



КОМІСАРЕНКО

Сергій Васильович — академік НАН України, директор Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України



РОМАНЮК

Світлана Іванівна — кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

ПЕРСПЕКТИВИ РЕДАГУВАННЯ ГЕНОМУ ЗА ДОПОМОГОЮ CRISPR/CAS, АБО ЯК ОПАНУВАТИ «ГЕНЕТИЧНІ НОЖИЦІ»

Нобелівська премія з хімії 2020 року

Нобелівську премію з хімії у 2020 р. присуджено двом дослідникам у галузі молекулярної біології — французькій Еммануель Шарпантьє (Emmanuelle Charpentier), яка нині очолює Відділення наук про патогени при Товаристві Макса Планка в Берліні, та американці Дженніфер Дудні (Jennifer Doudna) з Каліфорнійського університету в Берклі — за «розвиток методу редагування геному». У пресрелізі Нобелівського комітету зазначено, що лауреатки відкрили один з найпотужніших інструментів генної технології — CRISPR/Cas9, або так звані «генетичні ножиці». Цей метод сприяв отриманню у фундаментальних дослідженнях багатьох важливих результатів. Зокрема, дослідники рослин змогли створити культури, стійкі до цвілі, шкідників та посухи. У медицині тривають клінічні випробування нових методів лікування раку, а мрія про те, щоб вилікувати спадкові захворювання, ось-ось стане реальністю. «Генетичні ножиці» вивели науки про життя на новий етап розвитку і дають людству величезну користь.

7 жовтня 2020 р. у Стокгольмі в рамках 119-го нобелівського тижня Нобелівський комітет при Каролінському медичному інституті оголосив імена лауреатів Нобелівської премії з хімії. За традицією напередодні нобелівського тижня компанія Clarivate Analytics опублікувала список найбільш імовірних претендентів на цю нагороду, який вона визначає за результатами аналізу кількості цитувань [1].

На найвищій сходинці рейтингу опинилися троє вчених, які зробили значний внесок у дослідження нанокристалів, зокрема синтезували нанокристали з певними властивостями для широкого спектру застосувань у фізичних, біологічних та медичних системах. Так, Техван Хен (Taeghwan Hyeon) з Національного університету Сеула (Корея) винайшов новий спосіб створення нанокристалів перехідних металів, які можна застосовувати, наприклад, як контрастну речовину для магнітно-резонансної томографії. Маунг Бавенді (Moungi G. Bawendi) з Массачусетського технологічного інституту (США) спеціалі-

зується на квантових точках — мікроскопічних напівпровідниках з особливими спектроскопічними властивостями. Нарешті, Крістофер Мюррей (Christopher V. Murray) з Університету Пенсильванії (США) займається вдосконаленням властивостей нанокристалів, зокрема підвищенням їх провідності.

Нагороду пророкували також двом американським вченим: Джону Хартвігу (John F. Hartwig) з Каліфорнійського університету в Берклі та Стівену Бухвальду (Stephen L. Buchwald) з Массачусетського технологічного інституту, які відкрили реакцію амінування Бухвальда–Хартвіга, в результаті якої утворюються вуглець-азотні зв'язки внаслідок реакцій сполучення амінів з арилгалогенідами, що каталізуються паладієм. Цей метод виявився дуже корисним для синтезу в лабораторних умовах багатьох природних алкалоїдів.

Третім за списком претендентом на Нобелівську премію з хімії у 2020 р. вважали Макото Фудзіта (Makoto Fujita) з Токійського університету (Японія) — фахівця з супрамолекулярної хімії комплексних сполук. Зокрема, він досліджує самозбирання тривимірних конструкцій з органічних молекул, скріплених атомами металу, які можуть слугувати «молекулярними контейнерами» для інших речовин.

Останнім часом «класичні» хіміки скаржаться на те, що Нобелівську премію з хімії все частіше присуджують за дослідження на стику традиційних біологічних дисциплін, зокрема вченим, які працюють у галузі біохімії, молекулярної біології та імунології. Так сталося і цього року. Лауреатами 112-ї Нобелівської премії з хімії стали дві дослідниці, що працюють у галузі молекулярної біології: французька Еммануель Шарпентьє (Emmanuelle M. Charpentier) з Відділення наук про патогени при Товаристві Макса Планка в Берліні (Max Planck Unit for the Science of Pathogens) та американка Дженніфер Дудна (Jennifer A. Doudna) з Каліфорнійського університету в Берклі. Генеральний секретар Шведської королівської академії наук Йоран Ханссон оголосив мотивування рішення про нагородження: вчені були удостоєні цієї престижної

нагороди за «розроблення методу редагування геному». Згідно з офіційним пресрелізом, лауреати «відкрили один з найпотужніших інструментів генної технології — «генетичні ножиці» CRISPR/Cas9. Використовуючи їх, дослідники можуть змінювати ДНК тварин, рослин, мікроорганізмів, інших живих істот досить просто та з надзвичайно високою точністю. Ця технологія здійснила революційний вплив на науки про життя, знайшла застосування у нових методах лікування раку і може здійснити мрію про лікування спадкових захворювань» [2]. У 2020 р. розмір Нобелівської премії становить 10 млн шведських крон, або \$1,1 млн.

Дженніфер Дудна і Еммануель Шарпентьє у 2012 р. здійснили справжній прорив у науці і, безперечно, заслуговують на нагороду, яку чекали протягом останніх восьми років. До речі, компанія Clarivate Analytics пророкувала їм Нобелівську премію з хімії ще у 2015 р. Однак Нобелівський комітет тривалий час не поспішав приймати це рішення, ймовірно, через багаторічні патентні війни та судову тяганину за авторство між різними групами вчених, які зробили свій внесок у розроблення технології CRISPR-Cas. У березні 2020 р. у журналі «Вісник НАН України» вийшла наша стаття «Редагування геному, або CRISPR/Cas9 — панацея від багатьох невиліковних хвороб чи перший крок до генного апокаліпсису?» про основні напрями використання технології CRISPR-Cas та етичні проблеми, що виникли з появою цієї технології і спричинили бурхливі дискусії у суспільстві [3]. У цій публікації за пів року було передбачено схвальне рішення Нобелівського комітету (хто знає, можливо, вона і посприяла його прийняттю). Тому в цій статті ми лише коротко розглянемо значення відкриття CRISPR-Cas, підсумуємо досягнення цієї технології в різних галузях та оцінимо перспективи її розвитку в майбутньому.

Отже, познайомимося ближче з нобелівськими лауреатами з хімії 2020 р.

51-річна професор Еммануель Шарпентьє зараз очолює Відділення наук про патогени при Товаристві Макса Планка в Берліні.

Еммануель Шарпентьє народилася 11 грудня 1968 р. у Франції, в м. Жувізі-сюр-Орж (передмістя Парижа). Її батько був відповідальним за міські зелені насадження і навчив доньку латинських назв багатьох рослин. Мати була директором психіатричної лікарні. Батьки підтримували інтерес дівчинки до науки, і після закінчення школи вона вступила до Університету П'єра та Марії Кюрі у Парижі для вивчення біохімії, мікробіології та генетики (сьогодні це факультет природничих наук Університету Сорбони). У 1991 р. Е. Шарпентьє здобула ступінь бакалавра з біохімії та оголосила батькам про свій намір навчатися в аспірантурі Інституту Пастера, що їх анітрохи не здивувало. Виявляється, ще в 12 років Еммануель заявляла, що буде там працювати. Так і сталося: в 1995 р. в Інституті Пастера Е. Шарпентьє захистила дисертацію з мікробіології, присвячену дослідженню молекулярних механізмів стійкості до антибіотиків.

У 1996 р. Еммануель Шарпентьє переїхала до США, де протягом наступних п'яти років була науковим співробітником у трьох нью-йоркських установах. Протягом року вона працювала у Рокфеллерівському університеті в лабораторії мікробіолога Елейн Туоманен (Elaine Tuomanen), де було відкрито механізм стійкості до антибіотику ванкоміцину у *Streptococcus pneumoniae*, який використовує мобільні генетичні елементи для зміни свого геному. У 1997–1999 рр. Е. Шарпентьє працювала асистентом наукового співробітника в Медичному центрі Лангона при Нью-Йоркському університеті в лабораторії Памели Ковін (Pamela Cowin), де займалася дослідженням клітин шкіри у генетично-модифікованих ссавців, зокрема вивчала механізми регулювання росту волосся у мишей. У 1999–2002 рр. Еммануель була науковим співробітником у Дитячій дослідницькій лікарні Сент-Джуд у Мемфісі (штат Теннессі) і в Інституті біомолекулярної медицини Скірболла у Нью-Йорку.

Потім Еммануель Шарпентьє повернулася до Європи, де у 2002–2004 рр. працювала завідувачем лабораторії та запрошеним професором Інституту мікробіології та генетики Ві-



Еммануель Марі Шарпентьє (Emmanuelle Charpentier)

денського університету (Австрія). Тут у 2004 р. вона відкрила молекули РНК, які регулюють синтез фактора вірулентності у *Streptococcus pyogenes*. У 2004–2006 рр. була доцентом кафедри мікробіології та імунології, а в 2006 р. стала приват-доцентом мікробіології та здобула кваліфікаційне підтвердження в Центрі молекулярної біології. В 2006–2009 рр. Еммануель Шарпентьє, продовжуючи керувати лабораторією, працювала також професором Лабораторій Макса Ф. Перуца.

Потім Е. Шарпентьє переїхала до Швеції на посаду професора і завідувача Лабораторії медицини молекулярних інфекцій Швеції (MIMS) в Університеті Умео. Саме тут у 2011–2012 рр. вона зробила свої головні відкриття, що стосувалися CRISPR/Cas9. Еммануель Шарпентьє була керівником групи в Університеті Умео у 2008–2013 рр. і запрошеним професором у 2014–2017 рр. А в 2013 р. вона переїхала до Німеччини, де до 2015 р. працювала професором і завідувачем відділу в Центрі досліджень інфекційних захворювань ім. Гельмгольца у Брауншвейзі та у Ганноверській медичній школі. У 2015 р. Еммануель Шарпентьє прийняла пропозицію німецького Товариства Макса Планка стати науковим членом товариства та директором Інституту інфекційної біології ім. Макса Планка у Берліні. З 2016 р. вона є почесним професором Університету

Гумбольдта у Берліні, а з 2018 р. — директором Відділення наук про патогени Товариства Макса Планка (Max Planck Unit for the Science of Pathogens). Еммануель Шарпентьє є членом Європейської організації молекулярної біології (з 2014 р.), Німецької академії наук Леопольдіна (з 2015 р.), Берлін-Бранденбурзької академії наук, Австрійської академії наук, Королівської шведської академії наук (з 2016 р.), Національної академії наук США, Національної академії технологій Франції, Французької академії наук (з 2017 р.), Європейської академії наук і мистецтв (з 2018 р.).

У 2013 р. Еммануель Шарпентьє стала співзасновником компанії CRISPR Therapeutics та ERS Genomics [5].

56-річна Дженніфер Дудна є нині професором біохімії та молекулярної біології у Каліфорнійському університеті в Берклі (США).

Дженніфер Дудна народилася 19 лютого 1964 р. в м. Вашингтон (округ Колумбія) у сім'ї Мартіна Кірка Дудни і Дороти Джейн (Вільямс). Її батько здобув ступінь доктора англійської літератури в Університеті Мічигану в Енн-Арборі, а мати була домогосподаркою, хоча й мала ступінь магістра в галузі освіти. Коли Дженніфер виповнилося сім років, сім'я переїхала на острів Гаваї, оскільки батько після захисту дисертації отримав посаду викладача американської літератури в Гавайському університеті у м. Хіло. Мати здобула в університеті другу освіту (ступінь магістра з історії Азії) і викладала історію в коледжі місцевих громад. Перебуваючи на Гаваїях, Дженніфер Дудна була зачарована красою природи острова, його екзотичною флорою і фауною, що пробудило цікавість до вивчення біологічних механізмів життя. Батько наповнив будинок науково-популярною літературою і з задоволенням читав Дженніфер про науку. Коли вона навчалася у шостому класі, він подарував їй книгу Джеймса Уотсона 1968 р. про відкриття структури ДНК «Подвійна спіраль», яка її надихнула. До вибору професії науковця Дженніфер також підштовхнули розповіді вчителя хімії, робота під час літніх канікул у лабораторії відомого міколога Дона Хеммеса (Don

Hemmes) у Гавайському університеті, а також лекції співробітниці онкологічного центру Голулулу про дослідження ракових клітин.

У 1981 р. Дженніфер закінчила середню школу в Хіло і вступила до коледжу Помона в Клермонті (штат Каліфорнія). На другому курсі Дженніфер почала сумніватися у власних здібностях до науки і захотіла все покинути заради вивчення французької мови, однак вчителі відмовили їй.

Перші наукові дослідження Дженніфер Дудна виконувала в лабораторії професора Шарона Панасенка (Sharon Panasenka). У 1985 р. вона здобула ступінь бакалавра біохімії та вступила до аспірантури Гарвардської медичної школи, яку закінчила у 1989 р., захистивши під керівництвом Джека Шостака (Jack W. Szostak) дисертацію, присвячену розробленню системи, яка підвищує ефективність самовідтворювальної каталітичної РНК.

У 1989–1991 рр. Дж. Дудна працювала в Массачусетській лікарні загального профілю та у Гарвардській медичній школі в Бостоні (штат Массачусетс), у 1991–1994 рр. — в Університеті Колорадо у Боулдері разом із Томасом Чехом (Thomas Cech), який отримав Нобелівську премію з хімії у 1989 р. за відкриття каталітичних властивостей РНК.

На початку своєї наукової кар'єри Дженніфер Дудна досліджувала структуру та біологічні функції РНК-ензимів, або рибозимів. Під час роботи в Університеті Колорадо вона познайомилася з молодшим на чотири роки аспірантом Джеймі Кейтом (Jamie Cate), який згодом став її чоловіком. У 1994 р. Дж. Дудна перейшла до Єльського університету, де у 2000 р. отримала посаду професора молекулярної біофізики та біохімії. У 2000–2001 рр. вона була запрошеним професором хімії Гарвардського університету, а в 2002 р. перейшла на посаду професора біохімії та молекулярної біології Каліфорнійського університету в Берклі, де й зробила свої головні відкриття. Цікаво, що Дженніфер Дудна стала 25-м нобелівським лауреатом із Каліфорнійського університету в Берклі, причому ім'я 24-го, Райнгарда Генцеля (Reinhard Genzel), стало відоме днем раніше,

коли оголосили лауреатів Нобелівської премії з фізики.

Зараз Дженніфер Дудна є президентом і головою правління Інноваційного інституту геноміки, який фінансується Фондом гонконгського мільярдера Лі Ка-Шина (Li Ka-Shing) і створений спільно Каліфорнійським університетом у Берклі та Каліфорнійським університетом у Сан-Франциско. Вона обіймає посаду професора біомедицини та охорони здоров'я, є головою Дорадчого комітету з біології, співробітником Національної лабораторії імені Лоуренса в Берклі, дослідником Медичного інституту імені Говарда Х'юза, старшим науковим співробітником Інституту Гладстона у Сан-Франциско та ад'юнкт-професором клітинної та молекулярної фармакології Каліфорнійського університету в Сан-Франциско. Лабораторія Дж. Дудни працює над механістичним розумінням біологічних процесів за участі РНК.

Дженніфер Дудна є членом Національної академії наук США (з 2002 р.), Американської академії мистецтв і наук (з 2003 р.), Національної медичної академії (з 2010 р.), Національної академії винахідників (з 2014 р.) та іноземним членом престижного Лондонського королівського товариства (з 2016 р.).

Після відкриття у 2012 р. технології CRISPR Дж. Дудна стала співзасновником п'яти компаній, які займаються комерціалізацією технології: Caribou Biosciences (2011), Editas Medicine (2013), Intellia Therapeutics (2014), Mammoth Biosciences (2017) та Scribe Therapeutics (2019) [4].

Обидві дослідниці — Еммануель Шарпентьє і Дженніфер Дудна — мають неймовірну кількість наукових нагород (майже 40 кожна). Перелічимо тут лише спільні нагороди:

- премія доктора Поля Янссена з біомедичних досліджень (2014);
- премія Габбая (2014);
- премія за прорив у науках про життя (2015);
- премія принцеси Астурійської (2015);
- премія Грубера в галузі генетики (2015);
- премія Мессрі (2015);



Дженніфер Анна Дудна (Jennifer Anne Doudna)

- міжнародна премія канадського фонду Гайрднера (2016);
- премія Пауля Ерліха та Людвіга Дармстедтера (2016);
- премія Тан тайванської Академії Сініка (2016);
- премія програми Human Frontier Science Program (HFSP) (2016);
- премія Фонду BBVA «Рубежі знань» (2016);
- премія Л'Ореаль–ЮНЕСКО для жінок у науці (2016);
- премія Фонду Уоррена Альперта (2016);
- премія Японії (2017);
- премія медичного центру Олбані (2017);
- премія Харві (2018);
- премія Кавлі в галузі нанонауки (2018);
- почесна медаль Американського онкологічного товариства (2018);
- премія Вольфа з медицини (2020).

Дженніфер Дудна та Еммануель Шарпентьє за версією журналу Foreign Policy у 2014 р. увійшли до сотні провідних світових мислителів, за версією журналу Time у 2015 р. — до сотні найвпливовіших людей світу, у 2016 р. отримали звання «Людина року», а у 2018 р. увійшли до списку 50 найвидатніших жінок у галузі техніки, складеного журналом Forbes [4, 5].

Чому ж відкриття, яке зробили цьогогорічні лауреати Нобелівської премії з хімії, визнане усім світом як революційне і надзвичайно важливе? І що таке CRISPR/Cas9?

У 50–70-х роках ХХ ст. було вже відомо, що бактерії використовують для боротьби з вірусами спеціальні ензими — рестриктази (від лат. *restrictio* — обмеження), що розрізають вірусну ДНК і є специфічними до певної невеликої послідовності ДНК. Власну ДНК бактерії захищають від рестриктаз за допомогою метилювання нуклеотидних залишків аденіну та цитозину. З відкриттям «зшиваючих» ензимів — ДНК-лігаз стало можливим створення штучних конструкцій з ДНК живих організмів. Так виникла нова галузь науки — генна інженерія, яка дала змогу створювати генно-модифіковані організми (ГМО), рекомбінантні протеїни, індуковані стовбурові клітини тощо. Пізніше виявилось, що бактерії захищаються від вірусів не тільки за допомогою рестриктаз: у них є інший, більш специфічний механізм, який надає захист після зустрічі з певним вірусом. Цей механізм реалізує система з досить громіздкою назвою CRISPR/Cas9, або криспер.

Коли ДНК вірусу проникає в бактерію, відбувається копіювання фрагменту цієї ДНК і перенесення його в спеціальне «сховище» інформації про віруси у власному геномі — CRISPR (акронім від англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* — короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами). Тут зразки ДНК різних вірусів (спейсери) накопичуються між однаковими короткими повторами бактеріальної ДНК і використовуються для виготовлення CRISPR РНК — сгРНК (їх ще називають РНК-зондами або РНК-гідами), що специфічно розпізнають гени певних вірусів і зв'язуються з ними у разі повторного зараження. Завдяки сгРНК вірусну ДНК знаходять спеціальні ензими — протеїни Cas (CRISPR-асоційовані протеїни), гени яких розміщені поруч з масивом CRISPR. Ці ензими, як і рестриктази, є ендонуклеазами, тобто вони здатні розрізати ДНК вірусу, знешкоджуючи її, тому їх називають «генетичними ножицями».

Розглянемо, як працює ця система, на прикладі CRISPR/Cas9. Після транскрипції масиву CRISPR утворюється довга молекула РНК,

до якої приєднується невелика РНК, комплементарна повторам (tracrРНК). До tracrРНК приєднується та активується протеїн Cas9, до якого, у свою чергу, приєднується ензим РНКаза III, що розрізає довгу РНК на фрагменти — сгРНК та від'єднується. Фактично в результаті розрізання довгої РНК утворюються комплекси сгРНК, tracrРНК і активованого протеїну Cas9. Спейсерна частина сгРНК розпізнає комплементарну ділянку вірусної ДНК, а протеїн Cas9 замикається на двох нитках ДНК і «розрізає» їх, спричиняючи подальшу деградацію чужорідної ДНК [6]. Для успішного розпізнавання ДНК-«мішені» та її пошкодження необхідно, щоб протеїн Cas9 розпізнав певну коротку (3–9 нуклеотидів) послідовність PAM (від англ. *protospacer adjacent motif* — мотив, що примикає до протоспейсеру), яка відрізняється у різних бактерій і розміщена поруч з розпізнаною сгРНК ділянкою ДНК (див. рис.). Ймовірно, що розпізнавання PAM необхідне для захисту власних генів бактерії від розрізання системою CRISPR/Cas9, адже CRISPR містить 20 % спейсерів, націлених на власну ДНК [7].

Еммануель Шарпентьє і Дженніфер Дудна отримали Нобелівську премію за відкриття технології редагування геному за допомогою CRISPR/Cas9. Однак у сучасній науці вже неможливо відкрити щось одноосібно. Історія відкриття, яке спричинило революцію в генній інженерії, тривала 25 років, і багато вчених зробили у неї свій внесок.

У 1987 р. група японських дослідників на чолі з Йосідзумі Ісіно (Yoshizumi Ishino) разом з геном *iap*, який вони досліджували, випадково клонували досить великий фрагмент геному кишкової палички *Escherichia coli*, що не кодував жоден з протеїнів [8]. Це було дуже дивно, оскільки бактерії, як правило, не мають зайвих послідовностей. Ділянка складалася з послідовностей ДНК, що повторювалися, та варіабельних фрагментів ДНК між ними — спейсерів [9].

У 1993 р. науковці з Нідерландів під керівництвом Яна ван Ембдена (Jan D.A. van Embden) дослідили різноманітність перериваних пря-

мих повторів серед різних штамів збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*) і розробили новий метод диференціювання штамів, який використовується й дотепер [10].

Пізніше іспанець Франсиско Хуан Мартінес Мохіка (Francisco Juan Martínez Mojica) знайшов подібні ділянки в інших видів бактерій і архей та в 2000 р. запропонував об'єднати їх у родину під назвою SRSRs (від англ. short regularly spaced repeats — короткі регулярно розташовані повтори) [11], яку через два роки перейменували на CRISPR.

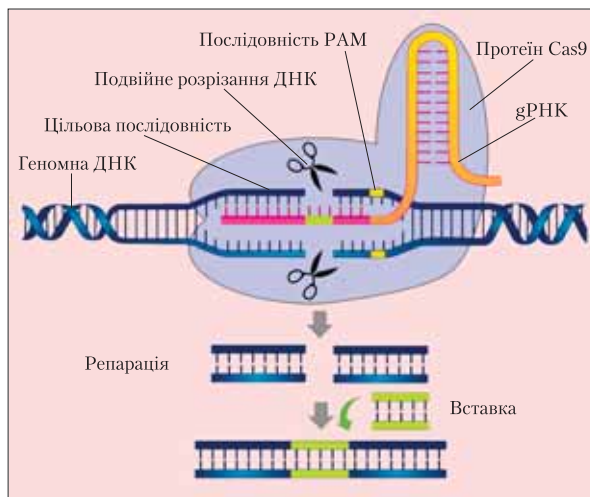
Тоді ж, у 2002 р., група вчених з Нідерландів на чолі з Рууд Янсен (Ruud Jansen) відкрила гени протеїнів Cas, які були розташовані поруч з ділянкою CRISPR [12].

А в 2005 р. відразу три дослідницькі групи незалежно одна від одної з'ясували, що між повторами CRISPR часто є послідовності, ідентичні послідовностям ДНК вірусів-бактеріофагів і плазмід [13–15].

Ці результати та припущення про виконання CRISPR функції противірусного захисту не викликали тоді особливого інтересу.

Все змінила наукова стаття, що вийшла в журналі Science в 2007 р. [16]. Її авторами були вчені на чолі з Філіпом Хорватом (Philippe Horvath) з компанії Danisco (США), яка виробляє відомі йогурти Danone (у 2011 р. її придбала компанія DuPont за \$6,3 млрд). Справа в тому, що при виробництві кисломолочних продуктів є небезпека зараження молочнокислих бактерій вірусами-бактеріофагами, що може призвести до величезних збитків. Тому в компанії Danisco вирішили відібрати для виробництва клони молочнокислих бактерій, стійких до вірусу. А оскільки компанія використовувала CRISPR для класифікації своїх комерційних штамів, то вчені одразу помітили, що в ділянках CRISPR відібраних клонів з'являлися нові спейсери, які були тотожні ділянкам вірусного геному. Тоді дослідники штучно вставили спейсер з послідовністю ДНК вірусу в ділянку CRISPR бактерії, що одразу ж зробило її стійкою до вірусу.

У 2007–2008 рр. було відкрито важливі деталі механізму роботи CRISPR. Група під ке-



Механізм дії системи CRISPR/Cas9, який дозволяє використовувати її для редагування геномної ДНК (адаптовано за www.labiotech.eu)

рівництвом Джона ван дер Ооста (John van der Oost), наприклад, показала, що захист CRISPR реалізується через малі РНК [17]. Лучіано Марраффіні (Luciano A. Maraffinì) та Ерік Сонтгеймер (Erik J. Sontheimer) з Північно-Західного університету в Еванстоні (США) довели, що система CRISPR спрямована на розривання ДНК [18]. Вони першими висловили думку про можливість використання CRISPR для редагування геному в гетерологічних системах і навіть подали заявку на патент, але через недостатність експериментального підтвердження врешті-решт відмовилися від нього [19].

Згодом стало відомо, що для виконання захисної функції CRISPR необхідна взаємодія з багатьма протеїнами Cas, одні з яких зв'язуються з малими РНК, інші — розпізнають ДНК вірусу, а треті — розрізають її. Однак Еммануель Шарпентьє, яка тоді працювала в Університеті Умео (Швеція), виявила різновид системи CRISPR, який для повноцінного захисту потребував лише одного дуже великого протеїну Cas — Cas9. У цей час Дженніфер Дудна з Каліфорнійського університету в Берклі досліджувала функціонування системи CRISPR зі структурної точки зору.

Е. Шарпентьє і Дж. Дудна познайомилися у 2011 р. на конференції в Пуерто-Рико. Вони зустрілися в кафе і під час прогулянки містом домовилися про співробітництво. Дж. Дудна, зацікавившись протеїном Cas9, намагалася відтворити роботу системи CRISPR/Cas9 у пробірці, але безуспішно. Того ж року Е. Шарпентьє відкрила *tracrRNA*, що відіграє вирішальну роль у CRISPR-опосередкованому захисті від вірусів [6]. Після додавання до пробірки *tracrRNA* Дж. Дудні нарешті вдалося домогтися розщеплення ДНК за допомогою системи CRISPR/Cas9. У 2012 р. Мартін Джінек (Martin Jinek) з групи Дженніфер Дудни об'єднав *tracrRNA* і *crRNA* в одну єдину молекулу *sgRNA* (від англ. single-guide RNA – єдина РНК-гід) і створив вектор для клонування цієї РНК. Виявилося, що така синтетична *sgRNA* коректно працює в клітині у комплексі з протеїном Cas9. Тоді ж наукові групи Еммануель Шарпентьє і Дженніфер Дудни опублікували статтю в *Science* [20], в якій описали спосіб використання системи CRISPR/Cas9 для розрізання обраних дослідником ДНК-«мішеней» у клітині та в експериментах *in vitro* і продемонстрували можливість такого підходу. Майже одночасно з ними подібну статтю опублікувала група литовського біохіміка Віргініюса Шикшніса (Virginijus Siksnys) з Інституту біотехнології Вільнюського університету [21]. Цікаво, що В. Шикшніс отримав результат раніше, але його опублікування було затримано на пів року через безпідставне відхилення статті журналом *Cell*.

На початку 2013 р. групи Джорджа Черча (George Church) [22] і його колишнього аспіранта Фена Чжана (Feng Zhang) [23] з Інституту Броуд (Broad Institute of MIT and Harvard) у Кембриджі (штат Массачусетс) показали, що штучна *crRNA* і протеїн Cas9 повноцінно функціонують у клітинах вищих організмів. Практично водночас ефективність такого підходу було підтверджено вченими з Південної Кореї в експериментах із культурою клітин людини [24]. Одразу після цього всі забули про проблеми бактерій в їх непростій боротьбі з вірусами. Здавалося, що наукові та

громадські видання «вибухнули» публікаціями виключно на одну тему: про CRISPR/Cas9 як фантастичний інструмент для редагування геномів вищих організмів.

Відкриття CRISPR/Cas9 зчинило справжній ажіотаж, адже ця технологія виявилася набагато кращою за попередні методи генної інженерії. Раніше, щоб створити ГМО, потрібно було провести дуже копітку і тривалу роботу, відкидаючи значну кількість невдалих варіантів. Технологія CRISPR/Cas9 запропонувала простий спосіб вбудовувати ген-вставку в певну послідовність ДНК і дала можливість працювати в клітинах усіх організмів від бактерій до ссавців. Систему CRISPR/Cas9 можна використовувати не лише в пробірці, як рестриктази, а й безпосередньо в живій клітині. Можна одночасно редагувати необмежену кількість генів у геномі, а також вводити компоненти системи не тільки в окремі клітини, а й у різні тканини або весь організм.

Звичайно, є інші інструменти для редагування геному, а саме: мегануклеази, генно-інженерні протеїни TALEN (на основі домену ефектору, подібного до активатора транскрипції – TALE) і нуклеази з «цинковими пальцями» ZFN (що містять домен еукаріотичного фактора транскрипції). Проте застосування цих систем для редагування геному вимагає створення окремого штучного протеїну для кожної нової ДНК-мішені. На відміну від них, система CRISPR використовує універсальний протеїн Cas9, а змінювати необхідно лише *sgRNA*. Це набагато простіше і дешевше, оскільки будь-які РНК можна легко синтезувати. Ще однією перевагою системи CRISPR/Cas9 є можливість застосування її до РНК, що надає більш гнучкі можливості для впливу на біохімічні процеси в клітині.

Усвідомивши беззаперечні переваги CRISPR/Cas9, вчені всього світу кинулися використовувати технологію для редагування геномів вірусів, бактерій, рослин і тварин. Відкрилися практично безмежні перспективи створення ГМО для боротьби з хворобами, поліпшення порід сільськогосподарських тварин і сортів рослин, створення моделей для

вивчення генетичних захворювань людини та тварин, тестування нових методів лікування і навіть створення домашніх улюбленців.

Технологія CRISPR/Cas9 здатна підвищити ефективність сільського господарства та допомогти прогодувати зростаюче населення планети, зменшивши при цьому негативний вплив людини на навколишнє середовище. За останні чотири роки Міністерство сільського господарства США дало дозвіл на вирощування шести організмів, модифікованих за допомогою CRISPR, зокрема печериць садових (*Agaricus bisporus*), які позбавлені здатності темнішати при механічних ушкодженнях і втрачати товарний вигляд; рижію посівного (*Camelina sativa*) — олійної культури, що містить більше омега-3 жирних кислот, а також стійкого до посухи сорту сої [25]. Дослідники планують вирощувати курей, м'ясо яких не викликає алергії у людини, відновити чисельність медоносних бджіл, які потерпають у всьому світі від хвороб та паразитів, а також застосувати CRISPR для контролю статі сільськогосподарських тварин. Однак, оскільки при редагуванні геному CRISPR може змінювати нецільові гени, висловлюється припущення, що це може вплинути на здоров'я тварин, на склад м'яса та молока. Тому поки що споживачі вимагають обережності у застосуванні нових технологій для тварин, які є джерелом продуктів харчування [26].

Можливість модифікації геномів екзотичних і маловивчених тварин спричинила «хвилю» масового створення нових модельних організмів. У березні 2019 р. за допомогою CRISPR було створено першу генетично модифіковану рептилію — коричневого аноліса (*Anolis sagrei*) [27]. Технологія CRISPR стала цінним інструментом фундаментальних досліджень, який дозволяє «вимикати» певні гени та встановлювати їх біологічну функцію в організмі.

Інактивувати ген без його пошкодження можна за допомогою CRISPR-інтерференції (CRISPRi). При застосуванні цього методу мутантний протеїн dCas9, в якого не функціонують обидва нуклеазних центри, зв'язується

з ДНК-мішенню і заважає просуванню РНК-полімерази, що приводить до припинення транскрипції [28].

Якщо до протеїну dCas9 «прив'язати» домен фактора транскрипції, який підвищує або знижує активність генів, можна безпосередньо впливати на функціонування генів і роботу всього організму. Регулювати активність експресії генів можна також, впливаючи на епігеномні процеси (наприклад, на метилювання ДНК чи ацетилювання гістонів). Для цього можна використати штучні протеїни, які складаються з dCas9іа каталітичного домену відповідного ензиму (ДНК-метилтрансферази чи ацетилтрансферази гістонів) [29]. Мішенню системи CRISPR/Cas9 можуть бути також довгі некодуєчі РНК (lncRNA) або енхансерні РНК (eRNA), які регулюють експресію генів і епігенетичні процеси [30]. Це дуже важливо для дослідження функцій регуляторних РНК і встановлення їх ролі в патогенезі захворювань, оскільки при понад 90% захворювань, пов'язаних з одиничною нуклеотидною заміною, ця заміна відбувається в некодуєчих ділянках ДНК [31]. А приєднавши до протеїну dCas9 флуоресцентний протеїн GFP, можна позначити певну ділянку в хромосомі живої клітини і спостерігати за нею під мікроскопом протягом клітинного циклу або візуально визначати довжину теломер [32].

У 2019 р. було створено біосенсор CRISPR-Chip на основі ультрачутливого графену та системи CRISPR/Cas9, який дозволяє протягом 15 хв виявляти певні послідовності ДНК без її ампліфікації з чутливістю 1,7 fM ($1,7 \times 10^{-15}$ моль) [33]. Подібні біосенсори, що використовують різні типи ензиму Cas, можуть бути націлені на виявлення специфічних послідовностей в одно- або дволанцюговій ДНК і РНК збудників інфекційних захворювань. Така система, наприклад, здатна визначати кількість РНК коронавірусу, його тип (SARS-CoV або SARS-CoV-2) і навіть диференціювати окремі заміни у РНК [34]. Отже, як бачимо, можливості системи CRISPR/Cas9 не обмежуються лише розрізанням певних послідовностей ДНК. Ця система є універсальним механізмом

доставки будь-яких молекул у будь-яку «точку» геному, що відкриває фантастичні можливості для медицини та фундаментальної науки.

У січні 2014 р. за допомогою системи CRISPR/Cas9 китайські вчені модифікували геном макак [35]. Після успіху з мавпами всі зрозуміли, що настала черга людини. Справді, дуже заманливо, виправивши всього одну нуклеотидну основу в ДНК, звільнити людину від важкої спадкової хвороби, наприклад гемофілії. Однак невідомо, як відреагує організм людини на втручання в геном. Тому можливість редагування генів людини одразу порушила низку етичних проблем, особливо гострих у випадку редагування генів ембріону людини. Дженніфер Дудна та інші провідні вчені неодноразово заявляли про небезпеку бездумного використання технології CRISPR/Cas9 і закликали до мораторію на клінічні експерименти з генетичної модифікації людини доти, доки не будуть зрозумілі наслідки і введені правила [36]. Адже простота технології і доступність у США реактивів для її реалізації дали можливість біохакерам здійснювати втручання в геном живих організмів у домашніх умовах, навіть без спеціальних навичок і обладнання. Проте експертний консультативний комітет ВООЗ на своєму засіданні в серпні 2019 р. оминув питання про мораторій, хоча і створив глобальний реєстр для відстеження всіх видів досліджень з редагування генів людини і запропонував консультації щодо управління такими технологіями [37].

Незважаючи на заклики до заборони експериментів з генетичної модифікації людини, 14 квітня 2015 р. в журналі *Protein&Cell* з'явилася стаття китайських генетиків під керівництвом Цзюньцзю Хуана (Junjiu Huang) з Університету Сунь Ятсена в Гуанчжоу, в якій описувався експеримент з використання системи CRISPR/Cas9 для редагування геному людського ембріону [38]. Метою роботи було виправлення мутації в одному з генів гемоглобіну, яка призводить до хвороби крові — бета-таласемії. Це була перша в історії спроба генетично модифікувати людину. В результаті з 86 запліднених яйцеклітин мутація була виправ-

лена лише в 4 ембріонах (це приблизно 5%). Крім того, в усіх клітинах ембріонів з'явилася значна кількість нових мутацій в інших генах у результаті неспецифічної взаємодії sgРНК з іншими подібними послідовностями ДНК, а також внаслідок помилок ензимів репарації. Такі результати викликали небезпідставні побоювання, що систему CRISPR/Cas9 взагалі ніколи не можна буде використовувати для експериментів на людині.

Для підвищення точності CRISPR/Cas9 пропонували різні ідеї. Наприклад, було отримано Cas9-ніказу — модифікований протеїн Cas9, у якого працює лише один нуклеазний центр, і тому він робить лише одноланцюгові розрізи ДНК. Використовуючи дві такі нікази з різними sgРНК, можна значно підвищити точність розрізання ДНК у потрібному місці [39]. У серпні 2017 р. було опубліковано надійливі результати досліджень, проведених під керівництвом Шухрата Міталіпова (Shoukhrat Mitalipov), відомого своїми успішними експериментами з клонування приматів і людини. Вдалося збільшити до 72,4% вихід ембріонів з виправленою мутацією гена *MYBPC3*, що викликає гіпертрофічну кардіоміопатію — спадкове захворювання серця, без появи інших мутацій [40].

У листопаді 2018 р. китайський дослідник Хе Цзянькуй (He Jiankui) з Південного університету науки і техніки у Шеньчжені несподівано заявив, що він створив перших у світі генетично відредагованих дітей — дівчат-близнюків Лулу і Нану, які не здатні заразитися вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) через модифікацію гена *CCR5*. У 2019 р. в рамках цього проекту народилася ще одна модифікована дитина. Ці заяви спровокували скандал і поліцейське розслідування в Китаї та обурення світової наукової громадськості [41]. На закритому суді Хе Цзянькуй було засуджено до трьох років ув'язнення та оштрафовано на 3 млн юанів (\$430 тис) за проведення «незаконної медичної практики». Його колеги Чжан Ренлі (Zhang Renli) та Цінь Цзінчжоу (Qin Jinzhou) отримали відповідно 24 та 18 місяців умовно. Всі троє визнали свою провину, їм до-

вічно заборонили брати участь у дослідженнях, пов'язаних з репродуктивною медициною [42]. До речі, Хе Цзянькуй зізнався, що спроба редагування виявилася не дуже вдалою: система редагування внесла мутацію, але не ту, на яку очікували. Що зараз відбувається з модифікованими дітьми, невідомо — влада Китаю їх приховує.

У 2019 р. ще двоє вчених заявили про намір створити немовлят з редагованими генами: Денис Ребриков з Російського національного дослідницького університету ім. М.І. Пирогова в Москві і Джанпієро Палермо (Gianpiro D. Palermo) з Нью-Йорка. Невідомо, наскільки ці плани близькі до втілення, але такі заяви є попередженням, що найближчим часом знайдуться й інші люди, які намагатимуться ввести в геном людини зміни, здатні успадковуватися майбутніми поколіннями [37, 43]. Вчені, які готові створювати дітей з редагованими генами, можливо, мріють покращити світ, позбавити людство від небезпечних захворювань. Однак внесені мутації, позбавляючи від однієї небезпеки, можуть наразити організм на інші через багатофункціональність більшості генів, яка у разі мутації гена приводить до зміни цілого комплексу ознак, не завжди бажаних і корисних.

Тому вчені зосередилися на інших перспективних напрямках застосування технології CRISPR/Cas9, таких як редагування геному бактерій або дріжджів з метою синтезу абсолютно нових речовин, створення тваринних моделей захворювань людини, боротьба з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів, знешкодження комах-шкідників і переносників інфекцій, вирішення проблеми нестачі донорських органів для трансплантації, захисту від небезпечних вірусів, лікування онкологічних захворювань тощо.

Експериментально підтверджено, що систему CRISPR/Cas9 можна успішно застосовувати для руйнування генів ензимів, що забезпечують стійкість бактерій до дії антибіотиків [44]. Навіть отримано бактеріофаги, що вибірково знешкоджують бактерії, стійкі до антибіотиків [45]. Біотехнологічна компанія Oxitec

(Велика Британія) використовує CRISPR/Cas9 для створення генно-модифікованих комах, які після спарювання зі своїми дикими родичами спричиняють загибель частини їхніх нащадків. У жовтні 2019 р. у м. Індаятуба (Бразилія) було успішно проведено випробування модифікованих комарів, створених для боротьби з лихоманкою денге та іншими захворюваннями, а також модифікованих діамантових молей, які є шкідниками різних видів капусти [46].

У серпні 2017 р. група вчених під керівництвом Джорджа Черча з Гарвардського університету оприлюднила приголомшливі результати досліджень з клонування генно-модифікованих за допомогою CRISPR/Cas9 свиней, у яких повністю інактивовано віруси PERV. Інактивація цих вірусів відкриває можливості використання для трансплантації людям органів свиней, які мають штучно створені ідентичні певній людині трансплантаційні антигени [47]. Дослідники з Університету Алабами (США) використали редагування генів та клонування для створення свиней без специфічних вуглеводів на поверхні їхніх органів. Бабуїни, яким було пересаджено серця та нирки від цих свиней, прожили більше року [48]. Поєднавши технологію CRISPR/Cas9 і антиретровірусну терапію тривалої дії, в липні 2019 р. було повністю видалено ВІЛ з Т-клітин 30% трансгенних «гуманізованих» мишей, які були попередньо інфіковані ВІЛ. Після випробування цієї методики на мавпах у 2020 р. заплановано перші випробування за участі людей [49].

Система CRISPR/Cas9 є також цінним інструментом для створення вірусів з певними властивостями, наприклад ослаблених вірусів для вакцин або онколітичних вірусів [50]. За допомогою цієї системи можна вдосконалити імунотерапевтичні підходи до лікування раку, зокрема створити генно-модифіковані Т-клітини з химерними антигенними рецепторами (CAR-T), до складу яких входить scFv-антитіло проти певного антигена ракових клітин. Так, у 2017 р. FDA схвалило препарат Kymriah (Tisagenlecleucel) виробництва Novartis (Швейцарія), який успішно лікує

В-клітинну лімфому за допомогою Т-клітин з химерними рецепторами проти антигена CD19 [51]. Зараз досліджуються та проходять клінічні випробування понад 300 різних варіантів терапії CAR-T. Поза тим, технологія CRISPR/Cas9 відкриває реальні можливості усунення мутацій, що спричиняють онкологічні захворювання [52].

Найпростішим варіантом для застосування CRISPR/Cas9 у практичній медицині для лікування спадкових захворювань, спричинених одиначною мутацією в певному гені, є захворювання крові, для яких технології клітинної терапії вже добре відпрацьовано. Наприкінці минулого року група вчених з Каліфорнійського університету в Берклі повідомила про успішне використання CRISPR/Cas9 для виправлення генетичної мутації в стовбурових клітинах пацієнтів із серпоподібноклітинною анемією [53]. Не дивно, що біотехнологічні компанії вкладають все більше і більше коштів у розроблення технології CRISPR/Cas9 і реалізацію ідей щодо її медичного застосування.

Вчені, які зробили найбільший внесок у винахід технології CRISPR/Cas9, стали співзасновниками перших семи компаній, що розвивають застосування цієї технології у медичній практиці. Еммануель Шарпентьє є співзасновником двох компаній: CRISPR Therapeutics та ERS Genomics. Дженніфер Дудна є співзасновником п'яти компаній: Caribou Biosciences (розробляє терапевтичні модифіковані клітини та бактерії кишечника), Editas Medicine (препарати і модифіковані клітини для терапії), Intellia Therapeutics (підходи до терапії раку, генетичних і аутоімунних захворювань), Mammoth Biosciences (діагностичні тест-системи з використанням нових протеїнів Cas12-14), Scribe Therapeutics (підходи до терапії нейродегенеративних захворювань, зокрема з використанням протеїну CasX).

Дженніфер Дудна була змушена розірвати відносини з компанією Editas Medicine, оскільки її партнер Фен Чжан несподівано оформив на себе та свій інститут патент на застосування технології CRISPR/Cas9 у клітинах еукаріотів (у тому числі людей). Кілька років тривала су-

дова тяганина за пріоритет, яка коштувала десятки мільйонів доларів, врешті було прийнято рішення на користь команди Дудна–Шарпентьє [54]. Фармацевтичні фірми вже вклали у зазначені вище стартап-компанії понад \$300 млн. У разі отримання обнадійливих результатів інвестиції зростуть, а застосування у медичній практиці обіцяє мільярдні прибутки.

Тривалий час FDA не дозволяло проведення за федеральні кошти клінічних випробувань системи CRISPR/Cas9. Однак на початку 2019 р. нарешті було офіційно схвалено проведення першого клінічного випробування системи CRISPR/Cas9 на людях за межами Китаю, де подібні випробування проводять протягом двох останніх років. Цього року фармацевтичні компанії CRISPR Therapeutics і Vertex розпочали випробування терапії CTX001, призначеної для лікування бета-таласемії та серпоподібної анемії, що зумовлені мутацією в одному гені. Ця терапія передбачає модифікацію стовбурових клітин пацієнта внесенням єдиної генетичної зміни, що приведе до підвищення рівня гемоглобіну в еритроцитах плоду [55].

У США зараз проводять понад 20 клінічних випробувань терапевтичних препаратів на основі CRISPR для низки захворювань, зокрема рідкісних моногенних гематологічних та очних, а також полігенних онкологічних захворювань [56]. Серед спадкових хвороб, зумовлених точковою мутацією, увагу вчених привертають передусім такі захворювання, як вроджений амавроз Лебера 10 (ураження сітківки ока), синдром Ушера (глухота з поступовою втратою зору), м'язова дистрофія Дюшенна, муковісцидоз (кістозний фіброз, що вражає дихальну і травну системи), дефіцит транстиретину (ураження периферичної нервової системи), амілоїдоз альфа-1 та первинна гіпероксалурія I типу (ураження нирок). Однак висока вартість препаратів на основі CRISPR може стати перешкодою для їх широкого використання: ні державні бюджети, ні страхові компанії не готові до таких витрат. Крім того, поки що CRISPR/Cas9 має низку недоліків, головними з яких є велика кількість помилок редагування, неефективність редагування ДНК

поза межами клітини і значний розмір ензиму Cas9, що ускладнює його доставку в клітину та зумовлює сильні імуногенні властивості.

Водночас немає жодних сумнівів, що технологія CRISPR/Cas9 є революційною і на неї чекає велике майбутнє. З відкриттям CRISPR/Cas9 з'явилося безліч можливостей для вирішення наболілих проблем людства, з якими наука досі не могла впоратися. Однак, щоб реалізувати всі ці можливості повною мірою, необхідно зробити технологію безпечною: виключити всі побічні ефекти, а також вдосконалити системи доставки компонентів CRISPR/Cas9 до клітин. Коли це буде зроблено, ідея застосування CRISPR/Cas9 до ембріонів людини для позбавлення від тяжких захворювань, ймовірно, вже не буде видаватися такою сумнівною.

До речі, Дженніфер Дудна вважає, що редагування геному людського зародку не можна забороняти повністю. Цю технологію слід детально дослідити і вдосконалити, а її клінічне використання потрібно обмежити випадками серйозних генетичних захворювань, коли інших варіантів лікування немає. Втім, такі випадки є рідкісними, адже значно простіше позбавитися генетичних дефектів не за допомогою редагування геному, а завдяки скринінгу та відбору ембріонів після запліднення у пробірці. На думку Дж. Дудни, більш перспективним напрямом розвитку технології CRISPR/Cas9 є її використання для регулювання експресії протеїнів і контролю функціонування клітин. Також є багато інших можливостей для застосування CRISPR/Cas9. У найближчому майбутньому лабораторія Дж. Дудни планує досліджувати функціонування системи CRISPR у різних мікроорганізмів, а також можливості редагування геному в природних мікробних спільнотах і маніпулювання певними мікробами. Одна з її компаній — Mammoth Biosciences, що займається розробленням діагностичних тестів на основі CRISPR/Cas9, у листопаді 2020 р. планує провести випробування тесту для діагностики COVID-19 [57].

Ми зараз переживаємо сплеск захоплення технологією CRISPR/Cas9. Протягом останніх восьми років опубліковано близько 17 тис.

наукових статей на цю тему, виділено мільйони доларів на дослідження, а кількість стартап-компаній невпинно зростає. Не дивно, що авторитетний науковий журнал Science випустив огляд досягнень у цій галузі під назвою The CRISPR Craze («Криспер-божевільня») [58]. Очікується, що у світі до 2025 р. на розвиток технології CRISPR/Cas9 та редагування геномів за її допомогою буде витрачено понад \$5,3 млрд [59].

Головною заслугою Дженніфер Дудни і Емануель Шарпентьє є те, що відкрита ними технологія редагування геному CRISPR/Cas9 стала початком нової ери в історії генної інженерії та стимулювала її подальший розвиток. Адже прогрес не стоїть на місці: вчені намагаються вдосконалити технологію CRISPR/Cas9, поєднати її з іншими методами та безперервно шукають нові способи редагування геному.

Одним з напрямів вдосконалення технології став пошук інших протеїнів Cas, які можуть виявитися більш ефективними. Так, було відкрито протеїни ScCas9 [60], CasX і CasY [61], Cas12a (Cpf1) [62], Cas13 (a, b, c, d) [63–65], Cas14(a, b, c) [66], які мають унікальні властивості і здатні зробити редагування геному на основі CRISPR ефективнішим і безпечнішим. Ці зусилля привели до розроблення трьох нових методів редагування геному, в яких використовують такі інструменти, як транспозази/рекомбінази, редактори основ та прайм-редактори [67].

Транспозази — це ензими, здатні зв'язувати одноланцюгову ДНК і вбудовувати її в геномну ДНК. Рекомбінази — ензими, що беруть участь у процесах гомологічної рекомбінації — обміну генетичним матеріалом між двома молекулами ДНК, що мають гомологічні нуклеотидні послідовності та містять певні специфічні сайти. Відкриття у деяких організмів транспозаз, асоційованих з CRISPR, а також злиття транспозаз і рекомбіназ з протеїнами Cas та проведення їх штучної еволюції дозволило використовувати ці ензими для редагування геномів. Так, нещодавно група під керівництвом Фена Чжана відкрила нову тех-

ніку редагування генів, яка дозволяє вставляти гени в ДНК без її розрізання за допомогою CRISPR-асоційованої транспозази з ціанобактерій *Scytonema hofmanni* (ShCAST), що складається з Tn7-подібних субодиниць транспозази та ензиму Cas12k [68].

Дослідники з Гарвардського університету під керівництвом Девіда Лю (David R. Liu) запропонували новий метод редагування геному — редагування основ (base editing), що дозволяє змінювати нуклеотидну послідовність ДНК живих клітин шляхом хімічного перетворення однієї основи на іншу, не здійснюючи дволанцюгових розрізів ДНК, які через некооректну репарацію призводять до помилок редагування. В основі методу лежить поєднання системи CRISPR і злитих протеїнів, що складаються з Cas9-нікази (Cas9, що розрізає лише один ланцюг ДНК) і ензиму, який модифікує певну нуклеотидну основу. Використовують ензим цитидиндезаміназу, що забезпечує у 15–75% ДНК клітини пряме перетворення цитозину в урацил у складі відповідних нуклеозидів, здійснюючи тим самим заміщення цитозину на тимін (або гуаніну на аденін) [69], а також так звані редактори основи аденіну (ABE) — ензими, отримані внаслідок штучної еволюції на основі аденозиндезамінази tPHK, що забезпечують у 50% ДНК клітини зворотне перетворення тиміну на цитозин (або аденіну на гуанін) [70].

Аналогічний підхід можна використовувати і для редагування РНК. У 2019 р. неабияку зацікавленість (понад 400 наукових публікацій) викликав метод, розроблений ще у 2012 р. німецькими вченими Торстеном Стаффорстом (Thorsten Stafforst) і Маріусом Шнайдером (Marius F. Schneider) із Тюбінгенського університету [71], який тоді залишився без уваги, оскільки був затьмарений сенсаційним відкриттям CRISPR/Cas9. Цей метод дозволяє змінювати протеїни шляхом редагування РНК, що вирішує проблему ризиків, пов'язаних із внесенням постійних змін у ДНК людини та ймовірністю обтяження її помилками редагування. Зміни у мРНК вносять за допомогою аденозинових дезаміназ ADAR (adenosine

deaminases acting on RNA), які знаходяться в комплексі з РНК-гідами (adRNAs — ADAR guide RNAs) і здатні в утвореній дволанцюговій РНК змінювати аденозин на інозин, який при синтезі протеїну зчитується як гуанозин. Важливою перевагою використання людських ензимів ADAR порівняно з протеїном Cas9, що має бактеріальне походження, є відсутність небажаних реакцій з боку імунної системи. Зараз уже відомі інші засоби редагування РНК: цитидинові дезамінази APOBEC і певні ензими винограду змінюють у складі нуклеозидів цитозин на урацил, а деякі ензими пухлин можуть змінювати гуанін на аденін тощо. Незважаючи на обмеженість способів зміни послідовності РНК та проблеми з доставкою РНК до клітин, кілька стартап-компаній вже почали використовувати системи редагування РНК для розроблення засобів лікування раку, м'язової дистрофії та інших захворювань (не лише генетичних), а також для корекції різних патологічних станів, таких як гострий біль або високий рівень холестерину [72].

Згадана вище група вчених під керівництвом Девіда Лю створила новий універсальний метод редагування геному — праймуюче редагування (priming editing), яке також не потребує дволанцюгових розрізів ДНК, але дає змогу здійснювати будь-які перетворення, зокрема вставки та делеції фрагментів ДНК, з високою точністю (частота помилок 10%) і більшою ефективністю (20–50%) порівняно з класичною системою CRISPR/Cas9 (3–20%). В основі методу лежить поєднання CRISPR, злитого протеїну, що складається з Cas9-нікази та ензиму зворотної транскриптази, здатної на основі РНК будувати ДНК. Причому замість gPHK використовують регPHK, яка не лише спрямовує злитий протеїн до потрібного сайту в геномі, а й містить «праймер» — послідовність, необхідну для самостійної добудови ензимом ланцюга ДНК (в системі CRISPR/Cas9 ДНК добудовують ензими репарації, часто роблячи помилки). На прикладі серпоподібноклітинної анемії, хвороби Тея–Сакса (рання дитяча амавротична ідіотія) та пріонової інфекції було продемонстровано можливості

праймуючого редагування: дослідники внесли в геном клітин людини мутації, що зумовлюють ці захворювання, а потім їх виправили. Аналіз ними бази даних шкідливих мутацій людини, які спричиняють виникнення різних захворювань, показав, що за допомогою праймуючого редагування можна виправити 89% цих мутацій [73]. Цей метод викликав шалений інтерес не тільки в наукових колах, а його першовідкривач Девід Лю став співзасновником кількох компаній — Editas Medicine, Beam Therapeutics та Prime Medicine, що займаються розробленням терапевтичних засобів на основі праймуючого редагування.

Можливо, що мікроорганізми, які подарували нам CRISPR/Cas9, приховують ще багато маловивчених і зовсім невідомих молекулярних механізмів, які ми можемо використати у власних цілях, зокрема для редагування геномів. Так, нещодавно було з'ясовано біологічну функцію відкритих ще у 1980-х роках ретронів — природних елементів ДНК бактерій, що кодують зворотну транскриптазу, яка на основі РНК-шаблону синтезує багато копій одноланцюжкового продукту ДНК з утворенням комплексів ДНК–РНК–ензим. Виявилося, що ретрони, як і CRISPR, виконують функцію противірусного захисту бактерій і в разі інактивації бактеріофагами інших систем захисту активують протеїн, що пошкоджує клітинну мембрану інфікованої бактерії та призводить до її загибелі до того, як фаги встигнуть розмножитися і поширитися [74]. Оскільки ре-

трони здатні перетворювати будь-яку бажану РНК-послідовність на ДНК, навіть у клітинах дріжджів і ссавців, вчені зі Стенфордського університету на чолі з Хантером Фрейзером (Hunter Fraser), поєднавши ретрони і CRISPR/Cas9, розробили новий метод редагування геному — CRISPEY (від англ. Cas9 Retron precise Parallel Editing via homology — точне паралельне редагування Cas9 за допомогою гомології). Цей метод продемонстрував високу ефективність (92%), пропускну здатність та точність (4,6% помилок) і дозволив отримати десятки тисяч клонів дріжджів-мутантів, кожен з яких відрізнявся лише однією основою в нуклеїновій послідовності гена [75].

Ймовірно, що цьогорічна Нобелівська премія з хімії — не остання в галузі редагування геному, темпи розвитку якої просто вражають. Незважаючи на те, що наявні сьогодні системи редагування мають певні недоліки та обмеження, а способи їх доставки в клітини потребують вдосконалення, ясно, що в найближчому майбутньому технології редагування геномів досягнуть більшої ефективності та безпечності, а втручання в геном людини може стати буденною справою. Повірити в це змушує висловлювання Девіда Лю: «Якщо CRISPR схожий на ножиці, редактори основ нагадують олівець, то прайм-редактори — це текстовий процесор, придатний для точного пошуку та заміни. Всі інструменти редагування геному відіграватимуть власні ролі... Це лише початок, а не кінець» [76].

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Chemistry. Citation Laureates 2020. <https://clarivate.com/webofscienccegroup/citation-laureates/chemistry/>
2. Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>
3. Komisarenko S.V., Romanyuk S.I. Genome editing, or CRISPR/Cas9 — a panacea for many incurable diseases or the first step to a gene apocalypse? *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2020. (3): 50–77 (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.15407/visn2020.03.050>
[Комісаренко С.В., Романюк С.І. Редагування геному, або CRISPR/Cas9 — панацея від багатьох невиліковних хвороб чи перший крок до генного апокаліпсису? *Вісник НАН України.* 2020. (3): 50–77.]
4. Jennifer Doudna. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Jennifer_Doudna
5. Emmanuelle Charpentier. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Emmanuelle_Charpentier
6. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011. **471**(7340): 602–607. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09886>

7. Westra E.R., Semenova E., Datsenko K.A., Jackson R.N., Wiedenheft B., Severinov K., Brouns S.J. Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet.* 2013. **9**(9): e1003742. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003742>
8. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987. **169**(12): 5429–5433. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987>
9. Nakata A., Amemura M., Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* 1989. **171**(6): 3553–3556. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.171.6.3553-3556.1989>
10. Groenen P.M., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 1993. **10**(5): 1057–1065. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
11. Mojica F.J., Diez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 2000. **36**(1): 244–246. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
12. Jansen R., Embden J.D., Gastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002. **43**(6): 1565–1575. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
13. Mojica F.J., Diez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution.* 2005. **60**(2): 174–182. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
14. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005. **151**(3): 653–663. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
15. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005. **151**(8): 2551–2561. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
16. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007. **315**(5819): 1709–1712. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
17. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slikhuis R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008. **321**(5891): 960–964. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
18. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science.* 2008. **322**(5909): 1843–1845. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
19. Sontheimer E., Marraffini L. Target DNA interference with crRNA. U.S. Provisional Patent Application 61/009, 317, filed September 23, 2008; later published as US2010/0076057 (abandoned).
20. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012. **337**(6096): 816–821. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
21. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. **109**(39): E2579–E2586. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
22. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013. **339**(6121): 823–826. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.123203372>
23. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013. **339**(6121): 819–823. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
24. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 2013. **31**(3): 230–232. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
25. Brown K.V. Why CRISPR-edited food may be in supermarkets sooner than you think. <https://gizmodo.com/why-crispr-edited-food-may-be-in-supermarkets-sooner-th-1822025033>
26. Lee J., Wang F. Gene-edited baby by Chinese scientist: the opener of the Pandora's box. *Science Insights.* 2018. **2018**(13): e000178. DOI: <https://doi.org/10.15354/si.18.co015>
27. Reardon S. CRISPR gene-editing creates wave of exotic model organisms. *Nature.* 2019. **568**(7753): 441–442. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01300-9>

28. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013. **152**(5): 1173–1183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
29. Kungulovski G., Jeltsch A. Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet.* 2016. **32**(2): 101–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.12.001>
30. Pefanis E., Wang J.G., Rothschild G., Lim J., Kazadi D., Sun J.B., Federation A., Chao J., Elliott O., Liu Z.P., Economides A.N., Bradner J.E., Rabadan R., Basu U. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell*. 2015. **161**(4): 774–789. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.034>
31. Elling R., Chan J., Fitzgerald K.A. Emerging role of long noncoding RNAs as regulators of innate immune cell development and inflammatory gene expression. *Eur. J. Immunol.* 2016. **46**(3): 504–512. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201444558>
32. Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., Huang B. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. 2013. **155**(7): 1479–1491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
33. Hajian R., Balderston S., Tran T., deBoer T., Etienne J., Sandhu M., Wauford N.A., Chung J.Y., Nokes J., Athaiya M., Paredes J., Peytavi R., Goldsmith B., Murthy N., Conboy I.M., Aran K. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat. Biomed. Eng.* 2019. **3**(6): 427–437. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0371-x>
34. CRISPR's future for point-of-care diagnostics. <https://www.diagnosticsworldnews.com/news/2020/02/18/crispr-%27s-future-for-point-of-care-diagnostics>
35. Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A.P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014. **156**(4): 836–843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
36. Baltimore D., Berg P., Botchan M., Carroll D., Charo R.A., Church G., Corn J.E., Daley G.Q., Doudna J.A., Fenner M., Greely H.T., Jinek M., Martin G.S., Penhoet E., Puck J., Sternberg S.H., Weissman J.S., Yamamoto K.R. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015. **348**(6230): 36–38. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aab1028>
37. Collins F.S. NIH Director on Human Gene Editing: 'We Must Never Allow our Technology to Eclipse our Humanity'. <https://www.discovermagazine.com/health/nih-director-on-human-gene-editing-we-must-never-allow-our-technology-to>
38. Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015. **6**(5): 363–372. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
39. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013. **154**(6): 1380–1389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
40. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., Koski A., Ji D., Hayama T., Ahmed R., Darby H., Van Dyken C., Li Y., Kang E., Park A.R., Kim D., Kim S.T., Gong J., Gu Y., Xu X., Battaglia D., Krieg S.A., Lee D.M., Wu D.H., Wolf D.P., Heitner S.B., Belmonte J.C.I., Amato P., Kim J.S., Kaul S., Mitalipov S. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017. **548**(7668): 413–419. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature23305>
41. Second woman carrying gene-edited baby, Chinese authorities confirm. <https://www.theguardian.com/science/2019/jan/22/second-woman-carrying-gene-edited-baby-chinese-authorities-confirm>
42. CRISPR scientist gets three years of jail time for creating gene-edited babies. <https://gizmodo.com/crispr-scientist-gets-three-years-of-jail-time-for-crea-1840724277>
43. Act now on CRISPR babies. *Nature*. 2019. **570**(137). DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01786-3>
44. Citorik R.J., Mimee M., Lu T.K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2014. **32**(11): 1141–1145. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>
45. Yosef I., Manor M., Kiro R., Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. **112**(23): 7267–7272. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>
46. Stokstad E. Genetically engineered moths can knock down crop pests, but will they take off? <https://www.sciencemag.org/news/2020/01/genetically-engineered-moths-can-knock-down-crop-pests-will-they-take> DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb1078>

47. Niu D., Wei H.J., Lin L., George H., Wang T., Lee I.H., Zhao H.Y., Wang Y., Kan Y., Shrock E., Leshia E., Wang G., Luo Y., Qing Y., Jiao D., Zhao H., Zhou X., Wang S., Wei H., Güell M., Church G.M., Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017. **357**(6357): 1303–1307. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aan4187>
48. Gene editing spurs hope for transplanting pig organs into humans. <https://www.nytimes.com/2017/08/10/health/gene-editing-pigs-organ-transplants.html>
49. Dash P.K., Kaminski R., Bella R., Su H., Mathews S., Ahooyi T.M., Chen C., Mancuso P., Sariyer R., Ferrante P., Donadoni M., Robinson J.A., Sillman B., Lin Z., Hilaire J.R., Banoub M., Elango M., Gautam N., Mosley R.L., Poluektova L.Y., McMillan J., Bade A.N., Gorantla S., Sariyer I.K., Burdo T.H., Young W.B., Amini S., Gordon J., Jacobson J.M., Edagwa B., Khalili K., Gendelman H.E. Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected humanized mice. *Nat. Commun.* 2019. **10**(1): 2753. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10366-y>
50. Yuan M., Webb E., Lemoine N.R., Wang Y. CRISPR-Cas9 as a powerful tool for efficient creation of oncolytic viruses. *Viruses*. 2016. **8**(3): E72. DOI: <https://doi.org/10.3390/v8030072>
51. Miller J.F., Sadelain M. The journey from discoveries in fundamental immunology to cancer immunotherapy. *Cancer Cell*. 2015. **27**(4): 439–449. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.007>
52. White M.K., Khalili K. CRISPR/Cas9 and cancer targets: future possibilities and present challenges. *Oncotarget*. 2016. **7**(11): 12305–12317. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7104>
53. DeWitt M.A., Magis W., Bray N.L., Wang T., Berman J.R., Urbinati F., Heo S.J., Mitros T., Muñoz D.P., Boffelli D., Kohn D.B., Walters M.C., Carroll D., Martin D.I., Corn J.E. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci. Transl. Med.* 2016. **8**(360): 360ra134. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336>
54. Sanders R. UC rings out 2019 with its 20th CRISPR patent. <https://news.berkeley.edu/2019/12/31/uc-rings-out-2019-with-its-20th-crispr-patent/>
55. Haridy R. First CRISPR therapy administered in landmark human trial. <https://newatlas.com/crispr-trial-under-way-vertex-gene-therapy/58643/>
56. The Future of CRISPR. <http://www.fwreports.com/dossier/the-future-of-crispr/#.XmgL-kFR2Uk>
57. Mullin E. Fresh off her Nobel Prize win, Jennifer Doudna predicts what's next for CRISPR. <https://futurehuman.medium.com/fresh-off-her-nobel-prize-win-jennifer-doudna-predicts-whats-next-for-crispr-1fea0225c41d>
58. Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*. 2013. **341**(6148): 833–836. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.341.6148.833>
59. Gene editing like CRISPR is too important to be left to scientists alone. <https://www.theguardian.com/commentis-free/2019/oct/22/gene-editing-crispr-scientists>
60. Chatterjee P., Jakimo N., Jacobson J.M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. *Sci. Adv.* 2018. **4**(10): eaau0766. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau0766>
61. Burstein D., Harrington L.B., Strutt S.C., Probst A.J., Anantharaman K., Thomas B.C., Doudna J.A., Banfield J.F. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*. 2017. **542**(7640): 237–241. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature21059>
62. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015. **163**(3): 759–771. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
63. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*. 2016. **353**(6299): aaf5573. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
64. Smargon A.A., Cox D.B., Pyzocha N.K., Zheng K., Slaymaker I.M., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.A., Essletzbichler P., Shmakov S., Makarova K.S., Koonin E.V., Zhang F. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol. Cell*. 2017. **65**(4): 618–630.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.023>
65. Yan W.X., Chong S., Zhang H., Makarova K.S., Koonin E.V., Cheng D.R., Scott D.A. Cas13d is a compact RNAtargeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol. Cell*. 2018. **70**(2): 327–339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.028>
66. Harrington L.B., Burstein D., Chen J.S., Paez-Espino D., Ma E., Witte I.P., Cofsky J.C., Kyrpides N.C., Banfield J.F., Doudna J.A. Programmed DNA Destruction by Miniature CRISPR-Cas14 Enzymes. *Science*. 2018. **362**(6416): 839–842. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aav4294>

67. Anzalone A.V., Koblan L.W., Liu D.R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.* 2020. **38**(7): 824–844. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>
68. Strecker J., Ladha A., Gardner Z., Schmid-Burgk J.L., Makarova K.S., Koonin E.V., Zhang F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science*. 2019. **365**(6448): 48–53. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aax9181>
69. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016. **533**(7603): 420–424. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature17946>
70. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017. **551**(7681): 464–471. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature24644>
71. Stafforst T., Schneider M.F. An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. **51**(44): 11166–11169. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201206489>
72. Reardon S. Step aside CRISPR, RNA editing is taking off. *Nature*. 2020. **578**(7793): 24–27. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00272-5>
73. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019. **576**(7785): 149–157. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
74. Pennis E. Microbes' mystery DNA helps defeat viruses – and has genome-editing potential. <https://www.sciencemag.org/news/2020/11/microbes-mystery-dna-helps-defeat-viruses-and-has-genome-editing-potential>
75. Sharon E., Chen S.A., Khosla N.M., Smith J.D., Pritchard J.K., Fraser H.B. Functional genetic variants revealed by massively parallel precise genome editing. *Cell*. 2018. **175**(2): 544–557.e16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.057>
76. Fan S. Everything You Need to Know About Superstar CRISPR Prime Editing. <https://singularityhub.com/2019/11/05/everything-you-need-to-know-about-superstar-crispr-prime-editing/>

Serhiy V. Komisarenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3244-3194>

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Svitlana I. Romaniuk

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3900-6755>

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

PROSPECTS FOR GENE EDITING USING CRISPR/CAS,
OR HOW TO MASTER THE “GENETIC SCISSORS”

Nobel Prize in Chemistry for 2020

The Nobel Prize in Chemistry in 2020 was awarded to two researchers in the field of molecular biology: French Emmanuelle Charpentier, who currently heads the Max Planck Unit for the Science of Pathogens (Berlin, Germany), and American Jennifer Doudna of the University of California (Berkeley, CA, USA) “for the development of a method for genome editing.” The press release of the Nobel Committee states that the winners have discovered one of the most powerful tools of genetic technology, CRISPR/Cas9, or so-called “genetic scissors.” This method has helped to obtain many important results in basic research. In particular, plant researchers have been able to create crops that are resistant to mold, pests and drought. In medicine, clinical trials of new methods of cancer treatment are underway, and the dream of curing hereditary diseases is about to become a reality. “Genetic scissors” have brought the life sciences to a new stage of development and are of great benefit to mankind.

Keywords: Nobel Prize in Chemistry, Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna, genome editing, CRISPR/Cas9.