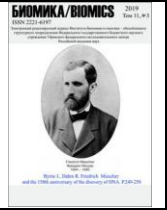




БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomicsj.ru>



**НЕКОТОРЫЕ НОВШЕСТВА В CRISPR/Cas ГЕНОМНОМ
РЕДАКТИРОВАНИИ И В СМЕЖНЫХ ОБЛАСТЯХ**

Кулуев Б.Р.¹, Кирьянова О.Ю.², Геращенко Г.А.¹, Рожнова Н.А.¹, Гумерова Г.Р.¹, Вершинина З.Р.¹,
Матниязов Р.Т.¹, Ахметзянова Л.У.^{2,3}, Князев А.В.¹, Михайлова Е.В.¹, Гарафутдинов Р.Р.¹,
Баймиев Ан.Х.¹, Губайдуллин И.М.^{2,3}, Баймиев Ал.Х.¹, Чемерис А.В.¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября, 71, E-mail: kuluev@bk.ru

²Уфимский государственный нефтяной технический университет

Россия, 450062, Уфа, ул. Космонавтов 1, E-mail: olga.kiryanova27@gmail.com

³Институт нефтехимии и катализа – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450075, Уфа, пр. Октября, 141, E-mail: irekmars@mail.ru

Резюме

Проводимые исследования, так или иначе связанные с CRISPR/Cas-локусами, настолько разнообразны, что все что вокруг них делается впору называть «Мир CRISPR/Cas» или даже «Вселенной CRISPR/Cas», и это не будет преувеличением. В данном обзоре затронута лишь небольшая их часть с акцентом на растительные организмы. При этом кратко описаны различные методологические новшества как разных этапов геномного редактирования и его различных вариантов в виде нокаутного редактирования (КО), нокин-редактирования (КИ), редактирования отдельных азотистых оснований в составе ДНК (ABE и CBE) и РНК (RBE), прайм-редактирования (PE), так и использования CRISPR/Cas-систем для других целей, включая высокочувствительную детекцию специфичных фрагментов нуклеиновых кислот, как при помощи методов амплификации, так и без оных.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR/Cas-системы, CRISPR/Cas-технология, CRISPR/Cas-компоненты, РНК-гиды, анти-CRISPR

Цитирование: Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Гумерова Г.Р., Вершинина З.Р., Матниязов Р.Т., Ахметзянова Л.У., Князев А.В., Михайлова Е.В., Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Некоторые новшества в CRISPR/Cas геномном редактировании и в смежных областях // *Биомика*. 2019. Т.11(3). С. 315-343. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27

© Автор(ы)

SOME NOVELTIES IN CRISPR/Cas GENOME EDITING AND RELATED AREAS

Kuluev B.R.¹, Kiryanova O.Yu.², Gerashchenkov G.A.¹, Rozhnova N.A.¹, Gumerova G.R.¹, Vershinina Z.R.¹,
Matniyazov R.T.¹, Akhmetzyanova L.U.^{2,3}, Knyazev A.V.¹, Mikhaylova, E.V.¹, Garafutdinov R.R.¹,
Baymiev An.Kh.¹, Gubaydullin I.M.^{2,3}, Baymiev Al.Kh.¹, Chemeris A.V.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, 71 Pr. Oktyabrya, E-mail: kuluev@bk.ru

²Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, 450062 Russia, 1 Kosmonavtov Str., E-mail: olga.kiryanova27@gmail.com

³Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450075, 141 Pr. Oktyabrya, E-mail: irekmars@mail.ru

Resume

The ongoing research on CRISPR/Cas loci is so diverse, that can be called no fewer than “The CRISPR/Cas World” or even “The CRISPR/Cas Universe”. This review covers only a small part of existing data, with an emphasis on plant organisms. There are briefly described new methods for different stages of genome editing and for its various options such as knockout editing (KO), knockin editing (KI), editing of nitrogenous bases in DNA (ABE and CBE) and in RNA (RBE), prime editing (PE). The use of CRISPR/Cas systems for other purposes, including highly sensitive detection of specific nucleic acid fragments, both with and without amplification methods, is discussed.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas system, CRISPR/Cas technology, CRISPR/Cas components, guide RNA, ant-CRISPR

Citation: Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Gumerova G.R., Vershinina Z.R., Matniyazov R.T., Akhmetzyanova L.U., Knyazev A.V., Mikhaylova, E.V., Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Gubaydullin I.M., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Some novelties in CRISPR/Cas genome editing and related areas. *Biomics*. 2019. V. 11(3). P. 315-343. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27

© The Author(s)

Содержание

	Стр.
Введение	316
Поиск CRISPR-локусов в геномах микроорганизмов	318
Используемые в геномном редактировании Cas-нуклеазы и некоторые иные ферменты	320
Дизайн РНК-гидов для осуществления CRISPR/Cas редактирования геномов	321
Модификация РНК-компонента Cas нуклеаз, включая РНК-гиды	326
Доставка CRISPR/Cas компонентов к местам редактирования геномов	327
Редактирование отдельных азотистых оснований и прайм-редактирование	329
Достижения и перспективы CRISPR/Cas-редактирования геномов растений	330
Использование CRISPR/Cas-систем не для целей редактирования геномов	331
Заключение	332
Литература	332
References	337

Content

	Pages
Introduction	316
Search for CRISPR loci in microbial genomes	318
Cas nucleases and some other enzymes used in genomic editing	320
Design of RNA guides for the implementation of the CRISPR/Cas genome editing	321
Modification of the RNA component of Cas nucleases, including RNA guides	326
Delivery of CRISPR / Cas components to genome editing sites	327
Editing nitrogenous bases and prime editing	329
Achievements and prospects of CRISPR/Cas-editing of plant genomes	330
Using CRISPR/Cas systems for non-genome editing purposes	331
Conclusion	332
References (in Russian)	332
References	337

Введение

После того, как у бактерий были обнаружены особые локусы в виде своеобразных перемежающихся уникальными последовательностями тандемно повторяющихся элементов их геномов, получивших название CRISPR-локусы (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), и было выяснено, что они выполняют защитную функцию, расщепляя ДНК бактериофагов в неких запрограммированных местах, этот механизм лег с основу технологии CRISPR/Cas геномного редактирования. В мире вслед

за этими первыми работами начался самый настоящий бум, как вокруг совершенствования данной технологии, так и в виде расширения сферы применения CRISPR/Cas-систем за пределы геномного редактирования. Причем, по прошествии уже 7 лет этот бум не стихает, а только усиливается. В мире публикуется огромное число экспериментальных и обзорных статей, связанных с CRISPR/Cas-системами, но по русскоязычным публикациям, в том числе и по обзорам, ощущается некоторая нехватка.

Ранее нами был подготовлен тематический номер журнала «Биомика», специально посвященный всестороннему рассмотрению CRISPR/Cas-систем и методам редактирования геномов на их основе [Чемерис (Chemeris), 2017], в котором, помимо расшифровки непростой терминологии, достаточно подробно была освещена история обнаружения CRISPR/Cas-локусов и выяснение их роли в жизнедеятельности микроорганизмов, а также современное (на тот момент) состояние дел в этой области (большой частью применительно к растениям). Поэтому этих вопросов в нашей новой обзорной статье касаться не будем, и уделим внимание лишь последним новшествам как в геномном редактировании (по возможности преимущественно растительных организмов), так и в прочих направлениях использования CRISPR/Cas-систем, в том числе исключив описание таковых (новшеств), рассмотренных нами в последующих после того тематического номера Биомики обзорах [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2018; Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2019; Герашченков и др. (Gerashchenkov et al.), 2020]. Приняв во внимание, что за время, прошедшее с момента выхода наших вышеупомянутых публикаций из печати, включая дату отправки последней рукописи в редакцию, появились новые варианты CRISPR/Cas-технологий редактирования геномов и модификации прочих направлений использования этих локусов, мы сочли необходимым их здесь коротко описать. Безусловно, ни в одной даже очень большой статье невозможно охватить все стороны тех глобальных исследований, связанных с CRISPR/Cas-локусами, которые настолько широки, глубоки и всеобъемлющи, что если воспользоваться астрономическими определениями, то их впору сравнить со взрывом сверхновой и называть «Мир CRISPR/Cas» или даже «Вселенная CRISPR/Cas», и поэтому этот обзор ни в коей мере не претендует на исчерпывающую полноту. В нем нашли отражение применимые главным образом к растительным объектам последние новшества в области геномного редактирования, в связи с чем подавляющее число цитируемых публикаций датированы 2019 г. или концом 2018 г. Но таковых работ уже настолько много, что в кратком обзоре можно коснуться только небольшой их части. Также уделено определенное внимание применению CRISPR/Cas-систем не только для целей геномного редактирования.

Весь (полный) процесс геномного редактирования с использованием CRISPR/Cas-технологии состоит из нескольких этапов, каждый из которых по-своему важен. Геномное редактирование начинается с выбора объекта, в геноме которого необходимо произвести те или иные изменения, и

определения мишеней и задач, под которыми подразумевается, что предстоит сделать экспериментатору – тем или иным способом нарушить ли работу какого-то конкретного гена, либо изменить свойства кодируемого им белка, или внедрить в растение некий новый ген. Фактически геномное редактирование при помощи CRISPR/Cas-технологии можно подразделить на несколько вариантов: а) нокаутные мутации (knock-out – KO), когда нарушается какой-либо ген, в том числе негативно влияющий на некий признак, важный для человека, сопровождаемые инсерциями или делециями ряда нуклеотидов в участке редактирования за счет негомологичного объединения репарируемых концов фрагментов ДНК в месте возникающего под действием Cas-нуклеазы двухцепочечного разрыва; б) геномное редактирование, в ходе которого за счет гомологичной рекомбинации в определенные участки генома по местам двухцепочечных разрывов (получившее название нокин-вариант (knock-in – KI)) происходят встраивания иных нуклеотидных последовательностей в виде олигонуклеотидов или более протяженных фрагментов ДНК, как нарушающих работу целевого гена (это тоже разновидность нокаутирования того или иного гена), так и приводящих к появлению новых желательных признаков; в) геномное редактирование без образования двухцепочечных разрывов ДНК и соответственно без делеций или инсерций в виде произведения однонуклеотидных замен (base editing – BE) за счет направленного дезаминирования конкретных азотистых оснований с помощью «сшитых» с каталитически неактивными нуклеазами соответствующих дезаминаз (и некоторых других ферментов), обеспечивающее появление новых признаков, либо изменение имевшихся, включая нокаутирование генов вследствие образования терминирующих кодонов; г) так называемое прайм-редактирование (prime editing – PE), когда за счет образующихся поочередно ников и действия сшитой с нуклеазой обратной транскриптазы происходит замена определенного участка ДНК. Помимо редактирования геномов или отдельных азотистых оснований с помощью CRISPR/Cas-технологии можно осуществлять также регуляцию работы отдельных генов в виде CRISPRa (activation) и CRISPRi (interference) вариантов, мишенью для которых служат промоторные области.

Под поставленные задачи и выбранные мишени с помощью компьютерных программ с целью достижения наибольшей эффективности и точности этого процесса, сводя к минимуму редактирование нецелевых участков, необходимо провести дизайн РНК-гидов в виде поиска наиболее оптимальных мест в конкретном гене или в ином участке ДНК для

намеченного варианта геномного редактирования – протоспейсеров. После этого либо создаются соответствующие генно-инженерные конструкции, несущие необходимые для редактирования гены подходящих Cas-нуклеаз и РНК-гидов и если необходимо (для нокин-вариантов) ту или иную донорную ДНК, либо осуществляется химический синтез молекул РНК-гидов для последующего формирования рибонуклеопротеидных частиц с соответствующими Cas-нуклеазами, часть которых уже доступна из ряда коммерческих источников в виде готовых ферментов. Следующий этап геномного редактирования заключается в доставке этих CRISPR/Cas-компонентов в ядро клетки и производстве там соответствующих ферментативных действий. Заключительный этап состоит в виде проверки правильности произведенного редактирования генома с помощью тех или иных методов, включая полногеномное секвенирование, сопровождаемое специализированными компьютерными программами. Данная обзорная статья посвящена краткому рассмотрению всех новшеств последних двух лет по важнейшим вопросам, касающимся изучения и практического использования CRISPR/Cas-систем.

Поиск CRISPR-локусов в геномах микроорганизмов

Как уже говорилось выше, биоинформатический анализ в ходе геномного редактирования производится на двух стадиях – на последней при анализе полученных результатов и если не считать выбор объекта, мишени в нем и стоящей задачи (что собственно имеет место быть при любых других геномных в том числе генно-инженерных исследованиях), то фактически еще на первой – при поиске и дизайне РНК-гидов. Но на самом деле биоинформатический анализ в связи с CRISPR/Cas-локусами проводится еще раньше – при поиске таковых в геномах различных микроорганизмов, и для этой цели также написано немало компьютерных программ. Именно обнаружение новых классов, типов и субтипов CRISPR/Cas-систем обеспечивает возможность направленного редактирования геномов, благодаря тому, что разные Cas-нуклеазы узнают отличающиеся по нуклеотидным последовательностям участки генома, прилегающие к потенциальным протоспейсам, увеличивая тем самым число потенциальных мест

редактирования, чему будет посвящен следующий раздел данной статьи.

CRISPR/Cas-локусы довольно широко распространены у микроорганизмов в Природе. Так, например, анализ 324 полностью секвенированных геномов архей показал, что в 276 геномах (85,2%) CRISPR/Cas-системы имеются. В том числе они обнаружены почти у всех термофильных архей – в 89 геномах из 92 секвенированных. При этом у термофильных бактерий рода *Thermus* также имеются CRISPR-локусы [Lopatina et al., 2019], хотя у эубактерий лишь около 40% геномов из 12792 полностью секвенированных несут такие локусы [Makarova et al., 2019]. В настоящее время согласно последней классификации [Makarova et al., 2019] у микроорганизмов насчитывается 2 класса, 6 типов и 33 подтипа CRISPR/Cas-систем. Причем в последние годы отмечается взрывной рост обнаружения CRISPR/Cas разнообразия во втором классе, находящим как раз применение в геномном редактировании и прочих исследованиях, использующих такие локусы. Однако это возможно связано с тем, что именно этому классу исследователи уделяют повышенное внимание.

Поиск CRISPR/Cas-локусов проводится с помощью ряда программ, значительная часть которых (практически все имевшиеся на тот момент), рассмотрены нами ранее, включая специальные базы данных по таким элементам геномов [Баймиев и др. (Baumiev et al.), 2017]. Поэтому здесь коснемся лишь появившихся с момента той публикации и упомянем один недавний обзор [Alkhnbashi et al., 2019], в который однако за небольшим исключением не вошли рассматриваемые здесь программы. Для начала напомним организацию функционального CRISPR-локуса, представленную на рис. 1, на котором виден блок из прямых повторов, перемежающихся уникальными спейсерами, называемый CRISPR-array. Фактически CRISPR-эрреи можно считать местом в геноме, являющимся неким аналогом памяти, где хранится информация о прежних атаках бактериофагов, а Cas-белки служат для реализации этой памяти и не дают развиться новым атакам вирусов [Weissman et al., 2018].



Рис. 1. Упрощенная схема организации функционального CRISPR-локуса. Cas-гены в разных классах, типах и подтипах могут располагаться иначе. (масштаб не соблюден).

Fig. 1. Simplified scheme of the functional CRISPR locus organization. Cas genes may be arranged differently in various classes, types, and subtypes. (the scale is not accurate).

Ввиду такой своеобразной организации этих элементов генома, программы поиска обычных tandemных повторов оказывались не всегда успешными, и было написано довольно большое число новых компьютерных программ, непосредственно ориентированных на поиск CRISPR-эреев. Разработка подобных инструментов продолжается и стоит указать некоторые из них. При этом многие исходные коды описанных ниже программ находятся в свободном доступе.

Однако прежде чем приступить к краткому рассмотрению различных биоинформатических ресурсов, связанных с поиском CRISPR/Cas-систем, следует коснуться еще и anti-CRISPR белков, получивших акронимы асг и аса (*anti-crispr* и *anti-crispr associated*), тем более что ранее [Чемерис (Chemeris), 2017] мы совсем не уделили им внимания. Впервые ингибирование CRISPR/Cas иммунной защиты было выявлено для первого класса CRISPR/Cas-систем у бактерии *Pseudomonas aeruginosa* [Bondy-Denomy et al., 2013]. С тех пор исследование anti-CRISPR-систем идет по нарастающей, свидетельством чему может служить количество публикуемых работ на эту тему. Так, из базы данных PubMed видно, что число статей, в заглавии и/или в аннотации которых содержится термин «anti-CRISPR», в 2013 году составило 3 публикации, в 2014 и 2015 годах – по 2, а затем их количество начало расти – в 2016 году стало уже 9 статей, в 2017 – 15, в 2018 – 34 и в 2019 году опубликовано 50 статей. Выросло среди них и число обзорных публикаций, с которыми можно порекомендовать познакомиться [Pawluk et al., 2017; Stanley, Maxwell, 2018; Hwang, Maxwell, 2019; Liu Q et al. 2019a; Yin et al., 2019; Zhang F. et al., 2019]. Примечательно название одного из таких обзоров [Maxwell, 2017] – The Anti-CRISPR Story: A Battle for Survival. Действительно трудно представить, что Природа, наделив микроорганизмы CRISPR/Cas-системой защиты от их инфицирования бактериофагами, «не дала» последним инструменты, позволяющие противоборствовать такой защите, в том числе внедряемые в геномы бактерий в виде профагов.

Как уже говорилось выше, сначала такие асг-белки были найдены против класса 1 CRISPR/Cas-систем, но через некоторое время они обнаружены и для класса 2 [Pawluk et al., 2017], к которым относятся используемые в геномном редактировании нуклеазы Cas9 и Cas12a. Теоретически механизмы анти-CRISPR противодействия иммунной защите микроорганизмов могут проявляться на разных уровнях – препятствуя захвату новых CRISPR-спейсеров; блокируя экспрессию генов,

кодирующих Cas-белки; ингибируя транскрипцию и/или процессинг сгРНК; мешая формированию активного рибонуклеопротеидного комплекса, не давая возможности связываться ему с чужеродной ДНК; блокируя нуклеазную (расщепляющую цепи ДНК) активность [Maxwell, 2017]. При этом надо заметить, что пока среди обнаруженных нескольких десятков семейств асг-белков таковые найдены не для всех этих этапов. При этом есть целый ряд асг- и аса-белков, функции которых еще не ясны. В одном из недавних обзоров, посвященном биоинформатическому поиску Асг-Аса-локусов в секвенированных геномах микроорганизмов [Yin et al., 2019], сообщается о выявлении уже (или всего!) 45 семейств таких небольших белков, ингибирующих 7 подтипов CRISPR/Cas-систем (<http://bcb.unl.edu/AcrDB/Download/knownAcrAca/Acrs/>).

Обнаружение anti-CRISPR систем, помимо того, что открывает новую эру в изучении бактериофагов, может быть применимо и для направленного редактирования геномов разных организмов, включая сами вирусы, и тому уже есть ряд примеров [Mayo-Munoz et al., 2018; Bubeck et al., 2019]. Ранее считалось, что бактериофаги преодолевают «сопротивление» микроорганизмов за счет процесса мутирования, изменяющего их нуклеотидные последовательности, которые до этого были «выбраны» этими бактериями в качестве протоспейсеров. Однако потенциал мутаций у бактериофагов может быть быстро исчерпан ввиду того, что они станут несовместимыми с нормальным функционированием и воспроизводством вируса, поэтому анти-CRISPR системы основаны на иных механизмах. В этой связи вполне вероятно, что имеются такие асг- или аса-белки, которые каким-то образом препятствуют взаимодействию спейсерных последовательностей в виде сгРНК с фаговыми протоспейсерами при неполной гомологии этих участков, что можно использовать при геномном редактировании с целью снижения узнавания нецелевых мишеней.

Возвращаясь в данной статье к самим CRISPR/Cas-локусам и их биоинформатическому поиску, необходимо заметить, что относительно недавно написанная программа **ULTRA** (**ULTRA Locates Tandemly Repetitive Areas**) по мнению авторов заполняет пробел между относительно простыми и весьма сложными программами, ищущими в геномах повторяющиеся участки [Olson, Wheeler, 2018]. Разработан алгоритм **D2R**, позволяющий детектировать CRISPR-повторы в геномах микроорганизмов, а также в метагеномных последовательностях [Chen S. et al., 2019]. Его коды доступны на сайте

http://github.com/XuegongLab/D2R_codes/.

Программа **OSTRFPD** (Omni Short Tandem Repeat Finder and Primer Designer) [Mathema et al., 2019], представленная по адресу <https://github.com/vivekmathema/OSTRFPD>, рассчитана не только на поиск tandemных повторов в геномах микроорганизмов, но и на дизайн соответствующих праймеров, для чего в нее имплементирована специализированная программа **Primer3**, рассмотренная среди прочих нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2016; Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019]. Другой аналогичной программой, используемой для поиска CRISPR-повторов, является **SPADE** (Search for Patterned DNA Elements) [Mori et al., 2019]. Она доступна на сайте <https://github.com/yachielab/SPADE>. На этом же портале (<https://github.com/CRISPRlab/CRISPRviz>) находится еще одна новая программа поиска CRISPR-повторов **CRISPR Visualizer (CRISPRviz)** [Nethery, Barrangou, 2019]. Другие авторы разместили там же схожую программу поиска CRISPR-эреев **CRISPRStudio** (<https://github.com/moineaulab/CRISPRStudio>) [Dion et al., 2018].

Помимо поиска tandemных перемежающихся повторов для обнаружения в геномах микроорганизмов CRISPR-локусов следует также искать Cas-белки, что уже привело к обнаружению новых CRISPR/Cas-систем, о чем будет говориться в следующем разделе. Так, одна из первых программ поиска CRISPR-эреев **CRISPRFinder** (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr>) получила свое развитие и превратилась в программу **CRISPRCasFinder** (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr>), в режиме on-line ищущую также гены Cas-белков [Couvin et al., 2019]. Алгоритм поиска разработан на основе построения суффиксного дерева. Выборка CRISPR-эреев состоит из четырех последовательных шагов. Соответственно на основе существующей с 2007 г. специализированной базы данных **CRISPRdb** появилась фактически новая база данных **CRISPRCasdb** [Pougel et al., 2020], где помимо CRISPR-эреев, содержится информация и о Cas-белках.

Также описана поисковая система **CasLocusAnno**, представляющая собой web-сервер, расположенный по адресу http://cefg.uestc.cn/CasLocusAnno/CasLocusAnno_v1.0.php [Dong et al., 2019]. Данная система включает в себя несколько программ и баз данных. Программный комплекс может работать и в режиме off-line, для чего его необходимо скачать с адреса <https://github.com/RiversDong/CasLocusAnno>. На упомянутом выше web-сервере

<http://cefg.uestc.cn/service.php> представлена также база данных **Anti-CRISPRdb** [Dong et al., 2018] с привязанной программой **acrDetector** (acr означает anti-crispr) <http://cefg.uestc.cn/acrDetector/#/>, рассчитанной на работу в режиме on-line для выявления соответствующих анти-CRISPR/Cas-белков. Впрочем, это не единственное приложение для поиска анти-CRISPR последовательностей. Есть еще подобный программный продукт – **AcrFinder** <http://ccb.unl.edu/AcrFinder/index.php>.

Web-сервер, сопряженный с базой данных **CRISPRminer** (<http://www.microbiome-bigdata.com/CRISPRminer/>), анализирует и хранит информацию о CRISPR-эреех, Cas-белках, а также анти-CRISPR-последовательностях [Zhang F. et al., 2018]. Свою базу данных для Cas-белков **CasPDB** создали также и другие авторы [Tang et al., 2019]. Она находится по адресу – <http://immunet.cn/caspdb/>. Специально разработанная стратегия **CRISPRicity**, нацеленная на поиск неких прочих генов вблизи CRISPR-эреев, позволила в базе данных прокариотических геномов выявить 79 таких белков, предположительно взаимодействующих с CRISPR/Cas-локусами [Shmakov et al., 2018].

Достаточно важным является определение направления транскрипции CRISPR-повторов и недавно предложен новый простой критерий Cas Orientation для получения этой информации [Milicevic et al., 2019]. Для поиска CRISPR-эреев в геномах микроорганизмов в «мокрое» эксперименте с помощью многостадийной ПЦР был разработан подход, названный **CAPTURE (CRISPR Adaptation PCR Technique Using Reamplification and Electrophoresis)** [McKenzie et al., 2019]. Одной из его особенностей можно считать использование на разных стадиях четырех комплектов праймеров: иницирующие праймеры; внутренние праймеры; вырожденные праймеры; праймеры «на повторы».

Используемые в геномном редактировании Cas-нуклеазы и некоторые иные ферменты

Важность расширения перечня Cas-нуклеаз, применяемых в геномном редактировании, вызвана необходимостью вносить изменения в различные места геномов, и чем больше будет таких ферментов, узнающих отличающиеся PAM-последовательности, тем больше шансов провести нужное редактирование. При этом следует иметь в виду, что более протяженные PAM-участки несколько снижают (теоретически) число нецелевых мест редактирования в силу того, что таковых просто в геноме будет иметься меньше. Тогда как более короткие PAM-участки, напротив, увеличивают вероятность нецелевого редактирования, зато предоставляют больше возможностей нацелить

соответствующую нуклеазу на конкретное место генома.

Основными ферментами геномного редактирования являются ставшие уже классическими нуклеазы Cas9 и Cas12a (Cpf1), а также их многочисленные ортологи и мутантные формы. Тем не менее, список таких нуклеаз, относящихся ко второму классу и ко II и к V-A типам соответственно, в 2019 году пополнился еще целым их рядом. Так, в одной из работ сообщается о 12 новых ортологах Cas12a нуклеазы [Zetsche et al., 2019]. В другом исследовании говорится о создании многочисленных химерных форм Cas12a нуклеазы, одна из которых характеризовалась более высокой специфичностью, чем исходный фермент дикого типа [Liu R.M. et al., 2019]. Недавно использована в геномном редактировании новая нуклеаза ErCas12a, узнающая PAM-последовательность YTTN [Wierson et al., 2019]. Можно также порекомендовать ознакомиться с недавней обзорной статьей, посвященной Cas12a (Cpf1) нуклеазам, где они всесторонне рассмотрены [Safari et al., 2019].

Надо сказать, что исторически складывается так, что какие-либо модификации Cas-нуклеаз сначала проводятся с Cas9 нуклеазой и только потом наступает черед Cas12a нуклеаз. Так, в Cas9 нуклеазе были нарушены по отдельности и вместе каталитические домены RuvC и HNH после чего этот фермент превратился в соответствующие nCas9 никазы или, став dCas9 нуклеазой, полностью потерял способность к разрезанию цепей ДНК, что нашло свои применения в геномном редактировании. Другим типом измененных Cas9 нуклеаз стали нуклеазы, несущие пришитые к ним цитидин- или аденин-деаминазы (а также некоторые другие ферменты), позволяющие производить редактирование отдельных азотистых оснований путем транзаций C→T и A→G без образования двуцепочечных разрывов молекул ДНК. Затем наступил черед подобных модификаций Cas12a нуклеаз, из которой также сделали фермент, позволяющий редактировать азотистые основания [Li X. et al., 2018]. Но и совершенствование Cas9 нуклеаз продолжается.

Проведено исследование молекулярных основ экспансии PAM-участков для группы нуклеаз xCas9, что дает возможность вести направленное создание их новых генно-инженерных форм [Chen W. et al., 2019]. Недавно созданы новые ферментные комплексы из nCas9 никазы и обратных транскриптаз, приведшие к, по сути, новому геномному редактированию [Anzalone et al., 2019] о котором более подробно будет говориться в другом разделе данной статьи. В дополнение к нуклеазам Cas9 и Cas12a (Cpf1) для редактирования геномов недавно добавились

нуклеазы Cas12b [Teng et al., 2018; Strecker et al., 2019] и CasX (Cas12e) [Liu J.J. et al., 2019], вошедшие в частности в ассортимент ферментов для дизайна РНК-гидов одной из компьютерных программ 2019 года **AsCRISPR**, о которой речь пойдет дальше.

Все вышеупомянутые ферменты относятся к разным типам и подтипам второго класса Cas-нуклеаз и до недавнего времени только ферменты этого класса применялись для геномного редактирования или иного воздействия на геномы. Но уже появилось сообщение об использовании комплекса ферментов Cascade из класса I, отнесенных к типу I-E, для активации отдельных генов у растений (кукурузы) и как отмечают сами авторы это первая работа с этими нуклеазами для оказания воздействия на геном [Young et al., 2019]. Легко представить, что вскоре за ней последуют другие подобные работы.

Относительно недавно при анализе *in silico* метагеномных данных терабайтного размера была идентифицирована новая группа Cas-нуклеаз, относящаяся к классу 2, типу V и получившая обозначение Cas14 [Harrington et al., 2018]. Всего было обнаружено 14 вариантов таких генов, которые уложились в три группы Cas14a, Cas14b и Cas14c. Особенности этих ферментов оказались малые размеры (400 – 700 аминокислотных остатков), приблизительно в два раза меньшие, чем у Cas9 нуклеаз, отсутствие необходимости в PAM-участке и специфичность действия только в отношении одноцепочечной ДНК. Cas14a нуклеаза интересна тем, что на ее основе создан метод детекции одонуклеотидных замен Cas14-DETECTR, о чем пойдет речь в соответствующем разделе данной статьи, где описываются иные применения Cas-нуклеаз, не имеющие отношений к геномному редактированию.

Дизайн РНК-гидов для осуществления CRISPR/Cas редактирования геномов

Селективность и эффективность геномного редактирования с помощью CRISPR-Cas технологии в значительной степени зависят от удачного дизайна РНК-гидов, проводимого с помощью специализированных компьютерных программ, которые сообразно выбранным мишеням находят в редактируемой последовательности нуклеотидов пригодные протоспейсеры, наиболее оптимально подходящие для решения стоящих задач. При этом под удачным дизайном понимается выбор целевых участков (on-target), которые удовлетворяют целому ряду задаваемых параметров и в идеале не имеют других похожих участков (off-target) в геноме того или иного организма, которые могли бы оказаться подвержены нежелательному редактированию. Учитывая крайнюю важность такого компонента

CRISPR/Cas-систем как РНК-гиды, специализированных программ их дизайна написано уже более сотни.

Мы уже не в первый раз обращаемся к этой теме. Так, осенью 2017 года опубликована обзорная статья [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2017], в которой было рассмотрено более 70 таких программных продуктов. Не так давно нами написан большой обзор, где упомянуты свыше 100 программ и около четверти из них (нацеленные на работу с геномами растений) были подвергнуты более тщательному анализу [Геращенко и др. (Gerashchenkov et al.), 2020]. Эта статья выйдет в свет в начале 2020 года, но с момента, когда завершилось ее написание (май 2019 г.), появился еще целый ряд новых программ, на которые в силу некоторых причин следует обратить внимание читателей.

Вообще обзорных статей по дизайну РНК-гидов в мире написано уже немало [Chuai et al., 2017; Periwal, 2017; Yennmalli et al., 2017; Cui et al., 2018; Demirci et al., 2018; Yan et al., 2018]. Часть из них мы процитировали ранее, а здесь хотим остановиться на некоторых обзорах 2019 года. Так, в одной из таких работ [Razaq et al., 2019], посвященной описанию геномного редактирования у растений, дан список из 22 программных продуктов для дизайна РНК-гидов, содержащий URL-адреса и весьма краткую информацию об их возможностях. Схожие работы также применительно к растениям опубликовали другие авторы [Uniyal et al., 2019; Vats et al., 2019]. В еще одной статье [Thomas et al., 2019] приведен перечень полутора десятков программ для дизайна РНК-гидов (не только для растительных организмов) и при этом сделан довольно подробный анализ их возможностей. Также весьма детально были проанализированы 18 популярных программ дизайна РНК-гидов, где авторами даже произведен подсчет времени, затрачиваемый на поиск подходящих протоспейсеров с учетом объема вводимой генетической информации [Bradford, Perrin, 2019]. Отдельно стоит выделить недавний обзор G.Liu и соавт. [Liu et al., 2020], в котором хотя и кратко, но затронуты различные вопросы дизайна РНК-гидов, включая термодинамику, используемые алгоритмы, при этом ряд программ рассмотрен достаточно подробно.

Испанскими авторами [Torres-Perez et al., 2019] подготовлен интересный и полезный web-ресурс “**WeReview: CRISPR Tools**” (<https://bioinfogp.cnbc.csic.es/tools/wereview/crisprtool/>), в котором собрано большое число компьютерных программ дизайна РНК-гидов и при этом он является свободно пополняемым. То есть каждый может внести в него информацию о своем

программном продукте, заполнив ряд обязательных граф – Name; Available?; Purpose; Platform; Off-targets; Score Oligos; Search by; Enzyme; PAM; Organisms. Помимо сортировки по каждой из этих граф, данный ресурс предусматривает сортировку программ по общему числу цитирований в статьях (по годам) за период их существования. Также имеются графы Reference и Comments. На момент принятия цитируемой выше статьи в печать (24 июля 2019 года) данный ресурс, как следует из текста, содержал сведения о 83 программах. По состоянию на середину ноября 2019 г. в нем уже была информация о 101 программе.

В одной из обзорных статей 2019 года главное внимание авторы [Wang J. et al., 2019] уделили используемым в ряде программ дизайна РНК-гидов алгоритмам, основывающихся на MDL (machine and deep learning) моделях, среди которых оказались CNN (Convolution Neural Network), L1-Reg (L1-Regression), SVM (Support Vector Machine), RF (Random Forest), GBRT (Gradient Boost Regression Tree) и др. Желая улучшить поиск как целевых, так и нецелевых сайтов редактирования были разработаны новые модели на основе алгоритма Convolution Neural Network – AttnToCRISPR_CNN, seqCRISPR и AttnToMismatch_CNN [Liu Q. et al., 2019].

Ранее нами большое число программ дизайна РНК-гидов было оценено по 34 параметрам, оформленным в виде специальной таблицы [Геращенко и др. (Gerashchenkov et al.), 2020], однако некоторые появившиеся новые подобные программы заставили нас число таких параметров увеличить по причине использования в них Cas-нуклеаз новых типов, о которых говорилось выше. Так, не желая добавлять новые колонки в таблицу (тем более, что используемый для этой цели английский алфавит оказался исчерпанным), мы увеличили количество столбцов с двойной информацией (таблица 2), тем более, что это было вполне логичным. Так, в колонки B и C мы добавили по второй Cas-нуклеазе – Cas12b и CasX соответственно, используя фактически новое и устаревшее их обозначение, но при этом, исходя из названий этих ферментов, упоминаемых в конкретной программе дизайна РНК-гидов. Колонка G в дополнение к длине (прото)спейсера стала содержать информацию о длине якорной (seed) последовательности. Но, прежде чем переходить к таблице 2, следует в таблице 1 перечислить программные продукты дизайна РНК-гидов с указанием их URL-адресов и литературных ссылок, не вошедшие в наши прежние публикации [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2017; 2018; Геращенко и др. (Gerashchenkov et al.), 2020].

Таблица 1.

Некоторые программы дизайна РНК-гидов и поиска PAM-последовательностей
Table 1. Some RNA guide design and PAM sequence search programs

Программа (по алфавиту) Program (listed alphabetically)	URL	Ссылка Reference
AlleleAnalyzer	https://github.com/keoughkath/AlleleAnalyzer	Keough et al., 2019
AsCRISPR	http://www.genemed.tech/ascrispr/ascrispr	Zhao et al., 2019
CHOPCHOP v.3	http://chopchop.cbu.uib.no	Labun et al., 2019
Crisflash	https://github.com/crisflash	Jacquin et al., 2019
CrisPam	https://github.com/ristllin/CrisPam	Rabinowitz et al., 2019
CRISPR	https://github.com/Alexzsx/CRISPR	Zhang S. et al., 2019
CRISPRitz	https://github.com/pinellolab/CRISPRitz	Cancellieri et al., 2019
CRISPR-PN	http://www.crispr-pn.net	O'Halloran, 2019
DeepCas9	https://github.com/lje00006/DeepCas9	Xue et al., 2019
DeepCpf1	http://deepcrispr.info	Luo et al., 2019
DeepHF	http://www.deephf.com	Wang D. et al., 2019
KOnezumi	http://www.md.tsukuba.ac.jp/LabAnimalResCNT/KOanimals/konezumi.html	Kuno et al., 2019
Motif Scraper	https://github.com/RobersonLab/motif_scraper	Roberson, 2019
MultiGuideScan	https://github.com/bioinformaticsCSU/MultiGuideScan	Li T. et al., 2019
PAVOOC	https://pavooc.me	Schaefer et al., 2019
SNP-CRISPR	https://www.flyrnai.org/tools/snp_crispr/web/	Chen C.L. et al., 2019
VARSCOT	https://github.com/BauerLab/VARSCOT	Wilson et al., 2019

Переходя к таблице 2, необходимо заметить, что в ней суммированы 37 параметров из основных характеристик программ дизайна РНК-гидов, сгруппированных в блоки (высеченные цветами радуги), касающихся использования различных Cas-нуклеаз; требований к протоспейсерам; способов ввода предназначенных для редактирования последовательностей ДНК или РНК; особенностей выдаваемых результатов. Кроме этой информации в таблице 2 даны сведения о возможной работе некоторых программ в автономном режиме и возможности валидации ранее подобранных РНК-гидов, в том числе иными программами дизайна. Но не все из данных столбцов оказались заполненными, поскольку приведенные здесь программные продукты не обладают некоторыми параметрами. Однако было принято решение такие столбцы все же оставить, поскольку данная таблица носит более общий характер. Вообще, для относительно полной характеристики возможностей различных программ дизайна РНК-гидов (всех, не только приведенных здесь) необходимо использовать около полусотни параметров.¹ При этом ряд новых программных продуктов для дизайна РНК-гидов из таблицы 2 мы сочли возможным рассмотреть чуть более подробно.

¹ На такую всеобъемлющую таблицу как раз может хватить 26 букв английского алфавита, если сделать все столбцы (или почти все), содержащими двойную информацию.

Некоторой особенностью программ дизайна РНК-гидов 2019 года можно считать нацеленность некоторых из них на то, чтобы принимать во внимание однонуклеотидные замены или иначе снипы (от англ. SNP – Single-Nucleotide Polymorphism), а также короткие инделы (*инсерции/делеции*). Так, интересным web-ресурсом является **SNP-CRISPR** (https://www.flyrnai.org/tools/snp_crispr/web/) [Chen C.L. et al., 2019], позволяющий осуществлять дизайн РНК-гидов с учетом находящихся в них снипов или инделов в пяти референсных геномах – дрозофилы, человека, мыши, рыбки данио и крысы. При этом можно обратиться к разработчикам с просьбой добавить другой геном, заполнив соответствующую форму. Однако при использовании данной программы автономно (после ее скачивания с сайта https://github.com/jrodiger/snp_crispr) возможен поиск РНК-гидов в любых доступных геномах. Там же содержится информация о всех уже подобранных РНК-гидах (PAM - NGG) для снипов, потенциально ассоциированных с болезнями человека (https://github.com/jrodiger/snp_crispr/tree/master/results). Работа с программой начинается с выбора организма, после чего требуется выбрать PAM-участок из двух вариантов (NAG и NGG) и указать свой e-mail, на который в течение получаса после запуска поиска будет прислан результат. Для этого надо еще загрузить файл с расширением *.vcf или *.csv, содержащий до 2000 аллелей, после чего проводится верификация соответствия введенных данных (нуклеотидных последовательностей) версии того или иного генома. Здесь следует отметить, что в автономно работающей версии программы никаких

ограничений по числу вводимых аллелей не существует и время поиска зависит от мощности компьютера пользователя. Выдаваемые результаты оформлены в виде таблицы из 15 столбцов, 14 из которых сортируемы, а первый представляет собой окошки, в которые можно ввести галочку для экспорта информации в итоговый файл в формате CSV или Excel. РНК-гиды с четырьмя или более тиминами подряд программа сразу отбраковывает. Наряду со стандартными сведениями, указывающими локализации на хромосоме и в секвенированной последовательности; непосредственно самими последовательностями нуклеотидов; цепями ДНК, в этой программе в последней колонке также дается информация о расстоянии снипа или индела до PAM-последовательности.

Еще одной программой, осуществляющей дизайн РНК-гидов с учетом однонуклеотидных замен и инделов, является **AsCRISPR** (Allele-specific CRISPR) – <http://www.genemed.tech/ascrispr/> [Zhao et al., 2019]. Другой ее особенностью служит то, что в ней РНК-гиды в дополнение к ставшим уже классическими нуклеазам Cas9 и Cas12a (Cpf1) можно подбирать и для относительно новых нуклеаз Cas12b и CasX (Cas12e). При этом можно сразу задать дизайн РНК-гидов для всей группы Cas9 нуклеаз (9 разных, включая SpCas9 с каноническим PAM участком NGG, и ее ортологи и мутанты), а также аналогично искать РНК-гиды для Cas12a и Cas12b нуклеаз (5 и 3 фермента соответственно). CasX нуклеаза предлагается только одна – Dpb(Plm)CasX. В настоящее время программа **AsCRISPR** позволяет анализировать только геномы человека (два генома) и один геном мыши, хотя авторы сообщают, что намерены в скором времени расширить список геномов. Для поиска РНК-гидов необходимо ввести интересующие последовательности длиной не менее 53 нуклеотидов (для Cas12a, Cas12b и CasX нуклеаз) и не менее 59 для Cas9 нуклеаз в формате $N_{29}[N_1N_2]N_{29}$ (для последней), где N_1N_2 обозначает биаллельный снип. Ранжированные результаты поиска по каждому снипу выдаются в табличной форме со множеством колонок, где приводится информация о конкретной нуклеазе с ее PAM-участком; цепи ДНК; GC-содержанию; подсчету эффективности редактирования по разным критериям; потенциальным нецелевым сайтам и др.

Также на дизайн РНК-гидов с учетом однонуклеотидного полиморфизма и коротких инделов рассчитаны программы **CrisPam** [Rabinowitz et al., 2019] и **AlleleAnalyzer** [Keough et al., 2019], подбирающие такие последовательности для 6 и 11 различных Cas-нуклеаз соответственно, причем последняя программа предоставляет пользователю возможность добавлять дополнительные Cas-нуклеазы.

Программа **CRISPR-PN** (<http://crispr-pn.net>) [O'Halloran, 2019] рассчитана на поиск протоспейсеров в геномах 14 паразитических нематод. Последовательность

ДНК вводится только через буфер обмена. Можно выбрать один из трех алгоритмов – SeqMap, Blast или Bowtie. По умолчанию выставлен PAM-участок NGG нуклеазы Cas9, но можно вводить PAM и с клавиатуры в том числе TTTN для Cas12a нуклеазы. Можно менять длину РНК-гида в пределах от 10 до 29 нуклеотидов. Длина seed последовательности также может меняться. Позволяется указывать GC-состав протоспейсеров и число неспариваний нуклеотидов в них. Мишени выдаются для обеих цепей ДНК с указанием их локализации. Причем допускается ранжирование по всем графам.

Программа **DeepHF** (<http://www.deephf.com/index/#/>) [Wang D. et al., 2019] позволяет осуществлять дизайн РНК-гидов для нуклеазы Cas9 и ее ортологов, а также для двух дезаминаз – аденин- и цитидиндезаминазы и в этих случаях нуклеотиды, подверженные дезаминированию приводятся в протоспейсерах красным цветом. При выборе варианта редактирования, позволяющего генерировать стоп-кодон, модифицированный нуклеотид в нем (цитозин) указывается строчной буквой. В варианте геномного редактирования поиск начинается с ввода последовательности длиной от 23 до 1000 нуклеотидов через буфер обмена, после чего требуется выбрать одну из четырех Cas9 нуклеаз. Результаты выдаются в табличной форме с несколькими столбцами, содержащими сведения о цепи ДНК; месте расщепления; предполагаемой эффективности редактирования. Редактирование отдельных азотистых оснований проводится аналогично. Модуль **BeStop** рассчитан на образование стоп-кодонов в генах человека с помощью комплексного фермента **AncBE4max**. Программа может также работать автономно после скачивания с сайта <https://github.com/izhangcd/DeepHF>.

Тенденциями последних лет при написании новых компьютерных программ дизайна РНК-гидов и совершенствовании существующих можно считать уделение внимания редактированию конкретных азотистых оснований и однонуклеотидным заменам (снипам) и коротким инделам. По всей видимости, тенденцией 2020 года при написании подобных программ станет введение в перечень ферментов химерного комплекса из **nCas9** никазы и обратной транскриптазы для нового варианта геномного редактирования, получившего название **Prime editing** [Anzalone et al., 2019], о котором речь в этой статье пойдет дальше.

Поскольку, помимо качественного дизайна РНК-гидов, на эффективность и специфичность процесса геномного редактирования влияют и другие факторы, в частности непосредственно РНК-компонент, то этому вопросу также следует уделить определенное внимание.

Таблица 2.

Основные характеристики некоторых новых программ дизайна РНК-тидов для CRISPR/Cas-редактирования геномов

Table 2. Main features of some new RNA guide design programs for CRISPR/Cas genome editing

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
1	+/+	+/+	-/+			+	-/+					+/+	+/+		+	+			+	+/+						+
2	+/+	+/+	+/+			+	+/+		+	+	+	+/+	+/+		+	+			+	+/+		+/+	-/+		+	+
3	+/+	+/+	+/+	+			+/+		+	+	+	+/+	+/+		+	+				+/+		+/+	-/+		+	+
4	+/+	+/+				+						+/+	+/+		+	+										+
5	+/+	+/+										-/+	-/+		+	+				+/+					+	+
6	+/+	+/+										-/+	-/+	+	+	+				+/+					+	+

1. **AsCRISPR**; 2. **CHOPCHOP v.3**; 3. **CRISPR-PN**; 4. **DeepHF**; 5. **PAVOOC**; 6. **SNP-CRISPR**

A – wtSpCas9 нуклеаза / ортологи и мутанты Cas9; **B** – Spf1 (Cas12a) / Cas12b; **C** – C2c2 (Cas13a) / CasX (Cas12e); **D** – Custom PAM; **E** – нуклеазы / FokI-Cas9; **F** – нуклеаза-деаминаза; **G** – длина (прото)спейсера / длина seed последовательности; **H** – 5'-конец sgRNA / промотор для транскрипции *in vivo*; **I** – неспаривания; **J** – инделы в спейсерах и протоспейсерах; **K** – GC-состав протоспейсера; **L** – ввод ДНК через буфер обмена / в виде файла; **M** – ввод конкретных генов с помощью идентификатора (наименование гена, Accession number) / ввод ДНК с помощью геномных координат; **N** – множественные последовательности; **O** – ранжирование sgRNA; **P** – нецелевые сайты; **Q** – микромология; **R** – фланкирующие участки; **S** – сайты рестрикции; **T** – обе цели ДНК / область редактирования (экзон, интрон, межгенный участок); **U** – присутствие TTT(T); **V** – GC-состав протоспейсера / вторичная структура sgRNA (константной и вариабельной частей); **W** – олигонуклеотиды и праймеры для клонирования / ПЦР детекции; **X** – валидация sgRNA; **Y** – демоверсия (руководство); **Z** – автономное использование.

1. **AsCRISPR**; 2. **CHOPCHOP v.3**; 3. **CRISPR-PN**; 4. **DeepHF**; 5. **PAVOOC**; 6. **SNP-CRISPR**

A – wtSpCas9 nuclease/orthologues and Cas9 mutants; **B** – Spf1 (Cas12a) / Cas12b; **C** – C2c2 (Cas13a) / CasX (cas12e); **D** – Custom PAM; **E** – nickases / FokI-Cas9; **F** – nuclease-deaminase; **G** – (proto)spacer length / seed length; **H** – 5'-end of gRNA/*in vivo* transcription promoter *in vivo*; **I** – mismatches; **J** – indels in spacers and protospacers; **K** – GC-content in protospacers; **L** – input of DNA through the paste / as a file; **M** – input of individual genes using an identifier (gene name, Accession Number) / input of DNA using the genome coordinates; **N** – multiple sequences; **O** – ranking of sgRNA; **P** – off-target sites; **Q** – microhomology; **R** – flanking regions; **S** – restriction sites; **T** – both DNA strands / edited region (exon, intron, intergenus space); **U** – presence of the TTT(T) sequence; **V** – GC-content in protospacers / secondary gRNA structure (constant and variable parts); **W** – oligonucleotides and primers for cloning / PCR detection; **X** – sgRNA validation; **Y** – demo version (manual); **Z** – off-line.

Модификация РНК-компонента Cas нуклеаз, включая РНК-гиды

Модификации РНКового компонента Cas нуклеаз могут иметь разную природу, что в значительной степени зависит от способа генерации РНК-гидов. Исторически первым и до сих пор наиболее распространенным является ферментативный способ синтеза таких молекул РНК *in vivo* внутри живой клетки, в которую доставлены соответствующие компоненты в виде тех или иных конструкций. Другим ферментативным способом синтеза гидовых РНК служит транскрипция в системе *in vitro*, осуществляемая под действием определенных РНК полимераз, узнающих соответствующий промотор в генно-инженерной конструкции или в ампликоне. Данные способы генерации гидовых РНК позволяют лишь произвести простые модификации в виде некоторого укорочения этих молекул или их удлинения путем добавления экстра-нуклеотидов или экстра-последовательностей. Так, самой простой модификацией РНК-гидов можно считать укорочение направляющей части этой молекулы, спаривающейся с цепью ДНК, что, как было показано ранее, несколько повышает специфичность геномного редактирования, снижая число нецелевых мест связывания. Однако, если эти участки сделать слишком короткими, то эффективность редактирования резко снизится и даже исчезнет.

Гораздо больше возможностей модификации РНК-гидов предоставляет химический синтез этих молекул, в ходе которого можно внести различные изменения, как защищающие от ферментативной деградации внутри клетки за счет фосфотиоатных и прочих не природных связей, так и обеспечивающие более прочное взаимодействие с мишенью при использовании, например, так называемых LNA или BNA производных азотистых оснований. Более подробно останавливаться здесь на таких модификациях не имеет смысла, поскольку недавно опубликован весьма подробный обзор на эту тему новосибирских авторов [Filipova et al., 2019]. Стоит лишь акцентировать внимание, что особенностью Cas12a нуклеаз V-A типа является то, что им не требуется tracrRNA, из-за чего вся crRNA, включающая константную и переменную части, необходимая для образования функционально активного рибонуклеопротеидного комплекса, составляет от 42 до 56 нуклеотидов, против 100 с лишним нуклеотидов sgRNA для Cas9 нуклеаз. Недавно добавленные в инструментарий² геномного редактирования нуклеазы типа V-B (Cas12b) и V-E (CasX) как и Cas9 нуклеаза не обходятся без tracrRNA и, следовательно, общая длина молекул РНК для этих нуклеаз также составляет около 100 нуклеотидов. Это важно с той точки зрения, что химический синтез рибоолигонуклеотидов значительно дороже дезоксирибонуклеотидного. Да и различные модификации РНК-гидов еще больше увеличивают стоимость экспериментов. В то же время описаны

иные модификации РНК-гидов, напротив, снижающие стоимость химического синтеза таких молекул за счет их химерной природы в виде РНК и ДНК частей. Краткое упоминание о такой модификации [Kartje et al., 2018] имеется и в вышеупомянутом обзоре Филипповой и соавт. [Filipova et al., 2019], но в нем лишь приведена ссылка на одну работу, которая была не первой, и после нее вышло еще несколько подобных публикаций в связи с чем считаем, что этому вопросу стоит уделить чуть больше внимания.

Помимо меньшей стоимости синтеза замена РНК на ДНК там, где это возможно, выглядит привлекательно в силу большей стабильности ДНК, помимо меньшей стоимости синтеза. Собственно все отличия между РНК и ДНК заключаются в наличии у последней дополнительной метильной группы у тимина и отсутствии гидроксильной группы в 2'-положении углеводного компонента, что несколько меняет конформацию двухцепочечных структур, и это может быть критичным для тех нуклеотидов, которые непосредственно взаимодействуют с Cas-белком. Описываемые ниже результаты во многом опирались на кристаллические структуры Cas9 и SpF1 нуклеаз с РНК-компонентами и редактируемой ДНК, где были установлены гидроксильные группы отдельных азотистых оснований crRNA, взаимодействующих с белковыми последовательностями [Nishimasu et al., 2014; Yamano et al., 2016].

Итак, в литературе первое упоминание, что в РНК-гиды для Cas9 нуклеазы включены дезоксирибозные основания, датируется летом 2017 г. [Jakimo et al., 2017]. Причем авторами было синтезировано несколько вариантов такой гидовой РНК, где помимо ДНК в разных количествах присутствовали и иные модифицированные основания (в частности инвертированный dT) и даже все 20 нуклеотидов направляющей части были представлены в виде ДНК. При этом была отмечена повышенная специфичность РНК-гидов, содержащих ДНК в направляющей части, проявивших к тому же увеличенную чувствительность к отдельным неспариваниям нуклеотидов.

Но на самом деле на несколько месяцев раньше международная группа исследователей направила в редакцию журнала Nature Communications рукопись статьи, в которой впервые (что было подчеркнуто) была описана возможность замены в crRNA для Cas9 нуклеазы отдельных рибооснований на их дезоксирибозные аналоги, однако статья вышла в свет только в ноябре 2017 г. [Rueda et al., 2017]. В той работе было синтезировано полтора десятка вариантов crRNA длиной 42 нуклеотида, включая последовательность, полностью представляющую собой ДНК, которая, впрочем, показала отсутствие нуклеазной активности. Остальные варианты содержали от 4 до 7 рибонуклеотидов, в зависимости от их расположения демонстрирующие от 0 до 100% активности. Причем ряд вариантов показал активность, даже превышающую таковую для природной crRNA, полностью представленной в виде РНК. Были установлены наиболее критичные места расположения нуклеотидов (1, 15, 16, 19, 22 – 24 от 5'-конца crRNA), где необходимо присутствие

² по крайней мере, включенные в одной из компьютерных программ в перечень ферментов, для которых можно подбирать РНК-гиды.

гидроксильной группы у азотистых оснований, но самыми принципиальными можно считать таковые в положениях 16 и 24. Весьма важным было то, что активность Cas9 нуклеазы с химерными sgRNA была продемонстрирована как в системах *in vitro*, так и *in vivo*.

В работе других авторов [McMahon et al., 2018] были исследованы замены рибооснований на ДНК в sgRNA для SrfI нуклеазы, располагавшиеся преимущественно на 3'-конце (до 5 замен) при 2 – 3 в остальной части РНК-гида, тогда как часть sgRNA, взаимодействующая с белком, была представлена полностью в виде РНК. Полученные результаты показали успешное геномное редактирование для культуры клеток человека. Сразу для двух нуклеаз SrfI и Cas9 оценивали влияние замен рибооснований на ДНК, показавшее в целом для обоих ферментов снижение нецелевого редактирования в культуре клеток человека [Yin et al., 2017]. При этом было обнаружено, что замены 2, 4, 6, 8, 10 и 12 оснований с 5'-конца РНК-гида для Cas9 нуклеазы лишь незначительно снижали активность ферментного комплекса, тогда как дальнейшие замены, приходящиеся уже на seed участок, сразу же приводили к полной потере активности. Что касается SrfI нуклеазы, то для нее обнаружено, что при замене на ДНК первых 8 рибооснований в РНК-гида (из которых 5 – в seed участке) активность сохранялась, но стоило ввести одно неспаривание в 6-ом положении, то активность полностью пропадала. Нескольким удивительным было отсутствие активности при замене последних 4 нуклеотидов на 3'-конце РНК-гида на ДНК.

Было также проведено довольно большое исследование влияния участков из ДНК, локализованных в разных местах молекулы sgRNA, на ферментативную активность Cas9 нуклеазы [Kartje et al., 2018]. При этом авторы использовали не единую sgRNA, а два ее компонента – tracrRNA и crRNA, протяженностью для последней в 42 нуклеотида. Было синтезировано 27 разных вариантов, от природного – из одних рибооснований, до полностью представленного в виде ДНК, который, впрочем, не проявил ферментативной активности, тогда как большинство других вариантов показали нуклеазную активность, в отдельных случаях даже превышающую такую для природной молекулы, но какой-то четкой закономерности при этом не наблюдается. Анализ нуклеазной активности проводился *in vitro* на двух субстратах – линейаризованной плазмиде и 60-ти нуклеотидном дуплексе ДНК, показавших во всех случаях схожие результаты. Возможно стоит обратить внимание на два варианта, в которых наиболее критичные нуклеотиды (в положениях 15, 16, 19, 22 – 24) в одном случае были представлены рибооснованиями, а в другом – несущими дезоксирибозы, тогда как остальные 36 нуклеотидов этих вариантов sgRNA напротив представляли собой ДНК и РНК соответственно. Неожиданным, пожалуй, оказалось то, что когда эти критичные нуклеотиды были в виде ДНК, а остальная часть (из «некритичных» нуклеотидов) состояла из РНК, то нуклеазная активность этой конструкции была

заметно выше. Авторы также испытали химерные варианты с tracrRNA, причем, когда она даже полностью была представлена в виде ДНК (а crRNA из РНК), то такой рибонуклеопротеидный комплекс с Cas9 нуклеазой сохранил небольшую ферментативную активность.

В своей следующей работе эти авторы провели еще более масштабное исследование, в ходе которого анализировался вклад в ферментативную активность Cas9 нуклеазы не только замен в sgRNA на ДНК аналоги, но и на прочие модифицированные неприродные варианты углеводных компонентов азотистых оснований [O'Reilly et al. 2019]. Следует заметить, что в этой работе использовался несколько укороченный вариант sgRNA в связи с чем критичные для взаимодействия нуклеотиды несли чуть другую нумерацию. Полученные результаты свидетельствуют, что многочисленные модификации crRNA сохраняли нуклеазную активность *in vitro* и в отдельных случаях даже превышали такую для природной молекулы. При этом все же необходимо иметь в виду, что любые модификации crRNA, кроме внесения в нее оснований с дезоксирибозами, удорожают ее стоимость.

В одной из недавних работ был проведен анализ гидовой части crRNA для Cas9 нуклеазы, состоящей из 19 ДНК-нуклеотидов (из всего 20) с единичными заменами поочередно на рибооснования всех нуклеотидов [Kim et al., 2019]. То есть, последовательности РНК-гида имели вид – nNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN, NnNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN, ..., NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNn, где строчными буквами указаны рибооснования, а прописными – ДНК-участки. Полученные результаты свидетельствуют, что почти все варианты измененных РНК-гида с субстратом в виде линейаризованной плазмиды в системе *in vitro* сохраняли высокую ферментативную активность, а некоторые оставались практически на том же уровне, что и crRNA из одних рибооснований.

Доставка CRISPR/Cas-компонентов к местам редактирования геномов

Доставка CRISPR/Cas-компонентов в клетку является очень важным этапом геномного редактирования, а применительно к растениям способ доставки еще определяет и статус образующегося организма, имея в виду – станет ли он генно-модифицированным или его можно будет считать фактически обычным мутантом, на которые правила обращения с ГМО (генетически-модифицированный организм) не распространяются. В этой связи следует отметить недавний обзор, в котором значительное внимание уделено вопросам создания растений с отредактированным геномом, считающимися при этом нетрансгенными, и/или становящимися таковыми, в том числе благодаря последующей сегрегации признаков [Мирошниченко и др. (Miroshnichenko et al.), 2019]. Чуть позже нами опубликована схожая обзорная статья, посвященная способам доставки CRISPR/Cas-компонентов в растения [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2019], в которой также была затронута

взаимосвязь ГМО и отредактированных с помощью CRISPR/Cas-технологии растений, но главное внимание уделено практически всем существующим на момент написания подходам по доставке CRISPR/Cas-компонентов в растения. Однако за истекший период появился ряд новых методов доставки, на которые стоит обратить внимание.

Для того чтобы произошло редактирование генома в самом простом нокаутном варианте (КО) необходимо, чтобы в ядре клетки оказались соответствующая Cas нуклеаза и присущая ей sgPНК с подобранным PНК-гидом, нацеленным на место редактирования. Причем эти компоненты могут доставляться как в составе разных генно-инженерных конструкций, так и вместе, и от того будет ли происходить их встраивание в геном или же иметь место транзientная экспрессия зависит статус будущего растения (не принимая во внимание возможное последующее удаление трансгенов). Аналогичная ситуация со статусом образующихся растений складывается при редактировании азотистых оснований (BE), поскольку в ней не производится внедрения какого-либо специфичного фрагмента ДНК. При геномном редактировании, предполагающем некую вставку (КИ), дополнительно должна вноситься соответствующая ДНК, которая может быть как двух-, так и одноцепочечной или быть представлена коротким олигонуклеотидом. При КИ-редактировании неизбежно происходит внедрение в растение чужеродной ДНК со всеми вытекающими последствиями в виде необходимости соблюдения правил обращения с ГМО. Что касается нового варианта геномного редактирования – прайм-редактирования (PE), то в нем обязательно происходит внедрение короткого фрагмента ДНК, образуемого под действием обратной транскриптазы и посему такие растения (которых пока нет) будут трансгенными.

Наиболее часто для доставки применяется агробактериальная инфекция почвенными агробактериями *Agrobacterium tumefaciens* или значительно реже с помощью *A. rhizogenes*, вызывающей образование волосовидных корней (hair roots). В отдельных случаях применяется агроинfiltrация, в том числе с использованием в качестве промежуточных хозяев некоторых растительных вирусов. Другими способами доставки CRISPR/Cas-компонентов являются биобаллистика, электропорация и полиэтиленгликольная трансформация протопластов, которые в том числе применяются для доставки уже готового рибонуклеопротеидного комплекса, что позволяет создавать отредактированные, но нетрансгенные растения.

Новый способ доставки CRISPR/Cas-компонентов в растительную клетку с помощью вакуумной инфильтрации функционализированными частицами хитозана диаметром 0,6 – 0,8 мкм, несущими готовый рибонуклеопротеидный комплекс, был применен при бесплазмидном редактировании генома картофеля [Хромов и др. (Khromov et al.), 2018]. Вакуумную инфильтрацию апикальных меристем картофеля проводили в стерильных условиях в течение одной минуты при давлении около

90 кПа в камере обычно используемой для биобаллистической трансформации генной пушки Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad Laboratories, США) после чего проводили регенерацию растений.

Недавно сообщено о первом использовании липофекции для доставки рибонуклеопротеидного комплекса Cas9 в протопласты табака *Nicotiana tabacum* [Liu W. et al., 2019], тогда как ранее подобный метод с успехом применялся для животных клеток. Для оценки эффективности доставки в присутствии специальных реагентов Lipofectamine 3000 или RNAiMAX и последующего геномного редактирования авторы использовали трансгенную линию табака, несущую оранжевый флуоресцентный белок, нарушение работы которого было легко контролируемо. Было обнаружено, что в присутствии Lipofectamine 3000 эффективность редактирования в режиме КО составила 6%, что сопоставимо с редактированием геномов при других способах доставки в виде полиэтиленгликольной трансформации протопластов или бомбардировкой золотыми частицами, несущими рибонуклеопротеидный комплекс с Cas нуклеазой.

Подводя некоторый итог способам доставки CRISPR/Cas-компонентов в клетки растений, мы составили некие схемы, отражающие, в том числе генно-модифицированный или нетрансгенный статус создаваемых растений с отредактированными геномами (рис. 2 и 3). Ранее подобная схема была подготовлена нами для другой обзорной статьи [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2019], но с учетом новых методов, описанных выше, для данной статьи схема была дополнена и разделена на две части.

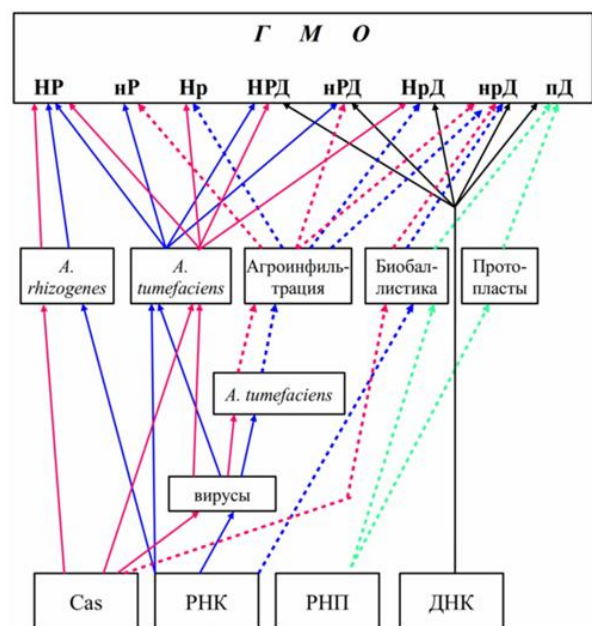


Рис. 2. Схема способов доставки CRISPR/Cas-компонентов для редактирования геномов растений в разных вариантах – КО, КИ, BE, а также PE (в перспективе), приводящих к образованию генно-модифицированных растений (пояснения в тексте)
 Fig. 2. Scheme of delivery methods for CRISPR/Cas components for editing plant genomes in different variants - KO, KI, BE, and PE (in the future), leading to the formation of genetically modified plants (explanations in the text)

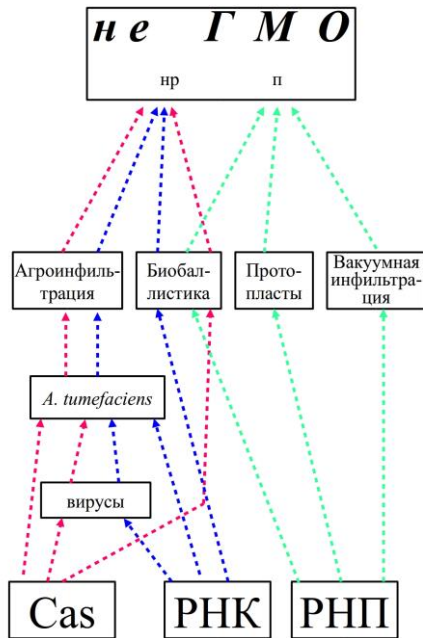


Рис. 3. Схема способов доставки CRISPR/Cas-компонентов для редактирования геномов растений в разных вариантах – КО, КИ, ВЕ, а также РЕ (в перспективе), приводящих к образованию нетрансгенных растений (пояснения в тексте)
 Fig. 3. Scheme of delivery methods for CRISPR/Cas components for editing plant genomes in different variants - KO, KI, VE, and PE (in the future), leading to the formation of non-transgenic plants (explanations in the text)

Под аббревиатурами «Cas» и «РНК» в рис. 2 и 3 понимаются компоненты CRISPR/Cas-редактирования в виде соответствующих генно-инженерных конструкций; «РНП» – представляет собой формируемый *in vitro* рибонуклеопротеидный комплекс; «ДНК» – любая донорная ДНК как в виде олигонуклеотидов, так и протяженных молекул в одно- или двухцепочечных формах, которая используется в КИ-вариантах. «Н» или «н» – подходящие Cas-нуклеазы, включая их разнообразные химерные формы; «Р» или «р» – sgРНК; «п» – РНП; «Д» – донорная ДНК. Заглавные буквы символизируют внедрение соответствующих компонентов в геном редактируемого растения. Строчные буквы обозначают транзитную экспрессию, не приводящую к встраиванию в геном чужеродной ДНК. Сплошными линиями показаны способы доставки CRISPR/Cas-компонентов, сопровождаемые интеграцией чужеродной ДНК. Прерывистыми линиями показаны способы, при которых происходит транзитная экспрессия отдельных CRISPR/Cas-компонентов или функционирует доставляемый рибонуклеопротеидный комплекс из Cas нуклеазы и sgРНК.

Таким образом, современные способы доставки CRISPR/Cas-компонентов позволяют создавать нетрансгенные растения с редактированными геномами, обозначаемые на схемах как «nr» и «п». Что касается получающихся трансгенных растений с редактированными геномами,

то для них существует множество вариантов – «НР», «НРД», «Нр», «НрД», «нР», «нРД», «нрД», «пД», причем таковые могут быть созданы с помощью разных способов.

Редактирование отдельных азотистых оснований и прайм-редактирование

Если КО- и КИ-варианты геномного редактирования предполагают обязательное возникновение двухцепочечных разрывов в определенном месте(ах) генома, то более новые варианты геномного редактирования в виде замен отдельных азотистых оснований (ВЕ) и прайм-редактирования (РЕ) обходятся без таких разрывов цепей ДНК и следовательно без процессов репарации, носящих до некоторой степени непредсказуемый характер. Таким образом, когда это возможно (исходя из последовательности ДНК), то то же нокаутное редактирование может производиться с помощью редактирования отдельных азотистых оснований путем транзаций С→Т и А→G, о чем уже говорилось выше. Процесс замены цитозина (С) на тимин получил сокращенное название СВЕ, тогда как по аналогии замена аденина (А) на гуанин стала носить название АВЕ. Редактирование азотистых оснований в молекулах РНК получило обозначение RBE, но о нем будет говориться ниже.

Редактированию отдельных азотистых оснований с помощью CRISPR/Cas-технологии посвящено уже довольно много обзоров [Eid et al., 2018; Molla, Yang, 2019; Yang et al., 2019; Mishra et al., 2020 и др.], включая вышедший на русском языке [Злобин и др. (Zlobin et al.), 2018] и посему здесь, не вдаваясь глубоко в детали процесса, коснемся лишь некоторых проблемных моментов и разработок последнего года.

Редактирование азотистых оснований с помощью CRISPR/Cas-технологии берет начало с 2016 г., когда на основе dCas9 и nCas9 нуклеаз были созданы несколько вариантов химерных ферментов, несущих на N-конце белка цитидиндеаминазу крысы gAPOBEC1, превращающей цитозин в урацил и затем при репликации в тимин, а на С-конце – ингибитор уридингликозилазы (UGI) для снижения репарирующей активности, удаляющей урацил из цепей ДНК [Komog et al., 2016]. Чуть позже на основе тех же dCas9 и nCas9 был сконструирован подобный химерный фермент, несущий на С-конце последовательности белка сразу два фермента – цитозиндеаминазу из миноги и UGI [Nishida et al., 2016]. Поскольку фермент, производящий дезаминирование аденина в цепи ДНК, известен не был, то для создания химерного фермента, превращающего аденин сначала в инозин и затем при репликации в гуанин прежде пришлось провести многоаундовую молекулярную эволюцию tРНК аденозиндеаминазы из *E. coli* (TadA), после чего были сконструированы несколько ферментных комплексов из nCas9 никазы и двух TadA белков, один из которых был исходным, а другой – модифицированным [Guadelli et al., 2017]. Впоследствии разными авторами было создано значительное количество подобных химерных ферментов для замен *in vivo* С→Т и А→G,

поскольку дезаминирование происходит в определенном «окне», находящемся на разном (для разных Cas ферментных комплексов) расстоянии от PAM-последовательности, которые тоже отличаются, чтобы у экспериментатора была возможность точного нацеливания соответствующей дезаминазы на нуклеотид, который требуется заменить. При этом известно, что окружающие такой нуклеотид последовательности могут довольно сильно, в том числе, негативно влиять на процесс дезаминирования. В 2019 г. было продолжено совершенствование процесса редактирования отдельных азотистых оснований в плане расширения спектра PAM-участков, более точного наведения в «окнах» на целевой нуклеотид и улучшения других аспектов [Cheng et al., 2019; Huang et al., 2019; Kleinstiver et al., 2019; Tan et al., 2019; Thuronyi et al., 2019; Zhang C. et al., 2019].

Редактирование молекул РНК (RBE) в виде замен отдельных оснований также имеет свое предназначение, поскольку позволяет влиять на процесс трансляции, не внося изменения в геном. С этой целью сначала был создан химерный фермент на основе неактивной dCas13 нуклеазы, мишенью для которой является РНК, и пришитой к ней аденозиндеаминазы ADAR2, превращающей аденин в инозин и далее в гуанин [Cox et al., 2017]. Этот процесс получил название REPAIR (RNA editing for programmable A to I replacement). Совсем недавно на основе той же dCas13 нуклеазы и адениндеазного домена ADAR2dd создан подобный химерный фермент, дезаминирующий цитозин в цепи РНК и превращающий его в урацил [Abudayyeh et al., 2019a]. Для этого авторам пришлось провести 16 раундов молекулярной эволюции по превращению аденозиндеаминазы в цитидиндеаминазу, хотя некоторая прежняя ферментативная активность все же сохранилась. Этот процесс получил название RESCUE (RNA editing for specific C to U Exchange).

Еще более новым вариантом геномного CRISPR/Cas-редактирования является предложенный совсем недавно Search-and-Replace метод, называемый также Prime editing [Anzalone et al., 2019], который на русском будет правильно называть – прайм-редактирование, поскольку, как известно, «прайм» – это приставка к какому-либо слову, не имеющая четкого определения, но фактически означающее нечто лучшее и к данному методу эта приставка вполне подходит. По крайней мере, в ряде случаев прайм-редактирование имеет определенное преимущество перед редактированием отдельных нуклеотидов, поскольку способно прицельно заменить сразу несколько нуклеотидов подряд или только один среди короткого блока, но это будет именно целевой нуклеотид, тогда как редактирование оснований (ABE или CBE) не всегда гарантирует в так называемом «окне» дезаминирование нужного нуклеотида, тем более, если в этом окне, как уже говорилось выше, находится гомополимерный участок. К тому же сейчас практически можно произвести замены только путем транзиций А→G и С→T, а прайм-редактирование позволяет осуществлять любые замены. Так как же работает этот метод?

Главным действующим «лицом» в прайм-редактировании служит химерная nCas9-никаза, сшитая с обратной транскриптазой M-MuLV или с ее мутантными формами, требующая также несколько видоизмененной sgPHK (pegRNA – prime editing guide) с экстрапоследовательностью, служащая матрицей при ее копировании обратной транскриптазой с образованного ника [Anzalone et al., 2019]. Таким образом, экстрапоследовательность заменяет собой в геноме ту, что нежелательна. Причем, авторы разработали сразу три варианта прайм-редактирования – PE1, PE2 и PE3. В рамках цитируемой работы было получено 19 мутантных форм обратной транскриптазы, из которых была выбрана несущая сразу 5 замен, с которой была создана PE2 система. Система PE3 производит ник на нередатируемой цепи с целью повышения эффективности прайм-редактирования. Несмотря на то, что прайм-редактирование произведено пока только с геномом человека в культуре клеток, нет никаких сомнений, что этот метод будет вскоре распространен и на другие объекты, включая растительные организмы.

Достижения и перспективы CRISPR/Cas-редактирования геномов растений

Достижениям и перспективам CRISPR/Cas-редактирования геномов растений только за последнее время посвящено множество обзоров [Manghwar et al., 2019; Satheesh et al., 2019; Schindele et al., 2019 Ahmad et. al., 2020]. Есть среди таковых и работы отечественных авторов, причем спектр рассматриваемых в них видов растений для редактирования геномов достаточно большой. В центре внимания оказывается и рис из семейства злаковых [Хлесткина (Khlestkina), 2019] и плодово-ягодные культуры [Тихонова, Хлесткина (Tikhonova, Khlestkina), 2019]. Ранее А.М.Коротковой и соавт. [Короткова и др. (Korotkova et al.), 2017] по состоянию на начало февраля 2017 г. был проведен детальный анализ экспериментов по редактированию геномов сельскохозяйственных растений, который затем был продолжен и на дату 17 августа 2018 г. составлен каталог по 50 генам с указанием функций их белковых продуктов, типов модификаций, методов доставки CRISPR/Cas-компонентов [Korotkova et al., 2019]. В чем-то схожая работа была проведена другой группой авторов, проанализировавших еще большее число публикаций по состоянию на конец 2018 г., охвативших, помимо CRISPR/Cas, и другие системы редактирования геномов растений в виде ZFN и TALEN [Мирошниченко и др. (Miroshnichenko et al.), 2019]. Вне всякого сомнения, CRISPR/Cas-редактирование геномов растений, в первую очередь имеющих сельскохозяйственное значение, с помощью всех вариантов этой технологии – KO, KI, BE продолжится. Также можно быть уверенными в том, что новое прайм-редактирование (PE) найдет применение для растительных организмов. Вероятно нокаутный подход с не всегда предсказуемыми последствиями будет понемногу заменяться вариантами, обходящимися без двухцепочечных разрывов – BE и PE. Интересно также отметить, что

на основе технологии CRISPR/Cas-редактирования геномов растений уже стали ставиться задачи решения сложнейших проблем апомиксиса [Xie et al., 2019], а также гетерозиса [Okada et al., 2019] и можно надеяться, если не на их скорое решение, то, по крайней мере, определенное продвижение в нужном направлении. Можно даже встретить высказывание, что направленная молекулярная эволюция на уровне ДНК (за которую недавно присудили Нобелевскую премию) вкупе с CRISPR/Cas технологией приведет к новой «зеленой» революции [Gionfriddo et al., 2019].

Использование CRISPR/Cas-систем не для целей редактирования геномов

Ранее нами был опубликован обзор [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2017], в котором были рассмотрены связанные с CRISPR/Cas-локусами иные исследования нуклеиновых кислот, среди которых определенное внимание было уделено такому методу как *spoligotyping*, используемому для идентификации возбудителей опасных болезней, в первую очередь туберкулеза, а также методам высокочувствительной детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот. Надо сказать, что сполиготипирование изолятов туберкулезной палочки в разных странах продолжается. Так, например, в одной из недавних статей после проведенного сполиготипирования отмечается, что циркулирующие штаммы в Индии недостаточно представлены в соответствующей глобальной базе данных [Poonawala et al., 2019]. Кроме генотипирования с помощью CRISPR/Cas-локусов туберкулезной палочки *Mycobacterium tuberculosis*, такой подход применяется и для штаммов бактерии *Salmonella enterica*, несущей в своем геноме два отличающихся локуса CRISPR-эреев, благодаря чему комбинации спейсеров в них являются сероспецифичными, на основе чего предложен метод, получивший название CRISPR-SeroSeq [Thompson et al., 2018].

Но гораздо больший интерес и огромные перспективы представляет использование Cas нуклеаз для различных методов детекции и диагностики, как с помощью этапов амплификации, так и без оных, что требует более внимательного рассмотрения этой стороны применения CRISPR/Cas-систем, воспринимаемой даже как новое поколение биосенсоров [Li Y. et al., 2019]. Поскольку это направление использования CRISPR/Cas-систем само по себе настолько многообразно, что заслуживает написания отдельной обзорной статьи, то здесь мы ограничимся лишь кратким перечислением разработанных методов и подходов, уделив чуть больше внимания только некоторым.

Пожалуй, первым из этой группы методов оказался высокочувствительный способ детекции специфичных последовательностей нуклеиновых кислот, получивший броское название SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) [Gootenberg et al., 2017]. В нем для детекции нарабатываемых ампликонов нашла применение нуклеаза Cas13a, мишенями для которой служат молекулы РНК. Позже был разработан новый вариант этого метода SHERLOCKv2 [Gootenberg et al.,

2018]. В частности, с помощью этого метода было оценено количественное содержание транскриптов гена устойчивости к глифосату у трансгенной сои [Abudayyeh et al., 2019].

На основе другой нуклеазы Cas12a, расщепляющей ДНК, предложен метод HOLMES (one-Hour Low-Cost Multipurpose Highly Efficient System) [Li L. et al., 2018], а затем и HOLMESv2 [Li L. et al., 2019], позволяющий в том числе дискриминировать однонуклеотидные замены или снипы. Поскольку снипы в связи с ДНК-идентификацией личности представляют для нас особый интерес [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2018a], что нашло отражение и в данном номере журнала [Анисимов и др. (Anisimov et al.), 2019], то уделим этому вопросу чуть больше внимания. Так, продемонстрирован высокочувствительный способ детекции снипов с помощью той же Cas12a нуклеазы и микрофлюидики [Shao et al., 2019]. Ранее на основе Cas9 нуклеазы был разработан метод CasPLA (CRISPR/Cas9-mediated Proximity Ligation Assay) [Zhang K. et al., 2018]. С помощью метода, названного DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter), с использованием Cas12a нуклеазы была достигнута аттомолярная чувствительность ДНК-мишеней [Chen et al., 2018]. После того как была обнаружена Cas14 нуклеаза на ее основе был разработан метод Cas14-DETECTR, также позволивший с высокой эффективностью выявлять снипы [Harrington et al., 2018]. О субаттомолярной чувствительности детекции снипов сообщают другие авторы, разработавшие метод CDetection [Teng et al., 2019].

Недавно сообщено об использовании CRISPR/Cas-систем для обогащения с целью последующего мономолекулярного нанопорового секвенирования (без амплификации) участков генома с экспансией коротких tandemных повторов, в том числе вызывающих ряд генетических заболеваний, и определения их метилированного статуса [Giesselmann et al., 2019]. Для этого был разработан специальный алгоритм, получивший название STRique (Short Tandem Repeat identification, quantification and evaluation), который находится по адресу <https://github.com/giesselmann/STRique>.

Визуальная детекция специфичных фрагментов ДНК с помощью Cas12a нуклеазы несколько отличающимися способами была продемонстрирована разными авторами [Hu et al., 2019; Li Y. et al., 2019a; Wang B. et al., 2019]. С использованием Cas12a нуклеазы продемонстрирована возможность проведения так называемых анализов «по месту лечения» (Point-of-Care Diagnostics) [Xiong et al., 2020]. Разработан оригинальный метод CRISDA (CRISPR/Cas9 Strand Displacement Amplification) [Zhou et al., 2019]. В качестве ДНК полимеразы с цепь-сдвигающей активностью использовался Кленовский фрагмент ДНК полимеразы I *E.coli*. Объединение полевого транзистора из графена с Cas9 нуклеазой позволило детектировать целевые гены, не прибегая к их амплификации [Hajian et al., 2019].

Последняя статья этого номера журнала [Сахабудинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2019]

посвящена некоторым вопросам небиологического применения молекул ДНК, в частности долговременному хранению в ДНК всевозможной информации, а также скрытой передачи данных путем криптографии и стеганографии. CRISPR/Cas-системы нашли применение и для этих целей. Так, в одной работе сообщается о методе CADS (Cas12-assisted DNA Steganography), с помощью которого в ложном праймере для амплификации удаляется участок на 3'-конце, после чего образующийся праймер становится истинным (специфичным), позволяющим амплифицировать нужную ДНК [Li S.Y. et al., 2018]. В результате таких манипуляций была прочитана закодированная в ДНК в «секретном» послании информация – «SHIYAN LI LOVES SCIENCE AND ART».

Заключение

Прежде чем перейти фактически к самому заключению по данной статье считаем необходимым отметить, что на упоминаемом в начале данной статьи также весьма важном этапе анализа результатов геномного редактирования после завершения такового мы останавливаться не стали, поскольку он недавно довольно подробно описан в одном из отечественных обзоров [Ломов и др. (Lomov et al.), 2019].

Поскольку целью данной статьи было рассмотрение различных методологических новшеств, связанных с CRISPR/Cas-системами, то превалирование среди цитированной литературы ссылок на публикации последних двух лет (а также небольшого числа тех, чей выход намечается в 2020 году), приблизившееся к почти 90% от общего их числа, не должно быть удивительным. При этом литература предыдущих лет представлена преимущественно пионерными работами.

Учитывая огромное биоразнообразие микроорганизмов, в том числе неподдающихся культивированию, можно не сомневаться в том, что будут продолжаться выявляться все новые типы Cas нуклеаз. Доказательством чему служат найденные совсем недавно при анализе метагеномных данных Cas14 нуклеазы. И после того, как подобные новые ферментные комплексы будут обнаружены (и/или созданы), они могут дать в руки исследователям совсем неожиданные возможности. Что касается уже известных, в том числе недавно разработанных методов, то, вне всякого сомнения, что то же прайм-редактирование будет активно развиваться и вместо обратной транскриптазы может оказаться более пригодной какая-либо ДНК полимеразы при условии использования химерной sgРНК, часть которой (как раз та, что должна служить матрицей при ее копировании с образующегося ника для замены нежелательного участка), будет представлена дезоксирибонуклеотидами, поскольку, как уже отмечалось выше, такое вполне возможно.

Приведенное в начале статьи сравнение CRISPR/Cas-систем и всевозможных технологий на их основе с целым Миром или со Вселенной могло показаться кому-то преувеличением. Вполне вероятно, что сейчас после прочтения описываемых в данной статье лишь небольшой части возможностей,

предоставляемых этими уникальными локусами микроорганизмов экспериментаторам, это мнение станет другим.

Интерес к данной работе вызван грантами РФФИ (№№ 18-04-00118 А, 18-29-14076-МК, 19-016-00117 А, 19-016-00139 А, 20-07-00222-А), а также выполняемыми Госзаданиями по темам №№ АААА-А16-116020350028-4, АААА-А19-119021190011-0.

Литература

1. Анисимов В.А., Гарафутдинов Р.Р., Сагитов А.М., Сахабутдинова А.Р., Хуснутдинова Э.К., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. ДНК-криминалистика – зарождение, современность и перспективы // Биомика. 2019. Т.11(3). С. 282-314. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-26
2. 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. 2017. Т.9. С.229-244.
3. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никонов Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора // Биомика. 2019. Т.11(1). С. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
4. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Дизайн РНК-гидов для CRISPR/CAS редактирования геномов растений // Молекулярная биология. 2020. Т.54(1). С. 29-50. DOI: 10.1134/S0026898420010061
5. Злобин Н.Е., Лебедева М.В., Таранов В.В., Харченко П.Н., Бабаков А.В. Редактирование генома растений путем направленной замены азотистых оснований (Обзор). // Биотехнология. 2018. Т.34(6). С. 59-68.
6. 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. doi: 10.18699/VJ17.244
7. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Геращенко Г.А., Никонов Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Применение CRISPR-локусов не для редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.271-283.
8. 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., Никонов Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017а. Т.9. С.155-182.
9. Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х.,

- Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Доставка CRISPR/CAS-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов. // *Физиология растений*. 2019. Т.66(5). С.339-353. DOI: 10.1134/S0015330319050117
10. Ломов Н. А., Вьюшков В.С., Петренко А.П., Сыркин М.С., Рубцов М.А. Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании. // *Молекулярная биология*. 2019. Т.53(6). С. 982-997. doi: 10.1134/S0026898419060119
11. Мирошниченко Д.Н., Шульга О.А., Тимербаев В.Р., Долгов С.В. Достижения, проблемы и перспективы получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом. // *Биотехнология*. 2019. Т.35(1). С. 3-26. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26
12. Сахабутдинова А.Р., Михайленко К.И., Гарафутдинов Р.Р., Кирьянова О.Ю., Сагитова М.А., Сагитов А.М., Чемерис А.В. Небиологическое применение молекул ДНК // *Биомика*. 2019. Т.11(3). С. 344-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-28
13. Тихонова Н.Г., Хлесткина Е.К. Генетическое редактирование для улучшения плодовых и ягодных культур. // *Садоводство и виноградарство*. 2019. №4. С. 10-15. DOI: 10.31676/0235-2591-2019-4-10-15
14. Хлесткина Е.К. Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR. // *Биотехнология и селекция растений*. 2019. Т.2(1). С. 49-54. doi: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54
15. Хромов А.В., Махотенко А.В., Снигирь Е.В., Макарова С.С., Макаров В.В., Супурнова Т.П., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum*. // *Биотехнология*. 2018. Т. 34(6). 51-58. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-51-58
16. Чемерис А.В. CRISPR/Cas системы (специальный тематический выпуск журнала) // *Биомика*. 2017. Т.9(3). С. 148-154.
17. Чемерис А.В., Рожнова Н.А., Геращенко Г.А. Некоторые недавние улучшения методов геномного редактирования // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. №3(5). С. 86–93.
18. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) // *Биомика*. 2016. Т. 8. № 3. С. 215-238.
19. 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.
20. Чемерис Д.А., Сагитов А.М., Аминев Ф.Г., Луценко В.И., Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Василев Р.Г., Алексеев Я.И., Сломинский П.А., Хуснутдинова Э.К., Чемерис А.В. Эволюция подходов к ДНК-идентификации личности // *Биомика*. 2018. Т.10(1). С.85-140. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-16
21. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, Koob J, Kellner MJ, Ladha A, Joung J, Kirchgatterer P, Cox DBT, Zhang F. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. // *Science*. 2019. V.365(6451). P.382-386. doi: 10.1126/science.aax7063
22. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Kellner MJ, Zhang F. Nucleic Acid Detection of Plant Genes Using CRISPR-Cas13. // *CRISPR J*. 2019a. V.2. P.165-171. doi: 10.1089/crispr.2019.0011
23. Ahmad N, Rahman MU, Mukhtar Z, Zafar Y, Zhang B. A critical look on CRISPR-based genome editing in plants. // *J Cell Physiol*. 2020. V.235(2). P.666-682. doi: 10.1002/jcp.29052
24. Alkhnbashi OS, Meier T, Mitrofanov A, Backofen R, Voß B. CRISPR-Cas bioinformatics. // *Methods*. 2019. pii: S1046-2023(18)30471-7. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.07.013
25. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. // *Nature*. 2019. V.576(7785).P.149-157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4
26. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. // *Nature*. 2013. V.493(7432). P.429-432. doi: 10.1038/nature11723
27. Bradford J, Perrin D. A benchmark of computational CRISPR-Cas9 guide design methods. // *PLoS Comput Biol*. 2019. V.15(8):e1007274. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007274
28. Bubeck F, Hoffmann MD, Hartevelde Z, Aschenbrenner S, Bietz A, Waldhauer MC, Börner K, Fakhiri J, Schmelas C, Dietz L, Grimm D, Correia BE, Eils R, Niopek D. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9. // *Nat Methods*. 2018. V.15(11). P.924-927. doi: 10.1038/s41592-018-0178-9
29. Cancellieri S, Canver MC, Bombieri N, Giugno R, Pinello L. CRISPRitz: rapid, high-throughput, and variant-aware in silico off-target site identification for CRISPR genome editing. // *Bioinformatics*. 2019. pii: btz867. doi: 10.1093/bioinformatics/btz867
30. Chen CL, Rodiger J, Chung V, Viswanatha R, Mohr SE, Hu Y, Perrimon N. SNP-CRISPR: A Web Tool for SNP-Specific Genome Editing. // *G3 (Bethesda)*. 2019. pii: g3.400904.2019. doi: 10.1534/g3.119.400904
31. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. // *Science*. 2018. V.360(6387). P.436-439. doi: 10.1126/science.aar6245
32. Chen S, Chen Y, Sun F, Waterman MS, Zhang X. A new statistic for efficient detection of repetitive sequences. // *Bioinformatics*. 2019. V.35(22). P.4596-4606. doi: 10.1093/bioinformatics/btz262
33. Chen W, Zhang H, Zhang Y, Wang Y, Gan J, Ji Q. Molecular basis for the PAM expansion and fidelity enhancement of an evolved Cas9 nuclease. *PLoS Biol*. 2019. V.17(10):e3000496. doi: 10.1371/journal.pbio.3000496
34. Cheng TL, Li S, Yuan B, Wang X, Zhou W, Qiu Z. Expanding C-T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. // *Nat Commun*. 2019. V. 10(1):3612. doi: 10.1038/s41467-019-11562-6

35. Chuai G.H., Wang Q.L., Liu Q. *In silico* meets *in vivo*: Towards computational CRISPR-based sgRNA design // *Trends Biotechnol.* 2017. V.35. P.12-21. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.06.008
36. Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B, Rocha EPC, Vergnaud G, Gautheret D, Pourcel C. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V.46(W1):W246-W251. doi: 10.1093/nar/gky425
37. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13. // *Science.* 2017. V.358(6366). P.1019-1027. doi: 10.1126/science.aag0180
38. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools // *Interdiscip. Sci.* 2018. V.10(2). P.455-465. doi: 10.1007/s12539-018-0298-z
39. Demirci Y., Zhang B., Unver T. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing // *J. Cell Physiol.* 2018. V.233(3). P.1844-1859. doi: 10.1002/jcp.25970
40. Dion MB, Labrie SJ, Shah SA, Moineau S. CRISPRStudio: A User-Friendly Software for Rapid CRISPR Array Visualization. // *Viruses.* 2018. V.10(11). pii: E602. doi: 10.3390/v10110602
41. Dong C, Zeng Z, Pu DK, Wen QF, Liu S, Du MZ, Sun Y, Gao YZ, Rao N, Huang J, Guo FB. CasLocusAnno: a web-based server for annotating cas loci and their corresponding (sub)types. // *FEBS Lett.* 2019. V.593(18). P.2646-2654. doi: 10.1002/1873-3468.13519
42. Eid A, Alshareef S, Mahfouz MM. CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. // *Biochem J.* 2018. V.475(11). P.1955-1964. doi: 10.1042/BCJ20170793
43. Filippova J, Matveeva A, Zhuravlev E, Stepanov G. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems // *Biochimie.* 2019. V.167. P.49-60. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.003
44. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. // *Nature.* 2017. V.551(7681). P.464-471. doi: 10.1038/nature24644
45. Giesselmann P, Brändl B, Raimondeau E, Bowen R, Rohrandt C, Tandon R, Kretzmer H, Assum G, Galonska C, Siebert R, Ammerpohl O, Heron A, Schneider SA, Ladewig J, Koch P, Schuldt BM, Graham JE, Meissner A, Müller FJ. Analysis of short tandem repeat expansions and their methylation state with nanopore sequencing. // *Nat Biotechnol.* 2019. V.37(12). P.1478-1481. doi: 10.1038/s41587-019-0293-x
46. Gionfriddo M, De Gara L, Loreto F. Directed Evolution of Plant Processes: Towards a Green (r)Evolution? // *Trends Plant Sci.* 2019. V.24(11). P.999-1007. doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.004
47. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. // *Science.* 2018. V.360(6387). P.439-444. doi: 10.1126/science.aag0179
48. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A., Myhrvold C., Bhattacharyya R.P., Livny J., Regev A., Koonin E.V., Hung D.T., Sabeti P.C., Collins J.J., Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science.* 2017. V. 356. P. 438-442. doi: 10.1126/science.aam9321
49. Hajian R, Balderston S, Tran T, deBoer T, Etienne J, Sandhu M, Wauford NA, Chung JY, Nokes J, Athaiya M, Paredes J, Peytavi R, Goldsmith B, Murthy N, Conboy IM, Aran K. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. // *Nat Biomed Eng.* 2019. V.3(6). P.427-437. doi: 10.1038/s41551-019-0371-x
50. Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, Cofsky JC, Kyrpidis NC, Banfield JF, Doudna JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. // *Science.* 2018. V.362(6416). P.839-842. doi: 10.1126/science.aav4294
51. Hu J, Jiang M, Liu R, Lv Y. Label-Free CRISPR/Cas9 Assay for Site-Specific Nucleic Acid Detection. // *Anal Chem.* 2019. V.91(16). P.10870-10878. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02641
52. Huang TP, Zhao KT, Miller SM, Gaudelli NM, Oakes BL, Fellmann C, Savage DF, Liu DR. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. // *Nat Biotechnol.* 2019. V.37(6). P.626-631. doi: 10.1038/s41587-019-0134-y
53. Hwang S, Maxwell KL. Meet the Anti-CRISPRs: Widespread Protein Inhibitors of CRISPR-Cas Systems. // *CRISPR J.* 2019. V.2(1). P.23-30. doi: 10.1089/crispr.2018.0052
54. Jakimo N, Chatterjee P, Jacobson JM. Chimeric CRISPR guides enhance Cas9 target specificity. // *bioRxiv.* June 08, 2017. doi: 10.1101/147686
55. Jacquin ALS, Odom DT, Lukk M. Crisflash: open-source software to generate CRISPR guide RNAs against genomes annotated with individual variation. // *Bioinformatics.* 2019. V.35(17). P.3146-3147. doi: 10.1093/bioinformatics/btz019
56. Kartje ZJ, Barkau CL, Rohilla KJ, Ageely EA, Gagnon KT. Chimeric Guides Probe and Enhance Cas9 Biochemical Activity. // *Biochemistry.* 2018. V.57(21). P.3027-3031. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00107
57. Keough KC, Lyalina S, Olvera MP, Whalen S, Conklin BR, Pollard KS. AlleleAnalyzer: a tool for personalized and allele-specific sgRNA design. // *Genome Biol.* 2019. V.20(1):167. doi: 10.1186/s13059-019-1783-3
58. Kim HY, Kang SJ, Jeon Y, An J, Park J, Lee HJ, Jang JE, Ahn J, Bang D, Chung HS, Jeong C, Ahn DR. Chimeric crRNAs with 19 DNA residues in the guide region show the retained DNA cleavage activity of Cas9 with potential to improve the specificity. // *Chem Commun (Camb).* 2019. V.55(24). P.3552-3555. doi: 10.1039/c8cc08468h
59. Kleinstiver BP, Sousa AA, Walton RT, Tak YE, Hsu JY, Clement K, Welch MM, Horng JE, Malagon-Lopez J, Scarfò I, Maus MV, Pinello L, Aryee MJ, Joung JK. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. // *Nat Biotechnol.* 2019. V.37(3). P.276-282. doi: 10.1038/s41587-018-0011-0

60. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. // *Nature*. 2016. V.533(7603). P.420-424. doi: 10.1038/nature17946
61. Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 23(1). С. 29-37. doi: 10.18699/VJ19.458
62. Kuno A, Mizuno S, Takahashi S. KOnezumi: a web application for automating gene disruption strategies to generate knockout mice. // *Bioinformatics*. 2019. V.35(18):3479-3481. doi: 10.1093/bioinformatics/btz090
63. Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. // *Nucleic Acids Res*. 2019. V.47(W1). P.W171-W174. doi: 10.1093/nar/gkz365
64. Li L, Li S, Wu N, Wu J, Wang G, Zhao G, Wang J. HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation. // *ACS Synth Biol*. 2019. 8(10). P.2228-2237. doi: 10.1021/acssynbio.9b00209
65. Li SY, Cheng QX, Wang JM, Li XY, Zhang ZL, Gao S, Cao RB, Zhao GP, Wang J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. // *Cell Discov*. 2018. V.4:20. doi: 10.1038/s41421-018-0028-z
66. Li SY, Liu JK, Zhao GP, Wang J. CADS: CRISPR/Cas12a-Assisted DNA Steganography for Securing the Storage and Transfer of DNA-Encoded Information. // *ACS Synth Biol*. 2018a V.7(4). P.1174-1178. doi: 10.1021/acssynbio.8b00074
67. Li T, Wang S, Luo F, Wu FX, Wang J. MultiGuideScan: a multi-processing tool for designing CRISPR guide RNA libraries. // *Bioinformatics*. 2019. pii: btz616. doi: 10.1093/bioinformatics/btz616
68. Li X, Wang Y, Liu Y, Yang B, Wang X, Wei J, Lu Z, Zhang Y, Wu J, Huang X, Yang L, Chen J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. // *Nat Biotechnol*. 2018. V.36(4). P.324-327. doi: 10.1038/nbt.4102
69. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing // *Trends Biotechnol*. 2019. V.37(7). P.730-743. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.12.005
70. Li Y, Mansour H, Wang T, Poojari S, Li F. Naked-Eye Detection of Grapevine Red-Blotch Viral Infection Using a Plasmonic CRISPR Cas12a Assay. // *Anal Chem*. 2019a. V.91(18). P.11510-11513. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03545
71. Liu G, Zhang Y, Zhang T. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. // *Comput Struct Biotechnol J*. 2019. V.18. P.35-44. doi: 10.1016/j.csbj.2019.11.006
72. Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, Ma E, Spinner HB, Baney KLM, Chuck J, Tan D, Knott GJ, Harrington LB, Al-Shayeb B, Wagner A, Brötzmann J, Staahl BT, Taylor KL, Desmarais J, Nogales E, Doudna JA. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. // *Nature*. 2019. V.566(7743). P.218-223. doi: 10.1038/s41586-019-0908-x
73. Liu RM, Liang LL, Freed E, Chang H, Oh E, Liu ZY, Garst A, Eckert CA, Gill RT. Synthetic chimeric nucleases function for efficient genome editing. // *Nat Commun*. 2019. V.10(1):5524. doi: 10.1038/s41467-019-13500-y
74. Liu Q, Zhang H, Huang X. Anti-CRISPR proteins targeting the CRISPR-Cas system enrich the toolkit for genetic engineering. // *FEBS J*. 2019. doi: 10.1111/febs.15139
75. Liu W, Rudis MR, Cheplick MH, Millwood RJ, Yang JP, Ondzighi-Assoume CA, Montgomery GA, Burris KP, Mazarei M, Chesnut JD, Stewart CN Jr. Lipofection-mediated genome editing using DNA-free delivery of the Cas9/gRNA ribonucleoprotein into plant cells. // *Plant Cell Rep*. 2019. doi: 10.1007/s00299-019-02488-w
76. Lopatina A, Medvedeva S, Artamonova D, Kolesnik M, Sitnik V, Ispolatov Y, Severinov K. Natural diversity of CRISPR spacers of *Thermus*: evidence of local spacer acquisition and global spacer exchange. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2019. V.374(1772):20180092. doi: 10.1098/rstb.2018.0092
77. Luo J, Chen W, Xue L, Tang B. Prediction of activity and specificity of CRISPR-Cpf1 using convolutional deep learning neural networks. // *BMC Bioinformatics*. 2019. V.20(1):332. doi: 10.1186/s12859-019-2939-6
78. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnyš V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. // *Nat Rev Microbiol*. 2019. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
79. Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, Jin S. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. // *Trends Plant Sci*. 2019. V.24(12). P.1102-1125. doi: 10.1016/j.tplants.2019.09.006
80. Mathema VB, Dondorp AM, Imwong M. OSTRFPD: Multifunctional Tool for Genome-Wide Short Tandem Repeat Analysis for DNA, Transcripts, and Amino Acid Sequences with Integrated Primer Designer. // *Evol Bioinform Online*. 2019. V.15:1176934319843130. doi: 10.1177/1176934319843130
81. Maxwell KL. The Anti-CRISPR Story: A Battle for Survival. // *Mol Cell*. 2017. V.68(1). P.8-14. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.002
82. Mayo-Muñoz D, He F, Jørgensen JB, Madsen PK, Bhoobalan-Chitty Y, Peng X. Anti-CRISPR-Based and CRISPR-Based Genome Editing of *Sulfolobus islandicus* Rod-Shaped Virus 2. // *Viruses*. 2018. V.10(12). pii: E695. doi: 10.3390/v10120695
83. McKenzie RE, Almendros C, Vink JNA, Brouns SJJ. Using CAPTURE to detect spacer acquisition in native CRISPR arrays. // *Nat Protoc*. 2019. V.14(3). P.976-990. doi: 10.1038/s41596-018-0123-5
84. McMahon MA, Prakash TP, Cleveland DW, Bennett CF, Rahdar M. Chemically Modified Cpf1-CRISPR RNAs Mediate Efficient Genome Editing in Mammalian Cells. // *Mol Ther*. 2018. V.26(5). P.1228-1240. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.02.031
85. Milicevic O, Repac J, Bozic B, Djordjevic M, Djordjevic M. A Simple Criterion for Inferring CRISPR

- Array Direction. // *Front Microbiol.* 2019. V.10:2054. doi: 10.3389/fmicb.2019.02054
86. Mishra R, Joshi RK, Zhao K. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. // *Plant Biotechnol J.* 2020. V.18(1). P.20-31. doi: 10.1111/pbi.13225
87. Molla KA, Yang Y. CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. // *Trends Biotechnol.* 2019. V.37(10). P.1121-1142. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008
88. Mori H, Evans-Yamamoto D, Ishiguro S, Tomita M, Yachie N. Fast and global detection of periodic sequence repeats in large genomic resources. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V.47(2):e8. doi: 10.1093/nar/gky890
89. Nethery MA, Barrangou R. CRISPR Visualizer: rapid identification and visualization of CRISPR loci via an automated high-throughput processing pipeline. // *RNA Biol.* 2019. V.16(4). P.577-584. doi: 10.1080/15476286.2018.1493332
90. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. // *Science.* 2016. V.353(6305). pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729
91. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. // *Cell.* 2014. V.156(5). P.935-949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
92. O'Halloran DM. Genome aware CRISPR gRNA target prediction for parasitic nematodes. // *Mol Biochem Parasitol.* 2019. V.227. P.25-28. doi: 10.1016/j.molbiopara.2018.12.001
93. O'Reilly D, Kartje ZJ, Ageely EA, Malek-Adamian E, Habibian M, Schofield A, Barkau CL, Rohilla KJ, DeRossett LB, Weigle AT, Damha MJ, Gagnon KT. Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure-activity relationships for Cas9 biochemical activity. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V.47(2). P.546-558. doi: 10.1093/nar/gky1214
94. Okada A, Arndell T, Borisjuk N, Sharma N, Watson-Haigh NS, Tucker EJ, Baumann U, Langridge P, Whitford R. CRISPR/Cas9-mediated knockout of Ms1 enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. // *Plant Biotechnol J.* 2019. V.17(10). P.1905-1913. doi: 10.1111/pbi.13106
95. Olson D, Wheeler T. ULTRA: A Model Based Tool to Detect Tandem Repeats. // *ACM BCB.* 2018. 2018. P.37-46. doi: 10.1145/3233547.3233604
96. Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. // *Nat Rev Microbiol.* 2018. V.16(1). P.12-17. doi: 10.1038/nrmicro.2017.120
97. Periwat V. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases. // *Brief Bioinform.* 2017. V. 18. P. 698-711. doi: 10.1093/bib/bbw052
98. Poonawala H, Kumar N, Peacock SJ. A review of published spoligotype data indicates the diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from India is under-represented in global databases. // *Infect Genet Evol.* 2019. V.78:104072. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104072
99. Pourcel C, Touchon M, Villeriot N, Vernadet JP, Couvin D, Toffano-Nioche C, Vergnaud G. CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers. // *Nucleic Acids Res.* 2020. V.48(D1):D535-D544. doi: 10.1093/nar/gkz915
100. Rabinowitz R., Darnell R., Offen D. CrisPam – a tool for designing gRNA sequences to specifically target a variant allele using CRISPR. // *Cytotherapy.* 2019. V.21(5), Suppl. P.e6-e7. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.04.021
101. Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM, Hameed MK, Khan MS, Joyia FA. Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. // *Int J Mol Sci.* 2019. V.20(16). pii: E4045. doi: 10.3390/ijms20164045
102. Roberson EDO. Motif scraper: a cross-platform, open-source tool for identifying degenerate nucleotide motif matches in FASTA files. // *Bioinformatics.* 2018. V.34(22). P.3926-3928. doi: 10.1093/bioinformatics/bty437
103. Rueda FO, Bista M, Newton MD, Goepfert AU, Cuomo ME, Gordon E, Kröner F, Read JA, Wrigley JD, Rueda D, Taylor BJM. Mapping the sugar dependency for rational generation of a DNA-RNA hybrid-guided Cas9 endonuclease. // *Nat Commun.* 2017. V.8(1):1610. doi: 10.1038/s41467-017-01732-9
104. Safari F, Zare K, Negahdaripour M, Barekati-Mowahed M, Ghasemi Y. CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. // *Cell Biosci.* 2019. V.9:36. doi: 10.1186/s13578-019-0298-7
105. Satheesh V, Zhang H, Wang X, Lei M. Precise editing of plant genomes - Prospects and challenges. // *Semin Cell Dev Biol.* 2019. V.96. P.115-123. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.04.010
106. Schaefer M, Clevert DA, Weiss B, Steffen A. PAVOOC: designing CRISPR sgRNAs using 3D protein structures and functional domain annotations. // *Bioinformatics.* 2019. V.35(13). P.2309-2310. doi: 10.1093/bioinformatics/bty935
107. Schindele A, Dorn A, Puchta H. CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. // *Curr Opin Biotechnol.* 2019. V.61. P.7-14. doi: 10.1016/j.copbio.2019.08.006
108. Shao N, Han X, Song Y, Zhang P, Qin L. CRISPR-Cas12a Coupled with Platinum Nanoreporter for Visual Quantification of SNVs on a Volumetric Bar-Chart Chip. // *Anal Chem.* 2019. V.91(19). P.12384-12391. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02925
109. Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV, Koonin EV. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018. V.115(23). E5307-E5316. doi: 10.1073/pnas.1803440115
110. Stanley SY, Maxwell KL. Phage-Encoded Anti-CRISPR Defenses. // *Annu Rev Genet.* 2018. V.52. P.445-464. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031321
111. Strecker J, Jones S, Koopal B, Schmid-Burgk J, Zetsche B, Gao L, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome

- editing. // *Nat Commun.* 2019. V.10(1):212. doi: 10.1038/s41467-018-08224-4
112. Tan J, Zhang F, Karcher D, Bock R. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. // *Nat Commun.* 2019. V.10(1):439. doi: 10.1038/s41467-018-08034-8
113. Tang Z, Chen S, Chen A, He B, Zhou Y, Chai G, Guo F, Huang J. CasPDB: an integrated and annotated database for Cas proteins from bacteria and archaea. // *Database (Oxford).* 2019. pii: baz093. doi: 10.1093/database/baz093
114. Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, Li T, Li J, Zhou Q, Li W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. // *Cell Discov.* 2018. V.4:63. doi: 10.1038/s41421-018-0069-3
115. Teng F, Guo L, Cui T, Wang XG, Xu K, Gao Q, Zhou Q, Li W. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity. // *Genome Biol.* 2019. V.20(1):132. doi: 10.1186/s13059-019-1742-z
116. Thomas M, Parry-Smith D, Iyer V. Best practice for CRISPR design using current tools and resources. // *Methods.* 2019. V.164-165:3-17. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.05.019
117. Thompson CP, Doak AN, Amirani N, Schroeder EA, Wright J, Kariyawasam S, Lamendella R, Shariat NW. High-Resolution Identification of Multiple Salmonella Serovars in a Single Sample by Using CRISPR-SeroSeq. // *Appl Environ Microbiol.* 2018. V.84(21). pii: e01859-18. doi: 10.1128/AEM.01859-18
118. Torres-Perez R, Garcia-Martin JA, Montoliu L, Oliveros JC, Pazos F. WeReview: CRISPR Tools-Live Repository of Computational Tools for Assisting CRISPR/Cas Experiments. // *Bioengineering (Basel).* 2019. V.6(3). pii: E63. doi: 10.3390/bioengineering6030063
119. Thuronyi BW, Koblan LW, Levy JM, Yeh WH, Zheng C, Newby GA, Wilson C, Bhaumik M, Shubina-Oleinik O, Holt JR, Liu DR. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. // *Nat Biotechnol.* 2019. V.37(9). P.1070-1079. doi: 10.1038/s41587-019-0193-0
120. Uniyal AP, Mansotra K, Yadav SK, Kumar V. An overview of designing and selection of sgRNAs for precise genome editing by the CRISPR-Cas9 system in plants. // *3 Biotech.* 2019. V.9(6):223. doi: 10.1007/s13205-019-1760-2
121. Vats S, Kumawat S, Kumar V, Patil GB, Joshi T, Sonah H, Sharma TR, Deshmukh R. Genome Editing in Plants: Exploration of Technological Advancements and Challenges. // *Cells.* 2019. V.8(11). pii: E1386. doi: 10.3390/cells8111386
122. Wang B, Wang R, Wang D, Wu J, Li J, Wang J, Liu H, Wang Y. Cas12aVDet: A CRISPR/Cas12a-Based Platform for Rapid and Visual Nucleic Acid Detection. // *Anal Chem.* 2019. V.91(19). P.12156-12161. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01526
123. Wang D, Zhang C, Wang B, Li B, Wang Q, Liu D, Wang H, Zhou Y, Shi L, Lan F, Wang Y. Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning. // *Nat Commun.* 2019. V.10(1):4284. doi: 10.1038/s41467-019-12281-8
124. Wang J, Zhang X, Cheng L, Luo Y. An overview and metanalysis of machine and deep learning-based CRISPR gRNA design tools. // *RNA Biol.* 2020. V.17(1). P.13-22. doi: 10.1080/15476286.2019.1669406
125. Weissman JL, Fagan WF, Johnson PLF. Selective Maintenance of Multiple CRISPR Arrays Across Prokaryotes. // *CRISPR J.* 2018. V.1. P.405-413. doi: 10.1089/crispr.2018.0034
126. Wierson WA, Simone BW, WareJoncas Z, Mann C, Welker JM, Kar B, Emch MJ, Friedberg I, Gendron WAC, Barry MA, Clark KJ, Dobbs DL, McGrail MA, Ekker SC, Essner JJ. Expanding the CRISPR Toolbox with ErCas12a in Zebrafish and Human Cells. // *CRISPR J.* 2019. V.2(6). P.417-433. doi: 10.1089/crispr.2019.0026
127. Wilson LOW, Hetzel S, Pockrandt C, Reinert K, Bauer DC. VARSCOT: variant-aware detection and scoring enables sensitive and personalized off-target detection for CRISPR-Cas9. // *BMC Biotechnol.* 2019. V.19(1):40. doi: 10.1186/s12896-019-0535-5
128. Xie E, Li Y, Tang D, Lv Y, Shen Y, Cheng Z. A strategy for generating rice apomixis by gene editing. // *J Integr Plant Biol.* 2019. V.61(8). P.911-916. doi: 10.1111/jipb.12785
129. Xiong Y, Zhang J, Yang Z, Mou Q, Ma Y, Xiong Y, Lu Y. Functional DNA Regulated CRISPR-Cas12a Sensors for Point-of-Care Diagnostics of Non-Nucleic-Acid Targets. // *J Am Chem Soc.* 2020. V.142(1). P.207-213. doi: 10.1021/jacs.9b09211
130. Xue L, Tang B, Chen W, Luo J. Prediction of CRISPR sgRNA Activity Using a Deep Convolutional Neural Network. // *J Chem Inf Model.* 2019. V.59(1). P.615-624. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00368
131. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. // *Cell.* 2016. V.165(4). P.949-962. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.003
132. Yan J, Chuai G., Zhou C., Zhu C., Yang J., Zhang C., Gu F., Xu H., Wei J., Liu Q. Benchmarking CRISPR on-target sgRNA design // *Brief Bioinform.* 2018. V.19(4). P.721-724. doi: 10.1093/bib/bbx001
133. Yang B, Yang L, Chen J. Development and Application of Base Editors. *CRISPR J.* 2019. V.2(2). P.91-104. doi: 10.1089/crispr.2019.0001
134. Yin H, Song CQ, Suresh S, Kwan SY, Wu Q, Walsh S, Ding J, Bogorad RL, Zhu LJ, Wolfe SA, Kotliansky V, Xue W, Langer R, Anderson DG. Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity. // *Nat Chem Biol.* 2018. V.14(3). P.311-316. doi: 10.1038/nchembio.2559
135. Yin H, Song CQ, Suresh S, Wu Q, Walsh S, Rhym LH, Mintzer E, Bolukbasi MF, Zhu LJ, Kauffman K, Mou H, Oberholzer A, Ding J, Kwan SY, Bogorad RL, Zatssepina T, Kotliansky V, Wolfe SA, Xue W, Langer R, Anderson DG. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. // *Nat Biotechnol.* 2017. V.35(12). P.1179-1187. doi: 10.1038/nbt.4005
136. Yin Y, Yang B, Entwistle S. Bioinformatics Identification of Anti-CRISPR Loci by Using Homology, Guilt-by-Association, and CRISPR Self-Targeting Spacer Approaches. // *mSystems.* 2019. V.4(5). pii: e00455-19. doi: 10.1128/mSystems.00455-19

137. Young JK, Gasior SL, Jones S, Wang L, Navarro P, Vickroy B, Barrangou R. The repurposing of type I-E CRISPR-Cascade for gene activation in plants // *Commun Biol*. 2019. V.2:383. doi: 10.1038/s42003-019-0637-6
138. Zetsche B, Strecker J, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Scott DA, Zhang F. A Survey of Genome Editing Activity for 16 Cas12a Orthologs. // *Keio J Med*. 2019. doi: 10.2302/kjm.2019-0009-OA
139. Zhang C, Xu W, Wang F, Kang G, Yuan S, Lv X, Li L, Liu Y, Yang J. Expanding the base editing scope to GA and relaxed NG PAM sites by improved xCas9 system // *Plant Biotechnol J*. 2019. doi: 10.1111/pbi.13259
140. Zhang F, Song G, Tian Y. Anti-CRISPRs: The natural inhibitors for CRISPR-Cas systems. // *Animal Model Exp Med*. 2019. V.2(2). P.69-75. doi: 10.1002/ame2.12069
141. Zhang F, Zhao S, Ren C, Zhu Y, Zhou H, Lai Y, Zhou F, Jia Y, Zheng K, Huang Z. CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. // *Commun Biol*. 2018. V.1:180. doi: 10.1038/s42003-018-0184-6
142. Zhang K, Deng R, Teng X, Li Y, Sun Y, Ren X, Li J. Direct Visualization of Single-Nucleotide Variation in mtDNA Using a CRISPR/Cas9-Mediated Proximity Ligation Assay. // *J Am Chem Soc*. 2018. V.140(36). P.11293-11301. doi: 10.1021/jacs.8b05309
143. Zhang S, Li X, Lin Q, Wong KC. Synergizing CRISPR/Cas9 off-target predictions for ensemble insights and practical applications. // *Bioinformatics*. 2019. V.35(7). P.1108-1115. doi: 10.1093/bioinformatics/bty748
144. Zhao G, Li J, Tang B. AsCRISPR: a web server for allele-specific sgRNA design in precision medicine. // *bioRxiv*. September 10, 2019. doi: 10.1101/672634
145. Zhou W, Hu L, Ying L, Zhao Z, Chu PK, Yu XF. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. // *Nat Commun*. 2018. V.9(1):5012. doi: 10.1038/s41467-018-07324-5
6. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019. V.576(7785).P.149-157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4
7. Baymiev An.Kh., Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Matniyazov R.T., Valeev A.Sh., Baymiev Al.Kh., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Bioinformatic resources for in silico search of the CRISPR loci in the genomes of prokaryotes. *Biomics*. 2017. V.9(3). P. 229-244. (In Russian)
8. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*. 2013. V.493(7432). P.429-432. doi: 10.1038/nature11723
9. Bradford J, Perrin D. A benchmark of computational CRISPR-Cas9 guide design methods. *PLoS Comput Biol*. 2019. V.15(8):e1007274. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007274
10. Bubeck F, Hoffmann MD, Harteveld Z, Aschenbrenner S, Bietz A, Waldhauer MC, Börner K, Fakhiri J, Schmela C, Dietz L, Grimm D, Correia BE, Eils R, Niopek D. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9. *Nat Methods*. 2018. V.15(11). P.924-927. doi: 10.1038/s41592-018-0178-9
11. Cancellieri S, Canver MC, Bombieri N, Giugno R, Pinello L. CRISPRitz: rapid, high-throughput, and variant-aware in silico off-target site identification for CRISPR genome editing. *Bioinformatics*. 2019. pii: btz867. doi: 10.1093/bioinformatics/btz867
12. Chemeris A.V. CRISPR/Cas Systems (Special thematic issue). *Biomics*. 2017. V.9(3). P. 148-154. (In Russian)
13. Chemeris A.V., Rozhnova N.A., Gerashchenkov G.A. Some recent improvements in genome editing techniques. *Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*. 2018. №3(5). P. 86–93. (In Russian)
14. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Design of primers for polymerase chain reaction (Brief review of software and databases). *Biomics*. 2016. V. 8(3). P.215-238. (In Russian)
15. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Kuluev B.R., Rozhnova N.A., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Gubaidullin I.M., Chemeris A.V. Bioinformatic resources for CRISPR/Cas genome editing, *Biomics*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 203-228. (In Russian)
16. Chemeris D.A., Sagitov A.M., Aminev F.G., Lutsenko V.I., Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Vasilov R.G., Alexeyev Ya.I., Slominsky P.A., Khusnutdinova E.K., Chemeris A.V. The evolution of approaches to DNA identification of personality. *Biomics*. 2018. V.10(1). P.85-140. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-16 (In Russian)
17. Chen CL, Rodiger J, Chung V, Viswanatha R, Mohr SE, Hu Y, Perrimon N. SNP-CRISPR: A Web Tool for SNP-Specific Genome Editing. *G3 (Bethesda)*. 2019. pii: g3.400904.2019. doi: 10.1534/g3.119.400904
18. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase

References

1. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, Koob J, Kellner MJ, Ladha A, Joung J, Kirchgatterer P, Cox DBT, Zhang F. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*. 2019. V.365(6451). P.382-386. doi: 10.1126/science.aax7063
2. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Kellner MJ, Zhang F. Nucleic Acid Detection of Plant Genes Using CRISPR-Cas13. *CRISPR J*. 2019a. V.2. P.165-171. doi: 10.1089/crispr.2019.0011
3. Ahmad N, Rahman MU, Mukhtar Z, Zafar Y, Zhang B. A critical look on CRISPR-based genome editing in plants. *J Cell Physiol*. 2020. V.235(2). P.666-682. doi: 10.1002/jcp.29052
4. Alkhnabashi OS, Meier T, Mitrofanov A, Backofen R, Voß B. CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods*. 2019. pii: S1046-2023(18)30471-7. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.07.013
5. Anisimov V.A., Garafutdinov R.R., Sagitov A.M., Sakhabutdinova A.R., Khusnutdinova E.K., Aminev F.G., Chemeris A.V. DNA forensics – the origin, present state and future prospects. *Biomics*. 2019. V.11(3). P. 282-314. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-26 (In Russian)

- activity. *Science*. 2018. V.360(6387). P.436-439. doi: 10.1126/science.aar6245
19. Chen S, Chen Y, Sun F, Waterman MS, Zhang X. A new statistic for efficient detection of repetitive sequences. *Bioinformatics*. 2019. V.35(22). P.4596-4606. doi: 10.1093/bioinformatics/btz262
20. Chen W, Zhang H, Zhang Y, Wang Y, Gan J, Ji Q. Molecular basis for the PAM expansion and fidelity enhancement of an evolved Cas9 nuclease. *PLoS Biol*. 2019. V.17(10):e3000496. doi: 10.1371/journal.pbio.3000496
21. Cheng TL, Li S, Yuan B, Wang X, Zhou W, Qiu Z. Expanding C-T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. *Nat Commun*. 2019. V. 10(1):3612. doi: 10.1038/s41467-019-11562-6
22. Chuai G.H., Wang Q.L., Liu Q. *In silico* meets *in vivo*: Towards computational CRISPR-based sgRNA design. *Trends Biotechnol*. 2017. V.35. P.12-21. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.06.008
23. Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B, Rocha EPC, Vergnaud G, Gautheret D, Pourcel C. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018. V.46(W1):W246-W251. doi: 10.1093/nar/gky425
24. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 2017. V.358(6366). P.1019-1027. doi: 10.1126/science.aaq0180
25. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdiscip. Sci*. 2018. V.10(2). P.455-465. doi: 10.1007/s12539-018-0298-z
26. Demirci Y., Zhang B., Unver T. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *J. Cell Physiol*. 2018. V.233(3). P.1844-1859. doi: 10.1002/jcp.25970
27. Dion MB, Labrie SJ, Shah SA, Moineau S. CRISPRStudio: A User-Friendly Software for Rapid CRISPR Array Visualization. *Viruses*. 2018. V.10(11). pii: E602. doi: 10.3390/v10110602
28. Dong C, Zeng Z, Pu DK, Wen QF, Liu S, Du MZ, Sun Y, Gao YZ, Rao N, Huang J, Guo FB. CasLocusAnno: a web-based server for annotating cas loci and their corresponding (sub)types. *FEBS Lett*. 2019. V.593(18). P.2646-2654. doi: 10.1002/1873-3468.13519
29. Eid A, Alshareef S, Mahfouz MM. CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks. *Biochem J*. 2018. V.475(11). P.1955-1964. doi: 10.1042/BCJ20170793
30. Filippova J, Matveeva A, Zhuravlev E, Stepanov G. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. *Biochimie*. 2019. V.167. P.49-60. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.003
31. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., Alexeyev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova J.Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R.T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019. V.11(1). P. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04 (In Russian)
32. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017. V.551(7681). P.464-471. doi: 10.1038/nature24644
33. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev An.Kh., Gubaidullin I.M., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing. *Molecular Biology*. 2020. V.54(1).
34. Giesselmann P, Brändl B, Raimondeau E, Bowen R, Rohrandt C, Tandon R, Kretzmer H, Assum G, Galonska C, Siebert R, Ammerpohl O, Heron A, Schneider SA, Ladewig J, Koch P, Schuldt BM, Graham JE, Meissner A, Müller FJ. Analysis of short tandem repeat expansions and their methylation state with nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2019. V.37(12). P.1478-1481. doi: 10.1038/s41587-019-0293-x
35. Gionfriddo M, De Gara L, Loreto F. Directed Evolution of Plant Processes: Towards a Green (r)Evolution? *Trends Plant Sci*. 2019. V.24(11). P.999-1007. doi: 10.1016/j.tplants.2019.08.004
36. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018. V.360(6387). P.439-444. doi: 10.1126/science.aaq0179
37. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A., Myhrvold C., Bhattacharyya R.P., Livny J., Regev A., Koonin E.V., Hung D.T., Sabeti P.C., Collins J.J., Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017. V. 356. P. 438-442. doi: 10.1126/science.aam9321
38. Hajian R, Balderston S, Tran T, deBoer T, Etienne J, Sandhu M, Wauford NA, Chung JY, Nokes J, Athaiya M, Paredes J, Peytavi R, Goldsmith B, Murthy N, Conboy IM, Aran K. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat Biomed Eng*. 2019. V.3(6). P.427-437. doi: 10.1038/s41551-019-0371-x
39. Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, Cofsky JC, Kyrpides NC, Banfield JF, Doudna JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*. 2018. V.362(6416). P.839-842. doi: 10.1126/science.aav4294
40. Hu J, Jiang M, Liu R, Lv Y. Label-Free CRISPR/Cas9 Assay for Site-Specific Nucleic Acid Detection. *Anal Chem*. 2019. V.91(16). P.10870-10878. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02641
41. Huang TP, Zhao KT, Miller SM, Gaudelli NM, Oakes BL, Fellmann C, Savage DF, Liu DR. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol*. 2019. V.37(6). P.626-631. doi: 10.1038/s41587-019-0134-y
42. Hwang S, Maxwell KL. Meet the Anti-CRISPRs: Widespread Protein Inhibitors of CRISPR-Cas Systems. *CRISPR J*. 2019. V.2(1). P.23-30. doi: 10.1089/crispr.2018.0052

43. Jakimo N, Chatterjee P, Jacobson JM. Chimeric CRISPR guides enhance Cas9 target specificity. *bioRxiv*. June 08, 2017. doi: 10.1101/147686
44. Jacquin ALS, Odom DT, Lusk M. Crisflash: open-source software to generate CRISPR guide RNAs against genomes annotated with individual variation. *Bioinformatics*. 2019. V.35(17). P.3146-3147. doi: 10.1093/bioinformatics/btz019
45. Kartje ZJ, Barkau CL, Rohilla KJ, Ageely EA, Gagnon KT. Chimeric Guides Probe and Enhance Cas9 Biochemical Activity. *Biochemistry*. 2018. V.57(21). P.3027-3031. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00107
46. Keough KC, Lyalina S, Olvera MP, Whalen S, Conklin BR, Pollard KS. AlleleAnalyzer: a tool for personalized and allele-specific sgRNA design. *Genome Biol*. 2019. V.20(1):167. doi: 10.1186/s13059-019-1783-3
47. Khlestkina E.K. Rice genome editing using CRISPR/Cas system. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019. V.2(1). P.49-54. doi: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54 (In Russian)
48. Khromov A.V., Makhotenko E.V., Snigir E.V., Makarova S.S., Makarov V.V., Suprunova TP., Miroshnichenko D.N., Kalina N.O., Dolgov S.V., Taliansky M.E. Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex to Apical Meristem Cells for DNA-free Editing of Potato *Solanum tuberosum* Genome. *Biotechnology*. 2018. V. 34(6). P.59-68. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-51-58 (In Russian)
49. Kim HY, Kang SJ, Jeon Y, An J, Park J, Lee HJ, Jang JE, Ahn J, Bang D, Chung HS, Jeong C, Ahn DR. Chimeric crRNAs with 19 DNA residues in the guide region show the retained DNA cleavage activity of Cas9 with potential to improve the specificity. *Chem Commun (Camb)*. 2019. V.55(24). P.3552-3555. doi: 10.1039/c8cc08468h
50. Kleinstiver BP, Sousa AA, Walton RT, Tak YE, Hsu JY, Clement K, Welch MM, Horng JE, Malagon-Lopez J, Scarfò I, Maus MV, Pinello L, Aryee MJ, Joung JK. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat Biotechnol*. 2019. V.37(3). P.276-282. doi: 10.1038/s41587-018-0011-0
51. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016. V.533(7603). P.420-424. doi: 10.1038/nature17946
52. Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017. V. 21(2). P. 250–258. doi: 10.18699/VJ17.244
53. Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019. T. 23(1). C. 29-37. doi: 10.18699/VJ19.458
54. Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Gerashchenkov G.A., Nikonorov Yu.M., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. The application of the CRISPR loci not for editing of genomes. *Biomics*. 2017. V.9. P.271-283. (In Russian)
55. Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Baymiev An.Kh., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Matniyazov R.T., Gumerova G.R., Mikhailova E.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris D.A., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. 2017. CRISPR/Cas editing of plant genomes. *Biomics*. 2017a. V.9(3). P. 155–182. (In Russian)
56. Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Delivery of CRISPR/Cas components into higher plant cells for genome editing. *Russ. J. Plant Physiol*. 2019. V.66(5). P. 694–706. doi 10.1134/S0015330319050117
57. Kuno A, Mizuno S, Takahashi S. KOnezumi: a web application for automating gene disruption strategies to generate knockout mice. *Bioinformatics*. 2019. V.35(18):3479-3481. doi: 10.1093/bioinformatics/btz090
58. Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2019. V.47(W1). P.W171-W174. doi: 10.1093/nar/gkz365
59. Li L, Li S, Wu N, Wu J, Wang G, Zhao G, Wang J. HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation. *ACS Synth Biol*. 2019. 8(10). P.2228-2237. doi: 10.1021/acssynbio.9b00209
60. Li SY, Cheng QX, Wang JM, Li XY, Zhang ZL, Gao S, Cao RB, Zhao GP, Wang J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*. 2018. V.4:20. doi: 10.1038/s41421-018-0028-z
61. Li SY, Liu JK, Zhao GP, Wang J. CADS: CRISPR/Cas12a-Assisted DNA Steganography for Securing the Storage and Transfer of DNA-Encoded Information. *ACS Synth Biol*. 2018a. V.7(4). P.1174-1178. doi: 10.1021/acssynbio.8b00074
62. Li T, Wang S, Luo F, Wu FX, Wang J. MultiGuideScan: a multi-processing tool for designing CRISPR guide RNA libraries. *Bioinformatics*. 2019. pii: btz616. doi: 10.1093/bioinformatics/btz616
63. Li X, Wang Y, Liu Y, Yang B, Wang X, Wei J, Lu Z, Zhang Y, Wu J, Huang X, Yang L, Chen J. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*. 2018. V.36(4). P.324-327. doi: 10.1038/nbt.4102
64. Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends Biotechnol*. 2019. V.37(7). P.730-743. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.12.005
65. Li Y, Mansour H, Wang T, Poojari S, Li F. Naked-Eye Detection of Grapevine Red-Blotch Viral Infection Using a Plasmonic CRISPR Cas12a Assay. *Anal Chem*. 2019a. V.91(18). P.11510-11513. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03545
66. Liu G, Zhang Y, Zhang T. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019. V.18. P.35-44. doi: 10.1016/j.csbj.2019.11.006
67. Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, Ma E, Spinner HB, Baney KLM, Chuck J, Tan D, Knott GJ, Harrington LB, Al-Shayeb B, Wagner A, Brötzmann J, Staahl BT, Taylor KL, Desmarais J, Nogales E, Doudna JA. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*. 2019. V.566(7743). P.218-223. doi: 10.1038/s41586-019-0908-x
68. Liu RM, Liang LL, Freed E, Chang H, Oh E, Liu ZY, Garst A, Eckert CA, Gill RT. Synthetic chimeric

- nucleases function for efficient genome editing. *Nat Commun.* 2019. V.10(1):5524. doi: 10.1038/s41467-019-13500-y
69. Liu Q, Zhang H, Huang X. Anti-CRISPR proteins targeting the CRISPR-Cas system enrich the toolkit for genetic engineering. *FEBS J.* 2019. doi: 10.1111/febs.15139
70. Liu W, Rudis MR, Cheplick MH, Millwood RJ, Yang JP, Ondzighi-Assoume CA, Montgomery GA, Burris KP, Mazarei M, Chesnut JD, Stewart CN Jr. Lipofection-mediated genome editing using DNA-free delivery of the Cas9/gRNA ribonucleoprotein into plant cells. *Plant Cell Rep.* 2019. doi: 10.1007/s00299-019-02488-w
71. Lomov NA, Viushkov VS, Petrenko AP, Syrkina MS, Rubtsov MA. Methods of Evaluating the Efficiency of CRISPR/Cas Genome Editing. *Molecular Biology.* 2019. V.53(6). P.862–875. DOI: 10.1134/S0026893319060116
72. Lopatina A, Medvedeva S, Artamonova D, Kolesnik M, Sitnik V, Ispolatov Y, Severinov K. Natural diversity of CRISPR spacers of *Thermus*: evidence of local spacer acquisition and global spacer exchange. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019. V.374(1772):20180092. doi: 10.1098/rstb.2018.0092
73. Luo J, Chen W, Xue L, Tang B. Prediction of activity and specificity of CRISPR-Cpf1 using convolutional deep learning neural networks. *BMC Bioinformatics.* 2019. V.20(1):332. doi: 10.1186/s12859-019-2939-6
74. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnys V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2019. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
75. Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, Jin S. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant Sci.* 2019. V.24(12). P.1102-1125. doi: 10.1016/j.tplants.2019.09.006
76. Mathema VB, Dondorp AM, Imwong M. OSTRFPD: Multifunctional Tool for Genome-Wide Short Tandem Repeat Analysis for DNA, Transcripts, and Amino Acid Sequences with Integrated Primer Designer. *Evol Bioinform Online.* 2019. V.15:1176934319843130. doi: 10.1177/1176934319843130
77. Maxwell KL. The Anti-CRISPR Story: A Battle for Survival. *Mol Cell.* 2017. V.68(1). P.8-14. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.002
78. Mayo-Muñoz D, He F, Jørgensen JB, Madsen PK, Bhoobalan-Chitty Y, Peng X. Anti-CRISPR-Based and CRISPR-Based Genome Editing of *Sulfolobus islandicus* Rod-Shaped Virus 2. *Viruses.* 2018. V.10(12). pii: E695. doi: 10.3390/v10120695
79. McKenzie RE, Almendros C, Vink JNA, Brouns SJJ. Using CAPTURE to detect spacer acquisition in native CRISPR arrays. *Nat Protoc.* 2019. V.14(3). P.976-990. doi: 10.1038/s41596-018-0123-5
80. McMahon MA, Prakash TP, Cleveland DW, Bennett CF, Rahdar M. Chemically Modified Cpf1-CRISPR RNAs Mediate Efficient Genome Editing in Mammalian Cells. *Mol Ther.* 2018. V.26(5). P.1228-1240. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.02.031
81. Milicevic O, Repac J, Bozic B, Djordjevic M, Djordjevic M. A Simple Criterion for Inferring CRISPR Array Direction. *Front Microbiol.* 2019. V.10:2054. doi: 10.3389/fmicb.2019.02054
82. Miroshnichenko D.N., Shulga O.A., Timerbaev V.R., Dolgov S.V. Generation of Non-transgenic Genome-edited Plants: Achievements, Challenges and Prospects. *Biotechnology.* 2019. V.35(1). P. 3-26. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26 (In Russian)
83. Mishra R, Joshi RK, Zhao K. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. *Plant Biotechnol J.* 2020. V.18(1). P.20-31. doi: 10.1111/pbi.13225
84. Molla KA, Yang Y. CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. *Trends Biotechnol.* 2019. V.37(10). P.1121-1142. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008
85. Mori H, Evans-Yamamoto D, Ishiguro S, Tomita M, Yachie N. Fast and global detection of periodic sequence repeats in large genomic resources. *Nucleic Acids Res.* 2019. V.47(2):e8. doi: 10.1093/nar/gky890
86. Nethery MA, Barrangou R. CRISPR Visualizer: rapid identification and visualization of CRISPR loci via an automated high-throughput processing pipeline. *RNA Biol.* 2019. V.16(4). P.577-584. doi: 10.1080/15476286.2018.1493332
87. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 2016. V.353(6305). pii: aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729
88. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 2014. V.156(5). P.935-949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
89. O'Halloran DM. Genome aware CRISPR gRNA target prediction for parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol.* 2019. V.227. P.25-28. doi: 10.1016/j.molbiopara.2018.12.001
90. O'Reilly D, Kartje ZJ, Ageely EA, Malek-Adamian E, Habibian M, Schofield A, Barkau CL, Rohilla KJ, DeRossett LB, Weigle AT, Damha MJ, Gagnon KT. Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure-activity relationships for Cas9 biochemical activity. *Nucleic Acids Res.* 2019. V.47(2). P.546-558. doi: 10.1093/nar/gky1214
91. Okada A, Arndell T, Borisjuk N, Sharma N, Watson-Haigh NS, Tucker EJ, Baumann U, Langridge P, Whitford R. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Msl1* enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. *Plant Biotechnol J.* 2019. V.17(10). P.1905-1913. doi: 10.1111/pbi.13106
92. Olson D, Wheeler T. ULTRA: A Model Based Tool to Detect Tandem Repeats. *ACM BCB.* 2018. 2018. P.37-46. doi: 10.1145/3233547.3233604
93. Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. *Nat Rev*

- Microbiol.* 2018. V.16(1). P.12-17. doi: 10.1038/nrmicro.2017.120
94. Periwal V. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases. *Brief Bioinform.* 2017. V. 18. P. 698-711. doi: 10.1093/bib/bbw052
95. Poonawala H, Kumar N, Peacock SJ. A review of published spoligotype data indicates the diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from India is under-represented in global databases. *Infect Genet Evol.* 2019. V.78:104072. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104072
96. Pourcel C, Touchon M, Villeriot N, Vernadet JP, Couvin D, Toffano-Nioche C, Vergnaud G. CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers. *Nucleic Acids Res.* 2020. V.48(D1):D535-D544. doi: 10.1093/nar/gkz915
97. Rabinowitz R., Darnell R., Offen D. CrisPam – a tool for designing gRNA sequences to specifically target a variant allele using CRISPR. *Cytotherapy.* 2019. V.21(5), Supplement. P.e6-e7. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.04.021
98. Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM, Hameed MK, Khan MS, Joyia FA. Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *Int J Mol Sci.* 2019. V.20(16). pii: E4045. doi: 10.3390/ijms20164045
99. Roberson EDO. Motif scraper: a cross-platform, open-source tool for identifying degenerate nucleotide motif matches in FASTA files. *Bioinformatics.* 2018. V.34(22). P.3926-3928. doi: 10.1093/bioinformatics/bty437
100. Rueda FO, Bista M, Newton MD, Goepfert AU, Cuomo ME, Gordon E, Kröner F, Read JA, Wrigley JD, Rueda D, Taylor BJM. Mapping the sugar dependency for rational generation of a DNA-RNA hybrid-guided Cas9 endonuclease. *Nat Commun.* 2017. V.8(1):1610. doi: 10.1038/s41467-017-01732-9
101. Safari F, Zare K, Negahdaripour M, Berekati-Mowahed M, Ghasemi Y. CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell Biosci.* 2019. V.9:36. doi: 10.1186/s13578-019-0298-7
102. Sakhabutdinova A.R., Mikhailenko K.I., Garafutdinov R.R., Kiryanova O.Yu., Sagitova M.A., Sagitov A.M., Chemeris A.V. Non-biological application of DNA molecules. *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 344-377. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-28 (In Russian)
103. Satheesh V, Zhang H, Wang X, Lei M. Precise editing of plant genomes - Prospects and challenges. *Semin Cell Dev Biol.* 2019. V.96. P.115-123. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.04.010
104. Schaefer M, Clevert DA, Weiss B, Steffen A. PAVOOC: designing CRISPR sgRNAs using 3D protein structures and functional domain annotations. *Bioinformatics.* 2019. V.35(13). P.2309-2310. doi: 10.1093/bioinformatics/bty935
105. Schindele A, Dorn A, Puchta H. CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. *Curr Opin Biotechnol.* 2019. V.61. P.7-14. doi: 10.1016/j.copbio.2019.08.006
106. Shao N, Han X, Song Y, Zhang P, Qin L. CRISPR-Cas12a Coupled with Platinum Nanoreporter for Visual Quantification of SNVs on a Volumetric Bar-Chart Chip. *Anal Chem.* 2019. V.91(19). P.12384-12391. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02925
107. Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV, Koonin EV. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018. V.115(23). E5307-E5316. doi: 10.1073/pnas.1803440115
108. Stanley SY, Maxwell KL. Phage-Encoded Anti-CRISPR Defenses. *Annu Rev Genet.* 2018. V.52. P.445-464. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031321
109. Strecker J, Jones S, Koopal B, Schmid-Burgk J, Zetsche B, Gao L, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun.* 2019. V.10(1):212. doi: 10.1038/s41467-018-08224-4
110. Tan J, Zhang F, Karcher D, Bock R. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nat Commun.* 2019. V.10(1):439. doi: 10.1038/s41467-018-08034-8
111. Tang Z, Chen S, Chen A, He B, Zhou Y, Chai G, Guo F, Huang J. CasPDB: an integrated and annotated database for Cas proteins from bacteria and archaea. *Database (Oxford).* 2019. 2019. pii: baz093. doi: 10.1093/database/baz093
112. Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, Li T, Li J, Zhou Q, Li W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov.* 2018. V.4:63. doi: 10.1038/s41421-018-0069-3
113. Teng F, Guo L, Cui T, Wang XG, Xu K, Gao Q, Zhou Q, Li W. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity. *Genome Biol.* 2019. V.20(1):132. doi: 10.1186/s13059-019-1742-z
114. Thomas M, Parry-Smith D, Iyer V. Best practice for CRISPR design using current tools and resources. *Methods.* 2019. V.164-165:3-17. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.05.019
115. Thompson CP, Doak AN, Amirani N, Schroeder EA, Wright J, Kariyawasam S, Lamendella R, Shariat NW. High-Resolution Identification of Multiple *Salmonella* Serovars in a Single Sample by Using CRISPR-SeroSeq. *Appl Environ Microbiol.* 2018. V.84(21). pii: e01859-18. doi: 10.1128/AEM.01859-18
116. Tikhonova N.G., Khlestkina E.K. Genetic editing for improvement of fruit and small fruit crops. *Horticulture and viticulture.* 2019. (4). P.10-15. DOI: 10.31676/0235-2591-2019-4-10-15 (In Russian)
117. Torres-Perez R, Garcia-Martin JA, Montoliu L, Oliveros JC, Pazos F. WeReview: CRISPR Tools-Live Repository of Computational Tools for Assisting CRISPR/Cas Experiments. *Bioengineering (Basel).* 2019. V.6(3). pii: E63. doi: 10.3390/bioengineering6030063
118. Thuronyi BW, Koblan LW, Levy JM, Yeh WH, Zheng C, Newby GA, Wilson C, Bhaumik M, Shubina-Oleinik O, Holt JR, Liu DR. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nat Biotechnol.* 2019. V.37(9). P.1070-1079. doi: 10.1038/s41587-019-0193-0
119. Uniyal AP, Mansotra K, Yadav SK, Kumar V. An overview of designing and selection of sgRNAs for precise genome editing by the CRISPR-Cas9 system in plants. *3 Biotech.* 2019. V.9(6):223. doi: 10.1007/s13205-019-1760-2

120. Vats S, Kumawat S, Kumar V, Patil GB, Joshi T, Sonah H, Sharma TR, Deshmukh R. Genome Editing in Plants: Exploration of Technological Advancements and Challenges. *Cells*. 2019. V.8(11). pii: E1386. doi: 10.3390/cells8111386
121. Wang B, Wang R, Wang D, Wu J, Li J, Wang J, Liu H, Wang Y. Cas12aVDeT: A CRISPR/Cas12a-Based Platform for Rapid and Visual Nucleic Acid Detection. *Anal Chem*. 2019. V.91(19). P.12156-12161. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01526
122. Wang D, Zhang C, Wang B, Li B, Wang Q, Liu D, Wang H, Zhou Y, Shi L, Lan F, Wang Y. Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning. *Nat Commun*. 2019. V.10(1):4284. doi: 10.1038/s41467-019-12281-8
123. Wang J, Zhang X, Cheng L, Luo Y. An overview and metanalysis of machine and deep learning-based CRISPR gRNA design tools. *RNA Biol*. 2020. V.17(1). P.13-22. doi: 10.1080/15476286.2019.1669406
124. Weissman JL, Fagan WF, Johnson PLF. Selective Maintenance of Multiple CRISPR Arrays Across Prokaryotes. *CRISPR J*. 2018. V.1. P.405-413. doi: 10.1089/crispr.2018.0034
125. Wierson WA, Simone BW, WareJoncas Z, Mann C, Welker JM, Kar B, Emch MJ, Friedberg I, Gendron WAC, Barry MA, Clark KJ, Dobbs DL, McGrail MA, Ekker SC, Essner JJ. Expanding the CRISPR Toolbox with ErCas12a in Zebrafish and Human Cells. *CRISPR J*. 2019. V.2(6). P.417-433. doi: 10.1089/crispr.2019.0026
126. Wilson LOW, Hetzel S, Pockrandt C, Reinert K, Bauer DC. VARSCOT: variant-aware detection and scoring enables sensitive and personalized off-target detection for CRISPR-Cas9. *BMC Biotechnol*. 2019. V.19(1):40. doi: 10.1186/s12896-019-0535-5
127. Xie E, Li Y, Tang D, Lv Y, Shen Y, Cheng Z. A strategy for generating rice apomixis by gene editing. *J Integr Plant Biol*. 2019. V.61(8). P.911-916. doi: 10.1111/jipb.12785
128. Xiong Y, Zhang J, Yang Z, Mou Q, Ma Y, Xiong Y, Lu Y. Functional DNA Regulated CRISPR-Cas12a Sensors for Point-of-Care Diagnostics of Non-Nucleic-Acid Targets. *J Am Chem Soc*. 2020. V.142(1). P.207-213. doi: 10.1021/jacs.9b09211
129. Xue L, Tang B, Chen W, Luo J. Prediction of CRISPR sgRNA Activity Using a Deep Convolutional Neural Network. *J Chem Inf Model*. 2019. V.59(1). P.615-624. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00368
130. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2016. V.165(4). P.949-962. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.003
131. Yan J., Chuai G., Zhou C., Zhu C., Yang J., Zhang C., Gu F., Xu H., Wei J., Liu Q. Benchmarking CRISPR on-target sgRNA design. *Brief Bioinform*. 2018. V.19(4). P.721-724. doi: 10.1093/bib/bbx001
132. Yang B, Yang L, Chen J. Development and Application of Base Editors. *CRISPR J*. 2019. V.2(2). P.91-104. doi: 10.1089/crispr.2019.0001
133. Yin H, Song CQ, Suresh S, Kwan SY, Wu Q, Walsh S, Ding J, Bogorad RL, Zhu LJ, Wolfe SA, Koteliensky V, Xue W, Langer R, Anderson DG. Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity. *Nat Chem Biol*. 2018. V.14(3). P.311-316. doi: 10.1038/nchembio.2559
134. Yin H, Song CQ, Suresh S, Wu Q, Walsh S, Rhym LH, Mintzer E, Bolukbasi MF, Zhu LJ, Kauffman K, Mou H, Oberholzer A, Ding J, Kwan SY, Bogorad RL, Zatssepin T, Koteliensky V, Wolfe SA, Xue W, Langer R, Anderson DG. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nat Biotechnol*. 2017. V.35(12). P.1179-1187. doi: 10.1038/nbt.4005
135. Yin Y, Yang B, Entwistle S. Bioinformatics Identification of Anti-CRISPR Loci by Using Homology, Guilt-by-Association, and CRISPR Self-Targeting Spacer Approaches. *mSystems*. 2019. V.4(5). pii: e00455-19. doi: 10.1128/mSystems.00455-19
136. Young JK, Gasior SL, Jones S, Wang L, Navarro P, Vickroy B, Barrangou R. The repurposing of type I-E CRISPR-Cascade for gene activation in plants. *Commun Biol*. 2019. V.2:383. doi: 10.1038/s42003-019-0637-6
137. Zetsche B, Strecker J, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Scott DA, Zhang F. A Survey of Genome Editing Activity for 16 Cas12a Orthologs. *Keio J Med*. 2019. doi: 10.2302/kjm.2019-0009-OA
138. Zhang F, Song G, Tian Y. Anti-CRISPRs: The natural inhibitors for CRISPR-Cas systems. *Animal Model Exp Med*. 2019. V.2(2). P.69-75. doi: 10.1002/ame2.12069
139. Zhang C, Xu W, Wang F, Kang G, Yuan S, Lv X, Li L, Liu Y, Yang J. Expanding the base editing scope to GA and relaxed NG PAM sites by improved xCas9 system. *Plant Biotechnol J*. 2019. doi: 10.1111/pbi.13259
140. Zhang F, Zhao S, Ren C, Zhu Y, Zhou H, Lai Y, Zhou F, Jia Y, Zheng K, Huang Z. CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. *Commun Biol*. 2018. V.1:180. doi: 10.1038/s42003-018-0184-6
141. Zhang K, Deng R, Teng X, Li Y, Sun Y, Ren X, Li J. Direct Visualization of Single-Nucleotide Variation in mtDNA Using a CRISPR/Cas9-Mediated Proximity Ligation Assay. *J Am Chem Soc*. 2018. V.140(36). P.11293-11301. doi: 10.1021/jacs.8b05309
142. Zhang S, Li X, Lin Q, Wong KC. Synergizing CRISPR/Cas9 off-target predictions for ensemble insights and practical applications. *Bioinformatics*. 2019. V.35(7). P.1108-1115. doi: 10.1093/bioinformatics/bty748
143. Zhao G, Li J, Tang B. AsCRISPR: a web server for allele-specific sgRNA design in precision medicine. *bioRxiv*. September 10, 2019. doi: 10.1101/672634
144. Zhou W, Hu L, Ying L, Zhao Z, Chu PK, Yu XF. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nat Commun*. 2018. V.9(1):5012. doi: 10.1038/s41467-018-07324-5
145. Zlobin N.E., Lebedeva M.V., Taranov V.V., Harchenko P.N., Babakov A.V. Redaktirovanie genoma rastenij putem napravlennoj zameny azotistyh osnovanij (Obzor). [Editing the plant genome by targeted substitution of nitrogenous bases (Review).] *Biotehnologija*. 2018. T.34(6). S. 59-68.