



# Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии

А.В. Смирнов<sup>1</sup>, А.М. Юнусова<sup>1</sup>, В.А. Лукьянчикова<sup>1</sup>, Н.Р. Баттулин<sup>1, 2</sup> ✉

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Система CRISPR/Cas9 была изначально описана как механизм адаптивного иммунитета архей и бактерий, однако после ряда модификаций она нашла активное применение в геномной инженерии, благодаря способности вносить направленный ДНК-разрыв с помощью короткого программируемого 20-нуклеотидного района в направляющей молекуле РНК (single guide RNA, sgRNA). Обзор посвящен современным приложениям системы CRISPR/Cas9 в геномной инженерии. В первой его части описан основной механизм действия CRISPR/Cas9, особо уделено внимание причинам неспецифической активности Cas9 (off-targets). Она выражается в связывании комплексом Cas9-sgRNA нецелевых геномных участков, имеющих лишь частичную гомологию с sgRNA, что может приводить к нежелательным мутациям в геноме. В обзоре обсуждаются недавние улучшения специфичности связывания Cas9 и подходов по расширению функций CRISPR/Cas9 для трансгенеза. Популярность системы CRISPR/Cas9 в основном обусловлена ее выдающимся потенциалом для геномной терапии и геномной инженерии, и последние достижения в этих областях представлены в нашем обзоре. В частности, CRISPR/Cas9 была недавно использована для контроля заражения клеток ВИЧ (вирусом иммунодефицита человека) и исправления генетических нарушений, таких как мышечная дистрофия Дюшенна и пигментный ретинит, на культурах клеток и животных моделях. Программируемость CRISPR/Cas9 облегчает создание трансгенных организмов с направленными генными мутациями, встройками генов и крупными хромосомными перестройками. Система CRISPR/Cas9 оказалась особенно востребованной для пронуCLEARной микроинъекции при получении трансгенных сельскохозяйственных животных в биотехнологии. Один из разделов обзора посвящен генетическим скринингам на основе CRISPR/Cas9, которые приводят к высокоэффективной идентификации новых генов и генных сетей во многих биологических процессах. Наконец, в обзоре рассматривается технология генных драйверов, основанная на CRISPR/Cas9, которая представляет собой мощный инструмент для модификации экосистем в обозримом будущем.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; редактирование генома; трансгенез; клеточная терапия; мутагенная цепная реакция.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175

УДК 57.088

Поступила в редакцию 17.03.2016 г.

Принята к публикации 20.05.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

✉ e-mail: battulin@gmail.com

## CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering

A.V. Smirnov<sup>1</sup>, A.M. Yunusova<sup>1</sup>,  
V.A. Lukyanchikova<sup>1</sup>, N.R. Battulin<sup>1, 2</sup> ✉

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The CRISPR/Cas9 system was initially described as an element of archeal and bacterial immunity, but gained much attention recently for its outstanding ability to be programmed to target any genomic loci through a short 20-nucleotide sgRNA region. Here we review some modern applications of the CRISPR/Cas9 system. First, we describe the basic mechanism of the CRISPR/Cas9 DNA recognition and binding, focusing in particular on its off-target activity. The CRISPR/Cas9 off-target activity refers to a non-specific recognition of genomic sites that have partial homology with sgRNA, occasionally resulting in unwanted mutations throughout the genome. We also note some recent improvements for enhancing Cas9 specificity or adding new functions to the system. Since Cas9-related hype is mostly driven by its remarkable potential for gene therapy and genome engineering, the latest CRISPR/Cas9 applications in these areas are also covered in our review. For instance, the CRISPR/Cas9 was recently used to control HIV infection and to repair genetic abnormalities, such as Duchenne muscular dystrophy or retinitis pigmentosa, both in cell cultures and rodent models. A programmable nature of CRISPR/Cas9 facilitates the creation of transgenic organisms through site-specific gene mutations, knock-ins or large chromosomal rearrangements (deletions, inversions and duplications). CRISPR/Cas9 proved to be especially useful in pronuclear microinjections of farm animals as well, having strong impact on biotechnology. In addition, we review Cas9-augmented genetic screens that allow an unbiased search for new genes and pathways involved in a plethora of biological aspects, owing to Cas9 efficiency and versatility. Finally, we argue that gene drivers based on CRISPR/Cas9 represent a powerful tool to modify ecosystems in the nearest future.

Key words: CRISPR/Cas9; genome editing; transgenesis; cell therapy; mutagenic chain reaction.

По усредненным оценкам, в мире обнаружено более миллиона видов эукариотических организмов, при этом миллионы эукариот и бактерий все еще остаются неопианными (Mora et al., 2011; Costello et al., 2013). Так как геном каждого вида в чем-то уникален, их изучение принесет неисчислимое количество неожиданных открытий. Однако даже исследование генов небольшого числа организмов, с которыми работают в лабораториях, представляет проблему. Для того чтобы понять функции отдельных элементов генома и то, как формируются конкретные признаки организмов, необходима разработка универсального инструментария для направленного редактирования генома: адресной «поломки» или «замены» генов. Для человечества контроль над редактированием генома будет означать избавление от наследственных генетических заболеваний, возможность модификации окружающих нас биоценозов, а также производство новых материалов и лекарств силами биотехнологии. Поэтому генетические инструменты для редактирования генома стали одним из самых востребованных открытий последних лет. На сегодняшний момент наибольшее распространение получили три метода: цинковопальцевые нуклеазы (ZFN), TALE-ассоциированные нуклеазы (Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALEN) и CRISPR/Cas9 (Wijśhake et al., 2014). Несмотря на то что они сопоставимы по многим параметрам, определяющим эффективность, один из методов, CRISPR/Cas9, благодаря своей простоте оставил конкурентов далеко позади. Всего за три года система CRISPR/Cas9 стремительно перешла рубеж, который отделяет «многообещающую и перспективную технологию» от инструмента, принятого на вооружение в тысячах лабораторий по всему миру. В 2016 г. каждую неделю публикуется более 30 работ, в которых упоминается система CRISPR/Cas9. Не пытаясь охватить всю область применения CRISPR/Cas9, в этом обзоре мы обратили свое внимание на самые актуальные направления, которые будут иметь значительное влияние на медицину и биотехнологию. Более подробную информацию можно найти в специализированных обзорах и компиляциях, указанных в начале каждого из разделов.

### Система геномного редактирования CRISPR/Cas9

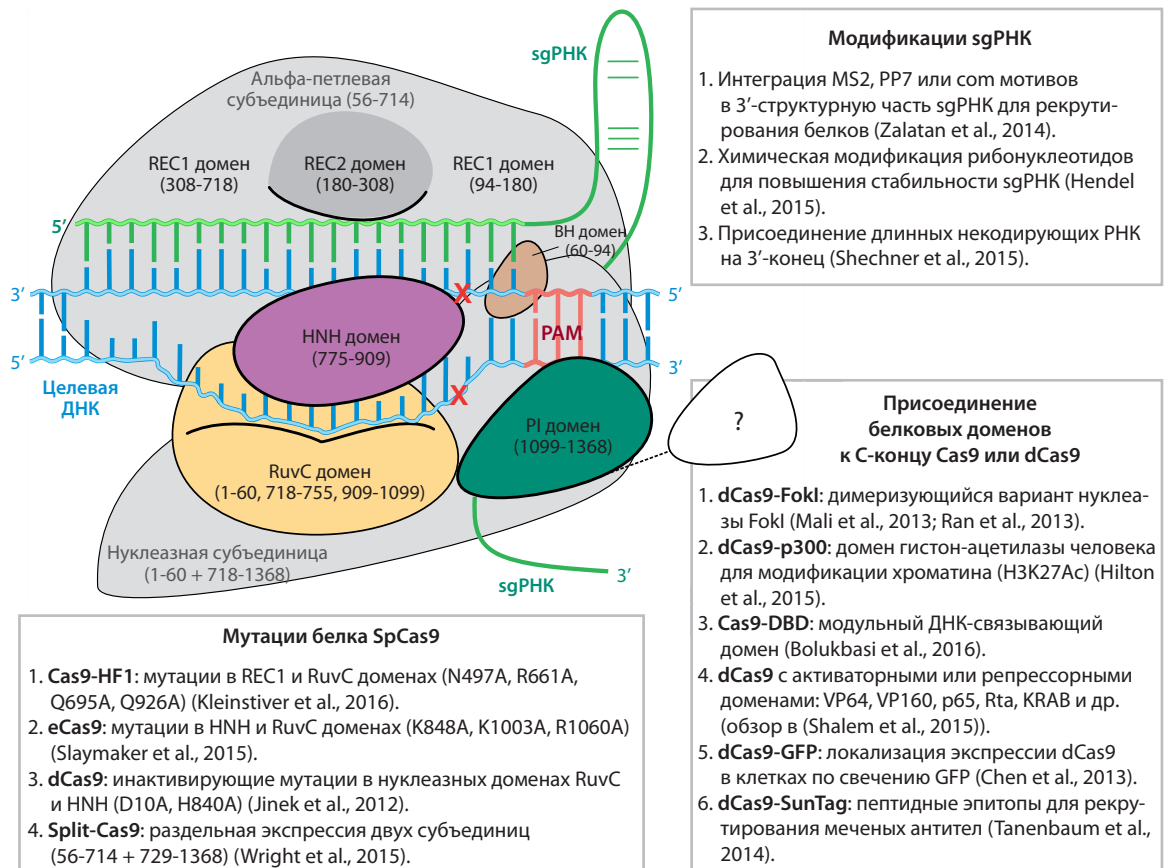
CRISPR/Cas – это система адаптивного приобретенного иммунитета бактерий и архей, направленная на уничтожение проникшей в клетку чужеродной ДНК, например, фагов или плазмид (Barrangou et al., 2007). В русском языке пока не достигнут консенсус о переводе названия CRISPR/Cas (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)–CRISPR-associated system (Cas)). Название можно представить как «сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные промежутками, и ассоциированная с ними система». Бактериальный CRISPR-локус содержит уникальные фрагменты чужеродной ДНК (промежутки или спейсеры в англоязычной литературе) и сохраненные организмом после инфекции вирусными или плазмидами, а также полученные извне. В случае повторного вторжения с CRISPR-локуса транскрибируется протяженная молекула РНК, которая фрагментируется комплексом белков CRISPR/Cas-системы

и вспомогательных РНК. Нарботанные РНК-молекулы при участии белков CRISPR/Cas-системы связывают и разрезают комплементарные участки чужеродной геномной ДНК (протоспейсеры). Важно, что связывание и деградация ДНК протоспейсера происходят только в присутствии специфического нуклеотидного сегмента (protospacer adjacent motif, PAM), который может иметь у разных видов бактерий разные последовательность и размер (Makarova et al., 2015). Наличие PAM-участка служит своеобразным опознавательным сигналом чужеродной ДНК и позволяет избегать разрезания собственных спейсерных районов CRISPR-локуса. CRISPR/Cas-системы подразделяются по происхождению и механизму действия на пять основных типов (см. обзор (Makarova et al., 2015)).

Нуклеаза SpCas9 (*Streptococcus pyogenes*), которая на сегодняшний день применяется в геномной инженерии чаще всего, является центральной темой нашего обзора. SpCas9 принадлежит ко второму типу CRISPR/Cas-систем. В отличие от нуклеаз других CRISPR-семейств, SpCas9 (далее Cas9) не требует дополнительных белков-кофакторов для связывания и разрезания ДНК. В естественных условиях для активации Cas9-нуклеазы необходимы две РНК: CRISPR-ассоциированная РНК (crRNA), происходящая из геномного локуса, хранящего фрагменты вирусных последовательностей; а также транс-активирующая РНК (tracrRNA), лицензирующая активность комплекса Cas9-РНК (подробное описание механизма см. в обзоре (Wright et al., 2016)). Однако для целей геномной инженерии две РНК объединены в составе одной химерной молекулы sgРНК (single guide RNA). Молекула sgРНК включает участок длиной 19–20 нуклеотидов, который должен быть комплементарен целевому участку генома, и функциональные элементы tracrRNA и crRNA, полная длина sgRNA составляет от 100 до 250 п. н. Для связи Cas9 с ДНК также необходим участок из трех нуклеотидов вида NGG (PAM), непосредственно прилегающий с 3'-конца к целевому сайту связывания sgРНК в геноме. После связывания с комплементарным sgРНК участком ДНК Cas9 разрезает обе нити ДНК на расстоянии в три нуклеотида от PAM, формируя двухцепочечный разрыв ДНК с тупыми концами. Система CRISPR/Cas9 легко подвергается модификациям: от изменений вторичной структуры sgРНК до мутаций специфических аминокислот в Cas9 или присоединения функциональных доменов других белков (рис. 1).

### Механизм действия системы CRISPR/Cas9

Сайт-специфичные нуклеазы разного происхождения, такие как I-SceI, ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9, используются биологами с определенной целью: для внесения одноцепочечных или двухцепочечных разрывов ДНК в интересующие участки генома. Несмотря на схожее назначение, сайт-специфичные нуклеазы по-разному взаимодействуют с ДНК. К примеру, мегануклеаза I-SceI связывает и разрезает уникальный мотив из 18 п. н., оставляя выступающие 3'-концы длиной в четыре нуклеотида. Цинковопальцевые и TALE-ассоциированные нуклеазы распознают целевой участок генома посредством модульных ДНК-связывающих доменов, а разрыв в геном вносится при помощи димеризующихся FokI-доменов. Нуклеаза CRISPR/Cas9 имеет специфический механизм



**Рис. 1.** Схема комплекса SpCas9-sgРНК на ДНК.

Числами обозначены размеры и порядок белковых доменов (в аминокислотах). Приведены различные модификации элементов системы CRISPR/Cas9.

действия, и его расшифровка в 2014 г. значительно подтолкнула развитие всей геномной инженерии.

Несмотря на то что первое описание CRISPR-локуса было сделано еще в 1980-х гг., а с 2011 г. велись эксперименты по направленному внесению двухцепочечных разрывов в ДНК-последовательность с помощью Cas-нуклеаз, понимание механизма действия эндонуклеазы SpCas9 появилось только после серии работ с участием одного из первооткрывателей и активных исследователей SpCas9 М. Жинека в 2014 г. (Anders et al., 2014; Jinek et al., 2014; Sternberg et al., 2014) (детали см. в обзоре (Wright et al., 2016)).

В статье S.H. Sternberg с коллегами (2014) описан процесс поиска специфичного сайта ДНК нуклеазой SpCas9, связанной с sgРНК. Проведя сложные биохимические эксперименты, такие как визуализация SpCas9 на растянутых фиксированных ДНК-нитех фага лямбда и *in vitro* связывание SpCas9 с ДНК, содержащей разное число PAM-сайтов, они выяснили динамику связывания нуклеазы и ДНК. Оказалось, что SpCas9 в комплексе с sgРНК производит поиск комплементарных сайтов ДНК за счет случайных трехмерных столкновений с ДНК хромосом. Присутствие PAM стабилизирует комплекс SpCas9-ДНК и инициирует расплетание ДНК-дуплекса. По данным ChIP-seq анализа, проведенного на белке с инактивированной нуклеазой

активностью (nuclease-deficient Cas9, dCas9), комплекс dCas9-sgРНК слабо связывается с большим количеством геномных сайтов, содержащих PAM и 5–8 нуклеотидов комплементарности с sgРНК, расположенных рядом с PAM (более 100 участков для некоторых sgРНК), однако разрезания неспецифических участков почти не происходит без стабилизации комплекса (Kuscu et al., 2014; Wu et al., 2014). Комплекс же SpCas9-ДНК в присутствии полностью комплементарной sgРНК очень стабилен, поэтому для его удаления с места разрыва необходимо действие других белков клетки. В работе С. Anders с коллегами (2014) анализ кристаллической структуры белка SpCas9 в комплексе с sgРНК и ДНК показал роль PAM-участка для стабилизации РНК-ДНК дуплекса. PAM-участок жестко связывается с некоторыми белковыми доменами SpCas9 (PAM-взаимодействующие домены) (Nishimasu et al., 2014) и образует небольшое выпячивание молекулы ДНК, облегчая доступ к первому нуклеотиду сайта узнавания sgРНК. Два гуанина в составе PAM образуют водородные связи с аминокислотами Arg 1333 и Arg 1335 С-концевого участка SpCas9. Мутации двух этих аминокислот значительно снижают эффективность SpCas9 в разрезании ДНК. Взаимодействие двух гуанинов PAM с SpCas9 помогает точнее сориентировать первый, неспецифический нуклеотид PAM-участка. Он образует

водородные связи с группой аминокислот, которые называются «фосфатным замком», и выворачивается из ДНК дуплекса, что приводит к инициации спаривания цепей sgРНК и комплементарной ей одноцепочечной нити ДНК. Интересно, что даже при отсутствии комплементарной последовательности в sgРНК РАМ-белковые взаимодействия способны создать локальное расплетание ДНК-дуплекса на один нуклеотид. Процесс поиска и разрезания ДНК-участков для белка SpCas9 оказался следующим: (1) формирование комплекса SpCas9 с sgРНК. При связывании белка Cas9 с молекулой sgРНК происходит поворот двух субъединиц Cas9 (альфа-петлевой (56–714 а.к.) и нуклеазной (1–57+718–1368 а.к.)) относительно друг друга на 100° (Jinek et al., 2014). Изменение конформации открывает участки связывания ДНК в центре молекулы Cas9. Две субъединицы – ДНК-связывающая и нуклеазная – взаимодействуют только посредством sgРНК, которая, таким образом, играет ключевую роль в активации Cas9. Это подтверждается и тем, что раздельная экспрессия двух белковых субъединиц Cas9 (split-Cas9) приводит к сборке функциональной нуклеазы, так как кооперация фрагментов осуществляется через sgРНК (Wright et al., 2015). После активации Cas9 происходят (2) случайные столкновения комплекса с хромосомной ДНК, затем (3) слабые взаимодействия белка SpCas9 с РАМ-участками (NGG), разбросанными по геному, (4) водородные связи РАМ с С-концевым РАМ-взаимодействующим доменом SpCas9 инициируют расплетание ДНК-дуплекса перед РАМ на один нуклеотид, но только (5) наличие комплементарной sgРНК стимулирует расплетание целевого ДНК-дуплекса. Наконец, (6) одноцепочечные молекулы ДНК разрезаются двумя нуклеазными доменами SpCas9 (RuvC, HNH).

Информация о кристаллической структуре SpCas9 служит для «приручения» нуклеазы в целях генной терапии и создания белков с повышенной специфичностью. Недавно были описаны результаты масштабного мутирования ДНК и sgРНК-связывающих доменов Cas9, что позволяет снизить избыточную термодинамическую стабильность комплекса Cas9-ДНК, допускающую мисматчи в sgРНК-участке. Двумя независимыми группами ученых были получены мутанты Cas9: High Fidelity Cas9 (Kleinstiver et al., 2016) и Enhanced Cas9 (Slaymaker et al., 2015). В работе В.Р. Kleinstiver с коллегами заменялись аминокислоты, взаимодействующие с ДНК-sgРНК дуплексом (N497A, R661A, Q695A, Q926A). Во втором исследовании мутировались аминокислоты, связывающие одноцепочечную ДНК (K848A, K1003A, R1060A) (см. схему в краткой заметке (Nelson, Gersbach, 2016)). Таким образом, комплекс мутантного «ослабленного» белка Cas9 на ДНК стабилизируется только в присутствии идеально комплементарной sgРНК. Это почти не сказывается на эффективности разрезания sgРНК, но значительно снижает число неспецифических сайтов разрезания в геноме (off-targets) (неспецифической активности Cas9 посвящен следующий раздел обзора). Ожидается, что улучшение специфичности SpCas9 ускорит работу в области клеточной терапии человека, так как высокая точность нуклеаз снимает необходимость тщательного скрининга off-target мутаций в геноме.

Более сложной альтернативой описанному подходу выглядит присоединение к Cas9 белков, повышающих специфичность связывания с ДНК на основе модульных доменов цинковопальцевых нуклеаз (Bolukbasi et al., 2016). Авторы решили создать химерный белок Cas9, соединенный на С-конце с четырьмя ДНК-связывающими доменами, узнающими участок из 12 нуклеотидов на расстоянии примерно 7–15 нуклеотидов от РАМ (в 3'-направлении). В структуру Cas9 были внесены мутации, нарушающие связывание нуклеазы с РАМ и ДНК, которые делают Cas9 зависимым от ДНК-связывающего домена. Система на основе Cas9 и ДНК-связывающих доменов не очень удобна для обычных приложений, так как репрограммирование ДНК-связывающих доменов занимает время и ограничивает число доступных геномных сайтов. Этот метод можно использовать для генной терапии клеток человека, когда сайты-мишени в геноме хорошо охарактеризованы и ДНК-связывающие домены протестированы заранее.

К настоящему моменту внимание научного сообщества направлено на адаптацию белка SpCas9 для различных задач, тем не менее, применение ортологических Cas9 белков из различных видов бактерий и архей может оказаться полезным в будущем. Сейчас ведутся поиски среди сотен CRISPR-ассоциированных нуклеаз из других видов бактерий и архей. Основные требования к ортологам Cas9 включают, помимо высокой эндонуклеазной активности, небольшой размер для облегчения упаковки в вирусы и узнавание различных РАМ-участков для расширения возможностей дизайна sgРНК. К примеру, нуклеаза SaCas9 из *Staphylococcus aureus* узнает РАМ вида 5'-NNGRRT-3', ее кодирующая последовательность короче гена *SpCas9* на 1000 п.н. Меньший размер позволяет использовать для ее доставки аденоассоциированные вирусы (AAV). Кристаллическая структура белка SaCas9 похожа на SpCas9, за исключением доменов, взаимодействующих с РАМ-проксимальным участком и структурными элементами sgРНК (Nishimasu et al., 2015). Нуклеаза NmCas9 (*Neisseria meningitidis*) связывает РАМ вида 5'-NNNNGATT-3', что позволяет выбирать геномные сайты, недоступные другим нуклеазам (Hou et al., 2013). Стоит отметить, что CRISPR-ассоциированные нуклеазы из других семейств также имеют большой потенциал для генной терапии. Так, нуклеаза Cpf1 из бактерии *Francisella novicida* (пятый тип CRISPR-систем) имеет размер в 1,3 тыс. аминокислот (SpCas9 – примерно 1,6 тыс.) и направляется к месту разрыва коротким аналогом sgРНК (44 п.н.) (Zetsche et al., 2015a). Было показано, что Cpf1 эффективно модифицирует ДНК в клетках человека (Zetsche et al., 2015a). Cpf1 распознает РАМ вида TTN, при этом сайт прилегает к 5'-концу направляющей РНК, в отличие от SpCas9. Двухцепочечный разрыв ДНК вносится на расстоянии примерно 20 п.н. от РАМ, формируя короткие 5'-одноцепочечные участки. Тот факт, что разрыв в ДНК возникает на удалении от РАМ, позволяет проводить генную модификацию одного геномного сайта несколько раз, так как мутагенез не разрушает участок связывания sgРНК с ДНК, как происходит в случае с SpCas9.

### Специфичность Cas9 и нецелевая активность

Одна из горячих тем в области использования CRISPR/Cas9 – ее неспецифическая активность в нецелевых участках генома (off-target сайты). Было показано, что помимо высокой сайт-специфичной активности, которая определяется наличием в целевом сайте PAM-участка и 20 нуклеотидов, комплементарных sgPНК, комплекс Cas9-sgPНК может вносить разрыв в ДНК при наличии PAM и неполной гомологии с sgPНК вплоть до трех–пяти несовпадающих нуклеотидов (Cong et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013; Mali et al., 2013; Pattanayak et al., 2013).

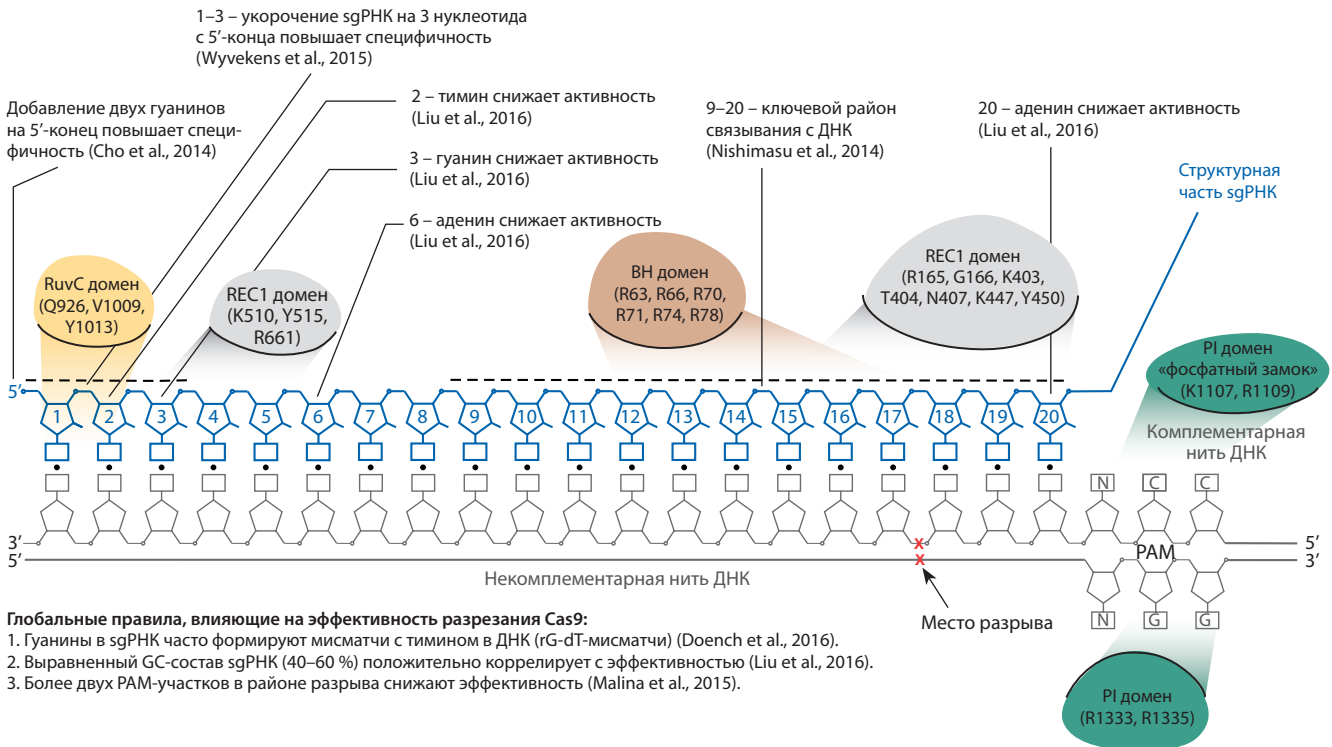
В большинстве случаев off-target активность CRISPR/Cas9 представляет собой нежелательный побочный эффект, от которого пытаются избавиться. Для этого было предложено несколько стратегий. Так, было показано, что простое уменьшение количества активных молекул Cas9 в клетке позволяет снизить off-target активность. Однако в итоге также падает и целевая активность системы (Hsu et al., 2013; Davis et al., 2015; Zetsche et al., 2015b). Поскольку мутация в off-target сайте происходит за счет репарации двухцепочечного разрыва ДНК, одна из стратегий предполагает использовать мутантные варианты Cas9, вносящие одноцепочечный разрыв (ник). При этом редактирование целевого локуса и внесение двухцепочечного разрыва в ДНК осуществляются за счет применения пары sgPНК и никирующей Cas9, создающих два близлежащих ника на обеих цепях в целевом участке генома (Mali et al., 2013; Ran et al., 2013). Так как off-target сайты обычно разделены в геноме большими расстояниями, вероятность внесения близлежащих ников где-либо, кроме целевого сайта, оказывается ничтожной. Одиночные же ники репарируются клетками по механизму высокоточной эксцизионной репарации оснований (Dianov et al., 2013). Похожая стратегия уменьшения off-target активности CRISPR/Cas9 была предложена при использовании каталитически неактивного белка dCas9, сшитого с нуклеазным доменом FokI. В этом случае также за счет использования двух sgPНК в целевом сайте происходят сближение молекул dCas9-FokI и внесение двухцепочечного разрыва в ДНК в результате димеризации FokI-доменов (Guilinger et al., 2014; Tsai et al., 2014). Однако необходимость дизайна двух sgPНК для модификации одного локуса уменьшает число доступных для редактирования локусов и усложняет методику в целом.

Ранее в обзоре обсуждалось, что стабильность комплекса Cas9-sgPНК на геномной ДНК коррелирует с off-target активностью. Избыточная энергия взаимодействия белка Cas9 с PAM целевого сайта может стабилизировать весь комплекс Cas9-sgPНК-ДНК при связывании его с off-target сайтом даже при множестве неправильно спаренных оснований. Существует несколько указаний на важность стабильности комплекса для эффективного внесения разрыва в ДНК. Было показано, что разрезание ДНК ферментом Cas9 происходит после разделения цепей целевого сайта (Anders et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). Причем наличие неправильно спаренных оснований между sgPНК и целевым ДНК-сайтом в области 1–12 нуклеотидов относительно PAM ингибирует нуклеазную активность Cas9. Но нуклеазная активность восстанавливается, если целевая двухцепочечная последовательность

ДНК при этом сама будет содержать ошибочно спаренные ДНК нуклеотиды (Semenova et al., 2011; Wiedenheft et al., 2011; Sternberg et al., 2014). Наличие в целевом сайте ДНК вставок или делеций нуклеотидов также частично игнорируется при связывании с sgPНК (Lin et al., 2014). Современные алгоритмы дизайна sgPНК учитывают возможные мисматчи и инделлы при анализе целевого сайта для повышения специфичности разрезания Cas9 (Doench et al., 2016).

В некоторых работах было показано, что модификации sgPНК также позволяют уменьшить off-target активность системы CRISPR/Cas9 (рис. 2). Так, добавление двух дополнительных гуаниновых нуклеотидов на 5'-конце молекулы sgPНК приводило к уменьшению off-target активности без уменьшения целевой активности для большей части протестированных sgPНК. Этот эффект, по-видимому, достигался за счет изменения стабильности связывания sgPНК или ее вторичной структуры (Cho et al., 2014). Укорочение sgPНК на три нуклеотида также сильно снижает off-target активность из-за уменьшения энергии связывания комплекса Cas9-sgPНК с ДНК (Fu et al., 2014; Wyvekens et al., 2015).

Для того чтобы улучшить алгоритмы по дизайну sgPНК, была предпринята попытка статистического анализа связи между нуклеотидной последовательностью sgPНК и эффективностью разрезания целевого участка генома. Исследователи из Америки и Японии (Liu et al., 2016) оценили активность более чем 200 sgPНК, равномерно распределенных по геному мыши, с помощью нуклеазного теста (Surveyor nuclease assay). Оказалось, что среди 218 sgPНК для 89 sgPНК (41 %) вообще не обнаруживалось детектируемой активности. С практической точки зрения, это означает, что необходимо тестировать несколько sgPНК перед проведением экспериментов с CRISPR/Cas9. В дополнение к этому наблюдению авторы заметили ряд закономерностей. Во-первых, на активность sgPНК влияют нуклеотиды в позициях 2, 3, 6, и 20, если считать от 5'-конца sgPНК. Двадцатый нуклеотид sgPНК, предваряющий PAM-последовательность, важен для инициации расплетания ДНК и стабилизации dCas9-sgPНК-ДНК комплекса вместе с PAM. sgPНК, имеющие на этой позиции аденин, как правило, показывают сниженную активность. Интересно, что некоторые нуклеотиды в позициях 2 (тимин), 3 (гуанин), и 6 (аденин), тоже отрицательно влияли на активность sgPНК. Традиционно считается, что 5'-конец sgPНК (дистальный от PAM) не играет большой роли в распознавании целевого участка в геноме. Авторы же предполагают, что ослабленные взаимодействия нуклеотидов 2 и 4–6 с Rec1-доменом белка SpCas9 снижают эффективность связывания комплекса с ДНК (Liu et al., 2016). Также с эффективностью разрезания ДНК положительно коррелировали сбалансированный GC-состав sgPНК (40–60 %), способность sgPНК образовывать вторичную структуру и активный хроматин в области разрыва (промоторные районы) (Liu et al., 2016). Этими наблюдениями можно пользоваться при создании sgPНК для экспериментальной работы (рис. 2). Актуальные программы для дизайна экспериментов с CRISPR/Cas9 и подбора sgPНК перечислены в сводном метаобзоре D.B. Graham and D.E. Root (2015).



**Рис. 2.** Схема sgRNA на ДНК.

Указаны белковые взаимодействия Cas9 с sgRNA и PAM-участком ДНК, по данным (Anders et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). Отмечены ключевые нуклеотиды sgRNA, влияющие на эффективность разрезания Cas9.

Особое значение off-target активность CRISPR/Cas9 приобретает в работах по клеточной терапии, поскольку предполагается, что после редактирования генома клетки будут вводиться в организм человека. Мутации, возникшие в результате внесения разрыва ДНК в нецелевом локусе, потенциально могут менять активность генов и приводить к опухолевому перерождению клеток. Проблема осложняется еще и индивидуальными особенностями генома каждого человека. Ведь для того чтобы уменьшить вероятность возникновения off-target эффектов, необходимо выбирать такие sgRNA, которые имеют минимальное количество похожих сайтов в геноме конкретного человека. Экспериментальная оценка этого эффекта была проведена в работе L. Yang с коллегами (2014) в эксперименте по нокауту гена *Tafazzin (TAZ)* в эмбриональных стволовых клетках человека. Выбранная sgRNA с высокой эффективностью направляла Cas9 к целевому сайту, так что в 54% клеток он оказывался мутированным. С помощью глубокого секвенирования генома авторы попытались картировать все off-target мутации, возникшие после проведения геномного редактирования (Yang et al., 2014). Помимо целевого сайта, были также проверены 31 потенциальный off-target сайт, отличающийся от целевого тремя нуклеотидами (высокоспецифичная sgRNA была подобрана таким образом, что в геноме не было похожих на нее сайтов с одним или двумя мисматчами). Было показано, что во всех потенциальных off-target сайтах частота возникновения мутаций была крайне низкой (примерно 0,15%), за исключением одного участка, для которого уровень возникновения мутаций был оценен

в 18,9%. Детальный анализ показал, что столь высокий уровень off-target активности в данном сайте объясняется наличием SNP в геноме клеточной линии. В референсном геноме, который использовался при выборе sgRNA, данный сайт нес мисматчи по трем нуклеотидам в позициях 11, 15 и 19 относительно PAM, однако геном использованной линии отличался от референсного, и в реальности не совпадали только нуклеотиды в позициях 15 и 19 (Yang et al., 2014). Поскольку известно, что первые 10–12 нуклеотидов после PAM имеют наибольшее влияние на специфичность Cas9 (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013), неудивительно, что данный off-target сайт модифицировался с высокой частотой. *In silico* анализ показал, что если для оценки специфичности sgRNA не используется геном конкретного человека, клетки которого будут подвергаться геномному редактированию, то вероятность присутствия высокоактивных off-target сайтов для sgRNA из-за SNP составляет от 1,5 до 8,5%, в зависимости от используемого алгоритма анализа. Важно отметить, что вне целевого и потенциальных off-target сайтов CRISPR/Cas9 не вызывает увеличения частоты небольших инсерций, делеций и геномных перестроек (Yang et al., 2014). Таким образом, для минимизации возможных изменений генома при геномном редактировании для целей клеточной терапии необходимо использовать геном конкретного пациента.

**Системы репарации ДНК – основа трансгенеза**  
Двухцепочечные разрывы ДНК, вносимые сайт-специфичными нуклеазами, репарируются клеткой за счет

негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) или с помощью гомологичной рекомбинации. NHEJ и, в меньшей степени, MMEJ (микрогомологичное соединение концов, microhomology-mediated end joining) действуют на протяжении всего клеточного цикла. Именно NHEJ несет ответственность за мутагенез ДНК в сайтах разрезания Cas9, так как лигирование двухщепочечных разрывов требует обработки свободных концов ДНК экзонуклеазами и заполнения однощепочечных участков полимеразой. Это может приводить к потере или вставке нуклеотидов (индел-мутации), а также к нуклеотидным заменам. Частота Cas9-обусловленного мутагенеза обычно составляет несколько десятков процентов (Geisinger et al., 2016).

В течение G2/M фазы в клетках активна гомологичная рекомбинация, при которой для восстановления информации используются сестринские хроматиды. При наличии в клетке трансгенного фрагмента ДНК с плечами, гомологичными участку генома, может происходить рекомбинация между трансгеном и свободными концами геномной ДНК, образующимися после разрезания целевого участка Cas9. Гомологичная рекомбинация максимально эффективна, если двухщепочечный разрыв располагается в 10–20 нуклеотидах от запланированного места внесения изменений в геном (Elliott et al., 1998; Yang et al., 2013b; Findlay et al., 2014). Баланс между негомологичным и гомологичным вариантами репарации ДНК во многом и определяет эффективность встройки трансгенной ДНК с помощью CRISPR/Cas9. Белки гомологичной рекомбинации присутствуют в клетке во все фазы клеточного цикла, однако лишь в S-фазе происходит их активация за счет увеличения экспрессии генов и посттрансляционных модификаций белков. Значительной проблемой для трансгенеза остается низкая частота гомологичной встройки, которая отражает фундаментальные особенности репарации ДНК в клетке. Например, плюрипотентные стволовые клетки человека модифицируются CRISPR/Cas9 с частотой менее 10 % (Liu et al., 2016), что связано с чувствительностью этого типа клеток к повреждениям ДНК. Активация гомологичной рекомбинации в нехарактерные фазы клеточного цикла, а также сдвиг равновесия между негомологичной и гомологичной рекомбинацией в пользу последней позволили бы улучшить эффективность направленной встройки трансгенов при использовании CRISPR/Cas9.

Одним из проверенных временем методов подавления NHEJ являются молекулы-ингибиторы ключевых белков NHEJ. В 2015 г. вышло несколько работ, в которых система CRISPR/Cas9 применялась в комбинации с ингибированием NHEJ. V.T. Chu с коллегами (2015) показали, что нокдаун белков канонического NHEJ (KU70, KU80 и лигазы IV) короткими шпилечными РНК (shRNA) повышал частоту гомологичной рекомбинации в два–три раза. После добавления к shРНК малой молекулы Scr7, которая блокирует ДНК-связывающий домен лигазы IV, и аденовирусных белков, E1B55K и E4orf6, опосредующих протеосомную деградацию лигазы IV, частота сайт-специфичной интеграции выросла в семь раз по сравнению с исходной. Важно, что молекула Scr7 была протестирована в экспериментах по пронуклеарной микроинъекции CRISPR/Cas9 и трансгенов. Исследователи задокументировали

повышение частоты сайт-специфичной встройки различных трансгенов в два–четыре раза при использовании Scr7, отметив также низкую токсичность (Matsuyama et al., 2015). Ингибиторы другого ключевого компонента NHEJ, ДНК-зависимой субъединицы протеинкиназы (DNA-PKcs), стимулировали направленную встройку трансгенов в два–четыре раза (Robert et al., 2015). В этой работе также был показан аддитивный эффект различных ингибиторов на эффективность подавления NHEJ.

Молекула RS-1 стабилизирует связывание белка RAD51 с ДНК. RAD51 – ключевой белок гомологичной рекомбинации, который формирует нуклеофиламенты на однощепочечной ДНК и необходим для инвазии донорного ДНК-дуплекса. Обработка клеток веществом RS-1 повышает частоту Cas9-направленной встройки в три–шесть раз (Pinder et al., 2015).

Наконец, два вещества (L755507 и Brefeldin A), обнаруженные в скрининге среди четырех тысяч малых молекул, повышали частоту гомологичной встройки трансгена в два–три раза при использовании CRISPR/Cas9, но механизм их действия на систему репарации пока не выяснен (Yu et al., 2015).

D. Yang с коллегами (2016) нашли способ повысить частоту сайт-специфического встраивания трансгена в плюрипотентных стволовых клетках человека, синхронизировав их в G2/M-фазах клеточного цикла с помощью нокодазола или АВТ-751. Синхронизация клеток стимулировала гомологичную рекомбинацию в среднем в четыре раза. Обработка синхронизированных клеток ингибитором лигазы IV (Scr7) не привела к дополнительному повышению частоты гомологичной рекомбинации, что указывает на полное ингибирование канонического пути NHEJ в этих условиях.

### **CRISPR/Cas9 ускоряет получение трансгенных животных при инъекции в зиготы**

Традиционно модификация генома проводится на эмбриональных стволовых (ЭС) клетках, затем следуют получение химерных животных и проведение скрещиваний. Помимо того, что сам процесс довольно длительный и трудоемкий (6–12 мес. и больше), для некоторых животных до сих пор не получены линии ЭС-клеток. С помощью же системы CRISPR/Cas9 исследователи могут получить трансгенное животное за один шаг, просто инъекцировав трансген, мРНК Cas9 и sgРНК в зиготу. Кроме того, инъекция нескольких sgРНК позволяет редактировать сразу несколько участков генома: вносить делеции (Wang et al., 2013) или встраивать фрагменты ДНК с помощью гомологичной рекомбинации (Yang et al., 2013a). А в работе A.W. Cheng с коллегами (2013) была показана возможность одновременно активировать работу трех генов в зиготе мыши с помощью dCas9, сшитой с активаторным доменом VP160.

Технология была испробована на всех модельных организмах, включая дрожофилу (Bassett et al., 2013), аксолотля (Flowers et al., 2013), крысу (Hu et al., 2013) и крупных животных, таких как макаки (Niu et al., 2014). Стоит отметить, что получение трансгенных приматов до этого являлось весьма трудной задачей. Китайским ученым с помощью инъекции CRISPR/Cas9 в эмбрионы

макак-крабоедов удалось внести мутации одновременно в два гена, *Ppar1* и *Rag1* (Niu et al., 2014).

Исследователи, работающие в области биотехнологии, с энтузиазмом переняли CRISPR/Cas9 для модификации геномов крупных сельскохозяйственных животных (подробный обзор представлен у W. Tan с коллегами (2016)). Трансгенез крупных животных, как правило, осуществляется через клонирование, которое отличается очень низкой эффективностью. Применение CRISPR/Cas9 позволило облегчить генную модификацию сельскохозяйственных животных: кроликов (Yuan et al., 2016), овец (Crispo et al., 2015), коз (Ni et al., 2014) и свиней (Whitworth et al., 2014). Интересно, что две группы китайских исследователей продемонстрировали очень высокую частоту Cas9-индуцированной встройки трансгенов в зиготах свиней (Peng et al., 2015; Wang et al., 2015a). В статье J. Peng с коллегами (2015) 100 % родившихся поросят (16 из 16) несли человеческий ген альбумина в нужном локусе. Этот случай скорее исключение, чем правило. H. Wang с коллегами (2015a) наблюдали более низкую частоту направленной встройки коротких ДНК-фрагментов (ssODN) при ПЦР-анализе бластоцист свиней (13 %), тем не менее эффективность при простом внесении мутаций в ген *Mitf* в зиготах составила почти 100 %.

Нужно заметить, что при всех достоинствах использования системы CRISPR/Cas9 для модификации одноклеточных эмбрионов у этой технологии есть и свои подводные камни. Один из них – мозаицизм развивающегося животного, возникающий, когда мутагенез аллелей происходит независимо в разных бластомерах по мере развития эмбриона. Например, если CRISPR/Cas9 не успеет модифицировать ни одного аллеля на одноклеточной стадии, а на двуклеточной стадии мутирует участок генома только в одном из бластомеров, то лишь половина клеток родившегося животного будут нести мутации. Кроме того, если репарация по механизму NHEJ протекает с мутагенезом целевого локуса, то модификации, произошедшие в разных клетках, могут приводить к различающимся мутациям. В результате животное будет состоять из смеси клеток с несхожими мутациями в целевом локусе генома. Мозаицизм уже наблюдался в реальных экспериментах на мышах (Long et al., 2014; Yen et al., 2014). Однако наибольшее значение проблема мозаицизма приобретает в экспериментах на крупных животных. Если мозаицизм наблюдается в половых клетках, то приходится использовать длительную стратегию проведения скрещиваний, для того чтобы получить гомозиготных носителей мутации. Это, очевидно, становится очень большой проблемой с учетом длительных циклов размножения, характерных для крупных животных. Так, в единственной на сегодняшний день опубликованной работе по редактированию генома приматов родившиеся животные были мозаиками (Niu et al., 2014).

### Применение CRISPR/Cas9 для генной терапии

В настоящее время CRISPR/Cas9 является самой используемой технологией для создания моделей заболеваний человека как *in vitro* – на разных типах стволовых клеток, так и *in vivo* – на генетически модифицированных животных.

Чрезвычайно высокая эффективность направленной модификации генов с помощью sgPНК и Cas9 позволяет одновременно редактировать сразу несколько копий гена: от биаллельных мутаций на гомологичных хромосомах (Wang et al., 2013a; González, Yeh, 2014) до мутагенеза 62 копий гена *pol* в эндогенных ретровирусах из генома свиньи (Yang et al., 2015). Последнее исследование имеет большое практическое значение, поскольку существуют опасения инфекции клеток человека этими ретровирусами при ксенотрансплантации органов от свиньи.

Для того чтобы упростить процесс моделирования заболеваний, в лаборатории пионера изучения CRISPR/Cas9 Фенга Жанга были получены трансгенные Cas9-мыши, во всех клетках которых экспрессируется Cas9 – либо конститутивно, либо после обработки Cre-рекомбиназой (Platt et al., 2014). Второй вариант позволяет ограничивать активность Cas9-нуклеазы специфичным типом клеток, так как проводятся скрещивания Cas9-мыши с линией, экспрессирующей Cre-рекомбиназу под тканеспецифическим промотором. Остается лишь ввести в клетки или зиготы Cas9-мыши sgPНК против гена-мишени.

Генная терапия для коррекции заболеваний человека – еще одна область медицины, где применение технологий направленного редактирования генома открывает широкие перспективы (Cox et al., 2015; Naldini, 2015). На модельных организмах была доказана принципиальная возможность коррекции мутации в одноклеточном эмбрионе. Работая с эмбрионами мышей, Y. Wu с коллегами (2013) показали, что доминантная мутация в гене *Crygc*, приводящая к катаракте, может быть исправлена путем ведения в зиготу мPНК Cas9 и соответствующей sgPНК. При этом аллель дикого типа (без мутации) на гомологичной хромосоме служит образцом для гомологичной рекомбинации. Мыши, родившиеся в результате этих экспериментов, не имели признаков катаракты, были фертильны и передавали аллель с исправленной мутацией потомкам. В другой работе (Long et al., 2014) авторы с помощью CRISPR/Cas9 редактировали мутацию в гене дистрофина (расположен на X-хромосоме), которая приводит к развитию мышечной дистрофии Дюшенна. В этом случае в зиготу мыши помимо мPНК Cas9 и sgPНК был введен короткий одноцепочечный ДНК-фрагмент (ssODN). Полученные мыши были мозаиками, по-видимому, из-за задержки в трансляции белка Cas9 на стадии зиготы. Но несмотря на этот факт, фенотип мышей был нормальным, что объясняется селективным преимуществом мышечных клеток с исправленной мутацией.

Описанные выше исследования были проведены исключительно на животной модели, однако авторы одной нашумевшей статьи (Liang et al., 2015) показали возможность редактирования генома в эмбрионах человека. В эксперименте были использованы три пронуклеарные зиготы, в которых исследователи модифицировали ген бета-глобина (Liang et al., 2015). Оказалось, что частота гомологичной рекомбинации в целевом локусе была низкой, а число off-target мутаций было существенно больше, чем в экспериментах с эмбрионами мышей или в культурах клеток человека. Интересно, что работа P. Liang с коллегами (2015) была отклонена ведущими журналами по этическим соображениям и вызвала бурные споры как



в научном сообществе, так и у общественности в целом (Cyranoski, 2015; Lanphier et al., 2015). Все же стало очевидно, что думать о практическом применении этой технологии на эмбрионах человека еще рано: необходимо решить много технических проблем, связанных с эффективностью и безопасностью CRISPR/Cas9. Естественно, что на первый план для современной генной терапии вышли методы редактирования генома в соматических клетках взрослого организма на основе CRISPR/Cas9.

Одна из первых работ по коррекции мутации непосредственно в тканях взрослого животного была проведена американской группой ученых на мышинной модели тирозинемии 1-го типа (Yin et al., 2014). Это заболевание связано с мутацией в гене фумарилацетоацетатгидролазы (*FAH*), которая приводит к нарушению метаболизма тирозина и в итоге к циррозу печени. Плазмидные векторы с компонентами системы CRISPR/Cas9 совместно с ДНК-олигонуклеотидом для гомологичной рекомбинации были введены в хвостовую вену мыши путем гидродинамической инъекции – в этом случае большая часть введенного раствора абсорбируется в печени. Исправление мутантного фенотипа происходило только в части клеток (0,4 %), но и этого было достаточно, так как такие клетки приобретали селективное преимущество и восстанавливали функцию печени.

В другой работе (Ding et al., 2014) мишенью стал ген пропротеиновой конвертазы (*Pcsk9*), играющей роль в гомеостазе холестерина. Известно, что при неактивном ферменте уровень холестерина в крови снижается, а, следовательно, снижается и риск коронарных заболеваний сердца. С помощью CRISPR/Cas9, упакованной в аденовирусные векторы, исследователи вносили мутации в ген *Pcsk9* в печени мыши. По их подсчетам, мутагенезу подвергалось до 50 % клеток печени, а уровень холестерина в крови при этом снижался на 35–40 %. Позднее была проведена похожая работа, но в качестве нуклеазы был использован ортолог Cas9, нуклеаза SaCas9, выделенная из бактерии *Staphylococcus aureus* (Ran et al., 2015). Ген *SaCas9* почти на 1000 п. н. меньше широко используемой нуклеазы *SpCas9*, поэтому он более эффективно упаковывается в аденовирусные частицы. Результаты этого исследования подтвердили эффективность терапии на основе SaCas9: более 40 % генно-модифицированных клеток, низкая неспецифическая активность и хорошая переносимость аденовирусных инфекций подопытными животными.

Большой прорыв сделан в генной терапии миодистрофии Дюшенна с помощью CRISPR/Cas9. Работы сразу трех научных коллективов были недавно опубликованы в одном номере журнала «Science» (Long et al., 2015; Nelson et al., 2015; Tabebordbar et al., 2015). Известно, что патология, как правило, вызывается мутациями, сдвигающими рамку считывания гена дистрофина (*dystrophin*), что приводит к отсутствию функционального белка. В таких случаях одна из потенциальных стратегий генной терапии – делеция экзона с мутацией с восстановлением рамки считывания гена. Образующийся при этом белок оказывается более коротким, но, тем не менее, функциональным. Исследователи вводили аденоассоциированные вирусы с компонентами системы CRISPR/Cas9 внутримышечно и внутривенно мышам с мутацией в гене дис-

трофина. В двух работах авторы (Long et al., 2015; Nelson et al., 2015) использовали нуклеазу SaCas9, а в третьей (Tabebordbar et al., 2015) – кодон-оптимизированный для человека вариант SpCas9. Результаты всех экспериментов одинаковы: индукция делеции мутантного участка восстанавливала экспрессию дистрофина в мышечных тканях, и подвижность животных увеличивалась. Более того, в предсказанных *in silico* off-target сайтах мутаций обнаружено не было.

Другой впечатляющий пример – это терапия пигментного ретинита. Исследование проводилось на модели пигментного ретинита крыс (S334ter-3), которая характеризуется доминантной мутацией в гене родопсина (*Rho*), приводящей к появлению стоп-кодона и укорочению белка на 15 аминокислот (Bakondi et al., 2015). Так как нуклеотидная замена вызывает возникновение РАМ-сайта (5'-TGG-3' вместо 5'-TGC-3'), стало возможным применить Cas9-индуцированный мутагенез для специфического «выключения» мутантного аллеля и частичного восстановления функции сетчатки. Интересным является то, что авторы воспользовались субретинальной инъекцией плазмид sgРНК/Cas9 с последующей электропорацией в глазах новорожденных крысят, которая оказалась эффективным методом доставки Cas9 *in vivo*.

Также в работе на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) от человека с нонсенс-мутацией в гене *RPGR* (нуклеотидная замена 3070G > T), вызывающей X-связанный пигментный ретинит, мутация была успешно исправлена с использованием короткой донорной ДНК-молекулы (ssODN) (Bassuk et al., 2016).

Описанные выше работы – примеры генной терапии, которая основана на внесении исправлений непосредственно в геном. Однако недавно ученые смогли провести эпигенетическую «подстройку» экспрессии участка генома человека. Каталитически неактивную dCas9, сшитую с транскрипционным репрессором KRAB, и sgРНК, использовали для того, чтобы изменить состояние хроматина и инактивировать D4Z4-микросателлитный повтор (Himeda et al., 2016). Аберрантная экспрессия РНК с этого района приводит к развитию одного из подтипов мышечной дистрофии – болезни Ландузи–Дежерина (*facioscapulohumeral muscular dystrophy*). Стоит сказать, что работа была проведена на культуре мышечных клеток, однако благодаря хорошим результатам можно ожидать, что она будет повторена в тестах *in vivo*.

Особый интерес представляет антивирусная терапия на основе программируемых нуклеаз. В природе CRISPR/Cas9 функционирует как система защиты бактерий от вирусной инфекции, так почему бы не применить эту защиту, прошедшую миллионы лет эволюции, для борьбы с вирусами человека? Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) в силу широкой распространенности и трудности полного излечения является наиболее подходящей мишенью. Существующая антиретровирусная терапия не позволяет избавиться от провирусов – копий вирусов, которые встроились в геном клетки. Н.-К. Liao с коллегами (2015) использовали систему CRISPR/Cas9, для того чтобы внести мутации в провирусную последовательность и снизить, таким образом, экспрессию вирусных генов. Протестировав ряд sgРНК на разные

участки вирусного генома, исследователи выяснили, что наибольшая эффективность (до 90 % резистентных к вирусу клеток) наблюдается при мутировании LTR-R региона вируса, регулирующего транскрипцию вирусной последовательности.

Параллельно развивается другая стратегия борьбы с ВИЧ – нарушение функции гена *CCR5*, кодирующего поверхностный рецептор на иммунных клетках человека. Известно, что при мутации этого гена вирус не способен проникнуть в клетку, что делает организм невосприимчивым к вирусной инфекции. Эффективность технологии CRISPR/Cas9 для получения мутаций в гене *CCR5* была показана на первичной культуре гемопоэтических стволовых клеток (Mandal et al., 2014) и на культуре индуцированных плюрипотентных клеток человека (Ye et al., 2014). Мутации в нецелевых сайтах при этом детектировались с низкой частотой. Подобные работы проводятся также и с другими системами редактирования генома (цинковопальцевые нуклеазы). В случае делеции *CCR5* с помощью цинковопальцевой нуклеазы даже проводится клиническое испытание, первые результаты которого свидетельствуют в пользу безопасности этого метода (Tebas et al., 2014). Все это говорит о большом потенциале технологий редактирования генома для генной терапии, по крайней мере в контексте заболеваний кроветворной системы.

### Геномные скрининги на базе CRISPR/Cas9

Одним из преимуществ CRISPR/Cas9 является простота клонирования и создания библиотек sgРНК для масштабных генетических скринингов. Геномные скрининги помогают обнаружить множество новых генов, функционально ассоциированных с какими-либо биологическими функциями в клетке. Обычно используют два подхода: gain-of-function («включение» экспрессии генов кДНК-библиотекой) и loss-of-function («выключение» генов за счет РНК-интерференции). Если изменение уровня экспрессии гена влияет на исследуемый биологический процесс, такой ген-кандидат затем более детально изучается дополнительными молекулярно-генетическими способами. До появления в арсенале биологов методов на основе CRISPR/Cas9 геномные скрининги в основном проводились с помощью РНК-интерференции (RNAi) (Boutros, Ahringer, 2008). Система CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ по сравнению с RNAi. Во-первых, после негативной или позитивной селекции присутствие конкретных sgРНК в выживших клетках обнаруживают с помощью глубокого секвенирования, что позволяет однозначно выявить гены-мишени. Cas9 менее токсичен для клетки, а его активность зависит только от комплекса белков NHEJ, которые вызывают мутагенез генов при репарации разрывов. Напротив, процессинг РНК в RNAi зависит от многих глобальных клеточных процессов, которые поэтому не могут быть мишенью для скрининга. К тому же при сравнении сходных по целям генетических скринингов на основе RNAi и CRISPR/Cas9 последний демонстрирует более достоверные и воспроизводимые результаты (Shalem et al., 2015).

Генетические скрининги на основе CRISPR/Cas9 активно применяются в медицине. К настоящему моменту уже опубликовано более двух десятков работ, в которых

использовали геномные CRISPR/Cas9 скрининги для анализа различных биологических аспектов: канцерогенеза и метастазирования (Toledo et al., 2015), воспаления (Schmid-Burgk et al., 2016) или митохондриальных патологий (Jain et al., 2016). Подробную информацию о некоторых исследованиях можно найти в многочисленных обзорах (Shalem et al., 2015; Xue et al., 2016).

В области канцерогенеза примером может служить эксперимент из группы Фенга Жанга (Chen et al., 2015). Линию клеток немелкоклеточного рака легких мыши, не дающего в норме метастазов, обработали лентивирусом с Cas9 и библиотекой лентивирусов с sgРНК mGeCKO (67405 sgРНК против 20611 белок-кодирующих генов и 1175 микроРНК). После недели культивирования клеток *in vitro* большая часть sgРНК была равномерно представлена в клеточной популяции, за исключением sgРНК, вызывающих мутации в генах жизненно важных клеточных процессов, которые быстро терялись из популяции. После подкожной имплантации смеси клеток в реципиентную мышь образовалась опухоль, причем на этом этапе терялось более половины исходных sgРНК. Процесс селекции клеток с различными sgРНК в первичной опухоли был в основном случайным, что отражает низкое влияние мутагенеза на способность клеток выживать при имплантации. По мере роста опухоли в ней увеличивалось число мутантных клеток с преимуществом в выживании и скорости деления, с уменьшением представленности sgРНК (4 % от исходных). Наконец, при анализе метастазов, клетки которых проходят «бутылочное горлышко» при выселении из опухоли, наблюдалось совсем небольшое количество sgРНК (0,4 % от исходных). Это подтверждает клональную теорию образования метастазов. Несколько генов (*Nf2*, *Pten*, *Cdkn2a*, *Fga*), sgРНК против которых были чаще представлены в метастазах, ассоциированы с канцерогенезом и пролиферацией опухолей.

В другой работе группа американских ученых (Parnas et al., 2015) применила обсуждаемый подход в дендритных клетках из костного мозга мыши. Примечательно, что источником первичной культуры дендритных клеток послужила созданная ранее Cas9-экспрессирующая мышь (Platt et al., 2014). Авторы заразили клетки библиотекой лентивирусов из 125,793 sgРНК – это примерно шесть независимых sgРНК на каждый ген. Для проведения отбора мутантных фенотипов дендритные клетки обрабатывали липополисахаридами, имитирующими бактериальную инфекцию. Стимулированные клетки разделялись на клеточном сортере по уровню индукции экспрессии цитокина TNF-альфа (Tumor Necrosis Factor alpha), который отвечает за ранний ответ на липополисахариды. Были обнаружены десятки генов, в том числе и новых, как негативно, так и позитивно регулирующих TNF-альфа ассоциированный сигнальный каскад. Важным технологическим улучшением было применение дополнительного этапа валидации результатов для 2569 генов, обнаруженных в первичном скрининге. Для этого большое число клеток было заражено с покрытием в 10 sgРНК на ген из первичного списка и повторно проверено, что позволило повысить точность детекции.

Новые перспективы для генетических скринингов на основе CRISPR/Cas9 открываются по мере модификации

системы. К примеру, Cas9 может связывать и разрезать РНК-транскрипты (O'Connell et al., 2014), предоставляя платформу для высокопроцессивного нокдауна экспрессии генов. Присоединение к инактивированной Cas9 активаторных или репрессорных доменов различных белков также применяется для скринингов. S. Konermann с коллегами активировали гены в клетках меланомы, обработанных противоопухолевым агентом, ингибитором протоонкогена BRAF (вемурафенибом), и обнаружили гены, гиперэкспрессия которых ассоциирована с устойчивостью раковых клеток к этому препарату (Konermann et al., 2014). Многие из выявленных генов были известны врачам ранее – это в основном компоненты сигнальных путей (PI3K-АКТ, ERK и др.), компенсирующих ингибирование BRAF в раковых клетках. Было уже ясно, что их гиперэкспрессия коррелирует с плохим прогнозом при лечении вемурафенибом, однако скрининг обнаружил и множество новых генов-кандидатов. Для CRISPR/Cas9-скринингов будут полезны химерные белки на основе Cas9, несущие каталитически активные домены, как в случае с доменом ацетилтрансферазы, способной модифицировать гистоны (Hilton et al., 2015); а также присоединение к sgРНК длинных некодирующих РНК для выяснения их функций (Shechner et al., 2015). Важной задачей будет создание библиотек sgРНК и для некодирующих районов генома.

Снижение стоимости высокопроизводительных методов секвенирования (NGS) и открытое распространение sgРНК-библиотек для геномов различных организмов должны в скором времени сделать геномные скрининги на основе CRISPR/Cas9 доступными во многих лабораториях мира.

### Применение CRISPR/Cas9 для внесения масштабных геномных мутаций (делеций, инверсий)

Использование универсального и эффективного метода геномного редактирования крайне необходимо и для получения хромосомных перестроек большого масштаба. Образование индел-мутаций (удаление–вставка нескольких нуклеотидов на месте репарационных событий) не всегда является достаточным условием для полной инактивации генетического элемента. Например, в случае с кластерами генов существуют множественные варианты транскриптов или же альтернативные старт-кодоны, расположенные в том же гене, способные при выпадении или вставке нескольких нуклеотидов исправить возникшую поломку; для нетранслируемых некодирующих молекул РНК или регуляторных последовательностей возникновение небольших мутаций не является серьезным препятствием для реализации их клеточной функции (Zhang et al., 2015). Таким образом, для функциональных исследований регуляторных и структурных элементов генома, генных кластеров, длинных некодирующих РНК (lncRNA), tandemно дублированных генов необходимы технологии, способные индуцировать направленные хромосомные перестройки в диапазоне от сотен до нескольких сотен тысяч п. н. Методы и системы клонирования, используемые прежде, например, ВАС (бактериальные искусственные хромосомы) и YAC (дрожжевые искусственные хромосо-

мы), довольно трудоемки в исполнении и, кроме того, не позволяют достичь желаемой эффективности.

CRISPR/Cas9 вызывает делецию, если вносит два одновременных разрыва в одном хромосомном локусе, при этом крупные хромосомные инверсии и дупликации при использовании Cas9 получаются спонтанно, с небольшой частотой. Одними из первых работ с применением CRISPR/Cas-системы, в которых удалось получить делеции и инверсии крупного масштаба, а также сравнить эффективность использования CRISPR/Cas9 и TALEN-систем, стали работы на геноме *Danio rerio* (Gupta et al., 2013; Gonzales et al., 2014; Ota et al., 2014). Были получены делеции гена микроРНК *dre-mir-126a* размером 563 п. н., а также кластера из шести генов – от *dre-mir-17a-2* до *dre-mir-92a-2* – величиной 1423 п. н. (Xiao et al., 2013). В другой работе была реализована возможность получения множественных геномных модификаций путем пронуклеарной инъекции мРНК нескольких направляющих в один локус РНК-молекул (sgРНК) и белка Cas9 в эмбрионы *Danio rerio* на 1–2-клеточной стадии (Ota et al., 2014). В результате были получены делеции до 7,1 тыс. п. н.

Затем последовало множество работ на различных модельных организмах, где при помощи CRISPR/Cas9 технологии удалось получить направленные перестройки крупного масштаба. На дрозофиле была проведена модификация локусов *rosy* и *yellow*, в результате чего были получены делеции размером 4,6 и 6,1 тыс. п. н. (Gratz et al., 2013). В экспериментах с CRISPR/Cas9 на эмбрионах аксолотля был получен нокаут по гену *Sox2* путем делеции геномного участка (Fei et al., 2014). Кроме того, система CRISPR/Cas9 оказалась применима и для удаления участков генома анаэробных грамм-положительных бактерий *Clostridium beijerinckii*, у которых практически отсутствует гомологичная рекомбинация, что затрудняло получение перестроек традиционными методами (Wang et al., 2015b). Совсем недавно была опубликована статья, в которой исследователи описали удаление фрагмента гена тирозиназы (*TYR*), связанного с альбинизмом, длиной 105 тыс. п. н. из генома кролика (Song et al., 2016). Доставка мРНК Cas9 и направляющих РНК-молекул осуществлялась пронуклеарной микроинъекцией в эмбрионы. В эксперименте наблюдалась достаточно высокая эффективность получения делеций: 10 % при ПЦП-скрининге эмбрионов и 18 % у рожденных крольчат.

Наиболее масштабные работы по получению делеций и инверсий с использованием CRISPR/Cas9-технологии проводились на клетках мыши и человека (Fujii et al., 2013; Li et al., 2013; Bauer et al., 2014; Canver et al., 2014; Choi et al., 2014; Essletzbichler et al., 2014; Fujihara et al., 2014; Zheng et al., 2014; Zhou et al., 2014; Brandl et al., 2015; He et al., 2015; Kraft et al., 2015; Zhang et al., 2015). Важной исследовательской задачей являются оптимизация процесса, достижение максимальной эффективности и скорости получения направленных геномных модификаций. Несколько крупных проектов были посвящены получению модельных животных для изучения патогенеза генетически обусловленных заболеваний, связанных с хромосомными aberrациями. В одной из работ на эту тему (Kraft et al., 2015) авторы представили подробный протокол получения трансгенных мышей с крупными

(до 1600 тыс. п. н.) структурными перестройками по геному с эффективностью до 42 %, названный CRISVar. Реализация предложенного протокола от момента дизайна специфических sgРНК-векторов до рождения химерных животных занимает 10 нед, что в несколько раз ускоряет процесс получения животных моделей по сравнению с 12 мес., затрачиваемыми ранее. Исследователям удалось детектировать делеции и инверсии для всех шести запланированных локусов (размеры делеций 1,2–1672 тыс. п. н. соответственно), тогда как процент возникновения дупликаций был в среднем в 1,5 раза ниже (Kraft et al., 2015).

Серьезной проблемой в данной области является то, что вероятность получения направленных геномных перестроек находится в определенной зависимости от размера последних. Причем выявление этой зависимости представляет предмет активных научных дискуссий (Xiao et al., 2013; Canver et al., 2014; He et al., 2015; Kraft et al., 2015; Song et al., 2016). Согласно данным из работы Kraft с коллегами (2015), взаимосвязь между размером модификации и частотой ее возникновения под действием CRISPR/Cas9-системы в эмбриональных стволовых клетках мыши отмечена не была. Но в исследовании, которое проводилось на линии клеток мышины эритролейкемии (MEL), авторы выявили обратную зависимость частоты возникновения перестройки от ее размера и предложили формулу функции нелинейной регрессии как наиболее подходящую для описания наблюдаемой корреляции (Canver et al., 2014). Помимо закономерности получения делеций, в данной работе была показана возможность удаления фрагментов ДНК размером от 1,3 до 1026 тыс. п. н. для локусов, расположенных в экзонах, интронах генов, а также в межгенных участках. Средняя эффективность процесса образования делеций составила 14,2 %, при этом фрагменты до 23 тыс. п. н. удалялись значительно лучше, тогда как последовательности свыше 70 тыс. – с эффективностью меньше 1 %. Частота образования инверсий составила 5,8 %, инверсии крупных размеров происходили со сниженной эффективностью. В одной из работ на линии НЕК293Т были получены свидетельства о независимости мутационного процесса с участием системы CRISPR/Cas9 от транскрипционного статуса выбранного района (Zheng et al., 2014). Авторы вносили делеции в ген цитокина *CCL2*, предварительно многократно усиливая его экспрессию добавлением фактора TNF-альфа, действующего на экспрессию *CCL2* через NF-κB сигнальный путь. Активность гена выросла примерно в 300 раз, при этом эффективность геномных перестроек осталась сравнительно неизменной, в среднем диапазоне 16–28 % (Zheng et al., 2014).

Получение крупных делеций имеет ценность и для некоторых медицинских исследований, нацеленных на исправление дефектных последовательностей генов при моногенных заболеваниях. Выше мы уже упоминали подходы, применяемые для восстановления рамки считывания гена дистрофина при миодистрофии Дюшенна за счет удаления мутантных экзонов. Известно, что более 60 % мутаций в гене дистрофина, приводящие к развитию миодистрофии Дюшенна, происходят между 45 и 55-м экзоном. В многочисленных исследованиях, в том числе и с использованием системы CRISPR/Cas9, показано,

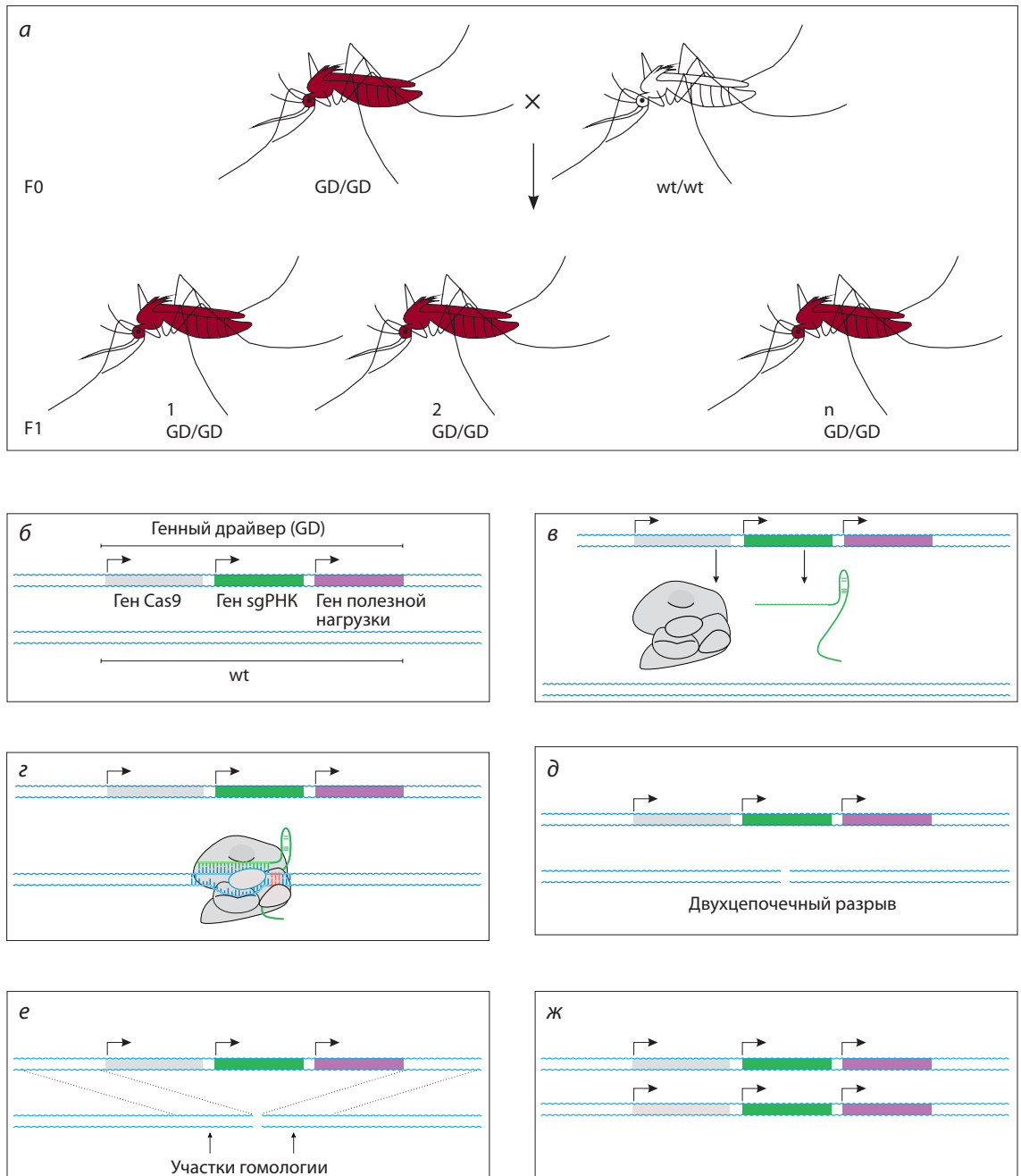
что делеция этого района дистрофина, имеющего размер около 725 тыс. п. н., приводит к образованию укороченного, но функционального белка. Преимущество этой универсальной стратегии в том, что делеция большого участка гена применима для лечения множества пациентов с миодистрофией Дюшенна и требует тестирования и использования лишь одной пары sgРНК (Ousterout et al., 2015; Young et al., 2016).

Как было отмечено в начале раздела, одна из задач, решить которую стало возможно благодаря появлению CRISPR/Cas технологии, – это исследование функции и роли длинных некодирующих РНК. Накапливается все больше информации о вовлеченности таких РНК-молекул во многие клеточные процессы, в числе которых и их участие в регуляции генной транскрипции (Nagano et al., 2011). Точности существующих генно-инженерных методов оказалось недостаточно для направленного удаления протяженных нуклеотидных последовательностей некодирующих РНК, так как последние могут иметь множественные альтернативные варианты. Классические способы модификации генома с привлечением гомологичной рекомбинации в случае крупных перестроек неудобны и малоэффективны. CRISPR/Cas9-система позволяет решить эту проблему, что было продемонстрировано в работе с lncРНК *Rian*, у которой есть многочисленные альтернативные формы (Han et al., 2014). Инъекция *in vitro* транскрибированные мРНК Cas9 и sgРНК в одноклеточные эмбрионы, исследователям удалось получить делеции в *Rian*-локусе размером до 23 тыс. п. н. при использовании пары направляющих РНК-молекул, а также повысить эффективность этого процесса до 33 % при участии нескольких sgРНК. Удаление кодирующей последовательности *Rian* привело к полному исчезновению ее экспрессии с материнского аллеля, а также к изменению экспрессии близлежащих генов в различных тканях.

В заключение стоит отметить, что делеции и инверсии при использовании CRISPR/Cas9 получаются на удивление легко и с высокой частотой. Так что не стоит забывать, что они могут произойти и случайно при одновременной доставке в клетки множества sgRNA для других целей (Niu et al., 2014; Frock et al., 2015).

### **CRISPR/Cas9 как основа создания искусственных генных драйверов**

Высокая эффективность системы CRISPR/Cas9 открыла новые возможности для контроля численности популяции насекомых-переносчиков заболеваний человека. Для этого было предложено внедрять в природные популяции насекомых-переносчиков, таких как малярийные комары, искусственные генетические элементы, инсерция которых приводит к нокауту определенных генов. Такие элементы (генные драйверы) способны конвертировать сопутствующий нормальный аллель и копировать себя, поэтому они быстро распространяются в популяции (рис. 3), даже если их наличие в геноме приводит к уменьшению приспособленности особи (Unckless et al., 2015). Идея использования искусственного автономного генетического элемента на основе программируемой нуклеазы была высказана более 10 лет назад (Burt, 2003), однако полноценная реализация данного подхода стала возможной



**Рис. 3.** Генные драйверы на основе CRISPR/Cas9.

а – схема наследования генного драйвера (GD); б–ж – копирование генного драйвера в аллель дикого типа (wt): б – схема генного драйвера; в – в клетке нарабатываются белок Cas9 и sgРНК; г – комплекс Cas9-sgРНК связывается с аллелем дикого типа; д – Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в аллель дикого типа; е – двухцепочечный разрыв репарируется системой гомологичной репарации по матрице хромосомы, содержащей генный драйвер; ж – в результате репарации появляется клетка, гомозиготная по генному драйверу.

только после создания простой и эффективной системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Проверка принципа предложенной идеи была проведена на дрозофиле (Gantz, Vier, 2015). С помощью традиционного способа получения трансгенных мух – микроинъекции генетической конструкции в оплодотворенное яйцо – были получены мухи, у которых в геномный локус *yellow* (*y*) была введена генетическая конструкция, состоящая из трех основных

элементов. Это, во-первых, кодирующая часть белка Cas9 под контролем промотора, обеспечивающего активность гена и в соматических, и в герминальных клетках; во-вторых, sgРНК, комплементарная выбранному участку гена *yellow*. Наконец, фланкировали конструкцию плечи гомологии – протяженные последовательности, гомологичные участкам справа и слева от вносимого разрыва в гене *y*. Поскольку интеграция конструкции приводит

к нокауту по гену *u*, наследование конструкции можно проследить по фенотипу мух. При скрещивании мух, гомозиготных по наличию трансгена (*y-/y-*), с мухами дикого типа (*y+/y+*) ожидается, что все потомки будут гетерозиготами по трансгену (*y+/y-*), однако в данном случае классические законы Менделя (Mendel, 1865) нарушаются, так что практически все (97 %) потомки имели фенотип *y-/y-* и были гомозиготами по трансгену. Особенность наследования этой конструкции объясняется тем, что на самых ранних стадиях развития за счет активности Cas9 и sgPHK, унаследованных в составе трансгенной конструкции от одного из родителей, вносится двухцепочечный разрыв в локус *y+*, унаследованный от второго родителя. Далее разрыв репарируется по механизму гомологичной рекомбинации, причем в качестве матрицы используется локус, несущий трансген, так как он фланкирован последовательностями, гомологичными району разрыва. При этом происходит копирование трансгенной конструкции в нормальный аллель. Следовательно, конструкции такого типа наследуются не только вертикально, от родителя к потомкам, но и горизонтально, в ядре клетки от трансгенного локуса в локус дикого типа (Gantz, Bier, 2015).

Применение этой технологии было опробовано на двух видах комаров *Anopheles stephensi* (Gantz, Bier, 2015) и *Anopheles gambiae* (Hammond et al., 2015). В обеих работах была продемонстрирована высокая эффективность наследования трансгенной конструкции. Однако дизайн экспериментов несколько отличался. V.M. Gantz с коллегами (2015), помимо элементов, обеспечивающих интеграцию (Cas9, sgPHK и плечи гомологии), ввели в конструкцию два гена одноцепочечных антител против антигенов возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. Такая конструкция, будучи введенной в нейтральный локус генома, не будет сказываться на приспособленности комара, но сделает его неспособным к передаче малярийного плазмодия. Хотя такая стратегия кажется привлекательной, поскольку мало влияет на комаров как вид, она, возможно, окажется не столь эффективной в борьбе с распространением малярии, поскольку может вызвать быструю эволюцию антигенов плазмодия, в результате которой они станут нечувствительными к используемым антителам (Alphey, 2016). A. Hammond с коллегами (2015) тоже предлагают использовать Cas9-подход для уменьшения численности популяции малярийных комаров. Для этого трансгенную конструкцию вводят в гены, нокаут по которым в гомозиготном состоянии приводит к стерильности самок. Моделирование распространения этого элемента в популяции показало, что доля его носителей может увеличиться с 0,05 до 0,9 менее, чем за два года. При этом доля фертильных самок станет меньше 20 % и далее продолжит уменьшаться вплоть до полного уничтожения популяции (Burt, 2003; Deredec et al., 2008). Вопросы безопасности применения таких крайне инвазивных конструкций, потенциально способных уничтожить биологический вид, безусловно, должны быть детально проанализированы до принятия решения об их использовании. Поэтому уже сейчас разрабатываются подходы для контроля распространения в популяции генетических драйверов на основе Cas9 (Wu et al., 2016).

Подробное обсуждение технологии генетических драйверов можно найти в недавнем обзоре группы американских ученых (Champer et al., 2016).

## Заключение

Появление системы CRISPR/Cas9 в арсенале геномной инженерии оказало огромное влияние на биологию. С 2013 г., когда были опубликованы первые свидетельства о «программируемости» Cas9 для редактирования генома, систему CRISPR/Cas9 начали использовать в тысячах лабораторий по всему миру (по данным сайта Addgene). Редакции многих уважаемых журналов (например, «Science» и «Nature»), называют это не менее чем Cas9-помешательством (Cas9 «craze» и «frenzy»). Мы предлагаем обзор наиболее важных, на наш взгляд, областей биологии, в которых система CRISPR/Cas9 оказалась особенно востребована. Среди них, конечно, генная терапия, хромосомная инженерия и геномные скрининги, а также создание трансгенных животных. К сожалению, в рамках обзора мы не смогли подробно обсудить использование CRISPR/Cas9 для активации и репрессии экспрессии генов, эпигенетической модификации состояния хроматина и флуоресцентного мечения специфических участков хромосом. Не упомянуты также создание трансгенных животных-биопродукторов и многое другое, включая и совсем отдаленные перспективы – воскрешение вымерших видов животных (странствующего голубя или мамонта) – на основе геномов современных видов. В ближайшем будущем можно ожидать идентификации новых уникальных ДНК и РНК-редактирующих нуклеаз среди тысяч белков из CRISPR/Cas-систем.

## Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект 16-14-00095).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Alphey L. Can CRISPR-Cas9 gene drives curb malaria? Nat. Biotechnol. 2016;34(2):149-150.
- 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.
- Bakondi B., Lv W., Lu B., Jones M.K., Tsai Y., Kim K.J., Levy R., Akhtar A.A., Breunig J.J., Svendsen C.N., Wang S. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther. 2015;24(3):556-563.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science (N.Y.). 2007; 315(5819):1709-1712.
- Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.L. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. Cell Rep. 2013;4(1):220-228.
- Bassuk A.G., Zheng A., Li Y., Tsang S.H., Mahajan V.B. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells. Sci. Rep. 2016;6:19969.
- Bauer D.E., Canver M.C., Orkin S.H. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. J. Vis. Exp. 2014;83:e52118.

- Bolukbasi M.F., Gupta A., Wolfe S.A. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nat. Methods*. 2016; 13(1):37-40.
- Boutros M., Ahringer J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 2008;9(7):554-566.
- Brandl C., Ortiz O., Rottig B., Wefers B., Wurst W., Kuhn R. Creation of targeted genomic deletions using TALEN or CRISPR/Cas nuclease pairs in one-cell mouse embryos. *FEBS Open Bio*. 2015;5:26-35.
- Burt A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 2003;270(1518):921-928.
- Canver M.C., Bauer D.E., Dass A., Yien Y.Y., Chung J., Masuda T., Maeda T., Paw B.H., Orkin S.H. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/cas9 nuclease system in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2014;289(31):21312-21324.
- Champer J., Buchman A., Akbari O.S. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17(3):146-159.
- Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., Huang B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. 2013;155(7):1479-1491.
- Chen S., Sanjana N.E., Zheng K., Shalem O., Lee K., Shi X., Scott D.A., Song J., Pan J.Q., Weissleder R., Lee H., Zhang F., Sharp P.A. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*. 2015;160(6):1246-1260.
- Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L., Katz Y., Theunissen T.W., Rangarajan S., Shivalila C.S., Dadon D.B., Jaenisch R. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. 2013;23(10):1163-1171.
- Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.-S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*. 2014;24(1):132-141.
- Choi P.S., Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat. Commun.* 2014;5:3728.
- Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):543-548.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823.
- Costello M.J., May R.M., Stork N.E. Can we name Earth's species before they go extinct? *Science*. 2013;339(6118):413-416.
- Cox D.B.T., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* 2015;21(2):121-131.
- Crispo M., Mulet A.P., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., dos Santos-Neto P.C., Nguyen T.H., Crénéguy A., Brusselle L., Anegón I., Menchaca A. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0136690.
- Cyranoski D. Embryo editing divides scientists. *Nature*. 2015;519(7543):272.
- Davis K.M., Pattanayak V., Thompson D.B., Zuris J.A., Liu D.R. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* 2015;11(5):316-318.
- Deredec A., Burt A., Godfray H.C.J. The population genetics of using homing endonuclease genes in vector and pest management. *Genetics*. 2008;179(4):2013-2026.
- Dianov G.L., Hübscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(6):3483-3490.
- Ding Q., Strong A., Patel K.M., Ng S.L., Gosis B.S., Regan S.N., Cowan C.A., Rader D.J., Musunuru K. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* 2014;115(5):488-492.
- Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):184-191.
- Elliott B., Richardson C., Winderbaum J., Nickoloff J.A., Jasin M. Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(1):93-101.
- Essletzbichler P., Konopka T., Santoro F., Chen D., Gapp B.V., Kralovics R., Brummelkamp T.R., Nijman S.M.B., Bürckstümmer T. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res*. 2014;24(12):2059-2065.
- Fei J.F., Schuez M., Tazaki A., Taniguchi Y., Roensch K., Tanaka E.M. CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem Cell Reports*. 2014;3(3):444-459.
- Findlay G.M., Boyle E.A., Hause R.J., Klein J.C., Shendure J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature*. 2014;513(7516):120-123.
- Flowers J.J., He S., Malfatti S., del Rio T.G., Tringe S.G., Hugenholtz P., McMahon K.D. Comparative genomics of two "Candidatus Accumulibacter" clades performing biological phosphorus removal. *ISME J*. 2013;7(12):2301-2314.
- Frock R.L., Hu J., Meyers R.M., Ho Y.-J., Kii E., Alt F.W. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(2):179-186.
- Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):822-826.
- Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(3):279-284.
- Fujihara Y., Ikawa M. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. *Method. Enzymol.* 2014;546:319-336.
- Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K., Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(20):e187.
- Gantz V.M., Bier E. The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*. 2015; 348(6233):442-444.
- Gantz V.M., Jasinskiene N., Tatarenkova O., Fazekas A., Macias V.M., Bier E., James A.A. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2015;112(49):E6736-E6743.
- Geisinger J.M., Turan S., Hernandez S., Spector L.P., Calos M.P. In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. *Nucl. Acids Res.* 2016;44(8):e76.
- Gonzales A.P.W., Yeh J.R. Cas9-based genome editing in Zebrafish. *Methods Enzymol.* 2014;546:377-413.
- González F., Zhu Z., Shi Z.-D., Lelli K., Verma N., Li Q.V., Huangfu D. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):215-226.
- Graham D.B., Root D.E. Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome Biol.* 2015;16(1):260.
- Gratz S.J., Wildonger J., Harrison M.M., O'Connor-Giles K.M. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Fly*. 2013;7(4):37-41.
- Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):577-582.
- Gupta A., Hall V.L., Kok F.O., Shin M., McNulty J.C., Lawson N.D., Wolfe S.A. Targeted chromosomal deletions and inversions in zebrafish. *Genome Res*. 2013;23(6):1008-1017.
- Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A.,

- Windbichler N., Crisanti A., Nolan T. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* 2015;34(1):1-8.
- Han J., Zhang J., Chen L., Shen B., Zhou J., Hu B., Du Y., Tate P.H., Huang X., Zhang W. Efficient in vivo deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biology.* 2014;11(7):829-835.
- He Z., Proudfoot C., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C.B.A., Lillo S.G. Highly efficient targeted chromosome deletions using CRISPR/Cas9. *Biotechnol. Bioeng.* 2015;112(5):1060-1064.
- Hendel A., Bak R.O., Clark J.T., Kennedy A.B., Ryan D.E., Roy S., Steinfeld I., Lunstad B.D., Kaiser R.J., Wilkens A.B., Bacchetta R., Tsalenko A., Dellinger D., Bruhn L., Porteus M.H. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(9):985-989.
- Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E., Reddy T.E., Gersbach C.A. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):510-517.
- Himeda C.L., Jones T.I., Jones P.L. CRISPR/dCas9-mediated transcriptional inhibition ameliorates the epigenetic dysregulation at D4Z4 and represses DUX4-fl in FSH muscular dystrophy. *Mol. Ther.: J. Am. Soc. Gene Ther.* 2016;24(3):527-535.
- Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L.-F., Sontheimer E.J., Thomson J.A. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013;110(39):15644-15649.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):827-832.
- Hu X., Chang N., Wang X., Zhou F., Zhou X., Zhu X., Xiong J.-W. Heritable gene-targeting with gRNA/Cas9 in rats. *Cell Res.* 2013;23(11):1322-1325.
- Jain I.H., Zazzaron L., Goli R., Alexa K., Schatzman-Bone S., Dhillon H., Goldberger O., Peng J., Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F., Goessling W., Zapot W.M., Mootha V.K. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science.* 2016;352(6281):54-61.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-821.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science.* 2014;343(6176):1247997.
- Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529(7587):490-495.
- Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* 2014;517(7536):583-588.
- Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragesteen B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupianez D.G., Andrey G. Deletions, inversions, duplications: Engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Reports.* 2015;10(5):833-839.
- Kuscu C., Arslan S., Singh R., Thorpe J., Adli M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(7):677-683.
- Lanphier E., Urnov F.D., Ehlen S.H., Werner M., Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature.* 2015;519:410-411.
- Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., Zhao Y., Liu M. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(8):681-683.
- Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363-372.
- Liao H.-K., Gu Y., Diaz A., Marlett J., Takahashi Y., Li M., Suzuki K., Xu R., Hishida T., Chang C.-J., Esteban C.R., Young J., Izpisua Belmonte J.C. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat. Commun.* 2015;6:6413.
- Lin Y., Cradick T.J., Brown M.T., Deshmukh H., Ranjan P., Sarode N., Wile B.M., Vertino P.M., Stewart F.J., Bao G. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 2014;42(11):7473-7485.
- Liu X., Homma A., Sayadi J., Yang S., Ohashi J., Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Reports.* 2016;6:19675.
- Long C., Amoasii L., Mireault A.A., McAnally J.R., Li H., Sanchez-Ortiz E., Bhattacharyya S., Shelton J.M., Bassel-Duby R., Olson E.N. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science.* 2015;351(6271):400-403.
- Long C., McAnally J.R., Shelton J.M., Mireault A.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science.* 2014;345(6201):1184-1188.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E. V An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13(11):722-736.
- Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):833-838.
- Malina A., Cameron C.J.F., Robert F., Blanchette M., Dostie J., Pelletier J. PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. *Nat. Commun.* 2015;6:10124.
- Mandal P.K., Ferreira L.M.R., Collins R., Meissner T.B., Boutwell C.L., Friesen M., Vrbancac V., Garrison B.S., Storchveoi A., Bryder D., Musunuru K., Brand H., Tager A.M., Allen T.M., Talkowski M.E., Rossi D.J., Cowan C.A. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell.* 2014;15(5):643-652.
- Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):538-542.
- Mendel G. Experiments in plant hybridization. *J. Roy. Hort. Soc.* 1865;IV(1865):3-47.
- Mora C., Tittensor D.P., Adl S., Simpson A.G.B., Worm B. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 2011;9(8):e1001127.
- Nagano T., Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell.* 2011;145(2):178-181.
- Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature.* 2015;526(7573):351-360.
- Nelson C.E., Gersbach C.A. Cas9 loosens its grip on off-target sites. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(3):298-299.
- Nelson C.E., Hakim C.H., Ousterout D.G., Thakore P.I., Moreb E.A., Rivera R.M.C., Madhavan S., Pan X., Ran F.A., Yan W.X., Asokan A., Zhang F., Duan D., Gersbach C.A. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2015;351(6271):403-407.
- Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A., Chen C. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e106718.



- Nishimasu H., Cong L., Yan W.X., Ran F.A., Zetsche B., Li Y., Kura-bayashi A., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*. 2015;162(5):1113-1126.
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949.
- Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A.P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014;156(4): 836-843.
- O'Connell M.R., Oakes B.L., Sternberg S.H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J.A. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*. 2014;516(7530):263-266.
- Ota S., Hisano Y., Ikawa Y., Kawahara A. Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes to Cells*. 2014;19(7):555-564.
- Ousterout D.G., Kabadi A.M., Thakore P.I., Majoros W.H., Reddy T.E., Gersbach C.A. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2015;6:6244.
- Parnas O., Jovanovic M., Eisenhaure T.M., Herbst R.H., Dixit A., Ye C.J., Przybylski D., Platt R.J., Tirosch I., Sanjana N.E., Shalem O., Satija R., Raychowdhury R., Mertins P., Carr S.A., Zhang F., Hacohen N., Regev A. A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks. *Cell*. 2015;162(3):675-686.
- Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9):839-843.
- Peng J., Wang Y., Jiang J., Zhou X., Song L., Wang L., Ding C., Qin J., Liu L., Wang W., Liu J., Huang X., Wei H., Zhang P. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Sci. Reports*. 2015;5:16705.
- Pinder J., Salsman J., Dellaire G. Nuclear domain "knock-in" screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucl. Acids Res.* 2015;43(19): 9379-9392.
- Platt R.J., Chen S., Zhou Y., Yim M.J., Swiech L., Kempton H.R., Dahlman J.E., Parnas O., Eisenhaure T.M., Jovanovic M., Graham D.B., Jhunjhunwala S., Heidenreich M., Xavier R.J., Langer R., Anderson D.G., Hacohen N., Regev A., Feng G., Sharp P.A., Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*. 2014;159(2):440-455.
- Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015;520(7546):186-191.
- Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.-Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380-1389.
- Robert F., Barbeau M., Éthier S., Dostie J., Pelletier J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Gen. Med.* 2015;7(1):93.
- Schmid-Burgk J.L., Chauhan D., Schmidt T., Ebert T.S., Reinhardt J., Endl E., Hornung V. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) screen identifies NEK7 as an essential component of NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(1):103-109.
- Semenova E., Jore M.M., Datsenko K.A., Semenova A., Westra E.R., Wanner B., van der Oost J., Brouns S.J., Severinov K. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011;108(25):10098-10103.
- Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 2015;16(5):299-311.
- Shechner D.M., Hacisuleyman E., Younger S.T., Rinn J.L. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. *Nat. Methods*. 2015;12(7):664-670.
- Slymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2015;351(6268):84-88.
- Song Y., Yuan L., Wang Y., Chen M., Deng J., Lv Q., Sui T., Li Z., Lai L. Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;1:1-10.
- Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014;507(7490):62-67.
- Tabebordbar M., Zhu K., Cheng J.K.W., Chew W.L., Widrick J.J., Yan W.X., Maesner C., Wu E.Y., Xiao R., Ran F.A., Cong L., Zhang F., Vandenberghe L.H., Church G.M., Wagers A.J., Vandenberghe H., Church G.M., Wagers A.J. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*. 2015;351(6271):407-411.
- Tan W., Proudfoot C., Lillico S.G., Whitelaw C.B.A. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res.* 2016;25(3): 273-287.
- Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L.S., Weissman J.S., Vale R.D. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*. 2014;159(3):635-646.
- Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., Spratt S.K., Surosky R.T., Giedlin M.A., Nichol G., Holmes M.C., Gregory P.D., Ando D.G., Kalos M., Collman R.G., Binder-Scholl G., Plesa G., Hwang W.-T., Levine B.L., June C.H. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *New Engl. J. Med.* 2014;370(10):901-910.
- Toledo C.M., Ding Y., Hoellerbauer P., Davis R.J., Basom R., Girard E.J., Lee E., Corrin P., Hart T., Bolouri H., Davison J., Zhang Q., Hardcastle J., Aronow B.J., Plaisier C.L., Baliga N.S., Moffat J., Lin Q., Li X.-N., Nam D.-H., Lee J., Pollard S.M., Zhu J., Delrow J.J., Clurman B.E., Olson J.M., Paddison P.J. Genome-wide CRISPR-Cas9 screens reveal loss of redundancy between PKMYT1 and WEE1 in glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Reports*. 2015;13(11):2425-2439.
- Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung J.K. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):569-576.
- Unckless R.L., Messer P.W., Connallon T., Clark A.G. Modeling the manipulation of natural populations by the mutagenic chain reaction. *Genetics*. 2015;201(2):425-431.
- Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-918.
- Wang X., Zhou J., Cao C., Huang J., Hai T., Wang Y., Zheng Q., Zhang H., Qin G., Miao X., Wang H., Cao S., Zhou Q., Zhao J. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs. *Sci. Reports*. 2015a;5:13348.
- Wang Y., Zhang Z.T., Seo S.O., Choi K., Lu T., Jin Y.S., Blaschek H.P. Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. *J. Biotechnol.* 2015b;200:1-5.
- Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D., Prather R.S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol. Reprod.* 2014;91(3):78.
- Wiedenheft B., Lander G.C., Zhou K., Jore M.M., Brouns S.J., van der Oost J., Doudna J.A., Nogales E. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*. 2011; 477(7365):486-489.

- Wijshake T., Baker D.J., van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1842(10): 1942-1950.
- Wright A.V., Nunez J.K., Doudna J.A. Review biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 2016;164(1-2):29-44.
- Wright A.V., Sternberg S.H., Taylor D.W., Staahl B.T., Bardales J.A., Kornfeld J.E., Doudna J.A. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015;112(10):2984-2989.
- Wu B., Luo L., Gao X.J. Cas9-triggered chain ablation of cas9 as a gene drive brake. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):137-138.
- Wu X., Scott D.A., Kriz A.J., Chiu A.C., Hsu P.D., Dadon D.B., Cheng A.W., Trevino A.E., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp P.A. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(7):670-676.
- Wu Y., Liang D., Wang Y., Bai M., Tang W., Bao S., Yan Z., Li D., Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):659-662.
- Wyvekens N., Topkar V.V., Khayter C., Joung J.K., Tsai S.Q. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Hum. Gene Ther.* 2015; 26(7):425-431.
- Xiao A., Wang Z., Hu Y., Wu Y., Luo Z., Yang Z., Zu Y., Li W., Huang P., Tong X., Zhu Z., Lin S., Zhang B. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(14):1-11.
- Xue H.Y., Ji L.J., Gao A.M., Liu P., He J.D., Lu X.J. CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives. *J. Med. Genet.* 2016;53(2):91-97.
- Yang D., Scavuzzo M.A., Chmielowiec J., Sharp R., Bajic A., Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci. Reports.* 2016;6:21264.
- Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013a;154(6): 1370-1379.
- Yang L., Grishin D., Wang G., Aach J., Zhang C.-Z., Chari R., Homzy J., Cai X., Zhao Y., Fan J.-B., Seidman C., Seidman J., Pu W., Church G. Targeted and genome-wide sequencing reveal single nucleotide variations impacting specificity of Cas9 in human stem cells. *Nat. Commun.* 2014;5:5507.
- Yang L., Guell M., Byrne S., Yang J.L., De Los Angeles A., Mali P., Aach J., Kim-Kiselak C., Briggs A.W., Rios X., Huang P.Y., Daley G., Church G. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucl. Acids Res.* 2013b;41(19):9049-9061.
- Yang L., Guell M., Niu D., George H., Lesho E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkinson R.A., Fishman J.A., Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015;350(6264):1101-1104.
- Ye L., Wang J., Beyer A.I., Teque F., Cradick T.J., Qi Z., Chang J.C., Bao G., Muench M.O., Yu J., Levy J.A., Kan Y.W. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014;111(26):9591-9596.
- Yen S.T., Zhang M., Deng J.M., Usman S.J., Smith C.N., Parker-Thornburg J., Swinton P.G., Martin J.F., Behringer R.R. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev. Biol.* 2014;393(1):3-9.
- Yin H., Xue W., Chen S., Bogorad R.L., Benedetti E., Grompe M., Kotliansky V., Sharp P.A., Jacks T., Anderson D.G. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(6):551-553.
- Young C.S., Hicks M.R., Ermolova N.V., Nakano H., Jan M., Younesi S., Karumbayaram S., Kumagai-Cresse C., Wang D., Zack J.A., Kohn D.B., Nakano A., Nelson S.F., Miceli M.C., Spencer M.J., Pyle A.D. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell.* 2016;18(4):533-540.
- Yu C., Liu Y., Ma T., Liu K., Xu S., Zhang Y., Liu H., La Russa M., Xie M., Ding S., Qi L.S. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2015;16(2): 142-147.
- Yuan L., Sui T., Chen M., Deng J., Huang Y., Zeng J., Lv Q., Song Y., Li Z., Lai L. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci. Reports.* 2016;6: 22024.
- Zalatan J.G., Lee M.E., Almeida R., Gilbert L.A., Whitehead E.H., La Russa M., Tsai J.C., Weissman J.S., Dueber J.E., Qi L.S., Lim W.A. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell.* 2014;160(1-2):339-350.
- Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015a;163(3): 759-771.
- Zetsche B., Volz S.E., Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* 2015b;33(2):139-142.
- Zhang L., Jia R., Palange N.J., Satheka A.C., Togo J., An Y., Humphrey M., Ban L., Ji Y., Jin H., Feng X., Zheng Y. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE.* 2015;10(3):1-14.
- Zheng Q., Cai X., Tan M.H., Schaffert S., Arnold C.P., Gong X., Chen C.Z., Huang S. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *BioTechniques.* 2014; 57(3):115-124.
- Zhou J., Wang J., Shen B., Chen L., Su Y., Yang J., Zhang W., Tian X., Huang X. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS J.* 2014;281(7):1717-1725.