

УДК 608.1

CRISPR/Cas: ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ© 2022 г. А. А. Шмакова^{a, b, *}, О. П. Шмакова^c, А. А. Карпухина^a, Е. С. Васецкий^{a, **}^aИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия^bЛаборатория молекулярной эндокринологии, ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России, ул. Зя Черепковская, 15а, Москва, 121552 Россия^cОтдел по изучению проблем подростковой психиатрии, ФГБНУ “Научный центр психического здоровья”, Каширское шоссе, 34, Москва, 115522 Россия

*e-mail: anyashm@gmail.com

**e-mail: vassetzky@gmail.com

Поступила в редакцию 07.03.2022 г.

После доработки 16.04.2022 г.

Принята к публикации 18.04.2022 г.

В настоящем обзоре обсуждаются ключевые этапы развития технологии редактирования геномов CRISPR/Cas от истории открытия до современных разработок в различных областях, включая применение данной технологии в медицине. Рассматриваются также технические и этические проблемы, связанные с использованием CRISPR/Cas для редактирования геномов эмбрионов человека.

Ключевые слова: CRISPR, Cas, редактирование геномов, история науки

DOI: 10.31857/S0475145022040073

ВВЕДЕНИЕ

Описание в геномах прокариот системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR, от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats), и ассоциированных с ними белков Cas (от англ. CRISPR associated protein) является одним из самых революционных и важных открытий в современной биологии.

CRISPR — это участки ДНК (локусы) в геноме прокариот, состоящие из одинаковых коротких повторов (30–40 пар нуклеотидов, далее — п.н.), разделенных уникальными последовательностями спейсеров такой же длины; вблизи этих участков находятся гены, кодирующие CRISPR-ассоциированные белки Cas (Hille, Charpentier, 2016). Короткие палиндромные повторы чрезвычайно распространены: регионы CRISPR найдены в геномах у 50% всех известных бактерий и 90% архей (Grissa et al., 2007; Hille et al., 2018), что может свидетельствовать об их чрезвычайной важности для жизнедеятельности прокариот. В 2020 г. за работы по практическому использованию CRISPR/Cas системы для редактирования генома была присуждена Нобелевская премия по химии Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Даудне.

Изучение системы CRISPR/Cas к настоящему моменту прошло путь от открытия необычных и

непонятно для чего предназначенных повторов, обнаруженных исследователями в геномах разных бактерий и архей, до описания участия системы CRISPR/Cas в функционировании приобретенного иммунитета прокариот и использования этих знаний для прицельного редактирования геномов эукариот, а также многих иных целей. Применяя инструменты на основе системы CRISPR/Cas, исследователи совершили прорыв в фундаментальных клинических испытаниях, биотехнологические компании запустили испытания генной терапии для целого ряда заболеваний. Технология продолжает стремительно развиваться, ее потенциал многообещающ для дальнейших работ в области биологии, медицины, биоинженерии, биохимии и иных наук.

В настоящем обзоре описана история открытия CRISPR/Cas системы, использования методики CRISPR/Cas для научно-практических изысканий.

**ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И РАЗРАБОТКИ
МЕТОДА CRISPR/Cas
ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ**

Впервые необычные повторяющиеся последовательности были описаны в 1987 г. в геноме бактерии *Escherichia coli* (кишечной палочки) группой японских ученых во главе с Есидзуми Исино (Y. Ishino), которые выявили, что на 3' конце гена

Iap, продукты которого ответственны за изоферментную конверсию щелочной фосфатазы, находились “пять высоко гомологичных последовательностей из 29 нуклеотидов, расположенные как повторы с интервалом в 32 нуклеотида” (Ishino et al., 1987). Е. Исино с соавт. не нашли биологического объяснения наличия и функции этих повторяющихся последовательностей и не придали большого значения своему наблюдению. Среди коллег работа также не вызвала большого отклика — до 2007 г. публикация Е. Исино цитировалась 1–2 раза за год.

Необычные повторяющиеся последовательности в геномах прокариот заинтересовали испанского исследователя Франсиско Мохику (F.J. Mojica), который обнаружил их в геноме археи *Haloferax mediterranei* в 1993 г. (Mojica et al., 1993), на тот момент ученому было всего 30 лет. В 1995 г. Ф. Мохику с соавт. (Mojica et al., 1995) подробно описали эти “тандемные повторы”, как они их называли, в геномах *Haloferax mediterranei* и *H. volcanii*: последовательность из 30 п.н. с диадной симметрией повторялась в тандеме с вкраплениями уникальных последовательностей из 33–39 п.н. и простиралась на большие участки — 1.4 тыс. п.н. в хромосоме *H. mediterranei* и около 3 тыс. п.н. в хромосоме *H. volcanii*. Чтобы понять роль этого участка ДНК, группа Ф. Мохики решила внести его дополнительную копию в клетку археи *H. volcanii* путем трансформации рекомбинантной плазмидой, содержащей фрагмент тандемных повторов длиной 1.1 тыс. п.н. Это привело к значительному снижению жизнеспособности клеток и нарушило распределение генома среди дочерних клеток (Mojica et al., 1995). Так возникла первая гипотеза, что биологическая роль тандемных повторов в геномах прокариот заключается в их участии в разделении (сегрегации) удвоенной хромосомы между дочерними клетками в процессе деления. Примерно в это же время похожие повторы были описаны в геномах *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993), стрептококка (Hoe et al., 1999), цианобактерии *Anabaena* sp. (Masepohl et al., 1996), *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* (Nakata et al., 1989) и других видов бактерий. Высказывались предположения, что данные повторы могут участвовать в хромосомных перестройках, рекомбинации или являются местами посадки белков, регулирующих соседствующие с повторами гены (Nakata et al., 1989; Groenen et al., 1993), однако экспериментально эти предположения не проверялись.

Закончив аспирантуру в 1995 г., Франсиско Мохику некоторое время работал постдокторантом в Оксфордском университете, а затем, движимый интересом к загадочным повторам, вер-

нулся в Испанию, где попытался основать свою исследовательскую группу по изучению “тандемных повторов”. Сам ученый отмечал, что в то время его заявки на исследования не получили грантов, и он был существенно ограничен в финансировании своих работ и в создании инфраструктуры собственной лаборатории (Mojica, Rodriguez-Valera, 2016). Несмотря на затруднения, ученый продолжил исследования. В качестве модельного организма Ф. Мохику переориентировался на *E. coli*, но воспроизведение экспериментов, проведенных им ранее на *H. volcanii*, не дало ожидаемых результатов: четкого фенотипа нарушения сегрегации генома *E. coli* при внесении в ее геном дополнительной копии “тандемного повтора” не наблюдалось. Второй гипотезой ученого стало то, что тандемные повторы служат ориентирами для связывания ДНК с клеточными структурами (например, белками клеточной мембраны или растворимыми белками). Однако никаких повтор-связывающих белков в клеточных экстрактах *E. coli* им обнаружено не было. Третье предположение состояло в том, что повторы могут влиять на трехмерную структуру молекулы ДНК, в которой они находятся, но и это не подтвердилось: анализ плазмидной ДНК показал, что внесение участков повторов не влияло на ее топологию (Mojica, Rodriguez-Valera, 2016).

Но Франсиско Мохику не сдавался в своих намерениях найти функции таинственных повторов. Постепенное развитие технологий секвенирования облегчило поиск подобных структур в геномах других организмов, и коллега Мохику, Сесар Диес-Вильясенор (C. Díez-Villaseñor), создал программу для поиска повторяющихся регионов в геномах прокариот. К 2000 г. Ф. Мохику с соавт. (Mojica et al., 2000) систематизировали данные о геномных повторах у 9 видов архей и 10 видов бактерий, они дали им название: короткие регулярно расположенные повторы (SRSR, от англ. Short Regularly Spaced Repeats; аббревиатура, также указывает на чередование спейсеров и повторов, поскольку может быть расшифрована также как: Spacer-Repeat-Spacer-Repeat). Весьма важная для науки работа была опубликована в формате микро-письма на 2 страницы (пусть этот факт послужит утешением для современных ученых, чьи работы просят сократить редакторы журналов).

Группа голландского микробиолога Руда Янсена (R. Jansen) (Jansen et al., 2002a), описавшая тандемные повторы у *Mycobacterium tuberculosis* и других видов прокариот, дала тандемам название: прямые повторы, перемежающиеся спейсерами (SPIDR, от англ. SPacers Interspersed Direct Repeats). Чтобы избежать дальнейшей путаницы в быстрорастущей тематике, Ф. Мохику и Р. Янсен

Asunto: Re: Acronym
Fecha: Wed, 21 Nov 2001 16:39:06 +0100
De: "Ruud Jansen" <R.Jansen@vet.uu.nl>
Empresa: Diergeneeskunde
A: "Francisco J. Martínez Mojica" <fmojica@ua.es>

Dear Francis

What a great acronym is CRISPR.

I feel that every letter that was removed in the alternatives made it less crispy so I prefer the snappy CRISPR over SRSR and SPIDR. Also not unimportant is the fact that in MedLine CRISPR is a unique entry, which is not true for some of the other shorter acronyms.

Перевод:

Дорогой Фрэнсис

Какая замечательная аббревиатура CRISPR.

Я чувствую, что каждая буква, которая была удалена в альтернативах, делала их менее хрустящими (игра слов CRISPR - crispy), поэтому я предпочитаю энергичный CRISPR аббревиатурам SRSR или SPIDR. Также немаловажным является тот факт, что в Medline CRISPR является уникальной записью, чего нельзя сказать о некоторых других более коротких аббревиатурах.

Рис. 1. Текст электронного письма, отправленного Р. Янсенем Ф. Мохике, относительно именования регулярно расположенных повторов CRISPR. Источник (Mojica, Garrett, 2013).

совместно решили заменить названия: прямые повторы, тандемные повторы, SRSR, SPIDR и другие вариации названий, на простое, “хрустящее” (по меткому замечанию самого Р. Янсена) и известное нам сегодня – CRISPR (рис. 1). В 2002 г. Р. Янсен с соавт. (Jansen et al., 2002b) идентифицировали также, что рядом с локусами повторов находятся гены, кодирующие белки, которым они дали название CRISPR-ассоциированные (Cas) белки.

Хотя на тот момент роль геномных повторов оставалась загадкой для ученых, широкое распространение повторных последовательностей у разных видов прокариот указывало на их несомненную значимость и фундаментальную клеточную роль. Открыв Cas белки, Р. Янсен выдвинул предположение, что, имея структуру, схожую с ДНК-хеликазами или экзонуклеазами, данные белки участвуют в метаболизме ДНК или регуляции экспрессии генов в какой-то области генома, функционально связанной с локусом CRISPR (Jansen et al., 2002b).

Однако финальным ключом к разгадке функций системы CRISPR/Cas стало открытие происхождения уникальных промежуточных спейсеров. Роль этих последовательностей долгое время

оставалась загадкой. Франсиско Мохика поначалу не придавал им особого значения, он писал: “само название спейсер намекает на их несущественную роль в повторах, <как последовательностей>, просто разделяющих палиндромы” (Mojica, Rodriguez-Valera, 2016). В начале 2000-х гг. его исследовательская группа продолжала работать над повторами CRISPR в *E. coli*. Они рутинно амплифицировали локусы CRISPR с помощью ПЦР, секвенировали их и сравнивали с последовательностями в общедоступных базах данных нуклеотидов. И вот однажды ученых постигла удача: один из запросов выдал совпадающую последовательность, они обнаружили, что последовательность спейсера гомологична кусочку генома бактериофага *E. coli*. Постепенно, Франсиско Мохика с соавт. накопили данные и о других спейсерах, которые имели сходство с последовательностями в бактериофагах или в конъюгативных плазидах (Mojica et al., 2005). Оказалось, что бактериофаги, чьи последовательности находили в спейсерах CRISPR, были неспособны инфицировать клетку-носитель спейсера, но инфицировали близкородственные штаммы, лишённые данного спейсера (Mojica et al., 2005). Произошло озарение, и Ф. Мохика первым высказал верное предположение,

что роль системы CRISPR заключается в приобретении иммунитета против чужеродной ДНК, а сам локус является “отсеком для хранения фрагментов ДНК захватчиков” (Mojica et al., 2005). Стоит вновь упомянуть о трудностях признания, с которыми столкнулись авторы революционного открытия при попытке опубликовать свои находки. Приводим эти факты (Lander, 2016) не с целью вызвать в читателе разочарование в объективности современных научных издательств, хотя таковое было бы небезосновательным в обсуждаемом случае, а скорее для утешения тех ученых, которым эта история даст надежду на последующее признание их работ независимо от первоначально негативной реакции научного сообщества на совершенное открытие. Понимая важность своего научного вывода, Ф. Мохики отправил статью в журнал Nature. В ноябре 2003 г. редакция Nature отклонила статью, даже не отправив ее рецензентам: по непонятным причинам редактор заявил, что идея статьи уже известна. В январе 2004 г. в Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) также решили, что статье не хватает “новизны и важности”, чтобы отправить ее на рецензию. Следующими рукопись Ф. Мохики отклонили журналы Molecular Microbiology и Nucleic Acid Research. Отчаявшийся и переживающий, что его могут опередить, Ф. Мохики отправил статью в Journal of Molecular Evolution, где после 1 года (!) рецензий статью наконец опубликовали 1 февраля 2005 г. Ф. Мохики так вспоминал об этом периоде: “Представьте, что у вас на руках большое <открытие>, и есть вероятность, что будет опубликована еще одна статья, которая вас опередит. Я помню, как каждый месяц отправлял письмо редактору со словами: “Пожалуйста, скажите мне, собираетесь ли вы публиковать или нет, чтобы мы могли подать заявку в другой журнал”. Я был в абсолютном отчаянии” (Fernández, 2019, перевод наш).

В марте и августе 2005 г. две независимые исследовательские группы из Франции описали схожие находки у *Yersinia pestis* и стрептококков (Bolotin et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Изучение столь необычного модельного организма — *Y. pestis*, возбудителя бубонной чумы, объяснялось тем, что первая исследовательская группа, возглавляемая Жилем Верно (G. Vergnaud), работала по заказу Министерства обороны Франции и разрабатывала методы отслеживания источника патогенов на основе генетических данных с целью защиты от биологического оружия. Их уникальная коллекция *Y. pestis* была получена во время вспышки чумы во Вьетнаме в 1964–1966 гг. (Lander, 2016). Как и Ф. Мохики, Ж. Верно столкнулся с нежеланием журналов публиковать обна-

руженные закономерности: статья коллектива под руководством Ж. Верно была отвергнута PNAS, Journal of Bacteriology, Nucleic Acids Research и Genome Research, прежде чем была опубликована в Microbiology 1 марта 2005 г.

Во второй из французских исследовательских групп работали наши бывшие соотечественники, изучавшие в Париже стрептококков, — Александр Болотин и Алексей Сорокин. Как вспоминает профессор Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Сергей Киселев, к Александру Болотину в то время “обратилась крупная фирма по производству йогуртов с просьбой разобраться, почему им перестало удаваться уничтожение ненужных бактерий в закваске. Для подавления их жизнедеятельности производители всегда использовали специальные вирусы, но в какой-то момент бактериофаги перестали убивать бактерии” (Веденева, 2020). Именно А. Болотин первым описал теперь всем специалистам известный и широко используемый в молекулярной биологии белок стрептококков нуклеазу Cas9¹ (Bolotin et al., 2005). В ходе работы, А. Болотин с сотрудниками заметили, что спейсеры имеют общую последовательность на конце — примыкающий к протоспейсеру мотив (protospacer adjacent motif — PAM), необходимый для распознавания мишени (Bolotin et al., 2005).

Столь разные исследования (изучение биологического оружия и йогуртов), тем не менее, привели к схожим научным выводам. Обе группы, подтверждая гипотезу Ф. Мохики, высказались о роли CRISPR в формировании приобретенного иммунитета бактерий. В 2006 г. группа ученых США (все являлись выходцами из бывшего СССР) К.С. Макарова, Н.В. Гришин, С.А. Шабалина, Ю.И. Вольф, Е.В. Кунин (K.S. Makarova, N.V. Grishin, S.A. Shabalina, Y.I. Wolf, E.V. Koonin) (Makarova et al., 2006) проанализировала все доступные на тот момент геномы прокариот и обнаружила несколько кластеров генов, соответствующих белкам Cas. Исследователи классифицировали Cas на белковые семейства, описали их вероятные функциональные и структурные особенности. Предполагая, что система иммунной защиты CRISPR/Cas работает по принципу РНК-интерференции, они проанализировали схожесть Cas-белков с белками системы РНК-интерференции, но сходства не нашли. Макарова с соавт. (Makarova et al., 2006), тем не менее, сделали ряд предположений о механизме работы CRISPR/Cas и о том, как могут приобретаться новые спейсеры.

Без прямого экспериментального подтверждения находки лишь подкрепляли гипотезу, но не

¹ В то время Cas9 называлась Cas5 или Csn1.

доказывали ее безоговорочно. Однако доказательства красивой гипотезы о приобретенном иммунитете прокариот не заставили себя ждать: в 2007 г. исследовательская группа французского ученого Филиппа Хорвата (P. Horvath) (Barrangou et al., 2007) продемонстрировала, что после заражения вирусом, бактерии интегрировали новые спейсеры, полученные из геномных последовательностей фага; а удаление или добавление определенных спейсеров модифицировало фаго-резистентность прокариотической клетки. Они показали, что Cas9 является ключевым белком, необходимым для процесса, посредством которого система CRISPR инактивирует вторгающийся фаг (Barrangou et al., 2007). В очередной раз находке поспособствовал запрос пищевой промышленности: авторы статьи – Родольф Баррангу (R. Barrangou), Сильвен Муано (S. Moineau), Филипп Хорват, работали в то время на датского производителя пищевых ингредиентов Danisco (теперь DuPont) и занимались секвенированием геномов бактерий, используемых в качестве заквасочных культур в молочной промышленности для производства йогуртов и сыров. Они также секвенировали бактериофаги, заражавшие и разрушавшие молочные культуры (Nair, 2017). Примечательно, что с 2011 г. йогуртовые и сырные культуры DuPont “вакцинируются” против бактериофагов естественным образом с использованием CRISPR (Nair, 2017). В 2008 г. группой Джона ван дер Ооста (J. van der Oost), совместно с К.С. Макаровой и Е.В. Куниным (Vrouns et al., 2008) было показано, что именно небольшие РНК (CRISPR RNA, crRNA), транскрибируемые с локуса CRISPR, связываются с белками Cas и являются проводниками (гидами) к ДНК-мишени для иммунной защиты. В том же 2008 г. Лучано Марраффини и Эрик Сонтхаймер (Marraffini, Sontheimer, 2008) описали механизм защиты бактерий от плазмидной ДНК, именно эти исследователи изящно продемонстрировали, что молекулой-мишенью белков Cas является ДНК, а не РНК. Они же первыми высказали предположение, что систему CRISPR/Cas можно использовать вне бактерий в качестве молекулярного инструмента: “С практической точки зрения, возможность направлять специфическое адресное разрушение ДНК, содержащей любую заданную последовательность-мишень из 24–48 нуклеотидов, может иметь значительную функциональную пользу, особенно если система может функционировать вне своего нативного бактериального или архейного контекста. ... Основное различие между системой рестрикции-модификации и интерференцией CRISPR заключается в том, что последняя может быть запрограммирована подходящей

эффекторной crRNA” (Marraffini, Sontheimer, 2008, перевод наш).

Тематика CRISPR наконец получила внимание, достойное ее значению. Новые открытия появлялись со скоростью нарастания снежного кома: группой Сильвена Муано (S. Moineau) (Gagneau et al., 2010) установлено, что комплекс Cas-crRNA разрезает чужеродную ДНК на 3 нуклеотида выше PAM; К.С. Макаровой с коллегами разработана классификация CRISPR/Cas систем (Makarova et al., 2011); Франсиско Мохика в 2010 г. подробно описал, как включается и выключается CRISPR система *E. coli*, и высказал предположение о механизме работы системы (Mojica, Díez-Villaseñor, 2010). Окончательная разгадка головоломки о механизме естественного иммунитета, управляемого CRISPR/Cas9, была найдена группой Эммануэль Шарпантье (E. Charpentier). В 2011 г. они выяснили, что в дополнение к crРНК существует вторая малая РНК, которую авторы назвали транскрибирующей CRISPR РНК (tracrRNA). Обнаружена последняя была с помощью секвенирования нового поколения, благо tracrRNA находится на 3 месте по распространенности в транскриптомах после рРНК и тРНК. Исследователи показали, что tracrRNA образует дуплекс с crРНК, и именно этот дуплекс направляет Cas9 к его ДНК-мишеням (Deltcheva et al., 2011).

Когда механизм работы CRISPR/Cas оказался окончательно расшифрован, научные изыскания сразу же переключились на тематику практического применения добытых знаний (ученые осознавали, сколь огромный потенциал кроется в обнаруженном механизме), что можно считать второй вехой развития обсуждаемой тематики. Изучение CRISPR/Cas начало осуществляться в отрыве от бактерий-хозяев: механизм работы CRISPR/Cas начал использоваться как инструмент для разрезания ДНК. Литовский биохимик Виргиниус Шикшнис, выпускник аспирантуры химфака МГУ, в 2011 г. смог “перенести” функциональный CRISPR/Cas из *S. thermophilus* и экспрессировать его в *E. coli*. Это подтвердило, что система CRISPR/Cas способна работать автономно, а все ее необходимые элементы (Cas9, crRNA и tracrRNA) уже известны (Sapranaukas et al., 2011). В 2012 г. его группа подробно охарактеризовала структуру Cas9, выявила ее нуклеазные домены, показала, что crRNA может быть укорочена до 20 нуклеотидов, и что мишени Cas9 можно менять, заменяя crRNA (Gasiunas et al., 2012). Авторы показали, что комплекс Cas9/crRNA/tracrRNA может расщеплять ДНК-мишень *in vitro*. В. Шикшнис представил свою статью в журнале Cell 6 апреля 2012 г., а 6 дней спустя журнал отклонил статью без рецензирова-

ния, В. Шикшнис сократил рукопись и отправил ее 21 мая в PNAS, где она была опубликована 4 сентября (Lander, 2016).

Технологическим прорывом стала работа Эммануэль Шарпантье (E. Charpentier) в сотрудничестве с Дженнифер Даудна (J.A. Doudna), которые в 2012 г. (Jinek et al., 2012) сообщили, что crRNA и tracrRNA могут быть объединены вместе в одну синтетическую гидовую РНК (sgRNA), именно такой технологией пользуются сейчас исследователи, которым для программирования прицельного разрезания ДНК необходимо лишь два элемента: нуклеаза Cas9 и гидовая РНК, которая направляет нуклеазу (Jinek et al., 2012). Как и В. Шикшнис, Э. Шарпантье и Д. Даудна показали, что Cas9 может разрезать очищенную ДНК *in vitro*, и что последняя может быть запрограммирована специально сконструированными crRNA. Их работа была подана в Science 8 июня и опубликована 28 июня 2012 г. Примерно в то же время Д. Даудна подала заявку на патент системы редактирования генов CRISPR/Cas9.

Наконец, в 2013 г. Фэн Чжан (Feng Zhang), который ранее работал с программируемыми нуклеазами TALEN (transcription activator-like effectors), первым успешно адаптировал CRISPR/Cas9 для редактирования генома в эукариотических клетках (Cong et al., 2013). Он применил CRISPR/Cas9 для прицельного редактирования разных локусов генома в клетках человека и мыши (Cong et al., 2013). Примерно в это же время аналогичные результаты представил Джордж Черч (G.M. Church) (Mali et al., 2013). После публикации, Фэн Чжан также подал заявку на патент от своего имени и смог получить его раньше, чем Д. Даудна.

НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ

На сегодняшний день CRISPR считают наиболее важным открытием в молекулярной биологии со времен ПЦР, повлекшим создание новейшей и успешной технологии генной инженерии. И, понимая важность данного открытия, исследователи и люди, заинтересованные наукой, гадали, когда же будет вручена Нобелевская премия за CRISPR/Cas. Многие опасались, что от технологии ждут каких-то практических достижений, чтобы, наконец, вручить премию.

В 2020 г. Нобелевскую премию по химии получили Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Даудна за развитие метода редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9. Во-первых, это, конечно, выбор в пользу прикладной, а не фундаментальной науки, т.к. если бы премию вручали за открытие CRISPR/Cas, то ей, несомненно, стоило бы отметить заслуги Ф. Мохики. Тем не менее фор-

мулировка Нобелевского комитета недвусмысленно говорит именно о “развитии метода”. Во-вторых, за одно открытие Нобелевскую премию могут вручить максимум трем людям, и ее вручение двум исследовательницам, Шарпантье и Даудне, можно рассматривать как своего рода заявление Нобелевского комитета. До вручения частью научного сообщества считалось, что ее получают Шарпантье, Даудна и Чжан (реже третьим называли Шикшниса), как те, кто вложил большой вклад в применение CRISPR/Cas для редактирования геномов *in vitro* и *in vivo*, в прокариотических и эукариотических клетках.

В целом, в эпоху коллективизма в науке оправданность вручения Нобелевских премий двум-трем людям все больше ставится под сомнение, ведь многие открытия – достижение не одного десятка ученых и их научных коллективов.

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR/Cas

Одним из наиболее заинтересованных в CRISPR/Cas промышленных секторов является сельское хозяйство. Прицельное редактирование геномов растений активно используют для повышения урожайности плодовых и зерновых культур, придания им устойчивости к заболеваниям и изменению погодных условий, а также других желаемых качеств. Например, редактирование генов, связанных с цитокиновым сигналингом, позволило значительно увеличить урожайность риса и пшеницы (Cong et al., 2013; Wang et al., 2014). Мутирование генов *CLV* (Rodríguez-Leal et al., 2017) and *ENO* (Yuste-Lisbona et al., 2020), ответственных за размер меристемы, позволило увеличить урожайность томатов. Людям, страдающим целиакией, важно контролировать потребление в пищу глютена, которым особенно богаты продукты из пшеницы. С помощью технологии CRISPR/Cas была создана разновидность пшеницы со сниженным содержанием глютена и на 85% меньшей иммуногенностью. Такого результата было практически невозможно достичь классическими методами скрещивания, так как в геноме пшеницы белки группы глютенов разбросаны в около сотне локусов (Sánchez-León et al., 2018). Большинство генетически модифицированных растений все еще находятся на стадии разработки и не используются для массового культивирования, однако есть и немало исключений. К настоящему времени уже более сотни разновидностей растений, выведенных методом CRISPR/Cas, официально разрешены к выращиванию. Это, например, соя с повышенным содержанием олеиновой кислоты за счет мутации в гене десатуразы омега-6 жирных кис-

лот и пшеница, устойчивая к мучнистой росе за счет редактирования локуса генов *MLO*, подавляющих защитные механизмы растения против грибковых инфекций (Wang et al., 2014).

Еще одно перспективное направление для использования CRISPR/Cas в живых организмах – редактирование геномов переносчиков инфекционных и паразитарных заболеваний для снижения численности их популяций, либо снижения способности передавать те или иные болезни: например, ведутся исследования по индуцированию стерильности малярийных комаров (North et al., 2020), что способно привести к существенному сокращению популяций переносчиков малярии. Такая инженерия сможет помочь контролировать передачу болезней и защитить экосистемы от опасных для человека видов.

Генная инженерия с использованием CRISPR/Cas предоставляет также уникальные медицинские возможности: например, с помощью данной технологии возможно производство органов свиньи, совместимых с человеческим организмом с целью трансплантации. Использование технологии CRISPR/Cas решает трансплантационные проблемы совместимости и иные проблемы, связанные с использованием органов свиньи у человека. К ним относится проблема патологичности для человека свинных эндогенных ретровирусов. В лаборатории Джорджа Черча успешно применили CRISPR/Cas9 для инактивации всех 62 копий ретровирусов в клетках свиньи (Yang et al., 2015); что, кстати, стало рекордом по количеству модифицированных локусов в одиночном эксперименте. Ученый-хирург Мухаммад Мохиуддин, уроженец Пакистана, занимается проблемами иммуносовместимости между свиными органами и человеческим организмом при ксенотрансплантации сердца в Университете Мэриленда, США. Его группа создала свиней с нокаутом трех генов, ответственных за синтез углеводных антигенов и отторжение организмом человека свиного сердца (*GGTA1KO*, β *4GalNT2KO*, *СМАНКО*), нокаутом гена рецептора гормона роста (*GHR*) для торможения роста сердца свиньи в теле человека, а также с добавлением шести генов человека: двух противовоспалительных (*hCD47*, *hHO-1*), двух генов, которые способствуют нормальному свертыванию крови (*hTBM*, *hEPCR*), и двух генов регуляторов системы комплемента (*hCD46*, *hDAF*) (Goerlich et al., 2021). Пересадка сердца от генномодифицированных свиней была испытана на бабуинах и показала хорошие результаты (Goerlich et al., 2021). Благодаря работе команды Мохиуддина, громким достижением нынешнего года стала первая в мире пересадка сердца генномодифицированной сви-

ньи человеку 7 января 2022 г. группой М. Мохиуддина (Reardon, 2022; Jee, 2022).

В 2021 г. были опубликованы результаты клинических испытаний применения CRISPR/Cas9 в человеческих клетках *ex vivo*. Группа доктора Хайдара Франгула (Haydar Frangoul) осуществила редактирование гематопоэтических стволовых клеток с целью нокаута энхансера *BCL11A* у двух пациентов с серповидно-клеточной анемией и β -талассемией (моногенные заболевания, вызванные мутациями гена *HBB*, кодирующего β -субъединицу гемоглобина) (Frangoul et al., 2021). *BCL11A* – репрессор экспрессии γ -субъединицы гемоглобина, и его нокаут приводит к росту экспрессии фетального гемоглобина HbF, что увеличивает выживаемость у пациентов с серповидно-клеточной анемией и β -талассемией. *Ex vivo* скорректированные клетки были возвращены пациентам (аутологичная трансплантация гематопоэтических стволовых клеток), что привело к росту концентрации в крови HbF и облегчению симптомов заболевания (Kaiser, 2020; Frangoul et al., 2021).

В настоящее время исследования самой технологии CRISPR/Cas активно развиваются по нескольким направлениям, включая разработку эффективных способов доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки (в виде ДНК, РНК или рибонуклеопротеинов) с использованием биологических (вирусы, вирусоподобные частицы, пептиды клеточной пенетрации), химических (липосомы, наночастицы) и физических методов (электропорация, сонопорация, микроинъекция) (Taha et al., 2022); а также разработку подходов, нацеленных на улучшение целевой (on-target) и снижение нецелевой мутагенной (off-target) активности Cas белков (Nidhi et al., 2021). Для минимизации нецелевого редактирования разрабатываются различные программные обеспечения, нацеленные на *in silico* предсказание off-target активности и подбор оптимальных и специфичных гидовых РНК; используются химически-модифицированные гидовые РНК, обладающие большей специфичностью; отбираются и конструируются улучшенные варианты нуклеаз Cas (Naeem et al., 2020).

Стоит отметить, что в России также есть ряд научных групп, которые занимаются исследованием системы CRISPR/Cas и разработкой технологий на ее основе. Научная группа Константина Викторовича Северинова из Сколковского института науки и технологий (SkolTech) занимается предсказанием и функциональной характеристикой новых систем CRISPR/Cas. Сергей Шмаков из команды Северинова создал полуавтоматическую поисковую систему, которая обнаруживает новые системы CRISPR/Cas (Shmakov et al., 2019). С

применением этой программы участниками исследовательской группы К.В. Северинова был найден, описан и охарактеризован белок C2c2 (ныне Cas13a), уникальный тем, что он разрезает не ДНК, а РНК (Abudayyeh et al., 2016). Яна Федорова, также из команды К.В. Северинова, с соавт. (Fedorova et al., 2020) описала компактный ортолог Cas9, обладающий все теми же функциональными особенностями, но уменьшенный в размере, что облегчает его доставку в клетки. Научная группа Сурена Минасовича Закияна (лаборатория эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН) успешно работает над созданием клеточных моделей различных нейродегенеративных заболеваний человека (Medvedev et al., 2021), в том числе с использованием системы CRISPR/Cas9 – болезни Хантингтона (Morozova et al., 2018; Malankhanova et al., 2020), бокового амиотрофического склероза (Ustyantseva et al., 2019), спинальной мышечной атрофии (Валетдинова и др., 2017). В лаборатории биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ научная группа Максима Николаевича Карагяюра активно занимается исследованием применения технологии CRISPR/Cas для нокаутирования генов интереса, для регуляции экспрессии генов на эпигенетическом уровне, для моделирования однонуклеотидных полиморфизмов с целью создания клеточных и тканевых моделей изучения процессов развития и регенерации тканей (Karagyaury et al., 2018; Rysenkova et al., 2018; Tyurin-Kuzmin et al., 2018; Dyikanov et al., 2019; Слободкина и др., 2020; Rusanov et al., 2020). Среди других интересных работ российских ученых – разработка метода быстрой сортировки клеток с генетическими модификациями после действия CRISPR/Cas9 на основе короткого пептида в Институте биологии гена (Zotova et al., 2019) и применение технологии CRISPR/Cas9 для одновременного создания двух–трех двухцепочечных разрывов в разных хромосомах для изучения механизмов хромосомных транслокаций в Институте биологии развития (Shmakova et al., 2019; Canoy, Vassetzky, 2021).

Таким образом, использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas в различных сферах и в различных организмах, предоставляет уникальные производственные и медицинские возможности для улучшения качества жизни.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CRISPR/Cas ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ НАСЛЕДУЕМОЙ ДНК

Поскольку система CRISPR/Cas – это удобный инструмент редактирования генома, почти

сразу после описания ее использования в эукариотических клетках начались исследования возможности ее применения в человеческих эмбрионах как для корректировки патологических мутаций, так и для фундаментальных исследований раннего эмбрионального развития человека. Изучению подвергались эффективность данного подхода, нецелевая мутагенность, частота редактирования (мозаицизм эмбрионов), возможность последующего развития эмбрионов (Ormond et al., 2017; Lea, Niakan, 2019). Источниками эмбрионов в таких работах являются невосребованные эмбрионы от процедуры экстракорпорального оплодотворения (Fogarty et al., 2017). Оказалось, что нокаутные модели на мышах не всегда точно отражают роль изучаемых генов в эмбриональном развитии человека (Fogarty et al., 2017). Несмотря на разные подходы, точное прицельное редактирование эмбрионов (за счет репарации ДНК по механизму гомологичной рекомбинации) остается низкоэффективным, в большинстве случаев после двухцепочечных разрывов возникают делеции или инсерции, а механизмы ранней эмбриональной репарации ДНК мало изучены (Ma et al., 2017). По этой причине использование CRISPR/Cas для корректировки патологических мутаций в эмбрионах затруднено. Вместе с этим, использование CRISPR/Cas для прицельного мутагенеза и нокаута генов также представляет определенные риски: по-видимому, двухцепочечные разрывы, вносимые Cas9 в одном локусе, приводят к делециям, которые могут простираются на несколько тысяч оснований, в том числе в эмбриональных и прогениторных клетках (Kosicki et al., 2018).

Несмотря на значительный прогресс в данной области, существует ряд опасений по поводу клинического использования CRISPR/Cas у людей: все настойчивее ставятся вопросы как безопасности метода, так и этичности его применения. Прецедентом стало дело Хэ Цзянькуя – исследователя из Южного научно-технологического университета в Шэньчжэне (Китай), применившего CRISPR/Cas для модификации генома человеческих эмбрионов. Предоставляя услуги по экстракорпоральному оплодотворению, группа Хэ Цзянькуя предложила паре, в которой мужчина был инфицирован ВИЧ, произвести генетическую модификацию гена CCR5 в эмбрионах, которая привела бы к устойчивости клеток к заражению ВИЧ (Regalado, 2019). Естественная мутация CCR5 Δ 32 встречается в Европе и Западной Азии, где ее средняя частота составляет примерно 10%, и гомозиготы по мутантной аллели действительно имеют резистентность к ВИЧ (Novembre et al., 2005; Lopalco, 2010). По утверждению Хэ Цзянькуя, который заявил о своем экспери-

менте в ноябре 2018 г., редактирование генома прошло успешно и привело к рождению здоровых девочек-близнецов Лулу и Наны (Cyranoski, Ledford, 2018). Стоит отметить, что ни план, ни результаты данной работы не были полностью опубликованы или подвергнуты рецензированию научным сообществом. 29 ноября 2018 г. власти Китая приостановили научную деятельность Хэ Цзянькуя, в его отношении было заведено уголовное дело за нарушение китайского законодательства в области экспериментов с людьми и за оказание нелегальной медицинской помощи, в декабре 2019 г. ученый был приговорен к 3 г. лишения свободы и штрафу в 3 млн юаней.

Хэ Цзянькуй, пытаясь опубликовать результаты своего громкого эксперимента, подал статью под названием “Рождение близнецов после редактирования генома для устойчивости к ВИЧ” в *Nature* и *JAMA*, обоими журналами статья была отвергнута (Regalado, 2019). Что интересно, в соавторах Хэ Цзянькуя был указан Майкл Дим, ученый из Университета Райса (Хьюстон, Техас, США). Несмотря на утверждения о том, что он не давал согласия на публикацию данных, в отношении М. Дима началась служебная проверка, результаты которой засекречены, но по состоянию на 2021 он больше не работает в Университете Райса.

Исследование Хэ Цзянькуя подверглось жесткой критике со стороны ученых по нескольким причинам:

1. Утверждения, заявленные в статье, не подтверждаются предоставленными данными. Несмотря на то, что в статье указано, что они пытались воспроизвести частый вариант мутации CCR5Δ32, фактически, это не так: в ген CCR5 были внесены другие мутации, роль которых в обеспечении резистентности к вирусу не изучена даже *in vitro*. В так и неопубликованной статье не приводилось доказательств, что генетическая манипуляция действительно привела к резистентности в отношении ВИЧ, хотя это можно было проверить до имплантации эмбрионов. Более того, анализируя данные секвенирования, приведенные в статье, можно заметить “частокол”, протяженный регион множественных неинтерпретируемых пиков в данных сиквенса в гене CCR5 (Regalado, 2019), что говорит о мозаичности эмбрионов, т.е. разные клетки имеют разные мутации в этом регионе, роль которых также не изучена.

2. Родители близнецов могли быть мало информированы о природе эксперимента или согласиться на проведение эксперимента под давлением. В настоящий момент существуют устоявшиеся эффективные протоколы для экстракорпорального оплодотворения у ВИЧ+ родителей, которые сво-

дят риски заражения эмбриона или плода к нулю. В связи с этим, процедура модификации генома не давала никакого медицинского преимущества, но приносила неоправданные риски, о чем пара могла быть не осведомлена. Более того, в Китае ВИЧ-положительные люди не имеют доступа к лечению бесплодия и экстракорпоральному оплодотворению, что указывает на то, что пара могла пойти на эксперимент вынужденно, так как это давало им единственный шанс иметь ребенка.

3. Заявленное медицинское преимущество делеции CCR5 вызывает сомнение. Даже если метод CRISPR эффективен для создания людей, устойчивых к ВИЧ, он вряд ли будет широко использоваться, особенно в местах, где разворачивается эпидемия ВИЧ, например, в южной Африке, ввиду его сложности, дороговизны, необходимости постоянного контроля и целого ряда других причин. Вероятно, потребуется много десятилетий широкого использования генетического редактирования с использованием CRISPR (при условии его эффективности), чтобы остановить эпидемию ВИЧ. Инициативы в области общественного здравоохранения, образования и широкого доступа к антиретровирусным препаратам являются более логичными и эффективными решениями для контроля над эпидемией ВИЧ.

4. Побочные эффекты применения редактирования генома людей мало изучены, и исследователи под руководством Хэ Цзянькуя приступили к созданию генетически модифицированных живых людей до того, как полностью осознали последствия внесенных ими правок. Технология CRISPR/Cas не обладает 100% специфичностью в отношении выбранного гена и внесение нуклеазы с гидовой РНК может приводить к непреднамеренным мутациям в других местах генома (т.н. off-target). Команда Хэ Цзянькуя тестировала отобранные 3–5 клеток из эмбрионов на ранней стадии до имплантации на off-target мутации и нашла однонуклеотидную вставку в некодирующем участке генома у одного эмбриона. Однако ключевой проблемой здесь является то, что секвенирование на предмет мутаций подразумевает лизирование клеток и выделение ДНК, т.е. протестированные клетки не могут быть в дальнейшем использованы для оплодотворения и могут отличаться от эмбриона, из которого они взяты. И напротив, эмбрионы, которые дали начало близнецам, не могли быть полностью проверены на наличие off-target мутаций в каждой из клеток. К примеру, использование CRISPR/Cas9 на эмбрионах овцы совместно с предимплантационным скринингом и отбором эмбрионов с желаемой мутацией приводит тем не менее к мозаицизму у половины плодов (Vilarino et al., 2018). В недавнем

исследовании применения CRISPR/Cas9 на человеческих эмбрионах для коррекции гена *EYS* обнаружено, что on-target и off-target разрезание Cas9 может приводить к полным или частичным хромосомальным потерям (Zuccaro et al., 2020).

В заключение необходимо еще раз подчеркнуть, что генетическая модификация людей на эмбриональной стадии продолжает считаться процедурой с недоказанной степенью риска и массовое внедрение технологии CRISPR/Cas потребует введения законов, гарантирующих, что технология не будет использоваться с нарушением этических правил.

Помимо редактирования генома эмбриона человека, к наследуемым изменениям относится редактирование половых клеток человека (сперматозоидов, яйцеклеток). Введение в яйцеклетки компонентов CRISPR/Cas9 совместно со сперматозоидами (в рамках экстракорпорального оплодотворения) предлагалось для повышения эффективности редактирования и снижения риска мозаицизма эмбрионов (Ma et al., 2017). Генетическая модификация сперматогонияльных стволовых клеток была испытана на мышах (Wu et al., 2015), свиньях (Webster et al., 2021). Однако, в целом, экспериментальные разработки по редактированию половых клеток человека довольно немногочисленные.

Руководящие этические и социальные принципы касательно клинического редактирования генома эмбриона человека были изложены американскими Национальными академиями наук, инженерии и медицины и английским советом Наффилда по биоэтике (National Academies of Sciences, 2017; Nuffield Council on Bioethics, 2018). В 2019 г. было опубликовано призыв ряда ведущих ученых, среди которых Эммануэль Шарпантье, Эрик Ландер, Фэн Чжан, к глобальному мораторию на любое клиническое использование редактирования наследуемой ДНК (в сперматозоидах, яйцеклетках или эмбрионах) для создания генетически модифицированных детей по технологическим, научным, медицинским и этическим соображениям (Lander et al., 2019). В 2020 г. было выпущено Женевское заявление о необходимости корректировки курса в редактировании наследуемого генома человека (Andorno et al., 2020). Его авторы настаивают, что перед началом любых шагов в сторону репродуктивного редактирования генома человека, требуется достигнуть глобального общественного консенсуса. В программу корректировки курса авторы включили разъяснение широкой общественности сложившихся недопониманий, связанных с редактированием генома, выдвижение на первый план социальных вопросов, в т.ч. вопросов равенства, и разработку критериев расширения прав и возможностей об-

щественности влиять на принятие решений в данной области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще 20 лет назад система CRISPR/Cas была известна лишь узкому кругу ученых, занимавшихся этой проблемой. Загадочная система повторов и спейсеров заинтересовала лишь некоторых микробиологов, работавших с бактериями или археями и не надеявшихся на грандиозные научные прорывы. Сегодня методика стала предметом пристального внимания всего научного сообщества, включая как узких специалистов, так и историков науки, философов, обсуждающих возникшие этические проблемы, а также общества в целом. По тематике CRISPR/Cas активно получают гранты, по ней охотно публикуются статьи. Следует помнить, что только неугасающий интерес первооткрывателей (в особенности, Франсиско Мохики), позволил нам оказаться на том уровне знаний, на котором мы сейчас находимся.

В настоящее время исследователи почти каждой биохимической, молекулярно-биологической или цитологической лаборатории используют CRISPR/Cas для редактирования генома. Бурное развитие методики привело общество к поворотному пункту: перед нами открылась возможность редактировать геномы людей. Тем не менее осознаны и существующие риски. Является ли технология полностью безопасной для человека ввиду возможных off-target эффектов? Как исключить возможное преступное и античеловечное использование методики? Невозможность протестировать побочные эффекты CRISPR/Cas на ранних стадиях развития эмбриона (вплоть до рождения) приводит к важной морально-этической проблеме: кто будет нести ответственность в случае рождения ребенка с генетическими аномалиями?

Появляются и иные насущные вопросы: можно ли применять CRISPR/Cas для несмертельных, купируемых заболеваний? Можно ли применять CRISPR/Cas на популяционном уровне? Не вызовет ли внедрение в практику этой современной и дорогой технологии еще большего разделения между бедными и богатыми, давая последним больше преимуществ? Наконец, можно ли массово применять CRISPR/Cas для “улучшения” генетики людей?

Казалось бы, совсем недавно в фантастической литературе описывалось, как можно по заказу менять фенотипические признаки людей вплоть до выбора цвета глаз или волос. Сейчас же представляется, что эта возможность не так фантастична. Но если цвет глаз и волос — это поли-

генные признаки, изменение которых с помощью CRISPR/Cas сложно или даже невозможно, то редактирование единичных генов выглядит разрешимой научной задачей. Прецедент с редактированием гена CCR5 заставил глубоко задуматься всю информированную общественность, ведь помимо описанной резистентности к ВИЧ, мутация CCR5 ассоциирована с улучшением памяти и способности к обучению (Zhou et al., 2016). Захотят ли будущие родители улучшать когнитивные способности своих еще нерожденных детей за счет редактирования генома?

На все подобные вопросы предстоит ответить в недалеком будущем, лучше сделать это прежде, чем приступить к редактированию генома людей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2020-773) и программы фундаментальных исследований ИБР РАН (0088-2021-0007).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Валетдинова К.Р., Овечкина В.С., Григорьева Е.В. и др.* Использование системы CRISPR/CAS9 для изучения клеточной модели спинальной мышечной атрофии // *Гены и клетки*. 2017. Т. 12. № 3.
- Веденеева Н.* Нобель по химии 2020: кто изменил код жизни курицы-несушки URL: <https://www.mk.ru/science/2020/10/07/nobel-po-khimii-2020-kto-izmenil-kod-zhizni-kuricynesushki.html> (дата обращения: 23.01.2022).
- Слободкина Е.А., Карагяур М.Н., Балабаньян В.Ю. и др.* Генная терапия в регенеративной медицине: последние достижения и актуальные направления развития // *Гены и клетки*. 2020. Т. 15. № 1. С. 6–16.
- Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S. et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science*. 2016. V. 353. № 6299. P. aaf5573.
- Andorno R., Baylis F., Darnovsky M. et al.* Geneva statement on heritable human genome editing: the need for course correction // *Trends in Biotechnology*. 2020. V. 38. № 4. P. 351–354.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H. et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. V. 315. № 5819. P. 1709–1712.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A. et al.* Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // *Microbiology*. 2005. V. 151. № 8. P. 2551–2561.
- Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M. et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // *Science*. 2008. V. 321. № 5891. P. 960–964.
- Canoy R.J., Vassetzky Y.S.* Factors that affect chromosomal translocations in cells: Doctoral dissertation. Paris: Université Paris-Saclay, 2021. 176 p.
- Cong L., Ran F.A., Cox D. et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
- Cyranoski D., Ledford H.* How the genome-edited babies revelation will affect research URL: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-07559-8> (дата обращения: 23.01.2022).
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M. et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // *Nature*. 2011. V. 471. № 7340. P. 602–607.
- Dyikanov D.T., Vasiliev P.A., Rysenkova K.D. et al.* Optimization of CRISPR/Cas9 technology to knock out genes of interest in aneuploid cell lines // *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2019. V. 25. № 3. P. 168–175.
- Fedorova I., Vasileva A., Selkova P. et al.* PpCas9 from *Pasteurella pneumotropica* – a compact Type II-C Cas9 ortholog active in human cells // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48. № 21. P. 12297–12309.
- Fernández C.R.* Francis Mojica, the spanish scientist who discovered CRISPR URL: <https://www.labiotech.eu/interview/francis-mojica-crispr-interview/> (дата обращения: 05.02.2022).
- Fogarty N.M.E., McCarthy A., Snijders K.E. et al.* Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis // *Nature*. 2017. V. 550. № 7674. P. 67–73.
- Frangoul H., Altshuler D., Cappellini M.D. et al.* CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 384. № 3. P. 252–260.
- Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M. et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature*. 2010. V. 468. № 7320. P. 67–71.
- 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. V. 109. № 39. P. E2579–E2586.
- Goerlich C.E., Griffith B., Hanna P. et al.* The growth of xenotransplanted hearts can be reduced with growth hormone receptor knockout pig donors // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2021. P. S0022-5223(21)01261–7.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C.* The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8. № 1. P. 172.

- Groenen P.M., Bunschoten A.E., Soolingen D. van 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. V. 10. № 5. P. 1057–1065.
- Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2016. V. 371. № 1707. P. 20150496.
- Hille F., Richter H., Wong S.P. et al. The biology of CRISPR-Cas: Backward and forward // Cell. 2018. V. 172. № 6. P. 1239–1259.
- Hoe N.P., Nakashima K., Lukomski S. et al. Rapid selection of complement-inhibiting protein variants in group A *Streptococcus epidemic* waves // Nat. Med. 1999. V. 5. № 8. P. 924–929.
- 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. V. 169. № 12. P. 5429–5433.
- Jansen R., Embden J.D.A. van, Gastra W. et al. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes // OMICS. 2002a. V. 6. № 1. P. 23–33.
- Jansen R., Embden J.D.A. van, Gastra W. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // Mol. Microbiol. 2002b. V. 43. № 6. P. 1565–1575.
- Jee C. A gene-edited pig's heart has been transplanted into a human for the first time URL: <https://www.technologyreview.com/2022/01/11/1043374/gene-edited-pigs-heart-transplant/> (дата обращения: 31.01.2022).
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
- Kaiser J. CRISPR and another genetic strategy fix cell defects in two common blood disorders URL: <https://www.science.org/content/article/crispr-and-another-genetic-strategy-fix-cell-defects-two-common-blood-disorders> (дата обращения: 18.02.2022).
- Karagyaur M.N., Rubtsov Y.P., Vasiliev P.A. et al. Practical recommendations for improving efficiency and accuracy of the CRISPR/Cas9 genome editing system // Biochemistry (Mosc). 2018. V. 83. № 6. P. 629–642.
- Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. № 8. P. 765–771.
- Lander E.S. The heroes of CRISPR // Cell. 2016. V. 164. № 1. P. 18–28.
- Lander E.S., Baylis F., Zhang F. et al. Adopt a moratorium on heritable genome editing // Nature. 2019. V. 567. № 7747. P. 165–168.
- Lea R., Niakan K. Human germline genome editing // Nat. Cell. Biol. 2019. V. 21. № 12. P. 1479–1489.
- Lopalco L. CCR5: From natural resistance to a new anti-HIV strategy // Viruses. 2010. V. 2. № 2. P. 574–600.
- Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.-W. et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos // Nature. 2017. V. 548. № 7668. P. 413–419.
- 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. V. 1. P. 7.
- Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R. et al. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems // Nat. Rev. Microbiol. 2011. V. 9. № 6. P. 467–477.
- Malankhanova T., Sorokin M., Medvedev S. et al. Introducing an expanded trinucleotide repeat tract into the human genome for Huntington's disease modeling *in vitro* // Curr. Protoc. Hum. Genet. 2020. V. 106. № 1. P. e100.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // Science. 2013. V. 339. № 6121. P. 823–826.
- Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA // Science. 2008. V. 322. № 5909. P. 1843–1845.
- Masepohl B., Görlitz K., Böhme H. Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1307. № 1. P. 26–30.
- Medvedev S.P., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R. et al. Creation and research of cell models of hereditary neurodegenerative diseases using directed genome editing // Neurochem. J. 2021. V. 15. № 4. P. 353–358.
- Mojica F., Garrett R. Discovery and seminal developments in the CRISPR field // CRISPR-Cas Systems: RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea / Eds. Barrangou R., van der Oost J. Springer VS, 2013. P. 1–31.
- Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Soria E. et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria // Mol. Microbiol. 2000. V. 36. № 1. P. 244–246.
- Mojica F.J., Ferrer C., Juez G. et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning // Mol. Microbiol. 1995. V. 17. № 1. P. 85–93.
- Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites // Mol. Microbiol. 1993. V. 9. № 3. P. 613–621.
- Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C. The on-off switch of CRISPR immunity against phages in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2010. V. 77. № 6. P. 1341–1345.
- Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // J. Mol. Evol. 2005. V. 60. № 2. P. 174–182.
- Mojica F.J.M., Rodríguez-Valera F. The discovery of CRISPR in Archaea and Bacteria // The FEBS J. 2016. V. 283. № 17. P. 3162–3169.
- Morozova K.N., Suldina L.A., Malankhanova T.B. et al. Introducing an expanded CAG tract into the *huntingtin* gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // PLoS One. 2018. V. 13. № 10. P. e0204735.

- Naeem M., Majeed S., Hoque M.Z. et al.* Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing // *Cells*. 2020. V. 9. № 7. P. 1608.
- Nair P.* QnAs with Rodolphe Barrangou // *PNAS*. 2017. V. 114. № 28. P. 7183–7184.
- Nakata A., Amemura M., Makino K.* Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome // *J. Bacteriology*. 1989. V. 171. № 6. P. 3553–3556.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, National Academy of Medicine; National Academy of Sciences, Committee on Human Gene Editing: Scientific, Medical, and Ethical Considerations. Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance. Washington (DC): National Academies Press, 2017. PMID: 28796468.
- Nidhi S., Anand U., Oleksak P. et al.* Novel CRISPR–Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 7. P. 3327.
- North A.R., Burt A., Godfray H.C.J.* Modelling the suppression of a malaria vector using a CRISPR-Cas9 gene drive to reduce female fertility // *BMC Biology*. 2020. V. 18. № 1. P. 98.
- Novembre J., Galvani A.P., Slatkin M.* The geographic spread of the CCR5 Δ 32 HIV-resistance allele // *PLoS Biol*. 2005. V. 3. № 11. P. e339.
- Nuffield Council on Bioethics. Genome editing and human reproduction: social and ethical issues. London: Nuffield Council on Bioethics, 2018. 205 p.
- Ormond K.E., Mortlock D.P., Scholes D.T. et al.* Human germline genome editing // *Am. J. Hum. Genet*. 2017. V. 101. № 2. P. 167–176.
- 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*. 2005. V. 151. Pt 3. P. 653–663.
- Reardon S.* First pig-to-human heart transplant: what can scientists learn? // *Nature*. 2022. V. 601. № 7893. P. 305–306.
- Regalado A.* China’s CRISPR babies: Read exclusive excerpts from the unseen original research URL: <https://www.technologyreview.com/2019/12/03/131752/chinas-crispr-babies-read-exclusive-excerpts-he-jiankui-paper/> (дата обращения: 23.01.2022).
- Rodríguez-Leal D., Lemmon Z.H., Man J. et al.* Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing // *Cell*. 2017. V. 171. № 2. P. 470–480. e8.
- Rusanov A., Kozhin P., Romashin D. et al.* Impact of p53 modulation on interactions between p53 family members during HaCaT keratinocytes differentiation // *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020.
- Rysenkova K.D., Semina E.V., Karagyaur M.N. et al.* CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 50. P. 29414–29430.
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V. et al.* Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 // *Plant Biotechnology J*. 2018. V. 16. № 4. P. 902–910.
- Sapranaukas R., Gasiunas G., Fremaux C. et al.* The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. № 21. P. 9275–9282.
- Shmakov S.A., Faure G., Makarova K.S. et al.* Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes // *Nat. Protoc*. 2019. V. 14. № 10. P. 3013–3031.
- Shmakova A.A., Germini D., Vassetzky Y.S.* Exploring the features of Burkitt’s lymphoma-associated t(8;14) translocations generated via a CRISPR/Cas9-based system // *Biopolymers and Cell*. 2019. V. 35. № 3. P. 232–233.
- Taha E.A., Lee J., Hotta A.* Delivery of CRISPR-Cas tools for *in vivo* genome editing therapy: Trends and challenges // *J. Controlled Release*. 2022. V. 342. P. 345–361.
- Tyurin-Kuzmin P.A., Karagyaur M.N., Rubtsov Y.P. et al.* CRISPR/Cas9-mediated modification of the extreme C-terminus impairs PDGF-stimulated activity of Duox2 // *Biol. Chem*. 2018. V. 399. № 5. P. 437–446.
- Ustyantseva E.I., Medvedev S.P., Vetchinova A.S. et al.* A platform for studying neurodegeneration mechanisms using genetically encoded biosensors // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. № 3. P. 299–309.
- Vilarino M., Suchy F.P., Rashid S.T. et al.* Mosaicism diminishes the value of pre-implantation embryo biopsies for detecting CRISPR/Cas9 induced mutations in sheep // *Transgenic Res*. 2018. V. 27. № 6. P. 525–537.
- Wang Y., Cheng X., Shan Q. et al.* Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol*. 2014. V. 32. № 9. P. 947–951.
- Webster D., Bondareva A., Solin S. et al.* Targeted gene editing in porcine spermatogonia // *Frontiers in Genetics*. 2021. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.627673>
- Wu Y., Zhou H., Fan X. et al.* Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells // *Cell Res*. 2015. V. 25. № 1. P. 67–79.
- Yang L., Güell M., Niu D. et al.* Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) // *Science*. 2015. V. 350. № 6264. P. 1101–1104.
- Yuste-Lisbona F.J., Fernández-Lozano A., Pineda B. et al.* ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network // *PNAS*. 2020. V. 117. № 14. P. 8187–8195.
- Zhou M., Greenhill S., Huang S. et al.* CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory // *eLife*. 2016. V. 5. P. e20985.
- Zotova A., Pichugin A., Atemasova A. et al.* Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 3132.
- Zuccaro M.V., Xu J., Mitchell C. et al.* Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos // *Cell*. 2020. V. 183. № 6. P. 1650–1664. e15.

CRISPR/Cas: History and Perspectives

A. A. Shmakova^{1, 2, *}, O. P. Shmakova³, A. A. Karpukhina¹, and Y. S. Vassetzky^{1, **}

¹*Koltsov Institute of Developmental Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

²*Laboratory of Molecular Endocrinology, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia*

³*Adolescent Psychiatry Research Unit, Federal State Budgetary Scientific Institution Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia*

**e-mail: anyashm@gmail.com*

***e-mail: vassetzky@gmail.com*

Discovery of the CRISPR/Cas system revolutionized biology and biomedicine in the 21st century. Here we discuss the milestones in the development of CRISPR/Cas genome editing technology, from the history of discovery to current developments, including medical applications. Technical and ethical problems associated with the use of CRISPR/Cas for editing human embryonic genomes are also discussed.

Keywords: CRISPR, Cas, genome editing, history of science