

CRISPR–CAS9: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ГЕНОМНОМ РЕДАКТИРОВАНИИ

Обзор

© 2022 И. Гостимская

Манчестерский университет,
M1 7DN Манчестер, Великобритания; электронная почта: gostimskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 11.05.2022

После доработки 07.07.2022

Принята к публикации 19.07.2022

Развитие метода геномного редактирования с использованием системы CRISPR–Cas9 было удостоено Нобелевской премии по химии в 2020 году, когда с момента открытия всех принципиальных молекулярных компонентов этой системы не прошло и 10 лет. Впервые в истории вручения премии её получили две женщины, Эмманюэль Шарпантье и Дженнифер Даудна, сделавшие одни из ключевых открытий в области манипулирования ДНК с помощью системы CRISPR–Cas9, так называемых «генетических ножниц». Важность этой технологии сложно переоценить, так как она позволяет не только направленно модифицировать геномы модельных организмов в научных исследованиях и изменять характеристики важных для человека растений и животных, но и несёт в себе потенциал революционных изменений в медицинской науке, в особенности в области лечения генетических заболеваний. Изначальной биологической функцией системы CRISPR–Cas9 является защита прокариот от мобильных генетических элементов, однако на момент написания данного обзора технологии, основанные на использовании CRISPR–Cas9 и родственных систем, уже успешно применялись в таких областях, как лечение опасных болезней человека, создание тестов для детекции коронавируса и даже для геномной модификации человеческих эмбрионов с последующим рождением младенцев, прошедших эту процедуру. Такое вмешательство в клетки зародышевой линии человека впоследствии вызвало широкое осуждение по причине этического аспекта данного использования технологии и даже призывы к мораторию на наследуемые геномные манипуляции. В данном обзоре рассматривается история открытия и изучения системы CRISPR–Cas9 с некоторыми современными аспектами её последующего использования, включая этические вопросы применения системы на человеке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CRISPR–Cas9, геномное редактирование, «генетические ножницы», этические аспекты.

DOI: 10.31857/S0320972522080103, **EDN:** AYYPVK

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ CRISPR–Cas9

Короткие палиндромные повторы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) были впервые обнаружены в бактериях *Escherichia coli* и описаны в 1987 г. в публикации Ishino et al. [1] из Осацкого университета (Япония). Секвенирование этих сложных для изучения фрагментов ДНК на тот момент заняло

несколько месяцев, однако ни их происхождение, ни значение в клетке не были предсказаны их первооткрывателями. Несмотря на то что во время ранних работ по этой тематике биологическая функция системы CRISPR ещё не была выявлена, на тот момент учёными уже был предложен способ использования закодированной в палиндромных повторах CRISPR информации в медицинских исследованиях, а именно, в области генотипирования различных штаммов

Принятые сокращения: *cas* – гены, ассоциированные с CRISPR (CRISPR-associated genes); CRISPR – равномерно распределённые короткие палиндромные повторы, собранные в кластеры (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats); crRNA – CRISPR-ассоциированная РНК (CRISPR-RNA); PAM – мотив, соседствующий с протоспейсером (Protospacer Adjacent Motif); sgRNA – единая направляющая РНК, «РНК-гид» (single guide RNA); SpCas9 – белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes*; tracrRNA – транс-активирующая CRISPR РНК (trans-activating CRISPR RNA).

бактерий: изначально на примере *Mycobacterium tuberculosis* [2], а затем – *Streptococcus pyogenes* [3]. Как оказалось, локусы CRISPR в разных штаммах одного и того же вида патогенных бактерий обладали высокой степенью полиморфизма, что позволяло характеризовать разнообразие штаммов бактерий в клинических условиях.

Важный прорыв в понимании биологической функции палиндромных повторов CRISPR случился после того, как в 1995 г. Франсиско Мохики из Университета г. Аликанте (Испания) обнаружил подобные структуры в геноме архей *Haloferax mediterranei* [4]. Их наличие в эволюционно удалённом домене жизни предполагало функциональную значимость этих элементов и послужило толчком к дальнейшим исследованиям. Ф. Мохики заметил схожесть описанных им элементов с ранее найденными ДНК-повторами в геноме бактерий и одним из первых выдвинул гипотезу, что эти необычные локусы включают в себя фрагменты чужеродной ДНК и, по сути, являются частью иммунной защиты бактерий и архей [5]. В том же году, что и Ф. Мохики, две другие лаборатории независимо пришли к подобным выводам [6, 7], оповещая о начале эпохи активных исследований этого необычайного явления природы. В соответствии с вышеупомянутой теорией иммунной системы прокариот, фрагменты вирусной ДНК («спейсеры» длиной в 17–84 оснований), разделённые короткими палиндромными повторами (23–50 оснований [8]) и сгруппированные в кластеры в межгенных областях, представляют собой библиотеку потенциально опасной для прокариот генетической информации (для обзора по микробному антивирусному арсеналу см. обзоры Isaev et al. [9, 10]). Изначально предполагалось, что такая система может работать по механизму РНК-интерференции, однако в публикации Марраффини и Сонтхаймера было впервые экспериментально продемонстрировано, что мишенью атаки иммунной системы прокариот является непосредственно чужеродная ДНК [11], а не мРНК, и, следовательно, использование такой системы в лаборатории может представлять собой потенциальный инструмент геномного редактирования. Однако в более поздних исследованиях было показано, что некоторые из описанных систем CRISPR действительно работают с молекулами РНК [12, 13] и, соответственно, могут быть использованы для избирательной деактивации транскриптов внутри клетки [14, 15].

Первые экспериментальные сведения о работе системы CRISPR были получены в 2007 г. в исследованиях двух французских учёных, Родольфа Баррангу и Филиппа Хорвата, рабо-

тающих с йогуртовыми культурами бактерий *Streptococcus thermophilus* в датской компании «Даниско» [16]. Благодаря наличию у компании богатой коллекции штаммов бактерий, собранных начиная с 1980 г., учёные смогли проследить исторический ход приобретения бактериями спейсеров в локусе CRISPR в ответ на вирусные атаки бактериофагов. Добавление дополнительных спейсеров в этой работе вызывало у клеток *S. thermophilus* приобретённый иммунитет к соответствующим новым видам бактериофагов, что впоследствии привело к получению авторами одного из первых патентов в этой области [17] и началу «вакцинации» бактериальных культур с помощью технологии CRISPR компанией «Даниско» в 2005 г. [18].

В настоящее время повторы CRISPR обнаружены в большинстве геномов архей и почти в половине изученных геномов бактерий, но не были найдены в последовательностях ДНК эукариот и вирусов. Существование CRISPR-повторов в митохондриях было предположено в одной из самых ранних публикаций по тематике, в которой эта система также была впервые описана у цианобактерий [19]. Авторы работы использовали ранее опубликованные данные секвенирования митохондриальных плазмид из бобов *Vicia faba* L. [20], а их выводы были в дальнейшем процитированы Mojica et al. [21], однако не были подтверждены в более поздних исследованиях [8].

На начальном этапе исследований повторов CRISPR различные научные группы для их обозначения использовали разнообразные имена, что на нынешний момент осложняет поиск ранних статей по этой тематике. Принятое на нынешний момент название CRISPR впервые появилось в публикации Jansen et al. [22] в 2002 г. (с подачи Ф. Мохики в корреспонденции между двумя коллаборирующими научными группами). В этой же работе впервые было описано наличие генов, ассоциированных с повторами CRISPR и получивших название *cas1–4* (CRISPR-associated genes). Эти гены были обнаружены в непосредственной близости от локусов CRISPR различных прокариот, а два из них содержали мотивы, характерные для хеликазы и нуклеазы, что подкрепило гипотезу авторов о неслучайной связи группы генов *cas* с системой CRISPR и их вовлечении в метаболизм ДНК. Также в 2002 г. эта группа генов была описана командой учёных под руководством Е.В. Кунина из института NCBI (Бетесда, США), однако её связь с повторами CRISPR не была выявлена в их ранней работе [23]. С момента первого открытия генов, ассоциированных с системой CRISPR, по сегодняшний день

было обнаружено их поистине необычайное множество и разнообразие в клетках прокариот, включающее в себя представителей семейств хеликаз, нуклеаз, полимераз и др. Белки, ассоциированные с этой системой, можно разделить на адаптационные (участвующие в приобретении иммунитета, главные представители – Cas1 и Cas2) и эффекторные (непосредственно вовлечённые в уничтожение мобильных генетических элементов посредством их распознавания и расщепления), а также дополнительные и регуляторные [24]. В настоящий момент признана система классификации, в которой все известные на сегодняшний день системы CRISPR–Cas разделены на 2 класса и 6 типов, которые также, в свою очередь, подразделяются на многочисленные подтипы: на момент написания обзора Makarova et al. [25] было описано более 30 подтипов (рис. 1). Главная разница между классами состоит в том, что эффекторный модуль белков класса 1 представлен комплексом из нескольких белков, тогда как в классе 2 – одним мультидоменным белком (Cas9, Cas12 или Cas13) [26–28].

Наибольший интерес для биотехнологии, медицины и других отраслей науки и индустрии из всех известных молекул Cas представляют собой белки системы направленного разрезания молекул чужеродной ДНК (а как было

выяснено впоследствии, в некоторых случаях – РНК) – так называемые «генетические ножницы», среди которых наиболее изученной является нуклеаза Cas9. Впервые этот белок был описан в связи с его ассоциацией с повторами CRISPR в статье Bolotin et al. [6], где он изначально был назван Cas5 (другие альтернативные названия – Csn1 и Csx12), также авторами этой публикации было выявлено присутствие в нем мотива HNH (His-Asn-His), присущего и другим нуклеазам. Ещё одно важное наблюдение, сделанное авторами той же работы – обнаружение определённой закономерности в последовательностях оснований по одну сторону от описанных спейсеров локусов CRISPR, однако понимание роли и название для этого явления пришло в более поздних исследованиях. В настоящее время короткие мотивы, соседствующие с протоспейсерами, но отсутствующие в изначальных спейсерах локуса CRISPR, носят название PAM – Protospacer Adjacent Motifs (мотивы, соседствующие с протоспейсерами) [29]. Протоспейсерами называются фрагменты ДНК, атакуемые иммунной системой прокариот и идентичные соответствующему спейсеру в локусе CRISPR за исключением вышеупомянутого мотива PAM. Эти мотивы важны на этапе распознавания потенциально опасной генетической информации, их присут-

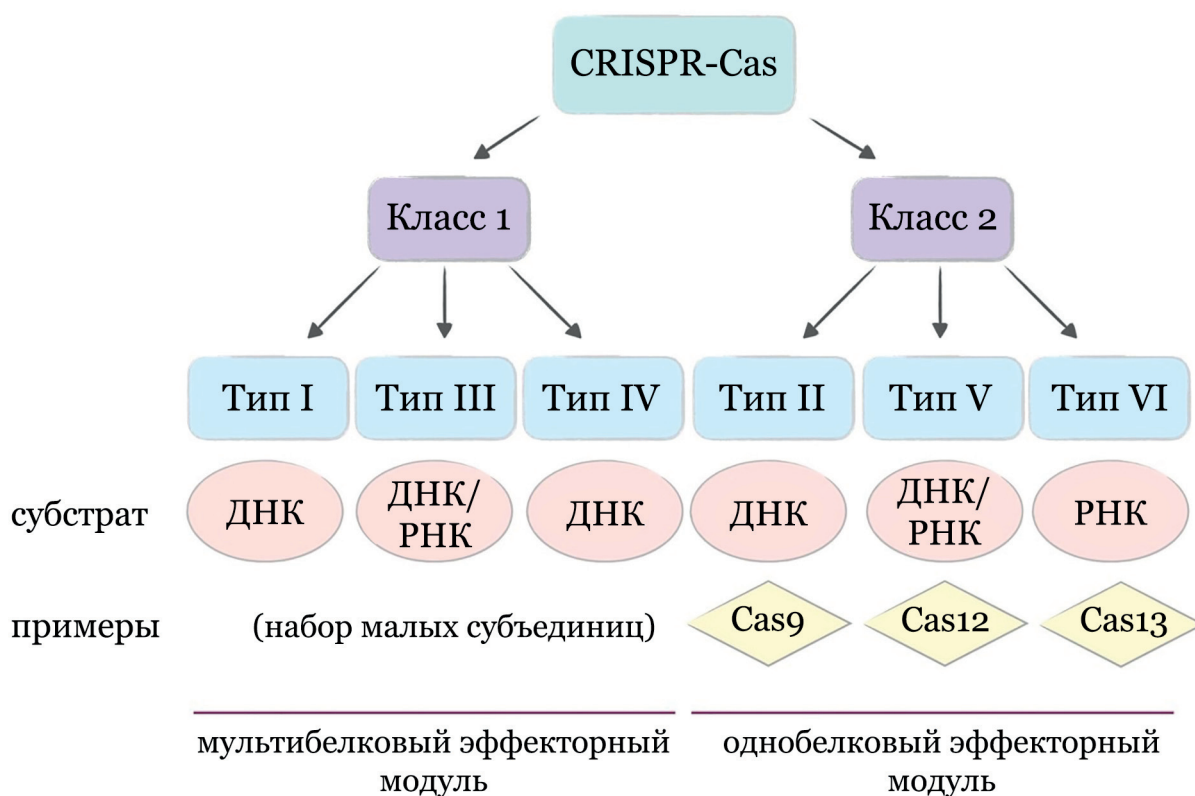


Рис. 1. Принятая классификация известных систем CRISPR–Cas

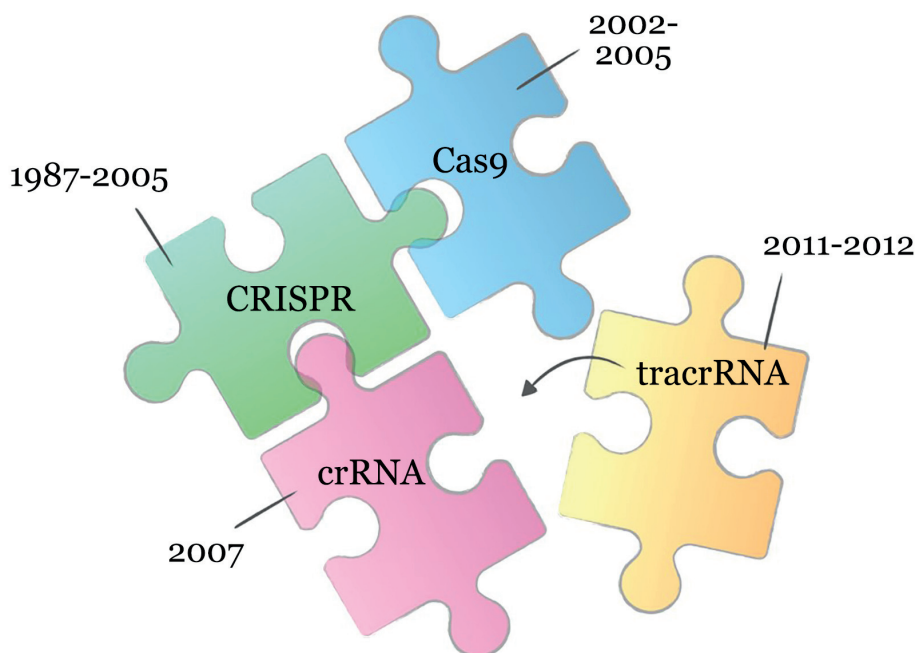


Рис. 2. Исторический ход открытий компонентов системы CRISPR–Cas9. 1987 г. – короткие повторы ДНК, впоследствии получившие название CRISPR, впервые замечены в бактериальных геномах, а в 1995 г. обнаружены и в геномах архей. 2005 г. – предположена роль повторов CRISPR в защите прокариот от чужеродной генетической информации, а также впервые описан белок Cas9 (изначальная информация о белках, ассоциированных с локусом CRISPR, появилась в 2002 г.). Две молекулы РНК, crRNA и tracrRNA, обнаружены в составе комплекса в 2007 и 2011 гг. соответственно. Работа, в дальнейшем удостоенная Нобелевской премии, где все компоненты были собраны *in vitro*, а две молекулы РНК объединены в одну для удобства использования системы, была опубликована в 2012 г.

ствии на конце последовательности сигналит о чужеродности фрагмента ДНК и необходимости её расщепления, тогда как последовательность ДНК, сохранённая в локусе CRISPR и не содержащая мотивов PAM, не подвергается атаке иммунной системы прокариот.

Важным игроком в системе CRISPR–Cas9 оказалась также короткая РНК – процессированный продукт транскрипции с локуса CRISPR, направляющая белки иммунной системы прокариот к чужеродным молекулам с генетической информацией. Группа исследователей под руководством Дж. ван дер Уста (Вагенингенский университет, Нидерланды), описавших существование таких молекул РНК, присвоила им название crRNA (CRISPR RNA, CRISPR-ассоциированная РНК). Также было замечено, что изначальным результатом транскрипции с локуса CRISPR является молекула-предшественница пре-crRNA, состоящая из нескольких фрагментов спейсеров и повторов, которая в дальнейшем подвергается расщеплению на индивидуальные фрагменты [30]. В работе лаборатории под руководством В. Шикшниса (Вильнюсский университет, Литва) было продемонстрировано, что длина непосредственно «направляющей» последовательности crRNA в 20 пар оснований, комплементарная ДНК-мишени, необходима и достаточна для нуклеаз-

ной активности комплекса CRISPR–Cas, даже если спейсер в локусе CRISPR представлен более длинной последовательностью нуклеотидов [31]. Эта публикация была одной из первых двух работ *in vitro*, проведённых параллельно и независимо в конкурирующих лабораториях и описывающих, как в системе CRISPR фермент Cas9 использует crRNA для целенаправленного разрезания чужеродной ДНК.

Последним недостающим звеном в головоломке, без которого невозможно собрать работающую систему CRISPR–Cas9 *in vitro*, оказалась ещё одна короткая молекула РНК, открытая в связи с её участием в процессировании crRNA группой Эмманюэль Шарпантье в 2011 г. [32]. Эта необходимая для работы нуклеазы молекула была названа tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA, транс-активирующая CRISPR RNA). В последующей работе, позднее отмеченной Нобелевской премией 2020 г., была показана роль tracrRNA в непосредственном механизме разрезания ДНК-мишени, а также предположено объединение двух молекул РНК, crRNA и tracrRNA, в одну химерную молекулу, что значительно облегчило практическое использование системы CRISPR–Cas9 в последующих применениях (sgRNA – single guide RNA, единая направляющая РНК, «РНК-гид» [33]). На рис. 2 показаны временные рамки хода исторических событий

открытия компонентов системы CRISPR–Cas9: изначально самого локуса CRISPR, затем белков, ассоциированных с ним, включая Cas9, а позднее – и двух молекул РНК, необходимых для образования рибонуклеопротеинового комплекса и распознавания субстратной ДНК.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR–Cas9 В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Открытие необходимых и достаточных компонентов системы CRISPR–Cas9 послужило началом гонки конкурирующих лабораторий за титул первенства в применении системы для генетического редактирования клеток человека и животных. В январе 2013 г. практически одновременно появились пять публикаций авторов, сообщавших о достижении этой цели. Две работы, напечатанные в одном выпуске журнала *Science* и предложившие наиболее оптимальный подход к решению этой задачи, были выполнены в лабораториях Джорджа Чёрча (Гарвардский университет, США) и Фэна Чжана (Институт Броуд, США). В этих работах было показано, что для успешного редактирования ДНК в клетках человека необходимо провести несколько шагов адаптации системы. К таким шагам относятся оптимизация кодонов кодирующей части гена *cas9* и добавление сигнала ядерной локализации, удлинение молекулы sgRNA (для улучшения эффективности работы системы), а также возможное добавление образца ДНК, по которому клетка может прове-

сти гомологически направленную репарацию двойного разрыва молекулы (последний шаг был применён только в лаборатории Дж. Чёрча) [34, 35]. Также в январе 2013 г. вышли сходные публикации из лабораторий Дж. Даудны (Колледж Беркли, США) [36], Джин-Су Кима (Сеульский университет, Южная Корея) [37] и Дж. Кита Джоунга (Гарвардская школа медицины, США) [38]. В последней упомянутой публикации работа была проведена на клетках данио-рерио, а не человека, однако, что немаловажно, впервые было показано использование системы CRISPR–Cas9 на клетках зародышевой линии.

ПЕРВЫЕ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Как было упомянуто выше, наиболее изученным белком из группы Cas является нуклеаза Cas9, за ~20 лет с момента открытия генов *cas* более 20 000 статей в системе PubMed упоминают название Cas9 в том или ином контексте. Следующим очевидным этапом исследований системы CRISPR–Cas9 послужили попытки получить детальную информацию о структуре этого белка с помощью методов кристаллографии. Ситуация со многими другими ключевыми этапами исследований в данной области повторилась и в этом случае: результаты кристаллографических работ конкурирующих лабораторий были опубликованы практически одновременно. В феврале 2014 г. в

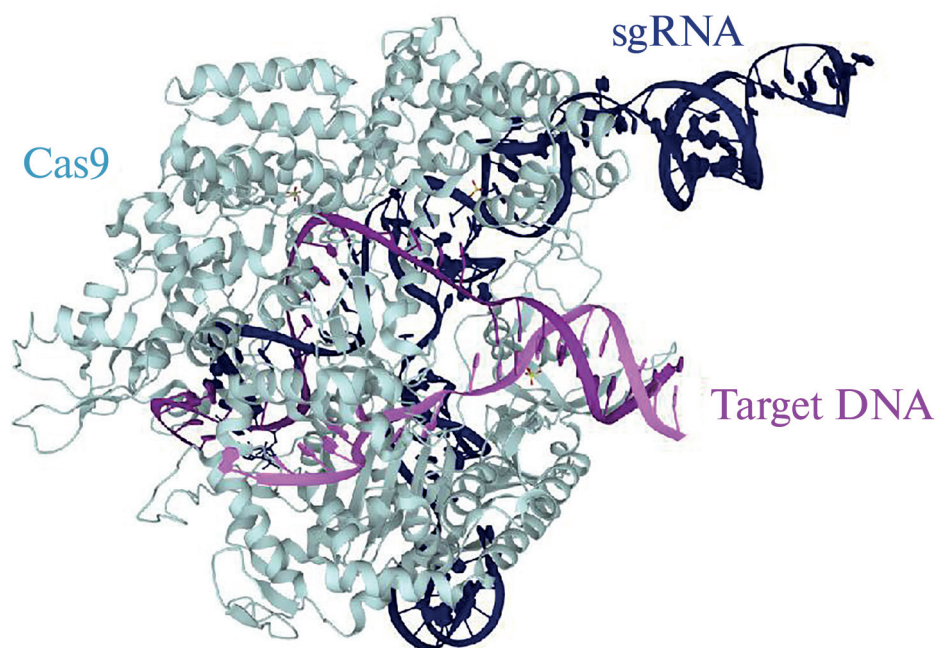


Рис. 3. Трёхмерная организация белка Cas9 в комплексе с РНК-«гидом» (sgRNA) и субстратной ДНК (Target DNA), кристаллографические данные (PDB ID 5F9R, PDB DOI 10.2210/pdb5F9R/pdb)

европейской базе данных PDBe («Protein Data Bank in Europe») были размещены 2 структуры кристаллов Cas9, а сопровождающие их публикации были напечатаны в журналах *Nature* и *Cell* [39, 40]. Структура, полученная в лаборатории Дж. Даудны, состояла из апо-белка (PDBe ID 4cmp, PDBe DOI 10.2210/pdb4cmp/pdb), тогда как лаборатории О. Нуреки (Токийский университет, Япония) удалось закристаллизовать белок в комплексе с «гидом»-РНК и «мишенью»-ДНК (PDBe ID 4oo8, PDBe DOI 10.2210/pdb4oo8/pdb).

Эти, как и многие последующие исследования, использовали в качестве объекта белок Cas9 из *S. pyogenes*, SpCas9, состоящий из 1368 аминокислот и представляющий собой мультидоменную и мультифункциональную эндонуклеазу. Кристаллические структуры показали, что белок Cas9 пространственно разделён на 2 части: распознающую и непосредственно нуклеазную, а связывание РНК-«гида» и ДНК-«мишени» происходит в положительно заряженном желобке на границе этих двух частей. Ключевыми структурами нуклеазной части SpCas9 являются 2 домена: HNH и RuvC, каждый из которых расщепляет одну из цепочек мишени ДНК. На рис. 3 показана общая архитектура комплекса SpCas9–sgRNA–DNA, где видна сложная вторичная структура связанной молекулы РНК и «развёрнутая» конформация двуцепочечной молекулы ДНК с образованием ДНК–РНК-дуплекса (PDB ID 5F9R, PDB DOI 10.2210/pdb5F9R/pdb, [41]). На момент написания обзора сотни кристаллических структур белков семейства Cas9 размещены на сайтах баз данных PDB, PDBe и PDBj.

ПАТЕНТНЫЙ ДИСПУТ

Закономерным желанием отдельных учёных, а также организаций, вовлечённых в исследование системы CRISPR–Cas9, было возможное получение финансовой прибыли от использования этой многообещающей технологии. Одна из первых патентных заявок была подана совместно Калифорнийским университетом в Беркли, представлявшим Дж. Даудну, Венским университетом (где работал один из двух ведущих авторов в ключевой статье по CRISPR–Cas9 [33]), а также Э. Шарпантье в качестве индивидуального изобретателя в соответствии с правилами Университета Умео (Швеция), где Шарпантье работала на момент выхода статьи [18]. Эта заявка на патент была подана на рассмотрение в мае 2012 г. [42], тогда как в декабре 2012 г. Институт Броуд в лице

Ф. Чжана также отправил на рассмотрение заявку на патент [43] одновременно с принятием статьи Ф. Чжана по редактированию клеток человека к публикации в журнал *Science* [35]. Изначально именно заявка Ф. Чжана оказалась успешной и привела к получению им патента в апреле 2014 г., тогда как заявка Дж. Даудны на тот момент всё ещё была на рассмотрении. Команда Дж. Даудны опротестовала такое решение, после чего последовал долгий диспут между двумя сторонами, включавший в себя судебные разбирательства, апелляции и т.п. и в итоге приведший к неоднозначной ситуации в области биотехнологии. В связи с тем, что к 2019 г. обе конкурирующие стороны обладали патентами в этой области, часть компаний, использовавших систему CRISPR–Cas9 на клетках человека, получили лицензию от команды Дж. Даудны, а часть – от Ф. Чжана. Однако апелляционная комиссия Ведомства по патентам и товарным знакам США в феврале 2022 г. опять подтвердила приоритет Ф. Чжана и Института Броуд в позиции держателя патента по использованию CRISPR–Cas9 в клетках человека, что вызвало гнев и недоумение у противоположной стороны и финансовые осложнения для компаний, получивших лицензии у команды Дж. Даудны [44]. Дж. Даудна и Э. Шарпантье, однако, выиграли сходный диспут в Европе, а также являются держателями основных патентов по использованию технологии в Великобритании, Китае, Японии, Австралии, Новой Зеландии и Мексике [18].

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ И ЭТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ, СВЯЗАННЫЕ С НЕЙ

Спешка, с которой конкурирующие лаборатории стремились вывести свои исследования на суд общественности, а также гонка патентирования данной технологии были безусловными индикаторами значимости вышеозначенного научного прорыва. Бесспорно, одной из главных движущих сил, мотивировавших многих учёных принять участие в исследованиях с использованием именно этой технологии, была потенциальная возможность модификации клеток человека, как соматических, так и зародышевой линии. Однако, несмотря на очевидные преимущества системы CRISPR–Cas9, многочисленные этические и технические трудности стоят на пути исследователей, желающих воплотить мечты об излечении жизненно-опасных заболеваний в реальность, особенно если генетические изменения, полученные в результате таких манипуляций, могут передаваться по наследству.

Впервые генная терапия была применена в сентябре 1990 г.: четырёхлетняя девочка, страдающая от дефицита аденозиндезаминазы, получила переливание генетически модифицированных Т-лимфоцитов. Клетки, взятые из крови девочки, были обработаны с помощью вирусного вектора — деактивированного вируса, несущего здоровую копию гена. Как отмечали журналисты, освещавшие историю, «редко в современной медицине столько надежд возлагается на один эксперимент», а доктора, проводившего эту процедуру, У. Френча Андерсона, называли «отцом генной терапии». В дальнейшем, однако, стали накапливаться волнующие результаты отрицательных побочных эффектов некоторых попыток генной терапии как на животных, так и на человеке. Поистине трагическая история Джесси Гелсинджера, американского подростка из Филадельфии, умершего от последствий генной терапии в 1999 г., потрясла мировую общественность и повлекла за собой серьёзный скептицизм и значительную задержку в развитии этой технологии. В случае Гелсинджера масштабный аутоиммунный ответ организма на вирусный вектор, несущий ген орнитинтранскарбамилазы, привёл к резкому повышению температуры тела, почечной и лёгочной недостаточности, желтухе, нарушению свёртываемости крови и последующей смерти в течение всего 4 дней с момента применения генной терапии [45].

Обширные дискуссии на тему безопасности и, что немаловажно, этичности потенциальной генной терапии с использованием CRISPR—Cas9 начались вскоре после первых публикаций, показавших возможность использования этой системы на клетках человека. Один из первых шагов в инициации формальных переговоров был совершён Дж. Даудной, созвавшей конференцию по обсуждению научных, медицинских, юридических и этических вопросов, связанных с геномными модификациями, состоявшуюся в долине Напа в Калифорнии в январе 2015 г. Последующий отчёт по итогам конференции был опубликован в марте 2015 г. в журнале *Science* [46] и, по сути, призывал к временному сдерживанию работы по внесению наследуемых изменений в клетки эмбрионов человека, по крайней мере, на время активных обсуждений социальных, экологических и этических последствий таких манипуляций. Практически одновременно с этим отчётом в журнале *Nature* также был опубликован комментарий о серьёзных рисках создания наследуемых изменений в эмбрионах человека [47]. Помимо прочего, авторы высказывали опасения, что преждевременная работа над эмбриональными

клетками может оказать отрицательное влияние на область генной терапии, в целом, и на годы отбросит назад работу исследователей в попытках лечения генетических и инфекционных заболеваний в соматических клетках. Опубликованные в марте 2015 г. отчёт о конференции в Напе и комментарий, призывавший не редактировать геном эмбрионов человека, были выпущены в обстановке всё возрастающего волнения в научных кругах, вызванного просочившимися новостями о непосредственном совершении таких экспериментов. Группа учёных из Университета имени Сунь Ятсена (Гуанчжоу, Китай), после неудачных попыток публикации работы в журналах *Nature* и *Science*, в апреле 2015 г. напечатала соответствующую статью по применению системы CRISPR—Cas9 на клетках человеческих эмбрионов [48]. Исследователи подчёркивали, что использовали нежизнеспособные эмбрионы, полученные в результате слияния двух сперматозоидов с одной яйцеклеткой и отбракованные лабораториями экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Главный вывод статьи заключался в том, что технология CRISPR—Cas9 на момент исследования ещё не была готова к использованию на эмбриональных клетках человека вследствие выявленных недостатков работы системы в отношении эффективности и специфичности совершённых ей модификаций. Комментарий журнала *Protein & Cell* (Пекин, Китай), опубликовавшего эту работу, состоял в том, что эта статья (помимо её научной ценности) способствует открытому обмену информацией о текущих исследованиях, и несмотря на неоднозначность вопроса и противоречивость мнений, должна по крайней мере послужить началом необходимых дискуссий о геномном редактировании клеток зародышевой линии. Заявка на публикацию была отправлена авторами в редакцию *Protein & Cell* в совокупности с отзывами рецензентов, полученными во время предыдущих попыток размещения работы, и принят редакцией к публикации в течение 2 дней с момента подачи заявки. Последующие дебаты в научном сообществе были описаны как «эпические» [49] и спровоцировали интерес к этому сложному вопросу у более широкой публики, а также в правительственных и регуляторных кругах различных стран.

Известные скандалы, вызванные проведением медицинских экспериментов на людях в прошлом, привели к созданию общих международных рекомендаций по биоэтике. Наиболее известными документами в этой области являются Нюрнбергский кодекс, разработанный после судебного процесса над врачами-на-

цистами в 1947 г., и последующая Хельсинкская декларация 1964 г., расширяющая принципы кодекса и интерпретирующая применение этих принципов к клиническим исследованиям. Ещё один важный документ, Бельмонтский доклад, был выпущен Национальной комиссией по защите человека при проведении биомедицинских и поведенческих исследований в США в 1979 г. Эта комиссия была создана в результате шокирующего скандала, произошедшего после утечки в прессу подробностей негуманного исследования сифилиса в Таскиги с 1932 по 1972 г. («The Tuskegee Study of Untreated Syphilis»). В течение десятилетий сотни мужчин из бедного афроамериканского населения, заражённых сифилисом, изучались врачами на предмет прогрессирования их заболевания. И хотя пенициллин стал стандартным методом его излечения к 1947 г., участникам исследования лечение не было предложено, несмотря на очевидные физические страдания заражённых и продолжение распространения инфекции в их семьях.

Упомянутые выше Нюрнбергский кодекс, Хельсинкская декларация и Бельмонтский доклад основаны на базовых этических принципах биомедицинских исследований, таких как уважение личности, информированное согласие пациента, понимание рисков и благ, добровольность участия, справедливость проведения экспериментов, максимальный профессионализм исследователя и т.п. Эти принципы и их применение в медицинской практике стали чрезвычайно актуальны после событий ноября 2018 г., когда китайский учёный Дзянкуй Хэ объявил о рождении младенцев, впервые прошедших генную модификацию с помощью системы CRISPR–Cas9. Инъекция этой системы в яйцеклетку матери была произведена на этапе процедуры ЭКО непосредственно после слияния с ней сперматозоида, и, соответственно, все изменения, потенциально привнесённые в геном в течение этой процедуры, являлись наследуемыми. Мировая научная общественность была шокирована преждевременностью таких медицинских экспериментов и степенью риска, принятого китайскими исследователями, пошедшими на эксперимент. В особенности учёных волновала возможность создания незапланированных («офф-таргет») мутаций в геноме будущих младенцев. Дз. Хэ (также известный в англоязычной среде под укороченным именем JK – Jiankui He) на момент проведения эксперимента не был известной фигурой в кругах исследователей CRISPR–Cas9, однако после заявления о его экспериментах привлёк огромный интерес международной общественности к своей персоне.

Оказалось, что Дз. Хэ изучал физику в Университете науки и технологии (Хэфей, Китай), а потом переехал в США, где получил степень PhD под руководством профессора физики, астрономии и биоинженерии Майкла Дима в Университете Райса (Хьюстон, Техас), и в дальнейшем работал в Стэнфордском университете (Калифорния) в лаборатории профессора Стивена Квейка. В группе М. Дима Дз. Хэ использовал методы теоретической биофизики, математического моделирования и компьютерных симуляций, опубликовав работы, посвящённые, помимо прочего, вирусным штаммам гриппа и последовательностям спейсеров в локусах CRISPR [50, 51], тогда как в лаборатории под руководством С. Квейка он обучился методам молекулярной биологии и заинтересовался инновационными технологиями силиконовой долины. Вернувшись в Китай, Дз. Хэ продолжил сотрудничество с М. Димом, а также успешно воплотил в жизнь инновационную идею в области метода ДНК-секвенирования своего второго научного руководителя, С. Квейка, создав успешную компанию «Direct Genomics» на основе его технологии [18, 52]. В Китае он был достаточно знаменит как молодой учёный и успешный предприниматель, вернувшийся из-за рубежа по известной программе «Тысяча талантов», получивший позицию и лабораторию в Южном научно-технологическом университете (SUStech, г. Шэньджен) и участвовавший в создании нескольких стартап-компаний [53]. Следующим шагом в его карьере, однако, стала сомнительная попытка внести вклад в историю и совершить, по его мнению, научный прорыв, способный изменить будущее человечества. Вместо этого результатом его работы стал самый большой медицинский скандал как минимум десятилетия. В 2017 г. Дз. Хэ начал набор добровольцев из числа семейных пар, желающих произвести на свет генетически модифицированное потомство, резистентное к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ). В числе условий, например, было наличие высшего образования у пары, желавшей участвовать в эксперименте, так, чтобы их участие происходило при адекватном уровне понимания ими основ науки и медицины. Следующим условием было наличие в паре ВИЧ-положительного мужчины и ВИЧ-отрицательной женщины: ситуация, при которой риск передачи вируса будущему младенцу был бы минимален (при условии «промывания» спермы во время процедуры ЭКО), однако мотивация пары участвовать в эксперименте была бы высока [53]. В планы Дз. Хэ входила генетическая модификация

гена *CCR5*, известного рецептора на поверхности клеток, через связывание с которым происходит проникновение вируса иммунодефицита человека в клетку. Около 300 человек отозвались на объявление Дз. Хэ, из них – 20 пар были отобраны для следующего этапа консультаций, на котором участникам объяснялась процедура и возможная степень риска. В результате этих консультаций 11 пар дали согласие на участие в исследованиях, из которых 7 в конечном итоге были отобраны исследователями для следующего этапа – непосредственного проведения процедуры ЭКО, включающего этап геномного редактирования. Мотивацией отдельных участников было, судя по всему, не только возможность заведения детей (процедура ЭКО в Китае запрещена при наличии ВИЧ-инфекции у одного из родителей), но и желание принятия участия в «историческом» эксперименте, призванном принести благо будущим поколениям как их страны, так и всего человечества [53]. В конечном итоге после нескольких неудачных попыток из отобранной группы участников и после всех проведённых процедур 2 беременности привели к рождению младенцев, прошедших процедуру геномной модификации с помощью системы CRISPR–Cas9. Достаточно много известно о первой беременности, в результате которой родились две девочки-близнецы, Лулу и Нана (псевдонимы, используемые в прессе и научной литературе). Совсем незначительное количество информации доступно о второй беременности, в результате которой родился ещё один ребёнок. Так как это событие произошло уже после скандала, вызванного рождением первых близнецов, то многие детали второй беременности остались в тайне. Манускрипт, написанный Дз. Хэ по результатам первой беременности, «Рождение близнецов после геномного редактирования для ВИЧ-резистентности» («Birth of twins after genome editing for HIV resistance»), так и остался неопубликованным, однако все же просочился в научное сообщество [54, 55]. Стало известно, например, что в одном из эмбрионов обе копии *CCR5* были инактивированы (Нана), тогда как во втором – только одна (Лулу) [56]. Следовательно, при всех прочих благоприятных обстоятельствах только Нана в будущем будет защищена от инфекции ВИЧ (по крайней мере от основных вариантов вируса, проникающих в клетку через связывание с рецептором *CCR5*). В случае Лулу, к сожалению, защиты от вируса не будет, так как одной копии гена *CCR5* достаточно, чтобы произвести соответствующий рецептор на мембране. Очевидцы происходящего полагают,

что два эмбриона были подсажены в матку будущей матери в надежде на то, что хотя бы один из них приведёт к рождению младенца с геномной модификацией. Близнецы родились значительно раньше срока (на 31 неделе) и провели первые недели своей жизни в инкубаторах неонатального отделения, однако в остальном были описаны как «здоровые» [53]. Учёные, получившие доступ к неопубликованному манускрипту Дз. Хэ, также заметили, что несколько клеток, отобранные для секвенирования на ранних этапах развития эмбрионов, свидетельствовали о явлении мозаицизма – наблюдение, приведшее к усиленной критике работы Дз. Хэ. В случае мозаицизма любая информация, полученная в ходе секвенирования отобранных клеток, не может быть экстраполирована на весь эмбрион в целом. Соответственно, на момент принятия ключевого решения о перенесении эмбрионов в матку матери исследователи не могли быть уверены в том, что система CRISPR–Cas9 не произвела драматических незапланированных мутаций в остальных клетках эмбрионов, даже если результаты секвенирования показывали отсутствие таковых в отобранных клетках. Многие другие аспекты проведения исследования также получили суровую критику со стороны научной и медицинской общественности [54], включая сомнительные обстоятельства получения разрешения от этического комитета одной из больниц города Шэньчжень, уровень квалификации самого Дз. Хэ для проведения клинических исследований (отсутствие медицинского образования и достаточного опыта работы в этой области), выбор гена, подвергнутого редактированию (скорее социальные, чем медицинские причины обращения пациентов за помощью), возможные побочные эффекты отсутствия действующей копии *CCR5* и др. По словам американского кардиолога и профессора медицины Пенсильванского университета Кирана Мусунуру, первые «младенцы поколения CRISPR», к сожалению, родились не в результате исторического научного достижения, а в результате исторического этического фиаско [56]. Пиар-кампания, проведённая Дз. Хэ и его командой, обеспечила достаточно лестное начальное освещение новостей о его работе в газете *Жэньминь Жибао* (Народная ежедневная газета Китая), однако последующий международный скандал привёл к помещению Дз. Хэ под домашний арест, а затем и к тюремному заключению сроком на 3 года. В настоящий момент Дз. Хэ уже освобождён из тюрьмы, однако мало что известно о его местонахождении и дальнейших планах [57].

Спустя несколько месяцев после скандала с Дз. Хэ российский учёный Д.В. Ребриков повторно всколыхнул международное научное сообщество своими заявлениями о намерении стать вторым в мире учёным, создавшим генно-модифицированных младенцев. Профессор Российского национального исследовательского медицинского университета им. Пирогова и заведующий лабораторией геномного редактирования в Центре акушерства, гинекологии и перинатологии, Д.В. Ребриков сообщил о своей потенциальной готовности к пересадке модифицированных эмбрионов в утробу матери в июне 2019 г. [58]. Как и в экспериментах Дз. Хэ, предполагалось редактирование гена *CCR5*, а предварительная работа лаборатории на нежизнеспособных эмбрионах ранее была опубликована в *Вестнике РГМУ* [59]. Реакция научной общественности на заявление была очень бурной и в большинстве своём критической, а журналы *Nature* и *Science* в октябре 2019 г. опубликовали новостные ленты, сообщавшие, что Д.В. Ребриков на тот момент уже переключился на редактирование гена *GJB2*, связанного с наследуемой глухотой, и подбирал пары, согласные принять участие в эксперименте [60, 61]. Однако в многочисленных интервью журналистам Д.В. Ребриков подчёркивал, что обязательное получение всех необходимых разрешений как от регуляторных органов, так и этических является неременным условием проведения его экспериментов. Это радикально отличало подход Д.В. Ребрикова от ситуации с Дз. Хэ, который, по сути, сообщил широкой научной общественности о рождении младенцев с модифицированным геномом постфактум. Министерство здравоохранения РФ (в соответствии с рекомендацией Всемирной организации здравоохранения) позднее сделало заявление, что решение о выдаче разрешения на такое исследование было бы преждевременным и безответственным, что и приостановило дальнейшее развитие ситуации, по крайней мере, до изменения обстановки в регуляторной сфере [62].

На время написания обзора состояние правовой базы, обеспечивающей регуляцию вопроса геномного редактирования эмбриональных клеток человека, сильно различается в разных государствах. Так, геномные модификации эмбрионов в целях, отличных от репродуктивных, разрешены как минимум в 11 странах, включающих Китай, США и Великобританию. Девятнадцать стран, включающих Беларусь, Канаду, Швецию и Швейцарию, запрещают проведение таких экспериментов. Многие другие страны (Россия в их числе) занимают про-

межуточную или неопределившуюся позицию. Ситуация с внесением наследуемых геномных изменений в эмбрионы, впоследствии используемые для репродуктивных целей, ещё более сложная [44].

МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Несмотря на повышенное внимание, привлечённое к внесению наследуемых изменений в клетки зародышевой линии, менее спорным и более распространённым на данный момент применением CRISPR–Cas9 в медицинских целях является модификация соматических клеток человека. Как уже было упомянуто выше, в первых попытках генной терапии (1990 г.) использовался аденоассоциированный вирусный вектор, доставлявший здоровую копию гена в клетки (в США эта технология была окончательно одобрена к использованию в клинике только в 2017 г. [63]). Дальнейшим шагом в развитии генной инженерии стало возможное применение геномного редактирования с использованием хоуминг-эндонуклеаз (HEs, Homing Endonucleases), нуклеаз с мотивом цинковых пальцев (ZFNs, Zinc Finger Nucleases) и эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), а в дальнейшем – и CRISPR–Cas9 [64]. Первые клинические исследования с использованием CRISPR–Cas9 на человеке начались в октябре 2016 г. в Китае [65]. Ген *PD-1* был инактивирован в клетках крови *ex vivo* в надежде, что такие клетки после возвращения в кровообращение смогут побороть немелкоклеточный рак лёгкого, от которого страдал пациент. В США *ex vivo* терапия с использованием CRISPR–Cas9 была впервые проведена в июле 2019 г. на пациентке с серповидноклеточной анемией (компания «CRISPR Therapeutics», основанная Э. Шарпантье). Терапия значительно улучшила состояние пациентки по крайней мере на несколько месяцев после процедуры, однако, к сожалению, цена такого лечения на момент его проведения в США оценивалась в районе 0,5–1,5 млн долларов. Высокая цена терапии с использованием CRISPR–Cas9, естественно, может послужить препятствием на пути её более широкого применения в будущем, даже если клинические исследования подтвердят эффективность и безопасность такого лечения [18]. Интересно заметить, что самым дорогим лекарством на момент написания обзора является ещё один препарат генной терапии,

Золгенсма, использующийся для лечения спинальной мышечной атрофии (2,125 млн долларов США за одну дозу лекарства). Золгенсма непосредственно доставляет в клетки действующую копию дефектного гена с помощью аденоассоциированного вируса – метод, отличный от геномного редактирования с помощью нуклеаз [66].

Первый пример клинических исследований *in vivo*, при котором клетки проходят геномное редактирование с помощью нуклеаз *in situ*, был проведён с использованием технологии ZFNs. Компания «Sangamo Therapeutics» впервые применила эту процедуру в июле 2017 г. на пациенте, страдавшем от синдрома Хантера (редкое генетическое заболевание, форма мукополисахаридоза). Пионерами в применении CRISPR–Cas9 для геномного редактирования *in vivo* в марте 2020 г. стала компания «Editas Medicine» [67]. Препарат под названием EDIT-101 был введён локально в сетчатку пациенту, страдавшему от одной из форм наследуемой слепоты, вызванной мутацией в гене *CEP290*. В настоящий момент ведутся различные клинические исследования по применению CRISPR–Cas9 для лечения таких заболеваний, как, например, болезнь Альцгеймера, различные формы раковых изменений, повышенный холестерол, ангиоэдема, острый миелоидный лейкоз и даже андрогенетическая алоpecia (облысение). Отдельным перспективным направлением для применения системы CRISPR–Cas9 в будущем может послужить лечение инфекционных заболеваний, вызванных такими патогенами как, например, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус папилломы человека (ВПЧ) [64].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие CRISPR–Cas9 как иммунной системы прокариот на рубеже XX–XXI веков – открытие, на первый взгляд, казалось бы, из разряда фундаментальной микробиологии – привело к революционным изменениям в области совершения геномных манипуляций за рекордно короткие сроки. Новые возможности открылись и в других областях биомедицины, таких как молекулярная диагностика инфекционных и неинфекционных заболеваний (генотипирование бактериальных штаммов, детекция вирусов и обнаружение генетических мутаций в циркулирующей внеклеточной ДНК у пациентов с раком лёгких [68]), а также в разработке потенциально нового метода иммунизации, ДНК-вакцин [18]. Одним из более

необычных примеров применения системы CRISPR–Cas9 стало выращивание мозгодобных органоидов, несущих различные варианты важного гена *NOVA1*, характерного для современного человека, неандертальца и денисовского человека [69]. Разработка технологии применения CRISPR–Cas9 – один из наглядных примеров того, как находки, совершённые в ходе фундаментальных исследований, могут изменить целые области науки и технологии, расширяя горизонты возможного. Можно предположить, что развитие этой новаторской техники является достойным продолжением таких захватывающих событий в науке, как публикация двуцепочечной структуры ДНК Уотсоном и Криком в 1953 г., рождение первого ребёнка путём экстракорпорального оплодотворения в 1978 г. и клонирование овечки Долли в 1996 г. Научное сообщество в ближайшие годы будет с интересом наблюдать за развитием законодательства и этических норм в применении системы CRISPR–Cas9 в геномном редактировании, а также за тем, в каких ещё областях познавательной деятельности сможет найти своё применение эта многообещающая технология.

Благодарности. Автор с теплом и благодарностью вспоминает годы, проведённые в лаборатории Андрея Дмитриевича Виноградова на кафедре биохимии МГУ имени М.В. Ломоносова. Эксперименты, задуманные Андреем Дмитриевичем, неизменно приносили интересные результаты, а его обширнейшие знания в различных областях науки позволяли сотрудникам и студентам чувствовать уверенность в том, что на любые вопросы будут даны ответы, а время, проведённое в лаборатории, принесёт заслуженные плоды. Публикации результатов работы, проведённой под руководством Андрея Дмитриевича, дали автору необходимый старт в научной жизни и возможность продолжения проведения исследований уже в других лабораториях и в других областях знаний. Уникальная команда учёных, подобранная Андреем Дмитриевичем: Вера Георгиевна Гривенникова, Татьяна Вадимовна Жарова и Элеонора Владимировна Гаврикова, – обеспечила семейную атмосферу доверия и поддержки в лаборатории, за что автор чрезвычайно благодарна.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakamura, A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *J. Bacteriol.*, **169**, 5429–5433, doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D., and van Embden, J. D. (1993) Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method, *Mol. Microbiol.*, **10**, 1057–1065, doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x.
- Hoe, N., Nakashima, K., Grigsby, D., Pan, X., Dou, S. J., Naidich, S., et al. (1999) Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains, *Emerg. Infect. Diseases*, **5**, 254–263, doi: 10.3201/eid0502.990210.
- Mojica, F. J. M., Juez, G., and Rodriguez-Valera, F. (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites, *Mol. Microbiol.*, **9**, 613–621, doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, *J. Mol. Evol.*, **60**, 174–182, doi: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Dusko Ehrlich, S. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, *Microbiology*, **151**, 2551–2561, doi: 10.1099/mic.0.28048-0.
- Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies, *Microbiology*, **151**, 653–663, doi: 10.1099/mic.0.27437-0.
- Popkov, V. A., Zorova, L. D., Korvigo, I. O., Silachev, D. N., Jankauskas, S. S., et al. (2016) Do mitochondria have an immune system? *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1229–1236, doi: 10.1134/S0006297916100217.
- Isaev, A. B., Musharova, O. S., and Severinov, K. V. (2021) Microbial arsenal of antiviral defenses. Part I, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 319–337, doi: 10.1134/S0006297921030081.
- Isaev, A. B., Musharova, O. S., and Severinov, K. V. (2021) Microbial arsenal of antiviral defenses. Part II, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 449–470, doi: 10.1134/S0006297921040064.
- Marraffini, L. A., and Sontheimer, E. J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA, *Science*, **322**, 1843–1845, doi: 10.1126/science.1165771.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., et al. (2015) Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR–Cas systems, *Mol. Cell*, **60**, 385–397, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.008.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., V. et al. (2017) Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 169–182, doi: 10.1038/nrmicro.2016.184.
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., et al. (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector, *Science*, **353**, aaf5573–aaf5573, doi: 10.1126/science.aaf5573.
- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., et al. (2017) RNA targeting with CRISPR–Cas13, *Nature*, **550**, 280–284, doi: 10.1038/nature24049.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 1709–1712.
- Horvath, P., Barrangou, R., Fremaux, C., Boyaval, P., and Romero, D. (2007) Use of a Cas Gene in Combination with CRISPR Repeats for Modulating Resistance in a Cell. US Patent Application No. PCT/US2006/033167 (initially filed on 26.08.2005).
- Isaacson, W. (2021) *The Code Breaker: Jennifer Doudna, Gene Editing, and the Future of the Human Race*, Simon & Schuster (New York, USA).
- Masepohl, B., Görlitz, K., and Böhme, H. (1996) Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.*, **1307**, 26–30, doi: 10.1016/0167-4781(96)00040-1.
- Flamand, M.-C., Goblet, J.-P., Duc, G., Briquet, M., and Boutry, M. (1992) Sequence and transcription analysis of mitochondrial plasmids isolated from cytoplasmic male-sterile lines of *Vicia faba*, *Plant Mol. Biol.*, **19**, 913–923.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., and Juez, G. (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria, *Mol. Microbiol.*, **36**, 244–246, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W., and Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Mol. Microbiol.*, **43**, 1565–1575, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 482–496, doi: 10.1093/nar/30.2.482.
- Shmakov, S. A., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K. V., and Koonin, E. V. (2018) Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR–Cas systems by gene neighborhood analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E5307–E5316, doi: 10.1073/pnas.1803440115.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67–83, doi: 10.1038/s41579-019-0299-x.

26. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2013) The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1392–1400, doi: 10.1042/BST20130038.
27. Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR–Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 67–78, doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
28. Koonin, E. V., and Makarova, K. S. (2019) Origins and evolution of CRISPR–Cas systems, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **374**, 20180087–20180087, doi: 10.1098/rstb.2018.0087.
29. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Almendros, C. (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system, *Microbiology*, **155**, 733–740, doi: 10.1099/mic.0.023960-0.
30. Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., et al. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, *Science*, **321**, 960–964, doi: 10.1126/science.1159689.
31. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012) Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2579–E2586, doi: 10.1073/pnas.1208507109.
32. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., et al. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III, *Nature*, **471**, 602–607, doi: 10.1038/nature09886.
33. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816–821, doi: 10.1126/science.1225829.
34. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, **339**, 823–826, doi: 10.1126/science.1232033.
35. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819–823, doi: 10.1126/science.1231143.
36. Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., and Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells, *eLife*, **2**, 1–9, doi: 10.7554/eLife.00471.
37. Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M., and Kim, J. S. (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 230–232, doi: 10.1038/nbt.2507.
38. Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., et al. (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR–Cas system, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 227–229, doi: 10.1038/nbt.2501.
39. Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., et al. (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation, *Science*, **343**, 1247997–1247997, doi: 10.1126/science.1247997.
40. Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., et al. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA, *Cell*, **156**, 935–949, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
41. Jiang, F., Taylor, D. W., Chen, J. S., Kornfeld, J. E., Zhou, K., et al. (2016) Structures of a CRISPR–Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage, *Science*, **351**, 867–871, doi: 10.1126/science.aad8282.
42. Jinek, M., Doudna, J., Charpentier, E., and Chylinski, K. (2013) Methods and Composition for RNA-Directed Target DNA Modification and for RNA-Directed Modulation of Transcription. US Patent Application No. 61/652,086 (initially filed on 25.05.2012).
43. Zhang, F. (2014) CRISPR–Cas9 Systems and Methods for Altering Expression of Gene Products. US Patent No. 8,697,359 (provisional application No. 61/736,527 filed on 12.12.2012).
44. Baylis, F., Darnovsky, M., Hasson, K., and Krahn, T. M. (2020) Human germline and heritable genome editing: the global policy landscape, *CRISPR J.*, **3**, 365–377, doi: 10.1089/crispr.2020.0082.
45. Stolberg, S. G. (1999) The biotech death of Jesse Gelsinger, *New York Times Magazine*, 136–150.
46. Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R. A., et al. (2015) A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification, *Science*, **348**, 36–38, doi: 10.1126/science.aab1028.
47. Lanphier, E., Urnov, F., Haecker, S. E., Werner, M., et al. (2015) Don't edit the human germ line, *Nature*, **519**, 410–411, doi: 10.1038/519410a.
48. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., et al. (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes, *Protein Cell*, **6**, 363–372, doi: 10.1007/s13238-015-0153-5.
49. Cyranoski, D., and Reardon, S. (2015) Embryo editing sparks epic debate, *Nature*, **520**, 593–594, doi: 10.1038/520593a.
50. He, J., and Deem, M. W. (2010) Heterogeneous diversity of spacers within CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), *Phys. Rev. Lett.*, **105**, 128102, doi: 10.1103/PhysRevLett.105.128102.
51. He, J., and Deem, M. W. (2010) Low-dimensional clustering detects incipient dominant influenza strain clusters, *PEDS*, **23**, 935–946, doi: 10.1093/protein/gzq078.
52. Cyranoski, D. (2016) Direct genomics revives Helicos sequencing system for China's hospitals, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 122–123, doi: 10.1038/nbt0216-122b.
53. Kirksey, E. (2021) *The Mutant Project. Inside the Global Race to Genetically Modify Humans*, Bristol University Press, U.K.
54. Regalado, A. (2019) China's CRISPR babies: read exclusive excerpts from the unseen original research, *MIT Technology Review. Biotechnology*.
55. Regalado, A. (2019) Why the paper on the CRISPR babies stayed secret for so long, *MIT Technology Review. Biotechnology*.
56. Musunuru, K. (2019) *The CRISPR Generation: The Story of the World's First Gene-Edited Babies*, BookBaby, N.J., U.S.A.
57. Regalado, A. (2022) The creator of the CRISPR babies has been released from a Chinese prison, *MIT Technology Review. Biotechnology*.

58. Cyranoski, D. (2019) Russian biologist plans more CRISPR-edited babies, *Nature*, **570**, 145-146, doi: 10.1038/d41586-019-01770-x.
59. Kodyleva, T. A., Kirillova, A. O., Tyschik, E. A., Makarov, V. V., Khromov, A. V., et al. (2018) The efficacy of CRISPR-Cas9-mediated induction of the CCR5delta32 mutation in the human embryo, *Bull. RSMU*, **4**, 70-74, doi: 10.24075/brsmu.2018.052.
60. Cohen, J. (2019) Embattled Russian scientist sharpens plans to create gene-edited babies, *Science. News.*, doi: 10.1126/science.aaz9337.
61. Cyranoski, D. (2019) Russian “CRISPR-baby” scientist has started editing genes in human eggs with goal of altering deaf gene, *Nature*, **574**, 465-466, doi: 10.1038/d41586-019-03018-0.
62. Meyer, M. (2020) The CRISPR babies controversy: responsibility and regulation in the spotlight, *EMBO Rep.*, **21**, e50307, doi: 10.15252/embr.202050307.
63. Smalley, E. (2017) First AAV gene therapy poised for landmark approval, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 998-999, doi: 10.1038/nbt1117-998.
64. Porteus, M. H. (2019) A new class of medicines through DNA editing, *N. Engl. J. Med.*, **380**, 947-959, doi: 10.1056/NEJMra1800729.
65. Cyranoski, D. (2016) CRISPR gene-editing tested in a person for the first time, *Nature*, **539**, 479-479, doi: 10.1038/nature.2016.20988.
66. Editorial (2019) Gene therapy’s next installment, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 697-697, doi: 10.1038/s41587-019-0194-z.
67. Ledford, H. (2020) CRISPR treatment inserted directly into the body for first time, *Nature*, **579**, 185, doi: 10.1038/d41586-020-00655-8.
68. Chertow, D. S. (2018) Next-generation diagnostics with CRISPR, *Science*, **360**, 381-382, doi: 10.1126/science.aat4982.
69. Rimmel, A. (2021) Neanderthal-like “mini-brains” created in lab with CRISPR, *Nature*, **590**, 376-377, doi: 10.1038/d41586-021-00388-2.

CRISPR-CAS9: A HISTORY OF ITS DISCOVERY AND ETHICAL CONSIDERATIONS OF ITS USE IN GENOME EDITING

Review

I. Gostimskaya

The University of Manchester, M1 7DN, Manchester, United Kingdom; e-mail: gostimskaya@gmail.com

The development of a method for genome editing based on CRISPR–Cas9 technology was awarded The Nobel Prize in Chemistry in 2020, less than a decade after the discovery of all principal molecular components of the system. For the first time in history a Nobel prize was awarded to two women, Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna, who made key discoveries in the field of DNA manipulation with the CRISPR–Cas9 system, so-called “genetic scissors”. It is difficult to overestimate the importance of the technique as it enables one not only to manipulate genomes of model organisms in scientific experiments, and modify characteristics of important crops and animals, but also has the potential of introducing revolutionary changes in medicine, especially in treatment of genetic diseases. The original biological function of CRISPR–Cas9 system is the protection of prokaryotes from mobile genetic elements, in particular viruses. Currently, CRISPR–Cas9 and related technologies have been successfully used to cure life-threatening diseases, make coronavirus detection tests, and even to modify human embryo cells with the consequent birth of babies carrying the introduced modifications. This intervention with human germplasm cells resulted in wide disapproval in the scientific community due to ethical concerns, and calls for a moratorium on inheritable genomic manipulations. This review focuses on the history of discovery of the CRISPR–Cas9 system with some aspects of its current applications, including ethical concerns about its use in humans.

Keywords: CRISPR–Cas9, genome editing, “genetic scissors”, ethical considerations