



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## CRISPR/Cas РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.

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

### Резюме

Описана краткая история и предыстория изучения CRISPR/Cas систем, приведена терминология, показано разнообразие CRISPR/Cas систем, а также различные улучшения технологии геномного редактирования. Проведен наукометрический анализ публикаций в этой области. Приведены примеры редактирования геномов ряда видов растений. Список цитированной литературы составил более 250 наименований и при этом большинство работ опубликовано в последние два-три-четыре года, и лишь немногочисленные статьи, имеющие отношение к истории и предыстории CRISPR/Cas технологии, датированы более ранними годами.

Ключевые слова: CRISPR, Cas9, Cpf1, nCas9, PAM, NHEJ, HDR, нуклеаза, никаза, двуцепочечные разрывы, крПНК, тракрПНК, гидПНК, спейсер, протоспейсер, нокаут, нокин

### Содержание

	Стр.
Введение	155
Терминология CRISPR/Cas систем	155
История метода	158
CRISPR/Cas9 наукометрия	160
Разнообразие CRISPR/Cas систем	162
Механизм защиты своих геномов у бактерий и архей на примере CRISPR/Cas9 системы	163
Конструирование CRISPR/Cas элементов для редактирования геномов	164
Доставка CRISPR/Cas компонентов в растительную клетку и детекция результатов редактирования	164
Совершенствование CRISPR/Cas технологии редактирования геномов	166
Геномное редактирование с помощью CRISPR/Cpf1 системы	169
Некоторые примеры редактирования геномов растений	170
Заключение	172
Литература	173

### Введение

В последние годы во всем мире имеет место настоящий бум вокруг CRISPR/Cas технологии, с помощью которой стало более доступным и эффективным геномное редактирование, поскольку применявшиеся ранее для этой цели методы в виде направленного мутагенеза с помощью химерных олигонуклеотидов [Hohn, Puchta, 1999; Sauer et al., 2016], в виде рекомбинации с использованием мегануклеаз [Thierry, Dujon, 1992; Smith et al., 2006], нуклеаз «цинковых пальцев» (ZFNs - Zinc Finger Nucleases) [Kim et al., 1996; Bibikova et al., 2003] и нуклеаз на основе эффекторных белков TALE (TALEN – Transcription Activator Like Effector Nucleases) [Moscou, Bogdanove, 2009; Christian et al., 2010] гораздо более трудоемки и не столь эффективны. В сопровождающей данную статью другой нашей публикации [Вершинина и др. 2017], посвященной

эволюции систем геномного редактирования эти и другие способы мутагенеза рассмотрены более подробно.

Хотя в названии данного обзора фигурируют растения при его написании невозможно обойтись без упоминания статей по другим организмам, поскольку практически все пионерные работы выполнены на бактериальных и животных объектах.

### Терминология CRISPR/Cas систем

При изучении CRISPR/Cas систем, в том числе при редактировании с их помощью геномов используется довольно значительное количество специальных терминов, часть которых существовала ранее, но многие возникли только в связи с появлением и развитием данной технологии. Представляется разумным собрать основные из них в таблицу (табл. 1) и дать определенные пояснения.

Основные термины, сопровождающие использование CRISPR/Cas систем

Термин	Аналог в русскоязычной литературе	Пояснение
CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)	CRISPR	Расположенные регулярными кластерами короткие палиндромные повторы. Являются особыми локусами геномов бактерий и архей, обеспечивающими им приобретенный иммунитет
CRISPR locus	CRISPR локус	Фрагмент геномной ДНК бактерий, содержащий гены CRISPR-ассоциированных белков в виде CRISPR оперона и CRISPR-кассеты, несущей короткие квазитандемные повторы, перемежающиеся уникальными спейсерами
CRISPR array CRISPR cassette	CRISPR кассета	Участок CRISPR локуса геномной ДНК бактерий, содержащий короткие палиндромные квазитандемные повторы, перемежающиеся уникальными спейсерами
RGN (RNA Guided Nuclease) RGEN (RNA Guided Engineering Nuclease) <i>или</i> RNA Guided EndoNuclease	РНК-направляемые эндонуклеазы	РНК-направляемые эндонуклеазы обеспечивают внесение одно- или двуцепочечных разрывов в ДНК в места, обнаруживающие гомологию с входящей в комплекс с ферментом Cas нуклеазой варибельной последовательностью РНК (спейсером)
Cas (CRISPR associated)	Cas	Ассоциированные с CRISPR-кассетой нуклеазы
Cas9	Cas9	CRISPR нуклеаза, относящаяся ко II классу и II типу CRISPR/Cas систем, генерирующая тупые концы ДНК
<i>Sp</i> Cas9	<i>Sp</i> Cas9	Cas9 нуклеаза, где <i>Sp</i> означает, что данный фермент обнаружен в микроорганизме <i>Streptococcus pyogenes</i> . Аналогичные обозначения (обычно двухбуквенные) делаются и для других подобных Cas нуклеаз, когда важно подчеркнуть принадлежность фермента
RuvC	RuvC	Каталитический домен Cas9 нуклеазы, вносящий одноцепочечный разрыв в целевой участок ДНК (протоспейсер)
HNH	HNH	Каталитический домен Cas9 нуклеазы, вносящий одноцепочечный разрыв в целевой участок ДНК, гомологичный протоспейсеру и связывающийся со спейсером крРНК (гидРНК)
Cpf1 (Cas12)	Cpf1	CRISPR нуклеаза, относящаяся ко II классу и V типу CRISPR/Cas систем (Cas12), генерирующая 5'-выступающие концы ДНК
Cas13a (C2c2)	Cas13a	CRISPR нуклеаза, относящаяся ко II классу и VI типу CRISPR/Cas систем (Cas13a), разрушающая молекулы РНК
NLS (Nuclear Localization Signal)		Сигнал ядерной локализации Cas нуклеазы в виде последовательности аминокислот (например, РKKRКV), размещаемой на N- и/или С-концах зрелого фермента
DSB (Double-Stranded Breaks)		Разрывы обеих цепей молекул ДНК, образующиеся под действием различных ферментов или физическими воздействиями напротив друг друга с образованием тупых концов или на некотором (небольшом) расстоянии друг от друга
nCas9 (nickase)	nCas9	Мутантная форма Cas9 нуклеазы, ставшая никазой, поскольку способна разрезать только одну из цепей ДНК
SSB (Single Stranded Break) Nick	«Ник» (Одноцепочечный разрыв)	Разрыв(ы) одной из цепей ДНК, возникающий(е) под действием особых нуклеаз (никаз) или других воздействий на некотором удалении друг от друга, не приводящие как правило к разъединению молекул ДНК на части по местам разрывов

CRISPR/Cas редактирование растений

dCas9 (dead или deactivated)	dCas9	Мутантная форма Cas9 нуклеазы, лишенная ферментативной активности за счет произведенных мутаций в обоих каталитических доменах фермента
pcoCas9 nuclease (pco - plant codon-optimized)		Мутантная форма Cas9 нуклеазы с кодонами, оптимизированными для трансляции в растениях
PAM (Protospacer Adjacent Motif)	PAM	Мотив, смежный с протоспейсером (для нуклеаз разного типа может располагаться как с его 5'-, так и с 3'-конца), служащий неким указателем мишени в составе редактируемой геномной ДНК
PFS (Protospacer Flanking Sequence)		Последовательность нуклеотидов, фланкирующая протоспейсер; для разных нуклеаз может располагаться как с его 5'-, так и с 3'-конца
Protospacer	протоспейсер	Специфичная последовательность, служащая мишенью в составе редактируемой геномной ДНК, связывающаяся со спейсером крРНК (гидРНК)
crRNA (crispr RNA)	крРНК	РНК, включающая спейсер из CRISPR-кассеты
tracrRNA (trans-activated CRISPR RNA)	тракрРНК	Транс-активирующая РНК, участвующая в образовании комплекса Cas9 с крРНК
sgRNA (single guided RNA)	гидРНК (егРНК, хгРНК)	Единая гидовая РНК (направляющая РНК, химерная направляющая РНК), включающая в свой состав как крРНК (около 30 нуклеотидов, из которых 20 определяют таргетирование), так и тракрРНК (около 70 консервативных нуклеотидов) на 3'-конце
gRNA domain	гидРНК	Домен единой направляющей РНК (гидовая РНК, спейсер), определяющий таргетирование
sgRNA scaffold sequence		Каркас направляющей РНК, обеспечивающий связывание с Cas9, без 20 нуклеотидов, определяющих таргетирование
Spacer	Спейсер	Специфичная вариабельная последовательность в составе направляющей РНК, связывающаяся с протоспейсером, а также участок CRISPR-кассеты, перемежающий палиндромные квазитандемные повторы
«Seed sequence»		Якорная или затравочная последовательность из 8-12 нуклеотидов на 3'-конце вариабельной последовательности в составе направляющей гидовой РНК, связывающаяся с протоспейсером и определяющая специфичность узнавания
On-target site	Целевой сайт	Специфичная последовательность в геноме (протоспейсер), с которой должна связываться вариабельная часть направляющей РНК
Off-target site	Нецелевой сайт	Неспецифичная последовательность в геноме, с которой может связываться вариабельная часть направляющей РНК
NHEJ (Non-Homologous End-Joining)		Репарация негомологичных концов ДНК, часто сопровождаемая инделами (инсерции/делеции)
MMEJ (Microhomology-Mediated End-Joining)		Один из вариантов репарации частично гомологичных концов при двуцепочечных разрывах ДНК, сопровождаемая делециями
HDR (Homology Directed Repair)		Репарация молекул ДНК, обусловленная гомологией концевых фрагментов
Knock-out (KO)	Нокаут	Нарушение работы какого-либо гена, вызываемого обычно NHEJ репарацией
Knock-in (KI)	Нокин	Внедрение в геномную ДНК какого-либо гена, вызываемого HDR репарацией
CRISPRi (CRISPR interference)		Использование CRISPR/dCas систем для репрессии работы отдельных генов в системе <i>in vivo</i>
CRISPRa (CRISPR activation)		Использование CRISPR/dCas систем для активации работы отдельных генов в системе <i>in vivo</i>

Необходимо заметить, что, по крайней мере, пока, в русскоязычной литературе для многих терминов не появилось аналогов на кириллице и поэтому имеют хождение англоязычные термины. Отсутствие устоявшихся русскоязычных терминов приводит также к тому, что некоторые принятые в мировой литературе сокращения в русских текстах не используются.

### История метода

Если кратко коснуться предыстории современного геномного редактирования, то надо сказать, что в 2007 г. Нобелевской премии по физиологии и медицине были удостоены М.Капекки (M.Caprecchi), О.Смитис (O.Smithies) и сэр М.Эванс (Sir M.Evans) за изобретение во второй половине 1980-х гг. метода нокаутирования генов, производимого благодаря таргетированию таких целевых генов за счет гомологии окружающих последовательностей ДНК. Для растений возможность подобного таргетирования генов на табаке была показана чуть позже в 1988 г. [Paszowski et al., 1988]. Однако для того чтобы рекомбинация была более эффективной требуется внесение в такой целевой участок ДНК двуцепочечных разрывов, на два порядка повышающих успешность процесса [Puchta et al., 1993; 1996]. Поэтому большинство позже появившихся методов геномного редактирования предполагает возникновение двуцепочечных разрывов ДНК, обеспечиваемое разными способами, что описано в статье Вершининой и соавторов [2017].

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) представляют собой короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, являющимися особыми локусами геномов бактерий и архей, организованными в виде перемежающихся (квзитандемных) прямых повторов, разделенных близкого с ними размера спейсерами с уникальными последовательностями. Более подробно организация CRISPR-локусов рассмотрена нами в другой статье [Баймиев и др., 2017a].

В последние годы опубликовано огромное количество обзорных статей, посвященных CRISPR/Cas технологии [Gasiunas, Siksnys, 2013; Doudna, Charpentier, 2014; Немудрый и др., 2014; Chylinski et al., 2014; Lomov et al., 2015; Makarova et al., 2015; Sontheimer, Barrangou, 2015; Савицкая и др., 2016; Ceasar et al., 2016; Hille, Charpentier, 2016; Luo et al., 2016; Leenay, Beisel, 2017; Shmakov et al., 2017; Marchisio, Huang, 2017 и др.]. Во многих из них довольно детально описаны обнаружение, а также история длительного изучения этих удивительных элементов геномов микроорганизмов, однако на некоторых моментах все же здесь необходимо остановиться.

В 2016 г. президент Broad Institute of MIT E.Lander в журнале Cell опубликовал статью под названием «The Heroes of CRISPR» [Lander, 2016], где достаточно подробно и красочно с житейскими подробностями живописал историю открытия и изучения CRISPR/Cas системы и отметил многих

ученых, причастных к этому. После чего в журнале Nature вышла статья, названная «The Unsung Heroes of CRISPR» [Ledford, 2016], в которой замечается, что еще довольно большое число ученых, внесших заметный вклад в изучение CRISPR/Cas9, в статье E.Lander не упомянуты. В комментариях к статье E.Lander [2016] в базе данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26771483#comments>) также говорится, что вклад некоторых лабораторий приведен в той статье весьма куце. Тем не менее, в ней изложены в хронологическом порядке некоторые факты, которые считаем целесообразным здесь привести.

E.Lander начинает вести историю изучения CRISPR локусов бактерий с работ начала 90-х гг. прошлого века испанского ученого F.Mojica, тогда как более принято первыми пионерами этих исследований считать японских авторов, обнаруживших некие особые последовательности нуклеотидов у кишечной палочки *E.coli* рядом с геном *iap* [Ishino et al., 1987]. Два года спустя эта же группа авторов опубликовала статью, в заголовке которой непосредственно говорилось о необычной организации повторяющихся последовательностей у *E.coli*, причем такие повторы были найдены с помощью блот-гибридизации по Саузерну еще у двух видов энтеробактерий – *Salmonella typhimurium* и *Shigella dysenteriae* [Nakata et al., 1989]. Однако некоторыми авторами отмечается, что еще раньше группа ученых из Калифорнийского университета в Беркли вместе со своими коллегами из Шотландии у *E.coli* и *S.typhimurium* нашли в их геномах участки с невыясненной функцией, названные ими как REP-последовательности (Repetitive Extragenic Palindromic), имевшие длину 35 нуклеотидов и включавшие еще другие участки [Stern et al., 1984]. Но именно F.Mojica действительно внес наиболее весомый вклад в изучение этих элементов генома и их обнаружение у разных групп организмов. Так, изучая геном археи *Haloflexa mediterranei*, он вместе с соавторами обнаружил почти совершенные повторы длиной 30 п.н., разделенные спейсерами сходного размера [Mojica et al., 1993]. Обнаружив позднее аналогичные повторы у близкого вида архей *H.volcanii* и сравнив свои результаты с данными японских авторов [Ishino et al., 1987] F.Mojica пришел к выводу, что эти последовательности, имеющие общую структуру, но отличающиеся по последовательностям, весьма важны для прокариот поскольку имеются как у архей, так и бактерий и опубликовал статью на этот счет [Mojica et al., 1995]. Анализируя становящиеся известными после 1995 г. полные геномы различных микроорганизмов, F.Mojica обнаружил подобные повторы у большого числа видов бактерий и архей, названные тогда как SRSRs (Short Regularly Spaced Repeats), однако их функция оставалась неизвестной [Mojica et al., 2000]. В те годы использовались и другие названия этих элементов бактериальных геномов – DR (Direct Repeats), DVR (Direct Variable Repeats), TREP (Tandem REPEATs), LTRR (Long Tandemly Repeated Repetitive sequences), LCTR (Large Clusters of Tandem Repeats), SPIDR (Spacer Interspersed Direct Repeats). В

2002 г. голландскими авторами была опубликована статья [Jansen et al., 2002], где SRSRs элементы геномов по согласованию с F.Mojica получили новое название - CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), ставшее общепринятым.

Развитие событий вокруг этих удивительных элементов генома микроорганизмов довольно детально изложено в двух обзорных статьях [Mojica, Montoliu, 2016; Mojica, Rodriguez-Valera, 2016]. Так, предположение о том, что CRISPR локусы могут служить прокариотам в качестве иммунной системы, было высказано F.Mojica еще в 2003 г., однако подготовленная и направленная в журнал Nature в ноябре 2003 г. статья была отклонена редакцией без рецензирования, ввиду отсутствия новизны. В январе 2004 г. эту же статью с аналогичной формулировкой отклонил журнал Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. Затем статью отвергли журналы Molecular Microbiology и Nucleic Acids Research. Здесь, пожалуй, уместно будет вспомнить ситуацию с публикацией метода ПЦР, когда статью К.Мюллера отказывались публиковать такие журналы как Science и Nature. В итоге F.Mojica послал эту статью

в журнал Journal of Molecular Evolution, где она вышла через год в февральском номере 2005 г. [Mojica et al., 2005]. Поэтому в таблице 2 имеется расхождение между датами, отмеченное звездочками. От отклонения статьи по CRISPR технологии пострадали также и литовские ученые. Как пишет E.Lander [2016], V.Siksnys с соавторами 6 апреля 2012 г. направили рукопись в журнал Cell и через шесть дней в ее публикации без проведения рецензирования им было отказано, после чего 21 мая сокращенный вариант был принят журналом Proceedings of the National Academy of Sciences of USA и on-line версия появилась в начале сентября 2012 г., но за это время в журнале Science вышла близкая по тематике статья J.Doudna и соавторов [Jinek et al., 2012].

За три десятилетия изучения CRISPR-локусов учеными разных стран проделан огромный объем работы, подготовлена настоящая лавина публикаций, произошло немало знаковых событий, что мы попытались свести в некую таблицу (Табл. 2), которая отнюдь не претендует на исчерпывающую полноту.

Таблица 2

Даты и страны произошедших знаковых событий и полученных научных результатов, связанных с CRISPR/Cas системами

Год	Научный результат/событие	Страны/города
1987	Первое упоминание в литературе об обнаружении необычных tandemных повторов (ставших позже известными как CRISPR) у грамм-отрицательных бактерий [Ishino et al., 1987]	<b>Япония</b> , Осака
1989	Обнаружение присутствия таких необычных tandemных повторов у других энтеробактерий [Nakata et al., 1989]	<b>Япония</b> , Осака
1991	Первое упоминание в литературе о таких необычных tandemных повторах у грамм-положительных бактерий [Hermans et al., 1991]	<b>Голландия</b> , Билтховен
1993	Первое упоминание в литературе о таких необычных tandemных повторах у архей [Mojica et al., 1993]	<b>Испания</b> , Аликанте
1995	Предположение, что такие tandemные повторы весьма важны для микроорганизмов, поскольку обнаруживаются как у зубобактерий, так и архей [Mojica et al., 1995]	<b>Испания</b> , Аликанте
2000	Такие необычные tandemные повторы обнаружены у довольно большого числа прокариот [Mojica et al., 2000]	<b>Испания</b> , Аликанте
2002	Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, получают обозначение CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [Jansen et al., 2002]	<b>Голландия</b> , Утрехт, Билтховен
2002	Обнаружение CRISPR-ассоциированных Cas генов [Jansen et al., 2002]	<b>Голландия</b> , Утрехт, Билтховен
2003*	Первое предположение, что CRISPR локусы могут служить прокариотам в качестве иммунной системы [Mojica et al., 2005*]	<b>Испания</b> , Аликанте
2005	Первые упоминания в литературе, что CRISPR локусы могут служить прокариотам в качестве иммунной системы [Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005]	<b>Франция</b> , Жуи-ан-Жоза <b>Испания</b> , Аликанте <b>Франция</b> , Париж
2005	Обнаружение, что CRISPR спейсеры гомологичны некоторым последовательностям бактериофагов и плазмид [Mojica et al., 2005]	<b>Испания</b> , Аликанте
2006	Первая классификация CRISPR/Cas систем [Makarova et al., 2006]	<b>США</b> , Бетесда, Даллас
2007	Первое экспериментальное доказательство, что CRISPR/Cas системы способны обеспечить бактериям защиту от бактериофагов, в том числе показана ключевая роль Cas-белка в этом процессе, который, как тогда предположили, является нуклеазой [Barrangou et al., 2007]	<b>США</b> , Мэдисон <b>Франция</b> , Данге-Сен-Ромен <b>Канада</b> , Квебек
2008	Первое экспериментальное доказательство, что направляющая РНК и CRISPR/Cas комплекс играют ключевые роли в иммунной системе бактерий [Brouns et al., 2008]	<b>Голландия</b> , Вагенинген

2008	Первое экспериментальное доказательство, что CRISPR/Cas система интерферирует с плазмидами при их горизонтальном переносе [Marraffini, Sontheimer, 2008]	<b>США</b> , Эванстон
2009	Обнаружено, что наличие короткого мотива рядом с протоспейсером (PAM) является характерным для CRISPR/Cas систем [Mojica et al., 2009]	<b>Испания</b> , Аликанте
2010	Продemonстрировано, что Cas нуклеаза из бактерии <i>Streptococcus thermophilus</i> , делает двуцепочечные разрывы внутри протоспейсера [Garneau et al., 2010]	<b>Канада</b> , Квебек <b>США</b> , Мэдисон <b>Франция</b> , Данге-Сен-Ромен
2011	Обнаружение транс-активирующей РНК (тракрРНК), обеспечивающей созревание крРНК и способствующей образованию функционального комплекса с Cas нуклеазой [Deltcheva et al., 2011]	<b>Швеция</b> , Умеа <b>Австрия</b> , Вена <b>Германия</b> , Вюрцбург
2011	Новая классификация CRISPR/Cas систем [Makarova et al., 2011]	<b>США</b> , Голландия, <b>Швеция</b> , Франция, <b>Испания</b> , Канада
2011	Первое доказательство, что CRISPR/Cas система из бактерии <i>Streptococcus thermophilus</i> , перенесенная в далеко отстоящий на эволюционной лестнице микроорганизм <i>E.coli</i> , может придавать ему иммунитет против фаговой инфекции и плазмидной трансформации [Saprunauskas et al., 2011]	<b>Литва</b> , Вильнюс <b>Франция</b> , Данге-Сен-Ромен <b>США</b> , Мэдисон
2012	Серьезное улучшение технологии CRISPR/Cas9 редактирования геномов за счет объединения тракрРНК и крРНК в единую направляющую РНК (sgRNA) [Jinek et al., 2012]	<b>США</b> , Беркли <b>Австрия</b> , Вена <b>Швеция</b> , Умеа
2012	Заявка на патент США No 13/842859 «Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription Methods and compositions for RNA-directed target DNA modification and for RNA-directed modulation of transcription», Приоритет от 20 мая 2012 г.	<b>США</b> , Беркли Австрия, Вена
2013	Показана возможность CRISPR/Cas9 редактирования эукариотических организмов [Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013]	<b>США</b> , Кембридж, Бостон, Нью-Йорк, Беркли <b>КНР</b> , Пекин
2014	Патент США No 8,697,359 «CRISPR-Cas systems and methods for altering expression of gene products», дата выдачи 15 апреля 2014 г., Приоритет от 12 декабря 2012 г.	<b>США</b> , Кембридж
2014	Появление фирм, аффилированных с патентообладателями и патентозаявителями, получивших от них исключительные права на коммерциализацию CRISPR/Cas9 технологий	<b>США</b> , Австрия
2015	Новая классификация CRISPR/Cas систем [Makarova et al., 2015]	<b>США</b> , Германия, Дания, Голландия, Швеция, Франция, Испания, Канада, Соединенное королевство

\* Несовпадение дат объяснено выше в тексте

Дальнейшие усовершенствования CRISPR/Cas технологии последних лет в эту таблицу не включены сознательно, так как в данной статье им будет посвящена специальная глава.

#### CRISPR/Cas9-наукометрия

На бурный рост интереса к CRISPR/Cas9 технологии редактирования геномов указывает растущее число публикаций, индексируемых, например, в базе данных PubMed. Если задать поиск статей с терминами «CRISPR» и «Cas9» без указания их локализации, то таких работ по состоянию на начало мая 2017 г. окажется 3375. Однако часть статей может быть посвящена другим вопросам, а упоминание в них терминов «CRISPR» и «Cas9» оказаться как бы сделанное мимоходом. Поэтому

правильнее было вести поиск статей, где CRISPR/Cas9 технология главенствует, задавая такие параметры - `crispr[Title/Abstract] AND cas9[Title/Abstract]`, что мы и сделали, получив более точные результаты об использовании именно данного метода. Число таких статей с терминами «CRISPR» и «Cas9» в названиях и/или аннотациях, опубликованных в последние годы составило 3285, что, впрочем, не намного меньше, когда поиск этих терминов не оговаривался разделами статей. Причем самые ранние статьи в обоих случаях датируются 2011 г. Здесь надо заметить, что в базе данных PubMed индексируются не все научные журналы биологического профиля и, следовательно, выявленные цифровые данные о числе публикаций, в которых используется или детально описывается

CRISPR/Cas9 технология, полными считаются не могут, но такой задачи и не стояло, поскольку главная цель была выявить тенденцию, а она видна и так.

Поскольку наши научные интересы лежат преимущественно в области молекулярной биологии растений, то поэтому при поиске статей, в заголовках или в аннотациях которых использовались термины «CRISPR» и «Cas9», в ряде случаев в поисковую строку мы с помощью булевого оператора AND вводили слово «plant», чтобы оценить соотношение исследований по «CRISPR/Cas9» вообще и по растительной тематике в частности. Как можно видеть из таблицы 3 и построенной на ее основе

гистограммы (рис. 1) заметный рост числа статей с «CRISPR» и «Cas9» в целом, начинается в 2013 г., тогда как применительно к растениям - только с 2014 г., «отставая» к тому же приблизительно на порядок. Для обзорных статей имеет место та же тенденция только со сдвигом на год - с 2014 г. и 2015 г. соответственно. Собственно, такая задержка в редактировании геномов растений с помощью CRISPR/Cas9 технологии абсолютно не удивительна и схожее отставание в изучении нуклеиновых кислот растений от таковых у бактерий и животных исторически всегда имело место при внедрении новых методов исследований.

Таблица 3

Публикационная активность с терминами CRISPR и Cas9 по базе данных PubMed  
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Термины в поисковой строке и их локализация	Всего	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017**
<i>crispr</i> [Title/Abstract] AND* <i>cas9</i> [Title/Abstract]	3285	1	3	73	305	690	1413	800
<i>crispr</i> [Title/Abstract] AND <i>cas9</i> [Title/Abstract] (обзоры)	469	0	0	7	38	128	220	77
<i>crispr</i> [Title/Abstract] AND <i>cas9</i> [Title/Abstract] AND plant	356	0	0	3	32	72	143	105
<i>crispr</i> [Title/Abstract] AND <i>cas9</i> [Title/Abstract] AND plant (обзоры)	80	0	0	0	6	16	39	17

\* Булевы операторы выделены курсивом

\*\* Данные по 2017 году приведены по состоянию на начало мая

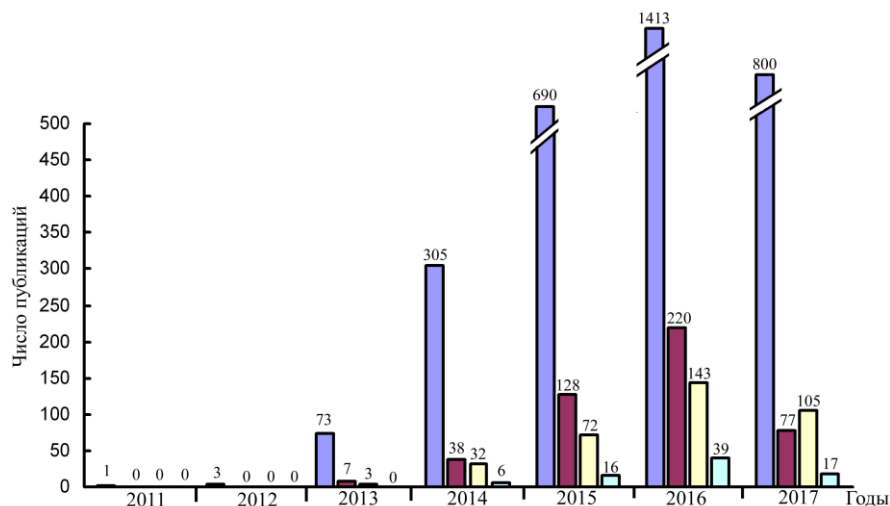


Рис. 1. Рост числа публикаций с терминами «CRISPR» и «Cas9» по базе данных PubMed вообще и по растительной тематике в частности. Данные по 2017 году приведены по состоянию на начало мая.

1 - *crispr*[Title/Abstract] AND *cas9*[Title/Abstract]. 2 - *crispr*[Title/Abstract] AND *cas9*[Title/Abstract] (обзоры).

3 - *crispr*[Title/Abstract] AND *cas9*[Title/Abstract] AND plant. 4 - *crispr*[Title/Abstract] AND *cas9*[Title/Abstract] AND plant (обзоры)

Экстраполируя данные за 4 месяца 2017 г., можно предположить, что число экспериментальных статей уверенно превысит показатели 2016 г. Причем для нас отрадно то, что количество исследований по редактированию геномов растений в последние годы растет даже несколько опережающими темпами. Хочется надеяться, что эта тенденция роста интереса к растительным объектам сохранится при этом,

несомненно, увеличится участие отечественных ученых, в том числе в экспериментальных статьях, в подготовке и написании которых также возможен и вклад авторов данного обзора.

Можно обратиться к одной статье китайских авторов [Du et al., 2016], при подготовке которой они воспользовались свежей версией специальной программы CiteSpaceV

(<http://cluster.cis.drexel.edu/~cchen/citespace/>) [Chen et al., 2005], позволяющей проводить анализ не только цитирований статей, но и составлять географическую карту тех или иных исследований по миру и проследить коллаборацию различных организаций, а также оценивать и некоторые другие параметры. На приведенной в их статье такой карте указано немало стран, среди которых имеется и Российская Федерация, но, помимо Российской академии наук (упомянутой в целом), отдельно там указан лишь Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, который на протяжении уже многих лет использует CRISPR локусы для генотипирования штаммов патогенных бактерий [Mokrousov et al., 2007; 2009; 2014], о чем будет говориться в отдельной статье в этом номере [Кулуев и др., 2017]. При этом не упомянут конкретно Институт молекулярной генетики РАН, в котором довольно интенсивно на протяжении многих лет в сотрудничестве с зарубежными и отечественными коллегами ведутся исследования CRISPR/Cas систем [Пугач и др., 2012; Semenova et al., 2009; 2011; 2016; Pougach et al., 2010; Datsenko et al., 2012; Beloglazova et al., 2015; Xue et al., 2015; Kuznedelov et al., 2016; Mekler et al., 2016; Severinov et al., 2016]. Этими китайскими авторами [Du et al., 2016] было также показано, что США значительно опережают другие страны по числу публикаций с CRISPR/Cas терминами, при этом Китайская академия наук по этому показателю по их данным выглядит в целом довольно неплохо. Обращение китайских авторов к базе данных Web of Science выявило, что с 2002 г. (когда впервые появился термин CRISPR) по декабрь 2015 г. в ней прореферировано 1908 экспериментальных и обзорных статей. Мы с некоторыми отклонениями повторили их анализ, также сдвинув сроки и продлив запрос до конца июня 2017 г., обнаружив в результате увеличение числа подобных публикаций, попавших в базу данных Web of Science, что представлено в таблице 4, из которой виден продолжающийся рост количества статей с упоминанием CRISPR. При этом в среднем в одной новой статье (без деления на обзорные и экспериментальные) в последние годы цитируются 18-19 работ по CRISPR.

Таблица 4  
Рост числа публикаций с термином «CRISPR»  
по базе данных Web of Science

Годы	Число публикаций	Число цитирований	Среднее число цитирований в одной статье других «CRISPR-статей»
2012	134	3827	29
2013	282	7005	25
2014	694	14772	21
2015	1295	24584	19
2016	2334	42808	18
2017*	1286	24196	19

\* Данные по 2017 году приведены по состоянию на конец июня

При этом самыми цитируемыми статьями на конец июня 2017 г. по-прежнему остаются работы Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Jinek et al., 2012 – соответственно 2799, 2243 и 2104 цитирований (по данным Web of Science), тогда как полтора года назад в конце 2015 г. таковых было существенно меньше – 1453, 1296 и 1051.

Ситуация с CRISPR/Cas редактированием геномов является отличной иллюстрацией отложенного внедрения фундаментальных результатов в практику. Причем от первого получения информации о таких типах повторов в геномах бактерий до подачи первой заявки на патент, защищающий технологию практического применения в виде редактирования геномной ДНК с помощью CRISPR/Cas систем, прошла целая четверть века. Около десятилетия ушло на то, чтобы применить на практике ставший более-менее понятным процесс механизма защиты бактерий от проникновения чужеродной ДНК. Для этого потребовалась шедшая по нарастающей работа очень большого числа экспериментаторов и теоретиков, в которую вовлекалось все больше ученых разных стран, что хорошо видно из увеличивающегося год от года числа статей по CRISPR/Cas системам. И эта работа продолжается, поскольку не все вопросы с геномным редактированием еще решены, да и, как известно, совершенству предела нет, и об этом как раз речь пойдет дальше.

#### Разнообразие CRISPR/Cas систем

В настоящее время принято считать, что особенности организации CRISPR локусов позволяют «уложить» их в 19 подтипов, относящихся к 6 типам и двум классам. Первые классификации CRISPR систем насчитывали всего три типа, затем пять типов их организаций [Makarova et al., 2006; 2011; 2015; Makarova, Koonin, 2015; Koonin et al., 2017], теперь их стало шесть [Barrangou, Horvath, 2017]. CRISPR локусы в мире бактерий довольно широко распространены и их разнообразие весьма велико, а различия при этом столь существенны, что вполне уместно считать, что единого эволюционного предка у них нет. Нет филогенетического родства между CRISPR-системами первого и второго классов, а также эволюционной близости тех или иных бактерий, их несущих.

CRISPR/Cas системы, отнесенные к первому классу, характеризуются наличием мультисубъединичного комплекса ферментов, получившего название Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defence), тогда как нуклеазы второго класса представляют собой единичный, но мультидоменный белок. К первому классу отнесены CRISPR/Cas системы I, III и IV типов. Второй класс объединяет CRISPR/Cas системы II, V и VI типов. I тип является наиболее распространенным и при этом весьма переменчивым. Эффекторной нуклеазой является Cas3. Этот тип CRISPR/Cas систем присущ в том числе кишечной палочке *E.coli*. Тип III, несущий нуклеазу Cas10, распространен преимущественно среди архей, редко встречаясь у бактерий. Тип IV

довольно плохо пока изучен и его функции не до конца ясны.

Тип II с нуклеазой Cas9 из второго класса встречается у бактерий не очень часто и ранее у архей не выявлялся, однако недавно был обнаружен у двух неподдающихся культивированию архей из групп Micrarchaeota и Parvarchaeota [Burstein et al., 2017]. При этом CRISPR/Cas система с эффекторной нуклеазой Cas9 оказалась наиболее удобной для геномного редактирования и именно она сейчас широко используется. Ранее составленная классификация CRISPR/Cas9 систем [Chylinski et al., 2014] весьма быстро устарела ввиду активного изучения CRISPR/Cas систем этого типа и постоянного поиска все новых вариантов. Надо заметить, что конкуренцию Cas9 нуклеазам начинают составлять нуклеазы Cas12 (тип V), которые имеют неплохой потенциал, но им в данной статье специально посвящен отдельный раздел. Недавно обнаруженная система CRISPR/Cas13 (тип VI) в качестве мишеней для деградации используют чужеродную одноцепочечную РНК [Shmakov et al., 2015; Abudayyeh et al., 2016]. Интересный вариант ее использования в виде аналитической системы детекции SHERLOCK [Gootenberg et al., 2017] будет рассмотрен в другой сопровождающей этот материал нашей статье [Кулуев и др., 2017].

Значительный вклад в поиск новых CRISPR систем вносит полногеномное секвенирование, в том числе метагеномное. Так, например, метагеномным секвенированием представителей рода *Flavobacterium*, обитающих в Антарктиде, показано, что обнаруженные тысячи новых спейсеров для CRISPR/Cas системы второго типа абсолютно не совпадают с таковыми, типичными для этого рода бактерий, но обитающих в Северном полушарии [Lopatina et al., 2016]. При этом секвенирование ДНК бактерий *E.coli*, обнаруженных в кишечнике мамонтенка возрастом около 42 тысяч лет, показало, что многие спейсеры CRISPR/Cas системы первого типа совпадают с таковыми, характерными для нашего времени [Savitskaya et al., 2017]. Недавно метагеномное секвенирование некультивируемых микроорганизмов позволило выявить две новых нуклеазы CasX и CasY, относящихся к типу II, но отличающихся от известных до этого. Анализ архитектуры этих CRISPR локусов позволил отнести CasX и CasY к новым подтипам типа V [Koonin et al., 2017].

Учитывая, что биоразнообразие бактерий и архей достаточно велико, можно не сомневаться в том, что еще далеко не все типы CRISPR локусов известны и их будут продолжать находить, в том числе благодаря бурно развивающемуся полногеномному секвенированию. Для поиска различных CRISPR элементов в виде повторов как таковых у различных микроорганизмов с полностью или частично секвенированными геномами существуют немало специализированных web-ресурсов и баз данных, которые достаточно подробно рассмотрены в другой нашей статье [Баймиев и др., 2017].

### Механизм защиты своих геномов у бактерий и архей на примере CRISPR/Cas9 системы

Как теперь известно, CRISPR элементы - это некая «память» микроорганизмов о произошедших на них нападений патогенных агентов, от которых им впредь необходимо защищаться. Упрощенная схема этого процесса выглядит следующим образом. На первой стадии, называемой адаптацией, некий микроорганизм небольшой фрагмент проникшей в бактериальную клетку чужеродной ДНК (бактериофага) встраивает в свой геном, в соответствующий CRISPR-локус, формируя новый спейсер и располагая его определенным образом (впереди остальных, встроенных ранее аналогичных последовательностей). Здесь можно заметить, что каждая бактериальная клетка будет встраивать в свой геном отличающиеся участки ДНК проникшего в нее патогена, поскольку таковых, пригодных в качестве мишеней при последующих инфекциях, существует множество, а согласованно бактерии действовать не могут и это тоже является определенным защитным механизмом, ввиду того, что если в «выбранном» бактерией месте генома фага произойдет мутация, то при последующих инфекциях он не подвергнется атаке и преодолет иммунную систему клетки-хозяина, однако другие бактериальные клетки в этой популяции, захватившие при адаптации другие участки с таким мутировавшим фагом справятся [van Houte et al., 2016]. На второй стадии – транскрипции – происходит транскрипция всего CRISPR локуса, сопровождаемая процессингом, в результате которого образуются короткие крРНК, связывающиеся с обладающей шпилечной вторичной структурой *транс*-кодируемой РНК. На третьей стадии, названной интерференцией, формируется комплекс из этих крРНК и тракрРНК с Cas нуклеазой, где спейсер (вариабельный участок молекулы крРНК) связывается с фрагментом чужеродной ДНК - «протоспейсером», а Cas фермент его разрушает. Обязательным условием такого действия комплекса крРНК/тракрРНК/Cas нуклеаза является не только узнавание ДНК-мишени комплементарной ей крРНК, но и наличие рядом на 3'-конце комплементарной цепи ДНК участка PAM, который для системы с Cas9 представляет собой последовательность NGG, где N – любой нуклеотид. ДНК-мишень разрезается путем внесения на расстоянии трех нуклеотидов от PAM двух одноцепочечных разрывов на противоположных цепях ферментативными активностями HNH и RuvC нуклеазы Cas9. В присутствии ионов магния первая из них разрезает цепь ДНК, спаренную с крРНК, а вторая – комплементарную ей, что в итоге приводит к двуцепочечному разрыву

Выяснению тонкого механизма действия CRISPR/Cas систем уделяется серьезное внимание и этим вопросам посвящено немало работ, в том числе с использованием рентгеноструктурного анализа CRISPR/Cas комплексов [Anders et al., 2014; Nishimasu et al., 2014; O'Connell et al., 2014; Sternberg et al., 2014; 2015; Szczelkun et al., 2014; Jiang et al., 2015; Sontheimer, Barrangou, 2015; Hirano et al., 2016; 2016a; Mekler et al., 2016; 2017; Jiang, Doudna, 2017;

Nishimasu, Nureki, 2017; Xu X. et al., 2017 и др.] однако это должно быть предметом рассмотрения в отдельной статье, тогда как здесь придется ограничиться лишь очень кратким описанием данного процесса. Так, сначала нуклеазный комплекс с молекулами РНК узнает РАМ последовательность после чего происходит выяснение наличия после него протоспейсерного участка, гомологичного спейсеру крРНК, и при его обнаружении происходит образование одно/двухцепочечной структуры ДНК/РНК в локальном месте, сопровождаемое проявлением каталитической активности Cas нуклеазы, приводящей к разрушению целостности молекулы ДНК.

При использовании технологии CRISPR/Cas9 в геномной инженерии происходит репарация образовавшегося двухцепочечного разрыва и она может происходить двояко. Репарация может производиться за счет неомологичного соединения концов фрагментов ДНК (NHEJ) и за счет того, что эти действия «склонны к ошибкам» могут иметь место инделы (инсерции или делеции) одного или нескольких нуклеотидов, что в итоге может приводить к нарушению рамки считывания кодируемого этим участком ДНК белка, что нарушит его функциональность. Репарация путем гомологичной рекомбинации (HDR) предполагает редактирование целевого участка или вставку новой последовательности, которая может нести желательный для экспериментатора признак, но для этого необходимо, чтобы такой фрагмент донорной ДНК присутствовал в месте действия.

#### **Конструирование CRISPR/Cas элементов для редактирования геномов**

Серьезное улучшение и одновременно упрощение CRISPR/Cas9 технологии, с которой и началось ее массовое применение на практике, произошло после того как было предложено объединить две молекулы крРНК и тракрРНК в единое целое, получившие название single guide RNA (sgRNA) [Jinek et al., 2012], в русскоязычных статьях обозначаемую как единую направляющую РНК либо просто направляющую РНК или гидовую РНК (гидРНК). После обнаружения такой возможности объединения молекул РНК стали во множестве создаваться специализированные векторные конструкции, несущие различные элементы или вместе (типа all-in-one) или по отдельности для редактирования геномов различных организмов с оптимизацией кодонов для лучшей трансляции при синтезе Cas9 нуклеазы. Причем для наработки гидРНК для редактирования нужного гена достаточно ограничиться клонированием в определенное место вектора только варибельного участка (спейсера), поскольку константная часть этой молекулы в таких плаزمиде уже присутствует.

Так, довольно большое разнообразие плазмид, применяемых при геномном редактировании системой CRISPR/Cas, представлено сейчас в репозитории Addgene (<http://www.addgene.org>). С учетом повышенного интереса к этой технологии в данном репозитории

специально подготовлен раздел CRISPR (<http://www.addgene.org/crispr/>), где можно вести поиск необходимых экспериментатору плазмид по их функциям, где имеется алфавитный список авторов, предоставляющих данные конструкции, а также содержатся рекомендации по планированию экспериментов, дизайну направляющих РНК и ряду других вопросов. Для дизайна экспериментов по CRISPR/Cas редактированию и подбору молекул гидРНК, учитывающему, в том числе off-target связывание на геномной ДНК можно воспользоваться многочисленными компьютерными программами, рассмотрению которых в этом номере посвящена отдельная статья [Чемерис и др., 2017], где нами рассмотрено большое число таких специализированных программ и специализированных баз данных. Здесь следует лишь заметить, что успешное CRISPR/Cas редактирование геномов в значительной мере зависит от дизайна гидРНК, который должен проводиться в том числе с целью снижения вероятности образования гибридных дуплексов ДНК/гидРНК в нецелевых местах генома.

Репозиторий плазмид AddGene организован в 2004 г. и к настоящему времени разросся до весьма внушительного хранилища различных плазмид, которые для некоммерческих организаций за умеренную плату (\$65) оказываются доступны после подписания соответствующего соглашения Material Transfer Agreement. В специальной статье, посвященной репозиторию AddGene [Joung et al., 2015], приведена динамика запросов плазмид, с помощью которых может осуществляться геномное редактирование в том числе CRISPR/Cas технологией, свидетельствующая, что в 2014 г. было разослано около 21 тысячи плазмид. Здесь можно еще добавить, что все плазмидные вектора в этом репозитории по востребованности подразделены на фактически четыре категории - популярные (от 20 до 50 запросов), более популярные (50-100 запросов), наиболее популярные (свыше 100 запросов) и все остальные. Плазмиды первых трех категорий несут в каталоге значки соответствующего цвета – оранжевый, красный и синий.

#### **Доставка CRISPR/Cas компонентов в растительную клетку и детекция результатов редактирования**

Создание конструкции для редактирования конкретных(ого) мест(а) в том или ином геноме на основе векторных плазмид, содержащих необходимые CRISPR/Cas элементы, это только часть дела, поскольку эти молекулы ДНК или их транскрипты или даже продукт трансляции Cas гена должны быть как-то доставлены внутрь клетки. В настоящее время доставка гидРНК и нуклеазы Cas9 в растительные клетки осуществляется несколькими способами, которые можно разделить на две категории – прямые и непрямые [Ran et al., 2017]. К последним относятся те, что используют промежуточного «хозяина» в виде некоего живого организма, которым чаще всего выступают агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* и

*A.rhizogenes*, несущие соответствующие генетические конструкции с нужными генами. Также в качестве переносчиков используются некоторые вирусы растений, о которых будет говориться ниже.

Агробактериальная трансформация, осуществляемая различными путями, является одним из наиболее простых и проверенных способов доставки чужеродной ДНК внутрь растительных клеток. Поэтому создано уже немало бинарных векторов, где необходимый комплекс генов, требующихся для редактирования геномов («ген(ы) гидРНК, ген Cas нуклеазы<sup>1</sup>), помещены (чаще всего) под промоторы U6 (риса или арабидопсиса) РНК полимеразы III и под 35S промотор (или иного подходящего промотора) в готовые вектора между LB и RB участками T-ДНК. Такой способ редактирования был использован, например, для генома арабидопсиса, риса и других растений [Ma et al., 2015; Kim H. et al., 2017; Ordon et al., 2017; Tsutsui, Higashiyama, 2017]. Недостатком этого подхода является то, что созданное трансгенное растение будет конститутивно экспрессировать эти чужеродные для него элементы в виде Cas нуклеазы и гидРНК в больших количествах, фактически повышая вероятность их off-target функционирования. Поэтому вполне логичным выглядит вариант со встраиванием в геном, например только генов гидРНК, тогда как транскрипция гена Cas происходит транзитивно с доставленной в клетку другой плазмиды, несущей данный ген. В этом случае требуется использование двух разных плазмидных конструкций. Такой подход был применен, например, при редактировании модельного растения австралийского табака *Nicotiana benthamiana* [Nekrasov et al., 2013], где был успешно отредактирован ген *pds*, кодирующий фитоендесатуразу. С другой стороны, эффективность редактирования значительно повышается при создании трансгенного растения со встроенными генами гидРНК и Cas нуклеазы по сравнению с тем, если они экспрессируются транзитивно. Так, было показано, что при редактировании двух генов у табака *Nicotiana tabacum* эффективность мутаций составила от 16,2 до 20,3% при транзитивной экспрессии, тогда как в полученном полноценном трансгенном растении эффективность редакции одного гена составила 81,8%, а второго – 87,5% [Gao et al., 2015].

В ряде работ для CRISPR/Cas9 редактирования растительных геномов описано использование вирусных векторов, несущих гены гидРНК и сконструированных на основе или вируса погремковости табака (Tobacco Rattle Virus – TRV) [Ali et al., 2015] или геминивируса, вызывающего курчавость листьев капусты (Cabbage Leaf Curl Virus - CaLCuV) [Yin et al., 2015], либо некоторых других вирусов [Čermák et al., 2015; Gil-Humanes et al., 2017; Zaidi, Mansoor, 2017]. Для доставки в клетку готовых конструкций с генами гидРНК использовалась

агроинфильтрация и биобаллистическая трансформация. В одной работе было предложено использовать *A.rhizogenes* в качестве переносчика генов Cas9 и гидРНК в составе соответствующего бинарного вектора в листья томатов с намерением вызвать быстрый рост косматых корней (hairy roots), в которых предлагается оценивать эффективность редактирования геномной ДНК [Jacobs et al., 2016]. Однако при этом авторы справедливо замечают, что регенерация полноценных растений из косматых корней для разных видов растений может быть проблематичной. К тому же надо иметь в виду, что внедрение в геном *rol*-генов, обеспечивающих феномен косматых корней и встройка из бинарного вектора фрагмента ДНК, фланкированного RB и LB участками - это фактически независимые трансформационные события.

К прямым методам доставки CRISPR/Cas9 кассет в клетки растений относятся полиэтиленикольная трансформация протопластов или их электропорация, а также биобаллистическая трансформация. При этом доставляемые молекулы могут быть как ДНК конструкциями, экспрессирующимися транзитивно [Jiang et al., 2013], так и формируемыми *in vitro* рибонуклеопротеидными частицами, о которых надо сказать особо. Так, впервые рибонуклеопротеин, состоящий из очищенной Cas9 нуклеазы и транскрибированной *in vitro* гидРНК, был применен для редактирования генома нематоды *Caenorhabditis elegans* путем инъекции образующегося за 10 мин при 37°C такого комплекса в гонады этого червячка [Cho et al., 2013]. Только через два года с использованием заранее образованного аналогичного рибонуклеопротеидного комплекса из Cas9 нуклеазы и гидРНК было осуществлено редактирование геномов нескольких видов растений - арабидопсиса, табака, салата и риса [Woo et al., 2015]. В этой работе доставка такого комплекса в протопласты растений велась с помощью полиэтиленикольной трансформации. Затем последовали сходные работы по редактированию генома петунии [Subburaj et al., 2016], винограда и яблони [Malnoy et al., 2016]. Геном хламидомонады был отредактирован также с помощью комплекса из Cas9 нуклеазы и гидРНК, который был введен в клетки этой одноклеточной зеленой водоросли с помощью электропорации [Baek et al., 2016]. Биобаллистическая процедура доставки рибонуклеопротеидного комплекса Cas9/pРНК была впервые успешно применена при редактировании генома кукурузы [Svitashev et al., 2016]. В одной из работ сообщается об использовании для доставки такого редактирующего комплекса в растения пшеницы как полиэтиленикольной трансформацией протопластов, так и бомбардировкой тканей золотыми частицами с нанесенными на них рибонуклеопротеином из Cas9 нуклеазы / гидРНК [Liang et al., 2017] в «протеолистической» модификации данного метода [Martin-Ortega, Wang, 2014]. Высокая специфичность такого способа редактирования геномов обуславливается тем, что в отсутствие ДНК нечему встраиваться в хозяйский геном, и нет

<sup>1</sup> При этом ген Cas9 может нести оптимизированные кодоны для трансляции в растениях или в эукариотах.

длительного последствия такого комплекса, который продолжает постоянно формироваться в случае создания полноценных трансгенных растений с этими генетическими элементами. Так, на пшенице было показано, что off target мест с использованием рибонуклеопротеидных частиц Cas9/гидРНК не отредактировано [Liang et al., 2017].

При этом Cas9 нуклеаза и гидРНК могут иметь разное происхождение, имея в виду, что гидРНК может быть наработана в системе *in vitro* с использованием конструкции, несущей ген гидРНК под промотором T7 РНК полимеразы или синтезирована химическим путем. Cas9 нуклеаза может быть наработана в *E.coli* с помощью экспрессионного вектора, несущего ген данного белка под контролем подходящего промотора, или как фермент просто приобретена из коммерческих источников, поскольку уже многие фирмы включили в свой ассортимент товаров данную позицию.

Еще одним вариантом доставки нуклеазного комплекса внутрь клеток является шприцевая инъекция его предшественников, применяемая пока только на животных организмах (мышь, пчела и аквариумная рыбка *Dario rerio* [Gagnon et al., 2014; Romanienko et al., 2016; Kohno et al., 2016; Xie et al., 2016]. Для этого с помощью T7 РНК полимеразы проводилась транскрипция *in vitro* и наработанные и очищенные (гель-электрофорезом) транскрипты гидРНК и Cas9 белка смешивались в нужной пропорции и вводились в ооциты, где на рибосомах хозяина синтезировалась данная нуклеаза. Теоретически подобный подход может быть применен и для растений только вместо инъекции шприцом следует использовать бомбардировку золотыми частицами.

После того как образованный в клетке или доставленный в нее тем или иным путем комплекс Cas9 нуклеаза/гидРНК поработает и произведет редактирование генома, необходимо отобрать те формы растений, в которых запрограммированные экспериментатором процессы произошли. Так, при получении трансгенных растений для отбора отредактированных форм иногда предлагается воспользоваться неким маркерным белком (например, в случае вектора рКАМА-ITACHI (рKIR) это красный флуоресцентный белок - RFP [Tsutsui, Higashiyama, 2017]), считая, что практически все (или подавляющее большинство) несущие данный маркерный признак растения будут характеризоваться намеченными мутациями. Использование для доставки CRISPR/Cas компонентов агробактерии *A. rhizogenes*, вызывающей образование косматых корней (hair roots) также свидетельствует о произошедшей в таком образце геномном редактировании [Michno et al., 2015]. Нарушение (нокаут) уже упоминавшегося выше гена фитоендосатуразы приводит к побелению листьев, что также служит подтверждением произошедшего редактирования генома. Однако таких косвенных свидетельств недостаточно и обязательно требуется уточнение произошедшей редакции.

В случае нокин экспериментов может быть проведена ПЦР с праймерами, обеспечивающими амплификацию встраиваемого гена, причем для большей убедительности один из праймеров следует подбирать к фланкирующему участку генома. При нокаутировании генов необходимо выявлять инделы в редактируемом участке и в этом случае без ПЦР не обойтись для чего предложены различные вариации детекции продуктов ПЦР, позволяющие выявлять различия между диким типом и мутантными формами. Самым надежным способом и при нокин и нокаутных экспериментах является секвенирование редактируемого участка генома, однако этот метод относительно трудоемок и дорог, поэтому предваряющими его могут быть различные другие методы, используемые при выявлении обычного полиморфизма ДНК, в большинстве своем основанные на ПЦР. Среди тех, что уже использовались при поиске CRISPR/Cas отредактированных мутантов можно упомянуть следующие. Так, для выявления образовавшихся инделов в одной из работ рекомендуется проведение капиллярного гель-электрофореза, обеспечивающего разделение флуоресцентно-меченных ампликонов (благодаря использованию одного из праймеров, несущих соответствующую метку) с точностью до нуклеотида [Ramlee et al., 2017]. Ранее при поиске произведенных мутаций предлагалось производить высокоточное плавление (HRM) ампликонов и даже их обычное плавление [D'Agostino et al., 2016]. В другой работе отличия в нуклеотидной последовательности ампликонов, включающих в себя отредактированный участок, выявляли с помощью метода SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism [Zheng et al., 2016]. Крайне важно выявить гомозиготный либо гетерозиготный статус имеют мутантные формы и для этого использовалась цифровая ПЦР [Findlay et al., 2016], а также детекция лигированием с помощью термостабильной ДНК лигазы отжигающихся на ампликонах флуоресцентно меченных олигонуклеотидов [Kc et al., 2016]. Недавно для скрининга CRISPR/Cas9 мутантов предложена ПЦР с критичной для одного из праймеров температурой отжига [Hua et al., 2017], а также обратно-транскрипционная ПЦР [Albers et al., 2017]. Опубликована также статья [Harayama, Riezman, 2017], в которой описывается трехпраймерная ПЦР, позволяющая уверенно выявлять гомозиготный статус исследуемых мутагенезированных образцов.

В литературе можно встретить немало подробных протоколов по использованию CRISPR/Cas9 технологии для редактирования геномов различных организмов, в том числе растений [Ran et al., 2013; Li et al., 2014; Мензоров и др., 2016; Немудрый и др., 2016; Ma, Liu, 2016; Lowder et al., 2017; Schmil et al., 2017].

#### Совершенствование CRISPR/Cas технологии для редактирования геномов

Здесь под «совершенствованием» следует понимать как повышение эффективности при одновременном снижении неспецифичности

редактирования геномов, так и упрощение всей методики при осуществлении этого процесса и о последней составляющей успешности редактирования уже говорилось выше при описании способов доставки CRISPR/Cas компонентов в клетки растений. Так, одним из главных недостатков CRISPR/Cas9 технологии является относительно высокая вероятность образования нецелевых мутаций, вследствие ошибочного спаривания гидПНК (ее варибельного спейсерного участка) с мишенью ДНК (протоспейсером). Так, например, недавно сообщено об очень высоком уровне нецелевых мутаций у мышей, вызванных CRISPR/Cas9 редактированием [Schaefer et al., 2017]. Путем полногеномного секвенирования двух особей у них было обнаружено соответственно незапланированных 164 и 128 инделов, а также 1736 и 1696 однонуклеотидных замен против обычных мутаций в поколениях в виде 3-4 инделов и 90-100 снипов, при этом у этих мышей в результате геномного редактирования совпали 117 инделов и 1397 однонуклеотидных замен, что говорит о неслучайности данного процесса. Чтобы максимально исключить появление нежелательных мутаций необходимо следовать определенным правилам и использовать соответствующие подходы. При этом в одной из статей [Wolt et al., 2016] приведена подборка полученных разными авторами данных по разным видам растений, в которой дана оценка возможных нецелевых мутаций, и надо сказать, что во многих случаях редактирование с помощью CRISPR/Cas систем, как работающих транзистентно, так и после их внедрения в геномы растений было исключительно планируемым, то есть мутациям подвергались фактически только лишь целевые сайты.

Во многом эффективность редактирования геномов зависит от удачного выбора участка редактирования (протоспейсера), для которого должна создаваться (синтезироваться) гидПНК, характеризующаяся подходящей вторичной структурой и не имеющая в других местах генома совпадающих нуклеотидных последовательностей. Как уже говорилось выше, для подбора таких оптимальных участков существует немало компьютерных программ, анализ которых сделан нами в другой статье [Чемерис и др., 2017]. Здесь же в качестве примера успеха эксперимента от правильности дизайна гидПНК можно привести статью, в которой было показано, что точность и эффективность редактирования сильно зависит от компьютерного анализа [Liang et al., 2016]. Установлено, что гомология 5'-конца, где замен не должно быть более трех из 10-12 нуклеотидов, более важна для обеспечения специфичности процесса, поскольку на 8-10 нуклеотидах 3'-конца допускается и менее полное спаривание.

Как уже говорилось выше полнота редактирования намеченных мест в геноме будет тем больше, чем дольше будет в клетке работать рибонуклеопротеидный комплекс Cas/гидПНК (тем более в случае его конститутивной экспрессии), но при этом также возрастает вероятность нецелевого

редактирования. В этой связи неким оптимальным решением является контролирование работы такого комплекса по времени, что может быть достигнуто разными путями. Так, транзистентная экспрессия введенной в клетки плазмидной ДНК, несущей хотя бы один из компонентов системы (ген Cas белка либо «ген» гидПНК), обеспечивает прекращение процесса редактирования через некоторое время и об этом уже говорилось выше при описании способов доставки. Другим решением может служить индуцирование работы нуклеазы, которая для этого должна быть «сшита» с каким-либо другим подходящим белком, реагирующим на введение соответствующих низкомолекулярных соединений или на воздействие света. Причем, желательно, чтобы имелась возможность как включения, так и выключения процесса редактирования. Например, нуклеаза Cas9, «сшитая» с гормон-связывающим доменом рецептора эстрогена, получившая название iCas9, обратимо индуцировалась 4-гидроокситамоксифеном [Liu K.I. et al., 2016]. В тоже время существуют и противоположные варианты, когда Cas нуклеаза не сшита с чем-то, а сама разделена на две части, поскольку для работы целого фермента они могут собраться с помощью гидПНК [Wright et al., 2015]. Такой подход успешно продемонстрирован на австралийском табаке *N.benthamiana*, когда созданное с помощью агробактериальной трансформации трансгенное растение, несущее участок ДНК, кодирующий гидПНК, а также фрагменты ДНК, кодирующие приблизительно треть или две трети фермента (аминокислоты с 1 по 430 или с 431 по 1053), становилось способным вести редактирование своего генома после его инфицирования рекомбинантным вирусом, содержащим ген, кодирующий дополняющую часть фермента и работающий лишь некоторое время [Caia et al., 2017].

В литературе описаны и более сложные способы контроля за работой CRISPR/Cas9 систем [Maji et al., 2016]. Обзор различных вариантов контроля за CRISPR/Cas9 редактированием можно найти в статье J.A.Doudna и соавт. [Nunes et al., 2016].

Относительно простым способом уменьшить число нецелевых отредактированных сайтов служит использование модифицированных Cas нуклеаз. Так, мутации в одном из каталитически активных доменов (H840A и D10A в RuvC и HNH соответственно) превращают Cas9 нуклеазу фактически в никазы, поскольку другой неизменный домен будет разрезать только одну цепь. Благодаря этому при использовании двух разных гидПНК, связанных каждая со своей отличающей Cas9 никазой, обеспечивается значительное уменьшение возникновения нецелевых мутаций, при том, что эффективность всего процесса редактирования заметно не снижается [Ran et al., 2013a]. Имеется немало примеров редактирования генома растений с помощью таких парных никаз [Fauser et al., 2014; Mikami et al., 2016]. Если провести сайт-направленный мутагенез этих мест (H840A и D10A) одновременно в обоих

каталитических доменах, то такая Cas9 нуклеаза потеряет способность к разрезанию цепей ДНК и станет dCas9 (d – от слова dead или deactivated), однако, если такую измененную нуклеазу сшить с мономером эндонуклеазы *FokI*, то при использовании двух таких ферментных комплексов с соответствующими гидРНК, образуется уже димер *FokI*, который только и способен проявлять каталитическую активность [Guilinger et al., 2014]. Этот подход с двумя гидРНК и никазами / *FokI* эндонуклеазами (fCas9) заметно увеличивает специфичность системы CRISPR/Cas9, поскольку разрезание цепей ДНК будет происходить при взаимодействии двух спейсеров/протоспейсеров и вероятность ложного узнавания этих последовательностей в геноме на расстоянии, обеспечивающем взаимодействие для fCas9 (около 35 нуклеотидов) будет крайне низка.

В одной из работ показано, что некоторые мутантные формы Cas9 нуклеазы, одна из которых получила обозначение *SpCas9 HF1* (High Fidelity) в гораздо меньшей степени редактируют нецелевые сайты [Kleinstiver et al., 2016]. Эта работа основывалась на предыдущих наблюдениях, что аминокислотные остатки N497, R661, Q695, Q926 взаимодействуют с ДНК-мишенью [Anders et al., 2014] и было решено их заменить, чтобы ослабить такое взаимодействие. В итоге вариант такой нуклеазы с заменами всех этих аминокислот на остатки аланина (N497A, R661A, Q695A, Q926A) показал наиболее высокую специфичность и при этом ухудшение эффективности редактирования целевых сайтов отмечено не было.

Использование гидРНК с укороченным спейсером несколько снижает (в ряде случаев до 5 тысяч раз) взаимодействие CRISPR/Cas систем с нецелевыми сайтами в геномах, однако укорочение до 15-16 нуклеотидов оборачивается потерей каталитической активности вообще [Fu et al., 2014]. В одной из работ продемонстрировано, что использование *FokI*-dCas9 нуклеазы в комплексе с укороченной гидРНК (tru-gRNA) обеспечивает повышенную специфичность геномного редактирования [Wyvekens et al., 2015].

Объединение тракрРНК и крРНК в единую молекулу гидРНК меньшего размера привело к возможности ее химического синтеза, что в значительной мере способствовало ускорению подготовки к началу эксперимента по редактированию. К тому же появилась возможность введения в такую химически синтезированную гидРНК различных модификаций, имеющих целью защитить эти молекулы от действия РНКаз и повысить прочность их связывания с мишенью [Hendel et al., 2015; Kelley et al., 2016; Lee et al., 2017]. Есть и другие преимущества в виде игнорирования при выборе наиболее подходящих спейсерных участков некоторых последовательностей (типа UUUU), потенциально способных выполнить роль терминаторов транскрипции при наработке гидРНК в системах *in vitro* и *in vivo*.

В ряде работ продемонстрировано при процессинге множественных гидРНК, транскрибированных с одного промотора, использование при расщеплении таких молекул рибозимов, являющихся частями единого транскрипта и фланкирующих последовательности гидовых РНК [Gao, Zhao, 2014; Yoshioka et al., 2015; Lee et al., 2016; He et al., 2017]. Также для массовой продукции гидРНК предлагается использовать рестрикторную эндонуклеазу *EcoP15I* для расщепления в нужных местах подготовленных соответствующим образом фрагментированной случайным образом ДНК или кДНК [Arakawa, 2016; Cheng et al., 2016; 2017].

В недавно опубликованной статье [Song, Stieger, 2017] показано, что эффективность нокин экспериментов зависит от длины рекомбинирующих участков справа и слева от места двуцепочечного разреза. Так было исследовано три варианта с фланкирующими гомологичными участками равной длины (по 500 нуклеотидов), а также по 300/700 и 700/300 нуклеотидов с 5'/3'-сторон соответственно. При этом обнаружено, что лучшие результаты достигались при варианте с более короткой областью гомологии на 5'-конце (300 нуклеотидов) и 700 гомологичными нуклеотидами на 3'-конце.

Если в ранних экспериментах по редактированию геномов в нокин вариантах, применялась донорная ДНК в составе плазмидных векторов, содержащая не менее чем по 500 фланкирующих с обеих сторон нуклеотидов комплементарных рекомбинируемого участку (а лучше – больше), то затем стали применять и донорную линейную ДНК, в том числе в виде ампликонов, причем сразу в денатурированном одноцепочечном виде [Richardson et al., 2016; Quadros et al., 2017], что выглядит вполне оправданным, поскольку ликвидирует фактически лишние стадии всего процесса редактирования, в том числе происходящих *in vivo*. Однако недавно показано, что достаточная длина гомологичных рекомбинируемых участков в CRISPR/Cas редактировании может быть значительно меньше. Так, в одной из работ продемонстрировано, что для введения одноклеточных замен в редактируемую последовательность с помощью донорной одноцепочечной ДНК со стороны 5'-конца достаточно участка приблизительно 80-90 нуклеотидов, тогда как на 3'-конце таковой может быть еще короче – всего 30-40 нуклеотидов [DeWitt et al., 2017]. Другими авторами показано, что для успешной рекомбинации для нокин экспериментов при CRISPR/Cas9 редактировании вполне хватает 35 нуклеотидов, гомологичных участкам, фланкирующим место разреза Cas нуклеазой геномной ДНК [Paix et al., 2016; 2017]. Обнаружено, что сходной длины и даже более короткие гомологичные участки для рекомбинации при нокин экспериментах достаточны для CRISPR/Cas редактирования [Yao et al., 2017]. И это открывает небывалые возможности в плане упрощения экспериментов по нокин вариантам CRISPR/Cas редактирования, поскольку позволяет использовать

обычные ампликоны, на концы которых всего лишь необходимо «навесить» по 35 экстрануклеотидов. Вкупе с химически синтезированной гидРНК и приобретенной Cas нуклеазой и образования на их основе *in vitro* рибонуклеопротеидного комплекса время подготовительных процедур к такому геномному редактированию резко сокращается.

Несмотря на то, что PAM участок за специфичность редактирования практически не отвечает, он служит первым ориентиром для той или иной Cas нуклеазы, найдя который этот фермент начинает искать гомологию соседствующих последовательностей с гидРНК, входящей в конкретный нуклеазный комплекс. Как известно разные Cas нуклеазы узнают отличающиеся PAM участки, что таким образом расширяет возможности экспериментатора при выборе мест для редактирования. Более того, оказалось, что некоторые мутантные формы одних и тех же нуклеаз узнают разные PAM участки [Kleinstiver et al., 2015; Leenay et al., 2016; Leenay, Beisel, 2016; Siksnys, Gasiunas, 2016; Nakade et al., 2017]. Так, кроме классического фермента *SpCas9* из *Streptococcus pyogenes* дикого типа, узнающего NGG последовательность, имеется целый ряд мутантных форм этой популярной нуклеазы - *SpCas9 VRER*, *SpCas9 EQR*, *SpCas9 VQR*, узнающих соответственно участки PAM – NGCG, NGAG or NGAN. Нуклеаза из *Staphylococcus aureus SaCas9* дикого типа узнает последовательность NNGRRT, а ее KKH мутант – NNNRRT. Нуклеаза из *Francisella novicida* дикого типа узнает последовательность NGG, а RHA мутант – YG. *Neisseria meningitidis* содержит нуклеазу *NmCas9*, узнающую PAM NNNNGATT. Нуклеаза из *Streptococcus thermophilus StCas9* узнает NNAGAAW. Нуклеаза из *Treponema denticola (TdCas9)* узнает участок NAAAAC. Нуклеазы *Cpf1* дикого типа из *Acidaminococcus sp.* *AsCpf1* и *Lachnospiraceae bacterium LbCpf1* узнают одинаковые последовательности PAM участков – TTTN, а нуклеаза *FnCpf1* из *Francisella novicida* - TTN. Довольно детальный анализ различных Cas нуклеаз, включая их PAM участки, а также химерные ферменты содержится в обзоре J.Murovec и соавт. [Murovec et al., 2017].

Отдельно следует остановиться на нуклеазе Argonaute из микроорганизма *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo), которая, как было сообщено, не нуждается в PAM участке и направляющей молекулой для нее служит 5'-фосфорилированный дезоксирибоолигонуклеотид [Gao et al., 2016]. Эти обстоятельства открывали широкие перспективы для введения мутаций в ДНК различных организмов с помощью этого фермента и было опубликовано несколько работ обзорного плана, высоко оценивающих шансы этого варианта геномного редактирования [Яковлев, 2016; Martínez-Gálvez et al., 2016; Wei et al., 2016; Wolcott, 2016]. Однако, приобретая соответствующие плазмидные конструкции в репозитории AddGene, исследователи по всему миру столкнулись с невоспроизводимостью опубликованных ранее результатов [Blow, 2016; Burgess et al., 2016; 2017; Syranoski, 2016; 2016a; Lee

et al., 2016; Qi et al., 2016; Zhang, 2016; Khin et al., 2017; Javidi-Parsijani Javidi-Parsijani et al., 2017]. Это привело к тому, что редакция журнала Nature Biotechnology была вынуждена опубликовать соответствующее дополнение или Addendum [Gao et al., 2017] к оригинальной статье китайских авторов, в котором отметила, что авторы поставлены в известность о возникших проблемах с воспроизводимостью результатов при редактировании геномов нуклеазой NgAgo и они работают над этим вопросом. Тем не менее, спустя некоторое время от самих авторов поступило заявление, что они отзывают свою статью по причине того, что их результаты не смогли воспроизвести другие экспериментаторы, заметив, что они сами продолжают выяснять в чем там дело, и готовят оптимизированный протокол [Gao et al., 2017a].

Поскольку превалирующим механизмом репарации при осуществлении CRISPR/Cas9 редактирования геномов является NHEJ, что приводит к нокауту генов и превышает на порядок репарацию путем гомологичной рекомбинации, обеспечивающей нокины генов, то с целью несколько увеличить эффективность последнего процесса рядом авторов использовались дополнительные белки, способствующие обмену цепей ДНК, что от двух до шести раз усиливало данный процесс внедрения новых генов в клетки млекопитающих [Pinder et al., 2015]. Если «сшить» dCas9 или nCas9 нуклеазу с какой-либо деаминазой, то можно, не вызывая двуцепочечных разрывов проводить точечные однонуклеотидные замены, например C→T или G→A [Komor et al., 2016; Kim et al., 2017a].

### Геномное редактирование с помощью CRISPR/Cpf1 системы

Прежде чем приступить к описанию особенностей редактирования геномов с помощью *Cpf1* нуклеазы (Cas12), отнесенной ко второму классу и пятому типу CRISPR/Cas систем, считаем важным заметить, что аббревиатура CPF1 была предложена еще в 1990 г. для дрожжей для обозначения центромерного промоторного фактора (Centromere Promoter Factor) [Mellor et al., 1990], а поскольку обычно поисковики не принимают во внимание различия между строчными и заглавными буквами, то CPF1 воспринимается и как *Cpf1*, внося тем самым некоторые искажения в число статей, в которых исследовалась или использовалась такая Cas нуклеаза. Так, в базе данных PubMed содержится 94 статьи с «*cpf1*», из которых 27 опубликованы до осени 2015 г. (когда впервые была описана *Cpf1* нуклеаза под таким обозначением [Zetsche et al., 2015]) и речь в них шла преимущественно о центромерном CPF1, хотя в ряде статей под такой аббревиатурой понимались и другие термины. Но если в поисковой строке набрать «*cpf1*» и «*crispr*» с булевым оператором AND, то сервер PubMed выдает информацию о 59 таких статьях на начало июня 2017 г. Из них до конца 2015 г. кроме работы [Zetsche et al., 2015] были опубликованы еще 2 статьи, в которых упоминалась *Cpf1* нуклеаза [Shmakov et al.,

2015; Fagerlund et al., 2015], за весь 2016 г. таких статей оказалось 22, а за первые пять месяцев 2017 г. таковых стало уже 34, что свидетельствует о растущем интересе к этой Cas12 нуклеазе Cpf1.

Впервые нуклеаза, отличающаяся по организации от Cas9, была обнаружена *in silico* в геноме *Francisella tularensis* subsp. *novicida* U112 [Schunder et al., 2013], однако детальный анализ этой CRISPR/Cas системы, отнесенной к V типу, был сделан только в 2015 г. на примере микроорганизмов *Francisella novicida* U112, *Acidaminococcus* sp. BV3L6 и *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 [Zetsche et al., 2015]. Аббревиатура Cpf1 происходит от CRISPR from *Prevotella* and *Francisella*. Три основных отличия от нуклеазы Cas9 заключаются в том, что нуклеаза Cpf1 узнает расположенный на противоположном конце АТ-богатый ПАМ (5'-(T)TTN-3'), что она образует двуцепочечный разрыв с выступающими 4-5 нуклеотидами на 5'-концах и у этого фермента отсутствует второй каталитический домен HNH. Еще одним отличием всей системы CRISPR/Cas с нуклеазой Cpf1 является то, что для ее функционирования не требуется тракрПНК. И последнее является крайне важным обстоятельством, поскольку длина крПНК, достаточная для формирования активного комплекса с Cpf1 белком, ограничивается всего 42-44 нуклеотидами против обычно используемой для Cas9 нуклеазы гидПНК (фрагментов крПНК:тракрПНК) длиной около 100 нуклеотидов.

Ввиду необходимости установления особенностей Cpf1 нуклеаз и выяснения механизма действия несколько работ были посвящены таким исследованиям, включая анализ кристаллической структуры данного белка [Dong et al., 2016; Fonfara et al., 2016; Gao et al., 2016; Stella et al., 2017; Swarts et al., 2017]. Для расширения применения Cpf1 нуклеаз применительно к разным субстратам были созданы мутантные формы данных ферментов в результате чего у них несколько изменились ПАМ участки [Gao et al., 2017; Nishimasu et al., 2017]. Так, например, AsCpf1 из *Acidaminococcus* sp. после замены ряда аминокислот стала узнавать новые ПАМ в виде TУСN и TATN. В настоящее время наиболее часто используемыми Cpf1 нуклеазами являются ферменты, происходящие из *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1), *Lachnospiraceae bacterium* (*LbCpf1*), *Francisella novicida* (*FnCpf1*), причем некоторые из них можно приобрести в виде непосредственно очищенного белка из коммерческих источников.

Геномное редактирование с помощью CRISPR/Cpf1 системы с успехом применяется и для растений, но пока для ограниченного числа видов. Так, с использованием *FnCpf1* нуклеазы был проведен целевой мутагенез арабидопсиса и табака, осуществленного путем создания трансгенных растений с помощью агробактерии *A.tumefaciens*, несущей бинарный вектор с клонированными в нем последовательностями, кодирующими ген данной нуклеазы, а также соответствующих крПНК [Endo et al., 2016]. В другой работе авторы сравнили эффективность редактирования геномов арабидопсиса и риса с помощью AsCpf1 и LbCpf1

нуклеаз, причем последняя показала почти 100% результат в виде биаллельных мутаций у риса [Tang et al., 2017]. Еще две группы авторов провели редактирование генома риса через создание трансгенных растений путем трансформации агробактериями, несущими оптимизированный по кононам ген Cpf1 нуклеазы и фрагмент ДНК, кодирующий гидПНК [Xu et al., 2017; 2017a; Yin et al., 2017]. Отдельного внимания заслуживает работа, в которой произведено редактирование геномов сои и дикого табака *Nicotiana attenuata*, осуществленных с помощью полиэтиленгликольной трансформации протопластов этих видов рибонуклеотидпротеидным комплексом, сформированным из наработанной в *E.coli* Cpf1 нуклеазы и транскрибированной *in vitro* крПНК [Kim et al., 2016]. При этом off target мутаций не отмечено. Важным моментом здесь является то, что такое редактирование проводилось без участия какой-либо ДНК и образования трансгенных растений в привычном понимании произойти не могло.

Здесь, пожалуй, стоит также вспомнить о работе, в которой производилось успешное и с довольно высокой эффективностью редактирование генома мыши с помощью двух нуклеаз (AsCpf1 и LbCpf1), однако главной особенностью было то, что осуществлялась трансформация инъекцией в оплодотворенные яйцеклетки (из которых потом появились живые мыши) молекул нуклеазных ПНК и крПНК [Kim et al., 2016a], подобно тому, как это описано ранее для CRISPR/Cas9 системы.

#### Некоторые примеры редактирования геномов растений

В недавнем обзоре новосибирских авторов, к которому можно отослать заинтересованного читателя, проведен очень детальный анализ экспериментов по редактированию геномов сельскохозяйственных растений [Короткова и др., 2017]. Авторы отмечают, что большинство из 145 генов-мишеней, подвергнутых редактированию у 15 видов растений, были направлены на апробацию метода или на исследование функции выбранных генов, тогда как у 12 видов (рис, кукуруза, пшеница, ячмень, соя, картофель, томат, огурец, виноград, яблоко, грейпфрут, лен) проведено редактирование преимущественно путем нокаутирования лишь 37 генов-мишеней, являющихся негативными регуляторами тех или иных полезных свойств сельскохозяйственных культур. Не видим смысла повторно описывать здесь те результаты по редактированию геномов тех 12 видов сельскохозяйственных растений, поскольку они рассмотрены в упомянутом обзоре всесторонне. Исходя из этого, коснемся CRISPR/Cas результатов редактирования растительных геномов, не вошедших в тот перечень [Короткова и др., 2017], в том числе и других видов растений, часть из которых входят в сферу наших научных интересов.

Так, весной 2017 г. появилось несколько публикаций, в которых CRISPR/Cas9 редактированию был подвергнут аллотетраплоидный вид хлопчатника *Gossypium hirsutum*, являющийся

очень важной технической культурой. Большинство этих работ явились на данном объекте, по сути, отработкой метода CRISPR/Cas9 редактирования, которая прошла довольно успешно и эффективность мутаций выбранных мишеней, в том числе репортерных трансгенов, составила от 47,6 до 81,8% [Chen et al., 2017], 66,7 – 100% [Wang et al., 2017] и даже достигла почти полного максимума (98,8 и 100%) запланированных мутаций [Li et al., 2017]. В другой работе [Janga et al., 2017] нокаутировали репортерный ген зеленого флуоресцентного белка, ранее внедренный в хлопчатник, причем внутри данного гена с помощью программы sg RNA Scorer 1.0 выбрали три мишени для образования в этих местах инделов, эффективность образования которых варьировала от 25,1 до 49,8%. Еще в одной статье было показано, что если с помощью CRISPR/Cas9 системы вызвать нокаут гена аргиназы, то боковые корни у такой линии хлопчатника начинают расти много лучше, что может позволить успешно выращивать такие растения на различных почвах [Wang et al., 2017]. Отправной точкой для данной работы послужила ранее полученная информация, что трансгенный хлопчатник со сверхэкспрессией гена аргиназы риса характеризуется ухудшенным ростом боковых корней [Meng et al., 2015]. Ранее CRISPR/Cas9 технология была применена для борьбы с курчавостью листьев у хлопчатника, вызываемой бегомовирусом [Iqbal et al., 2016].

Недавно сообщено фактически о создании нового сорта томатов, названного Tomelo, в котором произведен нокаут гена *SIM1*, обеспечивающего у натурального растения томатов поражение мучнистой росой [Nekrasov et al., 2017]. У томата таких генов семейства *Mlo* (*Mildew resistant locus*) известно 16, но за наибольшую восприимчивость отвечает именно ген *SIM1* [Zheng Z. et al., 2016]. Анализ 145 потенциальных нецелевых сайтов в геноме томата при CRISPR/Cas9 редактировании с допущением в них 4 неспариваний показал, что ни один из них нежелательным мутациям подвержен не был. При этом ранее было показано, что это генное семейство довольно широко распространено среди однодольных и двудольных растений и продуцирует белки, привлекающие фитопатогенные грибы, вызывающие мучнистую росу [Acevedo-Garcia et al., 2014]. Ранее в геноме гексаплоидной мягкой пшеницы удалось с помощью TALEN и CRISPR/Cas9 технологий нокаутировать все шесть аллелей этого гена во всех трех субгеномах, чтобы растения стали невосприимчивы к такому опасному заболеванию как мучнистая роса [Wang et al., 2014]. Используя CRISPR/Cas9 технологию, путем агробактериальной трансформации листовых дисков японскими авторами созданы томаты с партенокарпическими бессемянными плодами [Ueta et al., 2017]. Ими был произведен нокаут гена *IAA9*, задействованного в биосинтезе фитогормонов ауксинового ряда, в результате чего у полученных в ходе трех независимых экспериментов 40 трансгенных растений двух взятых в работу сортов томатов плоды стали завязываться до опыления, причем эффективность нокаутирования составила почти

100%. Авторы отметили также изменение формы листьев, но, произведя направленное секвенирование двух потенциальных нецелевых мест связывания гидРНК, обнаружили, что в них редактирование генома места не имело. Других авторов интересовал уровень  $\gamma$ -аминоасляной кислоты для чего ими было создано значительное число растений томатов с отредактированными геномами во множестве мест, что позволило им изучать регуляцию метаболических путей [Li et al., 2017a]. Причем одной из мишеней в их экспериментах служил ген фитоендесатуразы, нарушение которого приводило к возникновению в 61% случаев при CRISPR/Cas9 редактировании данного гена растений-альбиносов, служа удобным фенотипическим признаком.

Ген фитоендесатуразы весьма часто и довольно давно используется в качестве удобной мишени в экспериментах по CRISPR/Cas редактированию геномов различных растений – пшеницы [Upadhyay et al., 2013], австралийского табака *Nicotiana benthamiana* [Nekrasov et al., 2013], яблони [Nishitani et al., 2016], арбуза [Tian et al., 2017], винограда [Nakajima et al., 2017]. Так, например, внедрение с помощью агробактериальной трансформации в геном винограда CRISPR/Cas9 кассеты, нацеленной на нокаут гена фитоендесатуразы, привело к побелению листьев. При этом было обнаружено, что молодые листья более зеленые, нежели старые, и в качестве одной из причин этого авторы выдвинули гипотезу, что они имели больше времени подвергаться геномному редактированию. Помимо нарушения гена фитоендесатуразы, фенотипические изменения можно наблюдать и при CRISPR/Cas редактировании (нокаутировании) гена фитоенсинтазы, что было показано израильскими авторами на растениях томата [Filler et al., 2017].

Также недавно сообщено об успешном нокаутировании с помощью CRISPR/Cpf1 и CRISPR/Cas9 систем нескольких аллелей гена *FAD2*, кодирующего десатуразу жирных кислот, отвечающую за превращение мононенасыщенной олеиновой кислоты в полиненасыщенные жирные кислоты у сои [Kim et al., 2017], арабидопсиса и рыжика посевного из семейства крестоцветных [Jiang W.Z. et al., 2017]. При этом показано, что в семенах рыжика содержание олеиновой кислоты повысилось с 16 до 50% при одновременном падении линолевой и линоленовой кислот с 16% до 4% и с 35% до 10% соответственно. Почти одновременно бельгийскими [Mersx et al., 2017] и израильскими [Hanania et al., 2017] авторами выполнены очень похожие работы, в которых ими произведены нокаутирования 12 и 14 локусов в генах, ответственных за наработку в табаке специфических для растений ксилоз и фукоз, причем это было сделано с целью получения суспензионных культур клеток табака для улучшенной наработки в них рекомбинантных белков терапевтического назначения.

Произведена CRISPR/Cas9 редакция 5 генов орхидеи *Dendrobium officinale*, известной как целебное растение в китайской медицине [Kui et al., 2017]. Эффективность направленного мутагенеза

этих генов, входящих в путь метаболизма лигнина, составила в их руках от 10 до 100%. Другим лекарственным растением, подвергнутым геномному редактированию, стал красный шалфей *Salvia miltiorrhiza* [Li et al., 2017b]. В этой работе был произведен нокаут гена дитерпенсинтазы, задействованной в биосинтезе вторичного метаболита таншинона, являющегося, в том числе кардиопротекторным средством. Еще одним лекарственным растением, у которого произведен нокаут одного гена, стал опиумный мак *Papaver somniferum*<sup>2</sup> [Alagöz et al., 2016]. Было показано, что нокаут гена *4'OMT2*, участвующего в биосинтезе бензилизохинолиновых алкалоидов, заметно снижал их количество в отредактированном растении.

Сообщено о редактировании генома одуванчика кок-сагыза *Taraxacum kok-saghyz*, в ходе которого было произведено нокаутирование гена *I-FFT* (*fructan:fructan 1-fructosyltransferase*), вовлеченного в биосинтез инулина, являющегося фактически антагонистом наработки каучука [Paffaldano et al., 2016]. В этой работе доставка CRISPR/Cas9 компонентов в клетку осуществлялась с помощью агробактерии *A. rhizogenes*, вызывающей образование косматых корней, послуживших фенотипическим маркером образцов, в которых должно было произойти редактирование. Так, из 11 протестированных на предмет произведенных мутаций в гене *I-FFT* образцов в 10 они были выявлены, после чего была произведена регенерация CRISPR/Cas9 отредактированных полноценных растений. Авторы отмечают, что намерены провести дополнительные исследования для выяснения изменения соотношения каучук/инулин в корнях этих растений, что позволит ускорить процесс одомашнивания одуванчика кок-сагыза. Недавно другими авторами показано, что сверхэкспрессия в полученных обычным путем трансгенных одуванчиках кок-сагызе и близком виде *T. brevicorniculatum* гена фруктан 1-экзогидролазы, ответственного за расщепление инулина на фруктозу и сахарозу, привела к увеличению в два раза содержанию каучука в корнях этих растений [Stolze et al., 2017]. Здесь можно также добавить, что кок-сагыз – весьма перспективный каучуконос, который уже широко выращивался в СССР в 30-40-ые годы прошлого века [Кулуев и др., 2015; Гаршин и др., 2016].

В статье Коротковой [2017] упоминается, что ими при поиске отредактированных растений среди разных видов, представленных как пищевыми, так и техническими культурами, не обнаружено, чтобы они (вишня, гречиха, дыня, кофе, конопля, вика и др.) вовлекались в эксперименты по геномному редактированию. Мы решили продолжить такой список, и отмечаем, что пока нет публикаций по CRISPR/Cas редактированию некоторых важных технических культур, например, каучуконосов гевеи и гваюлы, тогда как редактирование генома другого каучуконоса одуванчика кок-сагыза уже началось

[Paffaldano et al., 2016]. Думается, что это упущение долго продолжаться не будет, поскольку в геномах этих видов, несомненно, требуется кое-что подредактировать путем нокаутирования и в плане повышения устойчивости к разным болезням, а также для увеличения наработки целевого метаболита – каучука и улучшения его физико-химических свойств, а возможно и привести в эти виды и новые гены с помощью нокин технологии. Также отсутствуют работы по редактированию различных растений с помощью CRISPR/Cas технологии с целью попытаться придать им апомиктичность (бесполосемянное размножение) путем, например, нокаута некоторых генов, задействованных в мейозе. Здесь можно еще заметить, что и ранее редактирования геномов каучуконосов гевеи и гваюлы, а также каких-либо других видов растений в связи с проблемой апомиксиса с помощью ZFN или TALEN подходов не проводилось. Перспективам редактирования геномов растений с помощью CRISPR/Cas технологии определенное внимание мы уделим еще и в статье [Баймиев и др., 2017].

Ввиду настоящей лавины информации по осуществлению редактированию геномов растений и невозможности привести даже малую ее толику считаем, что здесь можно лишь ограничиться упоминанием также уже весьма многочисленных обзорных статей на этот счет [Салина, 2016; Хлесткина, Шумный, 2016; Kumar et al., 2015; Ding et al., 2016; Lowder et al., 2016; Ma et al., 2016; Noman et al., 2016; Samanta et al., 2016; Steinert et al., 2016; Zaidi et al., 2016; Puchta, 2017; Герасимова и др., 2017; Злобин и др., 2017; Kamburova et al., 2017; Kanchiswamy, 2017; Liu X. et al., 2017; Zhang K. et al., 2017 и др.].

### Заключение

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

Ряд других вопросов по CRISPR/Cas технологии редактирования геномов, включая эволюцию методов геномного редактирования, патентование подобных разработок, биоинформатический анализ и соответствующие базы данных, а также другие приложения использования CRISPR/Cas систем, включая фундаментальные исследования функционального состояния геномов и слаженной работы ансамбля генов, рассмотрены в других наших статьях в этом же номере журнала [Баймиев и др., 2017; 2017a; Вершинина и др., 2017; Кулуев и др., 2017; Чемерис и др., 2017].

<sup>2</sup> Не входит в сферу наших интересов.

## Литература

1. Баймиев Ан.Х., Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Михайлова Е.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов (растений) и общество // Биомика. 2017. Т.9. С.183-202.
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 бактерий и архей // Биомика. 2017 Т.9. С.229-244.
3. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С. 245-270.
4. Гаршин М.В., Картуха А.И., Кулуев Б.Р. «Коксагыз: особенности культивирования, перспективы возделывания и внедрения в современное производство» // Биомика. 2016. Том 8. С. 323-333.
5. Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях // Физиология растений. 2017. Т.64. С.92-108.
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.
7. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Геращенко Г.А., Никоноров Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Применение CRISPR-локусов не для редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.271-283.
8. Кулуев Б.Р., Гарафутдинов Р.Р., Максимов И.В., Сагитов А.М., Чемерис Д.А., Князев А.В., Вершинина З.Р., Баймиев Ан.Х., Мулдашев А.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Натуральный каучук, его источники и составные части // Биомика. 2015. Т.7. С.224-283.
9. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т.20. С.930-944.
10. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // Acta Naturae. 2014. Т. 6. С. 20–42.
11. Немудрый А.А., Маланханова Т.Б., Малахова А.А., Медведев С.П., Зякин С.М. Стратегии редактирования паралогичных генов с помощью CRISPR/Cas9 // Гены и клетки. 2016. Т. 11. С. 87–94.
12. Пугач К.С., Лопатина А.В., Северинов К.В. CRISPR-системы адаптивного иммунитета прокариот // Молекулярная биология. 2012. Т.46. С.195-203.
13. Савицкая Е.Е., Мушарова О.С., Северинов К.В. Разнообразие механизмов CRISPR-Cas систем адаптивного иммунитета прокариот и возможности их применения в биотехнологии // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 870–880.
14. Салина Е.А. Технология геномного моделирования и редактирования для решения задач селекции растений // Достижения науки и техники АПК. 2016. № 9. С. 9-14.
15. Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: Система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений // Генетика. 2016. Т.52. С.774-787.
16. 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.
17. Чугунова А.А., Донцова О.А., Сергиев П.В. Методы изменения геномов: новая эра в молекулярной биологии // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 881-898.
18. Яковлев И. Не CRISPR/Cas9 единым: Новые технологии для геномного редактирования // Гены и клетки. 2016. Т.11.
19. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // Science. 2016. V. 353: aaf5573.
20. Acevedo-Garcia J., Kusch S., Panstruga R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond // New Phytol. 2014. V.204. P.273-281.
21. Alagoz Y., Gurkok T., Zhang B., Unver T. Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology // Sci Rep. 2016. V. 6: 30910.
22. Albers E., Sbroggio M., Martin-Gonzalez J., Avram A., Munk S., Lopez-Contreras A.J. A simple DNA recombination screening method by RT-PCR as an alternative to Southern blot // Transgenic Res. 2017. V. 26. P. 429–434.
23. Ali Z., Abul-faraj A., Li L., Ghosh N., Piatek M., Mahjoub A., Aouida M., Piatek A., Baltes N.J., Voytas D.F., Dinesh-Kumar S., Mahfouz M.M. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system // Mol Plant. 2015. V. 8. P. 1288–1291.
24. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease // Nature. 2014. V. 513. P. 569–573.
25. Arakawa H. A method to convert mRNA into a gRNA library for CRISPR/Cas9 editing of any organism // Sci. Adv. 2016. V.2(8):e1600699.
26. Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Dominguez L., Vidal D., Domingo M., Gonzolez O., Rodriguez-Ferri E.F., Bunschoten A.E., Van Embden J.D., Cousins D. Spacer oligonucleotide typing of

- Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis // J Clin Microbiol. 1996. V. 34. P. 2734–2740.
27. Baek K., Kim D.H., Jeong J., Sim S.J., Melis A., Kim J.S., Jin E., Bae S. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins // Sci Rep. 2016. V. 28: 30620.
  28. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // Science. 2007. V. 315. P. 1709–1712.
  29. Barrangou R., Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications // Nat Microbiol. 2017. V. 2: 17092.
  30. Beloglazova N., Kuznedelov K., Flick R., Datsenko K.A., Brown G., Popovic A., Lemak S., Semenova E., Severinov K., Yakunin A.F. CRISPR RNA binding and DNA target recognition by purified Cascade complexes from *Escherichia coli* // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 530–543.
  31. Bibikova M., Beumer K., Trautman J.K., Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases // Science. 2003. V. 300: 764.
  32. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // Microbiology. 2005. V. 151. P. 2551–2561.
  33. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // Science. 2008. V. 321. P. 960–964.
  34. Burstein D., Harrington L.B., Strutt S.C., Probst A.J., Anantharaman K., Thomas B.C., Doudna J.A., Banfield J.F. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes // Nature. 2017. V. 542. P. 237–241.
  35. Ceasar S.A., Rajan V., Prykhodzhiy S.V., Berman J.N., Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9 // Biochim Biophys Acta. 2016. V. 1863. P. 2333–2344.
  36. Čermák T., Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF. High-frequency, precise modification of the tomato genome // Genome Biol. 2015. V.16:232.
  37. Chen C. CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature // J. Am. Soc. Inf. Sci. Technol. 2005. V. 57. P. 359–377.
  38. Chen X., Lu X., Shu N., Wang S., Wang J., Wang D., Guo L., Ye W. Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system // Sci. Rep. 2017. V. 7: 44304.
  39. Cheng J., Roden C.A., Pan W., Zhu S., Baccei A., Pan X., Jiang T., Kluger Y., Weissman S.M., Guo S., Flavell R.A., Ding Y., Lu J. A Molecular Chipper technology for CRISPR sgRNA library generation and functional mapping of noncoding regions // Nat. Commun. 2016. V.7:11178.
  40. Cheng J., Pan W., Lu J. Dense sgRNA library construction using a Molecular Chipper approach // Bio Protoc. 2017. V.7(12). pii: e2373.
  41. Cho S.W., Lee J., Carroll D., Kim J.S., Lee J. Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins // Genetics. 2013. V. 195. P. 1177–1180.
  42. Christian M., Čermák T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases // Genetics. 2010. V. 186. P. 757–761.
  43. Chylinski K., Makarova K.S, Charpentier E., Koonin E.V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 6091–6105.
  44. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // Science. 2013. V. 339. P. 819–823.
  45. D'Agostino Y., Locascio A., Ristoratore F., Sordino P., Spagnuolo A., Borra M., D'Aniello S. A rapid and cheap methodology for CRISPR/Cas9 zebrafish mutant screening // Mol. Biotechnol. 2016. V. 58: 73–78.
  46. Datsenko K.A., Pougach K., Tikhonov A., Wanner B.L., Severinov K., Semenova E. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system // Nat. Commun. 2012. V. 10. :945.
  47. Delannoy S., Beutin L., Fach P. Improved traceability of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* using CRISPRs for detection and typing // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016. V. 23. P. 8163–8174.
  48. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // Nature. 2011. V.471. P.602-607.
  49. DeWitt M.A., Corn J.E., Carroll D. Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein // Methods. 2017. V. 121–122. P. 9–15.
  50. Ding Y., Li H., Chen L.L., Xie K. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9 // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 703.
  51. Dong D., Ren K., Qiu X., Zheng J., Guo M., Guan X., Liu H., Li N., Zhang B., Yang D., Ma C., Wang S., Wu D., Ma Y., Fan S., Wang J., Gao N., Huang Z. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA // Nature. 2016. V. 532. P. 522–526.
  52. Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // Science. 2014. V.346. P. 1258096.
  53. Du Q., Cui J., Zhang C., He K. Visualization analysis of CRISPR/Cas9 gene editing technology studies // J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 2016. V. 17. P. 798–806.
  54. Endo A., Masafumi M., Kaya H., Toki S. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes

- using Cpf1 from *Francisella novicida* // Sci. Rep. 2016. V. 6: 38169.
55. Fagerlund R.D., Staals R.H., Fineran P.C. The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools // Genome Biol. 2015. V. 16: 251.
  56. Fauser F., Schiml S., Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2014. V. 79. P. 348–359.
  57. Findlay S.D., Vincent K.M., Berman J.R., Postovit L.M. A digital PCR-based method for efficient and highly specific screening of genome edited cells // PLoS One. 2016. V. 11: e0153901.
  58. Fonfara I., Richter H., Bratovic M., Le Rhun A., Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA // Nature. 2016. V. 532. P. 517–521.
  59. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. P. 279–284.
  60. Gagnon J.A., Valen E., Thyme S.B., Huang P., Akhmetova L., Pauli A., Montague T.G., Zimmerman S., Richter C., Schier A.F. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs // PLoS One. 2014. V. 29: e98186.
  61. Gao Y., Zhao Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing // J. Integr. Plant Biol. 2014. V.56. P.343-349.
  62. Gao J., Wang G., Ma S., Xie X., Wu X., Zhang X., Wu Y., Zhao P., Xia Q. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum* // Plant Mol. Biol. 2015. V. 87. P. 99–110.
  63. Gao L., Cox D.B.T., Yan W.X., Manteiga J.C., Schneider M.W., Yamano T., Nishimasu H., Nureki O., Crosetto N., Zhang F. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities // Nat. Biotechnol. 2017. In press.
  64. Gao P., Yang H., Rajashankar K.R., Huang Z., Patel D.J. Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition // Cell Res. 2016. V. 26. P. 901–913.
  65. Garneau J.E., Dupuis M.È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // Nature. 2010. V.468. P.67-71.
  66. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. E2579–E2586.
  67. Gasiunas G., Siksnys V. RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: holy grail of genome editing? // Trends Microbiol. 2013. V. 21. P. 562–567.
  68. Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sánchez-León S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9 // Plant J. 2017. V.89. P.1251-1262.
  69. Gomgnimbou M.K., Abadia E., Zhang J., Refrégier G., Panaïotov S., Bachiyiska E., Sola C. "Spoligorifotyping," a dual-priming-oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multianalyte microbead-based hybridization system // J. Clin. Microbiol. 2012. V.50. P.3172–3179.
  70. 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.
  71. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // BMC Bioinformatics. 2007. V. 8: 172.
  72. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) for the genotyping of bacterial pathogens // Methods Mol. Biol. 2009. V. 551. P. 105–116.
  73. Groenen P.M., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method // Mol. Microbiol. 1993. V.10. P.1057-1065.
  74. Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to *FokI* nuclease improves the specificity of genome modification // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. P. 577–582.
  75. Hanania U., Ariel T., Tekoah Y., Fux L., Sheva M., Gubbay Y., Weiss M., Oz D., Azulay Y., Turbovski A., Forster Y., Shaaltiel Y. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins // Plant Biotechnol J. 2017. P. 1–10.
  76. Harayama T., Riezman H. Detection of genome-edited mutant clones by a simple competition-based PCR method // PLoS One. 2017. V. 12: e0179165.
  77. Hayut F.S., Bessudo M.C., Levy A.A. Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato // Nat. Commun. 2017. V. 8: 15605.
  78. He Y., Zhang T., Yang N., Xu M., Yan L., Wang L., Wang R., Zhao Y. Self-cleaving ribozymes enable the production of guide RNAs from unlimited choices of promoters for CRISPR/Cas9 mediated genome editing // J. Genet. Genomics. 2017. V.44. P.469-472.
  79. Hendel A., Bak R.O., Clark J.T., Kennedy A.B., Ryan D.E., Roy S., Steinfeld I., Lunstad B.D., Kaiser R.J., Wilkens A.B., Bacchetta R., Tsalenko A., Dellinger D., Bruhn L., Porteus M.H. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-

- Cas genome editing in human primary cells // Nat. Biotechnol. 2015. V. 33. P. 985–989.
80. Hermans P.W., van Soolingen D., Bik E.M., de Haas P.E., Dale J.W., van Embden J.D. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // Infect. Immun. 1991. V. 59. P. 2695–2705.
  81. Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2016. V. 371. pii: 20150496.
  82. Hirano S., Nishimasu H., Ishitani R., Nureki O. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9 // Mol. Cell. 2016. V. 61. P. 886–894.
  83. Hirano H., Gootenberg J.S., Horii T., Abudayyeh O.O., Kimura M., Hsu P.D., Nakane T., Ishitani R., Hatada I., Zhang F., Nishimasu H., Nureki O. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9 // Cell. 2016a. V. 164. P. 950–961.
  84. Hohn B., Puchta H. Gene therapy in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 8321–8323.
  85. Hua Y., Wang C., Huang J., Wang K. A simple and efficient method for CRISPR/Cas9-induced mutant screening // J. Genet. Genomics. 2017. V. 44. P. 207–213.
  86. Iaffaldano B., Zhang Y., Cornish K. CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection // Industrial Crops and Products. 2016. V.30. P.356–362.
  87. Iqbal Z., Sattar M.N., Shafiq M. CRISPR/Cas9: a tool to circumscribe cotton leaf curl disease // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 475.
  88. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 5429–5433.
  89. Jacobs T.B., Martin G.B. High-throughput CRISPR vector construction and characterization of DNA modifications by generation of tomato hairy roots // J. Vis. Exp. 2016. V. 110.
  90. Jacobs T.B., Zhang N., Patel D., Martin G.B. Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries // Plant Physiol. 2017. pp.00489.2017.
  91. Janga M.R., Campbell L.M., Rathore K.S. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Plant Mol. Biol. 2017.
  92. Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // Mol. Microbiol. 2002. V. 43. P. 1565–1575.
  93. Jiang F., Zhou K., Ma L2, Gressel S3, Doudna JA4. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition // Science. 2015. V. 348. P. 1477–1481.
  94. Jiang F., Doudna J.A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms // Annu. Rev. Biophys. 2017. V. 46. P. 505–529.
  95. Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41: e188.
  96. Jiang W.Z., Henry I.M., Lynagh P.G., Comai L., Cahoon E.B., Weeks D.P. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing // Plant Biotechnol. J. 2017. V. 15. P. 648–657.
  97. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. V. 337. P. 816–821.
  98. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells // Elife. 2013. V. 29: e00471.
  99. Joung J.K., Voytas D.F., Kamens J. Accelerating research through reagent repositories: the genome editing example // Genome Biol. 2015. V. 16: 255.
  100. Kamburova V.S., Nikitina E.V., Shermatov S.E., Buriev Z.T., Kumpatla S.P., Emani C., Abdurakhmonov I.Y. Genome editing in plants: An overview of tools and applications // Intern. J. Agronomy. 2017. (2017), Article ID 7315351.
  101. Kanchiswamy C.N. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement // Plant Cell Rep. 2016. V. 35. P. 1469–1474.
  102. Kaya H., Ishibashi K., Toki S. A Split *Staphylococcus aureus* Cas9 as a compact genome-editing tool in plants // Plant Cell Physiol. 2017. V. 58. P. 643–649.
  103. Kc R., Srivastava A., Wilkowski J.M., Richter C.E., Shavit J.A., Burke D.T., Bielas S.L. Detection of nucleotide-specific CRISPR/Cas9 modified alleles using multiplex ligation detection // Sci. Rep. 2016. V. 6: 32048.
  104. Kelley M.L., Strezoska Z., He K., Vermeulen A., Smith A. Versatility of chemically synthesized guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome editing // J. Biotechnol. 2016. V. 233. P. 74–83.
  105. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1156–1160.
  106. Kim H., Kim S.T., Ryu J., Choi M.K., Kweon J., Kang B.C., Ahn H.M., Bae S., Kim J., Kim J.S., Kim S.G. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system // J. Integr. Plant Biol. 2016. V. 58. P. 705–712.
  107. Kim D., Kim J., Hur J.K., Been K.W., Yoon S.H., Kim J.S. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells // Nat. Biotechnol. 2016a. V. 34. P. 863–868.
  108. Kim H., Kim S.T., Ryu J., Kang B.C., Kim J.S., Kim S.G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing // Nat. Commun. 2017. V. 16: 14406.
  109. Kim D., Lim K., Kim S.T., Yoon S.H., Kim K., Ryu S.M., Kim J.S. Genome-wide target specificities of

- CRISPR RNA-guided programmable deaminases // Nat. Biotechnol. 2017a. V. 35. P. 475–480.
110. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects // Nature. 2016. V. 529. P. 490–495.
  111. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities // Nature. 2015. V. 523. P. 481–485.
  112. Kohno H., Suenami S., Takeuchi H., Sasaki T., Kubo T. Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the european honeybee, *Apis mellifera* L. // Zoolog. Sci. 2016. V. 33. P. 505–512.
  113. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage // Nature. 2016. V. 533. P. 420–424.
  114. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V. 37. P. 67–78.
  115. Kui L., Chen H., Zhang W., He S., Xiong Z., Zhang Y., Yan L., Zhong C., He F., Chen J., Zeng P., Zhang G., Yang S., Dong Y., Wang W., Cai J. Corrigendum: building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale* // Front. Plant Sci. 2017. V. 8: 664.
  116. Kumar V, Jain M. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 47–57.
  117. Kuznedelov K., Mekler V., Lemak S., Tokmina-Lukaszewska M., Datsenko K.A., Jain I., Savitskaya E., Mallon J., Shmakov S., Bothner B., Bailey S., Yakunin A.F., Severinov K., Semenova E. Altered stoichiometry *Escherichia coli* Cascade complexes with shortened CRISPR RNA spacers are capable of interference and primed adaptation // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 10849–10861.
  118. Lander E.S. The heroes of CRISPR // Cell. 2016. V. 164. P. 18–28.
  119. Ledford H. The unsung heroes of CRISPR // Nature. 2016. V. 535. P. 342.
  120. Ledford H. Fixing the tomato: CRISPR edits correct plant-breeding snafu // Nature. 2017. V. 545. P. 394–395.
  121. Lee T.R., Ng A.S., Ingham P.W. Ribozyme mediated gRNA generation for *in vitro* and *in vivo* CRISPR/Cas9 mutagenesis // PLoS One. 2016. V. 11(11):e0166020.
  122. Lee K., Mackley V.A., Rao A., Chong A.T., Dewitt M.A., Corn J.E., Murthy N. Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering // Elife. 2017. V. 6. pii: e25312.
  123. Leenay R.T., Maksimchuk K.R., Slotkowski R.A., Agrawal R.N., Gomaa A.A., Briner A.E., Barrangou R., Beisel C.L. Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-Cas systems // Mol. Cell. 2016. V. 62. P. 137–147.
  124. Leenay R.T., Beisel C.L. Deciphering, communicating, and engineering the CRISPR PAM // J. Mol. Biol. 2017. V. 429. P. 177–191.
  125. Li J.F., Zhang D., Sheen J. Cas9-based genome editing in Arabidopsis and tobacco // Methods Enzymol. 2014. V. 546. P. 459–472.
  126. Li J.F., Zhang D., Sheen J. Cas9-based genome editing in Arabidopsis and tobacco // Methods Enzymol. 2014. V. 546. P. 459–472.
  127. Li C., Unver T., Zhang B. A high-efficiency CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Sci. Rep. 2017. V. 7:43902.
  128. Li R., Li R., Li X., Fu D., Zhu B., Tian H., Luo Y., Zhu H. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum* // Plant Biotechnol. J. 2017b.
  129. Li B., Cui G., Shen G., Zhan Z., Huang L., Chen J., Qi X. Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* // Sci. Rep. 2017b. V. 7: 43320.
  130. Liang G., Zhang H., Lou D., Yu D. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing // Sci. Rep. 2016. V. 19:21451.
  131. Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y., Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes // Nat. Commun. 2017. V. 8: 14261.
  132. Liu K.I., Ramli M.N., Woo C.W., Wang Y., Zhao T., Zhang X., Yim G.R., Chong B.Y., Gowher A., Chua M.Z., Jung J., Lee J.H., Tan M.H. A chemical-inducible CRISPR-Cas9 system for rapid control of genome editing // Nat. Chem. Biol. 2016. V. 12. P. 980–987.
  133. Liu D., Hu R., Palla K.J., Tuskan G.A., Yang X. Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research // Curr. Opin. Plant Biol. 2016a. V. 30. P. 70–77.
  134. Lomov N.A., Borunova V.V., Rubtsov M.A. CRISPR/Cas9 technology for targeted genome editing // Biopolymers and Cell. 2015. V. 31. P. 243–248.
  135. Lopatina A., Medvedeva S., Shmakov S., Logacheva M.D., Krylenkov V., Severinov K. Metagenomic Analysis of Bacterial Communities of Antarctic Surface Snow // Front. Microbiol. 2016. V. 7:398.
  136. Lowder L., Malzahn A., Qi Y. Rapid evolution of manifold CRISPR systems for plant genome editing // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 1683.
  137. Lowder L., Malzahn A., Qi Y. Rapid construction of multiplexed CRISPR-Cas9 systems for plant genome editing // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1578. P. 291–307.
  138. Luo M.L., Leenay R.T., Beisel C.L. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria // Biotechnol. Bioeng. 2016. V. 113. P. 930–943.
  139. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. A Robust CRISPR/Cas9

- system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 1274–1284.
140. Ma X., Liu Y.G. CRISPR/Cas9-based multiplex genome editing in monocot and dicot plants // *Curr. Protoc. Mol. Biol*. 2016. V. 115. P. 31.6.1–31.6.21.
  141. Ma X., Zhu Q., Chen Y., Liu Y.G. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications // *Mol. Plant*. 2016a. V. 9. P. 961–974.
  142. Maji B., Moore C.L., Zetsche B., Volz S.E., Zhang F., Shoulders M.D., Choudhary A. Multidimensional chemical control of CRISPR-Cas9 // *Nat. Chem. Biol*. 2017. V. 13. P. 9–11.
  143. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y., Koonin E.V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action // *Biol. Direct*. 2006. V. 1: 7.
  144. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Wolf Y., Yakunin A.F., van der Oost J., Koonin E.V. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol*. 2011. V. 9. P. 467–477.
  145. Makarova K.S., Wolf Y., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol*. 2015. V. 13. P. 722–736.
  146. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // *Science*. 2013. V. 339. P. 823–826.
  147. Makarova K.S., Koonin E.V. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems // *Methods Mol. Biol*. 2015. V. 1311. P. 47–75.
  148. Malnoy M., Viola R., Jung M.H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S., Velasco R., Nagamangala Kanchiswamy C. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins // *Front. Plant Sci*. 2016. V. 7: 1904.
  149. Marchisio M.A., Huang Z. CRISPR-Cas type II-based synthetic biology applications in eukaryotic cells // *RNA Biol*. 2017. V. 31. P. 1–8.
  150. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008. V. 322. P. 1843–1845.
  151. Martin-Ortigosa S., Wang K. Proteolistics: a biolistic method for intracellular delivery of proteins // *Transgenic Res*. 2014. V. 23. P. 743–756.
  152. Mekler V., Minakhin L., Semenova E., Kuznedelov K., Severinov K. Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. P. 2837–2845.
  153. Mekler V., Minakhin L., Severinov K. Mechanism of duplex DNA destabilization by RNA-guided Cas9 nuclease during target interrogation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 5443–5448.
  154. Mellor J., Jiang W., Funk M., Rathjen J., Barnes C.A., Hinz T., Hegemann J.H., Philippsen P. CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters // *EMBO J*. 1990. V. 9. P. 4017–4026.
  155. Meng Z., Meng Z., Zhang R., Liang C., Wan J., Wang Y., Zhai H., Guo S. Expression of the rice arginase gene OsARG in cotton influences the morphology and nitrogen transition of seedlings // *PLoS One*. 2015. V. 10(11):e0141530.
  156. Mercx S., Smargiasso N., Chaumont F., De Pauw E., Boutry M., Navarre C. Inactivation of the  $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the  $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8: 403.
  157. Michno J.M., Wang X., Liu J., Curtin S.J., Kono T.J., Stupar R.M. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme // *GM Crops Food*. 2015. V. 6. P. 243–252.
  158. Mikami M., Toki S., Endo M. Precision targeted mutagenesis via Cas9 paired nickases in rice // *Plant Cell Physiol*. 2016. V. 57. P. 1058–1068.
  159. Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites // *Mol. Microbiol*. 1993. V. 9. P. 613–621.
  160. Mojica F.J., Ferrer C., Juez G., Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning // *Mol. Microbiol*. 1995. V. 17. P. 85–93.
  161. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria // *Mol. Microbiol*. 2000. V. 36. P. 244–246.
  162. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *J. Mol. Evol*. 2005. V. 60. P. 174–182.
  163. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system // *Microbiology*. 2009. V. 155. P. 733–740.
  164. Mojica F.J., Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals // *Trends Microbiol*. 2016. V. 24. P. 811–820.
  165. Mojica F.J., Rodríguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria // *FEBS J*. 2016. V. 283. P. 3162–3169.
  166. Mokrousov I., Limeschenko E., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci // *Biotechnol. J*. 2007. V. 2. P. 901–906.

167. Mokrousov I., Vyazovaya A., Kolodkina V., Limeschenko E., Titov L., Narvskaya O. Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009. V.28. P.701-703.
168. Mokrousov I., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers // *J. Bacteriol.* 2014. V.196. P.1833-1841.
169. Moscou M.J., Bogdanove A.J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors // *Science.* 2009. V. 326: 1501.
170. Murovec J., Pirc Ž., Yang B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V.15. P.917-926.
171. Nakade S., Yamamoto T., Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3-What's next? // *Bioengineered.* 2017. V. 8. P. 265–273.
172. Nakajima I., Ban Y., Azuma A., Onoue N., Moriguchi T., Yamamoto T., Toki S., Endo M. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape // *PLoS One.* 2017. V. 12: e0177966.
173. Nakata A., Amemura M., Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. P. 3553–3556.
174. Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 691–693.
175. Nekrasov V., Wang C., Win J., Lanz C., Weigel D., Kamoun S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion // *Sci. Rep.* 2017 V.7. 482.
176. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA // *Cell.* 2014. V.156. P.935-949.
177. Nishimasu H., Nureki O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. V. 43. P. 68–78.
178. Nishimasu H., Yamano T., Gao L., Zhang F., Ishitani R., Nureki O. Structural basis for the altered PAM recognition by engineered CRISPR-Cpf1 // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. P. 1–9.
179. Nishitani C., Hirai N., Komori S., Wada M., Okada K., Osakabe K., Yamamoto T., Osakabe Y. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system // *Sci. Rep.* 2016. V. 17: 31481.
180. Noman A., Aqeel M., He S. CRISPR-Cas9: Tool for qualitative and quantitative plant genome editing // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. 1740. eCollection.
181. Nunez J.K., Harrington L.B., Doudna J.A. Chemical and biophysical modulation of Cas9 for tunable genome engineering // *ACS Chem. Biol.* 2016. V. 11. P. 681–688.
182. O'Connell M.R., Oakes B.L., Sternberg S.H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J.A. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9 // *Nature.* 2014. V. 516. P. 263–266.
183. Ordon J., Gantner J., Kemna J., Schwalgun L., Reschke M., Streubel J., Boch J., Stuttmann J. Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit // *Plant J.* 2017. V. 89. P. 155–168.
184. Paix A., Schmidt H., Seydoux G. Cas9-assisted recombineering in *C. elegans*: genome editing using in vivo assembly of linear DNAs // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44: e128.
185. Paix A., Folkmann A., Seydoux G. Precision genome editing using CRISPR-Cas9 and linear repair templates in *C. elegans* // *Methods.* 2017. V. 121–122. P. 86–93.
186. Paszkowski J., Baur M., Bogucki A., Potrykus I. Gene targeting in plants // *EMBO J.* 1988. V. 20. P. 4021–4026.
187. Pinder J., Salsman J., Dellaire G. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. 9379–9392.
188. Pougach K., Semenova E., Bogdanova E., Datsenko K.A., Djordjevic M., Wanner B.L., Severinov K. Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 77. P. 1367–1379.
189. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology.* 2005. V. 151. P. 653–663.
190. Puchta H., Dujon B., Hohn B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5034–5040.
191. Puchta H., Dujon B., Hohn B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 5055–5060.
192. Puchta H. Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017. V. 36. P. 1–8.
193. Quadros R.M., Miura H., Harms D.W., Akatsuka H., Sato T., Aida T., Redder R., Richardson G.P., Inagaki Y., Sakai D., Buckley S.M., Seshacharyulu P., Batra S.K., Behlke M.A., Zeiner S.A., Jacobi A.M., Izu Y., Thoreson W.B., Urness L.D., Mansour S.L., Ohtsuka M., Gurumurthy C.B.. Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins // *Genome Biol.* 2017. V. 18: 92.
194. Ramlee M.K., Wang J., Cheung A.M.S., Li S. Using a fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis technique to genotype CRISPR/Cas9-mediated knockout mutants in a high-throughput format // *J. Vis. Exp.* 2017. V. 122.

195. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. P. 2281–2308.
196. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity // *Cell.* 2013a. V. 154. P. 1380–1389.
197. Ran Y., Liang Z., Gao C. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing // *Sci. China Life Sci.* 2017. V. 60. P. 490–505.
198. Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 339–344.
199. Romanienko P.J., Giacalone J., Ingenito J., Wang Y., Isaka M., Johnson T., You Y., Mark W.H. A Vector with a single promoter for in vitro transcription and mammalian cell expression of CRISPR gRNAs // *PLoS One.* 2016. V. 11: e0148362.
200. Samanta M.K., Dey A., Gayen S. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes // *Transgenic Res.* 2016. V. 25. P. 561–573.
201. Sapranauskas R., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 9275–9282.
202. Sauer N.J., Mozurk J., Miller R.B., Warburg Z.J., Walker K.A., Beetham P.R., Schöpke C.R., Gocal G.F. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 496–502.
203. Savitskaya E., Lopatina A., Medvedeva S., Kapustin M., Shmakov S., Tikhonov A., Artamonova I.I., Logacheva M., Severinov K. Dynamics of *Escherichia coli* type I-E CRISPR spacers over 42 000 years // *Mol. Ecol.* 2017. V. 26. P. 2019–2026.
204. Schaefer K.A., Wu W.H., Colgan D.F., Tsang S.H., Bassuk A.G., Mahajan V.B. Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 547–548.
205. Schiml S., Fauser F., Puchta H. CRISPR/Cas-mediated in planta gene targeting // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1610. P. 3–11.
206. Schunder E., Rydzewski K., Grunow R., Heuner K. First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis* // *Int. J. Med. Microbiol.* 2013. V. 303. P. 51–60.
207. Semenova E., Nagornykh M., Pyatnitskiy M., Artamonova I.I., Severinov K. Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae* // *FEMS Microbiol Lett.* 2009. V. 296. P. 110–116.
208. Semenova E., Jore M.M., Datsenko K.A., Semenova A., Westra E.R., Wanner B., van der Oost J., Brouns S.J., Severinov K. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 10098–10103.
209. Semenova E., Savitskaya E., Musharova O., Strotskaya A., Vorontsova D., Datsenko K.A., Logacheva M.D., Severinov K. Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the *Escherichia coli* type I-E CRISPR-Cas interfering complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 7626–7631.
210. Severinov K., Ispolatov I., Semenova E. The influence of copy-number of targeted extrachromosomal genetic elements on the outcome of CRISPR-Cas defense // *Front. Mol. Biosci.* 2016. V. 31: 45.
211. Shariat N., Dudley E.G. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 430–439.
212. Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M., Terada R., Arazoe T., Ishii H., Teramura H., Yamamoto T., Komatsu H., Miura K., Ezura H., Nishida K., Ariizumi T., Kondo A. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion // *Nat. Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 441–443.
213. Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Wolf Y.I., Gootenberg J.S., Semenova E., Minakhin L., Joung J., Konermann S., Severinov K., Zhang F., Koonin E.V. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems // *Mol. Cell.* 2015. V. 60. P. 385–397.
214. Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Makarova K.S., Wolf Y.I., Severinov K., Zhang F., Koonin E.V. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol.* 2017. V. 15. P. 169–182.
215. Siksnys V., Gasiunas G. Rewiring Cas9 to target new PAM sequences // *Mol. Cell.* 2016. V. 61. P. 793–794.
216. Smith J., Grizot S., Arnould S., Duclert A., Epinat J.C., Chames P., Prieto J., Redondo P., Blanco F.J., Bravo J., Montoya G., Pâques F., Duchateau P. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34: e149.
217. Song F., Stieger K. Optimizing the DNA donor template for homology-directed repair of double-strand breaks // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2017. V. 7. P. 53–60.
218. Song J., Yang D., Xu J., Zhu T., Chen Y.E., Zhang J. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency // *Nat. Commun.* 2016. V. 7: 10548.
219. Sontheimer E.J., Barrangou R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. P. 413–424.
220. Steinert J., Schiml S., Puchta H. Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1429–1438.
221. Stern M.J., Ames G.F., Smith N.H., Robinson E.C., Higgins C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome // *Cell.* 1984. V. 37. P. 1015–1026.

222. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 // *Nature*. 2014. V. 507. P. 62–67.
223. Sternberg S.H., LaFrance B., Kaplan M., Doudna J.A. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9 // *Nature*. 2015. V. 527. P. 110–113.
224. Stolze A., Wanke A., van Deenen N., Geyer R., Prüfer D., Schulze Gronover C. Development of rubber-enriched dandelion varieties by metabolic engineering of the inulin pathway // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V.15. P.740-753.
225. Subburaj S., Chung S.J., Lee C., Ryu S.M., Kim D.H., Kim J.S., Bae S., Lee G.J. Site-directed mutagenesis in *Petunia* × *hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1535–1544.
226. Svitashv S. Schwartz C. Lenderts B. Young J.I. Mark Cigan A. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat. Commun.* 2016. V. 7:13274.
227. Swarts D.C., van der Oost J., Jinek M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a // *Mol. Cell.* 2017. V. 66. P. 221–233.
228. Szczelkun M.D., Tikhomirova M.S., Sinkunas T., Gasiunas G., Karvelis T., Pschera P., Siksnys V., Seidel R. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 9798–9803.
229. Tang X., Lowder L.G., Zhang T., Malzahn A.A., Zheng X., Voytas D.F., Zhong Z., Chen Y., Ren Q., Li Q., Kirkland E.R., Zhang Y., Qi Y. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants // *Nat. Plants.* 2017. V.3:17018. Erratum: *Nat. Plants.* 2017. V.3:17103.
230. Thierry A., Dujon B. Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce I: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. P. 5625–5631.
231. Tian S., Jiang L., Gao Q., Zhang J., Zong M., Zhang H., Ren Y., Guo S., Gong G., Liu F., Xu Y. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon // *Plant Cell Rep.* 2017. V. 36. P. 399–406.
232. Tsutsui H., Higashiyama T. pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2017. V. 58. P. 46–56.
233. Ueta R., Abe C., Watanabe T., Sugano S.S., Ishihara R., Ezura H., Osakabe Y., Osakabe K. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9 // *Sci. Rep.* 2017. V. 30:507.
234. Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat // *G3 (Bethesda).* 2013. V. 3. P. 2233–2238.
235. van Houte S., Ekroth A.K., Broniewski J.M., Chabas H., Ashby B., Bondy-Denomy J., Gandon S., Boots M., Paterson S., Buckling A., Westra E.R. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system // *Nature*. 2016. V. 532. P.385–388.
236. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. P. 947–951.
237. Wang Y., Liu X., Ren C., Zhong G.Y., Yang L., Li S., Liang Z. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16: 96.
238. Wang P., Zhang J., Sun L., Ma Y., Xu J., Liang S., Deng J., Tan J., Zhang Q., Tu L., Daniell H., Jin S., Zhang X. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system // *Plant Biotechnol. J.* 2017.
239. Wang Y., Meng Z., Liang C., Meng Z., Wang Y., Sun G., Zhu T., Cai Y., Guo S., Zhang R., Lin Y. Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton // *Sci. China Life Sci.* 2017a. V. 60. P. 524–527.
240. Wolt J.D., Wang K., Sashital D., Lawrence-Dill C.J. Achieving plant CRISPR targeting that limits off-target effects // *Plant Genome.* 2016. V. 9.
241. Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H., Kim S.G., Kim S.T., Choe S., Kim J.S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 1162–1164.
242. Wright A.V., Sternberg S.H., Taylor D.W., Staahl B.T., Bardales J.A., Kornfeld J.E., Doudna J.A. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 2984–2989.
243. Wyvekens N., Topkar V.V., Khayter C., Joung J.K., Tsai S.Q. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-Cas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. P. 425–431.
244. Xie S.L., Bian W.P., Wang C., Junaid M., Zou J.X., Pei D.S. A novel technique based on in vitro oocyte injection to improve CRISPR/Cas9 gene editing in zebrafish // *Sci. Rep.* 2016. V. 29: 34555.
245. Xu X., Duan D., Chen S.J. CRISPR-Cas9 cleavage efficiency correlates strongly with target-sgRNA folding stability: from physical mechanism to off-target assessment // *Sci. Rep.* 2017. V. 7: 143.
246. Xu R., Qin R., Li H., Li D., Li L., Wei P., Yang J. Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 713–717.
247. Xu R., Wei P., Yang J. Use of CRISPR/Cas genome editing technology for targeted mutagenesis in rice // *Methods Mol. Biol.* 2017a. V. 1498. P. 33–40.
248. Xue C., Seetharam A.S., Musharova O., Severinov K., Brouns S.J., Severin A.J., Sashital D.G. CRISPR interference and priming varies with individual spacer sequences // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. 10831–10847.
249. Yamano T., Nishimasu H., Zetsche B., Hirano H., Slaymaker I.M., Li Y., Fedorova I., Nakane T., Makarova K.S., Koonin E.V., Ishitani R., Zhang F.,

- Nureki O // Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA // *Cell*. 2016. V. 165. P. 949–962.
250. Yao X., Wang X., Liu J., Hu X., Shi L., Shen X., Ying W., Sun X., Wang X., Huang P., Yang H. CRISPR/Cas9 - Mediated precise targeted integration in vivo using a double cut donor with short homology arms // *EBioMedicine*. 2017. V. 20. P. 19–26.
251. Yin K., Han T., Liu G., Chen T., Wang Y., Yu A.Y., Liu Y. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing // *Sci. Rep.* 2015. V. 5: 14926.
252. Yin X., Biswal A.K., Dionora J., Perdigon K.M., Balahadia C.P., Mazumdar S., Chater C., Lin H.C., Coe R.A., Kretzschmar T., Gray J.E., Quick P.W., Bandyopadhyay A. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice // *Plant Cell Rep.* 2017. V. 36. P. 745–757.
253. Yoshioka S., Fujii W., Ogawa T., Sugiura K., Naito K. Development of a mono-promoter-driven CRISPR/Cas9 system in mammalian cells // *Sci. Rep.* 2015. V.5:18341.
254. Zaidi S.S., Mansoor S. Viral vectors for plant genome engineering // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8: 539.
255. Zaidi S.S., Tashkandi M., Mansoor S., Mahfouz M.M. Engineering plant immunity: using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: 1673
256. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // *Cell*. 2015. V. 163. P. 759–771.
257. Zhang K., Raboanatahiry N., Zhu B., Li M. Progress in genome editing technology and its application in plants // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8: 177.
258. Zheng X., Yang S., Zhang D., Zhong Z., Tang X., Deng K., Zhou J., Qi Y., Zhang Y. Effective screen of CRISPR/Cas9-induced mutants in rice by single-strand conformation polymorphism // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1545–1554.
259. Zheng Z., Appiano M., Pavan S., Bracuto V., Ricciardi L., Visser R.G., Wolters A.M., Bai Y. Genome-wide study of the tomato *SIMLO* gene family and its functional characterization in response to the powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici* // *Front. Plant Sci.* 2016. V.7:380.

### CRISPR/Cas GENOME EDITING OF PLANTS

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.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia, [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

#### Resume

The brief history and background of the study of CRISPR/Cas systems are described, the terminology is given. The diversity of CRISPR/Cas systems and various improved technologies of genome editing are shown. Scientometric analysis of publications in this area is carried out. Examples of editing genomes of several plant species are given. Cited literature contains more than 250 references. The majority of works were published in the last two or three or four years. Only a few articles relating to the history and prehistory of the CRISPR/Cas technology were published earlier.

**Keywords:** CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Cas, CRISPR associated, nuclease, Cas9, Cpf1, Double-Stranded Breaks, nCas9, nickase, PAM, Protospacer Adjacent Motif, crRNA, tracrRNA, sgRNA, On-target site, Off-target site, NHEJ, Non-Homologous End-Joining, HDR, Homology Directed Repair, Knock-out, Knock-in