозу, время свертывания цельной крови достигло практически нормальных значений, несмотря на снижающийся уровень активности cFVIII на протяжении 2 лет. Кроме того, в ткани печени были обнаружены персистирующие вектор-специфические ДНК и РНК, в то время как противовирусных антител не обнаружено. Авторы отмечают и тот факт, что после пункций вен у собак не проявлялось такого клинического признака гемофилии, как продолжительное кровотечение [79]. Таким образом, была показана возможность преобразования тяжелого течения гемофилии А в умеренную форму.

Генная терапия дефицита другого фактора свертываемости крови — проконвертина (FVII) — была успешно продемонстрирована на FVII-G96E-моделях собак. В качестве терапевтического средства применялись возрастающие дозы (от  $2E11$  до  $4.95E13$  векторных геномов на 1 кг массы тела) векторной конструкции AAV серотипа 8, содержащей комплементарную для зимогена ДНК cFVII. Результаты исследования показали пролонгированную эффективность и безопасность выбранной конструкции, а также адекватность выбора собак FVII-G96E в качестве моделей [80].

X-сопряженный тяжелый комбинированный иммунодефицит (XSCID) человека связан с мутациями в гене  $\gamma$ -цепи интерлейкина-2, что является смертельно опасным для детей с данным диагнозом в первые годы жизни ввиду полного отсутствия клеточного и гуморального иммунитета. В свою очередь, у собак выявлены две различные спонтанные мутации, приводящие к истинным клиническим, патологическим и иммунологическим XSCID-моделям. Стандартом лечения пациентов с XSCID была признана трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, минуя предварительное трансплантационное кондиционирование. Подобную схему терапии применяли на собачьих XSCID-моделях с использованием в качестве доноров костного мозга нормальных собак. В отличие

от пораженных XSCID людей, у которых наблюдалось приживание донорских Т-клеток и восстановление функции Т-клеток, но отмечалось незначительное приживание донорских В-клеток и плохое восстановление гуморального иммунного ответа, собаки XSCID-модели продемонстрировали циркуляцию 100% донорских Т-клеток и 20–50% донорских В-клеток и достигли полного восстановления иммунной функции [81]. Несмотря на снижение разнородности Т-клеток по прошествии времени после трансплантации, XSCID-собаки могли достичь предела выживаемости более 10 лет [82].

Попытка применения генетически улучшенных аутологических гемопоэтических стволовых клеток в качестве альтернативы классической трансплантации гемопоэтических стволовых клеток посредством терапии  $\gamma$ -ретровирусным геном поначалу имела неплохие результаты, однако постепенное снижение уровня Т-клеток привело к гибели всех собак в течение 11 мес после трансплантации [83].

Генная терапия *in vivo* посредством внутривенного введения RD114-псевдотипированного ретровирусного вектора продемонстрировала вирусную экспрессию в лимфоцитах периферической крови через 3 нед после инъекции, которая увеличивалась до 85% Т-клеток с исправленными генами спустя 8 нед после терапии. Продолжительные наблюдения выявили у собак устойчивую коррекцию Т-лимфоцитов и постоянную циркуляцию до 26% генетически исправленных В-лимфоцитов, а также присутствие вектора в миелоидных линиях и нормализацию функции иммунной системы до 18 мес после окончания терапии [84]. П. Й. Фелсбург и коллеги сообщали, что коррекция генов Т-клеток у собак посредством лентивируса сохранялась и поддерживалась на протяжении 4,5 года [85]. В 2014 г. были опубликованы результаты исследования по генной терапии XSCID *in vivo* с использованием пенистого вирусного вектора, согласно которым все собаки из терапевтической группы демонстрировали наличие генетически скорректированных лимфоцитов уже спустя 2 нед после инъекции, и их количество продолжало увеличиваться в течение 12 нед, однако выживаемость XSCID-моделей варьировала от 3 до 10,5 мес [86].

Врожденный амавроз Лебера составляет около 15% заболеваний, связанных с наследуемой врожденной слепотой. Причиной амавроза Лебера может быть исчезновение в результате мутации в гене *RPE65* фермента лецитин/ретинолацилтрансферазы, необходимого для регенерации фотопигмента в сетчатке. Естественная животная *RPE65*<sup>-/-</sup>-модель имеет аналогичные с человеком, страдающим врожденным амаврозом Лебера, ранние и серьезные нарушения зрения. Терапия рекомбинантным AAV, несущим *RPE65* дикого типа, дала хорошие результаты: улучшение зрения позволило собакам пройти через лабиринт [87]. Это дало возможность проводить успешные исследования и на людях.

На свойстве Fas-лиганда вызывать апоптоз клеток меланомы было основано исследование С. Р. Бианцо и коллег. Для этого липосомы, конъюгированные с ДНК, кодирующей Fas-лиганд, инъецировали интралеззионно, а также в окружающие новообразование ткани. Дальнейшие наблюдения продемонстрировали

регрессию меланомы ротовой полости на 12–58% у 3 из 5 собак [88]. Данную модель можно считать адекватной, т. к. она является естественной.

## 5.10. Нечеловекообразные приматы

У нечеловекообразных приматов (НЧП) есть врожденное превосходство по сравнению с другими моделями животных из-за сходства с людьми в генетике, физиологии, биологии развития, социальном поведении и познании. НЧП могут быть идеальной моделью, особенно для заболеваний нервной системы [89].

Хотя манипулирование генами у обезьян гораздо сложнее, чем у других животных (после того, как была создана первая трансгенная мышь, потребовалось более 25 лет исследований для создания трансгенных НЧП), разработка редактирования генома ускоряет исследования по созданию моделей НЧП.

Синдром Ретта является X-связанным нарушением нервного развития в спектре аутизма. Известно, что мутационные потери функции метил-СpG-связывающего белка 2 (MECP2) приведут к синдрому Ретта. В исследовании Й. Чена и коллег были разработаны три пары TALEN, нацеленных на несколько областей экзона 3 MECP2. Все три плазмиды, кодирующие TALEN, по отдельности и в комбинациях вводили в одноклеточные зиготы обезьян. Результаты показали, что MECP2-мутантные самцы имели эмбриональную летальность, в то время как у мутантных самок появлялись физиологические и поведенческие расстройства. Важно отметить, что эти нарушения были похожи на наблюдающиеся у пациентов с синдромом Ретта. Эта модель на животных предоставила больше возможностей для изучения механизмов заболевания и поиска вариантов лечения [90]. В другом исследовании CRISPR/Cas9 был нацелен на экзоны 4 и 46 МДД для создания МДД-моделей обезьян [91].

Первичные иммунодефициты составляют разнообразную группу редких и хронических заболеваний. Часть иммунной системы отсутствует или неправильно функционирует, угрожая жизни пациентов. Тяжелый комбинированный иммунодефицит является наиболее сложной формой проявления иммунодефицита [92].

В 2016 г. японские ученые оптимизировали ZFN и TALEN для создания инсерций или делеций в локусе, кодирующем субъединицы  $\gamma$ -рецептора интерлейкина-2 (IL2RG), у эмбрионов мармышек на стадии пронуклеуса. Обнаруживаемые мутации ДНК в целевом локусе приводили к инактивации IL2RG одновременно с иммунодефицитом (**рис. 5.8**). Они продемонстрировали высокоэффективное поколение НЧП-основателей с фенотипами тяжелого комбинированного иммунодефицита [93].

Для изучения HBV и HCV оптимальными основами для моделей всегда считались шимпанзе. Однако в последние годы из-за ужесточения этических норм и правил проведение таких исследований крайне ограничено. В связи с этим возникла необходимость получения моделей данных инфекционных заболеваний на НЧП и других животных моделях. До настоящего времени все попытки передать HBV НЧП не увенчались успехом. Исключение составляли

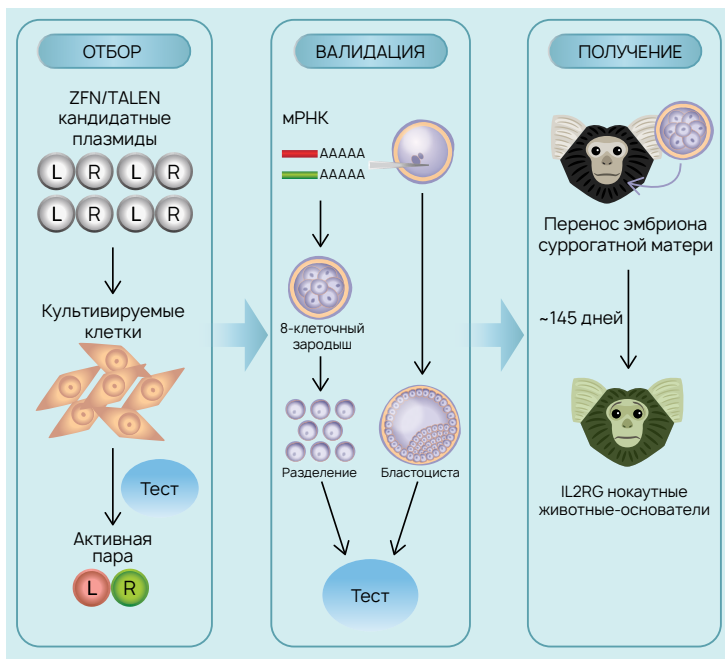


Рис. 5.8. Схема получения НЧП с фенотипом тяжелого комбинированного иммунодефицита посредством технологий ZFN и TALEN.

макаки, которые поддерживают репликацию HBV после внутрипеченочной инокуляции ДНК-конструкций HBV (плазмидных). Но даже в этом случае максимальный полученный результат — это самоограничивающийся гепатит [94]. В связи с этим необходимо проведение дальнейших исследований для оценки пригодности данной модели для изучения противовирусных и иммунологических аспектов инфекции, вызванной HBV.

Вернувшись к проблеме моделирования HBV-инфекции, хочется упомянуть животных, не являющихся приматами, однако экспериментально восприимчивых к HBV, — тупаях (*Scandentia*). Низкая эффективность инфицирования стандартных лабораторных животных в совокупности с этическими и экспериментальными ограничениями сделали HBV-модель тупай наиболее приемлемой при исследованиях *in vivo*. Показано, что заражение новорожденных животных HBV-индуцированной хронической инфекцией приводит к умеренным уровням виремии и иммунопатологическим изменениям в печени инфицированных животных, в том числе фиброзу и развитию гепатоцеллюлярной карциномы [95].

Казалось бы, обладание НЧП высокоразвитой корой головного мозга, когнитивными возможностями, сложными моторными навыками и нейроанатомией, сходной с человеком, должно делать их выгодными базами для моделирования возрастных нейродегенеративных заболеваний человека, характеризующихся

прогрессирующей гибелью нейронов, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона или Хантингтона. Однако успехи последних лет в области изучения этих расстройств позволили лишь незначительно приблизиться к пониманию патогенеза и терапии некоторых симптомов этих болезней.

Типичными методами имитации болезни Альцгеймера у приматов считались старение или целенаправленное поражение обогащенных холинергических областей головного мозга. Возрастные нарушения, отмечавшиеся у пожилых приматов, частично имели признаки болезни Альцгеймера, однако они не могли полностью отразить всех аспектов заболевания [96–99]. Когнитивный дефицит, связанный с утратой холинергических нейронов, моделировался посредством стереотаксических инъекций цитотоксина иботеновой кислоты в базальный передний мозг [100], в то время как повреждение гиппокампа и хвостатого ядра приводило к угнетению способности обучаться выполнению сложных задач [101]. Недавние исследования подтвердили участие фактора роста нервов (NGF) в сохранении холинергических нейронов, однако NGF не способен самостоятельно преодолеть гематоэнцефалический барьер, поэтому терапия моделей требовала адресной интрацеребральной доставки NGF, осуществляемой, к примеру, генетически модифицированными аутологичными фибробластами [102]. Эффективность этих методов послужила основанием для проведения в 2005 г. фазы I клинических испытаний, положительные результаты которых были опубликованы в 2015 г. [103]. Альтернативным вариантом персонализированной клеточной доставки NGF послужили AAV и лентивирусные векторы. М.Х. Тужински и соавторы показали способность AAV-NGF вызывать длительную биологически активную экспрессию NGF [103].

Первые попытки смоделировать на приматах двигательные расстройства, характерные для болезни Хантингтона, также сводились к нейротоксин-опосредованной индукции повреждения нейронов полосатого тела (стриатума). Лишь в 2008 г. были опубликованы данные, описывающие первую НЧП-модель болезни Хантингтона. Перенос генов осуществлялся посредством инъекции зрелых яйцеклеток макак-резусов в перивиттелиновое пространство, добавляя затем лентивирусный вектор, обладающий высоким титром и экспрессирующий экзон 1 *HTT* человека с 84 CAG-повторами. Все приматы родились в срок и несли трансгенные мутантные *HTT*-гены, хотя длина повторов колебалась от 27 до 88 повторов, что привело к гибели 2 животных в течение суток, а одного — в возрасте 1 мес [104]. Что касается применения методов генной терапии нового поколения, то в настоящее время они находятся на стадии исследований на клеточных культурах, а также мышинных и НЧП-моделях.

Болезнь Паркинсона представляет собой нейродегенеративное заболевание, возникающее, главным образом, вследствие дегенерации нигростриальных дофаминергических нейронов, и выражающееся в треморе, ригидности, постуральной неустойчивости, медлительности и трудности при ходьбе [105]. Для имитации моторной дисфункции, как и в предыдущих случаях, большой популярностью пользовались нейротоксины, действие которых, конечно, не могло воспроизвести полную картину, т. к. они оказывают острое воздействие

на нейроны, слабо имитируя прогресс заболевания. Среди генов, связанных с болезнью Паркинсона, можно выделить  $\alpha$ -синуклеин (*SCNA*) и киназу-2 лейцин-богатых повторов (*LRRK2*).

Одной из острых проблем, препятствующей прогрессу в разработке эффективных вариантов терапевтических средств для лечения болезни Паркинсона, является отсутствие многогранной животной модели. Существующие модели представлены двумя вариантами: острые (нейротоксин-индуцированные) и хронические (генетические). Принцип нейротоксиновых моделей основан на губительном воздействии свободных радикалов, образующихся при введении 6-гидроксидопамина [106] или 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина [107, 108], на дофаминергические нейроны. Как и нейротоксиновые модели предыдущих нейродегенеративных заболеваний, острые модели болезни Паркинсона имитируют лишь двигательные симптомы заболевания без прогрессирующей гибели дофаминергических клеток, что является значительной помехой при разработке терапевтических стратегий. Создание трансгенных мышей, несущих миссенс-мутации в генах, ответственных за *SNCA* ( $\alpha$ -синуклеин) и *LRRK2* (богатая лейцином повторная киназа 2, дардарин), позволило воспроизвести ограниченный паркинсонизм, опосредованный умеренной нигростриатальной дегенерацией дофаминергических нейронов [109–111]. Для создания хронической модели были успешно проведены исследования по интрацеребральной инъекции AAV-векторов или лентивирусных векторов, содержащих мутированный *SNCA* [112–114]. У НЧП-моделей, полученных из макак-крабоедов (*Macaca fascicularis*, циномольтус) или макак-резусов (*Macaca mulatta*), отмечались двигательные нарушения и нейropатологические особенности, характерные для болезни Паркинсона.

Обнадеживающие данные исследований о применении в качестве вектора доставки хелпер-зависимого аденовируса собак (CAV-2) [115] делают его идеально подходящим для моделирования болезни Паркинсона на НЧП. Эти векторы у грызунов и НЧП трансдуцируют преимущественно нейроны, при этом не оказывая продолжительного воздействия на гомеостаз новорожденных нейронов, и имеют клонируемую вместимость до 30 тыс. пар нуклеотидов. На основании этих данных недавно были созданы векторы CAV-2, содержащие кассету экспрессии *LRRK2 G2019S*, которую вводили в путамен (от лат. *putamen* — скорлупа) достаточно интересного НЧП — серого мышинного лемура (*Microcebus murinus*), обладающего положительными чертами как мышевидных грызунов (небольшие размеры, хорошая продуктивность в условиях неволи), так и особенностями нервной системы НЧП [116].

Что же касается самой генной терапии болезни Паркинсона, то, в связи с несовершенством животных моделей, на сегодняшний день лечение пациентов малоэффективно.

В 2018 г. многопрофильной командой ветеринарных врачей и ученых было сделано сообщение о носительстве небольшой популяцией японских макак (*Macaca fuscata*) мутации в гене *CLN7*, вызывающем одну из форм болезни Баттена — редкого смертельного нейродегенеративного рецессивно наследуемого

заболевания, входящего в группу восковицидных липофусцинозов нейронов. Это открытие сделает возможным разработку и тестирование стратегии генной терапии болезни Баттена, поскольку данная популяция макака является единственной известной моделью этого заболевания среди НЧП в мире [117].

НЧП-модели служат промежуточным звеном для понимания механизмов заболевания и связующим мостом, ведущим от экспериментального лечения имитированных патологических состояний к терапии реально страдающих пациентов. Совершенствование технологий направленного редактирования генома и методов эмбриональной инженерии позволят перенести НЧП в категорию рутинных моделей лабораторных животных для изучения генной терапии и скрининга лекарственных препаратов.

Возможность ознакомить читателя со всем многообразием существующих животных моделей, конечно, ограничена рамками нашей монографии. Исследователи всего мирового сообщества делают попытки имитировать не просто отдельные симптомы (хотя на начальных этапах это вполне оправдано), но и патогенез, приводящий к проявлению полного симптомокомплекса заболевания, характерного для человека. Крайне важно и необходимо тесное сотрудничество исследовательских институтов и лабораторий с мировым ветеринарным сообществом, ведь некоторые заболевания, характерные для животных, могут стать адекватными моделями для заболеваний человека, а полная расшифровка генома, в том числе диких животных, позволит выявить новые адекватные базы для моделирования.

Моделирование на одном виде животных на сегодняшний день не может полностью продемонстрировать весь путь повреждающего агента от его внедрения до развития тяжелого комплекса полиорганной дисфункции, будь то патоген или наследуемая мутация гена. Поэтому вполне естественно, что ни рыбки данио-рерио, ни даже плоские черви, которым, к сожалению, мы не уделили должного внимания, в ближайшие десятилетия не потеряют своей актуальности при изучении патогенеза различных заболеваний и разработке стратегий изучения эффективности генной терапии посредством систем направленного редактирования генома.

## Литература

1. Blagbrough I.S., Zara C. Animal models for target diseases in gene therapy – using DNA and siRNA delivery strategies. *Pharm. Res.* 2009; 26(1): 1.
2. Simmons D. The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation. *Nature Education.* 2008; 1(1): 70.
3. Rosen B.H., Chanson M., Gawenis L.R., et al. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2018; 17(2S): S28-S34.
4. Hardouin S.N., Nagy A. Mouse models for human disease. *Clin. Genet.* 2000; 57(4): 237-44.
5. Bouabe H., Okkenhaug K. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol. Biol.* 2013; 1064: 315-36.
6. Jimenez N., Coll J., Salguero F.J., et al. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine.* 2006; 24(27-28): 5615-26.

7. Rossi A., Kontarakis Z., Gerri C., et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015; 524(7564): 230-3.
8. Novodvorsky P., Watson O., Gray C., et al. *klf2ash317* mutant zebrafish do not recapitulate morpholino-induced vascular and haematopoietic phenotypes. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0141611.
9. Ota S., Hisano Y., Ikawa Y., et al. Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes Cells*. 2014; 19(7): 555-64.
10. Kotani H., Taimatsu K., Ohga R., et al. Efficient multiple genome modifications induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 protein complex in zebrafish. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0128319.
11. Cao J., Navis A., Cox B.D., et al. Single epicardial cell transcriptome sequencing identifies Caveolin 1 as an essential factor in zebrafish heart regeneration. *Development*. 2016; 143(2): 232-43.
12. Zou J., Tran D., Baalbaki M., et al. An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of Titin in zebrafish. *Elife*. 2015; 4: e09406.
13. Kennedy B.N., Alvarez Y., Brockerhoff S.E., et al. Identification of a zebrafish cone photoreceptor-specific promoter and genetic rescue of achromatopsia in the *nof* mutant. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007; 48(2): 522-9.
14. Furutani-Seiki M., Sasado T., Morinaga C., et al. A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev*. 2004; 121(7-8): 647-58.
15. Homma N., Harada Y., Uchikawa T., et al. Protanopia (red color-blindness) in medaka: a simple system for producing color-blind fish and testing their spectral sensitivity. *BMC Genet*. 2017; 18(1): 10.
16. Tseng W.C., Loeb H.E., Pei W., et al. Modeling Niemann-Pick disease type C1 in zebrafish: a robust platform for in vivo screening of candidate therapeutic compounds. *Dis. Model. Mech*. 2018; 11(9): dmm034165.
17. Strachan L.R., Stevenson T.J., Freshner B., et al. A zebrafish model of X-linked adrenoleukodystrophy recapitulates key disease features and demonstrates a developmental requirement for *abcd1* in oligodendrocyte patterning and myelination. *Hum. Mol. Genet*. 2017; 26(18): 3600-14.
18. Chen Y., Lu W., Gao N., et al. Generation of obese rat model by transcription activator-like effector nucleases targeting the leptin receptor gene. *Sci. China Life Sci*. 2017; 60(2): 152-7.
19. Larcher T., Lafoux A., Tesson L., et al. Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2014; 9(10): e110371.
20. Wang L., Kempton J.B., Brigande J.V. Gene therapy in mouse models of deafness and balance dysfunction. *Front. Mol. Neurosci*. 2018; 11: 300.
21. Carroll K.J., Makarewich C.A., McAnally J., et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016; 113(2): 338-43.
22. Jones J.M., Meisler M.H. Modeling human epilepsy by TALEN targeting of mouse sodium channel *Scn8a*. *Genesis*. 2014; 52(2): 141-8.
23. Xue W., Chen S., Yin H., et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 2014; 514(7522): 380-4.
24. Platt R.J., Chen S., Zhou Y., et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*. 2014; 159(2): 440-55.
25. McColl B., Vadolas J. Animal models of  $\beta$ -hemoglobinopathies: utility and limitations. *J. Blood Med*. 2016; 7: 263-74.
26. Zou Y.R., Gu H., Rajewsky K. Generation of a mouse strain that produces immunoglobulin kappa chains with human constant regions. *Science*. 1993; 262(5137): 1271-4.
27. Zou Y.R., Müller W., Gu H., et al. Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr. Biol*. 1994; 4(12): 1099-103.



28. Murphy A.J., Macdonald L.E., Stevens S., et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(14): 5153-8.
29. Macdonald L.E., Karow M., Stevens S., et al. Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(14): 5147-52.
30. Li K., Wohlford-Lenane C.L., Channappanavar R., et al. Mouse-adapted MERS coronavirus causes lethal lung disease in human DPP4 knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114(15): E3119-28.
31. Cockrell A.S., Yount B.L., Scobey T., et al. A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. *Nat. Microbiol.* 2016; 2(2): 16226.
32. Gorman M.J., Caine E.A., Zaitsev K., et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. *Cell Host Microbe*. 2018; 23(5): 672-85.e6.
33. Sarkar S., Heise M.T. Mouse models as resources for studying infectious diseases. *Clin. Ther.* 2019; 41(10): 1912-22.
34. Walsh N.C., Kenney L.L., Jangalwe S., et al. Humanized mouse models of clinical disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2017; 12: 187-215.
35. Guidotti L.G., Matzke B., Schaller H., et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 1995; 69(10): 6158-69.
36. Ando K., Moriyama T., Guidotti L.G., et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J. Exp. Med.* 1993; 178(5): 1541-54.
37. Yang D., Liu L., Zhu D., et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy. *Cell Mol. Immunol.* 2014; 11(1): 71-8.
38. Dandri M., Petersen J. Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2012; 56(2): 493-5.
39. Azuma H., Paulk N., Ranade A., et al. Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25(8): 903-10.
40. Sun S., Li J. Humanized chimeric mouse models of hepatitis B virus infection. *Int. J. Infect. Dis.* 2017; 59: 131-6.
41. Flisikowska T., Thorey I.S., Offner S., et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One*. 2011; 6(6): e21045.
42. Song J., Zhong J., Guo X., et al. Generation of RAG 1-and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res.* 2013; 23(8): 1059-62.
43. Li L., Zhang Q., Yang H., et al. Fumarylacetoacetate hydrolase knock-out rabbit model for hereditary tyrosinemia type 1. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(11): 4755-63.
44. Yan Q., Zhang Q., Yang H., et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen.* 2014; 3(1): 12.
45. Sui T., Lau Y.S., Liu D., et al. A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9. *Dis. Model Mech.* 2018; 11(6): dmm032201.
46. Zhu Y., Yu H., Wang W., et al. A novel GJA8 mutation (p. V44A) causing autosomal dominant congenital cataract. *PLoS One*. 2014; 9(12): e115406.
47. Jiang J.X. Gap junctions or hemichannel-dependent and independent roles of connexins in cataractogenesis and lens development. *Curr. Mol. Med.* 2010; 10(9): 851-63.
48. Yuan L., Sui T., Chen M., et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci Rep.* 2016; 6: 22024.
49. Zhao D., Wang H.B., Yang J.F., et al. Effect of vascular endothelial growth factor 165 gene transfection on bone defects and its mRNA expression in rabbits. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2007; 120(13): 1187-91.

50. Jiang W., Liu L., Chang Q., et al. Production of Wilson disease model rabbits with homology-directed precision point mutations in the ATP7B gene using the CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 1332.
51. Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А. и др. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор). *Биомедицина.* 2019; 15(4): 12-33.
52. Yang D., Yang H., Li W., et al. Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res.* 2011; 21(6): 979-82.
53. Umeyama K., Watanabe K., Watanabe M., et al. Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24413.
54. Yan S., Tu Z., Liu Z., et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell.* 2018; 173(4): 989-1002.e13.
55. Carlson D.F., Tan W., Lillico S.G., et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(43): 17382-7.
56. Huang L., Hua Z., Xiao H., et al. CRISPR/Cas9-mediated ApoE $^{-/-}$ -and LDLR $^{-/-}$ -double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels. *Oncotarget.* 2017; 8(23): 37751-60.
57. Lee B., Dennis J.A., Healy P.J., et al. Hepatocyte gene therapy in a large animal: a neonatal bovine model of citrullinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(7): 3981-6.
58. Pinnapureddy A.R., Stayner C., McEwan J., et al. Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2015; 10: 107.
59. Klebe S., Sykes P.J., Coster D.J., et al. Gene transfer to ovine corneal endothelium. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2001; 29(5): 316-22.
60. Gray-Edwards H.L., Randle A.N., Maitland S.A., et al. Adeno-associated virus gene therapy in a sheep model of Tay-Sachs disease. *Hum. Gene Ther.* 2018; 29(3): 312-26.
61. Howell J.M.C., Walker K.R., Nalbantoglou J., et al. GO 8 Gene therapy trials in the ovine model of McArdle's disease. *Neuromuscul. Disord.* 2006; 16(9): 725.
62. Frisbie D.D., Ghivizzani S.C., Robbins P.D., et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene. Ther.* 2002; 9(1): 12-20.
63. Heinzerling L.M., Feige K., Rieder S., et al. Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. *J. Mol. Med. (Berl).* 2001; 78(12): 692-702.
64. Narfström K., Holland Deckman K., Menotti-Raymond M. The domestic cat as a large animal model for characterization of disease and therapeutic intervention in hereditary retinal blindness. *J. Ophthalmol.* 2011; 2011: 906943.
65. Bradbury A.M., Gurda B.L., Casal M.L., et al. A review of gene therapy in canine and feline models of lysosomal storage disorders. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2015; 26(1): 27-37.
66. McCurdy V.J., Johnson A.K., Gray-Edwards H.L., et al. Sustained normalization of neurological disease after intracranial gene therapy in a feline model. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(231): 231ra48.
67. Hinderer C., Bell P., Gurda B.L., et al. Intrathecal gene therapy corrects CNS pathology in a feline model of mucopolysaccharidosis I. *Mol. Ther.* 2014; 22(12): 2018-27.
68. Hinderer C., Bell P., Gurda B.L., et al. Liver-directed gene therapy corrects cardiovascular lesions in feline mucopolysaccharidosis type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(41): 14894-9.

69. Foley B.T., Korber B.T.M., Leitner T.K., et al. *HIV Sequence Compendium 2018. № LA-UR-18-25673*. Los Alamos: Los Alamos National Lab. (LANL); 2018.
70. Sundstrom M., Chatterji U., Schaffer L., et al. Feline immunodeficiency virus OrfA alters gene expression of splicing factors and proteasome-ubiquitination proteins. *Virology*. 2008; 371(2): 394-404.
71. Miller C., Abdo Z., Ericsson A., et al. Applications of the FIV model to study HIV pathogenesis. *Viruses*. 2018; 10(4): 206.
72. Giannecchini S., Isola P., Sichi O., et al. AIDS vaccination studies using an ex vivo feline immunodeficiency virus model: failure to protect and possible enhancement of challenge infection by four cell-based vaccines prepared with autologous lymphoblasts. *J. Virol.* 2002; 76(14): 6882-92.
73. Karlas J.A., Siebelink K.H., Peer M.A., et al. Vaccination with experimental feline immunodeficiency virus vaccines, based on autologous infected cells, elicits enhancement of homologous challenge infection. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 3): 761-5.
74. Ellinwood N.M., Ausseil J., Desmaris N., et al. Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol. Ther.* 2011; 19(2): 251-9.
75. Nichols B.M., Aoki Y., Kuraoka M., et al. Multi-exon skipping using cocktail antisense oligonucleotides in the canine X-linked muscular dystrophy. *J. Vis. Exp.* 2016; (111): 53776.
76. Connelly S., Mount J., Mauser A., et al. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood*. 1996; 88(10): 3846-53.
77. Morral N., O'Neal W., Zhou H., et al. Immune responses to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2a wild type and E2a deleted vectors. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8(10): 1275-86.
78. Gallo-Penn A.M., Shirley P.S., Andrews J.L., et al. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood*. 2001; 97(1): 107-13.
79. McCormack W.M., Seiler M.P., Bertin T.K., et al. Helper-dependent adenoviral gene therapy mediates long-term correction of the clotting defect in the canine hemophilia A model. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4(6): 1218-25.
80. Marcos-Contreras O.A., Smith S.M., Bellinger D.A., et al. Sustained correction of FVII deficiency in dogs using AAV-mediated expression of zymogen FVII. *Blood*. 2016; 127(5): 565-71.
81. Felsburg P.J., Somberg R.L., Hartnett B.J., et al. Full immunologic reconstitution following nonconditioned bone marrow transplantation for canine X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood*. 1997; 90(8): 3214-21.
82. Vernau W., Hartnett B.J., Kennedy D.R., et al. T cell repertoire development in XSCID dogs following nonconditioned allogeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007; 13(9): 1005-15.
83. Kennedy D.R., Hartnett B.J., Kennedy J.S., et al. Ex vivo  $\gamma$ -retroviral gene therapy of dogs with X-linked severe combined immunodeficiency and the development of a thymic T cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011; 142(1-2): 36-48.
84. Ting-De Ravin S.S., Kennedy D.R., Naumann N., et al. Correction of canine X-linked severe combined immunodeficiency by in vivo retroviral gene therapy. *Blood*. 2006; 107(8): 3091-7.
85. Felsburg P.J., De Ravin S.S., Malech H.L., et al. Gene therapy studies in a canine model of X-linked severe combined immunodeficiency. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2015; 26(1): 50-6.
86. Burtner C.R., Beard B.C., Kennedy D.R., et al. Intravenous injection of a foamy virus vector to correct canine SCID-X1. *Blood*. 2014; 123(23): 3578-84.

87. Acland G.M., Aguirre G.D., Ray J., et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 2001; 28(1): 92-5.
88. Bianco S.R., Sun J., Fosome S.P., et al. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10(9): 726-36.
89. Chen Y., Niu Y., Ji W. Genome editing in nonhuman primates: approach to generating human disease models. *J. Int. Med.* 2016; 280(3): 246-51.
90. Chen Y., Yu J., Niu Y., et al. Modeling Rett syndrome using TALEN-edited MECP2 mutant cynomolgus monkeys. *Cell.* 2017; 169(5): 945-955.e10.
91. Chen Y., Zheng Y., Kang Y., et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24(13): 3764-74.
92. Ott de Bruin L.M., Volpi S., Musunuru K. Novel genome-editing tools to model and correct primary immunodeficiencies. *Front. Immunol.* 2015; 6: 250.
93. Sato K., Oiwa R., Kumita W., et al. Generation of a nonhuman primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing. *Cell Stem Cell.* 2016; 19(1): 127-38.
94. Gheit T., Sekkat S., Cova L., et al. Experimental transfection of *Macaca sylvanus* with cloned human hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt. 7): 1645-9.
95. Yang C., Ruan P., Ou C., et al. Chronic hepatitis B virus infection and occurrence of hepatocellular carcinoma in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). *Virology.* 2015; 12: 26.
96. Peters A., Rosene D.L., Moss M.B., et al. Neurobiological bases of age-related cognitive decline in the rhesus monkey. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996; 55(8): 861-74.
97. Price D.L., Martin L.J., Sisodia S.S., et al. Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegenerative disease. *Brain Pathol.* 1991; 1(4): 287-96.
98. Zhao Q., Lu J., Yao Z., et al. Upregulation of A $\beta$ 42 in the brain and bodily fluids of rhesus monkeys with aging. *J. Mol. Neurosci.* 2017; 61(1): 79-87.
99. Geula C., Nagykerly N., Wu C.K. Amyloid- $\beta$  deposits in the cerebral cortex of the aged common marmoset (*Callithrix jacchus*): incidence and chemical composition. *Acta Neuropathol.* 2002; 103(1): 48-58.
100. Voytko M.L., Olton D.S., Richardson R.T., et al. Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J. Neurosci.* 1994; 14(1): 167-86.
101. Teng E., Stefanacci L., Squire L.R., et al. Contrasting effects on discrimination learning after hippocampal lesions and conjoint hippocampal-caudate lesions in monkeys. *J. Neurosci.* 2000; 20(10): 3853-63.
102. Tuszynski M.H., Roberts J., Senut M.C., et al. Gene therapy in the adult primate brain: intraparenchymal grafts of cells genetically modified to produce nerve growth factor prevent cholinergic neuronal degeneration. *Gene Ther.* 1996; 3(4): 305-14.
103. Tuszynski M.H., Yang J.H., Barba D., et al. Nerve growth factor gene therapy: activation of neuronal responses in Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 2015; 72(10): 1139-47.
104. Yang S.H., Cheng P.H., Banta H., et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature.* 2008; 453(7197): 921-4.
105. Lasbleiz C., Mestre-Francés N., Devau G., et al. Combining gene transfer and nonhuman primates to better understand and treat Parkinson's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 2019; 12: 10.
106. Przedbroski S., Levivier M., Jiang H., et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience.* 1995; 67(3): 631-47.

107. Schober A., Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1): 215-24.
108. Petroske E., Meredith G.E., Callen S., et al. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience.* 2001; 106(3): 589-601.
109. Deng H., Yuan L. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease. *Ageing Res. Rev.* 2014; 15: 161-76.
110. Ramonet D., Daher J.P., Lin B.M., et al. Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2. *PLoS One.* 2011; 6(4): e18568.
111. Blesa J., Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 2014; 8: 155.
112. Kirik D., Annett L.E., Burger C., et al. Nigrostriatal  $\alpha$ -synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human  $\alpha$ -synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(5): 2884-9.
113. Koprach J.B., Johnston T.H., Reyes G., et al. Towards a non-human primate model of alpha-synucleinopathy for development of therapeutics for Parkinson's disease: optimization of AAV1/2 delivery parameters to drive sustained expression of alpha synuclein and dopaminergic degeneration in macaque. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0167235.
114. Yang W., Wang G., Wang C.E., et al. Mutant alpha-synuclein causes age-dependent neuropathology in monkey brain. *J. Neurosci.* 2015; 35(21): 8345-58.
115. Junyent F., Kremer E.J. CAV-2 – why a canine virus is a neurobiologist's best friend. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2015; 24: 86-93.
116. Mestre-Francés N., Serratrice N., Gennetier A., et al. Exogenous LRRK2G2019S induces parkinsonian-like pathology in a nonhuman primate. *JCI Insight.* 2018; 3(14): e98202.
117. McBride J.L., Neuringer M., Ferguson B., et al. Discovery of a CLN7 model of Batten disease in non-human primates. *Neurobiol. Dis.* 2018; 119: 65-78.

## Заключение

Направленное геномное редактирование с использованием программируемых нуклеаз заняло передовые позиции среди генетических технологий и широко применяется в различных областях, связанных с модификацией генома. Открытия последних лет показали нам, что системы направленного редактирования генома могут нести в себе огромный потенциал, который можно применить для современной науки и медицины. Направленное геномное редактирование может применяться для создания клеточных моделей наследственных заболеваний человека и животных, функционального скрининга геномов, изучения эпигеномов и визуализации клеточных процессов, а также в пищевой промышленности для получения обогащенных продуктов питания, в сельском хозяйстве для создания новых пород животных и сортов растений. Системы направленного редактирования генома представляют особый интерес с точки зрения разработки терапевтических подходов для лечения генетических, инфекционных, онкологических, иммунологических и других заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми.

Технологии направленного редактирования генома могут применяться в качестве противовирусной терапии и в борьбе с персистирующими вирусными инфекциями, вызванными ВИЧ, вирусом гепатита В, вирусом Эпштейна–Барр, цитомегаловирусом, папилломавирусами человека и др. Также геномное редактирование позволяет исправлять мутации, напрямую вызывающие то или иное заболевание. Разработаны подходы для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, буллезного эпидермолиза, серповидноклеточной анемии, бета-талассемии, пигментной ксеродермы и других моногенных заболеваний человека. Кроме того, системы направленного редактирования генома представляют собой революционный инструмент для терапии злокачественных новообразований, обладая огромным потенциалом для разработки новых методов генной и клеточной терапии.

В мире проводятся клинические испытания кандидатных терапевтических препаратов, для создания которых использованы программируемые нуклеазы — главные компоненты систем направленного редактирования генома. Эффективность применения генной и клеточной терапии исследуют в борьбе с гематологическими и солидными новообразованиями, наследственными

и инфекционными заболеваниями. Нет сомнений, что клинических исследований лекарственных препаратов, созданных с применением технологий направленного редактирования генома, с каждым годом будет становиться все больше.

Некоторые из систем направленного редактирования генома могут быть использованы для диагностики болезней путем идентификации генетических последовательностей, например вирусов или онкогенов, профилактики инфекционных болезней за счет модификации генов не человека, а переносчиков возбудителей заболеваний, например малярии. В перспективе диагностические системы на основе систем направленного редактирования генома могут быть использованы не только для качественного и/или количественного определения нуклеиновых кислот вместо специфических ПЦР-анализов, но и для быстрого мультиплексного определения экспрессии РНК, выявления загрязнения образцов нуклеиновыми кислотами, отслеживания транскриптов, ассоциированных с патологическими процессами, в пределах биологических систем. Такие диагностические системы могут стать многофункциональными, устойчивыми к ошибкам методами, пригодными для быстрой постановки диагнозов, включая инфекционные заболевания или чувствительное генотипирование микроорганизмов, в том числе у постели больного или в полевых условиях.

С момента открытия и описания первых систем, позволяющих производить направленное редактирование генома, было сделано множество впечатляющих открытий. С каждым днем методы направленного редактирования генома совершенствуются и развиваются. Технологический прогресс и развитие науки позволяют повышать безопасность и эффективность программируемых нуклеаз, совершенствуются методы доставки элементов систем редактирования генома, а также методы определения целевых и внецелевых эффектов, вызванных программируемыми нуклеазами. Использование систем направленного редактирования генома стало неотъемлемой частью научного прогресса, а ученые каждый день продолжают работать над открытием новых инструментов редактирования генов.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2707542

**Способ получения препарата рекомбинантной нуклеазы  
CAS, по существу, свободного от бактериальных  
эндотоксинов, полученный данным способом препарат и  
содержащий его набор для использования в системе  
CRISPR/Cas**

Патентообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки  
"Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии"  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора)  
(RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019109018

Приоритет изобретения 28 марта 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 27 ноября 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 28 марта 2039 г.

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

 Г.П. Ипатов





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2720767

**Способ обнаружения провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека, интегрированной в геном человека, в ультранизких концентрациях и специфические олигонуклеотиды для использования в способе**

Патентообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019141298

Приоритет изобретения 13 декабря 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений Российской Федерации 13 мая 2020 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 13 декабря 2039 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

 Г.П. Веселов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2720768

**Система CRISPR-Cas для детекции провирусной ДНК  
вируса иммунодефицита человека, интегрированной в геном  
человека, в ультранизких концентрациях**

Патентообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки  
"Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии"  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019141293

Приоритет изобретения 13 декабря 2019 г.

Дата государственной регистрации в  
Государственном реестре изобретений  
Российской Федерации 13 мая 2020 г.

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает 13 декабря 2039 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Велюев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2720769

**Способ получения препарата рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR/CAS и препарат для детекции провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека, интегрированной в геном человека, в ультранизких концентрациях**

Патентообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019141306

Приоритет изобретения 13 декабря 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 13 мая 2020 г.

Срок действия исключительного права на изобретение истекает 13 декабря 2039 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

 Г.П. Волын



---

Для заметок

---

*Научное издание*

Тюменцев Александр Игоревич  
Тюменцева Марина Алексеевна  
Михайлова Юлия Владимировна  
Шеленков Андрей Александрович  
Петров Вадим Викторович  
Нагорных Алексей Михайлович  
Судьина Анна Евгеньевна

## **Генетические технологии**

Под редакцией академика РАН  
В.Г. Акимкина

Редактор *О.В. Устинкова*  
Корректор *Ю.В. Смирнова*  
Художник *Н.Ю. Палочкина*  
Верстка *В.И. Архипов*

ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора  
111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А. [www.crie.ru](http://www.crie.ru)

Подписано в печать 25.10.2020. Формат 70 × 100 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Объем 12,5 п.л.  
Тираж 1000 экз.

Отпечатано в ООО «Объединенный полиграфический комплекс»  
г. Москва, Дербеневская набережная, д. 7, стр. 2,  
тел. +7(499)1306019, e-mail: [info@opk.bz](mailto:info@opk.bz), [www.opk.bz](http://www.opk.bz)

