

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.241

Поступила в редакцию 19.10.2017
Received 19.10.2017

И. Д. Волотовский, А. Г. Полешко

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ,
CRISPR-CAS9 (КРИСПЕР) СИСТЕМА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ
И ПЕРСПЕКТИВЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА**

Аннотация. В данном обзоре рассматриваются две оригинальные технологии в области клеточной биологии, перевернувшие наши представления о том, что происходит в процессе эмбрионального развития с белками, из которых построен организм человека. Эти технологии, появившиеся совсем недавно, привлекли самое пристальное внимание биологов и послужили мощным толчком для развития новых исследований, направленных на целевое изменение структуры и функционирования генетического аппарата клетки. Указанные технологии связаны с мезенхимальными стволовыми клетками и преследуют решение задач, стоящих перед генной терапией наследственных заболеваний человека. Первая технология использует индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, продукт обычных соматических клеток, которым придается свойства эмбриональных стволовых клеток, т. е. способность превращаться в любую специализированную клетку организма. Вторая технология предлагает достаточно простой и выполнимый в условиях лаборатории прием редактирования геномов клеток, заключающийся в проведении на уровне генома генно-инженерных манипуляций, заканчивающихся устранением мутации, элиминацией дефектных генов или вставкой новых генов, лишенных каких-либо ошибок.

Ключевые слова: редактирование генома, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, система CRISPR-Cas9

Для цитирования: Волотовский, И. Д. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, CRISPR-Cas9 (Криспер) система редактирования геномов и перспективы решения проблемы генной терапии наследственных заболеваний человека / И. Д. Волотовский, А. Г. Полешко // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 113–125.

I. D. Volotovskii, A. G. Poleshko

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, CRISPR-CAS9 (KRISPER) GENOME EDITING SYSTEM
AND PERSPECTIVES OF SOLVING THE PROBLEM OF GENE THERAPY
OF HUMAN HEREDITARY DISEASES**

Abstract. The given review considers the two original technologies in the field of cell biology turning our views over the processes taking place during embryogenesis with proteins of which our organism is built. They appeared more recently, attracted the closest attention of the biologists and have served as a powerful impetus for development of new researches aimed at a targeted change in the structure and function of cell genetic apparatus. These technologies are directly tied to mesenchymal stem cells and pursue the solution of the tasks facing gene therapy of human hereditary diseases. The first one considers induced pluripotent stem cells, e.g. giving somatic cells the ability to turn into each specialized cells of organism. The second technology offers quite simple and feasible in conditions of biological laboratory approach of editing cell genome. It consists in carrying out at the level of genome genetic engineering manipulations terminating in the elimination of mutations from genes, defected genes or insertion into genome of new gene devoted of any errors.

Keywords: genome editing, induced pluripotent stem cells, system CRISPR-Cas9

For citation: Volotovskii I. D., Poleshko A. G. Induced pluripotent stem cells, CRISPR-Cas9 (Krisper) genome editing system and perspectives of solving the problem of gene therapy of human hereditary diseases. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 1, pp. 113–125 (in Russian).

В 2008 г. журнал Science признал генетическое редактирование соматических клеток и превращение их в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells) – ИПСК главным научным прорывом года. Этому заявлению, основанному на выдающихся научных результатах, предшествовала большая научно-исследовательская работа, связанная с приданием обычным соматическим клеткам организма, например фибробластам, генетических и фенотипических признаков, свойственных эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК).

Эмбриональные стволовые клетки. Как известно, ЭСК образуются путем деления внутреннего клеточного материала в бластоцисте, образующейся после оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом на ранних стадиях развития зародыша [1]. Оказалось, что первичные зародышевые эмбриональные клетки, получившие название стволовых, могут размножаться в культуре и превращаться (дифференцироваться) в любые клетки всех трех зародышевых листков эмбриона, т. е. обладать свойством плюрипотентности [2]. По мере продвижения процесса эмбриогенеза к своему финишу (образованию структурно сформированного организма) клеточные участники этого процесса снижают уровень своей потентности, т. е. сужают спектр клеточного разнообразия при дифференцировке в ряду: тотипотентность → плюрипотентность → мультипотентность → бипотентность → унипотентность. Такое поведение, как установили К. Такахаши и С. Яманака [3, 4], основывалось на контроле биосинтетических процессов особыми транскрипционными факторами, а именно белками OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC. В вышедшей в 2006 г. статье этих авторов описано получение ИПСК с использованием генов этих белков. Параллельно с коллективом японских ученых над данной темой работали также американские исследователи под руководством Дж. Томсона. Они получили ИПСК с помощью иного набора белков – OCT4, SOX2, NANOG и LIN28, что было обнародовано в 2007 г. В принципе, гены, кодирующие указанные транскрипционные факторы, в геноме клетки представлены, но их экспрессия в реальных условиях функционирования клетки репрессирована. Казалось бы, зная, какие транскрипционные факторы ответственны за дифференцировку клетки, достаточно было снять блок с их экспрессии. Как это сделать Такахаши и Яманака не знали, поэтому они пошли по другому пути, решив ввести в фибробласты мыши с помощью ретровирусных векторов новые экзогенные гены указанных белков, характеризующиеся высокой экспрессией. Так были получены стволовые клетки, которые Такахаши и Яманака назвали индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками. Данные клетки имели сходную с ЭСК морфологию, ростовые свойства, экспрессировали типичные для ЭСК маркеры и, самое главное, проявляли плюрипотентность – способность дифференцироваться в любые специализированные клетки организма.

Прежде чем перейти к механизмам индуцирования соматических клеток коротко остановимся на собственно ЭСК и их основных свойствах. Первая линия ЭСК человека была выделена из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты и культивировалась на фидерном слое из мышечных эмбриональных фибробластов [1]. Использование данного приема основывалось на том, что фибробласты секретируют все необходимые для роста и развития клеток ключевые белковые факторы – LIF, FGF, TFGF и др. [5]. На фидерном слое фибробластов ЭСК растут плотными многослойными колониями круглой формы, поддерживая между собой тесные контакты. Одиночные клетки имеют размер порядка 20 мкм. ЭСК в состоянии претерпевать множество делений *in vitro*, не теряя плюрипотентности и сохраняя нормальный хромосомный набор. Стабильное состояние ЭСК связывают с особой организацией гистона H3 хроматина, представленной особыми участками, названными бивалентными, различающимися уровнем метилирования [6]. В них заблокирована дифференцировка и поддерживаются в активном состоянии транскрипционные факторы OCT3/4, SOX2 и NANOG, ответственные за плюрипотентность [7]. Следует отметить, что в сохранении плюрипотентности ЭСК большую роль играют и такие эпигенетические факторы, как общий уровень метилирования CpG-динуклеотидов, который в ЭСК, по сравнению с дифференцированными клетками, имеет обратную корреляционную связь с плотностью их локализации. Плюрипотентные клетки отличаются низким уровнем метилирования ДНК CpG-динуклеотидов (CpG-островки) на участках, где их плотность высока. В общем, уровень метилирования ДНК в ЭСК выше, чем в соматических клетках: у фибробластов CpG-островки в геноме метилированы в 99,98 % случаев, а у ЭСК – только в 75 %.

Отмечается сильно выраженное взаимодействие между различными генами в геноме ЭСК. Одни из них отвечают за плюрипотентность, другие – за дифференцировку в специализированные клетки трех зародышевых листков эмбриона. В геноме эффективно транскрибируются гены *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog*, кодирующие транскрипционные факторы, а также белки STAT3, ZIC3, HES1 и белки – модификаторы хроматина SET, MIST3.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки. Судя по литературным данным, наиболее популярными соматическими клетками, из которых получают ИПСК, являются фибробласты кожи. Однако получить ИПСК можно из любых соматических клеток, в том числе из мезенхимальных стволовых клеток, кератиноцитов, клеток периферической крови, нейтральных стволовых клеток, гепатоцитов, кератиноцитов и др.

Рассматривая механизмы индукции плюрипотентности в соматической клетке, т. е. превращение ее в подобие ЭСК, нужно ответить на два очень важных вопроса: какие события лежат в основе этого процесса и где они происходят в клетке. Теперь совершенно ясно, что они протекают на уровне генетического аппарата соматической клетки и заключаются в запуске экспрессии генов и факторов, определяющих свойства ЭСК. Методически это происходит в ходе трансфекции соматической клетки четырьмя уже упомянутыми генами *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, входящими, например, в состав так называемого коктейля Яманаки. Под влиянием продуктов этих генов «стирается» программа дифференцировки клетки (рис. 1). Чаще всего эти гены вводятся в соматическую клетку с помощью векторов на основе рекомбинантных вирусов (ретро-, ленти-, адено- и бакуловирусов). Используют также и другие методы доставки генетических конструкций на основе этих генов – трансфекцию с помощью липидов и катионных полимеров, электропорацию и нуклеофекцию.

Природа и функции транскрипционных факторов. *Транскрипционный фактор OCT3/4* относится к V классу POU семейства транскрипционных факторов и состоит из двух структурно независимых субдоменов: POU-специфического домена и POU-гомеодомена. Субдомены соединены варибельным по длине подвижным линкером *Oct3/4*, выполняющим важную роль в индукции плюрипотентности и контроле дифференцировки [8]. У человека экспрессия белка OCT3/4 характерна для клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты и трофобласта, у мыши – для плюрипотентных клеток ВКМ и эпибласта бластоцисты. Эмбрион при нокауте гена данного белка погибает. У мыши и человека ген *Oct3/4* локализован в области главного комплекса гисто-

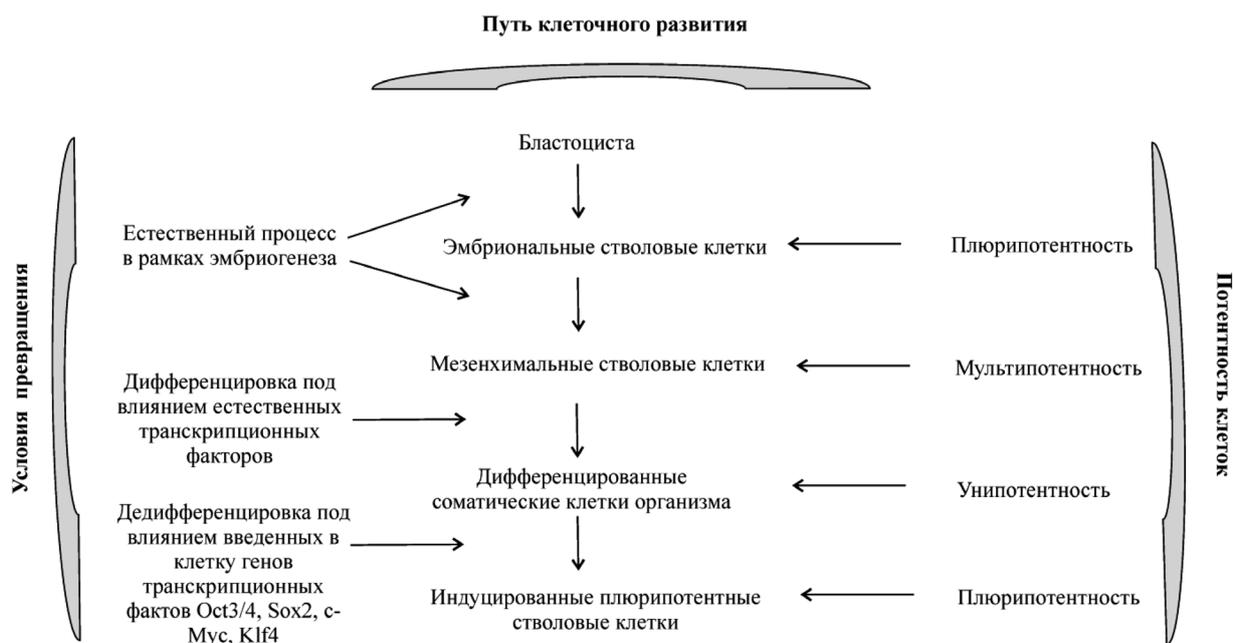


Рис. 1. Образование стволовых клеток и их превращения в ходе эмбриогенеза

Fig. 1. The formation and transformation of stem cells during embryogenesis

совместимости и содержит 5 экзонов. У человека обнаружено 3 изоформы гена *Oct3/4*, которые по-разному вовлечены в процесс поддержания плюрипотентности.

Транскрипционный фактор SOX2 участвует в регуляции разных этапов клеточного развития и дифференцировки, а также архитектоники хроматина. Его экспрессия характерна для ВКМ, эпибласта и герминальных клеток эмбриона. SOX2 комплексирует с OCT3/4, вместе они регулируют экспрессию генов *utf1*, *fgf4*, *fbx15*, также необходимых для поддержания плюрипотентности ЭСК. Нокаутирование этого гена запускает дифференцировку ЭСК в разные клеточные типы [6].

Транскрипционный фактор KLF4. Этот белок участвует в процессах эмбрионального развития, клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [9].

Транскрипционный фактор с-MYC – мультидоменный белок, контролирующий процессы пролиферации, клеточного роста и дифференцировки [10]. Установлено, что он регулирует транскрипцию более 10 % известных генов [11], в том числе транскрипцию генов микро-РНК [12].

Важной особенностью перечисленных выше транскрипционных факторов является то, что все они относятся к протоонкогенам, и, видимо, с этим обстоятельством связана туморогенность ЭСК, нередко проявляющаяся при их трансплантации. Как было отмечено выше, перечень транскрипционных факторов не ограничивается четырьмя белковыми факторами коктейля Яманаки, вместо KLF4 и с-MYC можно использовать NANOG и LIN28 [13]. NANOG – гомеодомный транскрипционный фактор, экспрессия которого также характерна для ВКМ и эпибласта предимплантационного эмбриона. Высокая экспрессия NANOG в ЭСК способна поддерживать их плюрипотентность в условиях *in vitro* даже при отсутствии в среде роста такого важного цитокина, как LIF (leukemia inhibitory factor). О белке LIN28 известно, что он является ингибитором синтеза микроРНК семейства let-7, принимающих участие в процессах дифференцировки. Но независимо от того, какой набор транскрипционных факторов используется для индукции плюрипотентности соматических клеток, общепринято, что эти факторы находятся в тесном взаимодействии друг с другом и функционируют в генетическом аппарате «концертно».

Методы получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Методы получения ИПСК разделяются на две большие группы – вирусные и невирусные. Первыми были разработаны вирусные методы индукции – ретровирусная [3] и лентивирусная [14], названные в соответствии с природой векторов, используемых для трансфекции соматических клеток. После доставки трансгенов в клетки они встраиваются в случайные места их генома и запускают процесс репрограммирования. На определенном этапе процесса репрограммирования происходит остановка экспрессии трансгенов или ее «замолкание» (от англ. *silence* – заставить замолчать) благодаря регуляторному влиянию продуктов генов клетки-хозяина гистоновых метилтрансфераз [15]. Оптимальное по времени «замолкание» экспрессии трансгенов имеет важное значение для дальнейшей судьбы клетки-хозяина, ее полному, а не частичному превращению в ИПСК. Для фибробластов и кератиноцитов этот временной интервал составляет 16 и 10 дней соответственно [16]. Кроме того, существуют неинтеграционные вирусные векторы, которые созданы на основе аденовирусов или вируса Сендай, не интегрирующихся в геном.

Описаны и другие методы доставки трансгенов в клетки хозяина с использованием эписомных и плазмидных конструкций, ДНК-транспазонов, микроРНК, РНК самих транскрипционных факторов, их рекомбинантных белков или так называемых малых молекул, меняющих эпигенетический статус клетки и деконденсирующих хроматин. В настоящее время активно разрабатываются методы, которые предусматривают в дальнейшем удаление введенных генетических конструкций. К ним можно отнести Cre-LoxP-опосредованную рекомбинацию и PiggyBac-транспозицию. Имеются данные о возможности репрограммирования соматических клеток в ИПСК с помощью химических веществ, использование которых позволит (в том числе в сочетании с другими методами) повысить его эффективность. Несмотря на разнообразие подходов, эффективность индукции, по данным многих исследователей, не превышает 2 %. Однако в литературе уже есть информация о возможности повышения эффективности репрограммирования фибробластов до 100 % [17]. Для этого предлагается подавить активность NURD (nucleosome remodelling and deacetylation) – белкового комплекса, ремоделирующего и деацетилирующего нуклеосомы. Ключевую роль



Рис. 2. Некоторые способы репрограммирования соматических клеток млекопитающих

Fig. 2. Some ways of reprogramming somatic cells of mammals

в этом комплексе играет белок MBD3 [18]. Комплекс NURD является, как полагают, эпигенетическим регулятором, контролирующим экспрессию генов плюрипотентности. Регуляторные события происходят на уровне гистонного белка H3, в котором деацетируется и триметируется лизин-27 и, как результат, происходит ингибирование экспрессии генов *Oct3/4* и *Nanog* [6]. Методы, которые были разработаны для репрограммирования соматических клеток в ИПСК, представлены на рис. 2.

При практически полной идентичности свойств ИПСК и ЭСК первые обладают все же одним очень важным преимуществом. ИПСК можно получить из соматических клеток пациентов, т. е. из аутологичного исходного клеточного материала. Этим они обеспечивают пациентоидентичность индуцированных клеток и полное исключение иммунологических конфликтов на уровне клеток, что может иметь место при использовании ЭСК. Поэтому в перспективе данный момент представляется важным при использовании ИПСК в персонализированной клеточной терапии.

На рис. 3 приведена схема, описывающая этапы получения ИПСК и способы применения данных клеток на практике. Анализируя схему, следует остановиться на трех основных вариантах практического использования ИПСК: формировании банков индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, создании моделей заболеваний человека, использовании клеток для скрининга

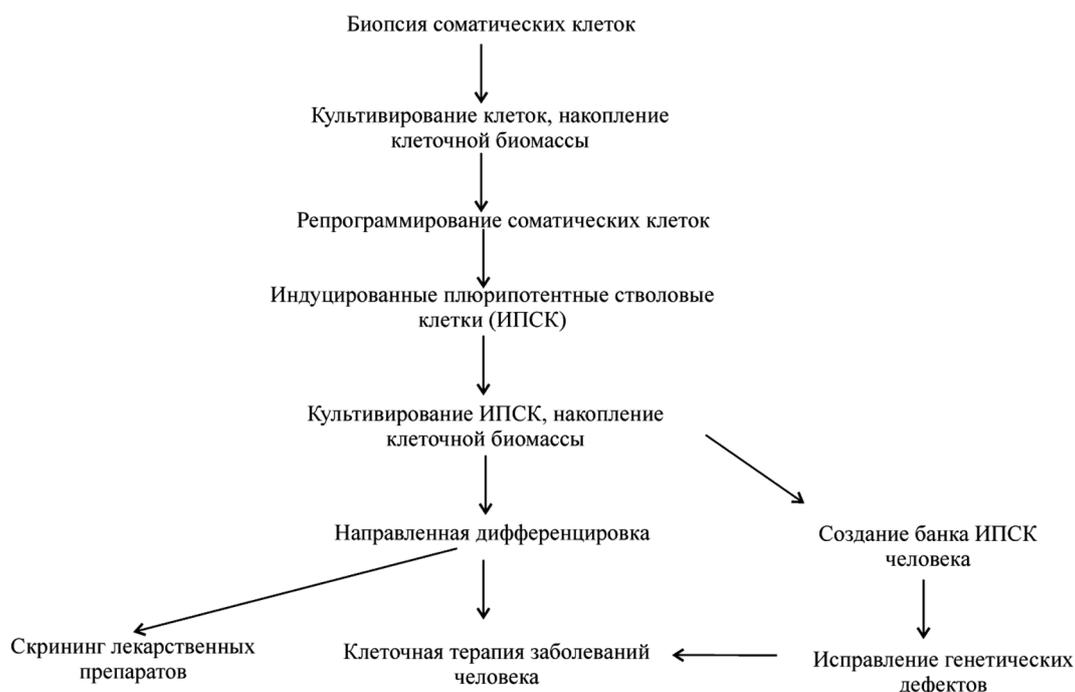


Рис. 3. Этапы получения и способы применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Fig. 3. Stages of obtaining induced pluripotent stem cells and methods of their application

	Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)	«Взрослые» мезенхимальные стволовые клетки (МСК)	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)
Происхождение (источники)	<ul style="list-style-type: none"> • Бластоциста эмбриона 	<ul style="list-style-type: none"> • Костный мозг • Жировая ткань • Периферическая кровь • Ткань пуповины • Резидентные стволовые клетки тканей 	<ul style="list-style-type: none"> • Репрограммирование соматических клеток
Свойства	<ul style="list-style-type: none"> • Плюрипотентность • Самообновление • Высокая репликативная способность 	<ul style="list-style-type: none"> • Клиническая безопасность аутологичных МСК • Высокая биологическая эффективность • Способность к размножению 	<ul style="list-style-type: none"> • Плюрипотентность • Аутологичность • Возможность получения большого количества клеточной биомассы
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> • Иммуногенность • Предмет этических дебатов • Потенциальная терратогенность • Нет данных об использовании в клинике 	<ul style="list-style-type: none"> • Ограниченные свойства • Ограниченная репликативная способность • Рост числа данных по использованию в клинике 	<ul style="list-style-type: none"> • Неясность по вопросу терратогенности • Отсутствие данных по клиническому применению

Рис. 4. Сравнение источников получения и свойств различных стволовых клеток

Fig. 4. Comparison of the sources and properties of various stem cells

лекарственных веществ, генетическом редактировании стволовых клеток и их применении в генной терапии наследственных заболеваний человека, в том числе для изучения молекулярных и клеточных основ данных заболеваний.

Так, например, возможность дифференцировки ИПСК, полученных от пациентов, в различные типы клеток позволяет использовать их для тестирования лекарственных соединений вместо проведения соответствующих экспериментов на животных. Как уже указывалось выше, ИПСК способны расти неограниченное время в культуре *in vitro*, благодаря чему можно накопить необходимое количество клеточного материала и для любых биологических экспериментов, связанных с изучением патогенеза различных наследственных заболеваний человека.

На рис. 4 суммированы представления о трех типах стволовых клеток: естественных – эмбриональных, мезенхимальных и искусственных – индуцированных плюрипотентных.

Широкое использование ИПСК в генной терапии сдерживалось рядом объективных причин. На время открытия ИПСК и последующего бума исследований по проблеме индуцированных плюрипотентных стволовых клеток не существовало простой и эффективной технологии редактирования геномов, которая могла бы успешно применяться для корректировки мутаций в геноме клетки, удаления из него дефектных генов и их замены на гены, не несущие в своей структуре какие-либо ошибки. На данный момент такая технология редактирования геномов разработана. Речь идет о системе CRISPR/Cas9 или, как еще ее называют, Криспер-системе.

Технологии целевого редактирования геномов. Разработка эффективного и надежного подхода для прецизионного и целевого изменения генома живой клетки представляла собой перво-степенную задачу для биологов. Сравнительно недавно была создана новая технология для решения этой задачи, базирующаяся на бактериальном CRISPR-ассоциированном ферменте – нуклеазе 9 (Cas9) из *Streptococcus pyogenes* [19]. Данная разработка завершила многолетние попытки исследователей подобраться вплотную к геному клетки и осуществить его редактирование. В частности, для этого пытались использовать такое явление, как гомологичная рекомбинация [20] и интерференция РНК [21], которая рассматривалась как лабораторная стартовая площадка для недорогого и эффективного анализа функции генов [22, 23]. Ее широкое использование сдерживалось только временным характером ингибирования функции генов и непредсказуемыми нецелевыми эффектами [24]. Уже в наши дни были предприняты попытки использовать для элиминации мутированных нуклеотидных последовательностей в генах ДНК

феномен экзон-скиппинга, заключаюцца ў связыванні пасле транскрыпцыі гена определенных участкаў целевой пре-мРНК экзогеннымі, дабавляемымі звне антысмысловымі олигонуклеотидамі, малымі синтэтычнымі молекуламі РНК, што пазваляло ісклучаць з агульнага працэса сплайсінг (созревание пре-мРНК, элімінацыя з нее інтронаў) і удаляць з пре-РНК определенные участкі пре-мРНК, напрыклад, экзоны з нонсенс-мутацыямі ў канкретных генах [25]. К сажаленню, ў сілу разнаобразных тэхнічных абмежаванняў тэхналогія экзон-скиппинга шырокага распаўсюджвання не атрымала.

Более успешными оказались технологии ZNF [26] и TALEN [27], использование которых позволило исследователям вызывать в геноме постоянные мутации через двухцепочечные разрывы ДНК и запускать процессы репарации. Однако эти технологии оказались дорогостоящими и затратными по времени, что ограничило их широкое использование, особенно в крупномасштабных работах с высокой пропускной способностью.

Нуклеазы цинковых «пальцев» (ZNF) являются одними из широко применяемых генно-инженерных ферментов. В структуре этих нуклеаз содержатся два полипептидных домена: Cys_2-His_2 – ДНК-связывающий домен и FokI домен, типичный для рестрикционных нуклеаз и обеспечивающий разрезание цепочки ДНК. Для узнавания целевого участка нужны всего три «пальца». Каждый из них связывается с нуклеотидным триплетом в структуре ДНК, поэтому 3 «пальца» ZNF могут обеспечить взаимодействие с целевым сайтом в ДНК, состоящим из 9 пар нуклеиновых оснований. Для разрезания двунитевой цепочки ДНК в клетку нужно ввести две нуклеазы. Как правило, результат нужно ждать достаточно долго (до нескольких месяцев).

TALEN-нуклеазы выделены из фитопатогенных бактерий *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен в этих нуклеазах состоит из консервативных 33–34 аминокислотных остатков и чередования с дивергентными 12-м и 13-м аминокислотными остаткам. Их рассматривают как RVD (repeat variable diresidue), своеобразный дуплет, они переменны и строго коррелируют со специфическими нуклеотидными последовательностями, т. е. каждый из них «узнает» определенные нуклеотидные чередования. При их «перемешивании» формируются комплементарные участки нуклеотидов, адресованные к ДНК-специфическим мишеням.

Криспер-система геномного редактирования. Бактерии и археи, не имеют свойственной животным и человеку иммунной защиты. Оказалось, однако, что у бактерий имеется своя, но гораздо более простая система молекулярного иммунитета, обеспечивающая защиту бактериальной клетки от бактериофагов и других патогенов. Еще в 1989 г. японскими исследователями был обнаружен в геноме кишечной палочки участок, содержащий многочисленные палиндромные повторы. Его назвали CRISPR-локусом (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), что можно перевести на русский язык как «скопление разделенных регулярными промежутками коротких симметричных палиндромных повторов» (рис. 5). Структура повторов была идентична по нуклеотидным последовательностям, а вот у промежутков, или спейсеров (от англ. *spacer* – прокладка), как их теперь называют, она оказалась переменной и зачастую была гомологичной нуклеотидным последовательностям, обнаруженным в геномах бактериофагов. По сути дела, оказалось, что спейсер представляет собой генетическую память бактериальной популяции. Другими словами, в спейсерах закладывается на хранение генетическая информация о бактериофагах, которая узнает «врага» и используется бактериями в уникальной системе защиты от губительного действия этих патогенов. В состав защитной системы входят палиндром-

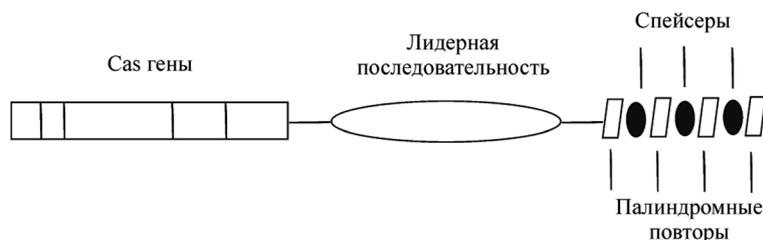


Рис. 5. Принципиальное строение CRISPR-локуса в геноме бактерий
Fig. 5. The principal structure of the CRISPR locus in the bacterial genome

ные повторы, спейсеры и гены специализированных нуклеаз Cas (CRISPR-associated nuclease), в том числе нуклеазы Cas9. Возникает вопрос, почему нуклеаза помечена цифрой 9? Действительно, их в бактериальной клетке больше 10, но наиболее подходящей для функционирования Криспер-системы оказалась Cas9. В научном обиходе для обозначения системы редактирования геномов CRISPR/Cas9 стали использовать термин Криспер-система.

Сама макромолекула нуклеазы Cas9 содержит два критических домена: узнающий целевую нуклеотидную последовательность – RuvC и обладающий нуклеазной активностью – HNH, вместе они осуществляют разрыв двух цепочек ДНК. Если в бактериальную клетку проникает бактериофаг, о котором в геноме бактерии остался след, судьба бактериофага предрешена: с высокой вероятностью он погибает. Данная система обнаружена в геномах 40 % секвенированных бактерий и 95 % у архей.

В 2012 г. появились первые публикации, в которых было описано применение системы CRISPR/Cas9 для редактирования геномов животных и человека. После 2012 г. число публикаций по Криспер-системе стало расти лавинообразно.

Оказалось, что компоненты системы Криспер можно адаптировать к другим геномам, введя ее в эукариотические клетки, в которых она будет работать по «навязанной» ей программе. Можно при этом с высокой точностью найти в геноме любую нуклеотидную последовательность. Например, в геноме человека насчитывается 3,2 млрд пар нуклеотидов, и на этой протяженности можно разрезать двуспиральную нить ДНК в конкретном месте, удалить или подправить «испорченный» ген, или вставить вместо него другой.

Как же устроена система Криспер? В каждом определенном локусе все палиндромные повторы одинаковы по строению и включают в себя от 24 до 35 пар оснований. Длина спейсеров составляет 21–72 пар оснований, они разные и различаются нуклеотидной последовательностью. К CRISPR-локусу примыкает лидерная нуклеотидная последовательность и гены, кодирующие Cas-нуклеазы (рис. 6).

Лидерная последовательность выполняет роль промотора, запускающего транскрипцию CRISPR-локуса. Образовавшаяся в ходе транскрипции длинная РНК получила название пре-сгРНК (CRISPR-РНК), а после ее процессинга – просто сгРНК. При этом в каждом из их фрагментов системы содержится часть повтора и спейсер. Разрезание двойной нити ДНК осуществляется Cas9 нуклеазой под контролем некодирующих РНК: сгРНК и трасгРНК. Комплекс сгРНК-трасгРНК-Cas9 и есть основное оружие защитной «иммунной» системы бактерий. При создании генетических конструкций, экспрессирующих компоненты CRISPR-Cas9, используются химерные молекулы сгРНК и трасгРНК, называемые РНК-гидом (single guide RNA – sgRNA). Специфичность действия CRISPR-Cas9 и зависит от наличия короткой нуклеотидной последовательности спейсера, входящего в состав сгРНК бактерии или искусственной sgRNA.

Благодаря спейсерным участкам в ДНК бактериофага узнаются комплементарные им целевые нуклеотидные последовательности, после чего активированные Cas9-нуклеазы расщепляют ДНК. По сути дела, сгРНК и трасгРНК выполняют роль прецизионного путевода нуклеазы Cas9 в «море» нуклеотидных последовательностей ДНК фага. После дегградации ДНК каждого нового бактериофага, с которым столкнулась бактерия, ее фрагмент вставляется в качестве спейсера в Криспер-систему этой бактерии, т. е. Криспер-кассета удлиняется, пополняя бактериальный банк новой информацией.

Для успешной реализации действия системы Криспер важную роль играет еще один генетический компонент – PAM (protospacer adjacent motif). Это короткая нуклеотидная последовательность, состоящая из 3 нуклеотидов и локализованная непосредственно после сайта-мишени. Каноническая последовательность PAM – это 5-NGG-3, где N – любой нуклеотид. PAM специфичен для конкретного вида бактерий. Только при наличии PAM комплекс сгРНК-трасгРНК-Cas9 распознает мишень и «разрезает» ДНК (рис. 7).

В 2012 г. М. Джинек с соавт. [28] сумели объединить сгРНК и трасгРНК в единую молекулу РНК – sgРНК, т. е. РНК-гида, о которой упоминалось выше. Он же предложил вектор для ее клонирования. Сродство РНК-гида к нуклеазе Cas9 и его способность направлять фермент к ДНК-мишени оказались такими же высокими, как у естественных сгРНК и трасгРНК. На прак-

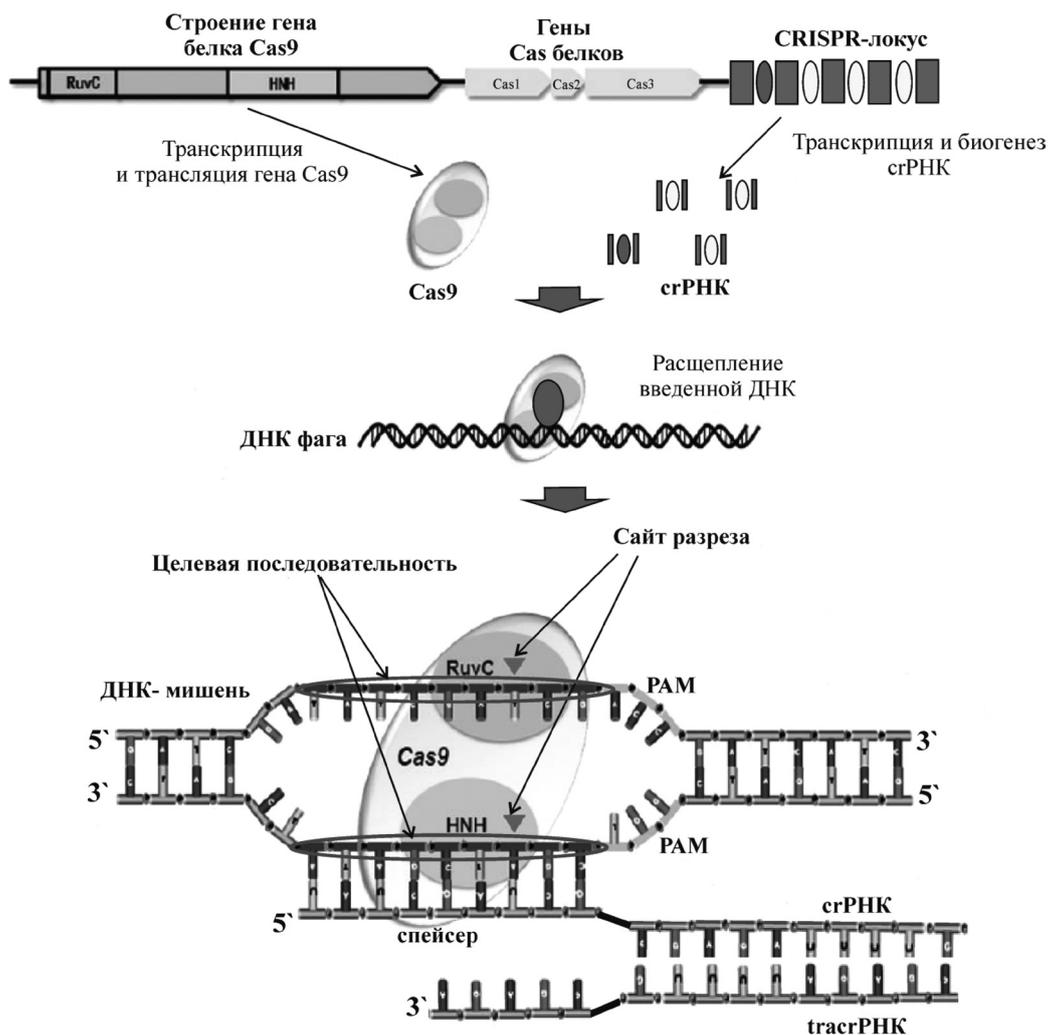


Рис. 6. Интеграция нового спейсера в геном бактерии и его дальнейшее использование в работе защитной системы бактериальной клетки

Fig. 6. Integration of a new spacer into the genome of a bacterium and its further use in the function of the bacterial cell protective system

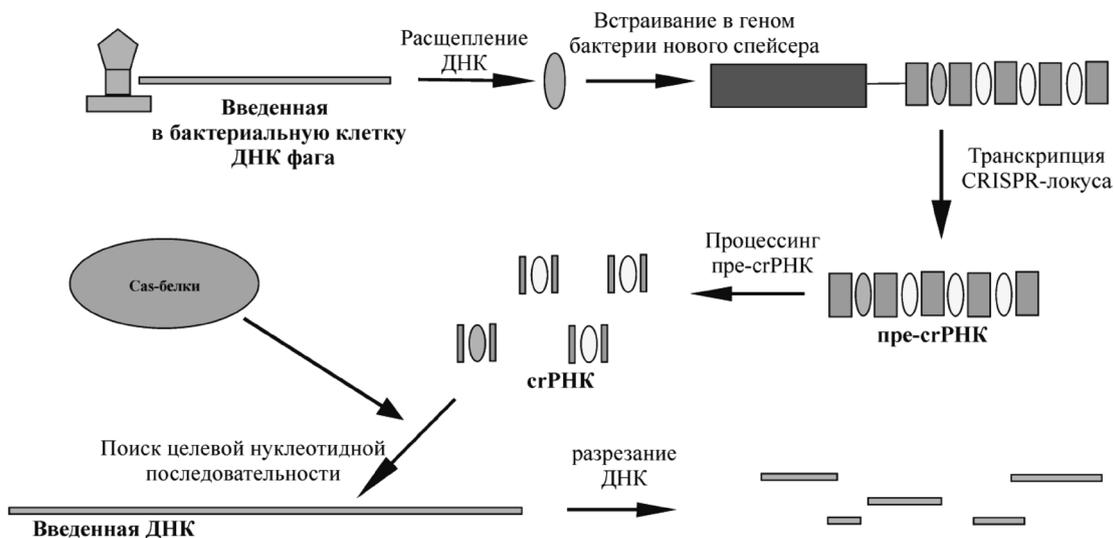


Рис. 7. Схема контролируемого комплексом CRISPR/Cas9 целевого разрезания ДНК бактерии

Fig. 7. Scheme of target cutting of DNA bacterium controlled by CRISPR/Cas9 complex

тике комплекс РНК-гид + Cas9 + вектор подвергают молекулярному клонированию в *E. coli*, выделяют из бактериальных клеток и трансфицируют его в клетку, в геноме которой содержатся гены, подлежащие редактированию.

Показано, что данный модифицированный генно-инженерный подход, разработанный в 2013 г., высокоэффективен при редактировании геномов микроорганизмов, животных и человека, а кроме того, он обладает существенными преимуществами по сравнению с ZFN- и TALEN-технологиями. При этом следует подчеркнуть главное – за определение целевой нуклеотидной последовательности в Криспер-системе отвечает небольшой участок РНК-гида, комплементарный 20 нуклеотидам ДНК-мишени, в то время как нуклеазы ZFN и TALEN узнают отдельные нуклеотиды с помощью определенных доменов, представленных в их макромолекулах. Кроме того, и ZFN, и TALEN функционируют как гетеродимеры, разрезая двухнитевую цепочку ДНК, а Cas9 способен разрезать сразу две цепочки ДНК-мишени и при определенных условиях только одну из них. Одиночный разрез осуществляет Cas9, у которой активность одного из критических доменов RuvC или HNH подавлена. В этом случае фермент называют Cas9-никазой.

Каким же образом после элиминации дефекта в определенном гене и всего дефектного гена можно восстановить исходную, но уже отредактированную нуклеотидную последовательность участка ДНК? Здесь может быть несколько вариантов, среди которых ключевое место занимают воссоединение негомологичных концов (NHEJ, от англ. *non-homologous and joining*) или гомологичная репарация (HDR, от англ. *homology-directed repair*). Механизм NHEJ, в основе которого лежит восстановление ковалентных связей в месте разрыва без участия матриц, преобладает в клетках млекопитающих, но часто ассоциирован с возникновением инсерционных или делеционных мутаций в точке разрыва ДНК. Поэтому для инактивации любого гена достаточно только внести в него двухцепочечный разрыв. При исправлении гена необходимы гомологичная репарация с внесением в клетку ДНК с правильной нуклеотидной последовательностью, которая служит матрицей, и наличие плечей гомологии – фланкирующих целевой сайт участков, соответствующих последовательностям ДНК, которые окружают сайт разрыва. Искусственно синтезированная молекула ДНК, гомологичная последовательности нуклеотидов в месте разрыва, служит матрицей для целевого восстановления исходной структуры ДНК. В случае одностороннего разрыва ДНК, а он при определенных условиях может быть реализован с помощью Cas9-никазы, застройка образовавшейся брешы осуществляется с помощью механизма гомологичной репарации по принципу комплементарности с использованием в качестве матрицы нетронутой исходной «правильной» цепи ДНК (рис. 8). Обычно гомологичная репарация в клетке протекает довольно редко. Однако система Криспер позволяет увеличить вероятность реализации гомологичной рекомбинации на несколько порядков.

С 2015 г. появились публикации о модификации Криспер-системы, которая позволяет разрезать двухцепочечную ДНК с образованием не тупых, а липких концов ДНК по краям ее разрыва, благодаря чему облегчается редактирование геномов с использованием механизмов репарации.

Прогресс биологической науки открыл совершенно неожиданные перспективы использования Криспер-системы для решения проблемы наследственных заболеваний. При изучении

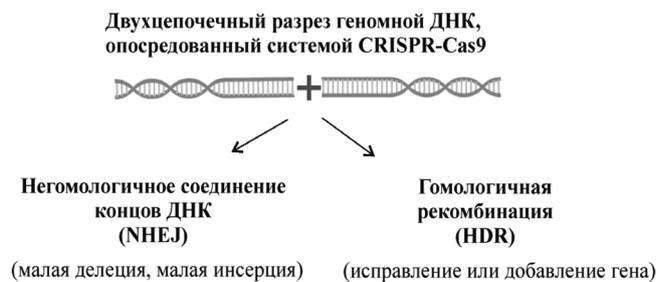


Рис. 8. Разрез геномной ДНК на уровне дефектного гена и восстановление отредактированного участка ДНК

Fig. 8. Cutting of genomic DNA at the level of the defective gene and the repair of the edited part of DNA

того или иного наследственного заболевания обычно сталкиваются с одной непреодолимой трудностью, связанной с его экспериментальным моделированием. Как оказалось, многочисленные экспериментальные модели заболеваний на животных не воспроизводят всего комплекса генетических и фенотипических особенностей заболевания у человека. Можно предположить, что система Криспер окажется очень полезной при моделировании наследственных заболеваний и в первую очередь редко встречающихся в человеческой популяции. Экспе-

риментальные модели полигенных заболеваний, созданные с помощью Криспер-системы, дают возможность определить, нокаут каких генов приводит к тем или иным фенотипическим изменениям в клетках, как из клеток формируются разнообразные ткани с различным генетическим фоном и какие молекулярные события происходят при развитии патологического процесса. На основании этих данных разрабатываются программы создания целых органов.

Другой задачей, решаемой с помощью Криспер-системы, является разработка методов лечения вирусных инфекций, например вируса иммунодефицита человека HIV-1 [29]. Попадание в клетки иммунной системы HIV-1 обусловлено его взаимодействием с поверхностным хемотическим рецептором CCR5. Делеция в гене данного рецептора делает его, а значит, и клетку, невосприимчивым к HIV-1. Также с помощью Криспер-системы можно проводить в геноме коррекцию мутаций, обуславливающих различные наследственные заболевания, например муковисцидоз, миодистрофию Дюшена, гемофилию, серповидноклеточную анемию и др. [30].

Для коррекции мутаций, которые являются причиной заболевания, используют как соматические, так и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, описание которых приведено в начале настоящей статьи. ИПСК могут быть получены из любой соматической клетки больного наследственным заболеванием. Как упоминалось выше, после индукции плюрипотентности эти клетки можно дифференцировать в различном направлении, т. е. превратить в любую клетку нашего организма. Иными словами, в нашем распоряжении может оказаться универсальная модельная система, с помощью которой можно анализировать патогенез конкретного наследственного заболевания и отрабатывать тактику его лечения, т. е. исправлять генетические дефекты в модели *in vitro* и использовать полученную информацию при разработке методов терапии заболевания.

Главное преимущество этого подхода заключается в том, что он позволяет исключить вклад в получаемые результаты генетического полиморфизма, свойственного любому организму.

Криспер-система открыла широкие перспективы в решении вопросов повышения результативности генной терапии при лечении наследственных и приобретенных социально-значимых заболеваний человека.

Изобретение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и Криспер-системы – это выдающееся достижение биологической науки, развивающейся в тесном сопряжении с медициной, и существенный прорыв в системе наших знаний, значимость которого становится все более очевидной. Можно не сомневаться, что начавшаяся массированная атака на наследственные заболевания человека в ближайшие годы принесет положительные результаты.

Список использованных источников

1. Pera, M. F. Human pluripotent stem cells: a progress report / M. F. Pera // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2001. – Vol. 11, N 5. – P. 595–599.
2. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin / P. M. M. Matin [et al.] // *Biochemical Society Transactions*. – 2005. – Vol. 33, N 6. – P. 1526–1530.
3. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, N 4. – P. 663–676.
4. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration / M. Stadtfeld [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 322, N 5903. – P. 945–949.
5. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media / A. B. J. Prowse [et al.] // *J. Proteome Research*. – 2007. – Vol. 6, N 9. – P. 3796–3807.
6. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3 / H. Yuan [et al.] // *Genes and Development*. – 1995. – Vol. 9, N 21. – P. 2635–2645.
7. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells / B. E. Bernstein [et al.] // *Cell*. – 2006. – Vol. 125, N 2. – P. 315–326.
8. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 / J. Nichols [et al.] // *Cell*. – 1998. – Vol. 95, N 3. – P. 379–391.
9. Dang, D. T. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors / D. T. Dang, J. Pevsner, V. W. Yang // *The Intern. J. of Biochemistry and Cell Biology*. – 2000. – Vol. 32, N 11–12. – P. 1103–1121.
10. The c-Myc target gene network / C. V. Dang [et al.] // *Seminars in Cancer Biology*. – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 253–264.
11. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC / J. H. Patel [et al.] // *Nature Rev. Cancer*. – 2004. – Vol. 4, N 7. – P. 562–568.

12. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis / T.-C. Chang [et al.] // *Nature Genetics*. – 2008. – Vol. 40, N 1. – P. 43–50.
13. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts / M. Nakagawa [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2008. – Vol. 26, N 1. – P. 101–106.
14. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells / J. Yu [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 318, N 5858. – P. 1917–1920.
15. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET / T. Matsui [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, N 7290. – P. 927–931.
16. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells / N. Maherali [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 340–345.
17. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency / Y. Rais [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 502, N 7469. – P. 65–70.
18. Kaji, K. Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells / K. Kaji, J. Nichols, B. Hendrich // *Development*. – 2007. – Vol. 134, N 6. – P. 1123–1132.
19. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas9 systems / L. Cong [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 339, N 6121. – P. 819–823.
20. Capecchi, M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of mammalian genome for the twenty-first century / M. R. Capecchi // *Nature Rev. Genetics*. – 2005. – Vol. 6, N 6. – P. 507–512.
21. Potent a specific genetic interference by double-stranded RNAi *Caenorhabditis elegans* / A. Fire [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 391, N 6669. – P. 806–811.
22. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs / S. M. Elbashir [et al.] // *Methods*. – 2002. – Vol. 26, N 2. – P. 199–213.
23. Analysis of mammalian gene function using small interference RNAs / J. Martinez [et al.] // *Nucleic Acids Symposium Series*. – 2003. – Vol. 3, N 1. – P. 333.
24. Detrimental effects of RNAi: a cautionary note on its use in *Drosophila* ageing / N. Alic [et al.] // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7, N 9. – P. e45376.
25. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy / A. Aartsma-Rus [et al.] // *Human Mutation*. – 2009. – Vol. 30, N 3. – P. 293–299.
26. Porteus, M. H. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases / M. H. Porteus // *Molecular Therapy*. – 2006. – Vol. 13, N 2. – P. 438–446.
27. A novel TALE nuclease acagffold enable high genome editing activity in combination with low toxicity / C. Mussolino [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39, N 21. – P. 9283–9293.
28. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 337, N 6096. – P. 816–821.
29. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus / H. Ebina [et al.] // *Sci. Rep.* – 2013. – N 3. – Art. nr 2510.
30. Валетдинова, К. Р. Применение системы CRISPR/Cas9 для создания и исследования клеточных моделей наследственных заболеваний человека / К. Р. Валетдинова // *Гены и клетки*. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 10–20.

References

1. Pera M. F. Human pluripotent stem cells: a progress report. *Current opinion in genetics and development*, 2001, vol. 11, no. 5, pp. 559–599. DOI: 10.1016/s0959-437x(00)00238-0
2. Matin M. M., Andrews P. W., Bahrami A. R., Damjanov I., Gokhale P., Draper J. S. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochemical Society Transactions*, 2005, vol. 33, no. 6, pp. 1526–1530. DOI: 10.1042/bst20051526
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, vol. 126, no. 4, pp. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024
4. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, vol. 322, no. 5903, pp. 945–949. DOI: 10.1126/science.1162494
5. Prowse A. B. J., McQuade L. R., Bryant K. J., Marcal H., Gray P. P. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *Journal of Proteome Research*, 2007, vol. 6, no. 9, pp. 3796–3807. DOI: 10.1021/pr0702262
6. Yuan H., Corbi N., Basilico C., Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes and Development*, 1995, vol. 9, no. 21, pp. 2635–2645. DOI: 10.1101/gad.9.21.2635
7. Bernstein B. E., Mikkelsen T. S., Xie X., Kamal M., Huebert D. J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S. L., Lander E. S. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006, vol. 125, no. 2, pp. 315–326. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.041
8. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, vol. 95, no. 3, pp. 379–391. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81769-9
9. Dang D. T., Pevsner J., Yang V. W. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2000, vol. 32, no. 11–12, pp. 1103–1121. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00059-5

10. Dang C. V., O'Donnell K. A., Zeller K. I., Nguyen T., Osthus R. C., Li F. The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, 2006, vol. 16, no. 4, pp. 253–264. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.07.014
11. Patel J. H., Loboda A. P., Showe M. K., Showe L. C., McMahon S. B. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nature Reviews. Cancer*, 2004, vol. 4, no. 7, pp. 562–568. DOI: 10.1038/nrc1393
12. Chang T.-C., Yu D., Lee Y.-S., Wentzel E. A., Arking D. E., West K. M., Dang C. V., Thomas-Tikhonenko A., Mendell J. T. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, 2008, vol. 40, no. 1, pp. 43–50. DOI: 10.1038/ng.2007.30
13. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochizuki Y., Takizawa N., Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 2008, vol. 26, no. 1, pp. 101–106. DOI: 10.1038/nbt1374
14. Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, vol. 318, no. 5858, pp. 1917–1920. DOI: 10.1126/science.1151526
15. Matsui T., Leung D., Miyashita H., Maksakova I. A., Miyachi H., Kimura H., Tachibana M., Lorincz M. C., Shinkai Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7290, pp. 927–931. DOI: 10.1038/nature08858
16. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, vol. 3, no. 3, pp. 340–345. DOI: 10.1016/j.stem.2008.08.003
17. Rais Y., Zviran A., Geula S., Gafni O., Chomsky E., Viukov S., Mansour A. A., Caspi I., Krupalnik V., Zerbib M., Maza I., Mor N., Baran D., Weinberger L., Jaitin D. A., Lara-Astiaso D., Blecher-Gonen R., Shipony Z., Mukamel Z., Hagai T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Tanay A., Amit I., Novershtern N., Hanna J. H. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*, 2013, vol. 502, no. 7469, pp. 65–70. DOI: 10.1038/nature12587
18. Kaji K., Nichols J., Hendrich B. Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Development*, 2007, vol. 134, no. 6, pp. 1123–1132. DOI: 10.1242/dev.02802
19. 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/Cas9 systems. *Science*, 2013, vol. 339, no. 6121, pp. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143
20. Capecchi M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*, 2005, vol. 6, no. 6, pp. 507–512. DOI: 10.1038/nrg1619
21. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, vol. 391, no. 6669, pp. 806–811. DOI: 10.1038/35888
22. Elbashir S. M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, vol. 26, no. 2, pp. 199–213. DOI: 10.1016/s1046-2023(02)00023-3
23. Martinez J., Patkaniowska A., Elbashir S. M., Harborth J., Hossbach M., Urlaub H., Meyer J., Weber K., Vandeburgh K., Manninga H., Scaringe S. A., Luehrmann R., Tuschl T. Analysis of mammalian gene function using small interference RNAs. *Nucleic Acids Research. Supplement*, 2003, vol. 3, no. 1, p. 333. DOI: 10.1093/nass/3.1.333
24. Alic N., Hoddinott M. P., Foley A., Slack C., Piper M. D., Partridge L. Detrimental effects of RNAi: a cautionary note on its use in *Drosophila* ageing. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 9, pp. e45376. DOI: 10.1371/journal.pone.0045376
25. Aartsma-Rus A., Fokkema I., Verschuuren J., Ginjaar I., van Deutekom J., van Ommen G. J., den Dunnen J. T. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation*, 2009, vol. 30, no. 3, pp. 293–299. DOI: 10.1002/humu.20918
26. Porteus M. H. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Molecular Therapy*, 2006, vol. 13, no. 2, pp. 438–446. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.08.003
27. Mussolino C., Morbitzer R., Lütge F., Dannemann N., Lahaye T., Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*, 2011, vol. 39, no. 21, pp. 9283–9293. DOI: 10.1093/nar/gkr597
28. 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, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829
29. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports*, 2013, no. 3, art. nr 2510. DOI: 10.1038/srep02510
30. Valetdinova K. R. Application of CRISPR/Cas9 system for developing and studying cellular models of inherited disease. *Geny i kletki* [Genes and Cells], 2016, vol. 11, no. 2, pp. 10–20 (in Russian).

Информация об авторах

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com.

Поляшко Анна Григорьевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: renovacio888@yandex.ru.

Information about the authors

Igor D. Volotovski – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com.

Anna G. Poleshko – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: renovacio888@yandex.ru.