

Технологии редактирования генома и перспективы их применения в биомедицине

М.Н. Карагяур^{1,2}, А.Л. Примак¹, С.С. Джауари¹, К.Д. Бозов¹, Ю.В. Макусъ¹

¹ Факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Ломоносовский проспект, 27, к. 1, Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Ломоносовский проспект, 27, к. 10, Москва, Россия

Адрес для переписки: m.karagyaour@mail.ru

Аннотация

Технологии редактирования генома и их модификации являются незаменимым инструментом для изучения функций отдельных молекул, получения клеточных линий и животных с заданными свойствами, а также разработки перспективных подходов к терапии не излечимых ранее заболеваний. Данный обзор освещает различные аспекты технологий геномного редактирования: от их биологического значения до принципов функционирования и наиболее перспективных областей применения в фундаментальных и прикладных исследованиях. Особое внимание уделено обсуждению ограничений технологий редактирования генома, а также правовых и этических аспектов их применения для коррекции генома человека. Данный обзор может быть интересен широкому кругу читателей, желающих узнать больше о технологиях редактирования генома и планирующих их практическое применение.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, ZFNs, TALENs, ограничения технологий редактирования генома

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Карагяур М.Н., Примак А.Л., Джауари С.С., Бозов К.Д., Макусъ Ю.В. Технологии редактирования генома и перспективы их применения в биомедицине. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):54–77. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-54-77>

Поступила 18.01.2024

Обработана 14.03.2024

Принята к публикации 20.03.2024

Genome editing technologies and prospects for their use in biomedicine

Maxim N. Karagyaur^{1,2}, Alexandra L. Primak¹, Stalik S. Dzshuari¹, Kirill D. Bozov¹, Yulia V. Makus¹

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119192, Lomonosovsky prospect, 27/1, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, 119192, Lomonosovsky prospect, 27/10, Moscow, Russia

Correspondence address: m.karagyaur@mail.ru

Abstract

Genome editing technologies and their modifications are an indispensable tool for studying the functions of individual molecules, obtaining cell lines and animals with specified properties, and developing promising approaches to the therapy of previously untreatable diseases. This review covers various aspects of genome editing technologies: from their biological significance to the principles of their functioning and the most promising areas of application in basic and applied research. Particular attention is paid to discussing the limitations of genome editing technologies, as well as the legal and ethical aspects of their application to human genome modification. This review may be of interest to a wide range of readers, including researchers wishing to learn more about genome editing technologies and planning their practical application.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, ZFNs, TALENs, limitations of genome editing technologies

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Karagyaur M.N., Primak A.L., Dzshuari S.S., Bozov K.D., Makus Yu.V. Genome editing technologies and prospects for their use in biomedicine. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):54–77. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-54-77>

Received 18.01.2024

Revised 14.03.2024

Accepted 20.03.2024

Список сокращений

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

гРНК — гидовая/направляющая РНК

ГСК — гематопоэтические стволовые клетки

пре-крРНК (pre-crRNA) — пре-криспр-РНК

РГ — редактирование генома

транс-крРНК (tracrRNA) — транс-криспр-РНК

BASU — *Bacillus subtilis* BirA, биотин лигаза *Bacillus subtilis*

BE — Base Editors, редакторы оснований

BER — Base Excision Repair, эксцизионная репарация оснований

CAR — Chimeric Antigen Receptor, химерный антигенный рецептор

CARLIN — CRISPR array repair lineage tracing, Отслеживание клеточной линии с помощью массива CRISPR

CARPID — CRISPR-Assisted RNA-Protein Interaction Detection, обнаружение взаимодействия РНК и белка с помощью CRISPR

Cas9 — CRISPR associated protein 9, CRISPR-ассоциированный белок 9

CCR5 — C-C chemokine receptor type 5, C-C-рецептор хемокина 5

CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы

HDR — Homology-Directed Repair, гомологически направленная репарация

HITI — Homology-Independent Target Integration, направленная интеграция, не зависящая от гомологии

IRES — Internal ribosome entry site, сайт внутренней посадки рибосомы

lncRNA — long non-coding RNA, длинные некодирующие РНК

miRNA — microRNA, микроРНК

MLV — Moloney Murine Leukemia Virus, вирус мышиной лейкемии Молони

MR1 — Major histocompatibility complex class I-related protein, белок, связанный с основным комплексом гистосовместимости I

NER — Nucleotide Excision Repair, эксцизионная репарация нуклеотидов

NHEJ — Non-homologous end joining, нехомологическое соединение концов

PAM — Protospacer Adjacent Motif, последовательность, прилежащая к протоспейсеру

PE — PrimeEditing, праймерное редактирование

Q-dot — Quantum dot, квантовые точки

saRNA — small activating RNA, малые активирующие РНК

siRNA — small interfering RNA, малые интерферирующие РНК

snRNA — small nuclear RNA, малые ядерные РНК

ssODN — single-stranded oligodeoxynucleotide, одноцепочечный олигонуклеотид

TALE — Transcription Activator Like Effectors, эффекторы, подобные транскрипционным факторам

TALENs — Transcription Activator Like Effector Nucleases, нуклеазы на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции

TCR — T-cell receptor, Т-клеточный рецептор

ZFNs — Zinc-Finger Nucleases, нуклеазы с цинковыми пальцами

Введение

Редактирование генома (РГ) представляет собой уникальный инструмент для внесения перманентных (постоянных) направленных изменений в геном организмов, принадлежащих ко всем царствам живого. Согласно современной классификации РГ считается одной из разновидностей генной терапии [1], однако от классических генотерапевтических подходов РГ отличается значительно более широким спектром возможностей применения: от редактирования последовательностей нуклеиновых кислот до управления экспрессией целевых генов, от маркирования целевых локусов до управления эпигеномом и стимуляции хромосомных транслокаций [2]. При этом все изменения активности или структуры целевых молекул

(ДНК, РНК и даже белков) происходят в природном контексте в живой клетке. В то время как классическая генная терапия подразумевает экзогенное введение молекул ДНК или РНК в дополнение к уже существующим и зачастую носит временный характер [3]. Высокая гибкость и достаточно высокая точность делают РГ незаменимым инструментом для изучения роли отдельных молекул в процессах функционирования клеток и в патогенезе отдельных заболеваний, а также открывают перспективу для терапевтической коррекции целого ряда тяжелых наследственных патологий.

Эволюция технологий редактирования генома

Истоки редактирования генома лежат в изучении механизмов гомологичной рекомбинации и поиске факторов, увеличивающих ее

эффективность. Гомологичная рекомбинация с конца 1980-х годов использовалась как биологический механизм, позволяющий осуществлять генетические манипуляции с клетками и получать первые породы генетически модифицированных животных [4–6]. В основе гомологичной рекомбинации лежит способность молекул ДНК обмениваться участками, обладающими определенной степенью гомологии [7]. Эффективность спонтанной рекомбинации была крайне низка, и вероятность ее возникновения составляла 1/1 000 000. Было установлено, что двуцепочечные разрывы ДНК, возникающие неподалеку от целевого гена, увеличивают вероятность гомологичной рекомбинации в 1000 раз [8, 9]. Это привело к пониманию, что нужно искать инструменты, способные вносить разрывы в нужные локусы ДНК. Первыми с этой целью стали применять мегануклеазы (рис. 1), например I-Cre, I-SceI, PI-PfuI и др. — разновидность эндонуклеаз рестрикции вирусного и микробного происхождения, способных распознавать протяженные и зачастую уникальные ДНК-последовательности (длиной 14–40 нуклеотидов) [10, 11]. Таким образом, мегануклеазы можно считать первым поколением технологий РГ. Впрочем, высокая специфичность и обусловленная этим практическая невозможность нацелить их в нужную область генома ограничили их распространение и применение. Попытки целенаправленно менять их специфичность с помощью мутагенеза оказались трудоемкими и ожидаемых результатов не дали.

Первыми истинно программируемыми нуклеазами стали Zinc-Finger Nucleases (ZFNs, или Нуклеазы с цинковыми пальцами) и Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALENs, или Нуклеазы на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции) (рис. 1), состоящие из ДНК-распознающего и нуклеазного домена [12]. ДНК-распознающий домен ZFNs и TALENs является модульным (составным) и включает в себя от 3–6 (ZFNs) до 14–20 (TALENs) субдоменов. Каждый из субдоменов ДНК-распознающего домена ZFNs представляет собой так называемый «цинковый палец» (входит в состав ДНК-связывающих белков, в т.ч. транскрипционных факторов), состоит из ~ 30 аминокислот и способен распознавать уникальный триплет [13]. Существует по меньшей мере 64 варианта таких модулей для сборки ДНК-связывающего домена ZFNs (по числу возможных триплетов).

Субдомены ДНК-распознающего домена TALENs, в свою очередь, были позаимствованы у микроорганизмов рода *Xanthomonas* (паразитов сельскохозяйственных растений), которые с целью облегчения инфицирования растений вводят в цитоплазму растительных клеток специальные белки — эффекторы, подобные активаторам транскрипции, или Transcription Activator Like Effectors (TALEs), что приводит к нарушениям транскрипции ряда защитных генов (MtN3/saliva/SWEET и др.) и компрометации защитных механизмов растений [14]. Каждый из субдоменов TALEs или TALENs состоит из ~ 34 аминокислот и способен распознавать один из дезоксирибонуклеотидов (А, Т, G или С) в составе ДНК. Существует по меньшей мере 4 варианта таких модулей для сборки ДНК-связывающего домена TALENs (по числу природных дезоксирибонуклеотидов). Комбинируя модули в ДНК-распознающих доменах ZFNs и TALENs, можно их нацеливать (программировать) на распознавание практически любых последовательностей ДНК.

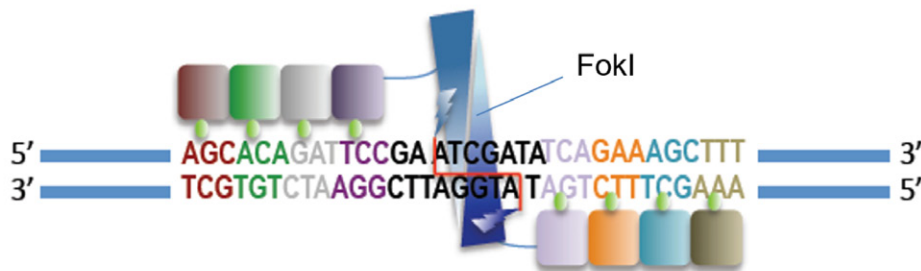
Нуклеазная активность ZFNs и TALENs реализуется благодаря входящему в их состав нуклеазному домену из эндонуклеазы рестрикции (чаще всего FokI) [15]. Такой нуклеазный домен должен удовлетворять двум основным требованиям: отсутствие специфичности к какой-то конкретной нуклеотидной последовательности и реализация нуклеазной активности строго вследствие димеризации. Комбинирование нуклеазного домена с программируемым ДНК-распознающим доменом ZFNs или TALENs позволяет не только наводить их в определенную область генома, но и вносить двуцепочечный разрыв в ДНК в локус по желанию. Для эффективного и специфичного разрезания ZFNs и TALENs программируются на участки противоположных цепей с обеспечением дистанции между ними в 13–18 нуклеотидов (рис. 1), что позволяет FokI-нуклеазному домену димеризоваться, активироваться и внести двуцепочечный разрыв. Последствия такого разрыва и его роль в редактировании генома будут рассмотрены ниже.

Основными недостатками ZFNs и TALENs являются трудоемкость сборки ДНК-распознающего домена из отдельных модулей и способность таких модулей «интерферировать» друг с другом, изменяя и снижая специфичность результирующего ДНК-распознающего домена [16]. Более

Мегануклеазы



Нуклеазы с цинковыми пальцами (Zinc-Finger Nucleases, ZFN)



Нуклеазы на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции (Transcription Activator Like Effector Nucleases, TALENs)

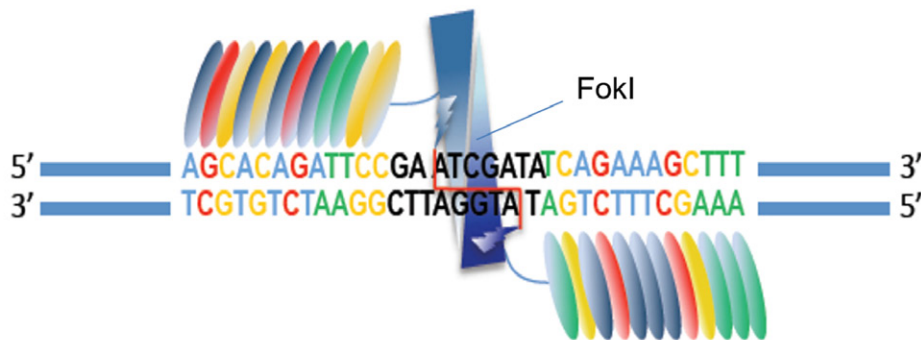


Рис. 1. Основные разновидности систем редактирования генома до появления CRISPR/Cas

тонкая адаптация такого ДНК-распознающего домена к целевой последовательности ДНК осуществляется с помощью методов направленного мутагенеза, фагового дисплея и направленной эволюции. Все это делает использование ZFNs и TALENs дорогим, трудоемким и времязатратным.

Основным конкурентом ZFNs и TALENs в РГ стала технология CRISPR/Cas, играющая роль адаптивного противовирусного иммунитета в бактериях и археях [17]. В основе технологии CRISPR/Cas лежит комплекс инвариантного белка-эндонуклеазы и короткой вариационной направляющей РНК, выполняющей функцию наведения эндонуклеазы в нужную область генома. Простота и дешевизна синтеза соответствующих направляющих РНК без необходимости

менять свойства самой эндонуклеазы (в противоположность мегануклеазам, ZFNs и TALENs) дают возможность быстро менять специфичность рибонуклеопротеиновых комплексов, а также позволяют одновременно осуществлять редактирование сразу по множеству целевых локусов в одной или разных клетках. Благодаря этим свойствам технология CRISPR/Cas приобрела широкое распространение как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях [18, 19]. Ее природный потенциал был дополнительно мультиплицирован созданием колоссального количества модификаций, позволяющих реализовывать самые смелые задумки и мечты ученых и клиницистов. В 2020 году исследователи Jennifer Anne Doudna и Emmanuelle Charpentier, работы которых [20] легли в основу применения системы CRISPR/Cas

для РГ, получили Нобелевскую премию по химии с формулировкой «за развитие методов геномного редактирования» («for the development of a method for genome editing»).

Биологическое значение системы редактирования генома CRISPR/Cas9

История CRISPR/Cas начинается в 1987 году, когда в бактериальной хромосоме *Escherichia coli* впервые были идентифицированы палиндромные повторы, расположенные с определенным интервалом и сгруппированные в кластер, получившие название CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [21]. Тогда их функциональное значение и роль в биологии бактериальной клетки понять не смогли. Позже CRISPR-локусы были идентифицированы у более чем 80% археев и 40% бактерий, в том числе и клинически значимых микроорганизмов, таких как *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*. Анализ CRISPR-локусов показал, что в их состав входят последовательности, соответствующие фрагментам ДНК бактериофагов, плазмид и ряда других паразитических генетических элементов, причем бактериальные клетки, несущие такие последовательности, оказались устойчивы к инфицированию соответствующими бактериофагами и плазмидами [17, 22]. Совокупность этих фактов позволила предположить, что CRISPR-локус является частью адаптивной иммунной системы бактерий и архей, что и было подтверждено экспериментально. Позже были установлены и другие участники функционирования данной системы — белки Cas (CRISPR-associated proteins или белки, ассоциированные с CRISPR), а также принципы и механизмы функционирования этой системы.

В составе самого CRISPR-локуса бактерий выделяют CRISPR-массив, который подобно каталогу хранит информацию о перенесенных инфекциях и служит материальной основой для синтеза РНК-инструкций для CRISPR-интерференции, а также гены Cas-белков, обеспечивающих функционирование всей системы CRISPR/Cas. CRISPR-локус встроен в бактериальную хромосому, что обеспечивает передачу устойчивости к паразитическим генетическим элементам и потомкам данной бактериальной клетки.

Для того чтобы лучше понять номенклатуру системы CRISPR/Cas и принципы ее работы, необходимо ввести несколько терминов. Если взглянуть

на структуру CRISPR-локуса и попытаться понять логику первых его исследователей, то можно заметить, что наибольшее внимание в структуре CRISPR-локуса они уделяли именно палиндромным повторяющимся последовательностям (по их именованию система CRISPR и получила свое название). И это неспроста, поскольку существовало множество примеров их биологической значимости: так, палиндромные последовательности в ДНК являются участками хромосомной нестабильности, а в структуре РНК они необходимы для процессинга тРНК и микроРНК, инициации обратной транскрипции и трансляции по IRES-зависимому механизму и т.д. [23, 24]. Последовательности ДНК, разделяющие такие палиндромные последовательности, получили название спейсеров. Когда стало понятно, что спейсеры представляют собой фрагменты генетического материала паразитических элементов, то соответствующие им последовательности в геноме таких паразитов (в том числе являющиеся мишенью при CRISPR-интерференции) получили название «протоспейсеры» (т.е. предспейсеры). Важную роль в регуляции активности системы CRISPR/Cas в ходе CRISPR-интерференции играет последовательность из 2–6 нуклеотидов, прилегающая к протоспейсеру с 3' или 5' конца (protospacer adjacent motif или PAM-последовательность) [25]. Ее биологическое значение будет рассмотрено ниже.

В работе системы CRISPR/Cas в бактериальной клетке можно выделить три основных этапа (рис. 2): первый — распознавание, захват и интеграция в CRISPR-локус чужеродного генетического элемента (протоспейсера), второй — экспрессия компонентов системы CRISPR/Cas, третий — CRISPR-интерференция, т.е. CRISPR/Cas-опосредованное расщепление целевых генетических элементов [17, 25]. Достоверно механизмы захвата протоспейсеров из чужеродных (паразитических) генетических элементов на сегодняшний день не установлены, но считается, что такими сигналами могут служить свободные концы ДНК (бактериофаги), множественные разрывы ДНК и «репликация по типу катящегося кольца». Дополнительными факторами, способствующими дифференциации генома паразитического элемента от кольцевого генома бактерий (бактериальной хромосомы) с последующим захватом из первого протоспейсера, являются концентрационное преобладание таких паразитических элементов над бактериальной хромосомой (большое количество копий плазмиды

или генома бактериофага на 1 бактериальную клетку), а также отсутствие (или нерегулярная встречаемость) в них Chi сайтов, характерных для данного микроорганизма (например, 5'-GCTGGTGGN₄₋₇-3' — для *Escherichia coli*). Chi сайт в геноме бактерий является областью связывания фермента RecBCD, обладающего хеликазной и нуклеазной активностью и играющего в бактериях ключевую роль в процессах репликации, рекомбинации и репарации ДНК (т.е. играет ключевую роль в поддержании стабильности геномной ДНК бактерий) [26, 27]. В процессах распознавания и вырезания протоспейсеров зачастую принимают участие ферменты-эффекторы CRISPR-интерференции (например, Cas9 *Streptococcus pyogenes*), что позволяет обеспечить более специфичное распознавание и эффективное расщепление таких протоспейсеров в составе генома паразита при последующих инфицированиях [28].

При встрече с новым бактериофагом шансов у бактерии выжить не так много, но они значительно увеличиваются, если заражение происходит низким титром бактериофага либо он мутантен (снижена вирулентность и/или репликация) или CRISPR-массив содержит направляющие РНК к протоспейсерам родственных вирусов (т.е. направляющие РНК, по крайней мере, частично способны распознавать протоспейсеры паразита). «Выздоровевшая» бактерия добавляет в свой CRISPR-массив новые протоспейсеры и не только сама приобретает устойчивость к данному вирусу/плазмиде, но и передает этот иммунитет своему потомству. Молекулярные механизмы встраивания новых протоспейсеров могут включать, как прямую интеграцию в соответствующую область CRISPR-массива (для двуцепочечных ДНК-протоспейсеров), так и копирование в CRISPR-массив с участием обратных транскриптаз (для РНК-протоспейсеров). Подробнее

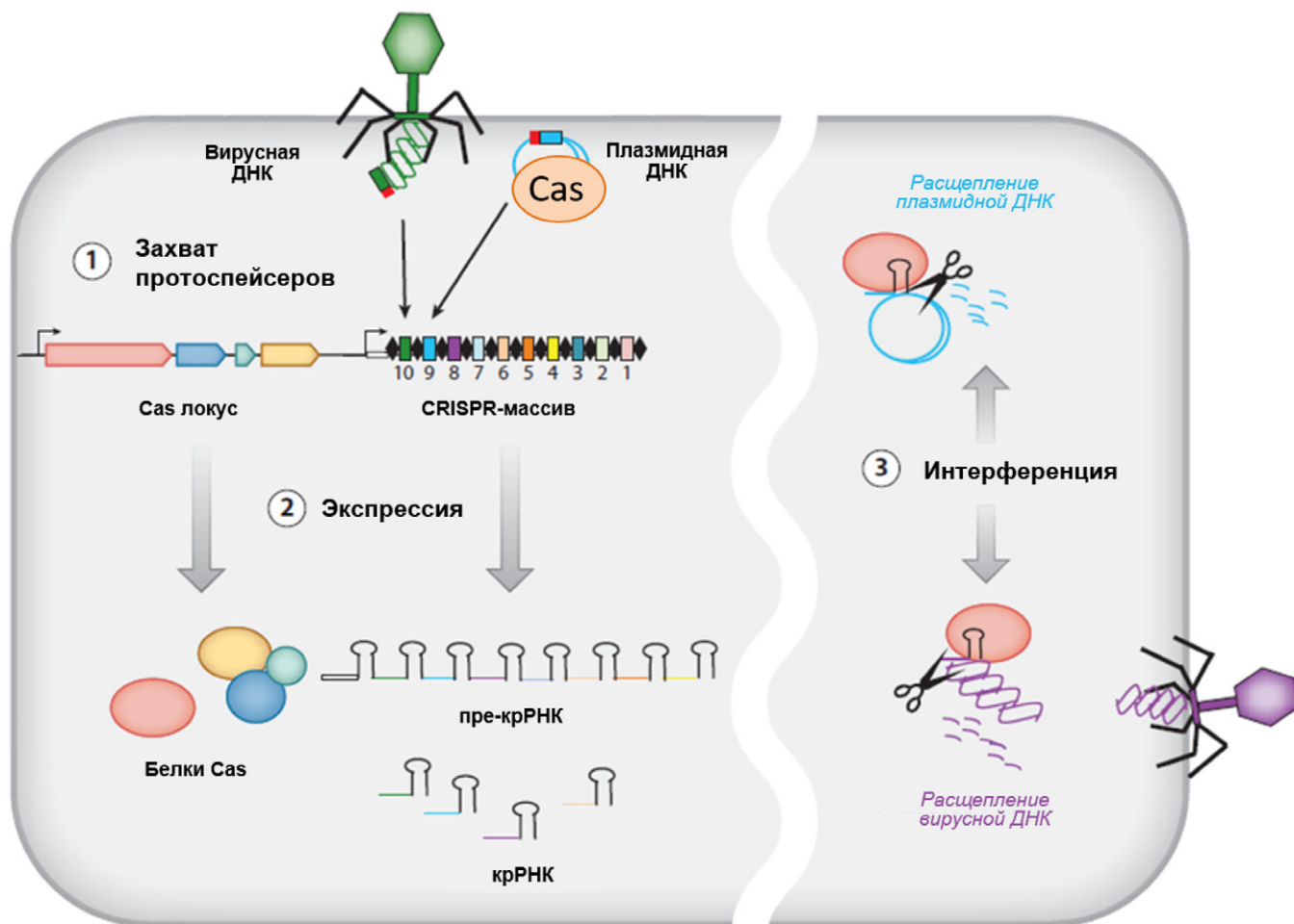


Рис. 2. Принципиальная схема функционирования системы адаптивного иммунитета CRISPR/Cas в бактериальной клетке [11 с модиф.]

с механизмами захвата и интеграции протоспейсеров в геном бактерий можно ознакомиться в следующем обзоре [29].

Вторым этапом в реализации CRISPR/Cas-опосредованной иммунной защиты в бактериальной клетке является экспрессия CRISPR-массива (в виде единой пре-крПНК (pre-crRNA)) и связанных с ним Cas белков. Синтезированная пре-крПНК процессируется с образованием отдельных крПНК, которые потом загружаются в эффекторную нуклеазу или комплекс белков, выполняющих такую функцию (например, система Cascade в *Escherichia coli*) [30]. В ряде случаев молекулы нуклеазы-эффектора (например, Cas9 из *Streptococcus pyogenes* или Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium*) связываются с пре-крПНК еще до ее созревания с последующим процессингом такого мультимолекулярного комплекса и образованием отдельных рибонуклеопротеинов, опосредующих CRISPR-интерференцию. Взаимодействие крПНК с нуклеазой осуществляется напрямую (Cpf1) или посредством вспомогательной транс-крПНК (tracrRNA), как у Cas9 из *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*. Образование рибонуклеопротеинового комплекса стабилизирует крПНК и активирует нуклеазу для распознавания ДНК-мишени. Характер экспрессии CRISPR-локуса (конститутивный или индуцируемый) в большинстве организмов пока не ясен, но для некоторых микроорганизмов (*Sulfolobus solfataricus*) был продемонстрирован конститутивный (постоянный) характер его экспрессии вне зависимости от фаговой инвазии [31].

Образовавшиеся рибонуклеопротеиновые комплексы идентифицируют комплементарные им протоспейсеры в составе паразитического генетического элемента и расщепляют его. Механизмы распознавания протоспейсера и расщепления целевой нуклеиновой кислоты несколько различаются в разных типах системы CRISPR/Cas. Мы рассмотрим механизм CRISPR-интерференции на примере наиболее изученного варианта CRISPR/Cas из *Streptococcus pyogenes*. Распознавание протоспейсера начинается со скольжения рибонуклеопротеинового комплекса Cas*крПНК*тракрПНК вдоль молекулы ДНК. Рибонуклеопротеиновый комплекс «сканирует» последовательность ДНК на наличие ПАМ (последовательности, прилежащей к протоспейсеру). Ее распознавание опосредовано аминокислотными остатками нуклеазы, и, соответственно, последовательность целевой

ПАМ определяется свойствами самой нуклеазы (5'NGG — у нуклеазы Cas9 от *Streptococcus pyogenes*, 5'NNNRRT — у Cas9 от *Staphylococcus aureus*, 5'TTTTV — у Cpf1 от *Acidaminococcus sp.* и *Lachnospiraceae sp.* и т.д.) и не зависит от последовательности крПНК [25, 32].

После обнаружения ПАМ рибонуклеопротеиновый комплекс останавливается в этой области, вызывает локальное расплетение цепей ДНК (проявляет хеликазную активность) и пытается внедрить в локально разделенные цепи ДНК последовательность крПНК. Если наблюдается высокая комплементарность крПНК к данному участку ДНК, то спейсер крПНК вытесняет соответствующую цепь ДНК из дуплекса (и она дополнительно стабилизируется положительно заряженными аминокислотами, входящими в состав молекулы нуклеазы) и образуется комплекс ДНК*крПНК*тракрПНК*Cas9, что приводит к активации нуклеазных доменов Cas9 и внесению двуцепочечного разрыва в ДНК. В случае недостаточной комплементарности комплекс диссоциирует и Cas9 продолжает сканирование. Таким образом, для расщепления целевой ДНК необходимо строгое соблюдение трех условий в указанной последовательности: связывание крПНК*тракрПНК с Cas (что приводит к активации домена, распознающего ПАМ), обнаружение ПАМ (что приводит к диссоциации цепей), высокая степень комплементарности крПНК (>90%) к выбранному локусу ДНК (что приводит к активации нуклеазных доменов нуклеазы и расщеплению ДНК) [33].

Необходимость соблюдения всех этих условий обеспечивает высокую специфичность системы CRISPR/Cas и защищает бактерий от ауторасщепления хромосомной ДНК. Ведь, по сути, спейсер крПНК закодирован в геноме бактерий и представляет собой идеально комплементарную мишень для распознавания комплексом крПНК*тракрПНК*Cas9, содержащим такую же крПНК. Ключевую роль в дифференциации хромосомной ДНК бактерии и ДНК паразитического элемента на этапе CRISPR-интерференции играет ПАМ-последовательность: в хромосомной ДНК она отсутствует в непосредственной близости от спейсера в составе CRISPR-массива, в то время как в целевой ДНК генетического паразита протоспейсер и ПАМ со-локализованы, что «разрешает» активацию нуклеазных доменов Cas9 и расщепление ДНК паразита. Расщепление ДНК разрушает целостность генов паразита

и открывает доступ экзонуклеазам, которые завершают разрушение паразитической ДНК. Нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophiles* генерируют перекрывающиеся, так называемые тупые концы ДНК в месте разрыва, а Cpf1 от *Acidaminococcus sp.* и *Lachnospiraceae sp.* — 5'-выступающие концы [34], «липкие». Согласно последним исследованиям, комплекс крПНК*тракрПНК*Cas9 после расщепления мишени способен реактивироваться и продолжить сканирование новых подходящих PAM [35].

Благодаря исследованиям микробиологических сообществ было идентифицировано 6 типов и более 30 подтипов различных систем CRISPR/Cas [36]. Их классификация базируется на особенностях захвата протоспейсера, процессинга пре-крПНК, количестве участников в эффекторном комплексе, целевой молекулы нуклеиновой кислоты, характеристиках PAM и типе расщепления протоспейсера в паразитическом элементе. Неожиданной находкой оказалось обнаружение систем CRISPR/Cas одного и того же типа в эволюционно далеких микроорганизмах и наличие нескольких систем разного типа в одной клетке. Все это свидетельствует об активном горизонтальном переносе генетической информации в микромире [37].

Применение системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома в биомедицине

На основании данных о прецизионной нуклеазной активности системы CRISPR/Cas в ходе CRISPR-интерференции было предложено задействовать ее для внесения прецизионных

разрывов в геномную ДНК эукариотических организмов, в т.ч. и человека [20, 38, 39]. Однако это потребовало ряда ее оптимизаций, поскольку исходно система бактериального иммунитета CRISPR/Cas была оптимизирована миллионами лет эволюции для работы в бактериальных клетках в условиях небольшого генома и предназначалась лишь для деградации целевой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

Для адаптации молекулы нуклеазы к работе в эукариотической клетке к ней был прикреплен сигнал ядерной локализации, чтобы доставить ее к месту основного хранения наследственной информации (в ядро). Использование генетических конструкций, кодирующих редакторы генома, потребовало оптимизации кодонного состава их генов — с целью увеличения эффективности трансляции белков генетических редакторов в эволюционно далеких гетерологичных системах (клетки млекопитающих и других эукариот по отношению к клеткам бактерий).

Также в целях удобства для одной из самых популярных и первых предложенных CRISPR/Cas систем — Cas9 от *Streptococcus pyogenes* (или SpCas9) было произведено объединение молекул крПНК*тракрПНК в единую синтетическую молекулу РНК (гидовая/направляющая РНК, гРНК или guide RNA, gRNA), которая, как было показано, служит практически равноценной заменой комплекса крПНК*тракрПНК [40]. Такая оптимизированная система CRISPR/Cas может быть использована для редактирования генома эукариотических клеток (рис. 3). Следует также отметить, что природная

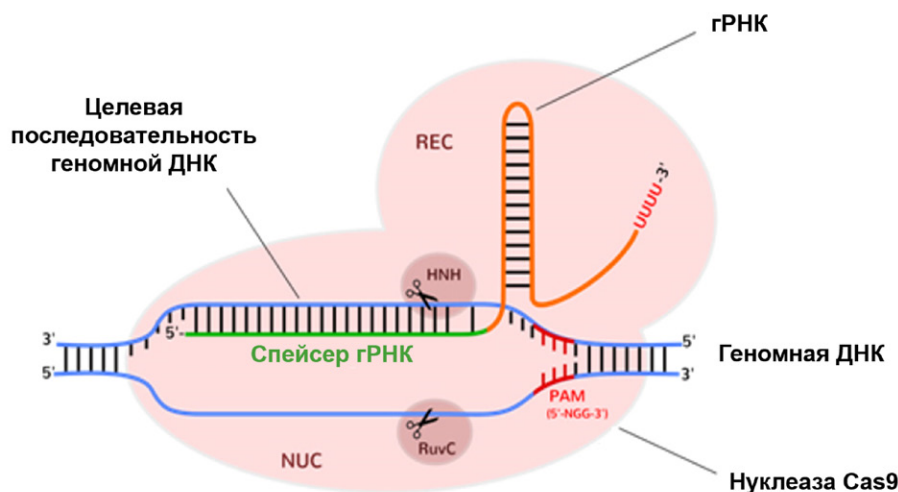


Рис. 3. Принципиальная схема функционирования системы CRISPR/Cas9 в эукариотической клетке

способность нуклеазы распознавать определенную РАМ-последовательность может быть изменена посредством генетической модификации РАМ-распознающего домена, что увеличивает гибкость системы CRISPR/Cas и расширяет спектр возможных областей для наведения [41]. Возможны и дополнительные модификации нуклеаз с выключением одного или всех нуклеазных доменов, в результате чего получают нуклеазу (фермент, расщепляющий одну из цепей ДНК и генерирующий так называемый ник — одноцепочечный разрыв) [42] или каталитически неактивную молекулу нуклеазы, которая, впрочем, по-прежнему сохраняет способность специфично связываться с заданными протоспейсерами.

Одной из основных задач для системы CRISPR/Cas в эукариотических клетках является внесение прицельного (направленного) разрыва в интересующий локус ДНК. Дальнейший исход такого разрыва определяется работой систем репарации геномной ДНК, причем было установлено, что в зависимости от типа разрыва могут задействоваться различные системы репарации. Наиболее оперативно активируемой и наименее требовательной является система негомологического соединения концов NHEJ (Non-Homologous End Joining), которая в течение 1–5 часов (по разным данным) с точностью 95% восстанавливает исходную последовательность ДНК конец-в-конец [43]. Именно ее высокая активность и точность защищают стабильность генетического материала и делают сложную многоклеточную жизнь возможной.

Согласно некоторым исследованиям единоментно в каждой из клеток высших эукариот присутствует до 40 двуцепочечных разрывов ДНК, которые образуются в результате репликации, транскрипции, повреждения ионизирующим излучением или химическими агентами, в том числе активными формами кислорода [44]. И все эти разрывы должны быть точно и оперативно репарированы для предотвращения мутаций и утраты частей генома, что и выполняет NHEJ. Впрочем, ~ в 5% случаев возможна утрата или встраивание небольшого количества нуклеотидов, что при разрыве в кодирующей области генома с большой долей вероятности может привести к сдвигу рамки считывания и выключению синтеза целевого белка. Именно на эту небольшую вероятность ошибки и нацелена данная разновидность системы CRISPR/Cas: нуклеаза распознает и разрезает ДНК в этом локусе

снова и снова, пока не произойдет накопление ошибки, а сайт расщепления станет нераспознаваемым. Это может быть использовано как в исследовательских целях (выключение белков с целью изучения их функции — см. далее), так и для коррекции ряда наследственных заболеваний, для которых характерна продукция мутантной токсической формы природного белка (к примеру, транстиретиновый амилоидоз, амавроз Лебера и др.) [45, 46].

Одним из ярких примеров клинического применения CRISPR/Cas с доказанной эффективностью является редактирование гена *CCR5* в аутологичных гематopoэтических стволовых клетках (ГСК) ВИЧ-инфицированных пациентов. Данный подход является одним из способов выработки резистентности к ВИЧ в аутологичных ГСК и их производных. В его основе лежит искусственное получение описанной ранее мутации *delta32* гена *CCR5* (делеция 32 нуклеотидов), которая приводит к утрате N-конца *CCR5* (служит ко-рецептором для инвазии ВИЧ-1) и при гомозиготном состоянии ассоциирована с резистентностью к инфицированию ВИЧ-1 [47]. Ранее трансплантация костного мозга от совместимых доноров с мутацией *CCR5 delta32* ВИЧ-инфицированным была предложена Gero Hütter и с успехом проведена ВИЧ-инфицированному Timothy Brown. В этом случае результат превзошел все ожидания, и проведенная терапия позволяет пациенту жить полноценной жизнью даже в отсутствие антиретровирусной терапии с 2007 года [48, 49]. Несмотря на успех, этот подход удалось реализовать всего несколько раз — и в большинстве случаев трансплантация такого костного мозга заканчивалась отторжением трансплантата или развитием реакции «трансплантат против хозяина». Ввиду этого концепция претерпела изменения, и в качестве более предпочтительного стал рассматриваться подход, предполагающий редактирование аутологичных ГСК, для чего с успехом применяются различные системы РГ, в том числе CRISPR/Cas [50].

Системы РГ потенциально могут решить и основные проблемы трансплантологии: доступности и совместимости донорского материала, а также ряд этических и правовых проблем, связанных с трансплантологией. Так, в 2017 году George Church совместно с Quihan Biotech (<https://www.qiahanbio.com/>) заявил о создании породы свиней — универсальных доноров, в которых

были исключены эндогенные ретровирусы свиней (>60), а также ряд генов, ответственных за распознавание донорских тканей системой комплемента реципиента [51]. Сердца от таких геномодифицированных свиней были успешно трансплантированы приматам, с которыми они прожили от полугода до 2 лет [52]. В 2021–2022 годах было произведено две трансплантации органов (почка и сердце) от таких свиней человеку: женщине в состоянии клинической смерти и мужчине (David Bennett) с неоперабельной кардиомиопатией. После трансплантации с сердцем свиньи David Bennett прожил 2 месяца, и данное исследование показало, что сердце свиньи способно успешно функционировать в организме человека, однако одним из основных механизмов дисфункции ксенотрансплантированного сердца по-прежнему является иммунологическое отторжение [53]. Полученные данные будут использованы для дальнейшей генетической модификации и оптимизации ранее полученной породы свиней-доноров.

Благодаря своей способности вносить прецизионный двуцепочечный разрыв в ДНК и индуцировать сдвиг рамки считывания система CRISPR/Cas удобна в проведении фундаментальных исследований. Одним из вариантов ее применения является CRISPR-скрининг, который позволяет одновременно осуществлять редактирование в широком спектре генов с целью установления их функции в том или ином изучаемом процессе. Для этого используют не одну направляющую РНК, а целую их библиотеку, каждая из которых нацелена на конкретную мишень (ген белка или микроРНК) [54, 55]. Существует большое разнообразие таких библиотек гРНК, направленных как на все потенциальные белок-кодирующие гены, так и на некую совокупность генов, вовлеченных в реализацию конкретной биологической функции, например миграцию, пролиферацию или дифференцировку клеток, активацию конкретного сигнального каскада, репарацию ДНК и т.п. Клетки, обработанные библиотекой векторов, несущих гРНК, клонируются (рассаживаются по одному), наращиваются, и затем оценивается сохранность или утрата в них интересующей функции (<https://www.genscript.com/CRISPR-gRNA-library.html?src=pullmenu>). Для ответивших клонов устанавливаются последовательности задействованных в геномном редактировании гРНК, что позволяет сделать вывод об участии тех или иных генов в исследуемых процессах.

Одним из основных объектов исследования для CRISPR-скрининга являются опухолевые клетки. Исследования на них позволили не только подтвердить существующие мишени для противоопухолевых препаратов, но и открыть новые белки-мишени, критически важные для выживания опухолевых клеток. Яркому примеру успешного применения технологии CRISPR-скрининга можно отнести идентификацию мишени (белок MR1) для универсального химерного антигенного рецептора (CAR, chimeric antigen receptor), опосредующего лизис широкого спектра опухолевых клеток и предполагаемого к использованию в составе CAR T-лимфоцитов для терапии широкого спектра онкологических заболеваний [56]. Потенциал данной технологии ограничен использованием легко модифицируемых клеток, способных к росту в условиях клонирования.

Помимо этого, данная модификация системы CRISPR/Cas, встроенная в геном мыши под контроль индуцируемого промотора, может быть использована для изучения судьбы клеток в процессах эмбриогенеза, регенерации и обновления тканей. Суть технологии, которая получила наименование CARLIN (CRISPR array repair lineage tracing), заключается в пульс-индукции экспрессии геномного редактора и модификации ряда локусов геномной ДНК с получением специфичного паттерна (картины) редактирования для каждой из клеток [57]. Уникальность паттернов редактирования для каждой из отредактированных клеток обусловлена работой систем репарации, возможностью их ошибки и случайной интеграцией/делецией нуклеотидов в ряде аллелей. Все это дает возможность отслеживать судьбу потомков отредактированной клетки *in vivo* в ходе процессов дифференцировки, дедифференцировки и трансдифференцировки, что дает мощный инструмент для изучения клеточных механизмов эмбриогенеза, регенерации и обновления тканей.

Для вырезания регуляторных и некодирующих областей генома, а также генов некодирующих РНК, для которых вставка, делеция или замена нескольких нуклеотидов не является критичной, может быть применено единомоментное использование двух рибонуклеопротеиновых комплексов, нацеленных на два различных протоспейсера, фланкирующих (прилежащих снаружи) фрагмент ДНК (до 1 млн нуклеотидов),

подлежащий удалению. Важным условием применения данной модификации CRISPR/Cas является создание высоких пиковых концентраций генетического редактора — в противном случае расщепление ДНК по целевым протоспейсерам будет происходить независимо, в различные моменты времени, и делеции искомого фрагмента не произойдет. Другим возможным исходом такого редактирования является инверсия вырезаемого фрагмента.

Технологию CRISPR/Cas можно использовать не только для внесения мутаций, сдвига рамки считывания и вырезания фрагментов ДНК. Она может быть задействована для встраивания последовательностей ДНК в целевой локус. Для этого помимо самих комплексов Cas9*гРНК требуется внесение в клетку (ядро клетки) ДНК-матрицы. Что касается систем репарации, то для интеграции ДНК-матрицы в геном могут быть задействованы как NHEJ, так и HDR (Homology-Directed Repair, гомологически направленной репарации). NHEJ способен встроить любую внесенную ДНК-матрицу прямо в область разрыва (без учета какой-либо гомологии); для этого матрица должна быть двуцепочечной и не очень длинной, чтобы была возможность создать ее достаточно высокую концентрацию в ядре и в области повреждения, однако использование NHEJ может привести к встраиванию ДНК-фрагмента в обратной ориентации или к единомоментному встраиванию сразу нескольких копий ДНК-фрагмента. Модификацией данного подхода является технология HITI (homology-independent target integration). Подробнее с принципом ее функционирования, возможностями и ограничениями можно ознакомиться в работе [58].

Система репарации HDR работает по другому принципу: она задействует гомологию между ДНК-последовательностями. В этом случае одна из цепей поврежденной ДНК устанавливает комплементарные взаимодействия с ДНК-матрицей, и в случае высокой гомологии этих последовательностей ДНК-матрица выполняет роль основы (а поврежденная цепь ДНК выступает в роли ДНК-затравки/прайма) для копирования и последующего встраивания в область разрыва [59]. Как понятно из описания, ключевыми для такого типа репарации являются особым образом спроектированные ДНК-матрицы, в которых область для копирования расположена в центре и с двух сторон окружена последо-

вательностями, идентичными или в высокой степени гомологичными целевой области редактирования.

При таком типе репарации в качестве ДНК-матрицы могут быть задействованы кольцевые и линейные молекулы ДНК (плазмидная ДНК, ПЦР-ампикон, одноцепочечная ДНК (ssODN, single-stranded oligodeoxynucleotides)), в том числе гомологичная хромосома. Данный тип репарации позволяет исправлять практически любые мутации и вставлять ДНК в любой локус генома по желанию, что может быть использовано как в исследовательских целях, так и с целью коррекции наследственных патологий.

Впрочем, этот подход характеризуется целым рядом недостатков, ограничивающих его широкое распространение. Среди них необходимость в ДНК-матрице, активность в строго определенных фазы клеточного цикла (S-, G2-фазы) и меньшая оперативность по сравнению с NHEJ, в результате чего в большинстве исследований эффективность HDR не превышала 1–7%. Для преодоления этих ограничений и увеличения активности HDR был предложен ряд экспериментальных подходов: ингибирование активности компонентов NHEJ, синхронизация доставки геномного редактора и ДНК-матрицы в область редактирования, а также синхронизация клеточного цикла в клетках (с остановкой в G2-фазе клеточного цикла) — в результате эффективность HDR удалось поднять до 12–18% [60, 61].

Гомологически направленная репарация, индуцированная системами РГ, может быть использована как один из способов создания экспериментальных моделей, а также как подход к терапии ряда заболеваний. Одним из примеров, где CRISPR/Cas-индуцированный HDR уже доказал свою эффективность как перспективный терапевтический подход, является создание Т-лимфоцитов, несущих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR) к клеткам опухолей. Полученные таким образом CAR Т-лимфоциты по своим свойствам значительно превосходят таковые, полученные посредством трансдукции ретровирусным или лентивирусным вектором. HDR позволяет прицельно интегрировать ген CAR в локус Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR), под контроль промотора гена TRAC, что обеспечивает физиологический уровень экспрессии

антиген-распознающего рецептора [62]. Все это снижает гиперактивацию Т-лимфоцитов и обеспечивает их более продолжительную выживаемость и функционирование, в противоположность тому, что наблюдается при случайной интеграции (по количеству копий и области встраивания) ретровирусного и лентивирусного генома в геном Т-лимфоцитов, когда ген CAR гиперэкспрессирован и коэкспрессирован с TCR, что приводит к гиперактивации Т-лимфоцитов, цитокиновому шторму, функциональному истощению и быстрой гибели таких CAR Т-лимфоцитов. Наиболее оправданным подходом для генетической модификации клеток пациента является модификация *ex vivo* с последующей ретрансплантацией полученных клеток ввиду сложности доставки ДНК-матрицы и относительно низкой эффективности самого HDR.

Для редакторов, осуществляющих двуцепочечный разрыв ДНК, характерен ряд существенных недостатков, таких как умеренная активность и возможность утраты или инверсии части хромосомы, а также индукция хромосомных транслокаций [63, 64]. Невысокая редактирующая активность таких нуклеаз на самом деле обусловлена высокой эффективностью систем репарации ДНК, в частности NHEJ. Что касается индукции хромосомных мутаций, предполагают, что это может быть обусловлено временной и пространственной солокализацией спонтанно возникающих разрывов с разрывами, вносимыми самими нуклеазами. Также было показано, что изредка одноцепочечный разрыв (ник) ДНК может конвертироваться в двуцепочечный, а следовательно, применение ника также сопряжено с риском хромосомных мутаций, хотя и в меньшей степени. Справедливости ради, следует отметить, что такие же недостатки характерны для ZFNs и TALENs, поскольку обусловлены не свойствами нуклеаз, а особенностями организации и функционирования генома.

Параллельно с поиском вариантов применения природной нуклеазной активности геномных редакторов развивалось и понимание того, что они могут быть не только эффекторами, разрезающими ДНК, но и платформой (посредниками) для прицельной доставки в нужную область генома других эффекторных молекул, и выбор таких молекул может быть ограничен только фантазией разработчика. Здесь мы рассмотрим наиболее интересные и перспективные из них.

В 2017 году впервые было предложено модифицировать последовательность ДНК без внесения в нее разрывов: David Liu предложил присоединить к молекуле Cas9 молекулы цитозин- и адениндезаминаз — ферментов, катализирующих гидролиз 4-аминогруппы цитозина и 6-аминогруппы аденина соответственно [65]. Такая разновидность модификаций CRISPR/Cas получила название редакторов азотистых оснований (Base Editors, BE). Для лучшего понимания принципов их функционирования необходимо обратиться к рассмотрению структуры геномной ДНК*гРНК*Cas9. гРНК распознает протоспейсер и по принципу комплементарности связывает одну из цепей ДНК, формируя дуплекс РНК*ДНК.

Вторая цепь ДНК в то же время локально представляет собой одноцепочечную ДНК, которая и может быть атакована дезаминазами. Дезаминазы вызывают конверсию аденина в инозин (в ходе репликации и транскрипции интерпретируется как гуанин), а цитозина — в дезоксиуридил (интерпретируется как тимин). Таким образом, редакторы оснований позволяют осуществлять замены А->Г и С->Т, что может быть использовано для моделирования или исправления ряда точечных мутаций или выключения целевого гена. Для реализации последней задачи необходимо наличие в протоспейсере целевого гена кодонов CAA, CAG, CGA или TGG, причем они должны располагаться в диапазоне 3–7 нуклеотидов протоспейсера (для SpCas9-BE), а сам протоспейсер должен быть уникален. В этом случае происходит конверсия кодонов, кодирующих аминокислоты, в стоп-кодоны: CAA -> TAA, CAG -> TAG, CGA -> TGA, TGG -> TAA/TAG/TGA, что приводит к преждевременной терминации трансляции и нокауту целевого гена. Направленность действия дезаминаз (активность в определенном окне редактирования) определяется длиной полипептидного линкера, связывающего нуклеазу и дезаминазу. В области деаминирования возникает локальная некомплементарность нуклеотидов, которая детектируется системами репарации ДНК (в основном, Nucleotide Excision Repair, NER или Base Excision Repair, BER) и в 50% случаев репарируется с образованием исходной последовательности. Для смещения равновесия в сторону репарации немодифицированной цепи и сохранности модифицированного основания в немодифицированную цепь дополнительно вносят одноцепочечный разрыв (с помощью нуклеазы-никазы),

что интерпретируется системами репарации как сигнал к ее исправлению.

Преимуществом редакторов оснований является их высокая эффективность (по нашим данным вероятность модификации составляет более 60%), а также отсутствие необходимости внесения двуцепочечного разрыва, что снижает вероятность нежелательных последствий геномного редактирования (хромосомные делеции и транслокации). Ввиду этого редакторы оснований нашли широкое применение в проведении исследований и считаются одним из наиболее перспективных и безопасных инструментов для коррекции моногенных наследственных патологий.

У редакторов оснований есть и недостатки: используемые дезаминазы являются конститутивно активными и не требуют связывания с протоспейсером — в результате они способны вызывать неспецифическое деаминирование одноцепочечных ДНК и РНК [66]. Впрочем, с помощью методов генной инженерии удалось значительно снизить активность редакторов оснований в отношении одноцепочечной РНК при сохранении их активности в отношении ДНК [67]. Другим недостатком ВЕ является неспособность дифференцировать целевое азотистое основание в «окне редактирования»: если встречаются несколько поддающихся деаминированию оснований, то с высокой долей вероятности все они будут деаминированы (отредактированы). Этот недостаток ВЕ пока преодолеть не удалось, но его можно обойти использованием альтернативных систем редактирования, например PrimeEditing (PE).

Метод редактирования PE был представлен в 2019 году David Liu [68]. В его основе лежит использование гибридной молекулы нуклеазы (SpCas9) и обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Комбинированный фермент SpCas9-MMLV за счет низкой активности надрезает вытесненную цепь ДНК, а затем за счет активности MMLV достраивает ее с внесением или делецией заданных нуклеотидов, при этом 3'-конец вытесненной цепи ДНК выполняет роль затравки (праймера), а роль РНК-матрицы выполняет 3'-фрагмент гРНК. Технология PE позволяет осуществлять вставки в область разрезания до 40 нуклеотидов и делеции до 80 нуклеотидов. Согласно сообщениям разработчиков исходная версия PE обладала активностью <5%,

однако после ряда модификаций его эффективность была увеличена до 20–30%. Побочным эффектом PE являются инсерции и делеции нескольких нуклеотидов в области редактирования — таких аллелей <10% [69].

Помимо непосредственного изменения нуклеотидной последовательности системы CRISPR/Cas позволяют прицельно управлять активностью отдельных генов, как напрямую — через привлечение или блокирование связывания транскрипционного комплекса, так и опосредованно — через эпигенетические модификации ДНК и гистонов. Для этих задач был разработан широкий спектр инструментов, построенных по одному и тому же принципу: каталитически неактивная нуклеаза выполняет навигационную функцию и доставляет эффекторные субъединицы (активатор/ингибитор сборки транскрипционного комплекса, метилазы, деметилазы, ацетилазы и деацетилазы) в интересующую область генома (чаще всего в промоторную область гена). Ввиду того что область связывания транскрипционных факторов и эпигенетических модификаций не является строго локализованной, эффективное применение данного класса инструментов требует их наведения на несколько разных протоспейсеров в интересующей области [70, 71]. Аналогичным образом осуществляют мечение интересующих ДНК-локусов с целью трехмерного картирования генома — для этого используют гибридные молекулы каталитически неактивной нуклеазы и флуоресцентных меток (флуоресцентные белки или Q-dots) [72].

Существует еще ряд CRISPR/Cas-опосредованных методов, которые могут быть использованы в научных исследованиях (индукция хромосомных транслокаций [73], XiST-опосредованная инактивация отдельных хромосом [74], детекция специфических нуклеотидных последовательностей (SHERLOCK) [75] и т.п.).

Несколько особняком от описанных вариантов использования технологий РГ стоит технология CARPID (CRISPR-Assisted RNA-Protein Interaction Detection), поскольку она осуществляет модификацию не нуклеиновых кислот, а связанных с ними белков [76]. В основе данного инструмента лежит гибридная молекула каталитически неактивной РНК-специфичной нуклеазы RfxCas13d и биотин-лигазы BASU. RfxCas13d посредством кРНК направляется в интересующую область РНК, а BASU лигирует биотин

к аминокислотным остаткам РНК-связывающих белков в этой области. Такие биотинилированные белки могут быть экстрагированы для последующей идентификации и изучения.

Из приведенного выше описания возможных областей применения CRISPR/Cas становится понятен потенциал данной технологии РГ и то, что ряд ее прорывных модификаций (к примеру, использование никаз, CRISPR-скрининг и PE) было бы невозможно реализовать на базе ZFNs и TALENs.

Технические, этические и правовые ограничения применения технологий редактирования генома в биомедицине

Общим недостатком для всех описанных модификаций технологии CRISPR/Cas является возможность распознавания нецелевых протоспейсеров — так называемых off-targets, причем структура молекулы SpCas9, согласно опубликованным данным, допускает активацию нуклеазных доменов даже в случае некомплементарности между гРНК и целевым протоспейсером от 2 до 10 нуклеотидов, а также 1- или 2-нуклеотидного выпячивания ДНК или РНК. Для большинства случаев считается, что несовпадение 2–3 нуклеотидов, в особенности расположенных близко к РАМ, радикально снижает или препятствует активации нуклеазных доменов SpCas9. Склонность к связыванию с выраженно некомплементарными мишенями во многом определяется нуклеотидной последовательностью самого протоспейсера, однако четких закономерностей установлено не было, что не позволяет *in silico* идентифицировать и отбраковывать такие гРНК [77].

Был разработан ряд биоинформатических инструментов, позволяющих предсказывать специфичность выбранных протоспейсеров гРНК, однако их мощность ограничена идентификацией потенциальных сайтов связывания гРНК, отличающихся несовпадением от исходного протоспейсера до 3 нуклеотидов и 1- или 2-нуклеотидным выпячиванием ДНК или РНК в дуплексе ДНК*РНК [78]. Такая некомплементарность между гРНК и протоспейсером вносит наиболее значимый вклад в нецелевое редактирование с использованием нуклеаз, расщепляющих 2 цепи ДНК, поскольку двуцепочечный разрыв (даже в нецелевой области) запускает механизм репарации NHEJ, что может привести к вставке/делеции нуклеотидов и сдвигу

рамки считывания в кодирующей области гена. На точность систем парных никаз, BE, PE и CRISPR/Cas-опосредованной регуляции активности генов такие off-target, в большинстве, не оказывают влияния, поскольку реализация их активности требует выполнения строгих дополнительных условий: парное расположение никаз на противоположных цепях на дистанции 40–80 нуклеотидов (система парных никаз), наличие подходящих нуклеотидов в окне редактирования и в кодирующей области гена (для BE), комплементарность 3'-концов ДНК и РНК (для PE), со-локализация сразу нескольких протоспейсеров в одном локусе (для систем CRISPR/Cas-опосредованной регуляции активности генов).

Поскольку предсказать все потенциальные сайты связывания гРНК не представляется возможным, то применяют альтернативные подходы. Так, для коррекции наследственных патологий рекомендуется осуществлять редактирование аутологичных клеток (гематопозитических стволовых клеток, фибробластов кожи, кератиноцитов) *ex vivo* с последующим полногеномным секвенированием (с целью детекции возможного нецелевого редактирования) и ретрансплантацией полученных клеток. Использование технологий редактирования генома *in situ* (в организме человека) оправдано лишь при жизнеугрожающих состояниях, что обусловлено описанными выше недостатками технологий РГ. В этом случае по возможности рекомендуется использовать редакторы, не вносящие двуцепочечных разрывов ДНК: никазы, BE, PE, редакторы эпигенома.

Для уменьшения вклада неспецифического редактирования генома в результаты фундаментальных исследований рекомендуется параллельное использование двух и более гРНК для выключения целевого гена. Результаты исследований, полученные для каждой из таких отредактированных клеточных линий, сопоставляются и совпадающие эффекты считаются специфическим результатом редактирования, а расходящиеся обычно интерпретируются как возможные исходы побочного нецелевого редактирования [79]. Такая логика обусловлена тем, что даже если у используемых гРНК есть альтернативные сайты распознавания в геноме, то вероятность их пересечения в одном и том же локусе (кроме целевого) равна нулю.

Полногеномное исследование отредактированных клеточных линий также является возможным способом контроля специфичности геномного редактирования в эксперименте, однако используется крайне редко ввиду своей высокой стоимости. Согласно данным литературы, вероятность нецелевого редактирования также можно снизить, ограничив время работы систем редактирования, в связи с чем разрабатывают системы индуцируемой экспрессии редакторов и временного контроля их существования [80–82]. В ряде исследований было показано, что долговременная активность систем РГ CRISPR/Cas9 в клетке (более 2 недель) может приводить к накоплению сайтов нецелевого редактирования [82, 83].

Что касается вариантов доставки систем РГ в целевые клетки, то редакторы генома могут быть доставлены в виде готовых рибонуклеотидных комплексов или в виде кодирующих их ДНК или РНК. Каждый из этих вариантов имеет свои особенности: рибонуклеотидные комплексы и РНК менее стабильны, чем ДНК, однако они являются единственным возможным вариантом для редактирования генома зигот с целью получения генетически модифицированных линий экспериментальных животных, поскольку транскрипция в зиготе и первых дочерних бластомерах подавлена. Для доставки систем РГ и их компонентов в целевые клетки применяют практически все известные способы генетической модификации: липофекция, электропорация, оптопорация, механическая трансфекция (трансфекция кристаллами фосфата кальция, золотыми наночастицами и т.п.), вирусная трансдукция, трансфекция рибонуклеопротеиновыми комплексами, конъюгированными с мембрано-пенетрирующими пептидами, и прямая инъекция компонентов систем РГ в клетку или ее ядро [79, 84].

Подтверждать редактирование генома необходимо с помощью минимум двух различных подходов: секвенирование ДНК в области редактирования и анализ уровня и/или качества отредактированного белка (или некодирующей РНК, если производилось редактирование гена некодирующей РНК) [79]. Следует отметить, что контроль уровня соответствующей мРНК после редактирования (нокаутирования) белкового гена не является значимым показателем успешности редактирования, потому что возможны различные варианты ее

изменения (зависит от конкретного гена, типа клеток и характера редактирования): отсутствие изменений (при этом трансляция белка нарушена за счет сдвига рамки считывания или введения стоп-кодона), снижение ее количества за счет активации механизма Non-sense-mediated mRNA decay или увеличение ее экспрессии в случае активации механизмов отрицательной обратной связи (попытка клетки компенсировать недостаток отредактированного белка) [85].

Следует помнить, что системы редактирования генома, несмотря на свой высокий потенциал, не являются панацеей (как для клинического применения, так и при проведении фундаментальных исследований) и в ряде случаев могут быть с успехом заменены методами классической генной терапии (экспрессией трансгена), использованием некодирующих РНК (микроРНК (miRNA), малые интерферирующие РНК (siRNA), малые активирующие РНК (saRNA), малые ядерные РНК (snRNA), длинные некодирующие РНК (lncRNA), и т.д.), селективными химическими ингибиторами и пр.

Из всего приведенного выше понятно, что системы РГ — мощный инструмент в фундаментальных исследованиях, но одной из самых долгожданных областей их практического применения для человечества является терапевтическая коррекция наследственных заболеваний и создание лекарственных препаратов для ряда других патологий (инфекции, опухолевые заболевания). По описанным выше причинам (нецелевое редактирование, возможность хромосомных мутаций и т.п.) большинство проводимых доклинических и клинических исследований предполагает проведение редактирования генома аутологичных или аллогенных клеток *ex vivo* с последующей их ретрансплантацией после подтверждения соответствия всем протоколам фармакологической безопасности. По данной схеме проводятся исследования для геномной коррекции следующих типов клеток: гематопозитические стволовые клетки (для лечения метахроматической лейкодистрофии, синдрома Вискотта — Олдрича, различных анемий, тяжелого Х-сцепленного комбинированного иммунодефицита, а также выработки резистентности клеток крови к ВИЧ) [50, 86], фибробласты и кератиноциты (буллезный эпидермолиз) [87], альвеолоциты (муковисцидоз) [88].

В ряде случаев, при прогрессирующих заболеваниях, сопряженных с высоким риском для жизни, или невозможности извлечения редактируемого органа, возможно проведение РГ прямо в организме пациента, при этом должны быть учтены и сопоставлены все возможные преимущества и недостатки такого подхода. Такой подход к генетической коррекции патологий планируется использовать для лечения заболеваний центральной нервной системы (хорея Гентингтона, моногенные нейродегенеративные и демиелинизирующие заболевания), патологий сетчатки (амавроз Лебера, пигментный ретинит, возрастная макулярная дегенерация), заболеваний печени (транстиретиновый амилоидоз, наследственная гиперхолестеринемия, гипераммониемия, гемофилии, инфекционные гепатиты), патологии мышечной ткани (миодистрофии) [45, 46, 89, 90].

По данным ресурса ClinicalTrials.gov, на момент написания данной статьи зарегистрировано 60 клинических исследований на различных стадиях для лекарственных кандидатов на основе CRISPR/Cas9, 8 — для лекарственных кандидатов на основе TALENs и 23 — на основе ZFNs. Абсолютное большинство таких лекарственных кандидатов предназначено для редактирования генома *ex vivo*, и лишь некоторые нацелены на редактирование генома *in situ* для коррекции транстиретинового амилоидоза (NCT04601051), гемофилии Б (NCT06379789), наследственного ангионевротического отека (NCT05120830), пигментного ретинита (NCT05805007) или амавроза Лебера (NCT03872479).

В конце 2023 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США выдало регистрационное удостоверение для первого препарата Casgevy (exagamglogene autotemcel), основанного на технологии CRISPR/Cas9, для *ex vivo* редактирования гена *BCL11A* в аутологичных гематопоэтических стволовых клетках при серповидно-клеточной анемии и бета-талассемии (<https://www.casgevy.com/>).

С точки зрения законодательной регуляции применение технологий РГ в соматических тканях *in situ* в РФ и множестве зарубежных стран приравнивается к генной терапии / классической фармакотерапии и является разрешенным подходом при условиях тщательной оценки эффективности и безопасности таких лекарствен-

ных препаратов. При этом применение клеток с отредактированным геномом (в том числе аутологичных), несмотря на их предположительно большую безопасность (при условиях временного контроля работы систем РГ, последующего полногеномного секвенирования отредактированных клеток и введения пациенту преддифференцированных или дифференцированных клеток) вызывает у фармацевтических регуляторов больше опасений, чем *in situ* применение технологий РГ, и в ряде стран (в том числе в РФ) находится под достаточно жестким контролем. Подробнее с основными законодательными нормами, регулирующими клиническое применение технологий РГ, можно ознакомиться в соответствующих обзорных работах [91–93].

Говоря о вопросах этики и законодательной регуляции технологий редактирования генома, нельзя обойти вопрос внесения наследуемых изменений в геном человека. С одной стороны, внесение таких изменений позволяет осуществлять профилактику генетических заболеваний и изучать ранние этапы эмбриогенеза человека. Но, с другой стороны, сопряжено с риском нецелевого редактирования, мозаицизмом генетического профиля и снижения стабильности генома индивидуума, а также чревато злоупотреблениями с целью «улучшения/ухудшения породы» человека с последующим усугублением социального неравенства и формированием кастового общества — эти вполне обоснованные опасения нашли отражения в ряде художественных произведений, таких как «Дивный новый мир», «Гаттака» и др.

В 2017 году мир потрясло сообщение о том, что в Китае были рождены девочки-близнецы Лулу и Нана с отредактированным геном CCR5. Китайские исследователи (He Jiankui и коллеги), осуществившие такое редактирование, мотивировали это необходимостью создания у близнецов иммунитета к ВИЧ [94]. В 2019 году они были приговорены к тюремному заключению от 1,5 до 3 лет и штрафу от 500 тыс. до 3 млн юаней с формулировкой «за осуществление медицинской деятельности без лицензии». Исследования последствий такого редактирования, проведенные в 2019 г., показали, что «ни у Лулу, ни у Наны не было желаемой делеции из 32 пар оснований в гене CCR5 и каждый эмбрион вместо этого экспрессировал варианты различной длины. Ранее не было показано, что эти новые мутации предотвращают ВИЧ-инфекцию — наоборот, они могут

быть вредоносными. Некоторые данные He Jiankui также предполагают наличие как отредактированных, так и неотредактированных клеток (мозаицизм), а также не исключают нецелевых эффектов редактирования, которые могут вызывать другие непредвиденные изменения в геноме» [64, 95–98] или привести к отсроченным нежелательным последствиям [99].

Таким образом, с точки зрения большинства специалистов в области генетики и редактирования генома наследуемое редактирование генома в настоящий момент несет больше рисков для человечества, чем положительных моментов. Возможные позитивные стороны наследуемого редактирования генома уже сейчас могут быть с успехом заменены альтернативными технологиями: донорством гамет, технологиями экстракорпорального оплодотворения и предимплантационного скрининга или проведением работ на эмбрионах животных (в исследовательских целях). По состоянию на 2020 год абсолютное большинство стран запрещает генетическую модификацию эмбриональных стволовых клеток, гамет и зигот человека с целью репродукции [100]. Фундаментальные исследования, предполагающие генетическую модификацию эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, гамет и зигот человека с последующим получением генетически модифицированного эмбриона, допустимы при условиях бесспорной аргументации в пользу их необходимости, соблюдения всех этических и правовых норм и культивирования таких эмбрионов в течение не более 14 дней, после чего эти эмбрионы должны быть заморожены или уничтожены [92, 101].

Технологии редактирования генома активно развиваются и используются в Российской Федерации в основном для получения клеточных и животных моделей с целью изучения механизмов развития заболеваний и поиска перспективных подходов к их терапии. Накопленный опыт

отечественных исследователей изложен в уникальных специализированных сборниках «Редактирование генов и геномов» [102] и «Методы редактирования генов и геномов» [103], которые не только подробным образом освещают теоретические вопросы геномного редактирования, но и содержат практические рекомендации по редактированию генома широкого спектра модельных объектов (от прокариот до млекопитающих).

Заключение

Технологии редактирования генома представляют собой мощный многофункциональный инструмент, который потенциально может помочь исследователям лучше понять принципы функционирования живых систем, установить причины и механизмы развития заболеваний и, в перспективе, разработать подходы к терапии ранее не излечимых заболеваний. Несмотря на колоссальный потенциал, технологии РГ обладают рядом технических ограничений (ограниченная специфичность и эффективность, возможность индукции хромосомных aberrаций), а их применение сопряжено с риском внесения нецелевых модификаций ДНК, этическими и правовыми рисками. Все это обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования технологий РГ, разумного и ответственного их применения, а также выработку протоколов общественного и международного контроля над использованием и распространением таких технологий, в особенности при работах по модификации геномов патогенных вирусов и микроорганизмов и работах по наследуемому редактированию генома человека.

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-30007), <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Funding: The study was funded by the Russian Science Foundation № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Литература

1. Landhuis E. The definition of gene therapy has changed. Scientific American. 2021. <https://www.scientificamerican.com/article/the-definition-of-gene-therapy-has-changed/>
2. Tao J, Bauer DE, Chiarle R. Assessing and advancing the safety of CRISPR-Cas tools: from DNA to RNA editing. Nat Commun. 2023;14(1):212. DOI: 10.1038/s41467-023-35886-6
3. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. Gene. 2013;525(2):162–169. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.137

4. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(23):9065–9069. DOI: 10.1073/pnas.83.23.9065
5. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*. 1986;323(6087):445–448. DOI: 10.1038/323445a0
6. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288–1292. DOI: 10.1126/science.2660260
7. Haber JE. Exploring the pathways of homologous recombination. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4(3):401–412. DOI: 10.1016/0955-0674(92)90005-w
8. Rosenberg SM, Hastings PJ. The split-end model for homologous recombination at double-strand breaks and at Chi. *Biochimie*. 1991;73(4):385–397. DOI: 10.1016/0300-9084(91)90105-a
9. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 2018;293(27):10524–10535. DOI: 10.1074/jbc.TM118.000372
10. Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, Pinto D, El Marjou F, Babinet C, et al. I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 1998;18(3):1444–1448. DOI: 10.1128/MCB.18.3.1444
11. Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, et al. A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(11):2952–2962. DOI: 10.1093/nar/gkg375
12. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397–405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
13. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011;188(4):773–782. DOI: 10.1534/genetics.111.131433
14. Gupta PK, Balyan HS, Gautam T. SWEET genes and TAL effectors for disease resistance in plants: Present status and future prospects. *Mol Plant Pathol*. 2021;22(8):1014–1026. DOI: 10.1111/mpp.13075
15. Kaczorowski T, Skowron P, Podhajska AJ. Purification and characterization of the FokI restriction endonuclease. *Gene*. 1989;80(2):209–216. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90285-0
16. Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *J Mol Biol*. 2016;428(5 Pt B):963–989. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.10.014
17. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:273–297. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430
18. Liu G, Lin Q, Jin S, Gao C. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Mol Cell*. 2022;82(2):333–347. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.002
19. Bharathkumar N, Sunil A, Meera P, Aksah S, Kannan M, Saravanan KM, Anand T. CRISPR/Cas-Based Modifications for Therapeutic Applications: A Review. *Mol Biotechnol*. 2022;64(4):355–372. DOI: 10.1007/s12033-021-00422-8
20. 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
21. 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;169:5429–5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
22. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60:174–182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3
23. Svetec Miklenić M, Svetec IK. Palindromes in DNA-A Risk for Genome Stability and Implications in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):2840. DOI: 10.3390/ijms22062840
24. Svoboda P, Di Cara A. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(7–8):901–908. DOI: 10.1007/s00018-005-5558-5

25. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505–529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822
26. Levy A, Goren MG, Yosef I, Auster O, Manor M, Amitai G, et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature.* 2015;520(7548):505–510. DOI: 10.1038/nature14302
27. Aviram N, Thornal AN, Zeevi D, Marraffini LA. Different modes of spacer acquisition by the *Staphylococcus epidermidis* type III-A CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(3):1661–1672. DOI: 10.1093/nar/gkab1299
28. Heler R, Wright AV, Vucelja M, Bikard D, Doudna JA, Marraffini LA. Mutations in Cas9 Enhance the Rate of Acquisition of Viral Spacer Sequences during the CRISPR-Cas Immune Response. *Mol Cell.* 2017;65(1):168–175. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.11.031
29. McGinn J, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(1):7–12. DOI: 10.1038/s41579-018-0071-7
30. Westra ER, Nilges B, van Erp PB, van der Oost J, Dame RT, Brouns SJ. Cascade-mediated binding and bending of negatively supercoiled DNA. *RNA Biol.* 2012;9(9):1134–1138. DOI: 10.4161/rna.21410
31. Deng L, Kenchappa CS, Peng X, She Q, Garrett RA. Modulation of CRISPR locus transcription by the repeat-binding protein Cbp1 in *Sulfolobus*. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(6):2470–2480. DOI: 10.1093/nar/gkr1111
32. Leenay RT, Maksimchuk KR, Slotkowski RA, Agrawal RN, Gomaa AA, Briner AE, et al. Identifying and Visualizing Functional PAM Diversity across CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell.* 2016;62(1):137–147. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.031
33. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature.* 2014;513(7519):569–573. DOI: 10.1038/nature13579
34. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038
35. Yourik P, Fuchs RT, Mabuchi M, Curcuru JL, Robb GB. *Staphylococcus aureus* Cas9 is a multiple-turnover enzyme. *RNA.* 2019;25(1):35–44. DOI: 10.1261/rna.067355.118
36. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67–83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
37. Carte J, Christopher RT, Smith JT, Olson S, Barrangou R, Moineau S, et al. The three major types of CRISPR-Cas systems function independently in CRISPR RNA biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Mol Microbiol.* 2014;93(1):98–112. DOI: 10.1111/mmi.12644
38. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143
39. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823–826. DOI: 10.1126/science.1232033
40. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife.* 2013;2:e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471
41. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* 2015; 523(7561):481–485. DOI: 10.1038/nature14592
42. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013;154(6):1380–1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021
43. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48
44. Yan WX, Mirzazadeh R, Garnerone S, Scott D, Schneider MW, Kallas T, et al. BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks. *Nat Commun.* 2017;8:15058. DOI: 10.1038/ncomms15058

45. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*. 2019;25(2):229–233. DOI: 10.1038/s41591-018-0327-9
46. 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
47. Nguyễn GT, Carrington M, Beeler JA, Dean M, Aledort LM, Blatt PM, et al. Phenotypic expressions of CCR5-delta32/delta32 homozygosity. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;22(1):75–82. DOI: 10.1097/00042560-199909010-00010
48. Brown TR. I am the Berlin patient: a personal reflection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(1):2–3. DOI: 10.1089/AID.2014.0224
49. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692–698. DOI: 10.1056/NEJMoa0802905
50. Cannon P, June C. Chemokine receptor 5 knockout strategies. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6(1):74–79. DOI: 10.1097/COH.0b013e32834122d7
51. 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
52. <https://www.technologyreview.com/2019/06/12/239014/crispr-pig-organs-are-being-implanted-in-monkeys-to-see-if-theyre-safe-for-humans/>
53. Kuehn BM. First Pig-to-Human Heart Transplant Marks a Milestone in Xenotransplantation. *Circulation*. 2022;145(25):1870–1871. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.060418
54. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014;343(6166):84–87. DOI: 10.1126/science.1247005
55. Kurata JS, Lin RJ. MicroRNA-focused CRISPR-Cas9 library screen reveals fitness-associated miRNAs. *RNA*. 2018;24(7):966–981. DOI: 10.1261/rna.066282.118
56. Crowther MD, Dolton G, Legut M, Caillaud ME, Lloyd A, Attaf M, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. *Nat Immunol*. 2020;21(2):178–185. DOI: 10.1038/s41590-019-0578-8
57. Bowling S, Sritharan D, Osorio FG, Nguyen M, Cheung P, Rodriguez-Fraticelli A, et al. An Engineered CRISPR-Cas9 Mouse Line for Simultaneous Readout of Lineage Histories and Gene Expression Profiles in Single Cells. *Cell*. 2020;181(6):1410–1422.e27. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.048
58. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. 2016;540(7631):144–149. DOI: 10.1038/nature20565
59. Haber JE. DNA Repair: The Search for Homology. *Bioessays*. 2018;40(5):e1700229. DOI: 10.1002/bies.201700229
60. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, Ma W. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet*. 2019;9:691. DOI: 10.3389/fgene.2018.00691
61. Carlson-Stevermer J, Abdeen AA, Kohlenberg L, Goedland M, Molugu K, Lou M, Saha K. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat Commun*. 2017;8(1):1711. DOI: 10.1038/s41467-017-01875-9
62. Perales MA, Kebriaei P, Kean LS, Sadelain M. Building a Safer and Faster CAR: Seatbelts, Airbags, and CRISPR. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(1):27–31. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.10.017
63. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1143157. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1143157
64. Liu M, Zhang W, Xin C, Yin J, Shang Y, Ai C, et al. Global detection of DNA repair outcomes induced by CRISPR-Cas9. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(15):8732–8742. DOI: 10.1093/nar/gkab686

65. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464–471. DOI: 10.1038/nature24644
66. Zuo E, Sun Y, Wei W, Yuan T, Ying W, Sun H, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science*. 2019;364(6437):289–292. DOI: 10.1126/science.aav9973
67. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*. 2018;36(9):843–846. DOI: 10.1038/nbt.4172
68. 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
69. Chen PJ, Liu DR. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nat Rev Genet*. 2023;24(3):161–177. DOI: 10.1038/s41576-022-00541-1
70. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 2014;159(3):647–661. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029
71. Nuñez JK, Chen J, Pommier GC, Cogan JZ, Replogle JM, Adriaens C, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*. 2021;184(9):2503–2519.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.025
72. Wu X, Mao S, Ying Y, Krueger CJ, Chen AK. Progress and Challenges for Live-cell Imaging of Genomic Loci Using CRISPR-based Platforms. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019;17(2):119–128. DOI: 10.1016/j.gpb.2018.10.001
73. Lekontsev S, Aligianni S, Lapao A, Bürckstümmer T. Efficient generation and reversal of chromosomal translocations using CRISPR/Cas technology. *BMC Genomics*. 2016;17(1):739. DOI: 10.1186/s12864-016-3084-5
74. Yue M, Ogawa Y. CRISPR/Cas9-mediated modulation of splicing efficiency reveals short splicing isoform of Xist RNA is sufficient to induce X-chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(5):e26. DOI: 10.1093/nar/gkx1227
75. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*. 2019;14(10):2986–3012. DOI: 10.1038/s41596-019-0210-2
76. Yi W, Li J, Zhu X, Wang X, Fan L, Sun W, et al. CRISPR-assisted detection of RNA-protein interactions in living cells. *Nat Methods*. 2020;17(7):685–688. DOI: 10.1038/s41592-020-0866-0
77. Fu R, He W, Dou J, Villarreal OD, Bedford E, Wang H, et al. Systematic decomposition of sequence determinants governing CRISPR/Cas9 specificity. *Nat Commun*. 2022;13(1):474. DOI: 10.1038/s41467-022-28028-x
78. Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID: A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(12):e214. DOI: 10.1038/mtna.2014.64
79. Karagyaur MN, Rubtsov YP, Vasiliev PA, Tkachuk VA. Practical Recommendations for Improving Efficiency and Accuracy of the CRISPR/Cas9 Genome Editing System. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(6):629–642. DOI: 10.1134/S0006297918060020
80. Zhang J, Chen L, Zhang J, Wang Y. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1171–1177. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.07.015
81. Senturk S, Shirole NH, Nowak DG, Corbo V, Pal D, Vaughan A, et al. Rapid and tunable method to temporally control gene editing based on conditional Cas9 stabilization. *Nat Commun*. 2017;8:14370. DOI: 10.1038/ncomms14370
82. Xia E, Duan R, Shi F, Seigel KE, Grasemann H, Hu J. Overcoming the Undesirable CRISPR-Cas9 Expression in Gene Correction. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;13:699–709. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.10.015
83. Kim D, Luk K, Wolfe SA, Kim JS. Evaluating and Enhancing Target Specificity of Gene-Editing Nucleases and Deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2019;88:191–220. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111730

84. Ghaemi A, Bagheri E, Abnous K, Taghdisi SM, Ramezani M, Alibolandi M. CRISPR-cas9 genome editing delivery systems for targeted cancer therapy. *Life Sci.* 2021;267:118969. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118969
85. Lindeboom RGH, Vermeulen M, Lehner B, Supek F. The impact of nonsense-mediated mRNA decay on genetic disease, gene editing and cancer immunotherapy. *Nat Genet.* 2019;51(11):1645–1651. DOI: 10.1038/s41588-019-0517-5
86. Koniali L, Lederer CW, Kleanthous M. Therapy Development by Genome Editing of Hematopoietic Stem Cells. *Cells.* 2021;10(6):1492. DOI: 10.3390/cells10061492
87. Smits JPH, Meesters LD, Maste BGW, Zhou H, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH. CRISPR-Cas9-Based Genomic Engineering in Keratinocytes: From Technology to Application. *JID Innov.* 2021;2(2):100082. DOI: 10.1016/j.xjidi.2021.100082
88. Marangi M, Pistrutto G. Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR Technique. *Front Pharmacol.* 2018;9:396. DOI: 10.3389/fphar.2018.00396
89. Harmatz P, Prada CE, Burton BK, Lau H, Kessler CM, Cao L, et al. First-in-human in vivo genome editing via AAV-zinc-finger nucleases for mucopolysaccharidosis I/II and hemophilia B. *Mol Ther.* 2022;30(12):3587–3600. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.10.010
90. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu Rev Med.* 2019;70:239–255. DOI: 10.1146/annurev-med-081117-010451
91. Boggio A, Knoppers BM, Almqvist J, Romano CPR. The Human Right to Science and the Regulation of Human Germline Engineering. *CRISPR J.* 2019;2:134–142. DOI: 10.1089/crispr.2018.0053
92. Karagyaur MN, Efimenko AYU, Makarevich PI, Vasiluev PA, Akopyan ZhA, Bryzgali-na EV, Tkachuk VA. Ethical and Legal Aspects of Using Genome Editing Technologies in Medicine (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2019;11(3):117. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.16
93. Shinwari ZK, Tanveer F, Khalil AT. Ethical Issues Regarding CRISPR Mediated Genome Editing. *Curr Issues Mol Biol.* 2018;26:103–110. DOI: 10.21775/cimb.026.103
94. Greely HT. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. *J Law Biosci.* 2019;6(1):111–183. DOI: 10.1093/jlb/lisz010
95. Raposo VL. The First Chinese Edited Babies: A Leap of Faith in Science. *JBRA Assist Reprod.* 2019;23(3):197–199. DOI: 10.5935/1518-0557.20190042
96. Cancellieri S, Zeng J, Lin LY, Tognon M, Nguyen MA, Lin J, et al. Human genetic diversity alters off-target outcomes of therapeutic gene editing. *Nat Genet.* 2023;55(1):34–43. DOI: 10.1038/s41588-022-01257-y
97. Nahmad AD, Reuveni E, Goldschmidt E, Tenne T, Liberman M, Horovitz-Fried M, et al. Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR-Cas9 cleavage. *Nat Biotechnol.* 2022;40(12):1807–1813. DOI: 10.1038/s41587-022-01377-0
98. Höijer I, Emmanouilidou A, Östlund R, van Schendel R, Bozorgpana S, Tijsterman M, et al. CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites in vivo that segregate across generations. *Nat Commun.* 2022;13(1):627. DOI: 10.1038/s41467-022-28244-5
99. Wei X, Nielsen R. CCR5-Δ32 is deleterious in the homozygous state in humans. *Nat Med.* 2019;25(6):909–910. DOI: 10.1038/s41591-019-0459-6
100. Baylis F, Darnovsky M, Hasson K, Krahn TM. Human Germ Line and Heritable Genome Editing: The Global Policy Landscape. *CRISPR J.* 2020;3(5):365–377. DOI: 10.1089/crispr.2020.0082
101. Grebenshchikova EG. Russia's stance on human genome editing. *Nature.* 2019;575(7784):596. DOI: 10.1038/d41586-019-03617-x
102. Редактирование генов и геномов. В 3-х т. Отв. ред. С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. 2-е изд., расш. и доп. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2018.
103. Методы редактирования генов и геномов. Отв. ред. С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2020, 550 стр. ISBN 978-5-7692-1670-1.

Об авторах

Карагяур Максим Николаевич — к.б.н., старший научный сотрудник, Институт регенеративной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; доцент, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Примак Александра Леонидовна — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Джауари Сталик Станиславович — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Бозов Кирилл Дмитриевич — аспирант, лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Макусь Юлия Валерьевна — студент-практикант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Authors

Maxim N. Karagyaур — PhD, senior researcher, Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University; Associate Professor, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Alexandra L. Primak — PhD student, laboratory researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Stalik S. Dzhauari — PhD student, laboratory researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Kirill D. Bozov — PhD student, laboratory researcher, Laboratory of Gene and Cell Technologies, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.

Yulia V. Makus — intern student, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University.