



CRISPR/Cas РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ (РАСТЕНИЙ) И ОБЩЕСТВО

Баймиев Ан.Х., Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р. Князев А.В., Чемерис Д.А.,
Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Михайлова Е.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

Значительное внимание уделено вопросам как следует соотносить созданные за счет индуцированного мутагенеза современные сорта растений с полученными с помощью генной инженерии трансгенными растениями или ГМ-растениями, а также с нокаутными и нокин формами CRISPR/Cas редактированных растений в связи с проблемой ГМО. Оценены перспективы внедрения разных форм CRISPR/Cas редактированных растений в сельскохозяйственное производство, включая окультуривание диких форм *de novo*. Затронуты вопросы редактирования генома человека и отношения общества к этому процессу, а также проведение сообществом DIY биологов экспериментов по геномному редактированию. Рассмотрена непростая ситуация с патентованием CRISPR/Cas технологии и ее коммерциализация.

Ключевые слова: CRISPR/Cas технология, ГМО, ГМ-растения, трансгенные растения, томат, нокаут, нокин, патентование

Содержание

| | Стр. |
|---|------|
| Введение | 183 |
| ГМ-растения и CRISPR/Cas редактированные растения | 184 |
| Патентная защита CRISPR/Cas технологии | 190 |
| Коммерциализация CRISPR/Cas технологии | 193 |
| CRISPR/Cas технология шагает в массы | 194 |
| CRISPR/Cas редактирование генома человека | 195 |
| Перспективы редактирования геномов растений | 196 |
| Заключение | 197 |
| Благодарности | 197 |
| Литература | 198 |

Введение

В мире в последние годы наблюдается настоящий бум вокруг CRISPR/Cas технологии, позволившей с большей легкостью и успехом проводить геномное редактирование многих живых объектов различных уровней генетической сложности. Можно предполагать, что дальнейший прогресс в этой области будет идти семимильными шагами и в относительно недалеком будущем появятся конкретные результаты по направленному изменению свойств ценных сельскохозяйственных видов растений и животных в лучшую сторону. В этой связи патентование CRISPR/Cas технологии и ее коммерциализация приобретает большое значение.

Пока трудно судить насколько все же глубоко CRISPR/Cas технология проникнет в жизнь людей, но уже есть примеры ее использования в самообразовательных целях.

Хотя в названии данного обзора фигурируют растения при его написании нельзя не упомянуть статьи по другим организмам, поскольку практически все пионерные работы выполнены на бактериальных и животных объектах, о чем уже говорилось в заглавной статье этого тематического выпуска [Кулуев и др., 2017]. Один из разделов посвящен редактированию геномов человеческих эмбрионов, поскольку в этой статье было бы неправильно обойти стороной данный вопрос.

ГМ-растения и CRISPR/Cas-редактированные растения

Согласно определению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), размещенному на их сайте¹, «Генетически модифицированные организмы (ГМО) — это организмы (т.е. растения, животные или микроорганизмы), чей генетический материал (ДНК) был изменен, причем такие изменения были бы невозможны в природе в результате размножения или естественной рекомбинации». Обращаем внимание читателей на упоминание о том, что «...такие изменения были бы невозможны в природе...», поскольку оно по сути является ключевым и к нему еще вернемся.

Далее под ГМО мы будем подразумевать исключительно генетически модифицированные растения (ГМ-растения, называемые еще трансгенными растениями), в силу ряда причин, среди которых превалирование таких модифицированных организмов над прочими генетически модифицированными, неутрачивающая борьба с ГМО, представленными именно ГМ-растениями, а также наш интерес к такому.

Ранее мы опубликовали две статьи, можно сказать, в защиту ГМО (ГМ-растений) [Чемерис и др., 2014; 2015], в которых на ста страницах (с учетом цитированной литературы) достаточно подробно рассмотрели все надуманные страхи и потенциальные угрозы для человека и окружающей среды, и не хотим на этих вопросах вновь подробно останавливаться, однако некоторые наиболее важные моменты из тех публикаций следует все же здесь вспомнить. Так, мы взяли на себя смелость и проанализировали движущие мотивы всех противников и сторонников ГМО, после чего многое становится явным и ясным. Если не принимать во внимание довольно большую аудиторию из тех, кто, не будучи специалистами в соответствующей области и не понимая многих тонкостей, лишь слепо следуют за выступающими против ГМО, то во всех остальных группах главенствуют четко выраженные корыстные и коммерческие интересы. Одна из таких групп противников ГМО, например, требует продолжения исследований их безопасности, причем на крысах и мышах при том, что чуть ли не половина человечества (многие государства Северной и Южной Америки, Китай, Индия, целый ряд других стран) уже более двух десятилетий, потребляя ГМ-продукты, как бы испытывает их на себе, и ни одного достоверно зафиксированного случая вреда здоровью от употребления ГМО не отмечено.

¹ http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/ru/

Весной 2016 г. в США был опубликован прошедший рецензию у 26 независимых экспертов доклад «Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects», подготовленный по итогам работы специально созданной комиссии, члены которой изучили разнообразную доступную литературу по данному вопросу, заслушали 80 экспертов по соответствующим областям знаний, провели анализ свыше 900 научных публикаций и прочли более чем 700 комментариев, присланных им как частными лицами, так и общественными организациями. Главный вывод данного доклада – ГМО - безопасны! Сам почти 600-страничный доклад желающие могут приобрести в виде книги на сайте издательства THE NATIONAL ACADEMIES PRESS (<https://www.nap.edu/catalog/23395/genetically-engineered-crops-experiences-and-prospects>) причем после регистрации (которую легко пройти) там же бесплатно доступна его pdf-версия.

Здесь, пожалуй, еще стоит вспомнить также и опыты G.-E.Seralini с соавторами, используемые противниками ГМО в качестве доказательства вредности ГМ-продуктов. Однако, если провести тщательный анализ результатов G.-E.Seralini, то становится очевидным, что кормление крыс пищей с более высоким содержанием ГМО (в их опытах корма содержали 11, 22 и 33% ГМ-ингредиентов, что значительно превышает «допустимые» 0,9%) как раз таки продлевало жизнь этим животным, причем практически прямо пропорционально количеству ГМО. Похоже G.-E.Seralini с соавт. не смогли правильно интерпретировать собственные результаты, приведя в статье излишне усложненное отображение данных. Или они изначально были заинтересованы не в достоверных, а в конкретных результатах, кои и представили, но на самом деле не получили. А противники ГМО видимо и не удосужились посмотреть, а на какие же факты и цифровые данные опираются эти авторы, делая свои весьма громкие выводы! Фактически работа G.-E.Seralini является примером того, что не должно считаться научным исследованием, поскольку их эксперименты выполнены с нарушением всех возможных требований, включая и статистические параметры. Но мы все же не удержались и полученные ими результаты (цифровые данные, ничего не убрав и не исказив) представили в виде другой таблицы [Чемерис и др., 2015], после чего опыты G.-E.Seralini можно действительно рассматривать как подтверждение пользы от употребления ГМО, если бы только это была действительно научная работа.

Тем не менее, еще раз повторим – данные G.-E.Seralini и соавт. (пусть и некорректные) свидетельствуют скорее об оказании защитного эффекта ГМО при возникновении раковых опухолей у

крыс. Кто не верит, может самолично прочитать статью G.-E.Seralini с соавторами, находящуюся в свободном доступе. Даже в двух местах она выложена: - <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512005637> или <http://www.enveurope.com/content/26/1/14>, только в первом месте оригинальная статья отозвана (retracted), а во втором – перепечатана с некоторыми перестановками в тексте. Вдумчивым читателям будет лишь необходимо произвести несложные арифметические подсчеты, на которые сами авторы статьи почему-то оказались неспособны, чтобы понять, что ГМО никак не повредило здоровью крыс, а скорее - наоборот.

Грубо подсчитав во что выльется тотальное определение содержания ГМО в различных пищевых продуктах в масштабах всей страны [Чемерис и др., 2015], мы однозначно поняли, что такого контроля не будет никогда. Или, если даже такое начнется, то тут же и закончится, как когда-то очень быстро завершилась непродуманная монетизация льгот. И тогда спрашивается - зачем весь этот ненужный ажиотаж вокруг ГМО? Тем более, что разнообразие ГМ-растений растет весьма быстро и ассортимент чего (т.е. различных генов, промоторов, терминаторов) в таких продуктах надо будет искать будет шириться, а если искать лишь выборочно, что называется «махнув рукой» на остальные ГМ-ингредиенты, то не напоминает ли это профанацию и желание лишь заработать деньги на таких даже не половинчатых анализах. К тому же надо учесть многочисленные возможные судебные процессы, которые могут инициироваться производителями, у которых вдруг найдут превышение допустимых 0,9%, а они не будут с этим согласны². На самом деле запрет

² В нашей второй статье про ГМО [Чемерис и др., 2015] мы, надеемся, убедительно показали, что в силу множества причин детекция содержания ГМ-ингредиентов в продуктах питания с необходимой точностью принципиально невозможна, причем независимо от установленного порога дозванного содержания ГМО! Поэтому с цифровыми данными некой контролирующей лаборатории, например, совершенно обоснованно может не согласиться другая, нанятая производителем, тем более, что различия в 0,1% процента легко переведут товар из категории «без ГМО» в категорию ГМО-содержащих продуктов со всеми вытекающими последствиями для такого «недобросовестного» производителя, пытающегося скрыть применение ГМ-сырья. И даже если станет допустимо содержание ГМО в 5% (а не 0,9% как сейчас), то уже обнаружение количества ГМ-ингредиентов в 5,1% будет свидетельствовать о превышении установленного порога. И дело не в предельном уровне детекции содержания ГМО,

ГМО в Российской Федерации имеет больше финансовую поддержку, лоббируемую определенными кругами, заинтересованными, например, в так называемом органическом земледелии, которое отчасти сродни почти средневековым технологиям, однако при этом надо понимать, что тем самым усугубляется технологическое отставание нашей страны в такой крайне важной отрасли экономики как аграрный сектор и соответственно в обеспечении продовольственной безопасности.

Мы сейчас готовим третью статью в защиту ГМО, которая будет иметь название «Запретить ГМО невозможно разрешить!» (без запятой, поскольку предлагаем читателю самому по прочтению всего текста поставить оную в нужное, по его мнению, место). В классическом варианте «Казнить нельзя помиловать!» кроме отсутствующей принципиальной запятой есть еще ключевое слово «нельзя», которое мы в нашем случае заменили на «невозможно», поскольку именно оно наиболее правильно отражает ситуацию, которая сложилась вокруг ГМО. Распространение генетически модифицированных растений по Планете уже действительно невозможно остановить и запретить. Как и прогресс науки. Другое дело, что сейчас появление CRISPR/Cas редактирования геномов, безусловно, окажет на создание таких растений самое серьезное влияние, к которому перейдем ниже.

Следует отметить некоторую эволюцию «ГМО-страшилок», распространяемых как в интернете на разных форумах, так и в различных публикациях (газетных, журнальных), которые принципиально не хотим цитировать. Если в начале противодействия людей запугивали тем, что чужеродная ДНК, присутствующая в некоторых ГМ-растениях, в виде, например, одного гена камбалы, может встроиться в геном и у их потомства появятся жабры, то сейчас пугают более изощренно, апеллируя

который может составить и 0,01%, а в точности таких цифр, которые мягко говоря, оставляют желать лучшего. Разве, что цифровая ПЦР позволяет получать нужной точности результаты, но эта технология дорогостояща настолько, что любой конечный товар того стоит не будет. Что касается больших партий сырья, то с ними также все непросто, поскольку как, например, тщательно перемешать зерно из нескольких вагонов и взять потом средневзвешенный образец. Кто даст гарантию правильности взятия пробы, не говоря уже об анализе? Да и другие моменты имеются, о которых мы уже писали в упоминаемой статье. Так что не будет никакой такой повальной детекции ГМО, как кому-то бы этого не хотелось. Невозможна!

к некоему малопонятному простому обывателю плейотропному действию генов. Но прежде чем перейти к его рассмотрению, все же задержимся ненадолго на этих самых жабрах. Даже трудно понять - верили ли те, кто пугал этим население сами или это такое глубочайшее невежество им было присуще. Причем, среди этой группы противников ГМО, запугивающих появлением жабр, ведь были даже биологи с учеными степенями, которые не могли не понимать, что за формирование жабр у рыб отвечает сотню различных генов, а не один ген криопротекторного антифризного белка, циркулирующего в крови арктических рыб и способствующий ее незамерзанию при низких температурах, используемый в некоторых трансгенных растениях с целью повышения их устойчивости к заморозкам [Hightower et al., 1991]. Да и не выращивались подобные растения в промышленных масштабах. Но перейдем к плейотропности.

Под плейотропным или иначе множественным действием генов понимается то, что один ген способен влиять на ряд фенотипических признаков, поскольку продукт практически каждого гена участвует в нескольких или даже во многих процессах, образующих метаболическую сеть организма. В связи с проблемой ГМО их противники с большой охотой используют это свойство плейотропности так как считают, что возразить сторонникам ГМО здесь нечего, поскольку встроенный один или пара генов при создании трансгенных растений могут оказать такое влияние на будущий организм, предвидеть которое невозможно, так как очень мало мы пока знаем о функционировании всего ансамбля генов и белков. Да и место встраивания трансгена при трансформации ядерной ДНК произвольное и оно также может нарушить работу какого-нибудь другого гена (в месте встройки) и тут уже почти цепная реакция может последовать. Вроде и возразить сторонникам ГМО нечего, но на самом деле есть что ответить! Не оспаривая возможность влияния встроенных генов, предлагаем взглянуть на проблему плейотропности генов с иной точки зрения. Значительное количество сортов всех сельскохозяйственных культур во второй половине XX века получены методом экспериментального случайного мутагенеза, осуществляемого физическими воздействиями в виде гамма-лучей, быстрых нейтронов, ионных пучков или химическими агентами в виде N-метил-N-нитрозомочевины, этилметансульфоната либо

другими подходящими химикатами³. Существует специальная база данных Mutant Variety Database <https://mvd.iaea.org>, где собираются сведения об искусственно произведенных мутантах сельскохозяйственных растений, которых в этой далеко неполной базе данных насчитывается свыше трех тысяч, относящихся к более чем двумстам видам. При этом произошедшие мутации множества генов теоретически могут с высокой вероятностью и с еще большей легкостью, чем при создании ГМО вызывать токсичность или аллергенность таких культур. Не говоря уже о массовой плейотропности мутантных генов, потенциально могущей оказывать негативное влияние на развитие растений. И об этом противники ГМО то ли не знали, то ли специально «забывали». Правда, еще в 2001 г. в Европе была принята специальная директива EU Directive 2001/18/EC, согласно которой сорта растений, созданных с помощью радиационного или химического мутагенеза, следует считать неподлежащими контролю как за ГМО или фактически безопасными, поскольку сама история их использования это уже доказала. Действительно формально такие мутантные растения согласно вышеупомянутого определения ВОЗ считаются ГМО не могут, поскольку мутации в обязательном порядке происходят в природе, хотя их частота в природных процессах намного ниже, чем в результате химического или радиационного воздействия. Абсолютно уверены в том, что если допустить, что трансгенные растения появились бы раньше и человечество с ними уже бы свыклось, то предложение проводить для создания новых сортов случайный мутагенез под действием радиации или сильных химических мутагенов встретило бы, наверное, не менее серьезное сопротивление, отчасти даже справедливое.

Некоторое время назад информация о происходящих мутациях под воздействием химикатов или радиации подтверждалась лишь измененными фенотипами, среди которых отбирались те, что были нужны для селекции. А сколько же таких мутаций после радио- или химобработки в действительности возникало в геноме оставалось тайной. Но с появлением методов полногеномного секвенирования новых поколений ситуация в корне поменялась. В настоящее время проведены многочисленные работы по секвенированию геномов мутагенизированных форм, показавшие множество таких мутаций. Чтобы не быть голословными приведем конкретные недавние работы.

³ Об индуцированном мутагенезе более подробно говорится в другой статье этого выпуска журнала [Вершинина и др., 2017].

Так, полногеномное секвенирование было применено для анализа 21 растения мягкой пшеницы, мутации в которых были вызваны обработкой этилметансульфонатом. Секвенирование показало, что частота произошедших мутаций составила в среднем одну замену на 5 тысяч пар нуклеотидов, из которых 70% пришлось на долю транзиций, а 30% - на трансверсии [Sidhu et al., 2015]. В результате гамма-облучения семян томата и их обработки тем же этилметансульфонатом у появившихся растений с помощью полногеномного секвенирования выявилось значительное количество произошедших мутаций, составивших в общей сложности более одного миллиона двухсот тысяч однонуклеотидных замен вместе с инсерциями/делециями [Shirasawa et al., 2016]. Полногеномное секвенирование двух экотипов модельного бобового растения лядвенца *Lotus japonicus* показало, что замены нуклеотидов под действием довольно низкой концентрации этилметансульфоната возникали приблизительно через каждые 200 тысяч пар нуклеотидов, что в целом на геном этого вида размером около 470 млн. пар нуклеотидов приводило к возникновению свыше 2 тысяч мутаций [Mohd-Yusoff et al., 2015].

Таким образом, «обычные» сорта сельскохозяйственных культур, получаемые с помощью индуцированного мутагенеза или при использовании в обычных скрещиваниях ранее полученных мутантных линий, несут в себе еще больший «заряд» непредсказуемости произошедших в них мутаций, что делает их в плане плейотропности генов теоретически куда более опасными, нежели ГМ-растения. Можно также вспомнить, что фактически любое скрещивание, в особенности отдаленное, самых обычных растений ведет к образованию нового организма с «перемешанными» генами, где плейотропный эффект обязательно имеет место. В том числе и отрицательный. И как же тогда относиться, например, к земклунике (гибриду садовой крупноплодной земляники и клубники европейской) или к йоште (гибриду черной смородины и крыжовника обыкновенного)? И ко многим другим им подобным отдаленным гибридам? В них то столько разных генов перемешано! Но такие гибриды, полученные с помощью специального скрещивания ни один противник ГМО, в том числе в связи с плейотропностью, и не вспоминает и, наверное, не боится. Не странно ли?!

В отличие от обычных трансгенных или иначе ГМ-растений, образцы, подвергнувшиеся CRISPR/Cas редактированию, имеют ряд принципиальных отличий. Так, в результате нокин-редактирования будет известно место встраивания целевого трансгена, точнее оно изначально выбирается экспериментатором. В этом, кстати, также

заключается некоторая трудность, поскольку нужно выбрать активно транскрибирующийся участок генома растения и при этом не нарушить работу никаких других генов. Однако знание полногеномных последовательностей редактируемых растений позволит такой выбор места для CRISPR/Cas-нокина несколько упростить. При выполнении нокаутного редактирования происходит запрограммированное нарушение определенного гена и в случае создания нового растения с хозяйственно-полезными признаками, нарушаемый ген должен оказывать некое отрицательное воздействие на рост и развитие редактируемого растения. Подобных растений создано уже немало и целый их ряд, относящихся к разным видам, приведен в недавнем обзоре Коротковой и соавт. [2017]. Есть и зарубежные обзорные статьи, посвященные этому вопросу [Khatodia et al., 2016; Cardi et al., 2017; Zhang et al., 2017].

Ярким примером произведенного благодаря нарушению работы одного гена положительного эффекта на рост растения может служить работа китайских авторов, сумевших в геноме гексаплоидной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* с помощью TALEN и CRISPR/Cas9 технологий во всех трех субгеномах нокаутировать все шесть аллелей гена, ответственного за поражение мучнистой росой (MILDEW-RESISTANCE LOCUS), в результате чего отредактированные растения пшеницы стали невосприимчивы к такому опасному заболеванию как мучнистая роса [Wang et al., 2014]. Теоретически с помощью химического или радиационного мутагенеза можно добиться того, что в каком-то из образцов пшеницы все эти гены *Tamlo* окажутся нарушенными, но при этом огромное количество локусов, оказавшихся за пределами рассмотрения, также неизбежно подвергнутся случайным мутациям. Тогда как с помощью CRISPR/Cas геномного редактирования в нокаутном режиме можно целенаправленно влиять только на выбранные гены-мишени, считая, что нецелевые сайты подвергаться мутациям не будут, что составляет отдельную проблему и она нами затрагивается в статьях Кулуева и соавт. [2017] и Чемериса и соавт. [2017]. Можно с помощью и классического трансгеноза создать аналогичные растения пшеницы, устойчивые к мучнистой росе и кодирующие, например, антисенс-РНК к нужным транскриптам, но это будет обычное трансгенное растение или ГМО. Можно и РНК-интерференцию применить, но и ее эффективность будет уступать нокаутным растениям.

Если нокин-CRISPR/Cas-редактирование геномов предполагает обязательное внедрение некоего чужеродного фрагмента ДНК, то нокаутные растения, полученные с помощью

усовершенствованной технологии CRISPR/Cas редактирования без использования какой-либо ДНК и производимые с помощью рибонуклеопротеидного комплекса из гидовой РНК (гидРНК) и соответствующей Cas нуклеазы, доставляемых путем бомбардировки клеток растений золотыми частицами, фактически являются имитацией природных мутагенных процессов и, следовательно, под определение ГМО, принятого ВОЗ, не попадают и на них не должны распространяться существующие ограничения при возделывании ГМ-растений. Безусловно, в подобном образом отредактированных растениях плейотропный эффект иметь место может, но в любом случае он по масштабу не будет сравним с тем, что проявится после радиационного или химического мутагенеза.

С помощью геномного CRISPR/Cas9 редактирования учеными Пенсильванского университета был получен новый сорт шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus*, не некоричневееющего на воздухе после сбора урожая, благодаря тому, что в нем оказался нарушенным один из шести имеющихся генов полифенолоксидазы, ответственной за накопление меланин-подобного пигмента, что снизило их общую ферментативную активность на 30% [Waltz, 2016]. В письме от 13 апреля 2016 г. Animal and Plant Health Inspection Service of US Department of Agriculture (APHIS USDA) (https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-321-01_air_response_signed.pdf) в ответ на запрос Dr. Y. Yang сообщалось, что созданная с помощью CRISPR/Cas технологии данная линия шампиньонов не подлежит регулированию, поскольку ГМО они не являются. Для коммерциализации такого сорта не требуется проведения продолжительных процедур исследований его безопасности. 18 апреля 2016 г. аналогичное письмо APHIS USDA направило в компанию DuPont Pioneer (https://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/About_Globa/Non_Searchable/15-352-01_air_response_signed.pdf), в котором говорится, что созданный ими с помощью CRISPR/Cas нокаутной технологии гена *waxy* сорт кукурузы, характеризующийся повышенным содержанием амилопектина, ГМО не является и не подлежит соответствующему регулированию [Waltz, 2016a]. И главным основанием для принятия таких решений было отсутствие какой-либо чужеродной ДНК в этих образцах гриба и растения [Kim, Kim, 2016]. Здесь надо добавить, что Аргентина, стала первой страной, опередив США, в своем таком благостном отношении к нокаутным растениям, поскольку еще в конце 2015 г. приняла резолюцию No 173/2015, в которой признала, что если в новом сорте, созданном с помощью NPBT (New Plant Breeding Techniques) чужеродной ДНК не содержится,

то он считается ГМО не может и на него не должны распространяться правила регулирования обращения ГМ-растений [Ishii, Araki, 2017].

Предполагается, что такой подход к CRISPR/Cas отредактированным сельскохозяйственным видам растений, где с помощью нокаутирования нарушены гены, отрицательно влияющие на урожайность и рост растений, без внесения посторонней ДНК открывает широкую дорогу небольшим компаниям, у которых раньше не было средств на проведение длительных и дорогостоящих анализов по доказательству безопасности созданного ими ГМ-растения. Здесь надо заметить, что время, затрачиваемое на доказательство безопасности ГМО, с шести месяцев в конце 90-х гг. прошлого столетия выросло до 65 месяцев в 10-х гг. столетия нынешнего [Smyth, 2017]. При этом можно предположить, что гиганты аграрной индустрии могут быть этим отчасти недовольны, поскольку могут ощутить определенную конкуренцию со стороны мелкого бизнеса и университетов.

В Европейском Союзе, где сильно влияние таких организаций как Greenpeace, Friends of the Earth, прочих неправительственных анти-ГМО организаций, настроения по отношению к CRISPR/Cas отредактированным растениям далеко не такие благодушные [Sprink et al., 2016]. Заголовок одной из статей [Zilberman et al., 2013] на эту тему начинается словами «Continents divided», что реально отражает состояние дел в этой области по обе стороны Атлантики, причем уже давно. В Европе весьма четко прослеживаются намерения рассматривать подобные, в том числе нокаутные растения, как самые настоящие ГМО. Однако, в Швеции, например, склонны считать, что нокаутные растения без чужеродной ДНК эквивалентны таковым, полученным радиационным и химическим мутагенезом и следовательно они - не ГМО. Какое отношение к таким нокаутным растениям сложится в России предугадать трудно, однако хочется выразить надежду, что они также не будут сочтены за ГМО и их можно будет без лишних ненужных сложностей выращивать на полях.

Есть опасения, что потребители в Европе, да и по миру воспримут такие NPBT растения настроенно и один из путей преодоления такого отношения заключается в просветительской работе [Ishii, Araki, 2016]. Но как бы в Европе к нокаутным растениям, полученным с помощью CRISPR/Cas технологии редактирования геномов, не относились, количество таких сортов потенциально довольно ограничено, поскольку не так много генов, блокирование работы которых может приводить к улучшению агрономических показателей культурных растений. Поэтому более перспективным выглядит создание новых сортов растений с отредактированными

геномами с помощью нокин вариантов, привносящих вместе с новыми генами ценные признаки. И это по современным понятиям уже ГМО, на которые пока распространяются действующие и во многих странах довольно жесткие правила. При этом хочется выразить надежду, что когда-нибудь придет понимание, что генетически модифицированные растения особенно с помощью CRISPR/Cas технологии, позволяющей определять место встраивания трансгена, абсолютно неопасны и их следует массово выращивать. Хотелось бы, что бы это не отложилось на очень долго. Впрочем, в Европе уже начались определенные подвижки, поскольку дошло до суда, о котором будет говориться ниже.

А.Эйнштейн как-то сказал «Труднее расщепить предрассудок, чем атом». Этой фразой начинается заметка шведского и итальянского ученых D.Eriksson и R.Defez «EU and GMOs: The case for a knowledge-based society», опубликованная в Euractiv, полный текст которой доступен по адресу - <http://www.euractiv.com/section/agriculture-food/opinion/wed-eu-and-gmos-the-case-for-a-knowledge-based-society>. И ситуация с ГМО (по крайней мере в Европе) как раз является ярким подтверждением слов А.Эйнштейна. Однако 13 сентября 2017 г. произошло возможно весьма знаковое событие, поскольку Главный суд Европейского Союза (Court of Justice of the European Union) принял решение в пользу одного из итальянских фермеров⁴, подтвердив его право выращивать ГМ-кукурузу сорта MON810 фирмы Monsanto, поскольку возможный вред от ее употребления не доказан, что ранее было ему и еще одному его коллеге-аграрию запрещено делать итальянскими властями, ссылавшимися на принятый ими свой закон от 2013 г., который суд Европейского Союза счел не имеющим правовой основы. При этом в решении европейского суда говорится, что, исходя из принципа предосторожности, вводить запрет нельзя, если только нет четких доказательств, что реально существует риск для здоровья человека, животных, или для самой природы. Теперь, с одной стороны есть довольно давняя директива Европейского Союза, запрещающая выращивать ГМО на территории стран ЕС, а с другой – недавнее решение Верховного суда Европы. Что главное?

Пикантность ситуации заключается еще и в том, что в той же Италии 87% всех кормов для свиней и коров содержат ГМО (среди которых также присутствует та самая кукуруза MON810) и их можно

⁴ Giorgio Fidenato – так зовут итальянского фермера, обратившегося в Суд Европейского Союза, и за его решительность он достоин того, чтобы его имя стало широко известно.

импортировать, а выращивать на собственных полях - нельзя. К тому же на европейском континенте не произрастают дикие сородичи кукурузы, которые могли бы переопылиться пылью с ГМ-сортов и, следовательно, экологической опасности просто не существует. Почти абсурдная ситуация, которая схожа для всей Европы, где, например, 92% всей используемой в качестве кормов сои является генетически модифицированной и при этом импортируемой. Фактически население европейских стран массово (хотя и косвенно едят ГМО) и относятся к этому спокойно, но выращивать самим себе не позволяют.

Намерена ли Европа становиться научно-обоснованным обществом или готова по-прежнему опираться на предрассудки и заблуждения? Этим вопросом в своей заметке как раз и задаются вышеупомянутые D.Eriksson и R.Defez.

В качестве некоего примера потенциального применения CRISPR/Cas технологий для улучшения потребительских свойств сельскохозяйственных культур можно привести ситуацию вокруг томатов, поскольку она весьма ярко характеризует реалии классической селекции и возможности генной инженерии. Так, несмотря на то, что как говорится «на вкус и цвет – товарищей нет», потребители во многих странах уже давно отмечают, что вкус у помидор стал плохим и в такой оценке этих плодов похоже все едины⁵. Те томаты, что повсеместно продаются в обычных магазинах и супермаркетах стали просто невкусными. При этом как раз цвет этих фруктов/овощей – напротив несколько улучшился, поскольку томаты стали равномерно красными. Противники ГМО часто связывают это с тем, что генно-модифицированные теперь помидоры продаются. На самом деле, это абсолютно не соответствует действительности, поскольку ни одного генно-инженерного сорта томатов, среди выращиваемых сейчас ГМ-культур, нет. Справедливости ради следует сказать, что именно томаты стали первым ГМ-растением, выведенным на поля еще в 1996 г. и выращиваемым до 1998 г. Тогда под названием Flavr Savr (производного от Flavor Saver, что означает в переводе на русский - «хранитель вкуса») выращивался уникальный сорт томатов с пролонгированным хранением плодов. В нашей первой статье о ГМО [Чемерис и др., 2014] вопросам создания таких томатов, их коммерциализации и беспрепятственного употребления в пищу населением томатной пасты из таких плодов, а затем организованным с помощью средств массовой информации неприятием этого товара уделено

⁵ Авторы данной статьи также солидарны с мнением, что вкус у многих сортов помидор испортился.

довольно много внимания и повторяться здесь не хотим. При этом отнюдь не исключаем, что тот или аналогичный сорт томатов с подобными свойствами может снова через какое-то время выращиваться в производственных масштабах и спокойно употребляться в пищу, тем более, что со вкусом у него проблем как раз не было.

Для того чтобы понять как стало возможным ухудшение вкуса у современных сортов томатов несколько групп ученых из разных стран провели соответствующие исследования и получили интересные данные. Так, за вкусовые характеристики томатов отвечают действующие на вкусовые рецепторы органические кислоты (в основном яблочная и лимонная), сахара (главным образом глюкоза и фруктоза), тогда как обонятельные рецепторы человека улавливают значительное число летучих пахучих веществ, часть которых представлена в плодах томатов в увеличенных концентрациях. Подсчитано, что в них может находиться до 400 летучих соединений [Baldwin et al., 2000], из которых от 20 до 30 являются преобладающими [Tieman et al., 2006; 2012; Mathieu et al., 2009; Rambla et al., 2014]. Развитию всех этих исследований способствовала в том числе и расшифровка полного генома томата *Solanum lycopersicum* сорта «Heinz 1706», размер которого составил около 900 млн.п.н. [Tomato Genome Consortium, 2012].

Наиболее интересная информация в связи со вкусовыми особенностями томатов была получена при анализе имеющихся у этого вида растений двух близкородственных генов *GLK1* и *GLK2*, кодирующих транскрипционные факторы, характеризующихся сходными функциями и вовлеченными в работу генного ансамбля, отвечающего за фотосинтез. Причем в листьях функционируют оба эти гена, а в плодах только второй [Powell et al., 2012]. Было обнаружено, что у гена *GLK2* у «плохих» сортов имеется мутация, где в участке из шести аденинов подряд вставлен дополнительный нуклеотид в виде также аденина, приводящего к нарушению рамки считывания и образованию терминирующего кодона и соответственно укороченного белкового продукта всего из 80 аминокислот вместо положенных 310. Растение с таким дефектным геном существовать может, поскольку первый ген из этой пары до некоторой степени восполняет нарушение работы второго. Когда и где произошла эта мутация установить не представляется возможным и важнее восстановить в будущих сортах функционирование гена *GLK2*, поскольку оказывается это крайне важно для возвращения томатам их вкуса, который всем или, по крайней мере, большинству нравился. Наверное, многие видели созревающие помидоры на грядках и обращали внимание, что они начинают краснеть с

нижней части плода, тогда как верхняя зона около плодоножки долго остается зеленой. В одной из работ проведен тщательный анализ экспрессии гена *GLK2* и обнаружено, что в норме имеется градиент его активности в плоде [Nguyen et al., 2013]. Именно в верхней части плода у старых сортов продолжает функционировать ген *GLK2* и идти фотосинтез, снабжая зреющий томат дополнительными количествами углеводов. Поэтому так называемые «корневые» помидоры считаются самыми вкусными.

На протяжении многих лет с помощью как классической селекции, так и используя химические или радиомутагены⁶, селекционеры добивались улучшения различных характеристик этих плодов, включая их устойчивость к фитопатогенам, товарный вид, лежкость плодов и пр. При этом органолептическим показателям серьезного внимания не уделялось, поскольку упор делался на относительно длительное хранение, возможность дальнейшей транспортировки, сохранение товарного вида, чтобы покупатель на прилавке мог видеть красивый непортящийся плод и был готов его купить. Да и контролировать биохимические показатели, включая присутствующие в пико- и наномолярных концентрациях пахучие метаболиты, много сложнее, чем вести визуальную оценку красивых и долгохранящихся плодов, не подверженных инфекциям.

В результате такой селекции произошло случайное нарушение работы гена *GLK2* вследствие чего плоды стали краснеть равномерно и этот признак стал вовлекаться в дальнейшую селекцию на прочие важные продажные характеристики. Поэтому в магазинах сейчас лежат плоды томатов, окрашенные абсолютно равномерно, выдерживающие длительные транспортировку и хранение при низких температурах, но абсолютно безвкусные. Собственно, ухудшение вкусовых показателей и питательной ценности в последние годы отмечается не только у томатов, но и у многих других культур, что также, видимо, объясняется проводимой селекцией на товарный вид с учетом различных требований производителей. Так, проведенное в США исследование питательных веществ у 43 сортов преимущественно огородных культур достоверно показало произошедшее за период с 1950 по 1999 гг.

⁶ На уже упоминавшей странице <https://mvd.iaea.org> можно найти информацию о созданных, в том числе, отечественными селекционерами сортах томатов времен СССР, например комбинированным воздействием на семена 0,01% раствором нитрозометилмочевины и гамма-лучами с дозой в 100 Грей.

заметное снижение содержания 6 таких веществ из 13 анализировавшихся [Davis et al., 2004].

Таким образом, то, что в случае с помидорами «испортила» классическая селекция необходимо сейчас восстановить с помощью генно-инженерных манипуляций, включая CRISPR/Cas редактирование геномов. Требуется внести целевые и фактически точечные генетические изменения в геном томатов для улучшения вкуса их плодов [Klee, Tieman, 2013]. В недавней статье [Tieman et al., 2017] большого коллектива авторов из ряда стран был проведен всесторонний анализ в том числе с использованием так называемого всегеномного исследования ассоциаций (Genome-Wide Association Studies) 398 сортов томатов, среди которых были как современные, так и старые, в том числе раритеты, а также дикие формы. Оказалось, что в современных сортах содержание определяющих вкус веществ намного ниже. Авторы наметили пути как можно с помощью генной инженерии воссоздать сорта томатов с почти забытым вкусом. Справедливости ради следует сказать, что и многие современные сорта томатов, в том числе выращиваемые на приусадебных участках, имеют вполне удовлетворительные органолептические показатели, а отмечаемое многими потребителями произошедшее ухудшение вкуса помидор касается в первую очередь плантационных сортов, плоды которых должны к тому же выдерживать длительную транспортировку.

Также несколько слов надо сказать об изменении вкусовых характеристик томатов во время их хранения при пониженных температурах. Установлено, что даже кратковременное (около суток) пребывание плодов при +5°C приводит к изменению спектра летучих ароматических соединений, среди которых начинают превалировать гваякол и метилсалицилат, обычно связываемые потребителями с неким «медицинским» привкусом таких плодов [Farneti et al., 2015]. Помещение томатов в условия комнатной температуры уже через сутки приводит к частичному восстановлению исходных ароматов. Генные инженеры теперь задумались и о том, как создать томаты, которые бы не меняли своего вкуса и аромата после длительного хранения на холоде, что неизбежно при транспортировке этих плодов на большие расстояния. И в этом случае без CRISPR/Cas технологии, по-видимому, уже не обойтись.

Хотя это не имеет прямого отношения к CRISPR/Cas редактированным растениям, но оставить эту недавнюю работу авторов из Словении [Fister et al., 2017] без внимания, наверное, было бы неправильным. Они обратили внимание на серьезную проблему охраны авторских прав на селекционные достижения и предложили путем агробактериальной трансформации вводить в геномы созданных сортов

нейтральные⁷ фрагменты ДНК со специально подобранной последовательностью, которые с помощью ПЦР можно выявить и секвенировать, расшифровав некое «сообщение». Таким образом, по их мнению, будет легко доказать права на конкретную интеллектуальную собственность. Фактически они предлагают получать самое настоящее трансгенное растение или ГМО, пометив такой чужеродной ДНК в том числе даже сорт обычной селекции. Собственно, считая, что ГМО не опасны, может быть когда-нибудь это будет весьма востребовано. А сейчас эти авторы разработали специальную программу (<http://www.storing-data-into-living-plant.net>), переводящую короткий текст (всего допускается 300 символов), написанный с использованием английского алфавита, включая арабские цифры, а также пару знаков # и ' в последовательность ДНК (1200 нуклеотидов) и наоборот - последовательность ДНК в соответствующий закодированный в ней текст. При этом, похоже, авторы забыли указать, что их программа также кодирует пробелы между словами, и это обнаружено нами при преобразовании с помощью их on-line конвертера для пробы некоего нашего текста в последовательность ДНК и обратно.

Патентная защита CRISPR/Cas технологии

Учитывая потенциально широкомасштабное коммерческое применение процесса редактирования геномов различных организмов с помощью CRISPR/Cas технологии, она не могла не быть запатентована. И действительно к настоящему времени в разных странах выдано уже немало патентов, и еще большее количество патентных заявок по CRISPR/Cas находятся на стадии рассмотрения. Ниже мы коснемся этих цифровых данных, но сначала следует в хронологическом порядке изложить ситуацию вокруг патентования основного принципа CRISPR/Cas9 редактирования геномов и разгоревшейся патентной битвы. В предыдущей статье [Кулуев и др., 2017] мы уже вспоминали про ПЦР в связи с отклонением некоторыми редакциями ведущих журналов рукописей статей по CRISPR-локусам, аналогично первым статьям по ПЦР. Патентование CRISPR/Cas9 технологии дают повод еще раз вспомнить ПЦР, поскольку и в вопросе защиты интеллектуальной собственности имеется некоторая аналогия. Так, на использование ПЦР

⁷ Не вовлекаемые в транскрипционный процесс и ничего не значащие с точки зрения их участия в метаболизме организма, однако вклад в плейотропное действие генов они оказывать могут при условии внедрения их в нежелательные места генома, где они могут нарушить работу каких-либо генов.

американским патентным ведомством были выданы два основных патента [US Patent # 4,683,195 и US Patent # 4,683,202], приведших к возможности коммерческого использования данной реакции, которые на протяжении нескольких лет активно оспаривались, и безуспешно, так как действие ряда пунктов формул этих изобретений было отменено. При этом вокруг ПЦР шли настоящие патентные баталии.

Хотим сразу заметить, что мы ни на чьей стороне в споре за права на интеллектуальную собственность на CRISPR/Cas технологии и просто наблюдаем за развитием событий. Итак, 25 мая 2012 г. в Патентное ведомство США (United States Patent and Trademark Office) из Калифорнийского университета в Беркли и от их коллег из Венского университета поступила заявка⁸ на патент «Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription», которой был присвоен номер 13/842859, где изобретателями выступили J.Doudna, E.Charpentier и другие их соавторы, а формула изобретения содержала 155 пунктов со множеством подпунктов и одним из важных новшеств было то, что они показали возможность объединения в одной молекуле РНК крРНК и тракрРНК. А 12 декабря того же 2012 года F.Zhang из Broad Institute в Кембридже (США) подал заявку на патент «CRISPR-Cas systems and methods for altering expression of gene products», содержащую всего 20 пунктов формулы изобретения. При этом было заплачено за ускоренное рассмотрение этой заявки, что в итоге обернулось тем, что патент США по ней за номером 8,697,359 был присужден уже 15 апреля 2014 г., тогда как ранее поданная Калифорнийским университетом упоминаемая выше аналогичная заявка до сих пор находится на рассмотрении у экспертов. Таким образом, создалась ситуация, при которой возник правовой спор о правообладателе «блокирующего» патента на технологию CRISPR/Cas9 между главным образом американскими институтами и университетами с восточного и западного побережий США. А поскольку данная технология теоретически сулит миллиарды долларов, то началась настоящая патентная война [Park, Babcock, 2017; Sherkow, 2017]. Авторы с восточного побережья утверждают, что в патентной заявке J.Doudna и соавторов нет упоминания о редактировании эукариотических клеток, на что получают ответ, что из патента это становится очевидным, и не было необходимости

специально указывать такую возможность, поскольку любой специалист с обычной квалификацией в области молекулярной биологии в состоянии это оценить и сделать. И приводят примеры быстро последовавших работ, в которых получены результаты по CRISPR/Cas редактированию геномов эукариотических организмов. Однако, приводимые ими фамилии авторов тех работ настолько известны (J.Doudna, F.Zhang, G.Church, J-S.Kim), что противоположная сторона парирует словами, что это люди далеко не ординарные и потому примером знаний общей массы экспериментаторов служить не могут [Ledford, 2016]. Здесь все же нужно заметить, что эта патентная заявка Калифорнийского и Венского университетов являет собой пример не до конца продуманного текста, в котором им надо было всего то упомянуть эукариоты и еще несколько пунктов формулы в дополнении к 155 посвятив именно таким организмам, тем более, что по их мнению это было очевидным.

В апреле 2015 г. Калифорнийский университет направил запрос в Патентное ведомство США с просьбой, чтобы Патентный суд и апелляционный совет (Patent Trial and Appeal Board) разобрался с правообладателями по патентам по CRISPR/Cas9 технологии. 11 января 2016 г. было вынесено решение, что в этих патентах возможно содержатся порочащие новизну пункты формулы изобретения другого. Однако в результате проведенных в декабре 2016 г. нескольких слушаний было решено, что пункты формулы из заявки Калифорнийского университета не порочат формулу изобретения из патента, принадлежащего Broad Institute. В итоге решение, сопровождаемое документом, занявшим 51 страницу, было вынесено в пользу Broad Institute и его партнеров - Massachusetts Institute of Technology, Harvard University [Cohen, 2017]. При этом мнения разных специалистов, в том числе по патентному праву разделились. Некоторые считают принятое решение справедливым, кто-то - несправедливым [Ledford, 2017]. К тому же возникают вопросы и для бизнеса, поскольку коммерциализация CRISPR/Cas9 технологии уже вовсю идет и в нее вовлечены патентообладатели и патентозаявители с обеих побережий США, о чем будет говорить дальше. Сейчас многими ожидается, что по той патентной заявке Калифорнийского университета вскоре все же будет вынесено положительное решение. Тем не менее, Калифорнийский университет, не согласившись с решением Патентного суда в середине апреля 2017 г. подал апелляцию в US Court of Appeals for the Federal Circuit в Вашингтоне и надо ждать повторного рассмотрения дела.

Оставалось еще Европейское патентное ведомство, которое также успело выдать CRISPR/Cas9

⁸ Дополнительные сведения о данной заявке – номер и дата публикации – US20140068797 A1 от 6 марта 2014 г., заявлена 15 марта 2013 г., с датой приоритета от 25 мая 2012 г.

патенты по заявкам Broad Institute, оспариваемые третьими сторонами, и не выдало J.Doudna и ее соавторам. При этом в Европе действуют свои патентные правила и решение Патентного ведомства США они конечно могут принять к сведению, но руководствоваться им не обязаны. Так, 23 марта 2017 г. Европейским патентным ведомством принято предварительное решение в пользу J.Doudna, E.Chargentier и их коллег, отличное от такового в США, и Калифорнийский университет будет его использовать в качестве дополнительного аргумента при отстаивании своего приоритета в правовом споре в Патентном ведомстве США. Дело еще в том, что в Европе давно действует принцип, что патент будет выдан тому, кто раньше заявил о своем изобретении, тогда как в США до марта 2013 г. (то есть во время подачи патентных заявок обоими противоборствующими сторонами) действовал иной принцип – владелец интеллектуальной собственности тот, кто раньше изобрел. В этом случае для доказательства приоритета в ход шли, в том числе рабочие журналы экспериментаторов, однако, из-за того, что приходилось сталкиваться с их подделкой, было принято решение – первый тот, кто первым заявил и в этом случае первенство было бы за заявкой Калифорнийского университета, представители которого говорят, что намерены добиваться признания права именно за ними распространять принцип CRISPR редактирования на геномы любых организмов и в середине апреля подали новую апелляцию, о чем уже говорилось выше. Средства массовой информации тиражируют образное высказывание J.Doudna, что она с коллегами придумали теннисный мячик, а на восточном побережье придумали зеленый теннисный мячик, тем самым давая понять, что их результат основной.

В литературе можно встретить высказывания, что излишняя широта пунктов формул изобретения в пресловутых патенте и патентной заявке с восточного и западного побережий США может «задушить» инновации в CRISPR/Cas технологиях [Gray, Spruill, 2017], что, впрочем, характерно для многих патентов, имеющих блокирующий характер. Собственно такими вопросами в отношении биотехнологических патентов задавались и ранее [Lei et al., 2009; Graff et al., 2013].

Вне всякого сомнения, что независимо от исхода патентных баталий применение CRISPR/Cas технологий будет не только расширяться, но и происходить их совершенствование и разработка новых вариантов, имеющих определенные преимущества. Поэтому неизбежно будет идти патентование таких результатов. В этой связи представляет интерес - как обстоят дела с этим уже

сейчас, для чего потребовалось провести патентный поиск, глубина которого позволила нам составить некое пусть и неполное представление об этой сфере продвижения CRISPR/Cas систем.

При поиске сочетания терминов «CRISPR» AND «Cas9» в патентной базе данных США в середине мая 2017 г. обнаружился 151 выданный патент, а поиск в базе данных только еще поданных заявок показал, что таковых уже гораздо больше - 850. Сочетания терминов «CRISPR» AND «Cpf1» показали там же наличие всего 6 патентов и 52 заявок на патенты. Однако в случае американских патентов и заявок на таковые, в тексте которых есть термины «CRISPR» AND «Cas9» или «Cpf1», надо иметь в виду, что в довольно большом числе документов они встречаются в списках литературы, принятой авторами патента во внимание при его написании. В Европейской патентной базе данных поиск патентных заявок в разделе Worldwide-collection из более чем 90 стран на середину мая выдает 918 документов, где слово «CRISPR» встречается в заголовках и аннотациях. Поиск схожих патентов в Китае показал заметный рост, поскольку сообщалось, что на конец июня 2015 г. в Патентном ведомстве КНР имелось всего 35 заявок [Peng, 2016], то по состоянию на середину мая 2017 г. таковых, где термин «CRISPR/Cas9» встречается в заголовках или на первых страницах, уже 148. При этом аналогичный поиск по базе данных российских патентов «вернул» 14 документов со словом «CRISPR», из которых - два патента, а 12 – заявки на них, но, к сожалению, все они принадлежат зарубежным авторам и компаниям.

Пока одни из основных патентов, охраняющих коммерческое применение CRISPR/Cas технологии, принадлежат The Broad Institute, Inc. (США) и Massachusetts Institute of Technology (США) под номерами 8,697,359 и 8,771,945 с датами приоритета от 12 декабря 2012 г. и 18 февраля 2014 г. и датами выдачи патентов 15 апреля 2014 г. и 8 июля 2014 г. соответственно. Патентная защита в них оговаривается для методов использования CRISPR/Cas системы для редактирования геномов эукариотических организмов с целью изменения экспрессии отдельных генов и изменения продуктов этих генов, в том числе одновременно множественного, а также патентуются компоненты данной системы, включая упоминание о том, что гидовая РНК (sgRNA) может быть сшита с tracrRNA. Оговаривается также оптимизация кодонов Cas9 нуклеазы для более эффективной транскрипции в разных организмах. Этим же организациям совместно с President of Fellow and Harvard College (США) принадлежит патент # 8,932,814 с датой выдачи 13 января 2015 г. В этом документе содержится патентная защита использования мутантной формы

нуклеазы Cas9, превращающей ее в нисказу. Также генно-инженерным путем модифицированные варианты Cas9 нуклеазы запатентованы The General Hospital Corporation (США) в документе под номером 9,512,446, выданном патентным ведомством США 6 декабря 2016 г. Этой же организацией 14 февраля 2017 г. получены патенты # 9,567,603 и # 9,567,604, в которых соответственно патентуется применение РНК-направляемой *FokI* эндонуклеазой и описывается использование укороченной гидовой РНК (trugRNA, где tru – от truncated). 2 мая 2017 г. патент США выдан Литовскому университету, где также патентуется использование нисказа на основе нуклеазы Cas9.

Среди массы поданных заявок на патенты США по различному улучшению, усовершенствованию CRISPR/Cas9 технологии можно отметить следующие. Так, уже упоминавшиеся выше The Broad Institute, Inc. (США), Massachusetts Institute of Technology (США), President of Fellow and Harvard College (США) совместно патентуют новые CRISPR системы, включая перспективную нуклеазу *Spf1*, подав заявку # 20160208243 А1. Они же вместе с Токийским университетом (Япония) патентуют некоторую оптимизацию системы CRISPR/Cas9 (номер заявки US 2016/0355797 А1). The General Hospital Corporation (США) подал две заявки на патенты США, с помощью одной из них (US 2016/0319261 А1) предполагается охрана Cas9 нуклеазы с измененной PAM специфичностью, а в другой (US 2016/0319281 А1) патентуются мультиплексные направляющие РНК. Можно также упомянуть еще пару заявок на патенты по улучшению технологии CRISPR/Cas9, принадлежащие научным учреждениям США – Whitehead Institute for Biomedical Research (US 2016/0053304 А1) и The John Hopkins University (US 2016/0074535 А1). Немало заявок на подобные патенты поданы международными коммерческими структурами – Sigma-Aldrich (US 2016/0017366 А1), Life Technologies Corporation совместно с Thermo Fisher Scientific Geneart GmbH (US 2016/0102322 А1), Integrated DNA Technologies, Inc. (US 2017/0044537 А1), Agilent Technologies, Inc. (US 2017/0058298 А1) и др.

Для нас отдельный интерес представляют заявки, в которых патентуется улучшение CRISPR/Cas систем применительно к растениям, включая способы детекции редактированных форм, что нашло отражение в документах, подготовленных Regents of the University of Minnesota (US 2014/0273235 А1 и US 2017/0029831 А1), а также хорошо известной в аграрном бизнесе фирмой Bayer CropScience NV (US 2015/0184171 А1). Другая не менее известная агробιοтехнологическая фирма Pioneer Hi-Bred International, Inc. недавно получила патент США # 9,580,701, в котором упомянуто применение нуклеазы *Spf1*.

Коммерциализация CRISPR-Cas технологий

Несмотря на то, что ситуация с собственниками CRISPR/Cas технологии была до конца не ясна, основные разработчики занялись ее коммерциализацией. F.Zhang явился одним из основателей фирмы Editas Medicine, которая аффилирована с Broad Institute, Duke University и Massachusetts General Hospital. J.Doudna и E.Charpentier при Калифорнийском университете при участии Венского университета организовали аналогичную фирму Caribou Bioscience. В Европе E.Charpentier создала фирмы CRISPR Therapeutics и ERS Genomics. Получив от патентообладателей и патентозаявителей исключительные лицензии, эти приинститутские фирмы стали предоставлять другим компаниям неисключительные права на эксплуатацию CRISPR/Cas9 технологии. С перечнем таких лицензиатов можно ознакомиться в ряде статей [van Erp et al., 2015; Brinegar et al., 2017; Cohen, 2017a; Contreras, Sherkow, 2017], тогда как мы ограничимся здесь упоминанием лишь некоторых. Так, Editas Medicine предоставила лицензии на производство для научно-исследовательских целей различных продуктов, реагентов, сервисных услуг фирмам Clontech, GE Healthcare, Sigma-Aldrich, Horizon, а также ATCC (American Type Culture Collection). Для использования в аграрном производстве такую лицензию получили фирмы DuPont и Monsanto. При этом, например фирме Monsanto запрещено создавать растения, которые могли бы быстро распространиться в природе и нарушить экологическое равновесие, а также запрещено создавать с помощью CRISPR/Cas9 технологии стерильные или как их еще называют «терминаторные» семена и вести исследования, которые могли бы непосредственно приводить к коммерциализации табачных продуктов, вредных здоровью человека [Guerrini et al., 2017]. Что касается DuPont Pioneer, то эта фирма получила лицензии и от Caribou Bioscience и от Вильнюсского университета [Grushkin, 2016]. Реагенту Caribou Bioscience разрешила производить фирме Integrated DNA Technologies. В начале мая 2017 г. ERS Genomics предоставила неисключительную лицензию английской фирме Oxford Genetics в том числе, разрешив продавать исследовательские наборы для CRISPR-редактирования.

Есть и другие «игроки» на поле коммерциализации CRISPR/Cas технологии. Так, в Южной Корее при Сеульском национальном университете создана компания ToolGen, которая предоставила лицензию такому гиганту как Thermo Fisher Scientific для использования CRISPR/Cas9 технологии в исследовательских целях, включая продажу реагентов и клеточных линий. Сама ToolGen

фокусируется на продуктах для аграрного сектора и биомедицины, где как раз ожидаются еще большие доходы от генно-терапевтического направления CRISPR/Cas-редактирования. Поэтому и вложения в эту сферу соответствующие. Например, компания Bayer уже инвестировала в фирму CRISPR Therapeutics 335 млн.долларов [Schinkel, Schillberg, 2016].

При этом держатели CRISPR/Cas технологии не намерены ограничивать ее распространение в научных исследованиях, предоставляя, например, через репозиторий Addgene имеющиеся у них и их последователей многочисленные плазмиды, несущие различные генные конструкции, за умеренную плату (все по 65 долларов США). Так, сообщается, что репозиторий Addgene к середине 2016 г. выполнил более тридцати тысяч запросов таких плазмид [McGuire, 2016].

CRISPR/Cas9 технология шагает в массы

CRISPR/Cas9 технология редактирования геномов приобретает все больший размах и уже применяется на практических занятиях для аспирантов. Так, например, за один семестр группам, в которых было по шесть аспирантов, поручалось провести редактирование генома дрожофилы и каждому аспиранту надо было создать свою плазмиду, несущую ген гидовой РНК, мишенью которой должен служить определенный ген плодовой мушки [Adame et al., 2016]. С такой работой группы аспирантов справились и теперь в университете в Нью-Мексико планируется расширение подобных занятий. В другом американском университете в Нью-Йорке в течение пяти недель проводилась работа по обнаружению в геномах неохарактеризованных штаммов кишечной палочки *E.coli* новых вариантов CRISPR-локусов, в ходе которой была произведена их амплификация, секвенирование по Сэнгеру, биоинформатический анализ [Militello, Lazatin, 2017]. Достигнутые результаты показали, что такие упражнения для аспирантского сообщества следует расширять. И это только опубликованная в специализированных журналах информация, но легко предположить, что география подобных студенческих и аспирантских работ и в настоящее время может быть гораздо шире, и, вне всякого сомнения, что будет расширяться.

Еще дальше пошел биофизик J.Zauner, научные интересы которого ранее лежали в области мутационного анализа белков [Zauner et al., 2014], создав в 2016 г. с помощью краудфандинговой площадки

Indiegogo (<https://www.indiegogo.com/projects/diy-crispr-kits-learn-modern-science-by-doing#/>) специальную фирму Open Discovery Institute (<http://www.the-odin.com>) и начав продавать через интернет-магазин наборы для

редактирования генома кишечной палочки и трансформации дрожжей. Весной 2017 г. его фирма стала одним из победителей SXSW 2017 INTERACTIVE INNOVATION AWARDS FINALISTS конкурса инноваций в разделе «HEALTH, MED & BIOTECH». Продающиеся наборы позиционируются как пригодные для проведения генно-инженерных манипуляций даже начинающими экспериментаторами. Например, набор DIY Bacterial Gene Engineering CRISPR Kit стоит \$150.00 и включает среди прочего плазмиду, несущую гены Cas9 и тракрРНК, а также плазмиду с геном крРНК. С помощью такого набора можно произвести мутацию K43T в геноме кишечной палочки *E.coli* (в гене *rpsL*), что в итоге позволит входящим в набор бактериям расти на среде со стрептомицином, тогда как исходный штамм такой возможностью не обладает.

Здесь несколько слов надо сказать о сообществе дияйвай (DIY) биологов, акроним которого расшифровывается как Do It Yourself. Оно было основано в 2008 г. и имеет свой сайт - <https://diybio.org>. Основу этого движения составляют любители, увлеченные современной биологией, включая генную инженерию и считающие, что они многое могут сделать сами в гараже или на кухне. Развитие сообщества DIY-биологов привело к распространению краудфандингового финансирования различных проектов и некоторые из них оказались даже вполне конкурентоспособными с аналогичными от классической науки.

Помимо упомянутого выше набора, фирма Open Discovery Institute продает и другие генно-инженерные киты, например, для придания дрожжам способности флуоресцировать благодаря внедрению в них плазмиды с генами флуоресцентных белков. В ассортименте есть и минимальный комплект необходимого для генно-инженерных манипуляций оборудования и расходных материалов стоимостью около 1000 долларов, который вполне подойдет для организации небольшой лаборатории и включает даже простенький ДНК-термоциклер⁹. Продаваемая этим интернет-магазином продукция до некоторой степени напоминает развивающие наборы для проведения химических опытов школьниками и таким образом может вызывать и увеличивать интерес к науке у подрастающего поколения, что можно только приветствовать, хотя могут возникать опасения бесконтрольного редактирования, например, микроорганизмов некими любителями, исходя из имеющихся каких-либо недобрых намерений. DIY-биологам журнал Nature недавно посвятил небольшую статью [Kuiken, 2016], где,

⁹ Данная модель ДНК-термоциклера была довольно подробно описана ранее [Магданов и др., 2011] и может быть куплена отдельно.

в том числе, выражается надежда, что вреда от таких экспериментаторов вряд ли следует ждать. Однако потенциальный вред CRISPR/Cas технологией человечеству все же нанесен быть может и об этом речь пойдет в следующем разделе.

CRISPR/Cas редактирование генома человека

Несмотря на то, что основное внимание в данной статье уделено редактированию геномов растений, нельзя обойти вниманием ситуацию с редактированием генома человека ввиду крайне важности этого вопроса. Как известно научный прогресс не остановить, но новые технологии часто кроме положительных аспектов для человечества могут нести и отрицательные моменты. Ярким примером тому служат «мирный» и «немирный» атомы. Последний несет в себе прямую угрозу жизни многих людей, да и всей цивилизации. Пока таких понятий как мирная и немирная генетика не существует и хочется надеяться, что они не появятся, тем не менее, такие технологии как, например, CRISPR/Cas редактирование генома человека может таить в себе скрытую¹⁰ угрозу ввиду пока несовершенства данного процесса и как следствие значительного количества ошибок в виде произведенных мутаций в иных, чем планировалось местах генома, которые могут оказать пагубное влияние на здоровье и даже жизнь такого индивида. При том, что CRISPR/Cas технология является очень мощным и потенциально весьма перспективным инструментом молекулярной медицины для ликвидации нежелательных мутаций в геномах на стадии эмбрионов из семей, отягощенных грузом тяжелых наследственных заболеваний, что могло бы облегчить жизнь многим родившимся нездоровым индивидам в будущем. К тому же такая генная терапия может стать весьма прибыльной, и эта сторона дела также является мощным двигателем к широкому применению таких подходов на практике. Но нельзя забывать и об этической стороне вопроса и о правовых аспектах.

Здесь будет уместно вспомнить знаменитую Асиломарскую конференцию 1975 г., наложившую определенные ограничения на эксперименты по молекулярному клонированию [Berg et al., 1975]. Понимая меру ответственности за будущее человечества, группа американских ученых, среди которых были участники и той Асиломарской

конференции, собрались в январе 2015 г. в Калифорнии, в городе Напа, чтобы обсудить использование CRISPR/Cas технологии редактирования геномов человеческих эмбрионов и последствия такого шага для человечества. Результатом встречи явилось коллективное письмо в журнал Science [Baltimore¹¹ et al., 2015], в котором подписавшие его 18 человек предложили провести широкое обсуждение этого вопроса и фактически выступили с предложением наложить мораторий на редактирование геномов людей до тех пор пока не будет полной уверенности в безопасности данной процедуры. В том же году журнал Nature Biotechnology опубликовал ответы опрошенных лиц, работающих в разных областях, среди которых, помимо ученых, были и социологи и бизнесмены, на заданные им вопросы по CRISPR/Cas редактированию генома человека [Bosley¹² et al., 2015]. При этом в бумажной версии журнала из-за экономии места опубликованы их несколько сокращенные ответы, а в электронной версии журнала они приведены полностью. Практически все ответившие (а ответили 26 человек из 50, которым были разосланы соответствующие вопросы) были единодушны в том, что надо относиться к этой технологии для редактирования человеческих генов, тем более, способных в измененном виде к передаче потомкам, крайне осторожно. Тем не менее, исследования по редактированию геномов такого организма как *Homo sapiens* ведутся и уже есть определенные успехи, достигнутые, например, при корректировке мутантного гена сердечного миозин-связывающего белка у эмбрионов человека, причем благодаря использованному подходу были отчасти решены проблемы нежелательной мозаичности и возникновения нецелевых мутаций [Ma et al., 2017].

В одном из своих выступлений на публике одна из главных разработчиков CRISPR/Cas технологии редактирования геномов Jennifer Doudna¹³ из Калифорнийского университета в Беркли отметила, что по ее прогнозам лет через десять можно ожидать внедрения этой технологии в жизнь и даже создания «дизайнерских» людей, но до этого времени должны быть сняты все вопросы этического плана и должна быть полная уверенность в абсолютной безопасности данной технологии. Ее выступление

¹⁰ О намеренном внесении некими «учеными» в геном человека нежелательных мутаций даже думать не хочется, хотя уже звучат голоса, что с помощью CRISPR/Cas технологии можно готовить новое нейротропное оружие [DiEuliis, Giordano, 2017].

¹¹ Список авторов в данной статье приведен по алфавиту.

¹² Список авторов в данной статье приведен по алфавиту.

¹³ J.Doudna - одна из участниц конференции в Напе и одна из соавторов письма в журнал Science [Baltimore et al., 2015].

можно увидеть и услышать здесь - https://www.ted.com/talks/jennifer_doudna_we_can_now_edit_our_dna_but_let_s_do_it_wisely/transcript; там же имеется текстовый перевод на 29 языков.

Не имея возможности уделять вопросам редактирования генома человека много внимания, отошлем заинтересованного читателя к ряду статей на этот счет [Evitt et al., 2015; Ishii, 2015; Lanphier et al., 2015; Pollack, 2015; Benston, 2017; Guttinger, 2017; Hynes et al., 2017; Mulvihill et al., 2017]. Здесь же еще только отметим намерения с помощью CRISPR/Cas9 технологии редактировать не только ядерные гены, но и митохондриальные геномы человека с целью исправления нежелательных мутаций для чего ведутся исследования по доставке в эти органеллы всех компонентов данной системы редактирования геномов, в том числе и в России [Jo et al., 2015; Орищенко и др., 2016]. При этом также, безусловно, возникают этические проблемы [Gómez-Tatay et al., 2017].

Перспективы CRISPR/Cas редактирования геномов растений

Выше уже говорилось, что нокаутное CRISPR/Cas редактирование геномов растений при условии, что никакая вспомогательная чужеродная ДНК встраиваться не должна, может приводить к созданию новых сортов, которые в качестве ГМО считаться не могут и не должны, поскольку будут представлять собой имитацию природных процессов с единичными мутациями. Нельзя их и сравнивать с сортами, созданными с помощью индуцированного мутагенеза путем химической или радиационной обработки семян, изменения в геномах после которых намного масштабнее, но за ГМ-растения таковые упорно не принимают. При этом можно надеяться, что отношение к таким нокаутным сортам (без чужеродной ДНК) будет аналогичным, в том смысле, что ГМО они считаться не будут и это открывает неплохие перспективы для генных инженеров по созданию сельскохозяйственных культур с ценными признаками, которые обычным селекционным путем, включая химический и радиационный мутагенез, получить невозможно.

Гены, которые неплохо бы нарушить, можно разделить на несколько групп по проявлению последствий таких действий в растительных организмах. Значительную часть таких генов составляют ответственные за возникновение того или иного заболевания, вызываемого фитопатогеном, поскольку если какого-либо соответствующего белкового продукта нарабатываться не будет – не будет и аттракции болезнетворного агента. И такие примеры по созданию устойчивых к мучнистой росе пшеницы и томатов путем редактирования их геномов уже имеются. Другая группа генов, которая после нарушения их работы может привести к улучшению

хозяйственно-полезных признаков, кодирует ферменты, участвующие в биосинтезе различных запасных веществ, потребительские свойства которых (с точки зрения человека) могут от этого улучшиться. Ярким примером является уже упоминавшийся сорт кукурузы с отредактированным геном *waxy*, приводящим к синтезу крахмала с иным соотношением амилозы и амилопектина, а также нокаутный картофель [Andersson et al., 2017]. Заинтересовавшихся этим вопросом читателей можем отослать к недавней обзорной статье новосибирских авторов [Хлесткин и др., 2017]. Важная группа генов, работу которых желательнее нарушить, кодирует белки, обладающие аллергенными свойствами и таких у разных растений немало. Фактически геномы всех трансгенных растений, у которых что-то было нарушено с помощью антисенс-технологии или РНК-интерференции и давало тем самым хозяйственный эффект сейчас могут заново быть отредактированы с помощью CRISPR/Cas технологии в ее нокаутном варианте, причем при обеспечении отсутствия чужеродной ДНК в конечном организме это будут уже не ГМ-сорта.

Однако, перечень генов, работу которых следует нарушить, для того, чтобы придать такому сорту определенные преимущества, все же довольно ограничен и вряд ли будет сильно увеличиваться, хотя это несомненно произойдет с ростом наших знаний о полных геномах и транскриптомах разных видов растений, включая окультуренные формы и их диких прародителей. В этой связи более предпочтительным для аграрного производства можно считать нокин CRISPR/Cas технологию, где внедряться может неограниченно большой спектр генов. Но такие растения согласно нынешнему определению ГМО считаться несомненно будут. При том, что они все же будут иметь определенные выгодные отличия от нынешних трансгенных растений, поскольку место внедрения чужеродной ДНК для них будет выбираться заранее с учетом многих факторов и этот процесс будет носить обдуманый, а не случайный характер.

Несмотря на сообщаемую во многих статьях довольно высокую эффективность CRISPR/Cas редактирования, следует учитывать, что в большинстве случаев такая сейчас достигается благодаря встраиванию тем или иным способом в геномы опытных растений специально подготовленных CRISPR/Cas конструкций, обеспечивающих постоянную или, по крайней мере, продолжительную наработку в ядре клетки соответствующих гидРНК и Cas нуклеаз. Доставка рибонуклеопротеидного комплекса из гидРНК и Cas нуклеазы без какой-либо ДНК, способного существовать в ядре только ограниченное время,

может не дать столь высокой частоты мутаций при нокаутных экспериментах и тем более при встраивании чужеродных генов в нокин вариантах редактирования. При этом однако снизится частота и нецелевых мутаций, что также крайне важно. Поэтому в настоящее время главнейшими задачами при CRISPR/Cas редактировании геномов растений без участия ДНК станет повышение эффективности процессов репарации после образующихся под действием Cas нуклеазы двуцепочечных разрывов ДНК в виде негомологичного объединения концов или встраивания чужеродных фрагментов разной длины, имеющих гомологичные участки по краям. Здесь определенную и даже большую помощь может оказать наиболее правильный подбор мест редактирования с помощью соответствующего компьютерного обеспечения, рассмотренного нами в другой статье [Чемерис и др., 2017]. Причем надо отметить, что для повышения эффективности отбора отредактированных форм в таких программах требуются некие дополнительные опции, которых пока в подавляющем большинстве программ нет.

В предыдущей статье мы уже упоминали, что до сих пор отсутствуют публикации по редактированию геномов растений с помощью CRISPR/Cas технологии с целью придать им апомиктичность (бесполое размножение). Нет также упоминаний апомиксиса на активно функционирующем форуме, посвященном различным вопросам CRISPR/Cas технологий - <https://groups.google.com/forum/#!forum/crispr>. Здесь можно также заметить, что в связи с проблемой апомиксиса редактирования геномов растений не производилось и ранее ни с помощью ZFN, ни с использованием TALEN подходов. При этом создание апомиктичных сортов многие связывают с новой «зеленой революцией» в сельскохозяйственном производстве, которая обязательно произойдет стать апомиксис управляемым. Тем не менее, несмотря на всю сложность феномена апомиксиса у растений такие работы проводить необходимо и нет сомнений, что информация о CRISPR/Cas редактировании геномов некоторых модельных растений в связи с апомиксисом вскоре появится.

В целом ряде статей обсуждаются вопросы улучшения сельскохозяйственных культур с помощью CRISPR/Cas технологий, которая несомненно ускорит селекционные процессы [Салина, 2016; Хлесткина, Шумный, 2016; Schaeffer, Nakata, 2015; Cao et al., 2016; Khatodia et al., 2016; Song et al., 2016; Zaidi et al., 2016; Герасимова и др., 2017; Nejat et al., 2017; Zhang et al., 2017]. Считается, что полногеномное секвенирование, в том числе образцов древней ДНК растений, поможет лучше понять произошедшие при доместикации изменения отдельных генов. В этой

связи весьма заманчивыми выглядят предложения провести доместикацию *de novo*, то есть фактически заново с помощью CRISPR/Cas технологии, что теоретически может позволить ускорить этот процесс и осуществить доместикацию существующих диких предков нынешних культурных растений за всего несколько лет вместо тысячелетий [Хлесткина, 2016; Liu et al., 2016; Zsögön et al., 2017]. При этом можно надеяться, что у новых культурных форм сохранится устойчивость диких видов к неблагоприятным факторам и от них в силу их большего генетического разнообразия передадутся другие ценные свойства, что крайне важно для сельскохозяйственного производства. Здесь можно заметить, что на самом деле не так много генов подверглось изменениям в ходе окультуривания разных видов растений и часто это некие регуляторные участки, которые отвечают за уровень экспрессии конкретных генов при том, что их кодирующие последовательности могут оставаться прежними, хотя и в них происходили замены [Doebley et al., 2006; Swinnen et al., 2016; Østerberg et al., 2017; Sahu, Chattopadhyay, 2017]. Верится, что секвенирование геномов новых поколений в купе со сравнением геномных последовательностей предковых и современных форм при помощи CRISPR/Cas технологии позволит создавать *de novo* по сути новые культурные растения.

Заключение

CRISPR/Cas редактирование геномов организмов различных уровней генетической сложности - это действительно прорывная технология и настоящая революция в геномной инженерии со всеми вытекающими из этого последствиями и перспективами для науки и для жизни общества, включая бизнес, в виде создания улучшенных сортов/пород растений/животных и лечения различных генетических заболеваний человека.

CRISPR/Cas технология фактически способна, если не стать альтернативой, то дополнить стандартную геномную инженерию, с помощью которой уже много лет создаются трансгенные растения и животные, называемые ГМО, при том, что некоторые организмы с отредактированными геномами формально ГМО могут и не считаться, поскольку не несут (в ряде случаев) чужеродную ДНК, а в тех случаях когда будут ее нести в виде новых полезных генов, то по крайней мере их внедрение будет проводиться в заранее выбранные оптимальные места геномов.

Благодарности

Авторы считают своим долгом выразить признательность неизвестному рецензенту за дельные советы и критические замечания, которые помогли сделать статью лучше.

Литература

1. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С. 245-270.
2. Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях // Физиология растений. 2017. Т.64. С.92-108.
3. Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. С. 250–258.
4. Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Никонов Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Применение CRISPR-локусов не для редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.271-283.
5. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ал.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никонов Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017а. Т.9. С.155-182.
6. Магданов Э.Г., Чемерис Д.А., Чемерис А.В. Современное приборное оснащение количественной и цифровой ПЦР // Биомика. 2011. Т.1. С.15-60.
7. Орищенко К.Е., Софронова Ю.К., Чупахин Е.Г., Лунев Е.А., Мазунин И.О. Импорт нуклеазы Cas9 в митохондрии // Гены и клетки. Т. 11. 2016. С. 100–105.
8. Салина Е.А. Технологии геномного моделирования и редактирования для решения задач селекции растений // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т.30. С.9-14.
9. Хлесткин В.К., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Гены-мишени для получения сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с заданными свойствами крахмала // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. С. 25-36.
10. Хлесткина Е.К. Доместикация за пару лет // Наука из первых рук. 2016. №5/6. С.72-75.
11. Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: Система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений // Генетика. 2016. Т.52. С.774-787.
12. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С. 203-228.
13. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг // Биомика. 2014. Т.6. С.77-138.
14. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Борьба с ГМО как неолысенковщина // Биомика. 2015. Т.7. С. 1-39.
15. Adame V., Chapapas H., Cisneros M., Deaton C., Deichmann S., Gadek C., Lovato T.L., Chechenova M.B., Guerin P., Cripps R.M. An undergraduate laboratory class using CRISPR/Cas9 technology to mutate *Drosophila* genes // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2016. V. 44. P. 263–275.
16. Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Falt A-S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts // Plant Cell Rep. 2017. V.36. P.117-128.
17. Baldwin E.A., Scott J.W., Shewmaker C.K., Schuch W. Flavor trivia and tomato aroma: Biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components // Hortscience. 2000. V.35. P.1013-1022.
18. Baltimore D., Berg P., Botchan M., Carroll D., Charo R.A., Church G., Corn J.E., Daley G.Q., Doudna J.A., Fenner M., Greely H.T., Jinek M., Martin G.S., Penhoet E., Puck J., Sternberg S.H., Weissman J.S., Yamamoto K.R. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification // Science. 2015. V.348. P.36-38.
19. Berg P., Baltimore D., Brenner S., Roblin R.O., Singer M.F. Summary statement of the Asilomar conference on recombinant DNA molecules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V.72. P.1981-1984.
20. Bosley K.S., Botchan M., Bredenoord A.L., Carroll D., Charo R.A., Charpentier E., Cohen R., Corn J., Doudna J., Feng G., Greely H.T., Isasi R., Ji W., Kim J.S., Knoppers B., Lanphier E., Li J., Lovell-Badge R., Martin G.S., Moreno J., Naldini L., Pera M., Perry A.C., Venter J.C., Zhang F., Zhou Q. CRISPR germline engineering - the community speaks // Nat. Biotechnol. 2015. V.33. P.478-486.
21. Cao H.X., Wang W., Le H.T., Vu G.T. The power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to speed up plant breeding // Int. J. Genomics. 2016;2016:5078796.
22. Cardi T., D'Agostino N., Tripodi P. Genetic transformation and genomic resources for next-

- generation precise genome engineering in vegetable crops // *Front Plant Sci.* 2017. V.22;8:241
23. Cohen J. The birth of CRISPR Inc. // *Science.* 2017. V.355. P.680-684.
 24. Contreras J.L., Sherkow J.S. CRISPR, surrogate licensing, and scientific discovery // *Science.* 2017. V.355. P.698-700.
 25. Davis D.R., Epp M.D., Riordan H.D. Changes in USDA food composition data for 43 garden crops, 1950 to 1999 // *J. Amer. Coll. Nutrition.* 2004. V.23. P.669-682.
 26. DiEuliis D., Giordano J. Why gene editors like CRISPR/Cas may be a game-changer for neuroweapons // *Health Secur.* 2017. V.15. P.296-302.
 27. Doebley J.F., Gaut B.S., Smith B.D. The molecular genetics of crop domestication // *Cell.* 2006. V.127. P.1309-1321.
 28. Evitt N.H., Mascharak S., Altman R.B. Human germline CRISPR-Cas modification: Toward a regulatory framework // *Am. J. Bioeth.* 2015. V.15. P.25-29.
 29. Farneti B., Alarcón A.A., Papatotiriou F.G., Samudrala D., Cristescu S.M., Costa G., Harren F.J., Woltering E.J. Chilling-induced changes in aroma volatile profiles in tomato // *Food Bioproc. Tech.* 2015. V.8. P.1442-1454.
 30. Fister K., Fister I. Jr., Murovec J., Bohanec B. DNA labelling of varieties covered by patent protection: a new solution for managing intellectual property rights in the seed industry // *Transgenic Res.* 2017. V.26. P.87-95.
 31. Gómez-Tatay L., Hernández-Andreu J.M., Aznar J. Mitochondrial modification techniques and ethical issues // *J Clin Med.* 2017. V. 6. pii: E25.
 32. Graff G.D., Phillips D., Lei Z., Oh S., Nottenburg C., Pardey P.G. Not quite a myriad of gene patents // *Nat. Biotechnol.* 2013. V.31. P.404-410.
 33. Gray B.N., Spruill W.M. CRISPR-Cas9 claim sets and the potential to stifle innovation // *Nat. Biotechnol.* 2017. V.35. P.630-633.
 34. Grushkin D. DuPont in CRISPR-Cas patent land grab // *Nat. Biotechnol.* 2016. V.34. P.13.
 35. Guttinger S. Trust in science: CRISPR-Cas9 and the ban on human germline editing // *Sci. Eng. Ethics.* 2017. doi: 10.1007/s11948-017-9931-1. [Epub ahead of print]
 36. Hightower R., Baden C., Penzes E., Lund P., Dunsmuir P. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants // *Plant Mol. Biol.* 1991. V.17. P.1013-1021.
 37. Hynes R.O., Collier B.S., Porteus M. Toward responsible human genome editing // *JAMA.* 2017. V.317. P.1829-1830.
 38. Jo A., Ham S., Lee G.H., Lee Y., Kim S., Lee Y.S., Shin J.H., Lee Y. Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9 // *Biomed Res Int.* 2015: 305716.
 39. Ishii T. Germline genome-editing research and its socioethical implications // *Trends Mol. Med.* 2015. V.21. P.473-481.
 40. Ishii T., Araki M. Consumer acceptance of food crops developed by genome editing // *Plant Cell Rep.* 2016. V.35. P.1507-1518.
 41. Ishii T., Araki M. A future scenario of the global regulatory landscape regarding genome-editing crops // *GM Crops Food.* 2017. V.8. P.44-56.
 42. Khatodia S., Bhatotia K., Passricha N., Khurana S.M., Tuteja N. The CRISPR/Cas genome-editing tool: Application in improvement of crops // *Front Plant Sci.* 2016. V.7:506.
 43. Kim J., Kim J-S. Bypassing GMO regulations with CRISPR gene editing // *Nat. Biotechnol.* 2016. V.34. P.1014-1015.
 44. Klee H.J., Tieman D.M. Genetic challenges of flavor improvement in tomato // *Trends Genet.* 2013. V.29. P.257-262.
 45. Lanphier E., Urnov F., Haecker S.E., Werner M., Smolenski J. Don't edit the human germ line // *Nature.* 2015. V.519. P.410-411.
 46. Ledford H. Bitter fight over CRISPR patent heats up // *Nature.* 2016. V.529. P.265.
 47. Lei Z., Juneja R., Wright B.D. Patents versus patenting: implications of intellectual property protection for biological research // *Nat. Biotechnol.* 2009. V.27. P.36-40.
 48. Liu D., Hu R., Palla K.J., Tuskan G.A., Yang X. Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016. V.30. P.70-77.
 49. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., Koski A., Ji D., Hayama T., Ahmed R., Darby H., Van Dyken C., Li Y., Kang E., Park A.R., Kim D., Kim S.T., Gong J., Gu Y., Xu X., Battaglia D., Krieg S.A., Lee D.M., Wu D.H., Wolf D.P., Heitner S.B., Belmonte J.C.I., Amato P., Kim J.S., Kaul S., Mitalipov S. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos // *Nature.* 2017. doi: 10.1038/nature23305.
 50. Mathieu S., Cin V.D., Fei Z., Li H., Bliss P., Taylor M.G., Klee H.J., Tieman D.M. Flavour compounds in tomato fruits: identification of loci and potential pathways affecting volatile composition // *J. Exp. Bot.* 2009. V.60. P.325-337.
 51. McGuire L. Genome editing: Broad Institute keeps CRISPR tools open // *Nature.* 2016. V.534. P.37.
 52. Militello K.T., Lazatin J.C. Discovery of *Escherichia coli* CRISPR sequences in an

- undergraduate laboratory // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2017. V. 45. P. 262–269.
53. Mohd-Yusoff N.F., Ruperao P., Tomoyoshi N.E., Edwards D., Gresshoff P.M., Biswas B., Batley J. Scanning the effects of ethyl methanesulfonate on the whole genome of *Lotus japonicus* using second-generation sequencing analysis // *G3 (Bethesda)*. 2015. V.5. P.559-567.
 54. Mulvihill J.J., Capps B., Joly Y., Lysaght T., Zwart H.A.E., Chadwick R.; International Human Genome Organisation (HUGO) Committee of Ethics, Law, and Society (CELS) Ethical issues of CRISPR technology and gene editing through the lens of solidarity // *Br. Med. Bull.* 2017. V.122. P.17-29.
 55. Nejat N., Rookes J., Mantri N.L., Cahill D.M. Plant-pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. V.37. P.229-237.
 56. Nguyen C.V., Vrebalov J.T., Gapper N.E., Zheng Y., Zhong S., Fei Z., Giovannoni J.J. Tomato GOLDEN2-LIKE transcription factors reveal molecular gradients that function during fruit development and ripening // *Plant Cell*. 2014. V.26. P.585-601.
 57. Østerberg JT, Xiang W, Olsen LI, Edenbrandt AK, Vedel SE, Christiansen A, Landes X, Andersen MM, Pagh P, Sandøe P, Nielsen J, Christensen SB, Thorsen BJ, Kappel K, Gamborg C, Palmgren M.
 58. Accelerating the Domestication of New Crops: Feasibility and Approaches.
 59. *Trends Plant Sci.* 2017 May;22(5):373-384.
 60. Pollack R. Eugenics lurk in the shadow of CRISPR // *Science*. 2015. V.348. P.871.
 61. Powell A.L., Nguyen C.V., Hill T., Cheng K.L., Figueroa-Balderas R., Aktas H., Ashrafi H., Pons C., Fernández-Muñoz R., Vicente A., Lopez-Baltazar J., Barry C.S., Liu Y., Chetelat R., Granell A., Van Deynze A., Giovannoni J.J., Bennett A.B. Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development // *Science*. 2012. V.336. P.1711-1715.
 62. Rambla J.L., Tikunov Y.M., Monforte A.J., Bovy A.G., Granell A. The expanded tomato fruit volatile landscape // *J. Exp. Bot.* 2014. V.65. P.4613-4623.
 63. Sahu K.K., Chattopadhyay D. Genome-wide sequence variations between wild and cultivated tomato species revisited by whole genome sequence mapping // *BMC Genomics*. 2017. V.18(1):430.
 64. Schaeffer S.M., Nakata P.A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field // *Plant Sci*. 2015. V.240. P.130-142.
 65. Sherkow J.S. Law, history and lessons in the CRISPR patent conflict // *Nat. Biotechnol.* 2015. V.33. P.256-257.
 66. Sherkow J.S. CRISPR: Pursuit of profit poisons collaboration // *Nature*. 2016. V.532. P.172-173.
 67. Sherkow J.S. Inventive steps: the CRISPR patent dispute and scientific progress: The recent patent decisions about CRISPR tell us a lot about how advances in biology are actually made—and how they are not // *EMBO Rep.* 2017. V.18. P.1047-1051.
 68. Shirasawa K., Hirakawa H., Nunome T., Tabata S., Isobe S. Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato // *Plant Biotechnol J.* 2016. V.14. P.51-60.
 69. Sidhu G., Mohan A., Zheng P., Dhaliwal A.K., Main D., Gill K.S. Sequencing-based high throughput mutation detection in bread wheat // *BMC Genomics*. 2015. 16:962.
 70. Smyth S.J. Canadian regulatory perspectives on genome engineered crops // *GM Crops Food*. 2017. V.8/ P.35-43.
 71. 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 Journal*. 2016. V.4. P.75-82.
 72. Sprink T., Eriksson D., Schiemann J., Hartung F. Regulatory hurdles for genome editing: process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts // *Plant Cell Rep.* 2016. V.35. P.1493-1506.
 73. Swinnen G., Goossens A., Pauwels L. Lessons from domestication: Targeting cis-regulatory elements for crop improvement // *Trends Plant Sci.* 2016. V.21. P.506-515.
 74. Tieman D., Bliss P., McIntyre L.M., Blandon-Ubeda A., Bies D., Odabasi A.Z., Rodríguez G.R., van der Knaap E., Taylor M.G., Goulet C., Mageroy M.H., Snyder D.J., Colquhoun T., Moskowitz H., Clark D.G., Sims C., Bartoshuk L., Klee H.J. The chemical interactions underlying tomato flavor preferences // *Curr. Biol.* 2012. V.22. P.1035-1039.
 75. Tieman D., Zhu G., Resende M.F. Jr., Lin T., Nguyen C., Bies D., Rambla J.L., Beltran K.S., Taylor M., Zhang B., Ikeda H., Liu Z., Fisher J., Zemach I., Monforte A., Zamir D., Granell A., Kirst M., Huang S., Klee H. A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor // *Science*. 2017. V.355. P.391-394.
 76. Tieman D.M., Zeigler M., Schmelz E.A., Taylor M.G., Bliss P., Kirst M., Klee H.J. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits // *J. Exp. Bot.* 2006. V.57. P.887-896.
 77. Tomato Genome Consortium / The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // *Nature*. 2012. V.485. P.635-641.
 78. van Erp P.B.G., Bloomer G., Wilkinson R., Wiedenbelt B. The history and market impact of

- CRISPR RNA-guided nucleases // *Curr. Opin. Virol.* 2015. V.12. P.85-90.
79. Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation // *Nature*. 2016. V.532. P.293.
80. Waltz E. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation // *Nat. Biotechnol.* 2016a. V.34. P.582.
81. 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 // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. P. 947–951.
82. van de Wiel C.C.M., Schaart J.G., Lotz L.A.P., Smulders M.J.M. New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions // *Plant Biotechnol Rep.* 2017. V. 11. P. 1–8.
83. Zaidi S.S., Tashkandi M., Mansoor S., Mahfouz M.M. Engineering plant immunity: using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: 1673
84. Zhang K., Raboanatahiry N., Zhu B., Li M. Progress in genome editing technology and its application in plants // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8: 177.
85. Zayner J.P., Antoniou C., French A.R., Hause R.J. Jr., Sosnick T.R. Investigating models of protein function and allostery with a widespread mutational analysis of a light-activated protein // *Biophys. J.* 2013. V.105. P.1027-1036.
86. Zilberman D., Kaplan S., Kim E., Hochman G., Graff G. Continents divided: Understanding differences between Europe and North America in acceptance of GM crops // *GM Crops Food.* 2013. V.4. P.202-208.
87. Zsögön A., Cermak T., Voytas D., Peres L.E. Genome editing as a tool to achieve the crop ideotype and de novo domestication of wild relatives: Case study in tomato // *Plant Sci.* 2017. V. 256. P. 120–130.

CRISPR/Cas GENOME EDITING (PLANTS) AND SOCIETY

Baymiev An.Kh., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A.,
Rozhnova N.A., Gerashchenkov G.A., Mikhailova E.V., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia, chemeris@anrb.ru

Resume

Considerable attention is dedicated to differences between plants created through induced mutagenesis and modern plant varieties generated by genetic engineering (transgenic plants or GM plants), as well as knockout and knock-in forms of the CRISPR/Cas edited plants in connection with the problem of GMOs. The prospects of the introduction of different forms of CRISPR/Cas edited plants in agriculture, including the domestication of wild forms de novo are considered. Problems of the human genome editing and the attitude of society to this process, as well as carrying out experiments on genomic editing by biologists community DIY are concerned. Difficult situation with the patenting of CRISPR/Cas technology and its commercialization are described.

Keywords: CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, GMO, GM-plants, transgenic plants, tomato, Knock-out, Knock-in, patenting