

В. В. ВЛАСОВ, С. П. МЕДВЕДЕВ, С. М. ЗАКИЯН

# «Редакторы» геномов

ОТ «ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ» ДО CRISPR



Появление методов манипулирования генетическим материалом ознаменовало собой настоящую революцию в биологии, биотехнологии и медицине. Направленное вмешательство в геном живых организмов позволило решать широкий спектр задач, начиная от создания модифицированных видов бактерий, растений и животных, обладающих новыми ценными свойствами, и клеточных моделей, необходимых для создания новых лекарств, до разработки методов генотерапии, открывающей перспективы исправления врожденных генетических нарушений

**Ключевые слова:** направленное редактирование геномов, искусственные нуклеазы, система CRISPR/Cas9, клеточные модели заболеваний человека.  
**Key words:** targeted genome editing, artificial nucleases, CRISPR/Cas9 system, cell models of human diseases

Чтобы успешно вторгнуться в «святыню» клетки – ее наследственный материал, необходимы технологии, позволяющие расщеплять и соединять молекулы ДНК в заданных участках.

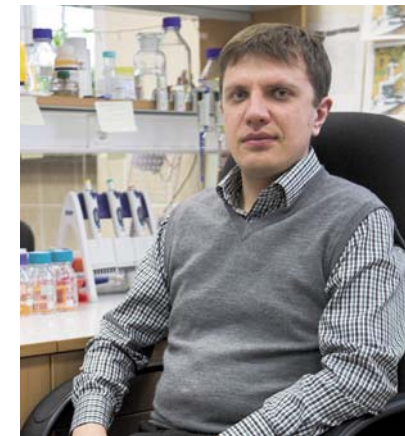
Для этих целей можно использовать рестриктазы – ферменты, способные узнавать определенные короткие нуклеотидные последовательности и расщеплять по ним молекулу ДНК. Для соединения нуклеотидных фрагментов используют ферменты ДНК-лигазы, которые входят в состав природных ферментных комплексов, исправляющих (репарирующих) повреждения в структуре ДНК. «Сшивку» ДНК можно осуществлять также ферментными комплексами системы рекомбинации, благодаря которой происходит обмен гомологичных фрагментов в составе геномных ДНК в процессе образования половых клеток.

Открытие ферментов рестрикции и ДНК-лигаз в 1960–1970-х гг. стало толчком к появлению генетической инженерии: с помощью этих ферментов оказалось возможным расщеплять ДНК на заданные фрагменты и вновь соединять их, формируя новые генетические конструкции. Так получали (и получают сейчас) различные варианты бактериальных и вирусных геномов.

Однако с помощью такого набора инструментов оказалось крайне трудно манипулировать большими сложными геномами высших организмов. Проблема заключалась в том, что ферменты рестрикции могут «узнавать» только относительно короткие последовательности ДНК. Такой специфичности вполне достаточно для работы с короткими ДНК вирусов и бактерий, поскольку в пределах той же бактериальной ДНК конкретные короткие нуклеотидные последовательности встречаются не слишком часто. Поэтому практически всегда можно подобрать рестриктазу, которая расщепит бактериальную ДНК на достаточно небольшой набор



ВЛАСОВ Валентин Викторович – действительный член РАН, председатель Объединенного ученого совета СО РАН по биологическим наукам, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), заведующий кафедрой молекулярной биологии Новосибирского государственного университета. Лауреат государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор более 460 научных работ и 29 патентов

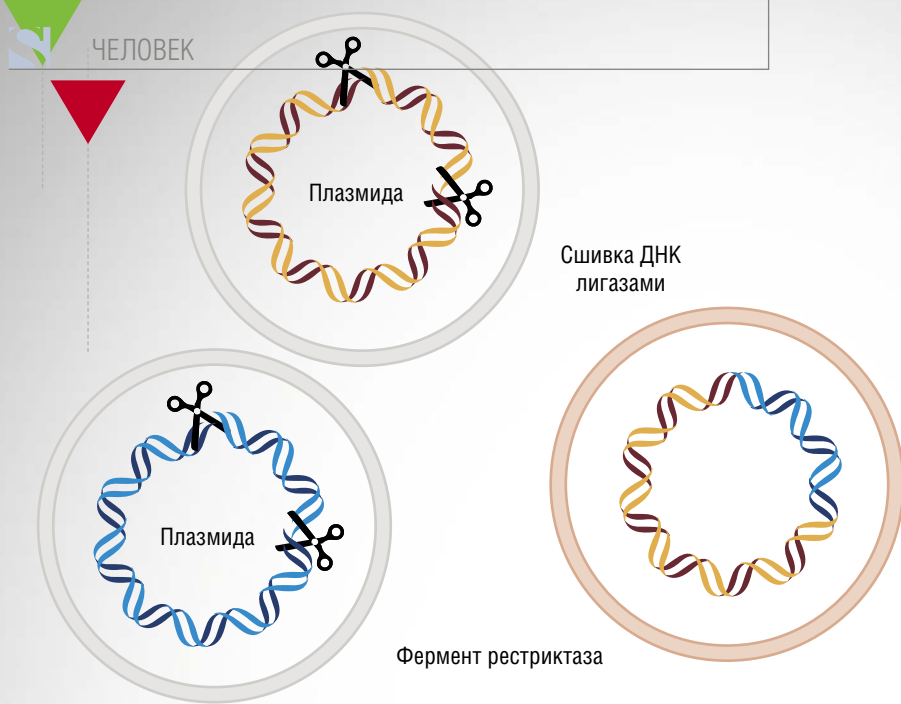


МЕДВЕДЕВ Сергей Петрович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института цитологии и генетики СО РАН и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), ведущий научный сотрудник Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина. Автор и соавтор 14 научных работ

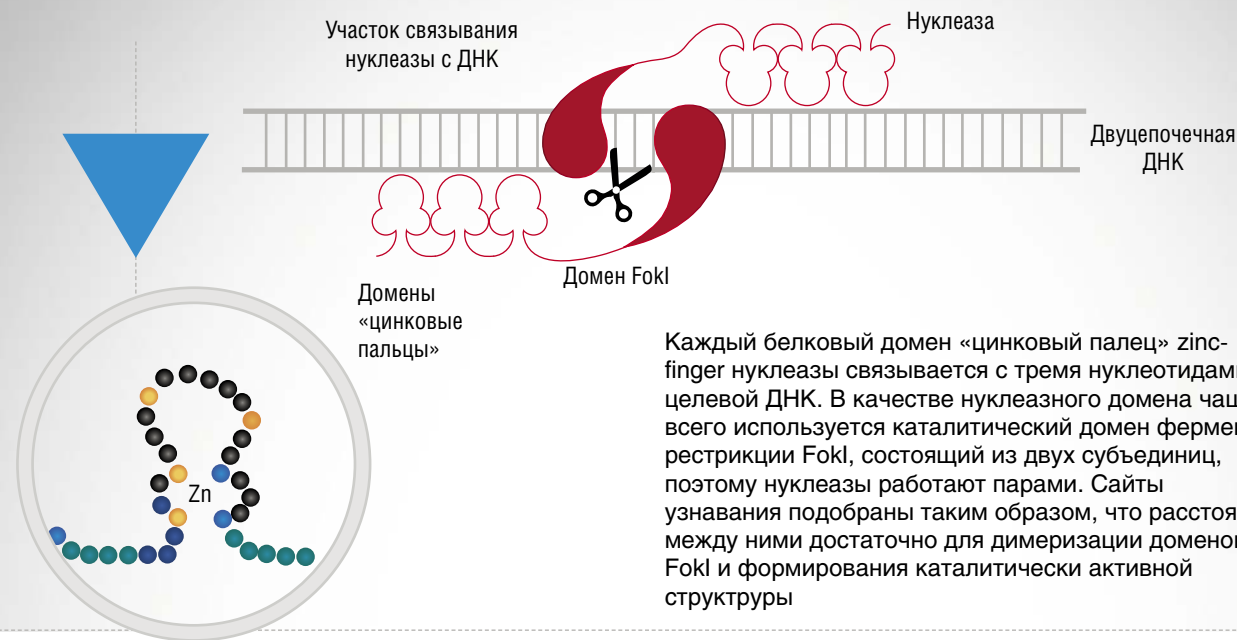


ЗАКИЯН Сурен Минасович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН, заведующий лабораторией молекулярной и клеточной медицины Новосибирского научно-исследовательского Института патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина, заведующий лабораторией стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор и соавтор 215 научных работ, 5 патентов и 3 монографий

© В. В. Власов, С. П. Медведев С. М. Закиян, 2014



В генетической инженерии для манипуляций с геномами вирусов и бактерий используют ферменты рестрикции, которые разрезают молекулу ДНК и ДНК-лигазы, соединяющие фрагменты ДНК в нужную конструкцию. Для создания генетических переносчиков-«векторов» часто используются бактериальные плазмиды – функционирующие автономно от основного носителя наследственности генетические образования, представляющие собой небольшие кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК



Каждый белковый домен «цинковый палец» zinc-finger нуклеазы связывается с тремя нуклеотидами целевой ДНК. В качестве нуклеазного домена чаще всего используется каталитический домен фермента рестрикции FokI, состоящий из двух субъединиц, поэтому нуклеазы работают парами. Сайты узнавания подобраны таким образом, что расстояние между ними достаточно для димеризации доменов FokI и формирования каталитически активной структуры

фрагментов, из которых можно затем выбрать нужные. Если повезет, то можно будет даже подобрать фермент, который расщепит ДНК в одном, точно определенном месте.

Но специфичности рестриктаз совершенно недостаточно для работы с геномами растений и животных. Такие геномы содержат множество коротких последовательностей нуклеотидов, которые узнаются рестриктазами, поэтому направленное воздействие на один определенный участок становится невозможным. Между тем для решения большого числа важнейших задач биотехнологии и фундаментальной медицины требовались эффективные и точные инструменты для осуществления точечного воздействия на определенные участки ДНК в составе геномов высших организмов, в том числе человека.

### Сначала были химеры

Первые попытки создания методов редактирования сложных геномов связаны с конструированием «искусственных ферментов» в виде олигонуклеотидов (коротких нуклеотидных последовательностей), которые могли бы избирательно связываться с определенными последовательностями в структуре целевой ДНК и несли бы на себе химические группы, способные расщеплять ДНК (Кнорре, Власов, 1985). Однако до сих пор эффективных методов расщепления ДНК на такой основе создать не удалось.

Реально работающим подходом оказалось конструирование химерных нуклеаз – сложных белков, содержащих две структурные единицы, одна из которых катализирует расщепление ДНК, а вторая способна

избирательно связываться с определенными нуклеотидными последовательностями в составе целевой молекулы, направляя на этот участок действие нуклеазы. Подобные химерные нуклеазы можно «производить» непосредственно в клетке: для этого в нее вносят соответствующие генно-инженерные конструкции (векторы), кодирующие нуклеазы. Такие векторы снабжаются сигналом ядерной локализации – белковой структурой, обеспечивающей поступление конструкции в ядро клетки к геномной ДНК.

Первыми среди химерных нуклеаз стали zinc-finger нуклеазы, в состав которых в качестве адресующих структур входят так называемые «цинковые пальцы». Последние представляют собой белковые домены (достаточно стабильные и независимые элементы третичной структуры белка), содержащие молекулу цинка и по форме действительно напоминающие палец (Kim *et al.*, 1996). Каждый «цинковый палец» способен «узнать» и специфично связаться с определенной последовательностью ДНК из трех нуклеотидов.

Нужно сказать, что домены «цинковые пальцы» встречаются в составе человеческих факторов транскрипции – белков, регулирующих процесс синтеза РНК с матрицей ДНК. При создании искусственных нуклеаз можно сконструировать цепочку из «цинковых пальцев» так, что она будет узнавать определенный участок ДНК. Если такая цепочка будет достаточно длинной, она может распознавать относительно протяженные последовательности ДНК, состоящие из ряда тринуклеотидных фрагментов. Это означает реальную возможность точечного воздействия на заданные участки в составе больших сложных геномов.

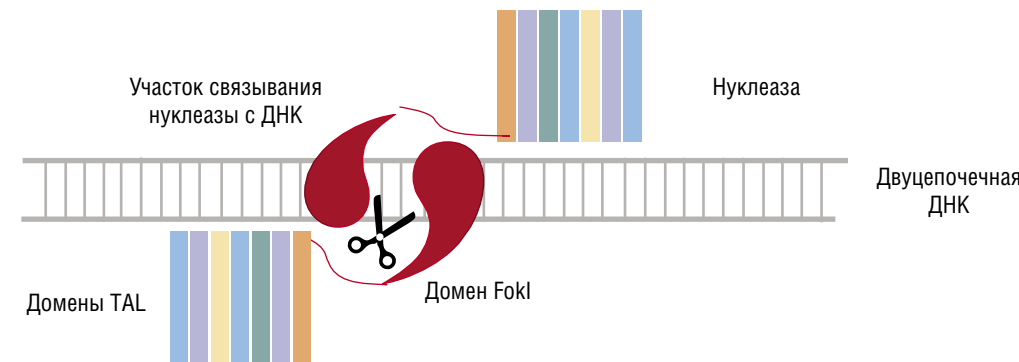
Однако у метода «цинковых пальцев» обнаружились и серьезные недостатки: во-первых, это не вполне

строгое распознавание тринуклеотидных повторов, что приводит к заметному числу расщеплений ДНК в «нецелевых» участках. Во-вторых, метод оказался весьма трудозатратным и дорогостоящим, поскольку для каждой последовательности ДНК необходимо создать свою оптимизированную белковую структуру zinc-finger нуклеазы. Поэтому система «цинковые пальцы» широкого распространения не получила.

Более перспективным средством избирательного воздействия на ДНК оказались конструкции на основе химерных нуклеаз, названные TALENs (от *Transcription Activator-like Effector Nucleases*) (Sanjana *et al.*, 2012). Роль ДНК-распознающих структур в них играют белковые домены, каждый из которых «узнает» только один нуклеотид. Природным прототипом таких доменов явились белки (TAL-effectors) некоторых бактерий, паразитирующих в клетках сельскохозяйственных растений. Эти бактериальные белки, попадая в ядро растительной клетки, имитируют транскрипционные факторы и связываются с определенными участками ДНК, активируя таким образом гены, необходимые для выживания паразита.

Поскольку механизм «узнавания» ДНК в данном случае однозначен и прост (один нуклеотид распознается одним белковым доменом), то получение конструкции, специфично распознающей нужную исследователю нуклеотидную последовательность, – относительно простая задача.

Каждый из белковых доменов TALE узнает один нуклеотид ДНК. Как и zinc-finger нуклеазы, нуклеазы TALENs обычно используют нуклеазный домен FokI. Нуклеазы также работают парами: каждый из «распознающих» блоков узнает свой специфический участок целевой ДНК





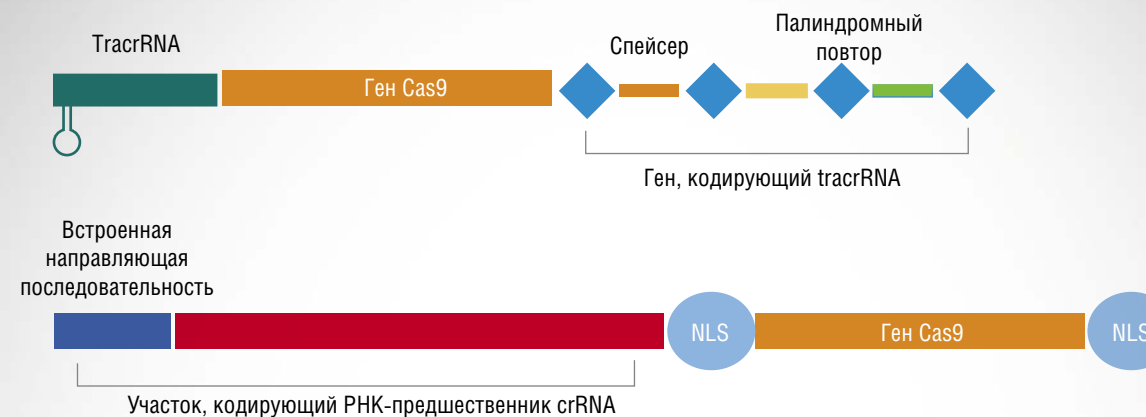
Соединяя такую направляющую конструкцию с ферментом, расщепляющим ДНК (как правило, для этих целей используется FokI – каталитический домен фермента рестрикции), мы получаем систему с высокой специфичностью действия.

Здесь нужно отметить, что для успешного разрезания молекулы ДНК с помощью FokI необходимо две субъединицы этого фермента. Поэтому все химерные нуклеазы, в составе которых имеется FokI, работают парами: каждая из них узнает свой специфический участок на разных цепочках молекулы ДНК. Эти целевые сайты выбираются так, чтобы они находились на небольшом (10–20 нуклеотидов) расстоянии, достаточном для димеризации доменов FokI, в результате которой формируется каталитически активная структура. Поскольку каждый из блоков такой бинарной нуклеазы связывается с ДНК независимо, точность расщепления ДНК повышается, а воздействие на «нецелевые» последовательности минимизируется.

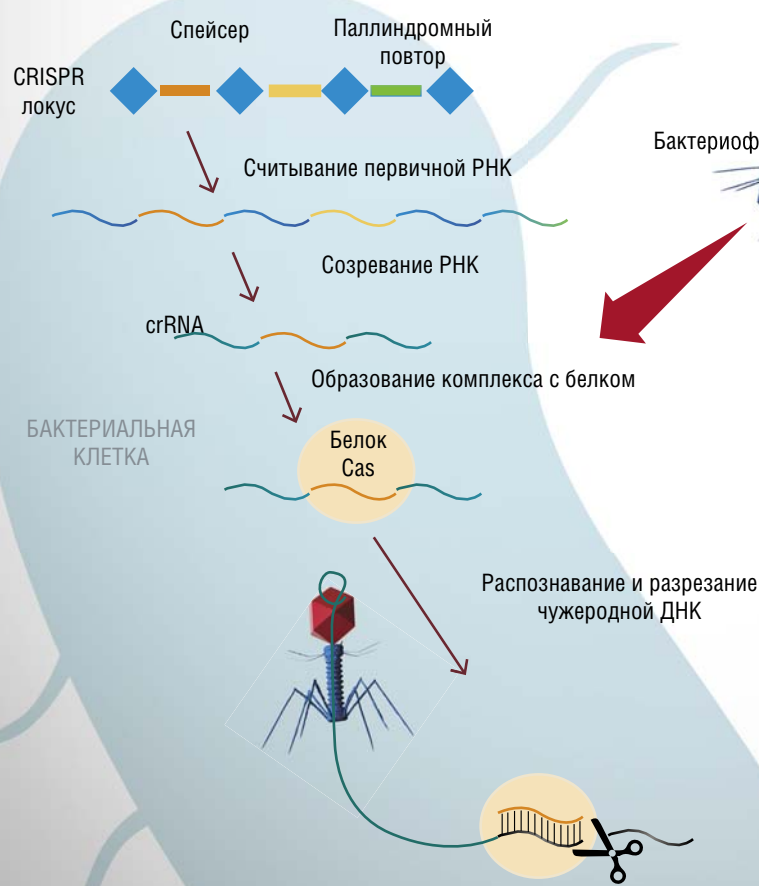
## Бактериальное ноу-хау

С помощью искусственных нуклеаз TALENs оказалось теоретически возможным внести двунитевой разрыв в любой участок генома. В 2011 г. методы геномной инженерии, в первую очередь использование TALENs, были названы авторитетным журналом «Nature Methods» «методом года» благодаря колоссальному спектру возможных применений в самых разных областях фундаментальной и прикладной науки, от функциональной геномики и биологии развития до сельскохозяйственной биотехнологии.

Однако в 2012–2013 гг. в этой области произошел поистине революционный прорыв: был разработан новый метод генетической инженерии CRISPR/Cas, открывший принципиально новые возможности для манипуляций на уровне генома высших организмов (Cong *et al.*, 2013). Этот метод чрезвычайно прост, обеспечивает точное воздействие на заданные участки ДНК и может быть использован практически в любой современной молекулярно-биологической лаборатории.



Природная защитная система CRISPR/Cas типа II-A бактерии *Streptococcus pyogenes*, состоит из трех генов (вверху). Созданная на ее основе упрощенная искусственная генетическая конструкция состоит всего из двух генов, в том числе гена, кодирующего одну направляющую РНК, способную опознавать целевой участок ДНК (внизу). В конструкцию также встроен ген NLS, кодирующий сигнал ядерной локализации – белок, обеспечивающий поступление конструкции в ядро клетки



Бактериальный CRISPR локус состоит из повторяемых последовательностей ДНК, между которыми располагаются спейсеры – небольшие фрагменты чужеродной ДНК. В случае проникновения в бактериальную клетку бактериофага запускается специфический механизм защиты. Сначала с CRISPR-локуса синтезируется протяженная первичная РНК, которая «созревает» – разрезается на более короткие фрагменты (crRNA). Каждая crRNA содержит участок, соответствующий спейсеру, и кусочки повторяющихся палиндромных последовательностей, отвечающие за привлечение Cas-белков. Спейсер комплементарно связывается с определенным участком в ДНК бактериофага, а белок разрезает ее

В отличие от химерных нуклеаз, в CRISPR/Cas структурами, узнающими ДНК, являются не белки, а короткие РНК. Идея создания такой системы родилась при изучении механизмов, которые бактерии используют для защиты от своих патогенных вирусов (бактериофагов). Конкретно речь идет о своеобразных «иммунных» реакциях бактерий на проникновение определенного бактериофага, которая выражается в избирательном расщеплении его геномной ДНК.

Работа этого механизма обеспечивается специальными участками бактериального генома – CRISPR локусами (от Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). Как видно по названию, этот локус состоит из стандартных повторных некодирующих последовательностей бактериальной ДНК, а разделяют эти повторы спейсеры – короткие фрагменты чужеродной (вирусной или плазмидной) ДНК. Последние встраиваются в бактериальный геном после того, как ДНК бактериофага, попавшего в клетку бактерии, рекомбинирует с ее геномом. Состав и порядок расположения спейсеров указывает на число «атак» различных вирусов, успешно пережитых самой бактериальной клеткой и (или) ее родительскими поколениями.

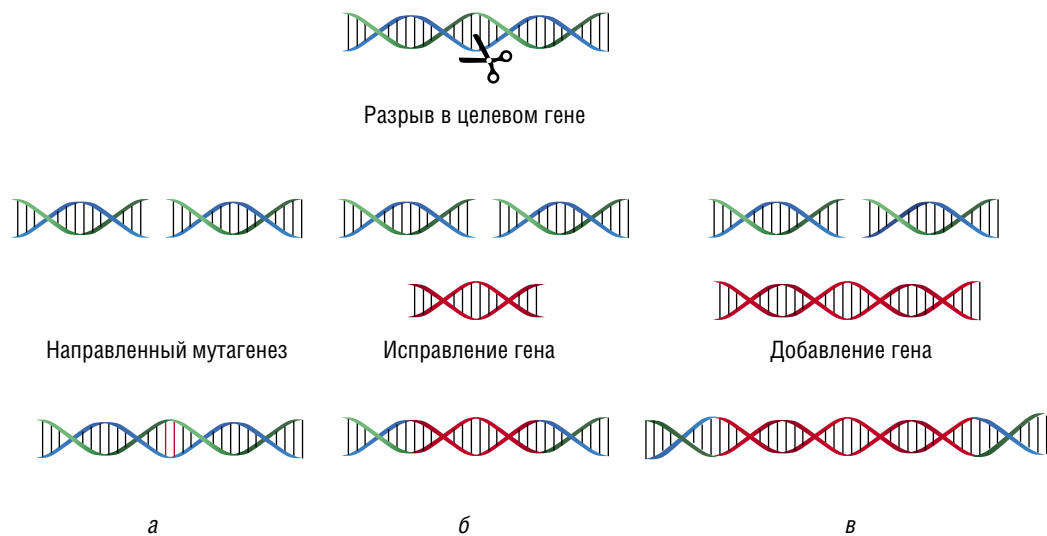
Как это работает? При повторном проникновении в бактериальную клетку уже «известного» ей вируса происходит синтез протяженной первичной РНК, закодированной в CRISPR-локусе. В результате «созревания» этой первичной ДНК образуется ряд коротких фрагментов (crRNA), каждый из которых состоит из специфического участка, соответствующего

спейсеру, и универсальных участков, соответствующих палиндромным повторам бактериальной ДНК. Бактериальная ДНК отвечает за привлечение уже упоминавшихся Cas-белков, а спейсер играет роль наводчика: он связывается с определенным, комплементарным ему участком вирусной ДНК, после чего белки Cas разрезают ее, обеспечивая уничтожение бактериофага. Благодаря своей высокой специфичности и способности к быстрой «настройке» система CRISPR/Cas работает очень эффективно, обеспечивая бактерии и ее потомству надежную защиту от патогенов.

К настоящему времени детально описаны несколько типов защитных систем CRISPR, функционирующих в клетках различных бактерий. Наиболее «популярной» оказалась система CRISPR/Cas типа II-A, обнаруженная у бактерии *Streptococcus pyogenes*, которая состоит из трех генов, кодирующих crRNA, транскрибирующую РНК (tracrRNA) и белок Cas9. На основе этой системы и были созданы универсальные генетические конструкции, кодирующие элементы искусственного «редактора генома» CRISPR/Cas.

Был создан и упрощенный вариант системы, функционирующей в виде комплекса из белка Cas9 и единой направляющей РНК, состоящей из транскрибирующей CRISPR РНК и короткой «зрелой» crRNA. Направляющая последовательность опознает целевой участок ДНК и комплементарно связывается с ним, а Cas9 – разрезает ДНК в нужном месте.

С помощью системы CRISPR/Cas можно осуществлять все виды модификаций генома: вносить точечные мутации, встраивать в определенные места новые гены либо, наоборот, удалять крупные участки нуклеотидных



Система CRISPR/Cas позволяет разрезать цепь ДНК в одном, строго определенном месте. Репарация («ремонт») ДНК в месте разреза может происходить по пути негомологичного соединения концов, в результате чего с большой частотой возникают мутации (а). Если же в клетку доставить искусственно синтезированную донорскую молекулу, которая гомологична участку разрыва, то таким образом можно произвести либо замену участка гена (б), либо направленную вставку трансгена (в)

## Настоящее и будущее

последовательностей, исправлять или заменять отдельные генетические элементы и фрагменты генов.

Технологически стратегия геномной инженерии с помощью системы CRISPR/Cas включает в себя следующие этапы: выбор целевой последовательности и определение вида необходимого воздействия; создание ген-направленной конструкции и доставка ее в клеточное ядро; анализ участка генома, подвергнутого воздействию.

Система CRISPR может быть использована для получения как генетически модифицированных клеток, выращиваемых в культуре, так и живых организмов. В первом случае в клетки вводят плазмиды или вирусные векторы, которые обеспечивают высокий и устойчивый синтез элементов системы CRISPR/Cas. Во втором случае в одноклеточные эмбрионы животных путем микроинъекции вводят уже «готовые» sgRNA и мРНК, с которой происходит синтез белка Cas9. Для получения генетически модифицированных растений, клетки которых имеют прочную оболочку, используют выращиваемые в культуре протопласты (растительные клетки без внешней оболочки) и плазмиды, кодирующие элементы CRISPR/Cas. Другой подход, применяемый для растений, – использование агробактерий, природных «генных инженеров», несущих специальную плазмиду.

Благодаря своей простоте, эффективности и широким возможностям система CRISPR/Cas за короткое время уже нашла применение в самых различных областях фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии и медицины.

Внося модификации в различные элементы генома клеток животных и растений и изучая последствия, ученые получают возможность исследовать роль отдельных генов в функционировании отдельных клеток и всего организма в целом. С помощью системы CRISPR/Cas уже получен ряд мутантных лабораторных животных (мышей, крыс, лягушек, рыб). Все эти модельные организмы открывают новые перспективы для исследований в области биологии развития, иммунологии и изучения заболеваний человека и животных.

Уникальная способность комплекса системы CRISPR/Cas избирательно связываться с определенными участками ДНК позволила разработать на ее основе регуляторы активности генов. Для этого в систему включают каталитически неактивный мутантный белок Cas9, к которому могут быть присоединены белки, активирующие или подавляющие функции промоторов, управляющих работой генов. При связывании такого комплекса с целевой ДНК может подавляться либо стимулироваться работа целевого гена.

Более того, при использовании системы CRISPR/Cas возможно одновременно вводить в клетки несколько генетических конструкций, направленных на разные участки генома. Это позволяет воздействовать на работу одновременно нескольких генов, чтобы исследовать взаимоотношения между ними и их участие в нормальных и патологических процессах жизнедеятельности. Таким способом можно, например, определить мутации в генах, ответственные за развитие устойчивости раковых опухолей к химиотерапии.

Одной из важнейших задач современной биомедицины является создание клеточных моделей для поиска и доклинического исследования новых лекарств. Внося направленные модификации в геном стволовых клеток человека, мы получаем линии клеток-моделей наследственных заболеваний, вызванных нарушениями функций определенных генов. Такие клеточные линии являются, по сути, неограниченным источником «пациентов в пробирке», на которых можно проводить тестирование десятков тысяч различных химических соединений – потенциальных лекарств.

Большие надежды на CRISPR/Cas возлагаются и в связи с развитием генотерапии. Несмотря на многолетние широкие исследования, до настоящего времени не удалось разработать приемлемых методов введения в клетки генов, замещающих дефектные. Главная причина неудач – применение генетических конструкций, содержащих «лишнюю» ДНК (бактериальную или вирусную), к тому же встраивались они неуправляемо, в произвольные участки генома. Все это приводило к различным нарушениям работы генетического аппарата, в том числе к злокачественному перерождению клеток. Однако CRISPR/Cas позволяет вводить гены в геном с хирургической точностью, что делает генотерапию безопасной.

Более того, с помощью этого метода можно не вводить извне «чужие», но редактировать собственный генетический аппарат, сохраняя «свои» системы регуляции.

**К важнейшим задачам современной биотехнологии и биомедицины, нуждающихся в развитии технологий редактирования геномов, относятся:**

- создание растений и животных, обладающих новыми, ценными свойствами и признаками (урожайность, устойчивость к неблагоприятным условиям среды, вредителям и патогенам);
- получение мутантных модельных животных для исследования заболеваний человека;
- разработка методов генотерапии, исправления генетических мутаций в культивируемых стволовых клетках человека;
- создание клеточных моделей для поиска и доклинического исследования новых лекарств

Так уже удалось отредактировать аномальный ген в стволовых клетках пациента, страдающего муковисцидозом (Schwank *et al.*, 2013). Такие клетки с «отремонтированным» геномом могут быть трансплантированы обратно в организм больного, где они заменят больные клетки и восполнят утраченную ими функцию.

Применение метода CRISPR/Cas в комбинации с клеточными технологиями открывает принципиальную возможность радикального избавления людей от генетических заболеваний, таких как сахарный диабет, хорея Хантингтона, мышечные дистрофии и др. Генетическое вмешательство может быть осуществлено на уровне эмбрионов, получаемых при проведении экстракорпорального оплодотворения, из которых можно вырастить организм, все клетки которого будут иметь модифицированный геном. Препятствием на пути развития таких технологий являются только этические проблемы: вся необходимая техника уже существует и опробована на лабораторных животных. Например, удалось вырастить здоровых мышей из эмбриональных клеток, в которых был скорректирован дефектный ген, ответственный за развитие катаракты. Эти особи дали здоровое потомство (Wu *et al.*, 2013).

Современные средства терапии, к сожалению, не способны воздействовать на вирусную ДНК, находящуюся в составе человеческой ДНК. Системы, функционирующие по механизму CRISPR, возможно, позволят в будущем радикально излечивать подобные хронические заболевания, вызываемые вирусами, встраивающимися в геном человека (вирусами гепатита В, герпеса, ВИЧ и др.). Так, известен случай излечения от СПИДа так называемого «берлинского пациента» Т. Брауна в результате пересадки ему стволовых клеток крови от донора, несущего мутацию «невосприимчивости» к ВИЧ. С помощью технологии CRISPR/Cas возможно внести мутацию в этот ген в клетках, которые могут быть затем трансплантированы в организм зараженного.

Одной из важнейших задач современной биотехнологии является создание новых пород скота, а также сельскохозяйственных культур растений, высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным условиям. Главной целью применения метода CRISPR/Cas в биотехнологии является создание генетически модифицированных животных и посевных растений, которые бы обладали новыми ценными свойствами. С помощью этой системы уже внесены точные модификации в геном пшеницы и табака, получены сорта риса, устойчивые к бактериям *Xanthomonas*, вызывающие бактериальную гниль, которая наносит большой экономический ущерб сельскому хозяйству (Chen, Gao, 2013).

Еще одним интересным биотехнологическим направлением применения системы CRISPR/Cas является получение линий животных или растений, способных синтезировать белки человека, например, инсулин,





М. н. с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН Михаил Сорокин, аспиранты ИЦиГ СО РАН Анастасия Стекленева, Артем Немудрый, Камила Валетдинова, с. н. с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН Сергей Медведев и студентка 5 курса ФЕН НГУ Туяна Маланханова в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН

**Х**отя система редактирования геномов CRISPR/Cas была создана лишь в 2012 г., она уже применяется во многих лабораториях и компаниях развитых стран. Опубликованы сотни результатов исследований с применением этой технологии, описаны десятки успешных экспериментов по редактированию геномов дрожжей, грызунов, насекомых, растений и человеческих клеток.

Компоненты системы в виде готовых наборов производятся компанией «Life Technologies», недавно слившейся с компанией «Thermo Fisher» (США), и доступны для исследователей. Крупнейшие фармацевтические фирмы, такие как «Takeda», формируют с помощью технологии CRISPR банки генетически модифицированных стволовых клеток – клеточных моделей заболеваний.

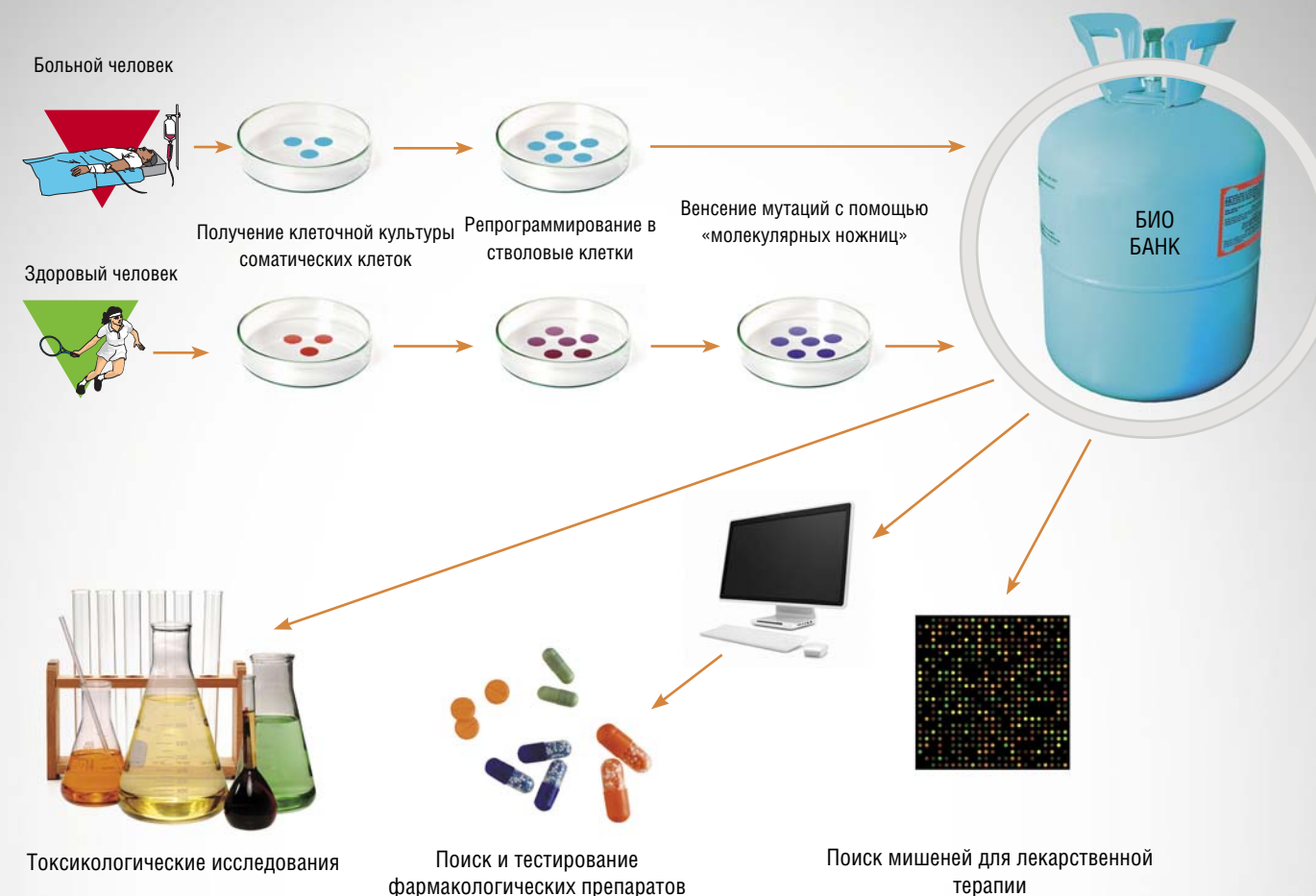
Несмотря на активное применение этой технологии в крупных мировых научных центрах, в России CRISPR/Cas используют лишь в нескольких исследовательских центрах, в том числе в Новосибирском Академгородке. Сегодня технологии TALENs и CRISPR/Cas используют в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН, лаборатории молекулярной и клеточной медицины Института патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина и в лаборатории стволовых клеток Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в работах, связанных с внесением мутаций в стволовые клетки человека, в частности, для создания клеточных моделей бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, Паркинсона и синдрома удлиненного интервала QT.

Однако для проведения полномасштабных исследовательских работ с использованием TALENs и CRISPR/Cas необходимо создание консорциума по клеточным технологиям с привлечением ведущих специалистов на базе профильных НИИ РАН: кардиологии, иммунологии, неврологии, онкологии и др. Создание в Новосибирском Академгородке Центра клеточных технологий может стать инфраструктурной основой для развития новых биомедицинских технологий и высокотехнологичной фармацевтической промышленности – приоритетных направлений развития научно-технического потенциала страны.

В настоящее время в разработке находится проект Биобанка клеточных моделей заболеваний человека, основой которого станут линии индуцированных плюри-

необходимый больным сахарным диабетом, или альбумин, использующийся при лечении геморрагического шока, ожогов и цирроза печени. Сейчас альбумин получают из плазмы крови человека – весьма ограниченного источника, однако мировая потребность в этом препарате постоянно растет и сегодня составляет 500 т в год. С помощью методов геномной инженерии ген альбумина человека уже введен в геном риса и крупного рогатого скота (He *et al.*, 2011; Moghaddassi *et al.*, 2014). Такой белок может быть выделен из растительных и животных тканей, где он синтезировался, и после очищения использован для медицинских целей.

Несомненно, в ближайшее время система CRISPR/Cas будет усовершенствована: можно ожидать упрощения белкового каталитического компонента, повышения избирательности действия системы, создания более эффективных средств доставки в разные типы клеток и целые организмы. Уже получены данные, указывающие на то, что на основе системы CRISPR можно создать средства направленного воздействия не только на ДНК, но и на РНК, что открывает новые возможности для регуляции активности генов и борьбы с вирусными инфекциями.



потентных стволовых клеток, полученных из обычных соматических клеток людей, страдающих различными наследственными и приобретенными заболеваниями. Кроме того, в Биобанк войдут клеточные модели наследственных заболеваний человека – клеточные линии, полученные с помощью методов геномной инженерии TALENs и CRISPR/Cas.

Клеточные линии и культуры будут храниться в жидком азоте, – в таком состоянии они могут оставаться жизнеспособными в течение десятилетий и использоваться по мере необходимости. Все хранящиеся в биобанке клеточные культуры и линии будут детально охарактеризованы: для каждой будет составлен «паспорт», содержащий сведения о ее происхождении и характеристиках. Такие клеточные линии могут быть предоставлены в распоряжение как академических институтов для проведения фундаментальных исследований по изучению механизмов развития болезней, так и частным компаниям, занимающимся поиском, разработкой, производством и тестированием новых лекарств.

**Литература**  
Власов В.В. и др. *Комплементарные здоровью. Прошлое, настоящее и будущее антисмысловых технологий* // НАУКА из первых рук. 2014. № 1 (55). С. 38–50.

Кюппе Д.Г., Власов В.В. // *Успехи химии*. 1985. Т. 54, № 9. С.1420–1447.

Медведев С.П. *Как отредактировать наследственность* // НАУКА из первых рук. 2014, № 1 (55). С. 10–14.

Cong L., Ran F.A., Cox D. et al. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems* // *Science*. 2013, V. 339. P. 819–823.

Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran, S. (1996). *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1156–1160.

Moghaddassi S., Eyestone W., Bishop C.E. (2014). *TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin*. *PLoS One* 9, e89631.

Schwank, G., Koo, B.K., Sasselli, V. et al. (2013). *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*. *Cell Stem Cell* 13, 653–658.

Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M. et al. *Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9*. *Cell Stem Cell* 13, 659–662.