

Эволюция подходов к манипуляции генетическим материалом живых объектов: от селекции к редактированию генома

Д.В. Стамбольский*, А.В. Захарова, М.Н. Карагяур

Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Россия, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 10

* Адрес для корреспонденции: stambolskydv@my.msu.ru

Аннотация

Системы редактирования генома представляют собой мощный инструмент, способный прицельно модифицировать генетический материал в его природном контексте внутри живого организма. Благодаря таким удивительным возможностям системы редактирования нашли широкий спектр применения во всех сферах биологической науки и медицины. В данной рукописи мы проводим краткий исторический экскурс по вопросу возникновения и развития различных систем геномного редактирования. Эволюция данного направления сопровождалась грандиозными открытиями и вручением целого ряда Нобелевских премий. Отслеживая логику научной мысли в стремлении понять и модифицировать материальную основу наследственности, данная рукопись ставит своей целью сформировать у начинающих исследователей целостную картину об огромной вселенной (без преувеличения) систем геномного редактирования. Понимание же полноты всего спектра потенциальной активности систем редактирования обязывает исследователей к вдумчивому и ответственному их применению.

Ключевые слова: системы редактирования генома, CRISPR/Cas9, TIGR/Tas, преимущества и ограничения систем геномного редактирования

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Для цитирования: Стамбольский Д.В., Захарова А.В., Карагяур М.Н. Эволюция подходов к манипуляции генетическим материалом живых объектов: от селекции к редактированию генома. *Регенерация органов и тканей*. 2025;3(1): 10–21. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-10-21>

Получена 18.02.2025

Обработана 21.03.2025

Принята к публикации 25.03.2025

Evolution of approaches to manipulating the genetic material of living objects: from selection to genome editing

Dmitry V. Stambolsky*, Alina V. Zakharova, Maxim N. Karagyaur

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119192, Moscow, Lomonosovsky Ave., 27/10

* Correspondence: stambolskydv@my.msu.ru

Abstract

Genome editing systems are powerful tools capable of precisely modifying genetic material in its natural context within a living organism. Due to these remarkable capabilities, editing systems have found a wide range of applications in all areas of biological science and medicine. In this review, we provide a brief historical overview of the origins and development of various genome editing systems. The evolution of this field has been accompanied by significant discoveries and the awarding of numerous Nobel Prizes. Tracing the logic of scientific thought in the quest to understand and modify the material basis of heredity, this manuscript aims to provide budding researchers with a comprehensive picture of the vast universe of genome editing systems. Understanding the full spectrum of potential activity of editing systems obliges researchers to use them thoughtfully and responsibly.

Keywords: genome editing systems, CRISPR/Cas9, TIGR/Tas, advantages and limitations of genome editing systems

Conflicts of interest: the authors declare no conflicts of interest.

Funding: the study was carried out as part of Lomonosov Moscow State University state assignment.

For citation: Stambolsky D.V., Zakharova A.V., Karagyaur M.N. Evolution of approaches to manipulating the genetic material of living objects: from selection to genome editing. *Tissue and organ regeneration*. 2025;3(1): 10–21. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2025-1-10-21>

Received 18.02.2025

Revised 21.03.2025

Accepted 25.03.2025

Редактирование или модификация генома — это процедура направленной вставки, удаления или перемещения фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в геноме живого организма [1].

История редактирования генома начиналась со становления генетики как науки и открытия ДНК и ее роли в хранении, передаче и реализации наследственной информации [2]. Наследственная передача признаков была известна задолго до открытия ДНК. Первым подходом к получению организмов с желательными геномами были селекционные работы по получению

с помощью последовательных, многократных скрещиваний видов животных и сортов растений, у которых случайно возникшие желательные признаки в результате селекционного отбора закреплялись в гомозиготном состоянии [3]. С момента понимания роли ДНК в наследственности селекционеры для повышения шансов на получение желательного признака начали использовать методы, повышающие частоту изменений структуры ДНК (химический или радиационный мутагенез) [4]. Однако такие подходы носили эмпирический ненаправленный характер и редко приводили к достижению нужного результата [5].

Понимание механизмов хранения и передачи генетической информации началось с открытия нуклеиновых кислот. Впервые ДНК была выделена из отделяемого раны пациента швейцарским химиком Фридрихом Мишером в 1868 году [6] (рис.). Полученное им вещество он назвал нуклеин. Он определил, что выделенное вещество является кислотой, но его функции остались для него неизвестными. ДНК в чистом виде впервые выделил немецкий исследователь Рихард Альтман в 1889 году, он же впервые назвал ее нуклеиновой кислотой [7]. В 1928 г. английский ученый Фредерик Гриффит провел эксперимент, в котором показал, что непатогенный штамм *Streptococcus pneumoniae* может трансформироваться в вирулентный при добавлении к нему гомогената патогенного штамма. Данное явление получило название бактериальной трансформации [8]. Позднее, в 1944 году, при фракционировании материала, переносящего изучаемые свойства, группой британских исследователей было показано, что за трансформацию отвечает именно ДНК, а другие молекулярные фракции таким свойством не обладают [9]. В 1940-е годы под руководством Александра Тодда в Британии были установлены детали химического строения нуклеотидов (Нобелевская премия по химии, 1957 год) [10].

В дальнейшем множество исследователей изучали нуклеотидный состав ДНК из различных источников. На основании этих исследований в 1951 году были сформулированы правила Чаргаффа, четко определяющие количественные соотношения между нуклеотидами в составе ДНК [11]. В 1952 году Розалинд Франклин под руководством Мориса Уилкинса с помощью рентгеноструктурного анализа получила изображение молекулы ДНК [12]. Данные о том, что ДНК содержит информацию о самой себе и о строении белков, впервые были получены в 1952 г. Альфредом Херши (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1969 год) и Мартой Чейз [13]. В 1957 году Хейнц Френкель-Конрат продемонстрировал, что носителем генетической информации может быть не только ДНК, но и рибонуклеиновая кислота (РНК) [14]. На основе массива всех ранее полученных знаний о ДНК в 1953 году Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком молекула ДНК была описана как двойная спираль, состоящая из цепей нуклеотидов, притом нуклеотиды первой спирали комплементарно связаны с нуклеотидами второй спирали (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1962 год) [15].

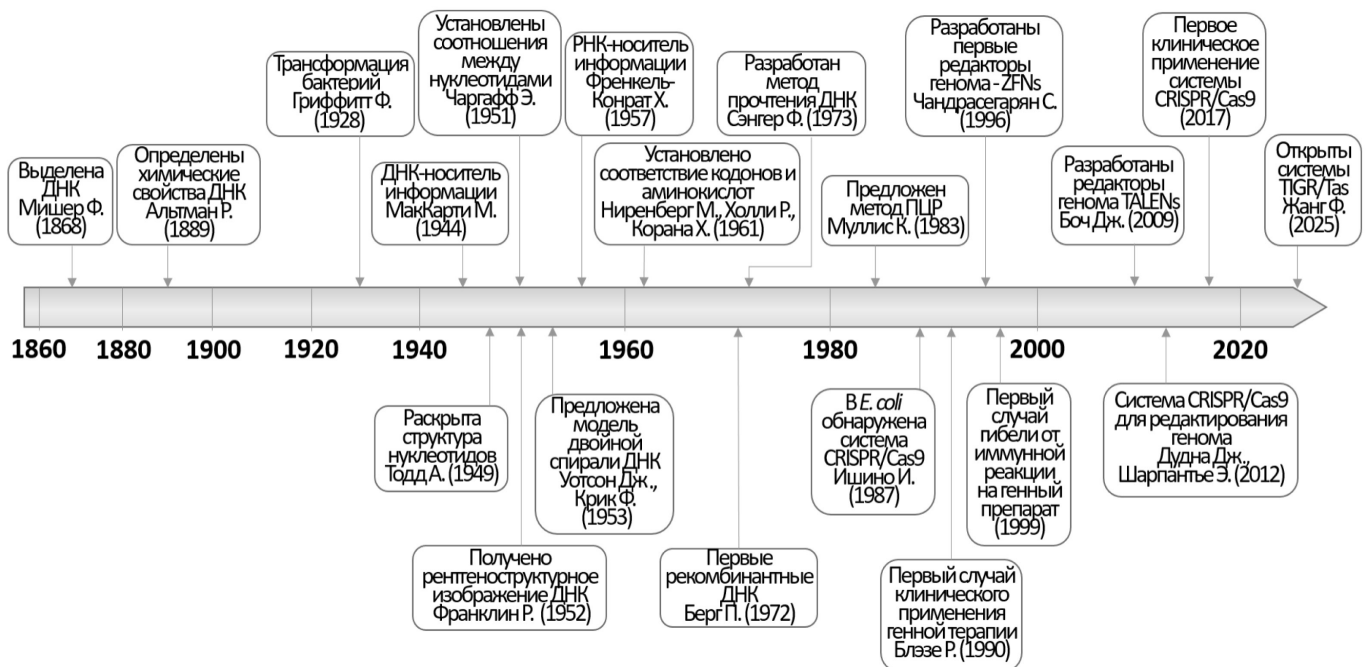


Рис. Хронология ключевых открытий, сформировавших современное понимание структуры генетического материала и возможности его редактирования

Fig. Timeline of key discoveries that have shaped the current understanding of genetic material structure and the possibility of its editing.

Смысловое прочтение структуры ДНК было начато с предположения о триплетности генетического кода, которое было высказано российским физиком Георгием Гамовым в 1954 году [16]. Он предположил, что триплетов, построенных их 4 разных нуклеотидов (А, Т, G, С), входящих в состав ДНК, достаточно для кодирования 20 протеиногенных аминокислот. В дальнейшем это предположение было в 1961 году подтверждено Маршаллом Ниренбергом (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1968 год) и Генрихом Маттеи, что позволило установить соответствия между кодонами и аминокислотами [17].

С момента открытия роли ДНК как ключевого носителя информации о структуре живой материи и с момента описания ее структуры и механизмов реализации записанной в ней информации возникла идея о внесении направленных изменений в геном. Редактирование генома в аспекте целеполагания — это способ придания организму желательных свойств или способ лечения в случаях, когда заболевание обусловлено наличием в геноме определенных вариантов в последовательности ДНК.

ДНК представляет собой чрезвычайно прочную и стабильную молекулу, защищенную от внесения в нее случайных изменений. Дальнейшие исследования в этой области позволили создать методическую базу для разработки технологий редактирования генома [18]. В 1973 году Фредериком Сэнгером был разработан метод секвенирования ДНК [19]. В 1974 году описаны и получены первые рестриктазы — ферменты, позволяющие разрезать ДНК в строго определенных местах [20]. В 1972 г. под руководством Пола Берга исследователи впервые сконструировали ДНК, включающую гены *E. coli*, гены бактериофага и вируса SV40 [21]. В 1983 году Кери Муллисом был предложен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который позволил «тиражировать» нужные молекулы ДНК в требуемом объеме [22]. Это важное открытие быстро нашло свое применение в диагностике наследственных и инфекционных заболеваний и было по достоинству оценено научным и медицинским сообществом с присвоением в 1993 году Кери Муллису Нобелевской премии по химии.

В 1990 г. в США была проведена первая клиническая процедура генотерапии. Пациентке с иммунодефицитом была введена генетическая конструкция, кодирующая фермент аденозин-

дезаминазу ADA [23]. Наблюдался клинический эффект, но его поддержание требовало повторных введений конструкции.

Гибель пациента от анафилактического шока при процедуре генотерапии семейной гиперхолестеринемии, использующей аденовирусный вектор, как минимум на десятилетие затормозила развитие и внедрение генотерапевтических подходов в клиническую практику [24].

Целью редактирования генома является внесение заданных изменений в его последовательность. Для этого необходимо синтезировать нужную последовательность ДНК и обеспечить ее доставку и встраивание в нужный орган, в ткань, в тип клеток, в конкретный участок молекулы ДНК. Даже если генотерапия не имеет своей целью постоянное встраивание новой последовательности в геном, тканевая и клеточная специфичность доставки генетической конструкции имеет существенное значение.

До момента открытия систем редактирования генома для осуществления направленной вставки в геном целевого организма в основном полагались на гомологичную рекомбинацию, происходившую между высокоомологичными участками ДНК, один из которых локализован в геноме целевой клетки и подлежит редактированию, а второй является синтетическим фрагментом, имеющим гомологию с целевым участком ДНК, и вводится извне [25, 26]. Такая возможность продемонстрирована для всех эукариотических клеток [27]. Метод используется до настоящего времени при создании клеточных линий, когда возможен отбор клеточных клонов по заданному признаку [28]. Данный подход имеет ряд существенных недостатков: во-первых, недостаточная частота естественных рекомбинаций ДНК; во-вторых, недостаточная специфичность встраивания синтезированных последовательностей в геном — встроившийся не в то место фрагмент ДНК может либо не работать, либо вызывать нежелательные последствия [29, 30].

Изучение природы такого рода рекомбинаций позволило установить, что абсолютное их большинство обусловлено возникновением разрывов ДНК, а внесение разрыва повышает эффективность гомологичной рекомбинации в 1000 раз [31, 32]. Последующие исследования в области прецизионного редактирования генома были направлены

на поиск подходов к внесению прицельных разрывов в двойную спираль ДНК [33]. Обычные эндонуклеазы, выделенные из микроорганизмов, широко используемые в молекулярной биологии и геномной инженерии, при встрече с полногеномной ДНК не способны обеспечить необходимую специфичность, так как геном содержит множество распознаваемых ими участков [34].

Одним из первых инструментов для внесения двуцепочечных разрывов в ДНК стали мегануклеазы — ферменты бактериального и фагового происхождения, специфически распознающие относительно длинные последовательности нуклеотидов (до 40 пар оснований), что обеспечивало высокую точность разрезания [35, 36]. Существенным их недостатком являлась практическая невозможность прицельно перенацелить их на новую последовательность ДНК [37].

В попытках повысить гибкость распознавания ДНК-мишеней были созданы истинно искусственные программируемые нуклеазы с ДНК-специфичными модульными доменами класса «цинковые пальцы», так называемые Zinc-Finger Nucleases (ZFNs) [38]. Каждый из таких модулей в составе цинковых пальцев способен специфически распознавать конкретный триплет нуклеотидов. Специфичность ДНК-связывающего домена нуклеазы обеспечивается за счет сочетаний 3–5 таких модулей [39]. Данный подход до сих пор иногда используется, но он не полностью оправдал возложенные надежды — распознавание целевых последовательностей ДНК сложными рекомбинантными белками, содержащими «цинковые пальцы», далеко не всегда является специфичным, не говоря уже о сложности сборки таких модульных многокомпонентных систем [40, 41].

Параллельно с ZFNs разрабатывались системы редактирования, основанные на белках TALE (эффе́ктор, подобный активатору транскрипции) из паразитических микроорганизмов рода *Xanthomonas*, способствующие инвазии бактерий в ткани растения через изменение транскрипционной программы хозяйской растительной клетки и коллапс ее защитных механизмов [42]. Такого рода геномные редакторы получили название TALENs, или TALE нуклеазы [43].

В отличие от ZFNs каждый из модулей ДНК-распознающего домена TALENs способен распознавать отдельный нуклеотид, что придает

данному редактору большую гибкость [44]. Все же распознавание последовательностей ДНК с помощью аминокислотных остатков не обладает достаточной специфичностью, а сборка и адаптация такого рода редакторов крайне трудоемка и затратна [45]. Поэтому появление редакторов, основанных на других принципах (CRISPR/Cas и TIGR/Tas), произвело революцию в редактировании генома [46]. В основе системы CRISPR/Cas лежит система бактериального иммунитета, защищающая бактерий от агентов, содержащих чужеродные нуклеиновые кислоты [47]. Локус CRISPR был впервые обнаружен в 1987 г. у *Escherichia coli* [48]. Впоследствии была уточнена его структура — в 1993 году были описаны повторяющиеся последовательности, разделенные равными промежутками, а в 2002 году были открыты гены *cas* — гены локусов CRISPR, кодирующие белки Cas [49, 50]. В 2007 году была установлена и доказана роль системы CRISPR как основы адаптивного иммунитета бактерий [47]. Наконец в 2012 году Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье предложили использовать систему CRISPR/Cas для внесения прицельных разрывов в целевые области ДНК [51, 52]. В 2017 году прошли первые клинические испытания лечения серповидноклеточной анемии с использованием системы CRISPR/Cas [53]. «За разработку метода редактирования генома» в 2020 году Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье была присуждена Нобелевская премия по химии [54].

Существенным отличием системы CRISPR/Cas от вышеописанных мегануклеаз, ZFNs и TALENs является использование для распознавания специфических последовательностей ДНК нуклеотидных последовательностей РНК, а не конформационных сочетаний аминокислот в составе ДНК-распознающих доменов нуклеаз [55, 56]. В связи с этим CRISPR/Cas-системы еще называют РНК-направляемыми нуклеазами. Системы CRISPR/Cas обладают высокой специфичностью, высокой гибкостью и низкой себестоимостью, что делает их крайне удобным инструментом для прицельного внесения двуцепочечных разрывов в ДНК как с целью выключения генов, так и для точного встраивания необходимых последовательностей [57].

Исследования последнего десятилетия позволили сделать системы редактирования еще более гибкими, что было достигнуто дополнением их различными функциональными доменами:

для редактирования оснований, праймированного редактирования, модификации эпигенома и управления активностью отдельных генов, прижизненного мечения целевых участков генома, инактивации целых хромосом и прочих задач [56, 59]. Возможности применения систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas во многом ограничены лишь фантазией исследователя [57].

В 2025 году было описано новое семейство программируемых РНК-направляемых нуклеаз — система редактирования генома TIGR/Tas (Tandem Interspaced Guide RNA-Targeting Systems, Системы наведения на направляющих РНК с перемежающимися повторами), представители которого рассматриваются как потенциальная альтернатива CRISPR/Cas [60]. Система TIGR/Tas, как и CRISPR/Cas, выполняет функцию адаптивного бактериального иммунитета. Основные отличия от CRISPR/Cas заключаются в способности редактировать практически любую последовательность ДНК (нет зависимости от РАМ-последовательности), меньшем размере нуклеаз (около 350 аминокислот) и способности TIGR-РНК связываться с 2 цепями ДНК одновременно [61]. С одной стороны, указанные параметры могут увеличить гибкость систем редактирования, а с другой, снизить ее прецизионность или эффективность, что было ранее продемонстрировано при модификации систем CRISPR/Cas. Возможности применения системы TIGR/Tas для прицельного редактирования генома в настоящий момент активно изучаются [62].

Редактирование генов сделало возможным прорывное развитие различных областей биологических наук и медицины [63, 55]. Его уже широко используют в молекулярной и клеточной биологии, биоинженерии и сельском хозяйстве [64]. Так, редактирование генома уже позволяет моделировать патогенные мутации человека с целью установления их вовлеченности в патогенез и функциональной значимости в клеточных и животных моделях [65, 66]. Системы CRISPR/Cas увеличивают продуктивность культурных растений и животных и делают их более устойчивыми к инфекциям [64]. Редактирование генов вирусов открывает возможности к разработке живых биотехнологически аттенуированных вакцин, а модификация геномов насекомых в ближайшее время позволит искоренить вектор-переносимые инфекции с минимальным влиянием на экологию [65–68].

Редактирование генома постепенно входит и в медицинскую практику [69]. Так, с помощью технологий редактирования генома удалось установить молекулярно-генетические причины ряда наследственных заболеваний, создать породу свиней — универсальных доноров для ксенотрансплантации, разработать подходы к терапии наследственных заболеваний и созданию более эффективных CAR T-лимфоцитов для лечения рака крови и солидных опухолей [53, 70, 71]. Говоря о клиническом применении систем редактирования генома, нельзя не упомянуть лекарственные препараты Casgevy (одобрен FDA для лечения бета-талассемии и серповидноклеточной анемии) и NTLA-2001 (проходит III фазу клинических испытаний для лечения транстиретинового амилоидоза) [71–73].

В связи с недостатком данных о возможных нежелательных последствиях использования генной терапии и редактирования генома решение о применении данных технологий должно приниматься лишь в тех случаях, когда их польза такого применения будет очевидно превышать его потенциально возможный вред [74, 75]. Наиболее перспективным направлением редактирования генома в медицине является лечение тяжелых моногенных наследственных заболеваний путем исправления или замещения дефектных генов, причем пока преимущественно *ex vivo* с тщательной проверкой отредактированных клеток [76, 57]. Перспективным выглядит применение методов редактирования генома при разработке методов клеточной терапии для получения клеток с повышенным терапевтическим потенциалом [53, 77]. В то же время к применению данных технологий *in situ* стоит относиться с осторожностью, поскольку их применение может сопровождаться нежелательными эффектами: нецелевым редактированием и возникновением хромосомных мутаций [78–80]. Использование систем редактирования для лечения опухолевых и инфекционных заболеваний (за исключением модификации генома эффекторных иммунных клеток или выключения генов рецепторов, задействованных в проникновении инфекционного агента) мы считаем низкоэффективным [81, 82]. Причина этого кроется в сочетании относительно невысокой эффективности систем редактирования и низкой эффективности стратегии негативной селекции для лечения опухолевых и инфекционных заболеваний [83].

Говоря о редактировании генома, нельзя не затронуть и этические аспекты, связанные с безопасностью и последствиями для организма и экосистемы в целом широкого применения методов редактирования геномов [84]. Необходимость общественного обсуждения и государственного регулирования этих технологий является важным аспектом их применения [85, 86]. Признание потенциальных проблем безопасности, связанных с редактированием генома, подчеркивает важность мониторинга пациентов во время и после лечения [87]. На данном этапе развития в качестве наименее опасных выглядят регулируемые генетические конструкции с управляемой активностью либо конструкции, имеющие ограниченный срок действия [88]. В связи с этим представляют интерес элиминируемые конструкции на основе РНК или плазмидных ДНК [89]. В качестве целевых клеток

для редактирования генома по озвученным выше причинам следует в первую очередь рассматривать клетки, которые могут быть отредактированы *ex vivo*, проверены и возвращены в организм: гемопоэтические стволовые клетки, лейкоциты, кератиноциты, фибробласты [90–92].

Заключение

Системы редактирования генома представляют собой мощный прецизионный инструмент, который произвел или еще произведет революцию, без сомнения, во всех сферах биологической науки и медицины. Понимая такой потенциал данной технологии (в том числе и негативные стороны ее использования), необходимо отслеживать отсроченные последствия ее применения, постепенно раздвигая по мере необходимости существующие технические и даже некоторые этические ограничения.

Литература

1. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet.* 2008;122(6):565–581. DOI: 10.1007/s00439-007-0433-0
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature.* 1953;171(4356):737–738. DOI: 10.1038/171737a0
3. Lehnert H, Berner T, Lang D, Beier S, Stein N, Himmelbach A, Kilian B, Keilwagen J. Insights into breeding history, hotspot regions of selection, and untapped allelic diversity for bread wheat breeding. *Plant J.* 2022;112(4):897–918. DOI: 10.1111/tpj.15952
4. Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. *Science.* 1927;66(1699):84–87. DOI: 10.1126/science.66.1699.84
5. Riaz M, Yasmeen E, Saleem B, Hameed MK, Saeed Almheiri MT, Saeed Al Mir RO, et al. Evolution of agricultural biotechnology is the paradigm shift in crop resilience and development: a review. *Front Plant Sci.* 2025;16:1585826. DOI: 10.3389/fpls.2025.1585826
6. Miescher F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hoppe-Seyler's Med Chem.* 1871;4:441–460.
7. Altmann R. *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen.* Leipzig: Veit & Co., 1890.
8. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond).* 1928;27(2):113–159. DOI: 10.1017/S0022172400031879
9. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation. *J Exp Med.* 1944;79(2):137–158. DOI: 10.1084/jem.79.2.137
10. Todd AR. Nucleotides, nucleosides, and nucleic acids. *Angew Chem.* 1958;70(1):1–17. DOI: 10.1002/anie.195800011
11. Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia.* 1950;6(6):201–209. DOI: 10.1007/BF02173653
12. Franklin RE, Gosling RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature.* 1953;171:740–741. DOI: 10.1038/171740a0
13. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in the growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 1952;36(1):39–56. DOI: 10.1085/jgp.36.1.39
14. Fraenkel-Conrat H, Singer B. Reconstitution of infectivity with ribonucleic acid and virus protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1957;43(9):707–713. DOI: 10.1073/pnas.43.9.707

15. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737–738. DOI: 10.1038/171737a0
16. Gamow G. Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures. *Nature*. 1954;173:318. DOI: 10.1038/173318a0
17. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961;47(10):1588–1602. DOI: 10.1073/pnas.47.10.1588
18. Karagyaur MN, Rubtsov YP, Vasiliev PA, Tkachuk VA. Practical recommendations for improving efficiency and accuracy of the CRISPR/Cas9 genome-editing system. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(6):629–642. DOI: 10.1134/S0006297918060020
19. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2
20. Roberts RJ. Restriction enzymes and their use in molecular cloning. *Annu Rev Biochem*. 1976;45:485–528. DOI: 10.1146/annurev.bi.45.070176.002501
21. Jackson DA, Symons RH and Berg P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli* Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 69, No. 10, 1972, pp. 2904–2909. DOI:10.1073/pnas.69.10.2904
22. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335–350. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6
23. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270(5235):475–480. DOI: 10.1126/science.270.5235.475
24. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80(1–2):148–158. DOI: 10.1016/j.ymgme.2003.08.016
25. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288–1292. DOI: 10.1126/science.2660260
26. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51(3):503–512. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90646-5
27. Smithies O. The integration of homologous DNA sequences in mammalian chromosomes. *Nature*. 1985;317(6039):230–234. DOI: 10.1038/317230a0
28. Trudeau DL, Smith MA, Arnold FH. Innovation by homologous recombination. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(6):902–909. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.10.007
29. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, et al. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 1987;330(6148):576–578. DOI: 10.1038/330576a0
30. Porteus MH, Baltimore D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*. 2003;300(5620):763. DOI: 10.1126/science.1078395
31. 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):8096–8106. DOI: 10.1128/MCB.14.12.8096-8106.1994
32. Choulika A, Perrin A, Dujon B, Nicolas JF. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1995;15(4):1968–1973. DOI: 10.1128/MCB.15.4.1968-1973.1995
33. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011;188(4):773–782. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
34. Roberts RJ. Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem*. 1976;4:123–164. DOI: 10.3109/10409237609105456
35. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges. *Curr Gene Ther*. 2011;11(1):11–27. DOI: 10.2174/156652311794520111
36. Stoddard BL. Homing endonuclease structure and function. *Q Rev Biophys*. 2005;38(1):49–95. DOI: 10.1017/S0033583505004063

37. Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(22):e149. DOI: 10.1093/nar/gkl720
38. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(3):1156–1160. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156
39. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 2005;435(7042):646–651. DOI: 10.1038/nature03556
40. Carroll D. Genome engineering: Zinc-finger nucleases and beyond. *Nat Protoc.* 2011;6(2):239–254. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
41. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* 2014;15(5):321–334. DOI: 10.1038/nrg3686
42. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009;326(5959):1509–1512. DOI: 10.1126/science.1178811
43. Карагяур МН, Примак АЛ, Джауари СС, Бозов КД, Макусь ЮВ. Технологии редактирования генома и перспективы их применения в биомедицине. Регенерация органов и тканей. 2024;2(1):54–77. DOI: 10.60043/2949-5938-2024-1-54-77
44. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55. DOI: 10.1038/nrm3486
45. Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae.* 2014;6(3):19–40.
46. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096. DOI: 10.1126/science.1258096
47. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140
48. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 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):5429–5433. DOI: 10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987
49. Mojica FJM, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. 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;17(1):85–93. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x
50. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565–1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
51. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816–821. DOI: 10.1126/science.1225829
52. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819–823. DOI: 10.1126/science.1231143
53. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–260. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054
54. Nobel Foundation. The Nobel Prize in Chemistry 2020: Emmanuelle Charpentier and Jennifer A Doudna. [NobelPrize.org](https://www.nobelprize.org). 2020.
55. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262–1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010
56. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49–55. DOI: 10.1038/nrm3486
57. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9:1911. DOI: 10.1038/s41467-018-04252-2
58. Dyikanov DT, Vasiluev PA, Rysenkova KD, Aleksandrushkina NA, Tyurin-Kuzmin PA, Kulebyakin KY, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 technology to knock out genes of interest

- in aneuploid cell lines. *Tissue Eng Part C Methods*. 2019;25(3):168–175. DOI: 10.1089/ten.TEC.2018.0365
59. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576(7785):149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4
 60. Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, et al. Structure and Engineering of *Francisella novicida* Cas9. *Cell*. 2016;164(5):950–961. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.039
 61. Faure G, Saito M, Wilkinson ME, Quinones-Olvera N, Xu P, Flam-Shepherd D, et al. TIGR-Tas: A family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses. *Science*. 2025;388(6746):eadv9789. DOI: 10.1126/science.adv9789
 62. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Joung JK. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016;529(7587):490–495. DOI: 10.1038/nature16526
 63. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015;21(2):121–131. DOI: 10.1038/nm.3793
 64. Gao C. Genome editing in crops: from bench to field. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(7):476–495. DOI: 10.1038/s41580-021-00409-y
 65. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, et al. A CRISPR–Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*. 2016;34(1):78–83. DOI: 10.1038/nbt.3439
 66. Dipaola MG, Fortuna C, Severini F, Bevivino G, Di Luca M, Nolan T, et al. Temporal and spatial profiling of *Aedes albopictus* immune responses to chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2025;19(10):e0013588. DOI: 10.1371/journal.pntd.0013588
 67. Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife*. 2014;3:e03401. DOI: 10.7554/eLife.03401
 68. Mazloum A, Karagyaur M, Chernyshev R, van Schalkwyk A, Jun M, Qiang F, Sprygin A. Post-genomic era in agriculture and veterinary science: successful and proposed application of genetic targeting technologies. *Front Vet Sci*. 2023;10:1180621. DOI: 10.3389/fvets.2023.1180621
 69. Petraitytė G, Preikšaitienė E, Mikštienė V. Genome Editing in Medicine: Tools and Challenges. *Acta Med Litu*. 2021;28(2):205–219. DOI: 10.15388/Amed.2021.28.2.8
 70. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR–Cas9. *Science*. 2017;357(6357):1303–1307. DOI: 10.1126/science.aan4187
 71. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365. DOI: 10.1126/science.aba7365
 72. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR–Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021;385(6):493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454
 73. Intellia Therapeutics. NTLA-2001 phase III clinical data release. 2024.
 74. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015;519(7544):410–411. DOI: 10.1038/519410a
 75. Baylis F. Altered inheritance: CRISPR and the ethics of human genome editing. *CRISPR J*. 2019;2(4):203–209. DOI: 10.4159/9780674241954
 76. Cornu TI, Mussolino C, Cathomen T. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat Med*. 2017;23(4):415–423. DOI: 10.1038/nm.4313
 77. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015;348(6230):36–38. DOI: 10.1126/science.aab1028
 78. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1726–1737. DOI: 10.1056/NEJMoa1817226
 79. 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;36(8):765–771. DOI: 10.1038/nbt.4192

80. Papathanasiou S, Markoulaki S, Blaine LJ, Leibowitz ML, Zhang CZ, Jaenisch R, et al. Whole chromosome loss and genomic instability in mouse embryos after CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Commun.* 2021;12(1):5855. DOI: 10.1038/s41467-021-26097-y
81. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol.* 2020;10:1387. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387
82. Rehman SU, Abbas GH. CRISPR/CAS9-based gene editing in cancer therapy: A systematic review and meta-analysis on current status and future directions. *Medicine (Baltimore).* 2026;105(2):e47114. DOI: 10.1097/MD.00000000000047114
83. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature.* 2020; 578(7794):229–236. DOI: 10.1038/s41586-020-1978-5
84. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance.* Washington, DC: National Academies Press; 2017. DOI: 10.17226/24623
85. Karagyaur MN, Efimenko AYu, Makarevich PI, Vasiluev PA, Akopyan ZhA, Bryzgalina EV, et al. Ethical and legal aspects of using genome-editing technologies in medicine (review). *Contemporary Technologies in Medicine.* 2019;11(3):117–135. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.16
86. Bredenoord AL, Schneider M, van Delden JJM. Ethical issues in genome editing: CRISPR-Cas9 and beyond. *EMBO Rep.* 2021;22(1):e52018. DOI: 10.15252/embr.202052018
87. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, Carroll D, Charo RA, Charpentier E, et al. CRISPR germline engineering: the community speaks. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):478–486. DOI: 10.1038/nbt.3227
88. Wang H, Lu H, Lei YS, Gong CY, Chen Z, Luan YQ, et al., Development of a Self-Restricting CRISPR-Cas9 System to Reduce Off-Target Effects. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:390–401. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.06.012
89. Xu CL, Ruan MZC, Mahajan VB, Tsang SH. Viral Delivery Systems for CRISPR. *Viruses.* 2019;4;11(1):28. DOI: 10.3390/v11010028.
90. Park SH, Lee CM, Dever DP, Davis TH, Camarena J, Srifa W, et al. Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(15):7955–7972. DOI: 10.1093/nar/gkz475
91. Hoban MD, Cost GJ, Mendel MC, Romero Z, Kaufman ML, Joglekar AV, et al. Correction of the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood.* 2016;127(7):839–848. DOI: 10.1182/blood-2015-11-679381
92. Bischof J, Hierl M, Koller U. Emerging Gene Therapeutics for Epidermolysis Bullosa under Development. *Int J Mol Sci.* 2024;25(4):2243. DOI: 10.3390/ijms25042243

Об авторах

Стамбольский Дмитрий Викторович — к.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел научных программ и инновационных технологий, Университетская клиника, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Захарова Алина Вячеславовна — аспирант, факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Карагяур Максим Николаевич — д.б.н., доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины, старший научный сотрудник Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Authors

Dmitry V. Stambolsky — Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Department of Scientific Programs and Innovative Technologies, University Clinic, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

Alina V. Zakharova — PhD student, Faculty of Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

Maxim N. Karagyaur — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Senior Researcher, Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

Вклад авторов

Д.В. Стамбольский — концепция рукописи, анализ и интерпретирование данных, написание статьи.

А.В. Захарова — анализ и интерпретирование данных, написание статьи.

М.Н. Карагяур — итоговая переработка статьи, иллюстрирование рукописи.

Author contribution statement

Dmitry V. Stambolsky — manuscript concept, data analysis and interpretation, article writing.

Alina V. Zakharova — data analysis and interpretation, article writing.

Maxim N. Karagyaur — article writing, final revision of the article, illustrations.