



CRISPR/Cas СИСТЕМЫ (специальный тематический выпуск журнала)

Чемерис А.В.

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

Через пару лет наступит круглая дата – полтора столетия с момента открытия молекул ДНК, совершенного в 1869 г. молодым¹ швейцарским ученым Ф.Мишером во время его стажировки в Германии и назвавшим тогда выделенную им из ядер лейкоцитов гноя субстанцию «нуклеином» [Miescher, 1871]. По удивительному совпадению дат в тот же год 4 ноября 1869 г. как раз когда Ф.Мишер завершал написание рукописи своей статьи², вышел первый номер журнала Nature, в котором через восемь с лишним десятилетий были опубликованы материалы, посвященные открытию двойной спирали ДНК [Watson, Crick, 1953; 1953a], названному позже «открытием века» (имеется ввиду XX-го). По крайней мере, в области биологических наук. Наверное, и открытие Ф.Мишера можно назвать таковым для века XIX-го. Как минимум. Но по достоинству оцененным так оно в то время быть не могло в силу ограниченности тогдашних знаний. Однако прежде чем перейти к веку XXI-му следует еще отдать должное Ф.Мишеру, сумевшему заглянуть далеко вперед, фактически на столетие, и уже тогда в той самой эпохальной статье предположившему³, что «на основании опытов с другими тканями, о которых я вскоре сообщу, мне теперь представляется вероятным, что мы открыли целое семейство несколько отличающихся друг от

друга фосфорсодержащих веществ, которые, пожалуй, как группа нуклеиновых веществ заслуживает быть поставленной наряду с белками»⁴. Затем Мишер задается вопросом (!) - не связано ли это вещество с делением клеток? И чуть ниже замечает - «Выявление связей между ядерными веществами, белками и ближайшими продуктами их превращений позволит постепенно поднять покров, которым полностью скрыты от нас интимные процессы клеточного роста»⁵.

Однако это фундаментальное открытие Ф.Мишера, внесшее важнейший вклад в биологическую науку, практического воплощения «дождалось» более века, когда 2 декабря 1980 г. в США был выдан первый патент, в котором охране подлежал способ получения рекомбинантных молекул ДНК, заявка на который была подана еще 4 ноября 1974 г. [Cohen, Boyer, 1980]. За время действия этого патента и двух других, выданных на его основе несколько позже, Стэнфордский и Калифорнийский университеты от продажи лицензий выручили 255 млн. долларов [Bera, 2009]. После тех первых патентов «по ДНК» было получено множество других, где одной из главных

¹ Когда Ф.Мишер сделал это открытие ему было всего 25 лет.

² Описание обстоятельств, явившихся причиной того, что эта статья Ф.Мишера была опубликована больше чем через год после ее написания, выходит за рамки данной заметки, но желающие узнать почему так произошло могут сделать это самостоятельно, прочитав, например, работы R.Dahm [2005; 2008].

³ Фрагменты текста оригинальной статьи Ф.Мишера здесь и далее даны в переводе Е.А.Яновской [Фридрих Мишер. Труды по биохимии. (Серия «Классики науки»), 1985].

⁴ А белки в то время ассоциировались с самой жизнью и в качестве доказательства этого можно привести данное известным немецким философом Ф.Энгельсом в 1878 г. в работе «Анти-Дюринг» следующее определение: «Жизнь есть способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка».

⁵ За этими словами Ф.Мишера «скрываются» и репликация и транскрипция и трансляция, а также прочие процессы белково-нуклеиновых взаимодействий, важную роль в которых своего нуклеина он предполагал.

действующих молекул также являлась ДНК, обеспечившая владельцам таковых немалую прибыль. Только коммерциализация основных патентов «по ПЦР» принесла, например, несколько миллиардов долларов. В настоящее время множеством патентов охраняются различные сферы использования ДНК, в том числе и CRISPR/Cas технология геномного редактирования, хотя необходимо отметить, что вокруг патентов на нее идут серьезные баталии, поскольку ожидается солидный коммерческий эффект от ее внедрения, что также может дать многомиллиардные барыши, и за них сейчас идет нешуточная борьба.

С учетом все ускоряющегося темпа жизни вряд ли стоит ожидать, что за сделанным сейчас каким-либо открытием, если оно хотя бы близко будет сопоставимо по грандиозности упоминаемым выше, последует столь же долгий период ожидания его воплощения в практику. Так, за недавним открытием⁶ уникальной CRISPR/Cas системы защиты у микроорганизмов (которое уже успели окрестить открытием века нынешнего) весьма быстро последовало ее использование для редактирования геномов про- и эукариот [Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013], при том, что потребовалось около 25 лет на то, чтобы сначала понять и затем продемонстрировать функции этих необычных локусов бактерий и архей после того как их впервые обнаружили [Ishino et al., 1987].

Вообще, открытия по характеру их свершения бывают нескольких типов. Так, вышеупомянутые открытия трех столетий, касающиеся ДНК, все сделаны по-разному. Если, для открытия CRISPR/Cas9 системы потребовались продолжительные исследования большого числа ученых, работающих в разных, хотя и смежных областях, то открытие двойной спирали ДНК явилось, как считается, плодом чудесного прозрения двух выдающихся ученых, которым, опираясь на имеющиеся ограниченные экспериментальные данные, всего-то потребовалось догадаться, что ДНК представляет собой двуцепочечную молекулу, а не трехцепочечную (как тогда думали некоторые), и что цепи в ней антипараллельны⁷. И это как раз тот

⁶ Здесь в отличие от открытия самой ДНК и открытия двойной спирали ДНК невозможно привести одну-две ключевые ссылки, поскольку открытие CRISPR/Cas систем стало возможным благодаря многолетним трудам большой армии ученых из разных стран.

⁷ Как было сделано открытие вторичной структуры ДНК очень подробно с житейскими подробностями описал Дж. Уотсон в своей знаменитой книге «Двойная спираль» [Watson, 1968], вышедшей, в том числе, и в нашей стране в 1969 г. и переизданной в 2001 г. [Уотсон, 1969; 2001].

случай, про который говорят - «все гениальное – просто». Что касается сделанного Ф. Мишером открытия ДНК как вещества, то здесь, помимо кропотливого труда, ему еще сопутствовала удача в виде правильного выбора объекта для выделения из него конкретной ядерной субстанции, что позволило сразу отсеять значительное количество попутно экстрагируемых веществ, которые могли бы сильно затруднить анализ полученного препарата.

Конечно, по своей значимости открытие CRISPR/Cas системы, несомненно, уступает и открытию непосредственно самой ДНК, и открытию организации этой молекулы в виде двойной спирали, поскольку CRISPR/Cas система это уже как бы частности, но по своим последствиям для человечества разработанные технологии на ее основе могут оказаться даже более значимыми, поскольку это уже именно современные технологии, а не просто фундаментальные знания об основах Жизни. Так ли это будет или нет – сама жизнь и покажет, а пока в мире имеет место настоящий бум вокруг CRISPR/Cas систем и CRISPR/Cas технологий геномного редактирования на основе этой уникальной системы иммунной защиты бактерий и архей.

Вполне оправданным представляется выбор CRISPR/Cas9 технологии как одного из десяти прорывов 2013 г. по версии журнала Science, где ей в тот год было отдано второе место⁸ [Coontz, 2013]. Справедливости ради следует сказать, что чуть ранее в 2011 г. журналом Nature Methods методом года была названа другая технология геномного редактирования - TALEN. Однако в 2015 г. CRISPR/Cas9 технология все же стала «Прорывом года» [Travis, 2015].

Вне всякого сомнения, что в ближайшие годы разработчики CRISPR/Cas9 технологии редактирования геномов будут отмечены Нобелевской премией. Однако ввиду того, что конкретная Нобелевская премия по действующему положению может делиться не более чем между тремя учеными, видимо именно выбор этих троих может послужить главным препятствием, чтобы отметить такой наградой эту революционную технологию – претендентов, имеющих приблизительно равные права, побольше будет. Возможным выходом из этой ситуации может стать одновременное присуждение в один год Нобелевских премий за CRISPR/Cas системы в области химии (например, за разработку CRISPR/Cas9 технологии геномного редактирования), а также по физиологии и медицине (за исследование обеспечивающих «иммунитет» для микроорганизмов CRISPR/Cas систем⁹), сразу пяти -

⁸ Первое место среди «прорывов» 2013 года «досталось» иммунотерапии рака.

⁹ Без чего CRISPR/Cas9 технология и не появилась бы.

шести ученым. Хотя таких прецедентов в истории Нобелевских премий, наверное, еще и не было, но это было бы наиболее справедливым решением, учитывая как революционность данной технологии, так и большое число ученых, внесших значительный вклад в эти исследования на разных этапах.

А пока пятеро ученых, наиболее отличившихся при изучении CRISPR/Cas9 систем и создавших на ее основе передовую технологию редактирования генов и геномов про- и эукариотических организмов – Эммануэль Шарпентье (E.Chargentier) из Института инфекционной биологии Макса Планка (Германия), Дженнифер Дудна (J.Doudna) из Калифорнийского университета в Беркли (США), Лучиано Марраффини (L.Marraffini) из Рокфеллеровского университета (США), Франциско Моджика (F.J.M.Mojica) из Университета Аликанте (Испания) и Фэн Чжан (F.Zhang) из Гарвардского университета и Массачусетского технологического института (США) стали обладателями премии Медицинского центра в Олбани (США) в области медицины и биомедицинских исследований (<http://www.amc.edu/Academic/AlbanyPrize/>), которая им вручена в ходе торжественной церемонии 27 сентября 2017 г. Эта престижная премия вручается ежегодно с 2001 г., а ее денежное содержание составляет довольно круглую сумму - 500 тысяч американских долларов.

В последние годы целый ряд журналов издали отдельные тематические номера, в которых одна, несколько или даже значительное число статей в таких выпусках посвящены CRISPR/Cas системам и технологиям. Среди подобных выпусков – вышедший в мае 2017 г. двоянный том журнала *Methods* издательства Elsevier (Vol. 121-122), в котором сразу 14 обзорных и экспериментальных статей посвящены разным вопросам CRISPR/Cas систем, а предваряет их статья специально приглашенных для этого выпуска редакторов J.P.Concordet и C.Giovannangeli [2017]. В сентябрьском номере журнала *FEBS Journal* за 2016 год, специально посвященном CRISPR/Cas системам, опубликованы 9 обзорных и экспериментальных статей, включающие историю их обнаружения и прочие аспекты. На обложку данного номера помещен датированный 1992 годом фрагмент радиоавтографа секвенирующего геля, на котором изображены полосы ДНК, соответствующие определенным нуклеотидам CRISPR-повторов одной археи. Все эти статьи предваряет введение, написанное известным специалистом в области биоинформатики J.G.Doench [2016], внесшим заметный вклад в совершенствование CRISPR/Cas технологии редактирования геномов. Ранее ноябрьский номер 2015 г. журнала *ACS Synthetic*

Biology также был посвящен вопросам геномной инженерии, где CRISPR/Cas редактированию уделено определенное внимание. Номер был предварен вводной статьей N.Boyle [2015]. Есть и другие примеры тематических номеров журналов, посвященных CRISPR/Cas системам, например апрельский номер за 2017 г. журнала *Biochemistry and Cell Biology* или выпуск журнала *Evolutionary Applications* (2015, V.8, No 6).

В России в 2016 г. один из выпусков журнала «Биохимия» (Том 81, № 7) также вышел со специальной подборкой обзорных и экспериментальных статей по редактированию геномов и геномной терапии, занявших значительную часть этого номера, с предваряющей редакционной статьей А.А.Замятнина (мл.) [2016]. Однако в целом недостаток русскоязычных публикаций по CRISPR/Cas технологиям, в том числе в виде обзорных статей, все же ощущается, в связи с чем было решено один из номеров 2017 г. (Т.9, №3) издаваемого Институтом биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук (ИБГ УНЦ РАН) рецензируемого электронного журнала «Биомика» посвятить различным вопросам CRISPR/Cas систем.

Соавторы опубликованных в этом номере «Биомики» статей (из тех, что работают в ИБГ УНЦ РАН) все являются сотрудниками одной лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии. Приступая к использованию CRISPR/Cas технологий, мы решили более детально (насколько это нам необходимо для достижения поставленных перед собой целей) ознакомиться с CRISPR/Cas системами, результатом чего стало появление этих обзорных статей, которые в первую очередь помогли нам самим лучше разобраться в современных тенденциях развития CRISPR/Cas технологий и определить для себя конкретные цели и сформулировать соответствующие задачи, которые можно решать с их использованием. При этом, надеемся, что эти наши статьи, позволившие выпустить данный тематический номер, могут оказаться полезными также и тем, кто еще только думает о применении в своих исследованиях CRISPR/Cas технологий, включая аспирантов, магистрантов и студентов старших курсов.

Честно признаемся, что к экспериментам по CRISPR/Cas редактированию геномов растений мы приступили совсем недавно, приобретя под свои цели и задачи ряд векторов в репозитории Addgene (<http://www.addgene.org>). Однако хотим заметить, что в лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии ИБГ УНЦ РАН исследования в области геномной инженерии растений ведутся на протяжении более чем 25 лет, в ходе которых созданы многочисленные трансгенные растения

целого ряда видов растений, включая весьма экзотические в виде, например, древесного растения параспонии *Parasponia andersonii*, растущей на островах Французской Полинезии в Тихом океане, семена которой с острова Таити нам любезно прислал Dr. J-Y. Meyer. (Пользуясь случаем, еще раз выражаем ему свою благодарность.) Есть опыт получения и транспластомного растения – табака *Nicotiana tabacum*, служащего удобным модельным объектом. Впервые в мире нами созданы транспластомные косматые («волосовидные»)¹⁰ корни (у табака), в которых произведены модификации ядерного и пластидного геномов, что сулит определенные преимущества при наработке ряда целевых первичных и вторичных метаболитов (данная технология сейчас патентуется).

Молекулярно-биологические исследования генов и геномов разных видов растений и микроорганизмов в лаборатории насчитывают уже более 35 лет. За это время сотрудниками накоплен большой опыт экспериментальной работы, подготовлен высококвалифицированный персонал, что позволяет нам надеяться на успешное освоение и применение CRISPR/Cas технологий, несмотря на то, что наши планы по их использованию, помимо получения некоторых нокаутных (оригинальных с учетом выбора генов и мест редактирования геномов) форм растений, весьма сильно отличаются от тех, что до этого ставились в мире. Думать так нам позволяет проведенный патентный поиск, анализ большого числа литературных источников, а также поиск по различным базам данных, таким как РИНЦ, GenBank, PubMed, Scopus, Web of Science, SciFinder, доступ к которым у нас имеется.

Для проведения работ в области геномной инженерии мы располагаем всем комплексом соответствующего оборудования, включая необходимые для трансформации некоторых растительных объектов электропораторы и

¹⁰ Русскоязычный термин «волосовидные корни» для «hairy roots» был предложен еще в начале прошлого века известным специалистом в области бактериального патогенеза растений И.Л.Сербиновым [1912] и видимо стоит к нему вернуться, поскольку похоже это был самый правильный перевод с научной точки зрения прилагательного «hairy», где «-видные» означает «подобные» и именно это определение наиболее полно отражает морфологию таких корней. В русскоязычной литературе сейчас имеют хождение разные обозначения этих корней (об этом достаточно подробно говорилось в другой нашей статье [Кулуев и др., 2015]), что не очень удобно, так как вносит ненужную путаницу.

биобаллистическую пушку (производства фирмы Bio-Rad Laboratories, США). В нашей лаборатории исследования в области геномной инженерии растений проводятся в условиях полного цикла, подразумевающего молекулярно-биологические эксперименты по клонированию целевых генов, созданию необходимых плазмидных и иных конструкций, культивирование тканей растений для регенерации, а также физиологический анализ ростовых характеристик создаваемых ГМ-растений, включая показатели урожайности для тех растений, коим она присуща. Что касается исследований в области культуры тканей растений, а также физиологии и биохимии растений в нашем Институте вообще, то они имеют еще более глубокие корни, «уходящие» вглубь почти на 45 и 55 лет соответственно.

В первой статье этого тематического выпуска [Кулуев и др., 2017], являющейся фактически заглавной ко всему номеру, кратко описана история и предыстория изучения CRISPR/Cas систем, приведена используемая терминология, продемонстрировано разнообразие CRISPR/Cas систем. Сделан акцент на различных улучшениях геномного редактирования, разработанных в последнее время. Приведены примеры редактирования геномов целого ряда видов растений. Проведен наукометрический анализ публикаций по CRISPR/Cas тематике вообще и по растениям в частности.

Во второй статье [Баймиев и др., 2017] в связи с проблемой ГМО значительное внимание уделено вопросам как следует соотносить созданные за счет индуцированного мутагенеза современные сорта растений с полученными с помощью геномной инженерии трансгенными растениями или ГМ-растениями, а также с нокаутными и нокин формами CRISPR/Cas отредактированных растений. Рассмотрены перспективы внедрения CRISPR/Cas отредактированных растений в сельскохозяйственное производство. Затронуты вопросы доместикации диких форм *de novo*. Описана сложившаяся непростая ситуация с патентованием CRISPR/Cas технологии и ее коммерциализация. Несмотря на то, что основное внимание как в этой статье, так и в других статьях номера обращено на растения, не были обойдены и вопросы редактирования генома человека и отношения общества к этому процессу, а также проведение сообществом DIY биологов экспериментов по геномному редактированию.

Третья статья номера [Чемерис и др., 2017] посвящена рассмотрению возможностей многочисленных компьютерных программ дизайна гидовой РНК (гидРНК) с указанием их актуальных web-страниц. Кратко описаны этапы работы с такими

программами, причем для ряда программ приведены более подробные характеристики, отраженные в специальном Приложении к статье с упором на редактирование геномов растений. Определенное внимание уделено программам поиска произведенных в результате CRISPR/Cas редактирования мутаций в геномах различных организмов. Охарактеризованы специализированные базы данных по предварительно подобранным гидПНК для ряда геномов растительных и животных организмов, включая человека. При написании этой статьи авторами проведен анализ практически всей имеющейся литературы по компьютерному дизайну гидПНК и соответствующих интернет-ресурсов.

В четвертой статье [Баймиев и др., 2017a] говорится о CRISPR-локусах, встречающихся приблизительно у половины бактерий и у большинства архей, дана их краткая характеристика и приведена типичная организация, важным элементом которой служат CRISPR-кассеты, содержащие уникальные спейсеры, перемежающиеся одинаковыми квазитандемными палиндромными повторами. Рассмотрены компьютерные программы поиска CRISPR-кассет в секвенированных полных геномах микроорганизмов и в метагеномных данных путем выявления в них соответствующих повторяющихся участков. Указаны актуальные web-страницы таких программ и в табличной форме приведены их предназначения и возможности. Заметное внимание уделено базам данных по CRISPR-кассетам с указанием их web-адресов и продемонстрированы возникающие разночтения при выявлении CRISPR-кассет с помощью разных программ поиска таких участков прокариотических геномов. В этой статье авторами также произведен анализ практически всей имеющейся литературы по данному вопросу. Не остались без внимания и соответствующие интернет-ресурсы.

В пятой статье [Вершинина и др., 2017] рассмотрена эволюция методов геномного редактирования, начиная с индуцированного мутагенеза, вызывающего под действием радиации или химических агентов случайные мутации в геномах, а также геномные мутации посредством индуцированной полиплоидии, причем для последней для одного растения проведено настоящее расследование. Отмечено, что для эффективного целенаправленного редактирования геномов любых организмов необходимо внесение двуцепочечных разрывов в нужные места молекул ДНК. Описываются методы направленного мутагенеза с помощью химерных олигонуклеотидов, рекомбинации с использованием мегануклеаз, искусственных молекулярных «ножниц», нуклеаз «цинковых пальцев», нуклеаз на основе эффекторных

TALE белков, а также на основе Cas нуклеаз, являющихся составной частью передовой CRISPR/Cas технологии редактирования геномов. Продемонстрирован весомый вклад отечественных ученых в отдельные направления получения мутантных растений и чинимые им ранее препятствия. Цитированная в данной статье литература относится к трем столетиям.

Шестая статья [Кулуев и др., 2017a] посвящена прочим применениям CRISPR-локусов, исторически первым среди которых явилось генотипирование штаммов отдельных видов бактерий, в первую очередь патогенных, с помощью CRISPR-кассет. Уделено внимание представляющему значительный интерес для фундаментальных исследований изучению процессов репрессии (CRISPRi) и активации (CRISPRa) транскрипции отдельных генов, помочь в выяснении протекания которых способны мутантная неактивная форма dCas9 нуклеазы и ей подобные. Не остался в стороне от рассмотрения новый способ CRISPR-Dx выявления специфичных последовательностей нуклеиновых кислот с помощью ПНК-зависимой ПНК нуклеазы Cas13a.

Использованная для написания этих шести обзорных статей литература в общей сложности составила 838 наименований. Из них число работ непосредственно по CRISPR/Cas системам (за вычетом процитированных в разных статьях номера одинаковых публикаций), приблизилось к шестистам, что в целом представляет заметную долю всех имеющихся в настоящее время печатных работ по данной тематике.

Особое внимание было обращено нами на относительно немногочисленные работы по CRISPR/Cas системам отечественных авторов, которые постарались отразить максимально полно. При этом тех авторов, чьи статьи по этой тематике не попали в поле нашего зрения и оказались не упомянуты, заранее просим нас простить.

Потенциал CRISPR/Cas технологий редактирования геномов различных организмов, включая человека, действительно огромен и, вне всякого сомнения, будет и дальше расти одновременно с их совершенствованием и улучшением. Причем, нынешняя CRISPR/Cas технология редактирования геномов является весьма показательным примером успешного внедрения в практику результатов фундаментальных исследований, длившихся однако четверть века.

В данном номере журнала CRISPR/Cas системы бактерий и архей рассмотрены довольно всесторонне, но ряд вопросов, включая тематически близкие, остались неохваченными, или им уделено относительно немного места и поэтому возможно следует рекомендовать по ним кому интересно

прочтеть отдельные обзоры. Так, весьма кратко затронута эволюция этой системы иммунной защиты бактерий и архей [Barrangou et al., 2007; Horvath, Barrangou, 2010; Makarova et al., 2011; 2013; Пугач и др., 2012; Koonin et al., 2017], остались без внимания каспозоны [Krupovic et al., 2014; 2017], прочие разные системы защиты микроорганизмов от проникновения в них бактериофагов и плазмид в виде изменения клеточных рецепторов, исключения множественного заражения (суперинфекции) и другие [Ширяева и др., 2016], среди которых самой известной является система рестрикции-модификации [Roberts et al., 2015].

Пожалуй здесь нельзя обойти вниманием тот факт, что CRISPR/Cas системы защиты микроорганизмов до некоторой степени размывают границы между теориями эволюции по Ж-Б.Ламарку и Ч.Дарвину поскольку последний считал, что мутации абсолютно случайны и уже затем начинает действовать естественный отбор, тогда как первый ратовал за передачу по наследству благоприобретенных признаков¹¹, что как раз, казалось бы, происходит при атаке бактериофагами бактерий и архей, которые благодаря горизонтальному переносу части генетической информации своих врагов защищают себя от них в дальнейшем. Так ли это - довольно подробно разбирается в ряде статей [Koonin, Wolf, 2009; Koonin et al., 2016]. Но есть противники даже проведения таких аналогий [Weiss, 2015], тем более, что в этом случае к вопросам эволюции надо подходить довольно формально, считая бактериофаги частью внешней среды.

В заключение этой предваряющей основной материал номера статьи можно еще отметить, что в геномном редактировании, называемом сейчас CRISPR/Cas технологией редактирования геномов, сами CRISPR-кассеты в виде повторов не применяются, поскольку работают искусственные комплексы из конкретных гидовых РНК (в том числе синтезированных химически) и соответствующей Cas нуклеазы или парное сочетание таких несколько отличающихся комплексов, нацеленных на определенные места в геномах редактируемых организмов благодаря нуклеотидной гомологии и присутствию необходимых PAM элементов. Поэтому также используемое более краткое обозначение этого процесса как CRISPR-редактирование с учетом реально действующих компонентов не в полной мере отражает происходящее и правильнее использовать термин CRISPR/Cas, но это наша точка зрения.

¹¹ Т.Д.Лысенко также придерживался подобных взглядов.

Статьи тематического номера

1. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017. Т.9. С.155-182.
2. 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. CRISPR/Cas редактирование геномов (растений) и общество // Биомика. 2017. Т.9. С.183-202.
3. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.203-228.
4. Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Матниязов Р.Т., Валеев А.Ш., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для *in silico* поиска CRISPR локусов в геномах прокариот // Биомика. 2017а. Т.9. С.229-244.
5. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.245-270.
6. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Геращенко Г.А., Никоноров Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Применение CRISPR-локусов не для редактирования геномов // Биомика. 2017а. Т.9. С.271-283.

Литература

7. Замятин А.А. (мл.) Специальный выпуск: редактирование геномов и геновая терапия // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 867–869.
8. Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений – важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // Биомика. 2015. Т.7. С.70-120.
9. Пугач К.С., Лопатина А.В., Северинов К.В. CRISPR-системы адаптивного иммунитета прокариот // Молекулярная биология. 2012. Т.46. С.195-203.
10. Сербинов И.Л. Бактериальный рак плодовых деревьев, ягодных кустарников и других садовых, а также сельскохозяйственных растений // Плодоводство. 1912. № 9. С.787-795.
11. Уотсон Дж.Д. Двойная спираль. Воспоминания об открытии структуры ДНК // М.: Мир, 1969. 144

- С. или Уотсон Дж.Д. Двойная спираль. Воспоминания об открытии структуры ДНК // М.: «Регулярная и хаотическая динамика», 2001. 144 С.
12. Фридрих Мишер. Труды по биохимии. (Серия «Классики науки»). Ред. А.С.Спирин. М., Наука. 1985. 318 с.
 13. Ширяева А.А., Строчкая А.В., Северинов К.В. Вирусы и бактерии – великое противостояние // Наука из первых рук. 2016. №4. С.51-57.
 14. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // Science. 2007. V.315. P.1709-1712.
 15. Bera R.K. The story of the Cohen-Boyer patents // Current Science. 2009. V.96. P.760-763.
 16. Boyle N. Special issue on genome engineering // ACS Synth. Biol. 2015. V.4. P.1165-1166.
 17. Cohen S.N., Boyer H.W. Process for producing biologically functional molecular chimeras // US Patent No 4,237,224. Dec. 2, 1980.
 18. Concordet J.P., Giovannangeli C. CRISPR-Cas systems for genome engineering and investigation // Methods. 2017. V. 121–122. P.1-2.
 19. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // Science. 2013. V. 339. P. 819–823.
 20. Coontz R. Science's top 10 breakthroughs of 2013. (<http://www.sciencemag.org/news/2013/12/sciences-top-10-breakthroughs-2013>).
 21. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA // Dev. Biol. 2005. V.278. P.274-288.
 22. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research // Hum. Genet. 2008. V.122. P.565-581.
 23. Doench J.G. CRISPR/Cas9 gene editing special issue // FEBS J. 2016. V.283. 3160-3161.
 24. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea // Science. 2010. V.327. P.167-170.
 25. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 5429–5433.
 26. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. V. 337. P. 816–821.
 27. Koonin E.V., Wolf Y.I. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? // Biol. Direct. 2009. V.4:42.
 28. Koonin E.V., Wolf Y.I. Just how Lamarckian is CRISPR-Cas immunity: the continuum of evolvability mechanisms // Biol. Direct. 2016. V.11:9
 29. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V.37. P.67-78.
 30. Krupovic M., Makarova K.S., Forterre P., Prangishvili D., Koonin E.V. Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity // BMC Biol. 2014. V.12:36.
 31. Krupovic M., Béguin P., Koonin E.V. Casposons: mobile genetic elements that gave rise to the CRISPR-Cas adaptation machinery // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V.38. P.36-43.
 32. Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Koonin E.V. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems // Biol. Direct. 2011. V.6:38.
 33. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria // Nucleic Acids Res. 2013. V.41. P.4360-4377.
 34. Miescher F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen // Medizinsich-chemische Untersuchungen. 1871. Bd.4. S.441-460.
 35. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE - a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes // Nucleic Acids Res. 2015. V.43 (Database issue). D298-299.
 36. Travis J. Making the cut. CRISPR genome-editing technology shows its power // Science. 2015. V.350. P.1456-1457.
 37. Watson J.D., Crick F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. V.171. P.737-738.
 38. Watson J.D., Crick F.H.C. Genetic implication of the structure of deoxyribonucleic acid // Nature. 1953a. V.171. P.964-967.
 39. Watson J.D. The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA / The New American Library. 1968. 226 P.
 40. Weiss A. Lamarckian illusions // Trends Ecol. Evol. 2015. V.30. P.566-568.

CRISPR/Cas SYSTEMS
(*Special thematic issue*)

Chemeris A.V.

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