

Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений

Н.Е. Злобин, В.В. Терновой, Н.А. Гребенкина, В.В. Таранов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

Существует несколько технологий редактирования генома растений, из которых наиболее простой и универсальной является CRISPR/Cas. В настоящее время эта технология активно используется для нокаутирования генов, делеций участков генома и встраивания экзогенных последовательностей в растительный геном. Для каждого из этих приложений разработано множество вариантов генетического инструментария, которые использовались различными исследовательскими группами для решения конкретных задач. Технология CRISPR/Cas применительно к редактированию генома растений находится на начальном этапе оптимизации, выражающейся в поиске наиболее эффективных, простых и универсальных методик. Вследствие этого экспериментальная работа должна предвшаться достаточно длительным и трудоемким выбором варианта генетического инструментария, оптимального для решения конкретной экспериментальной задачи. В данном обзоре мы охарактеризовали разработанные на сегодняшний день основные варианты генетического инструментария технологии CRISPR/Cas для редактирования генома растений с точки зрения решаемых экспериментальных задач, составляющих компонентов и эффективности применения. В первой части подробно рассмотрены основные элементы технологии CRISPR/Cas – нуклеаза и направляющая РНК, проанализировано влияние структурных особенностей этих элементов на эффективность редактирования. Обобщены экспериментальные данные о взаимосвязи между эффективностью редактирования и нуклеотидной последовательностью направляющей РНК. Охарактеризованы различные варианты нуклеаз, использовавшиеся при редактировании геномов растений, обсуждаются преимущества этих вариантов для решения определенных экспериментальных задач. Вторая часть обзора посвящена различным стратегиям экспрессии элементов системы CRISPR/Cas в растительных клетках, в частности преимуществам и недостаткам использования стабильной трансформации и транзientной экспрессии. Описывается влияние регуляторных элементов генов, кодирующих нуклеазу и направляющую РНК, на эффективность редактирования. Особый акцент сделан на способах повышения эффективности замещения целевых участков в гене растений на экзогенные последовательности ДНК.

Ключевые слова: CRISPR/Cas; редактирование генома; генетическая инженерия растений; sgRNA.

Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome

N.E. Zlobin, V.V. Ternovoy, N.A. Grebenkina, V.V. Taranov

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

There are several technologies for plant genome editing, of which the most simple and universal is CRISPR/Cas. Currently, this technology is widely used for gene knockout, deleting genome fragments and inserting exogenous sequences in the plant genome. For each of these applications, many different types of genetic tools have been developed that are used by various research groups to solve specific problems. The CRISPR/Cas technology for plant genome editing is at an early stage of optimization, which is reflected by the ongoing search for the most effective, simple and flexible techniques. As a result, experimental work has to be preceded by a rather long and laborious process of selecting a genetic tool that will be optimal for a specific experimental task. In our review we describe the main variants of the CRISPR/Cas technology used to edit a plant genome. We classify them in terms of experimental tasks solved, major components and technology performance. In the first half of the review a detailed description of two major components of CRISPR/Cas technology – nuclease and guide RNA – is given, the effect of structural features of these elements on editing efficiency is analyzed. Experimental data on the relationship between editing efficiency and nucleotide sequence of guide RNA are generalized. We also give the characteristic for different variants of nucleases used for plant genome editing and discuss their benefits for different experimental purposes. In the second half of the review various strategies for expression of CRISPR/Cas elements in plant cells, in particular, advantages and disadvantages of stable transformation and transient expression, are discussed. The effect of various regulatory elements of genes encoding nuclease and guide RNA on editing efficiency is described. Special emphasis is placed on the techniques of increasing targeted gene replacement efficiency.

Key words: CRISPR/Cas; genome editing; plant genetic engineering; sgRNA.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):104-111. DOI 10.18699/VJ17.228

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zlobin N.E., Ternovoy V.V., Grebenkina N.A., Taranov V.V. Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):104-111. DOI 10.18699/VJ17.228

УДК 631.523.13

Поступила в редакцию 20.10.2016 г.

Принята к публикации 15.12.2016 г.

© АВТОРЫ, 2017

В настоящее время существует три основные технологии направленного изменения генома: ZFN (zinc finger nuclease – нуклеазы с доменами «цинковые пальцы»), TALEN (transcription activator-like effector nucleases – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) (Чугунова и др., 2016). Из них наиболее простой, универсальной и одновременно эффективной является CRISPR/Cas. Данный метод основан на способности комплекса, состоящего из специфической sgRNA (single guide RNA – одиночная направляющая РНК) и бактериальной нуклеазы Cas9 (CRISPR associated – ассоциированный с CRISPR), вносить точечные двуцепочечные разрывы в участок генома, комплементарный последовательности sgRNA (рис. 1, а) (Савицкая и др., 2016). В клетках эукариот репарацию двуцепочечных разрывов обеспечивают два основных механизма – NHEJ (nonhomologous end joining – негомологичное воссоединение концов) и HDR (homology directed repair – репарация на основе гомологичной рекомбинации) (Jasin, Haber, 2016). При репарации по типу NHEJ в месте разрыва могут происходить инсерции или делеции небольшой длины – до нескольких десятков пар нуклеотидов. Если место разрыва приходится на кодирующую область гена, возможен сдвиг рамки считывания, приводящий к нокауту гена. Репарация двуцепочечных разрывов по механизму гомологичной рекомбинации приводит к восстановлению исходной последовательности в месте разрыва с использованием в качестве матрицы эндогенной гомологичной последовательности (например, гомологичной хромосомы) или экзогенной гомологичной последовательности ДНК. В последнем случае происходит замещение целевой последовательности в геноме (см. рис. 1, б) (Puchta, Fauser, 2014).

Технология CRISPR/Cas была разработана в 2012 г. и впервые применена на растительных объектах в 2013 г. Поиск в базе данных NCBI позволил установить, что к настоящему времени эта технология использована для редактирования генома тридцати видов растений, включая такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как рис, пшеница, кукуруза и картофель. Сейчас основной задачей применения технологии CRISPR/Cas является нокаутирование генов, однако эта технология также успешно применялась для встраивания экзогенных последовательностей в геном и делеции участков генома различной длины. Одно из основных преимуществ технологии CRISPR/Cas9 – возможность редактирования генома сразу по нескольким сайтам (локусам) за счет использования нескольких различных sgRNA (Lowder et al., 2015).

Эффективность технологии определяется рядом параметров: способом доставки генетического инструментария в растительную клетку, вариантом нуклеазы (Cas9 или ортологи), кодонным составом гена нуклеазы, промотором и терминатором генов нуклеазы и sgRNA, структурой sgRNA. В нашем обзоре охарактеризованы различные варианты генетического инструментария, применявшиеся для редактирования геномов растений.

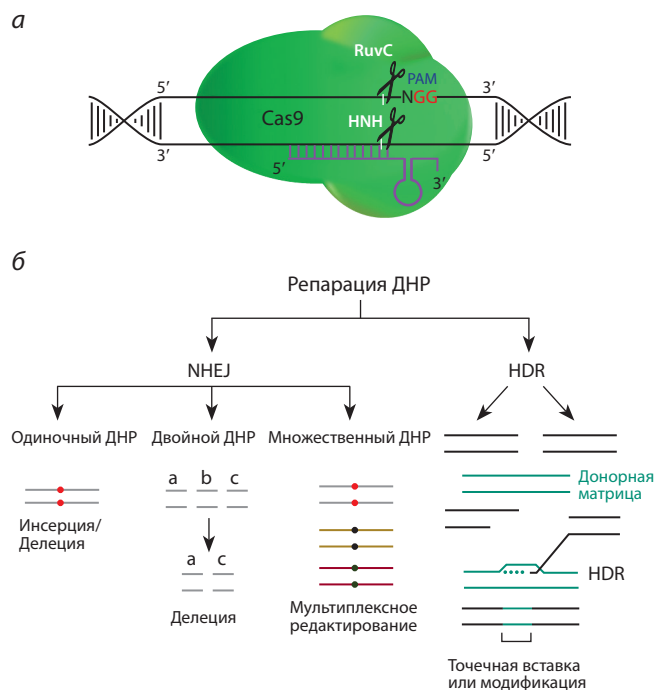


Рис. 1. Технология CRISPR/Cas.

а – комплекс нуклеазы Cas9, sgRNA и геномной ДНК. RuvC и HNH – домены Cas9, обладающие нуклеазной активностью. PAM – последовательность NGG, необходима для взаимодействия нуклеазы Cas9 с ДНК; б – двуцепочечные разрывы в ДНК (ДНР), образуемые комплексом Cas9-sgRNA, репарируются в клетке за счет негомологичного воссоединения концов (NHEJ) или на основе гомологичной рекомбинации (HDR).

Структура sgRNA

Специфичность технологии CRISPR/Cas9 обеспечивается направляющей РНК – sgRNA, которая состоит из двух областей – константной, длиной около 70 нуклеотидов, и вариательной, длиной 17–25 нуклеотидов. Константная часть необходима для образования комплекса sgRNA с нуклеазой Cas9, вариательная – для специфичного связывания комплекса с целевой последовательностью в геноме (Jinek et al., 2012; Nishimasu et al., 2014). В геномной ДНК к 3'-концу участка, комплементарного sgRNA, должна примыкать так называемая последовательность PAM (protospacer adjacent motif – последовательность, примыкающая к протоспейсеру), необходимая для связывания комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК. Последовательность PAM для нуклеазы Cas9 состоит из трех нуклеотидов, обычно NGG (Hsu et al., 2013; Mao et al., 2013). Фактически, наличие последовательности PAM – это единственное ограничение при выборе сайта для редактирования геномной ДНК с помощью технологии CRISPR/Cas. Анализ секвенированных геномов растений показал наличие хотя бы одного уникального сайта для редактирования в кодирующих областях не менее чем 90 % генов (Luo et al., 2016), за исключением кукурузы, в которой только 30 % генов содержат такой сайт (Xie et al., 2014).

Подбор sgRNA к уникальной последовательности в геноме обеспечивает высокую специфичность редактирования. Однако было показано, что комплекс Cas9-sgRNA

способен взаимодействовать и с другими нуклеотидными последовательностями в геноме, имеющими высокую гомологию с целевой последовательностью. Следствием этого взаимодействия являются нецелевые модификации генома – так называемый off-target эффект. Для взаимодействия комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК наиболее критична комплементарность первых 12 нуклеотидов, примыкающих к последовательности PAM (Ding et al., 2016). Несовпадения в дистально расположенных нуклеотидах не всегда препятствуют взаимодействию комплекса Cas9-sgRNA с ДНК (Endo et al., 2014). Это требуется принимать во внимание при оценке потенциальной специфичности sgRNA. На культуре клеток человека было показано, что снижению уровня нецелевых модификаций может способствовать укорачивание варибельной последовательности sgRNA с 20 до 17–18 нуклеотидов (Fu et al., 2014).

Структура sgRNA оказывает влияние не только на специфичность, но и на эффективность редактирования. Образование варибельной частью вторичных структур может снижать эффективность редактирования (Ma et al., 2015). Обнаружена положительная корреляция между эффективностью редактирования и содержанием гуанина и цитозина в варибельной области sgRNA (Zhang et al., 2014; Ma et al., 2015). На примере *Danio rerio* было показано, что эффективность редактирования также зависит от нуклеотидного состава последовательности PAM: она выше при наличии цитозина на месте «N» в PAM NGG (Gagnon et al., 2014). В качестве последовательности PAM могут выступать мотивы NAG и NGA, однако эффективность редактирования при этом существенно снижается (Hsu et al., 2013; Mao et al., 2013).

Для дизайна sgRNA создан ряд биоинформатических приложений (Ding et al., 2016; Periwai, 2016). В наиболее простых алгоритмах при подборе целевого участка для sgRNA учитываются два параметра: уникальность участка в геноме и наличие примыкающей последовательности PAM. В более сложные алгоритмы включены дополнительные параметры, в частности GC-состав варибельного участка sgRNA, а также влияние последовательности варибельного участка на фолдинг sgRNA. В последнее время появились алгоритмы, использующие данные экспериментального сравнения эффективности различных sgRNA при редактировании генома животных (Labun et al., 2016). Биоинформатические приложения позволяют не только подобрать sgRNA, но и выявить для этой sgRNA вероятные сайты off-target эффекта (Periwai, 2016).

Вариант нуклеазы

В технологии CRISPR/Cas в качестве нуклеазы обычно используется Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). В настоящее время открыто множество других бактериальных белков-ортологов Cas9 с аналогичными функциями (Fonfara et al., 2014). Белки-ортологи взаимодействуют с различными последовательностями PAM, что расширяет спектр возможных последовательностей-мишеней в геномной ДНК. Кроме того, использование белков с более длинными последовательностями PAM позволяет повысить специфичность редактирования. Для редактирования растительного генома применялись три ортолога SpCas9:

SaCas9 из *Staphylococcus aureus*, Blat Cas9 из *Brevibacillus laterosporus* и StCas9 из *Streptococcus thermophilus* (Karvelis et al., 2015; Steinert et al., 2015). Эти белки кодируются генами меньшего размера (соответственно 3.2, 3.3 и 3.4 вместо 4.2 т. п. н.), что облегчает создание генетических векторов и повышает эффективность трансфекции ими растительных клеток.

На основе нуклеазы Cas9 путем точечного мутагенеза был создан новый тип фермента для редактирования генома – никаза nCas9 (Mali et al., 2013). Комплекс, состоящий из nCas9 и sgRNA, вносит в ДНК не двунитевые, а однонитевые разрывы. В отличие от двунитевых разрывов, однонитевые («ники») репарируются в клетке с высокой точностью, что делает практически невозможной модификацию генома одиночным комплексом nCas9-sgRNA (Fauser et al., 2014). Для создания двунитевых разрывов с помощью никазы nCas9 требуется использовать две sgRNA, комплементарные близкорасположенным последовательностям нуклеотидов в обеих цепях ДНК. Комплекс nCas9 с первой sgRNA вносит разрыв в одну из цепей ДНК, комплекс со второй sgRNA вносит разрыв в комплементарную цепь в непосредственной близости от первого разрыва. При репарации полученного таким образом двунитевого разрыва обычно происходит делеция нуклеотидов, расположенных между сайтами связывания двух sgRNA (Schiml et al., 2014). Необходимость координированного функционирования двух комплексов nCas9 с различными sgRNA для внесения двунитевого разрыва в геномную ДНК существенно снижает уровень нецелевых модификаций (Mikami et al., 2016).

Все варианты белка Cas9, предназначенные для редактирования эукариотического генома, должны содержать сигнал ядерной локализации (nuclear localisation signal – NLS). В растениях повышенную активность демонстрировал вариант Cas9 с двумя сигналами ядерной локализации, расположенными на N- и C-конце белковой молекулы (Cong et al., 2013).

Донорная ДНК

Два основных компонента системы CRISPR – Cas и sgRNA – необходимы и достаточны для получения нокаут-мутаций, а также делеций участков генома различной длины. В случае, если требуется заменить эндогенную последовательность в геноме на экзогенную, необходим также третий компонент – донорная ДНК. Донорная ДНК содержит на 5'- и 3'-конце последовательности нуклеотидов, идентичные участкам геномной ДНК, фланкирующим область вставки (Jasin, Haber, 2016). Процесс встраивания последовательностей в геном основан на рекомбинации между участком генома и экзогенной молекулой ДНК. Было показано, что частота рекомбинации, обычно очень низкая, повышается на порядки при внесении разрыва в ДНК, что позволяет использовать технологию CRISPR/Cas для встраивания экзогенных последовательностей в геном (Puchta et al., 1993). Репарация на основе гомологичной рекомбинации может стимулироваться образованием не только двунитевого, но и однонитевого разрывов в геномной ДНК; установлено, что для стимуляции этого пути репарации никаза nCas9 может быть не менее эффективна, чем нуклеаза Cas9, при

меньшем уровне нецелевых модификаций (Fauser et al., 2014). Для повышения частоты репарации по механизму гомологичной рекомбинации в растительной клетке также может применяться ингибирование экспрессии генов, продукты которых вовлечены в процесс репарации путем негомологичного воссоединения концов (Qi et al., 2013).

Стабильная трансформация растительных клеток компонентами системы CRISPR/Cas

Для получения растений с отредактированным геномом требуется взаимодействие комплексов Cas9-sgRNA с геномной ДНК. Наиболее распространенный метод доставки компонентов системы CRISPR/Cas – стабильная трансформация Т-ДНК, содержащей гены Cas и sgRNA. В настоящее время существует два основных метода трансформации растений: биобаллистика и агробактериальная трансформация. Метод биобаллистики применялся при редактировании генома ряда сельскохозяйственных культур – пшеницы, риса, кукурузы, сои (Shan et al., 2013; Wang et al., 2014; Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015). В качестве объектов трансформации использовались незрелые зародыши или каллусная ткань. Гены, кодирующие Cas9 и sgRNA, могли находиться в составе одного генетического вектора или содержаться в двух разных векторах (Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015).

Наиболее часто для доставки компонентов системы CRISPR/Cas в растительные клетки применяется агробактериальная трансформация генетическими конструкциями, несущими гены Cas9 и sgRNA в области Т-ДНК. С применением такого подхода удалось добиться высокой эффективности получения нокаут-мутантов (Miao et al., 2013).

Одним из основных факторов, влияющих на эффективность редактирования, является уровень экспрессии Cas9 и sgRNA в клетке (Ma et al., 2015; Mikami et al., 2015b). В подавляющем большинстве работ по редактированию геномов различных видов растений применялись стандартные «сильные» конститутивные промоторы, способные обеспечить высокий уровень экспрессии белка Cas9 в растительной клетке. К недостаткам использования конститутивных промоторов относятся высокая вероятность получения химерных растений, содержащих различные варианты модификации целевой последовательности в геноме, а также низкая эффективность передачи модификации в последующее поколение при семенном размножении (Fauser et al., 2014). Кроме того, с использованием конститутивного промотора для гена Cas9 обычно не удавалось добиться высокой эффективности редактирования при трансформации растений методом погружения соцветий, что, по всей вероятности, объясняется малой активностью этих промоторов в зародышевых тканях (Luo et al., 2016). Эта проблема была решена применением тканеспецифичных промоторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии Cas9 в зародышевых клетках (рис. 2) (Hyun et al., 2015; Wang et al., 2015; Yan et al., 2015; Mao et al., 2016). Использование таких промоторов позволяет получать отредактированные растения в первом поколении трансгенных растений. Помимо промотора, существенное влияние на эффективность редактирования могут оказывать и другие функциональные области гена, кодирующего

Cas9: 5'-нетранслируемая область и терминатор (Ma et al., 2015; Wang et al., 2015).

Еще одним способом повышения эффективности функционирования системы CRISPR/Cas в растительных клетках является оптимизация кодонного состава гена, кодирующего нуклеазу Cas9. К настоящему времени создано несколько различных вариантов гена Cas9, оптимизированного для экспрессии в клетках арабидопсиса, табака, риса, однодольных, двудольных, а также растений в целом (Balt et al., 2014; Schaeffer, Nakata, 2016; Song et al., 2016). В большинстве исследований оптимизация кодонного состава показала себя достаточно эффективным средством повышения уровня экспрессии Cas9 и увеличения эффективности редактирования, хотя некоторыми исследовательскими группами получены экспериментальные данные, свидетельствующие об обратном (Johnson et al., 2015).

В целях повышения эффективности редактирования оптимизации подвергалась экспрессия не только Cas9, но и sgRNA. В настоящий момент для экспрессии sgRNA чаще всего используются промоторы типа U3 и U6 для РНК-полимеразы III (RNAPol III), обеспечивающие высокую экспрессию малых РНК в различных растительных тканях. Молекулы РНК, транскрибирующиеся с промотора U3, должны содержать на 5'-конце аденин, с промотора U6 – гуанин, что надо учитывать при дизайне sgRNA. Добавление соответствующего нуклеотида (А или G) на 5'-конец sgRNA не оказывает негативного влияния на эффективность редактирования (Xie, Yang, 2013). В исследовании, проведенном на рисе, была показана большая эффективность промотора OsU6 по сравнению с OsU3, однако систематического сравнительного анализа эффективности промоторов U3 и U6 применительно к геномному редактированию растений не проводилось (Mikami et al., 2015a). Обычно для экспрессии sgRNA применяются собственные промоторы U3 и U6 растения – объекта редактирования; использование гетерологичных промоторов из других видов растений может сопровождаться снижением эффективности редактирования (Jiang et al., 2013; Sun et al., 2015).

Редактирование генома растений посредством стабильной интеграции генов Cas9 и sgRNA в геномную ДНК имеет два основных недостатка. Для получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом, несущих необходимые модификации и не содержащих вставок Т-ДНК, необходимо проводить отбор в последующих поколениях (Schiml et al., 2014). В то же время получение сортов культурных растений с отредактированным геномом требует удаления области Т-ДНК, поскольку постоянное функционирование системы CRISPR/Cas в растительных клетках приведет к накоплению нецелевых мутаций, которые могут оказать негативное влияние на формирование хозяйственно ценных признаков. Это увеличивает длительность и трудоемкость экспериментальной работы; кроме того, такой прием нецелесообразен для вегетативно размножаемых культурных растений, в частности картофеля, вследствие потери сортовых качеств при семенном размножении.

Вторым недостатком является сложность применения этого подхода для замещения участков геномной ДНК на

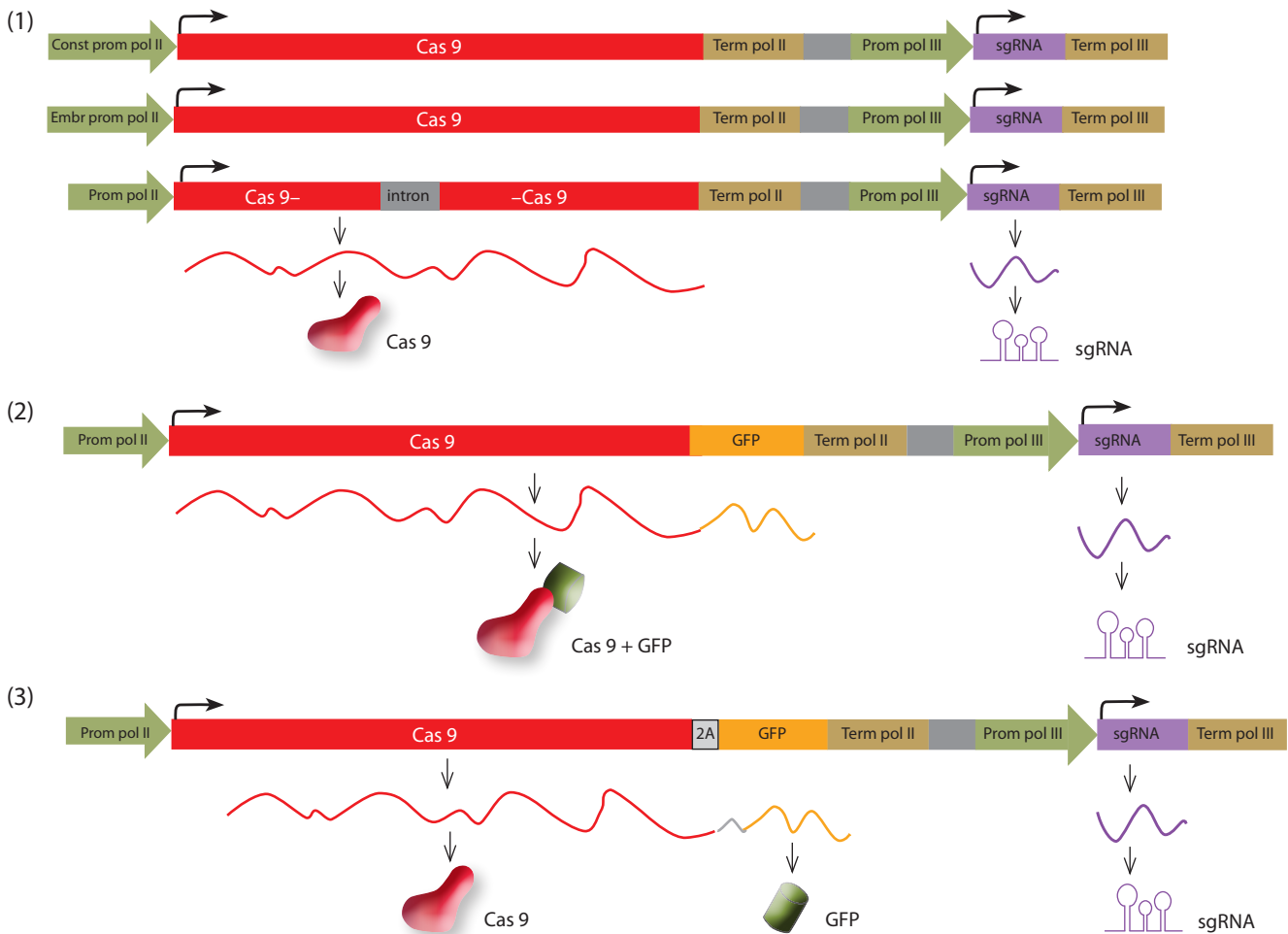


Рис. 2. Схемы вариантов генетического инструментария для редактирования генома растений.

Prom pol II – промотор для РНК-полимеразы II (const – конститутивный, embr – экспрессирующий в зародышевых клетках); Term pol II – терминатор для РНК-полимеразы II; Prom pol III – промотор для РНК-полимеразы III; Term pol III – терминатор для РНК-полимеразы III; 2A – последовательность, обеспечивающая «проскакивание» рибосомы (ribosome skipping).

экзогенные последовательности (gene replacement). Было показано, что последовательность донорной ДНК может быть включена в состав Т-ДНК генетического вектора для агробактериальной трансформации растений (Fauser et al., 2012), однако эффективность получения растений со вставкой экзогенной ДНК в геном при этом невысока, что, вероятно, объясняется малой копийностью донорной ДНК в ядре клетки (Schiml et al., 2014; Čermák et al., 2015; Paul, Qi, 2016). Частично эта проблема может быть разрешена путем доставки донорной ДНК с помощью биобаллистики (Sun et al., 2016). Для повышения копийности донорная ДНК может также быть встроена в самореплицирующийся вектор на основе геномной ДНК джеминивирусов (*Geminiviridae*). Повышение эффективности редактирования при использовании такого подхода продемонстрировано, в частности, на табаке, томате и картофеле (Baltes et al., 2014; Čermák et al., 2015; Butler et al., 2016).

Транзиентная экспрессия компонентов CRISPR/Cas в растительной клетке

Альтернативой стабильной трансформации является транзиентная экспрессия элементов системы CRISPR/Cas

в растительных клетках. Именно с помощью транзиентной экспрессии была впервые показана возможность редактирования генома растений с помощью технологии CRISPR/Cas (Li et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie et al., 2013). Гены, кодирующие Cas9 и sgRNA, могут быть встроены в векторы для транзиентной экспрессии и доставлены в ядро растительной клетки с помощью биобаллистики, агроинфильтрации или трансфекции протопластов (Li et al., 2013; Shan et al., 2013). Данные многочисленных исследований демонстрируют высокую эффективность этого подхода для редактирования генома в различных видах растений. Использование вышеперечисленных методов трансфекции позволяет эффективно доставлять в растительную клетку не только генетические конструкции, кодирующие Cas9 и sgRNA, но и высокие концентрации донорной ДНК в составе плазмид или в виде линейных молекул (Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015). Таким образом, транзиентная экспрессия компонентов технологии CRISPR/Cas в растительных клетках – высокоэффективное средство как получения нокаут-мутаций, так и встраивания экзогенных последовательностей в растительный геном. Кроме того, этот подход позволяет

относительно быстро и просто оценить эффективность различных вариантов генетического инструментария для редактирования генома растений, что не только облегчает подбор оптимального инструментария для выполнения конкретной экспериментальной задачи, но и способствует оптимизации технологии CRISPR/Cas в целом.

Трансфекция протопластов генетическими векторами для транзientной экспрессии используется наиболее часто благодаря своей универсальности и относительной простоте применения. Гены, кодирующие Cas9 и sgRNA, могут как входить в состав одного вектора, так и находиться в двух разных векторах (Li et al., 2013; Xing et al., 2014). Преимуществом второго подхода является большая эффективность трансфекции протопластов плазмидной ДНК меньшего размера; с другой стороны, необходимость котрансфекции индивидуального протопласта генетическими конструкциями обоих типов ведет к снижению эффективности редактирования.

Очевидно, что эффективность редактирования повышается с увеличением доли трансфицированных протопластов, которая может существенно варьировать от эксперимента к эксперименту. Для контроля эффективности трансфекции протопластов обычно применяются генетические конструкции, кодирующие репортерные флуоресцентные белки. Было показано, что Cas9, находящийся в составе химерного белка с GFP, сохраняет свою активность (Nekrasov et al., 2013). Использование генетических конструкций, содержащих химерный ген Cas9+GFP, делает возможным контроль эффективности трансфекции в каждом эксперименте. Между Cas9 и GFP может быть размещена последовательность 2A, которая при трансляции химерной мРНК приводит к «проскакиванию» рибосомы (ribosome skipping) и образованию двух независимых белков (см. рис. 2) (Osakabe et al., 2016).

Из протопластов могут быть регенерированы растения с отредактированным геномом. В частности, таким способом был получен картофель с повышенным содержанием амилопектина в крахмале (Andersson et al., 2016). Этот подход особенно перспективен для создания новых сортов картофеля, поскольку позволяет получать растения с отредактированным геномом без вставок Т-ДНК.

Заключение

Относительная простота и низкая себестоимость технологии CRISPR/Cas сделали геномное редактирование доступным для широкого круга исследователей, владеющих базовыми методами генетической инженерии растений. Технология CRISPR/Cas в настоящее время активно развивается, что выражается не только в постоянном повышении ее эффективности, но и в разработке новых приложений этой технологии, выходящих за рамки редактирования генома. В частности, создание трансгенных растений, экспрессирующих Cas и sgRNA, комплементарную определенному участку в геноме патогена, является принципиально новой перспективной стратегией повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к биотическим стрессам (Zaidi et al., 2016). Варианты Cas с точковыми мутациями, нарушающими нуклеазную активность, могут быть использованы для регуляции экспрессии генов, а также прижизненного окрашивания

целевых участков геномной ДНК (Bortesi, Fischer, 2015; Paul, Qi, 2016). Разработка эффективных вариантов генетического инструментария для решения различных задач позволит ускорить реализацию потенциала технологии CRISPR/Cas, превратив ее в один из базовых инструментов биологии и биотехнологии растений.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Савицкая Е.Е., Мушарова О.С., Северинов К.В. Разнообразие механизмов CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот и возможности их применения в биотехнологии. Биохимия. 2016;(7):870-880.
- Чугунова А.А., Донцова О.А., Сергиев П.В. Методы изменения геномов: новая эра в молекулярной биологии. Биохимия. 2016;(7):881-898.
- Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Reports. 2016;1-12. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Baltes N.J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P.A., Voytas D.F. DNA replicons for plant genome engineering. Plant Cell. 2014;26(1):151-163. DOI 10.1105/tpc.113.119792.
- Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol. Advances. 2015;33(1):41-52. DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
- Butler N.M., Baltes N.J., Voytas D.F., Douches D.S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. Front. Plant Sci. 2016;7:1045. DOI 10.3389/fpls.2016.01045.
- Čermák T., Baltes N.J., Čegan R., Zhang Y., Voytas D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. Genome Biology. 2015;16(1):1. DOI 10.1186/s13059-015-0796-9.
- 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. DOI 10.1126/science.1231143.
- Ding Y., Li H., Chen L.L., Xie K. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. Front. Plant Sci. 2016;7:703. DOI 10.3389/fpls.2016.00703.
- Endo M., Mikami M., Toki S. Multi-gene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. Plant Cell Physiol. 2014;56(1):41-47. DOI 10.1093/pcp/pcu154.
- Fausser F., Roth N., Pacher M., Ilg G., Sánchez-Fernández R., Biesgen C., Puchta H. In planta gene targeting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012;109(19):7535-7540. DOI 10.1073/pnas.1202191109.
- Fausser F., Schiml S., Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 2014;79(2):348-359. DOI 10.1111/tpj.12554.
- Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K., Makarova K.S., Lécrivain A.L., Bzdrenga J., Koonin E.V., Charpentier E. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. Nucl. Acids Res. 2014;42(4):2577-2590. DOI 10.1093/nar/gkt1074.
- Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nature Biotechnol. 2014;32(3):279-284. DOI 10.1038/nbt.2808.
- Gagnon J.A., Valen E., Thyme S.B., Huang P., Ahkmetova L., Pauli A., Montague T.G., Zimmermann S., Richter C., Schier A.F. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. PloS ONE. 2014;9(5):e98186. DOI 10.1371/journal.pone.0098186.
- 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., Marraf-

- fini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnol.* 2013;31(9):827-832. DOI 10.1038/nbt.2647.
- Hyun Y., Kim J., Cho S.W., Choi Y., Kim J.S., Coupland G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta.* 2015;241(1):271-284. DOI 10.1007/s00425-014-2180-5.
- Jasin M., Haber J.E. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair.* 2016;44:6-16. DOI 10.1016/j.dnarep.2016.05.001.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgrRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucl. Acids Res.* 2013; 41(20):e188. DOI 10.1093/nar/gkt780.
- 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. DOI 10.1126/science.1225829.
- Johnson R.A., Gurevich V., Filler S., Samach A., Levy A.A. Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in plants. *Plant Mol. Biol.* 2015;87(1-2):143-156. DOI 10.1126/science.1225829.
- Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* 2015;16(1):1. DOI 10.1186/s13059-015-0818-7.
- Labun K., Montague T.G., Gagnon J.A., Thyme S.B., Valen E. CHOP-CHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucl. Acids Res.* 2016;44(W1):W272-6. DOI 10.1093/nar/gkw398.
- Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnol.* 2013;31(8):688-691. DOI 10.1038/nbt.2654.
- Li Z., Liu Z.B., Xing A., Moon B.P., Koellhoffer J.P., Huang L., Ward R.T., Clifton E., Falco S.C., Cigan A.M. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* 2015;169(2):960-970. DOI 10.1104/pp.15.00783.
- Lowder L.G., Zhang D., Baltes N.J., Paul III J.W., Tang X., Zheng X., Voytas D.F., Hsieh T.-F., Zhang Y., Qi Y. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol.* 2015;169(2):971-985. DOI 10.1104/pp.15.00636.
- Luo M., Gilbert B., Ayliffe M. Applications of CRISPR/Cas9 technology for targeted mutagenesis, gene replacement and stacking of genes in higher plants. *Plant Cell Reports.* 2016;35:1-12. DOI 10.1007/s00299-016-1989-8.
- Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant.* 2015;8(8):1274-1284. DOI 10.1016/j.molp.2015.04.007.
- 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. *Nature Biotechnol.* 2013;31(9):833-838. DOI 10.1038/nbt.2675.
- Mao Y., Zhang H., Xu N., Zhang B., Gou F., Zhu J.K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol. Plant.* 2013;6(6):2008-2011. DOI 10.1093/mp/sst121.
- Mao Y., Zhang Z., Feng Z., Wei P., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.K. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14(2):519-532. DOI 10.1111/pbi.12468.
- Miao J., Guo D., Zhang J., Huang Q., Qin G., Zhang X., Wan J., Gu H., Qu L.J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research.* 2013;23(10):1233-1236. DOI 10.1038/cr.2013.123.
- Mikami M., Toki S., Endo M. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol. Biol.* 2015a;88(6):561-572. DOI 10.1007/s11103-015-0342-x.
- Mikami M., Toki S., Endo M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Reports.* 2015b;34(10):1807-1815. DOI 10.1007/s00299-015-1826-5.
- Mikami M., Toki S., Endo M. Precision targeted mutagenesis via Cas9 paired nickases in rice. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(5):1058-1068. DOI 10.1093/pcp/pcw049.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnol.* 2013;31(8):691-693. DOI 10.1038/nbt.2655.
- 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. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Osakabe Y., Watanabe T., Sugano S.S., Ueta R., Ishihara R., Shinozaki K., Osakabe K. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci. Reports.* 2016;6: 26685. DOI 10.1038/srep26685.
- Paul III J.W., Qi Y. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Reports.* 2016;1-11. DOI 10.1007/s00299-016-1985-z.
- Periwal V. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases. *Brief. Bioinform.* 2016;1-14. DOI 10.1093/bib/bbw052.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucl. Acids Res.* 1993;21(22):5034-5040. DOI 10.1093/nar/21.22.5034.
- Puchta H., Fauser F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J.* 2014;78(5):727-741. DOI 10.1111/tpj.12338.
- Qi Y., Zhang Y., Zhang F., Baller J.A., Cleland S.C., Ryu Y., Starkner C.G., Voytas D.F. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res.* 2013;23(3):547-554. DOI 10.1101/gr.145557.112.
- Schaeffer S.M., Nakata P.A. The expanding footprint of CRISPR/Cas9 in the plant sciences. *Plant Cell Reports.* 2016;35(7):1451-1468. DOI 10.1007/s00299-016-1987-x.
- Schimpl S., Fauser F., Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J.* 2014;80(6):1139-1150. DOI 10.1111/tpj.12704.
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.L., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnol.* 2013;31(8):686-688. DOI 10.1038/nbt.2650.
- Song G., Jia M., Chen K., Kong X., Khattak B., Xie C., Li A., Mao L. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *Crop J.* 2016;4(2):75-82. DOI 10.1016/j.cj.2015.12.002.
- Steinert J., Schimpl S., Fauser F., Puchta H. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J.* 2015;84(6): 1295-1305. DOI 10.1111/tpj.13078.
- Sun X., Hu Z., Chen R., Jiang Q., Song G., Zhang H., Xi Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci. Reports.* 2015;5:10342. DOI 10.1038/srep10342.
- Sun Y., Zhang X., Wu C., He Y., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y., Xia L. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant.* 2016;9(4):628-631. DOI 10.1016/j.molp.2016.01.001.
- Svitashev S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 2015; 169(2):931-945. DOI 10.1104/pp.15.00793.

- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnol.* 2014;32(9):947-951. DOI 10.1038/nbt.2969.
- Wang Z.P., Xing H.L., Dong L., Zhang H.Y., Han C.Y., Wang X.C., Chen Q.J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol.* 2015;16(1):144. DOI 10.1186/s13059-015-0715-0.
- Xie K., Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant.* 2013;6(6):1975-1983. DOI 10.1093/mp/sst119.
- Xie K., Zhang J., Yang Y. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol. Plant.* 2014;7(5):923-926. DOI 10.1093/mp/ssu009.
- Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B., Wang X.C., Chen Q.J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 2014;14(1):1. DOI 10.1186/s12870-014-0327-y.
- Yan L., Wei S., Wu Y., Hu R., Li H., Yang W., Xie Q. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using *YAO* promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.* 2015;8(12):1820-1823. DOI 10.1016/j.molp.2015.10.004.
- Zaidi S.S.E.A., Mansoor S., Ali Z., Tashkandi M., Mahfouz M.M. Engineering plants for geminivirus resistance with CRISPR/Cas9 system. *Trends Plant Sci.* 2016;21(4):279-281. DOI 10.1016/j.tplants.2016.01.023.
- Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N., Zhu J.K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12(6):797-807. DOI 10.1111/pbi.12200.