

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ НАПРАВЛЕННОГО ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/Cas К ПЛЮРИПОТЕНТНЫМ СТВОЛОВЫМ КЛЕТКАМ

© Е. А. Васильева^{1,*}, Д. Мелино^{2, 3}, Н. А. Барлев^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² С.-Петербургский государственный технический университет (Технологический институт),

³ Медицинский Научный Совет, Отдел Токсикологии, Лейчестер, LE1 9HN, Великобритания

* электронный адрес: slkd-k@mail.ru

Направленное геномное редактирование с использованием программируемых нуклеаз за короткое время заняло передовые позиции среди технологий модификаций генома. Плюрипотентные стволовые клетки человека представляют собой уникальную платформу для изучения функции генов, действия лекарственных препаратов и моделирования заболеваний на тканях. Для работы с такой системой необходима технология быстрого, точного и хорошо контролируемого манипулирования геномом. Для решения этой задачи может быть использована система CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated), основанная на действии направляемой Cas9 эндонуклеазы, способной производить расщепление ДНК в интересующих сайтах-мишениях. Ряд существенных преимуществ CRISPR/Cas и ее успешное применение на линиях плюрипотентных стволовых клеток открывают широкие возможности в области генной терапии и регенерационной медицины. В настоящей публикации мы даем обзор основных систем направленного геномного редактирования на основе программируемых нуклеаз, приводим сравнение этих систем, рассматриваем механизм работы и возможности системы CRISPR/Cas, а также перспективы ее применения к линиям плюрипотентных стволовых клеток.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, геномное редактирование, плюрипотентные стволовые клетки, ZFNs, TALENs.

Принятые сокращения: система CRISPR/Cas — clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated, crRNA — CRISPR РНК, ESCs — эмбриональные стволовые клетки, hPSCs — плюрипотентные стволовые клетки человека, HDR — направляемая гомологией репарация, iPSCs — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, NHEJ — негомологичное воссоединение концов при репарации, sgRNA — одиночная гид-РНК, tractRNA — трансактивирующая crRNA, ZFN — нуклеаза «цинковые пальцы».

Новый подход к редактированию генома на основе направляемых нуклеаз в короткое время приобрел популярность и стал успешно применяться в исследованиях в области функциональной геномики, получении трансгенных организмов и экспериментах в области генной терапии. Плюрипотентные стволовые клетки человека (hPSCs) включают в себя эмбриональные стволовые клетки (hESCs) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs), получение которых из зрелых соматических стало возможным относительно недавно благодаря выявлению четырех необходимых для этого факторов — Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc (Takahashi et al., 2007). hPSCs способны к самообновлению, имеют неограниченный пролиферативный потенциал и представляют собой постоянно обновляющийся экспериментальный материал (Thomson, 1998), пригодный для быстрого широкомасштабного анализа. Эти клеточные линии способны генерировать все клеточные типы, включая редкие и труднодоступные популяции клеток человека. hPSCs представляют собой уникальную платформу для изучения генов, вовлеченных в молекулярные механизмы возникновения аномальных

фенотипов, моделирования заболеваний на тканях, изучения действия лекарственных препаратов. Данный подход открывает широкие возможности в области генной терапии и регенерационной медицины. К примеру, для лечения моногенных заболеваний теоретически из соматических клеток пациента могут быть получены iPSCs, которые могут быть корректированы, дифференцированы в клетки, пригодные для терапии, и трансплантированы в организм пациента для восстановления функции (рис. 1, а).

Для работы с такой системой необходима хорошо развитая технология быстрого, точного и хорошо контролируемого манипулирования геномом. К сожалению, успешно применяемое к мышевым ESCs редактирование через гомологическую рекомбинацию (Thomas, Capecchi, 1986; Capecchi, 2005) не оказалось эффективным для hPSCs (Hockemeyer, Jaenisch, 2010).

Технологии направленного редактирования генома на основе программируемых нуклеаз предоставляют возможность эффективной и точной генетической модификации путем образования двухнитевых разрывов ДНК в интересующих сайтах-мишениях высокоспецифичными

Моделирование болезней
Скрининг лекарственных
препаратов

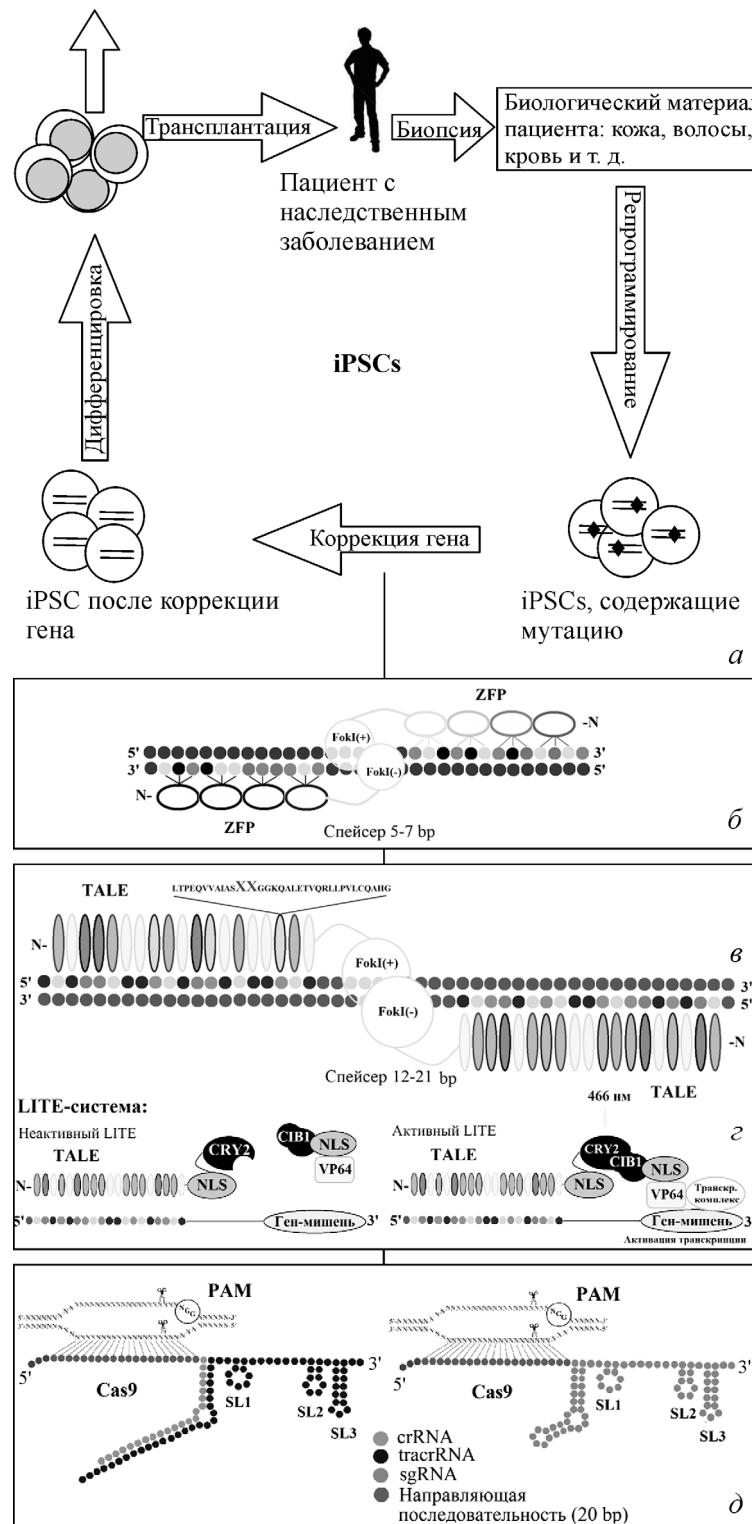


Рис. 1. Системы редактирования генома на основе направляемых нуклеаз и возможность их применения в генной терапии.
а — применение систем генного редактирования к индуцированным стволовым клеткам (iPSCs) для использования в заместительной терапии. **б** — система ZFNs (zinc finger nucleases), ZFP — zinc finger protein. **в** — система TALENs (transcription activator like effector nucleases). **ζ** — система LITE (light-inducible transcriptional effectors); стимуляция светом приводит к конформационным изменениям CRY2, объединению с CIB1 и привлечению комплекса транскрипционных факторов к промоторной области гена-мишени, что вызывает инициацию транскрипции. **θ** — система CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated); PAM — protospacer adjacent motif; SL1—3 — Stem Loop 1—3.

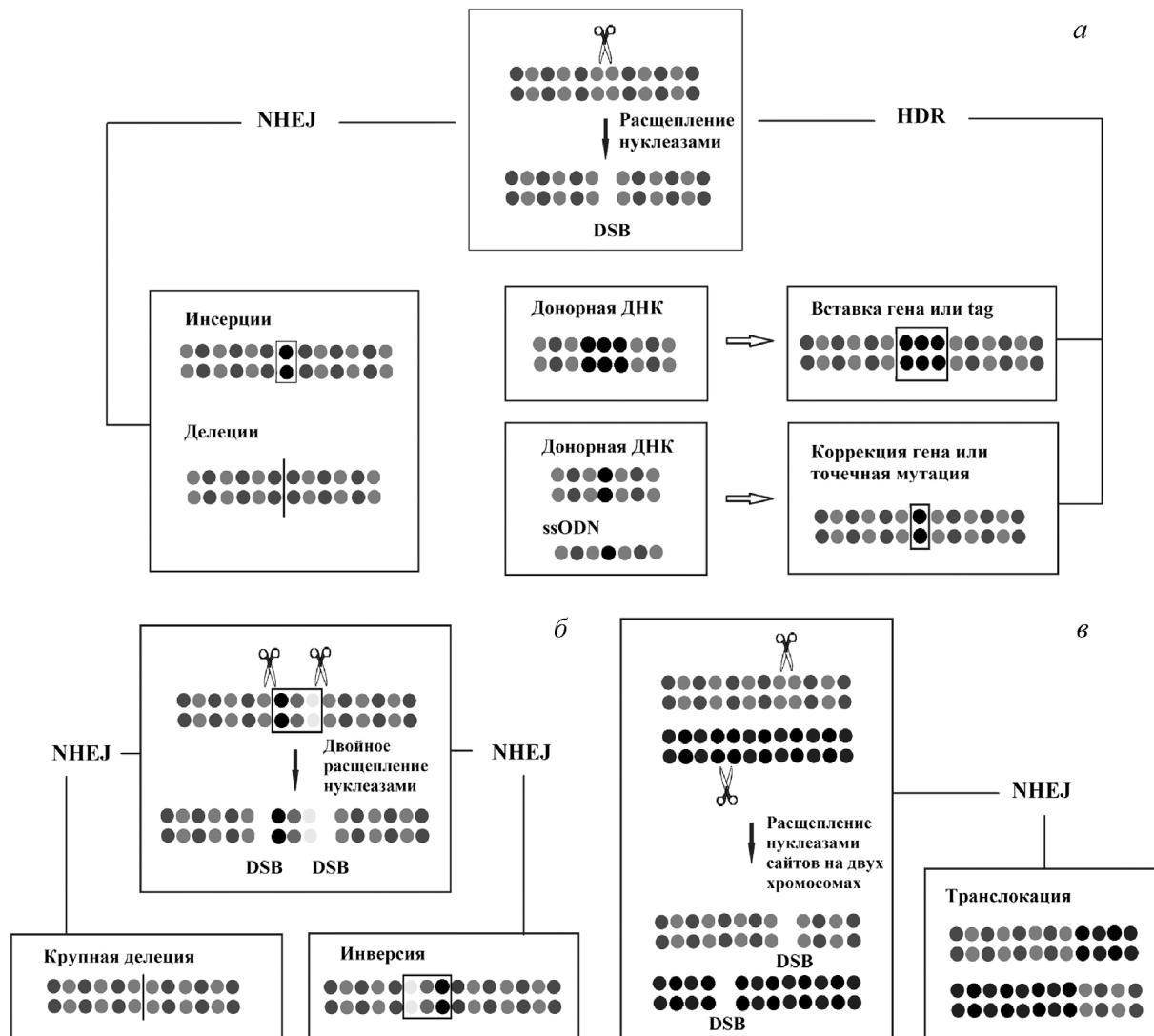


Рис. 2. Геномное редактирование с использованием программируемых нуклеаз.

а — индуцированные нуклеазами двухнитевые разрывы (ДР) могут быть восстановлены через негомологичное воссоединение концов (NHEJ), которое приводит к возникновению вставок и делеций. Альтернативным путем является гомологическая репарация (HDR) в присутствии донорной ДНК или одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN), содержащих гомологические плечи. *б* — двойное расщепление нуклеазами в пределах одной хромосомы может приводить к крупным делециям или появлению инверсий. *в* — внесение двух ДР на разных хромосомах может приводить к возникновению транслокаций.

нуклеазами и репарирования концов в генетическом локусе после внесения желаемых изменений. Индуцируемые нуклеазами разрывы могут быть подвергнуты репарации по одному из двух возможных механизмов — негомологичному воссоединению концов (nonhomologous end-joining, NHEJ) и гомологичной репарации (homology-directed repair, HDR) (рис. 2).

NHEJ может приводить к эффективному внесению мутаций типа инсерций или делеций различной длины, которые могут приводить к смещению рамки чтения кодирующей последовательности или быть причиной нарушений в сайтах связывания промоторных областей с транскрипционными факторами.

HDR-опосредованная репарация может быть использована для внесения направленных точечных мутаций или введения желаемой последовательности через рекомбинацию локуса мишени с привнесенной донорной эндогенной ДНК-матрицей (donor templates). Идентификация мутаций проводится с помощью скрининга.

К ряду эффективных методов для осуществления направленного геномного редактирования относятся системы направляемых нуклеаз — нуклеазы «цинковые пальцы» (zinc finger nucleases, ZFN), TALENs (transcription activator like effector nucleases) и системы CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated) (рис. 1, *б*, *в*, *д*). Нуклеазы ZFNs содержат Cys₂-His₂ ДНК-связывающий домен, а также расщепляющий домен эндонуклеазы рестрикции FokI (Kim et al., 1996). Система TALENs была обнаружена у патогенной бактерии *Xanthomonas* (Bogdanove et al., 2010), она состоит из программируемого ДНК-связывающего домена и ДНК-расщепляющего домена эндонуклеазы рестрикции FokI (Miller et al., 2011). По причине того, что FokI активна только в виде димера, этот фермент может расщеплять сайты мишени только в димеризованном состоянии.

Особого внимания заслуживает система CRISPR/Cas, получившая популярность в работах по направленному редактированию генома благодаря высокой эффективно-

сти, простоте и скорости в работе по сравнению с вышеупомянутыми системами. Эта система была обнаружена у 48 % секвенированных геномных последовательностей бактерий и у 84 % архей (Grissa et al., 2007). Система CRISPR/Cas требует наличия двух основных компонентов — эндонуклеазы Cas9 для расщепления ДНК и вариабельной CRISPR РНК (crRNA) и трансактивирующей crRNA (tracrRNA), объединенных в дуплекс (Jinek et al., 2012). Использование системы на млекопитающих привело к ее улучшению через оптимизацию состава кодонов и замену дуплекса crRNA : tracrRNA на одиночную sgRNA (Cho et al., 2013). Соединение crRNA : tracrRNA или sgRNA с последовательностью-мишенью через уотсон-криковские взаимодействия оснований является механизмом, направляющим эндонуклеазу Cas9 к желаемому геномному локусу для сайт-специфического расщепления.

Системы направленного редактирования генома

Система ZFNs. Нуклеаза ZFN, содержащая домен «цинковые пальцы», была успешно применена для редактирования геномов растений (Lloyd et al., 2005), насекомых (Beumer et al., 2006), рыбок *Danio rerio* (Doyon et al., 2008), мышей (Carberry et al., 2010), крыс (Mashimo et al., 2010), свиней (Hauschild et al., 2011), клеточных линий человека (Urnov et al., 2005), эмбриональных и индуцированных стволовых клеток (Urnov et al., 2005; Soldner et al., 2011). ZFN содержит ДНК-связывающий домен «цинковые пальцы» и нуклеазный домен эндонуклеазы рестрикции FokI (рис. 1, б). ДНК-связывающий домен состоит из tandemных массивов Cys₂-His₂, каждый из которых узнает приблизительно 3 bp ДНК. Для связывания субъединицы ZFN с последовательностью ДНК размером 9–18 bp необходимо от 3 до 6 «цинковых пальцев». Когда две ZFNs соединяются со своими мишенями, находящимися на расстоянии 5–7 bp друг от друга в правильной ориентации, нуклеазный домен димеризуется и вносит двухнитевые разрывы в ДНК в интересующем локусе, после чего осуществляется репарация двухнитевых разрывов через HDR или NHEJ (Lieber, 2010; Moynahan, Jasin, 2010). По сравнению с другими нуклеазами у ZFNs возможность выбора последовательности-мишени ограничена. Это обусловлено отсутствием коллекции, состоящей из 64 «цинковых пальцев», которые покрывали бы все возможные комбинации триплетов. Кроме того, не все ZFNs способны эффективно расщеплять сайты-мишени. Успешные сайты-мишени часто богаты гуанином и содержат 5'-GNN-3'-повторы.

Изложенный подход может быть применен для коррекции генов или для добавления новых в интересующем локусе (Urnov et al., 2010). Система ZFNs была успешно применена в области генной терапии для коррекции мутации, вызывающей серповидно-клеточную анемию в iPSCs человека (Sebastian et al., 2012). Использование данного подхода совместно с PiggyBack-технологией в iPSCs позволило произвести биаллельную коррекцию точечной мутации (Glu342Lys) в гене α1-антитрипсина (*A1AT* или *SERPINA1*), возникновение которой приводит к дефициту α1-антитрипсина. Генетическая коррекция iPSCs, впоследствии дифференцированных и доставленных к клеткам печени, позволила восстановить структуру и функцию A1AT *in vitro* и *in vivo* (Yusa et al., 2012).

Система TALENs. Эта система реализует несколько иной подход к направленному геномному редактированию. Система была применена к растениям (Christian et al., 2013), насекомым (Katsuyama et al., 2013), нематодам (Cheng et al., 2013), рыбам (Cade et al., 2012), амфибиям (Lei et al., 2012), мышам (Qiu et al., 2013), крысам (Tesson et al., 2011), кроликам (Song et al., 2013), линиям трансформированных клеток человека, hESCs и iPSCs (Hockemeyer et al., 2011; Holkers et al., 2013). Важнейшим компонентом системы является сайт-специфический ДНК-связывающий белок TALE, полученный из патогенного для растений организма *Xanthomonas* (рис. 1, в). TALE-подобный белок, полученный из патогенной бактерии *Ralstonia*, также может быть использован для специфичного связывания ДНК в процессе геномного редактирования (Li et al., 2013b). ДНК-связывающий домен TALE представляет собой tandemные повторы из 33–35 аминокислот. TALE-повторы имеют схожую последовательность и различаются двумя высоковариабельными аминокислотами в позициях 12 и 13 (RVDs, repeat variable residues), что лежит в основе специфического узнавания нуклеотида каждым повтором (Moscou, Bogdanove, 2009). Четыре tandemных повтора Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp и Asn-Gly достаточны для узнавания гуанина, аденина, цитозина и тимина и, следовательно, для создания TALENs с уникальными свойствами. Вторым элементом системы является нуклеазный домен эндонуклеазы рестрикции FokI, который становится активным при димеризации.

Недавно на основе TALE-домена была разработана новая оптогенетическая система LITE (light-inducible transcriptional effectors) (Konermann et al., 2013). LITE-система состоит из двух компонентов (рис. 1, г). К первому относятся ДНК-связывающий домен TALE из *Xanthomonas* и светочувствительный белок CRY2 (TALE : CRY2) из *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 2008). Второй компонент включает в себя CIB1 (партнер для взаимодействия с CRY2), соединенный с желаемым эффектором (комплекс CIB1 : эффектор). В отсутствие света TALE : CRY2 присоединены к промоторным регионам гена-мишени, в то время как комплекс CIB1 : эффектор остается свободным (рис. 1, г). Воздействие светом приводит к конформационным изменениям в CRY2, что способствует привлечению комплекса CIB1 : эффектора и ряда транскрипционных факторов к промоторной области гена-мишени и, как следствие, мощной индукции транскрипции (рис. 1, г). Помимо регуляции транскрипционной активности эта система может быть применена для эпигенетической модификации хроматина (Konermann et al., 2013). Подход позволяет изучать влияние модификаций хроматина на экспрессию генов.

Для деметилирования метилированных цитозинов (5 mC) в CpG-областях хроматина TALEs были соединены с каталитическим доменом белка TET1 (ten-eleven translocation), окисляющего 5-метилцитозин. Этот подход может быть использован для активации генов, репрессированных за счет ДНК-метилирования, а также для изучения функций метилирования CpG (Mendenhall et al., 2013).

Система CRISPR/Cas9 основана на действии направляемой Cas9-эндонуклеазы, способной производить расщепление ДНК в интересующих сайтах-мишених. Специфичность действия нуклеазы определяется мотивом PAM и направляющей ее последовательностью, комплементарной к сайту-мишени, состоящей из 20 нуклеотидов и входящей в состав направляющей РНК. Таким

Сравнение систем редактирования генома на основе программируемых нуклеаз

Показатель	Система		
	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Сайт связывания ДНК	Домен «цинковые пальцы»	Transcription activator-like effectors (TALE)	crRNA : tracrRNA или sgRNA
Нуклеаза	FokI	FokI	Cas9
Эффективность	++	++	+++
Специфичность	18—36 bp	30—36 bp	23—28 bp
Off-target	Варьирует	Низкий	Варьирует
Цитотоксичность	»	Низкая	Низкая
Множественное редактирование	Осложнено	Осложнено	Да
Плотность потенциальных сайтов, особенности сайтов-мишеней	1 на 100 bp. Отсутствие коллекции цинковых пальцев для узнавания всех триплетов. Желательна обогащенность гуанином и наличие 5'-GNN-3'-повторяющихся последовательностей	1 на 1 bp. Могут быть сконструированы практически для любой ДНК-последовательности. Ограничение: необходимость наличия тимина на 5'-конце последовательности-мишени	1 на 4—8 bp. Необходимость РАМ-последовательности 5'-X20 NGG-3', 5'-X20 NAG-3' или 5'-X20 NNNNGATT-3'
Паттерн вносимых изменений	Делекции и инсерции индуцируются с сопоставимыми частотами. Преимущественно образуются выступающие концы	Делекции продуцируются с более высокой частотой по сравнению с инсерциями. Преимущественно образуются выступающие концы	Часто происходят вставки размечтом в 1—2 bp. При расщеплении преимущественно образуются тупые концы

образом, в состав направляющей РНК входят crRNA и tractrRNA, образующие дуплекс, или одиночная sgRNA (рис. 1, д). Система была успешно применена к растениям (Jiang et al., 2013), нематодам (Liu et al., 2014), насекомым (Bassett et al., 2013), рыбам (Hwang et al., 2013; Ota et al., 2014), мышам (Shen et al., 2013), крысам (Li et al., 2013а) и клеточным линиям человека (Cho et al., 2013), ESCs и iPSC (Hou et al., 2013; González et al., 2014). Подробнее система CRISPR/Cas рассматривается ниже.

Сравнение систем ZFNs, TALENs и CRISPR/Cas9

Каждая из трех вышеописанных систем может использоваться для внесения направленных генных изменений, нарушения функции генов, коррекции и добавления новых. Эффективность всех трех систем варьирует и в значительной степени зависит от эффективности трансфекции. Сравнение эффективности систем TALENs и CRISPRs в идентичных ESCs человека показало большую эффективность CRISPR/Cas (Ding et al., 2013).

ZFNs и TALENs работают как димеры, и их специфичность определяется ДНК-связывающим доменом. Специфичность может регулироваться изменением количества «цинковых пальцев» у ZFNs и модулей TALE у TALENs. Однако не исключена вероятность того, что нуклеазы с большим количеством модулей могут узнавать дополнительные сайты, взаимодействуя лишь частью модулей. Нуклеаза Cas9 является РНК-направляемой нуклеазой, и ее специфичность определяется РАМ-последовательностью и 20 bp, предшествующим РАМ (см. таблицу).

При анализе специфичности всех трех систем был выявлен off-target эффект (см. таблицу). Он обусловлен действием нуклеаз в нежелательных местах. Однако TALENs имеет более низкий off-target-эффект по сравнению

с системой ZFNs (Mussolini et al., 2011). Значительный off-target-мутагенез, индуцируемый CRISPR/Cas9 мечением различных генов, был показан на клеточных линиях человека (Fu et al., 2013).

Каждая из двух систем ZFNs и TALENs требует дизайна ДНК-связывающих белков и сложного конструирования плазмид для их экспрессии, что делает эти методы длительными и проблематичными. Сравнительная простота, возможность быстрой работы, эффективность и дешевизна использования системы CRISPR/Cas являются ее важными преимуществами.

Система CRISPR/Cas9

Механизм иммунного ответа. С момента открытия повторяющихся последовательностей CRISPR до понимания функции и применения этой системы для направленного редактирования генома прошло несколько десятков лет (рис. 3). CRISPR/Cas — прокариотический аналог иммунной системы, предоставляющий защиту от фагов и плазмид (Makarova et al., 2006). Геномы почти всех архей и половины бактерий содержат кластеры Cas-генов и массивы CRISPRs. CRISPR бактерий, у которых была обнаружена данная система, содержат короткие, частично палиндромные повторы ДНК. CRISPR-повторы чередуются с CRISPR-спайсерами (CRISPR спарсер). Биологическая роль этих повторов стала понята относительно недавно, когда было показано, что спайсеры гомологичны инородным генетическим элементам вирусов и плазмид (Bolotin et al., 2005). Эти данные позволили предположить причастность системы CRISPR к иммунной системе прокариот (Makarova et al., 2006). Размер CRISPR-повтора может варьировать (23—55 bp), но обычно составляют 28—37 bp, а палиндромное строение повтора способствует формированию структуры застеж-



Рис. 3. Развитие знаний о системе CRISPR/Cas.

ка—молния. Размер CRISPR-спейсера также варьирует, хотя составляет преимущественно 32—38 bp.

Классификация CRISPR/Cas. Система CRISPR/Cas на основе генетических, структурных и функциональных различий делится на 3 типа (I—III) и 17 субтипов (Koonin, Makarova, 2013). Типы I и III родственны и представляют собой ансамбли Cas-белков, соединяющихся с crRNA для узнавания и последующей деградации нуклеиновых кислот, тогда как тип II филогенетически и структурно стоит особняком. Однако, несмотря на различия трех систем, в функционировании каждой можно выделить общие три этапа. Первый этап — адаптация, во время которой новый спейсер приобретается из экзогенной нуклеиновой кислоты в CRISPR-локус. Вторым этапом является биогенез crRNA, во время которого CRISPR-мотив транскрибируется и процессируется в малые интерферирующие crRNA, содержащие спейсер и фрагменты flankирующих повторов. Последним шагом является соединение с комплексами Cas-белков, во время которого crRNA направляют Cas-нуклеазу для специфического расщепления гомологичной чужеродной последовательности (Reeks et al., 2013).

Из-за того что система II типа намного проще структурно, именно она была применена для направленного геномного редактирования.

Механизм работы и структура Cas9. Система CRISPR/Cas II типа, состоящая из нуклеазы Cas9 и

sgRNA (синтетического комплекса crRNA и tracrRNA), может быть программирована на расщепление практически любой последовательности, предшествующей последовательности PAM. Образование комплекса Cas9 с sgRNA приводит к конформационным изменениям, формированию центрального канала для ДНК мишени, т. е. активации эндонуклеазы (Jinek et al., 2014).

Бактериальные системы из *Streptococcus pyogenes*, *S. thermophiles* и *Neisseria meningitidis* были адаптированы для использования в биоинженерных целях. Для работы с этими системами два компонента должны быть введены и экспрессированы в клетках или организме — Cas9-нуклеаза и sgRNA. 20 нуклеотидов на 5'-конце sgRNA (аналог протоспейсера) направляют Cas9 к специфичному ДНК-сайту. Этот сайт должен лежать непосредственно на 5'-конце PAM-последовательности. Таким образом, нуклеазная активность Cas9 может быть направлена к любой ДНК-последовательности формы N20-PAM с введением 20 bp в sgRNA.

Как говорилось выше, специфичность CRISPR/Cas9 обусловлена последовательностью PAM размером в 3—5 bp, локализующейся ниже последовательности мишени. Идентифицированные PAM-последовательности варьируют в системах с ортологами Cas: 5'-NGG-3' PAM у *S. pyogenes* (Jinek et al., 2012), 5'-NGGNG-3' и 5'-NNNA-GAAW-3' PAM у *S. thermophiles* (Deveau et al., 2008; Karvelis et al., 2013), 5'-NNNNNGATT-3' PAM у *N. meningiti-*

dis (Hou et al., 2013). PAM-зависимость увеличивает специфичность системы CRISPR/Cas. Использование CRISPR/Cas с длинной последовательностью PAM может служить инструментом снижения off-target-эффекта.

Совсем недавно были определены кристаллические структуры эндонуклеазы Cas9 для системы CRISPR/Cas типа II-A у *S. pyogenes* и типа II-C у *Actinomyces naeslundii* (Jinek et al., 2014). Эндонуклеаза Cas9 системы типа II-A *S. pyogenes* была также получена в комплексе с sgRNAs и ДНК-мишенью (Nishimasu et al., 2014).

Молекула Cas9 имеет форму полумесяца размером $10 \times 10 \times 5$ нм (Jinek et al., 2014). Было показано, что Cas9 обладает консервативной структурой, состоящей из двух фрагментов: REC (α -хеликазного высококонсервативного узнающего фрагмента), который вовлечен в узнавание дуплекса повтор—антиповтор в sgRNA, и нуклеазного фрагмента NUC, ответственного за узнавание PAM и за расщепление ДНК-мишени. Нуклеазный фрагмент состоит из нуклеазных доменов HNH и RuvC, которые позиционированы особым образом для расщепления соответственно комплементарной и некомплементарной нитей ДНК-мишени (Gasiunas et al., 2012). Нуклеазный фрагмент содержит еще PI-домен, непосредственно взаимодействующий с PAM (PAM-interacting domain) и определяющий специфичность PAM. Cas9 также содержит две предполагаемые борозды связывания с ДНК.

Была предложена модель расщепления ДНК РНК-направляемой эндонуклеазой Cas9. Согласно этой модели, Cas9 взаимодействует со смысловым—антисмысловым дуплексом sgRNA, что способствует формированию комплекса Cas9 : sgRNA. Два структурных фрагмента подвергаются конформационным изменениям после соединения с sgRNA, что приводит к формированию центрального канала, позволяющего соединение с ДНК-субстратом. Таким образом, двойной комплекс узнает ДНК-последовательность, комплементарную участку 20 bp направляющего региона sgRNA для формирования финального комплекса Cas 9 : sgRNA : ДНК-мишень. Перед формированием тройного комплекса PI-домен узнает PAM-последовательность на некомплементарной цепи, тем самым вызывая формирование R-петли. Затем домен HNH расщепляет комплементарную цепь в гетеродуплексе, а домен RuvC расщепляет одноцепочечную некомплементарную цепь (Nishimasu et al., 2014). Кроме того, было показано, что нуклеаза Cas9 содержит богатый аргинином высококонсервативный регион (Makarova et al., 2011), который, как предполагается, отвечает за связывание с РНК (Bayer et al., 2005). Биохимические исследования показали, что узнавание PAM эндонуклеазы Cas9 является необходимым условием для соединения и расщепления ДНК-мишени.

Трудности работы с системой CRISPR/Cas

Как сказано выше, одной из проблем использования системы CRISPR/Cas является наличие off-target-эффекта. В больших геномах могут присутствовать множественные последовательности ДНК, которые идентичны или высокомологичны последовательностям-мишням, интересующим исследователей. Расщепление подобных сайтов вызывает возникновение мутаций в нежелательных местах — off-target-мутаций. Снижение этого эффекта может быть достигнуто тщательным выбором сайтов-мишней с помощью использования соответствующих программ и ресурсов (рис. 4, а). Для обеспечения

большей специфичности CRISPR/Cas9 следует выбрать сайт-мишень с наименьшим числом off-target-сайтов и неправильно спаренных оснований между sgRNA и комплементарной последовательностью. Кроме того, во избежание off-target-эффекта может быть оптимизирован уровень экспрессии эндонуклеазы Cas9 (Pattanayak et al., 2013).

Успешным оказался подход с использованием мутантных низкозараженных версий Cas9 (nCas9), в основе которого лежит кооперация между двумя gRNA для внесения двухнитевых разрывов в ДНК (Mali et al., 2013). Другим подходом может быть создание мутантных линий с использованием sgRNA, которая метит разные последовательности в одном и том же гене. Наблюдение одного и того же фенотипа в различных мутантных линиях может говорить о нарушениях, связанных с интересующим геном.

Еще одна сложность заключается в ограничении применения РНК-полимеразы III для продукции gRNA из-за недостатка коммерчески доступной РНК-полимеразы III (Gao, Zhao, 2014). Кроме того, использующиеся для производства sgRNA *in vivo* промоторы U3 и U6 snRNA генов домашнего хозяйства имеют значительные ограничения (Gao, Zhao, 2014). Был предложен новый подход для производства gRNA как *in vitro*, так и *in vivo*. Был спроектирован искусственный ген RGR, транскрибируемая мРНК которого содержала желаемую sgRNA с рибосомальными последовательностями на обоих концах. После самокатализируемого расщепления зрелая gRNA успешно индуцировала последовательное специфичное расщепление на дрожжах (Gao, Zhao, 2014).

Возможности системы CRISPR/Cas

Сегодня с помощью системы CRISPR/Cas9 можно решить ряд задач, таких как активация и репрессия транскрипции с целью изучения транскрипционных сетей (присоединение доменов VP64 и KRAB соответственно), использование репортерных белков для визуализации (GFP и др.), очистка хроматина (аффинная метка), изменение топологии ДНК (использование доменов, приводящих к димеризации) и изучение модификаций хроматина. CRISPR/Cas9 может приводить к внесению точечных мутаций, заменам последовательностей, вставкам и делециям. Использование двойных систем sgRNA/Cas9 может способствовать возникновению крупных делеций, инверсий и транслокаций. Примером использования CRISPR/Cas для регуляции транскрипционной активности генов является система CRISPRi (CRISPR inference) (Qi et al., 2013). В системе используется дефектная dCas9 без нуклеазной активности. Она коэкспрессируется с sgRNA для формирования комплекса узнавания, который вмешивается в процессы транскрипционной elongации, присоединение РНК-полимеразы и транскрипционных факторов. Это позволяет выключать экспрессию генов без генетического изменения последовательности ДНК.

Применение систем направленного редактирования к hPSCs

Геномная инженерия на основе hPSCs несет большой потенциал для биомедицинских исследований, разработки платформ для тестирования лекарственных препаратов и регенеративной медицины. hPSCs способны к неограниченному делению и сохраняют потенциал диффе-

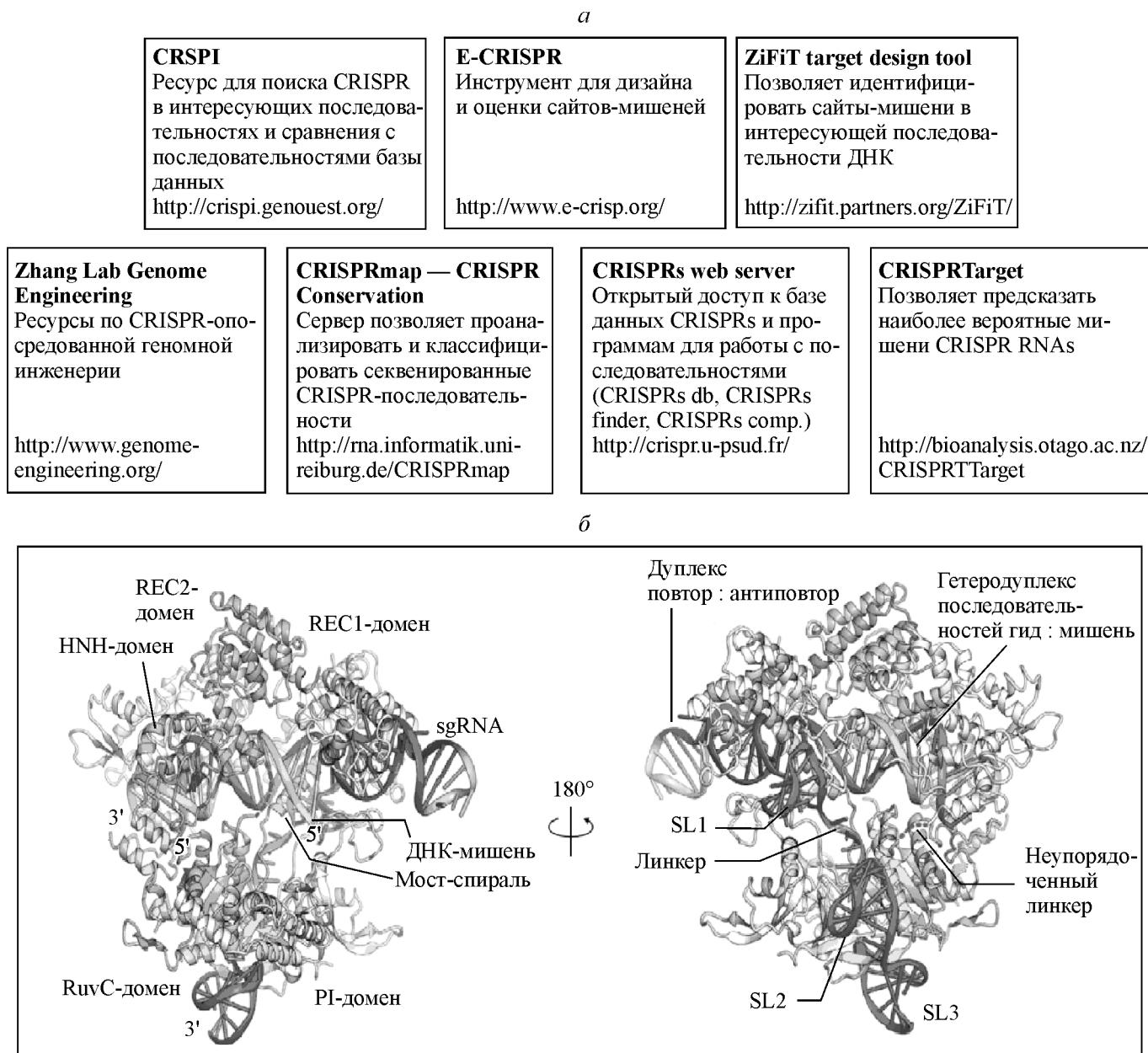


Рис. 4. Ресурсы для работы с системой CRISPR/Cas (*a*) и кристаллическая структура эндонуклеазы Cas9 в комплексе с sgRNA и ДНК-мишенью у *Streptococcus pyogenes* (*b*).

ренцировки в любой тип клеток человека (Thomson, 1998). Важной проблемой является разработка систем для эффективного и точного манипулирования геномом hPSCs.

Для редактирования генома hPSCs применяли системы ZFNs и TALENs. Однако работа с этими системами требует значительных усилий и длительного времени (Hockemeyer et al., 2009, 2011). Кроме того, hESCs являются плохо трансфицируемыми клеточными линиями. Недавно были получены данные об эффективном применении системы CRISPR/Cas9 из *Neisseria meningitidis* к плuriпотентным клеткам (Hou et al., 2013). В этой системе использовали протоспейсер размером 24 bp и несколько иную последовательность PAM (Hou et al., 2013). РНК-направляемая Cas9 нуклеаза из *N. meningitidis* (NmCas9) узнает PAM-последовательность структуры 5'-NNNNGATT3', отличную от PAM-последовательностей, узнаваемых Cas9

у *S. pyogenes* (SpCas9) (5'-NGG-3') и *S. thermophilus* (StCas9) (-5'-NNAGAAW-3') (W = A или T) (Hou et al., 2013). Катализируемый РНКазой III пре-crRNA-процессинг необходим для обеих систем *S. pyogenes* и *S. thermophilus*. Исследование системы CRISPR/Cas9 у *N. meningitidis* позволило обнаружить RNaseIII-процессингнезависимую систему (Schoen et al., 2014). Была показана высокая (60%-ная) эффективность применения NmCas9 для геномного редактирования на двух линиях ESCs и одной линии индуцированных плuriпотентных стволовых клеток. Преимуществом использования NmCas9 по сравнению с SpCas9 является лучшая специфичность мечения благодаря длинному crRNA-спейсеру (24 bp) и длинному PAM (Schoen et al., 2014). Кроме того, длинная последовательность PAM способствует снижению off-target-эффекта, хотя и ограничивает возможности применения этой системы. Нали-

чие ошибочно спаренных оснований оказалось переносимо в разной степени для NmCas9 и SpCas9 в клетках млекопитающих. NmCas9 является более чувствительной по сравнению с SpCas9 к ошибочно спаренным основаниям в 13, 15 и 17-м положениях (отсчет с PAM-проксимального конца протоспейсера). Эффективность NmCas9 геномного редактирования при наличии таких мисмэтчей достигала 10—40 %, тогда как у SpCas9 — 60—90 % (Cong et al., 2013; Hou et al., 2013).

Совсем недавно на основе совместного использования системы CRISPR/Cas с TALENs была разработана платформа для проведения генно-инженерных работ на hPSCs, названная iCRISPR (González et al., 2014). iCRISPR позволяет быстрое (сроком до 1 мес) и высокоэффективное создание биаллельных нокаутных линий hPSCs для работ, связанных с изучением функции генов, а также с внесением гомозиготных мутаций в hPSCs со специфичными изменениями нуклеотидов для точного моделирования (воспроизведения) условий изучаемой болезни. Кроме того, была показана успешная одношаговая генерация двойных и тройных нокаутных линий hPSC с эффективностью до 10 %, а также стадиоспецифический индуцибельный нокаут гена во время дифференцировки hPSC путем котрансфекции sgRNAs с одноцепочечной ДНК (ssDNA)-HDR-матрицей с эффективностью до 10 % (González et al., 2014). Для достижения быстрого, множественного и индуцибельного геномного редактирования в hPSCs с помощью TALENs-опосредованного мечения генов была создана панель hPSCs для быстрой и надежной доксициклин-индуцибельной экспрессии Cas9 (iCas9 hPSCs). Путем трансфекции iCas9 hPSCs с sgRNAs, спроектированной для нескольких различных генов, были генерированы биаллельные нокаутные линии hPSC по шести индивидуальным генам с эффективностью от 20 до 60 % (González et al., 2014).

Система CRISPR/Cas была успешно применена и для регуляции активации и репрессии транскрипционной активности генов в hPSCs, оказывающих влияние на ход клеточной дифференцировки. Этот подход может быть применен для изучения и регулирования решений дифференцировки (Kearns et al., 2014).

iPSC могут быть прекрасной платформой для моделирования заболеваний. Использование системы CRISPR/Cas позволило получить iPSCs с биалльной мутацией в гене, кодирующем метилтрансферазу 3В (*DNMT3B*). Возникновение подобной мутации приводит к синдрому ICF (immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome) — очень редкому аутосомально-рецессивному заболеванию, характеризующемуся иммуно-дефицитностью, нестабильностью хромосом и аномалиями лица (Horii et al., 2013).

Стоит упомянуть работу, в которой были получены iPSCs, гомозиготные по *XXR5Δ32*-мутации, с помощью редактирования генома дикого типа iPSCs с использованием системы CRISPR/Cas совместно с PiggyBac-технологией. Пациенты, гомозиготные по мутации, вызванной делецией в гене рецептора C-C (хемокинового рецептора V типа (*XXR5Δ32*)), резистентны к вирусу HIV-1. iPSCs были дифференцированы в моноциты (макрофаги) и была показана их резистентность к HIV-1 (Ye et al., 2014).

Интересной также является стратегия изучения функциональной роли интересующих генов на стволовых клетках с использованием CRISPR/Cas. Недавно с помощью CRISPR/Cas9 была произведена вставка индуцибельного регулируемого тетракиклином промотора (tet-OFF/TRE-CMV) выше области эндогенного промотора гена рецеп-

тора VEGFR 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) в ESCs мыши. Этот ген является ключевым в процессе дифференцировки в эндотелиальные клетки. Таким образом, могут быть достигнуты и инактивация гена с помощью наличия вставки, и индуцибельная экспрессия этого же гена в одной и той же системе (Matsunaga, Yamashita, 2014).

Заключение

Применение систем редактирования генома на основе программируемых направляемых нуклеаз к плорипотентным стволовым клеткам позволяет использовать hPSCs в качестве платформы для изучения генов, вовлеченных в молекулярные механизмы возникновения аномальных фенотипов, моделирования заболеваний, изучения лекарственных препаратов. Это открывает новые возможности в области генной терапии и регенеративной медицины. К таким методам геномного редактирования относятся системы направляемых нуклеаз — ZFNs, или «цинковые пальцы», TALENs и CRISPR/Cas.

Каждая из трех вышеописанных систем может использоваться для направленных изменений генома, нарушения функции генов, их коррекции и добавления новых. Сравнительная простота, высокая скорость в работе, эффективность и дешевизна использования системы CRISPR/Cas являются ее важными преимуществами. Кроме того, CRISPR/Cas успешно зарекомендовала себя при работе с эмбриональными клетками человека. Система CRISPR/Cas9 может быть использована для внесения точечных мутаций, замен последовательностей, вставок и делеций, для активации и репрессии транскрипции генов как с привнесением генетических изменений в последовательность ДНК, так и без, для изучения транскрипционных сетей, визуализации с использованием репортерных белков и изучения модификаций хроматина. Использование системы из двух sgRNA/Cas9 позволяет получать крупные делеции, инверсии и транслокации. Важным преимуществом системы является возможность успешной одношаговой генерации двойных и тройных нокаутных линий hPSC, а также возможность стадиоспецифического индуцибельного нокаута гена во время дифференцировки hPSC. Система CRISPR/Cas может быть применена для регуляции активации и репрессии транскрипционной активности генов в hPSCs, оказывающих влияние на ход клеточной дифференцировки. Этот подход может быть применен для изучения и манипулирования решениями дифференцировки стволовых клеток. Перспективным может являться использование системы CRISPR/Cas в онкогенетических работах, а также эпигенетических исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (контракт № 14.740.11.0920 для Д. Мелино) и Российского научного фонда (проект 14-15-00816 для Н. А. Барлева).

Список литературы

- Bassett A. R., Tibbit C., Ponting C. P., Liu J.-L. 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* 4 : 220—228.
- Bayer T. S., Booth L. N., Knudsen S. M., Ellington A. D. 2005. Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA. *RNA*. 20 : 1848—1857.

- Beumer K., Bhattacharyya G., Bibikova M., Trautman J. K., Carroll D. 2006. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 172 : 2391—2403.
- Bogdanove A. J., Schornack S., Lahaye T. 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 : 394—401.
- Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 151 : 2551—2561.
- Cade L., Reyon D., Hwang W. Y., Tsai S. Q., Patel S., Khayter C., Joung J. K., Sander J. D., Peterson R. T., Yeh J.-R. J. 2012. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res.* 40 : 8001—8010.
- Capecci M. R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* 6 : 507—512.
- Carberry I. D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E. J., Liaw L., Cui X. 2010. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 186 : 451—459.
- Cheng Z., Yi P., Wang X., Chai Y., Feng G., Yang Y., Liang X., Zhu Z., Li W., Ou G. 2013. Conditional targeted genome editing using somatically expressed TALENs in *C. elegans*. *Nat. Biotechnol.* 31 : 934—937.
- Cho S. W., Kim S., Kim J. M., Kim J.-S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31 : 230—232.
- Christian M., Qi Y., Zhang Y., Voytas D. F. 2013. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3 (Bethesda)*. 3 : 1697—1705.
- 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. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339 : 819—823.
- Deveau H., Barrangou R., Garneau J. E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D. A., Horvath P., Moineau S. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190 : 1390—1400.
- Ding Q., Regan S. N., Xia Y., Oostrom L. A., Cowan C. A., Musunuru K. 2013. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*. 12 : 393—394.
- Doyon Y., McCammon J. M., Miller J. C., Faraji F., Ngo C., Katibah G. E., Amora R., Hocking T. D., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Amacher S. L. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26 : 702—708.
- Fu Y., Foden J., Khayter C., Maeder M. L., Reyon D., Joung J. K., Sander J. D. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31 : 822—826.
- Gao Y., Zhao Y. 2014. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.* 56 : 343—349.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109 : E2579—E2586.
- Gilbert L., Larson M. H., Morsut L., Liu Z., Brar G., Torres S. E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E. H., Doudna J., Lim W., Weissman J. S., Qi L. S. 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 154 : 442—451.
- González F., Zhu Z., Shi Z.-D., Lelli K., Verma N., Li Q. V., Huangfu D. 2014. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 13 : 1—12.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 8 : 172.
- Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., Queisser A., Carnwath J. W., Lucas-hahn A., Zhang L., Meng X., Philip D., Schwinzer R., Cost G. J., Nie H. 2011. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108 : 15 010.
- Hockemeyer D., Jaenisch R. 2010. Gene targeting in human pluripotent cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 75 : 201—209.
- Hockemeyer D., Soldner F., Beard C., Gao Q., Mitalipova M., DeKelver R. C., Katibah G. E., Amora R., Boydston E. A., Zeitler B., Meng X., Miller J. C., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Jaenisch R. 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 27 : 851—857.
- Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C. S., Gao Q., Cassidy J. P., Cost G. J., Zhang L., Santiago Y., Miller J. C., Zeitler B., Cherone J. M., Meng X., Hinkley S. J., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D., Jaenisch R. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29 : 731—734.
- Holkers M., Maggio I., Liu J., Janssen J. M., Miselli F., Musolino C., Recchia A., Cathomen T., Gonçalves M. A. F. V. 2013. Differential integrity of TALE nuclelease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 41 : e63.
- Horii T., Tamura D., Morita S., Kimura M., Hatada I. 2013. Generation of an ICF syndrome model by efficient genome editing of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR system. *Int. J. Mol. Sci.* 14 : 19 774—19 781.
- Hou Z., Zhang Y., Propson N. E., Howden S. E., Chu L.-F., Sontheimer E. J., Thomson J. A. 2013. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 110 : 1313587110.
- Hwang W. Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M. L., Tsai S. Q., Sander J. D., Peterson R. T., Yeh J.-R. J., Joung J. K. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31 : 227—229.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D. P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41 : e188.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337 : 816—821.
- Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A. T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 343 : 1247997.
- Karvelis T., Gasiunas G., Miksys A., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. 2013. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol.* 10 : 841—851.
- Katsuyama T., Akhmedov A., Seimiya M., Hess S. C., Sievers C., Paro R. 2013. An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 41 : e163.
- Kearns N., Genga R. M. J., Enuameh M. S., Garber M., Wolfe S., Maehr R. 2014. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development*. 141 : 219—223.
- Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 93 : 1156—1160.
- Konermann S., Brigham M. D., Trevino A. E., Hsu P. D., Heidenreich M., Cong L., Platt R. J., Scott D., Church G. M., Zhang F. 2013. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*. 500 : 472—476.
- Koonin E. V., Makarova K. S. 2013. Evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes CRISPR-CAS. *RNA Biol.* 10 : 679—686.
- Lei Y., Guo X., Liu Y., Cao Y., Deng Y., Chen X., Cheng C. H. K., Dawid I. B., Chen Y., Zhao H. 2012. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered trans-

- ription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 17 484—17 489.
- Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., Zhao Y., Liu M.* 2013a. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31 : 681—683.
- Li L., Atef A., Piatek A., Ali Z., Piatek M., Aouida M., Sharaku A., Mahjoub A., Wang G., Khan S., Fedoroff N. V., Zhu J.-K., Mahfouz M. M.* 2013b. Characterization and DNA-binding specificities of Ralstonia TAL-like effectors. *Mol. Plant.* 6 : 1318—1330.
- Lieber M. R.* 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79 : 181—211.
- Liu H., Yu X., Li K., Klejnot J., Yang H., Lisiero D., Lin C.* 2008. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science.* 322 : 1535—1539.
- Liu P., Long L., Xiong K., Yu B., Chang N., Xiong J.-W., Zhu Z., Liu D.* 2014. Heritable/conditional genome editing in *C. elegans* using a CRISPR-Cas9 feeding system. *Cell Res.* 24 : 1—4.
- Lloyd A., Plaisier C. L., Carroll D., Drews G. N.* 2005. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 2232—2237.
- Makarova K. S., Aravind L., Wolf Y. I., Koonin E. V.* 2011. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct.* 6 : 38.
- Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalina S. A., Wolf Y. I., Koonin E. V.* 2006. 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.* 1 : 7.
- Mali P., Aach J., Stranges P. B., Esvelt K. M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G. M.* 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 31 : 833—838.
- Mashimo T., Takizawa A., Voigt B., Yoshimi K., Hiai H., Kurokubo T., Serikawa T.* 2010. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS ONE.* 5 : e8870.
- Matsunaga T., Yamashita J. K.* 2014. Single-step generation of gene knockout-rescue system in pluripotent stem cells by promoter insertion with CRISPR/Cas9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444 : 158—163.
- Mendenhall E. M., Williamson K. E., Reyon D., Zou J. Y., Ram O., Joung J. K., Bernstein B. E.* 2013. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat. Biotechnol.* 31 : 1133—1136.
- Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I., Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H. S., Holmes M. C., Zhang L., Gregory P. D., Rebar E. J.* 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29 : 143—148.
- Moscou M. J., Bogdanove A. J.* 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 326 : 1501.
- Moynahan M. E., Jasin M.* 2010. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 : 196—207.
- Mussolino C., Morbitzer R., Lütge F., Dannemann N., Layhe T., Cathomen T.* 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 39 : 9283—9293.
- Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konermann S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O.* 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 156 : 935—949.
- Ota S., Hisano Y., Ikawa Y., Kawahara A.* 2014. Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes Cells.* 15 : 1—10.
- Pattanayak V., Lin S., Guilinger J. P., Ma E., Doudna J. A., Liu D. R.* 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 31 : 839—843.
- Qi L. S., Larson M. H., Gilbert L., Doudna J., Weissman J. S., Arkin A. P., Lim W.* 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 152 : 1173—1183.
- Qiu Z., Liu M., Chen Z., Shao Y., Pan H., Wei G., Yu C., Zhang L., Li X., Wang P., Fan H.-Y., Du B., Liu B., Liu M., Li D.* 2013. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res.* 41 : e120.
- Reeks J., Naismith J. H., White M. F.* 2013. CRISPR interference: a structural perspective. *Biochem. J.* 453 : 155—166.
- Schoen C., Vogel J., Sontheimer E. J.* 2013. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *NIH Public Access.* 50 : 488—503.
- Sebastiano V., Maeder M. L., Angstman J. F., Haddad B., Khayter C., Yeo D. T., Goodwin M. J., Hawkins J. S., Ramirez C. L., Batista L. F. Z., Artandi S. E., Wernig M., Joung J. K.* 2011. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *NIH Public Access.* 29 : 1717—1726.
- Shen B., Zhang J., Wu H., Wang J., Ma K., Li Z., Zhang X., Zhang P., Huang X.* 2013. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.* 23 : 720—723.
- Soldner F., Laganière J., Cheng A. W., Hockemeyer D., Gao Q., Alagappan R., Khurana V., Golbe L. I., Myers R. H., Lindquist S., Zhang L., Guschin D., Fong L. K., Vu B. J., Meng X., Urnov F. D., Rebar E. J., Gregory P. D., Zhang H. S., Jaenisch R.* 2011. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell.* 146 : 318—331.
- Song J., Zhong J., Guo X., Chen Y., Zou Q., Huang J., Li X., Zhang Q., Jiang Z., Tang C., Yang H., Liu T., Li P., Pei D., Lai L.* 2013. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res.* 23 : 1059—1062.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.* 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131 : 861—872.
- Tesson L., Usal C., Ménoret S., Leung E., Niles B. J., Remy S., Santiago Y., Vincent A. I., Meng X., Zhang L., Gregory P. D., Aengon I., Cost G. J.* 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29 : 695—696.
- Thomas K. R., Capecchi M. R.* 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51 : 503—512.
- Thomson J. A.* 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282 : 1145—1147.
- Urnov F. D., Miller J. C., Lee Y.-L., Beausejour C. M., Rock J. M., Augustus S., Jamieson A. C., Porteus M. H., Gregory P. D., Holmes M. C.* 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 435 : 646—651.
- Urnov F. D., Rebar E. J., Holmes M. C., Zhang H. S., Gregory P. D.* 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11 : 636—646.
- Ye L., Wang J., Beyer A. I., Teque F., Cradick T. J., Qi Z., Chang J. C.* 2014. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 111 : 9591—9596.
- Yusa K., Rashid S. T., Strick-Marchand H., Varela I., Liu P., Darche S., Alexander G., Marciniaek S. J., Fusaki N.* 2012. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 478 : 391—394.

CRISPR/Cas SYSTEM FOR GENOME EDITING IN PLURIPOTENT STEM CELLS

E. A. Vasilieva^{1,} G. Melino^{2,3} N. A. Barlev^{1,2}*¹ Institute of Cytology RAS, ² Technological University, St. Petersburg,
and ³ MRC Toxicology Unit, Leicester, LE1 9HN, United Kingdom; * e-mail: slkd-k@mail.ru

Genome editing systems based on site-specific nucleases became very popular for genome editing in modern bioengineering. Human pluripotent stem cells provide a unique platform for genes function study, disease modeling, and drugs testing. Consequently, technology for fast, accurate and well controlled genome manipulation is required. CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated) system could be employed for these purposes. This system is based on site-specific programmable nuclease Cas9. Numerous advantages of the CRISPR/Cas system and its successful application to human stem cells provide wide opportunities for genome therapy and regeneration medicine. In this publication, we describe and compare the main genome editing systems based on site-specific programmable nucleases and discuss opportunities and perspectives of the CRISPR/Cas system for application to pluripotent stem cells.

Key words: CRISPR/Cas, genome editing, pluripotent stem cells, ZFNs, TALENs.