

## ОБЗОРЫ

**ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 ДЛЯ СОЗДАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА**

*К.Р. Валетдинова*

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия  
ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия  
ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия*

**Application of CRISPR/Cas9 system for developing and studying cellular models of inherited disease**

*K.R. Valetdinova*

*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
State Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia*

В настоящее время более 4500 заболеваний классифицируются как наследственные. Большинство форм наследственных заболеваний человека обусловлены генными мутациями. Благодаря развитию новых способов манипуляции с геномами, в частности с использованием системы CRISPR/Cas9, появилась возможность искусственно вводить ту или иную мутацию в геном исследуемого объекта, а также исправлять генные мутации. Тем самым можно создавать клеточные модели наследственных болезней человека, а также проводить эксперименты по проверке гипотез и принципов генной и клеточной терапии. В обзоре рассмотрены наиболее интересные примеры исследований, которые дают представление о возможностях и перспективах применения системы CRISPR/Cas9 для создания и исследования клеточных моделей наследственных заболеваний человека.

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, наследственные заболевания, клеточная модель, плюрипотентные стволовые клетки.

**Введение**

Изучение многих наследственных заболеваний человека затруднено не только по причине значительного разнообразия патологических изменений на уровне молекулы ДНК, но и в силу невозможности экспериментальных исследований с вовлечением человека. Многочисленные экспериментальные модели на животных не воспроизводят в должной мере все генетические и фенотипические особенности, характерные для наследственных болезней человека. Поэтому в настоящее время активно развивается направление, связанное с созданием моделей *in vitro*. Значительный прогресс данного направления связан с появлением системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

С помощью данной технологии мутации, являющиеся причиной развития наследственных заболеваний, могут быть внесены в геном плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека [1, 2]. ПСК практически неограниченное время сохраняют свои свойства в культуре и дают в результате дифференцировки необходимые клеточные производные. Дифференцированные производные ПСК человека,

Currently, more than 4500 diseases classified as an inherited diseases. Most forms of human inherited diseases are caused by gene mutations. Given to the development of new methods genome editing, particularly with the use of CRISPR/Cas9 system, it is possible to artificially introduce precise mutations in the genome, as well as to correct gene mutations. It is thus possible to create a cellular model of human inherited diseases, as well as to carry out experiments for testing hypotheses and principles of gene and cell therapy. In this review, we consider studies that provide insight into the possibilities of CRISPR/Cas9 system for developing and studying cellular models of human inherited diseases.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, inherited diseases, cellular model, pluripotent stem cells.

представляют собой универсальную модельную систему для выявления и глубокого анализа механизмов патогенеза заболеваний, а также для скрининга лекарственных препаратов и разработки тактики терапии наследственных болезней [3–5]. Важным преимуществом данного подхода является получение изогенных клеточных моделей. Благодаря этому, в результате исследований не вносит вклад всё разнообразие генетического полиморфизма, существующего в человеческой популяции.

С помощью системы CRISPR/Cas9 можно редактировать геном плюрипотентных клеток пациента с наследственным заболеванием таким образом, чтобы исправить имеющуюся мутацию. Подобная коррекция мутаций, проводимая в экспериментах *in vitro*, служит основой для разработки новых способов терапии наследственных заболеваний.

**Система CRISPR/Cas9**

Система CRISPR/Cas является одним из механизмов защиты бактерий и архей от внедрения чужеродного генетического материала, в первую очередь от бактериофагов [6]. Существует около

e-mail: valetdinova@bionet.nsc.ru

11 различных CRISPR/Cas систем, которые делят на три типа (I–III) [7]. CRISPR/Cas система II типа *Streptococcus pyogenes* является наиболее изученной и широко используемой в геномной инженерии в силу ряда причин, важнейшая из которых — небольшое количество компонентов, необходимое для ее работы. Для внесения двухцепочечного разрыва в молекулу ДНК достаточно активности единственного белка Cas9 и присутствия комплекса из двух РНК — crRNA и tracrRNA [8].

#### *Геномная инженерия с помощью CRISPR/Cas9*

В 2012 г. группа исследователей под руководством Э. Шарпентье и Д. Дудна показала возможность использования естественной системы CRISPR/Cas9 II типа *Streptococcus pyogenes* и ее модифицированных компонентов *in vitro* [8], а в 2013 г. группа ученых под руководством Ф. Занга адаптировала данную систему для редактирования геномов клеток млекопитающих [9]. Вместо двух некодирующих РНК используется единственная sgRNA, в которой зрелая crRNA соединена с частью tracrRNA с помощью синтетической структуры «петля—стебель» для имитации естественного дуплекса crRNA-tracrRNA. В структуру sgRNA входит спейсер длиной 20 нуклеотидов, полностью комплементарный последовательности ДНК протоспейсера в геноме мишени. Нуклеаза Cas9 связывается с sgRNA и вносит двухцепочечный разрыв между 3 и 4 нуклеотидами от 3'-конца протоспейсера, к которому примыкает последовательность PAM 5'-NGG-3' [10]. Векторы-основы для создания генетических конструкций, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9, доступны на ресурсе Addgene. Таким образом, для внесения двухцепочечного разрыва в любой интересующий исследователя участок молекулы ДНК требуется лишь синтезировать и клонировать новый спейсер, что делает всю процедуру сборки максимально быстрой, простой и эффективной.

Двунитевые разрывы, которые вносит система CRISPR/Cas9, репарируются в клетке по одному из двух возможных механизмов:

— негомологичное соединение концов, при котором возникают ошибки, что приводит в результате к появлению в целевом локусе небольших инсерций и (или) делеций;

— гомологичная рекомбинация, при которой неповрежденный гомолог служит матрицей для восстановления исходной структуры ДНК; это событие происходит в клетке довольно редко, но использование CRISPR/Cas9 позволяет повысить вероятность прохождения гомологичной рекомбинации на несколько порядков [9]. Если добавить к компонентам CRISPR/Cas9 искусственно синтезированную молекулу ДНК, имеющую гомологию с последовательностью нуклеотидов в месте разрыва, то она может служить матрицей для другого способа репарации — HDR (homology-directed repair), при котором небольшой фрагмент искусственной матрицы встраивается в целевой локус. С помощью HDR в целевой локус можно поместить сайт рестрикции, маркерную метку или же нуклеотиды для исправления «неправильных» ДНК. Однако HDR активно происходит только в делящихся клетках, и ее эффективность очень сильно зависит от типа клетки, стадии жизнедеятельности, а также целевого локуса генома и самой матрицы [11].

#### *PAM*

PAM — трехбуквенный мотив, который находится непосредственно перед протоспейсером. Он является специфичным для конкретного вида бактерии, в частности у *Streptococcus pyogenes* это трехбуквенный мотив NGG, с гораздо меньшей эффективностью используется мотив NAG [12]. Взаимодействие данного участка с комплексом sgRNA-ДНК мишень-Cas9 является необходимым событием для образования двунитевого разрыва [13].

#### *Нецелевая активность*

Нецелевая активность CRISPR/Cas9 обусловлена тем, что данная система способна вносить двунитевые разрывы в ДНК мишень, не полностью комплементарную sgRNA. То есть при наличии 1–4 мисматчей, особенно в 5'-области протоспейсера, данная нуклеотидная последовательность будет являться потенциальным нецелевым сайтом [14]. Однако первые 8–12 нуклеотидов 3'-конца, находящиеся сразу после PAM, являются важным участком протоспейсера — «seed» последовательностью. Замены в данном районе делают ДНК мишень практически недоступной для системы CRISPR/Cas9 [9]. Для выбора мишеней для системы CRISPR/Cas9 разработаны ресурсы, которые позволяют подобрать оптимальную последовательность sgRNA с минимальным нецелевым эффектом [15]. Кроме того, существуют многочисленные ресурсы для поиска потенциальных нецелевых сайтов в геноме [11]. Пользуясь данными биоинформатическими приложениями, можно определить наиболее вероятные нецелевые сайты и проанализировать активность CRISPR/Cas9 в них с помощью высокопроизводительного секвенирования [16], либо другими доступными методами [17]. Таким образом, специфичность работы CRISPR/Cas9 определяется, в первую очередь, выбором оптимального целевого сайта, а уже затем другими факторами, такими как особенности связывания ДНК мишени, эпигенетический статус мишени и др. [18].

#### *Методы доставки*

Методы доставки векторов, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9, в культивируемые клетки человека довольно разнообразны. Наиболее распространенными и эффективными являются такие способы, как нуклеофекция [14], электропорация [19], липофекция [9], доставка, опосредованная вирусами [20]. Однако, учитывая перспективы применения данной системы для терапии наследственных заболеваний, необходимо разработать методы эффективной адресной доставки *in vivo*. Для этой цели больше подходят неинтегрирующиеся в геном вектора, в частности вектора, основанные на аденовирусах, аденоассоциированных вирусах и некоторых лентивирусах. В экспериментах на животных для доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в форме РНК либо ДНК используется микроинъекция в эмбрионы на ранних стадиях развития [21].

#### *Оптимизация системы CRISPR/Cas9*

Для повышения специфичности работы и снижения нецелевой активности CRISPR/Cas9 в настоящее время предложены следующие варианты оптимизации данной системы.

1. Использование Cas9 никаз. Известно, что двунилевой разрыв образуется за счет взаимодействия двух нуклеазных доменов Cas9 – RuvC и HNH, каждый из которых вносит разрыв только в одну из цепей ДНК [22]. Некоторые мутации позволяют инактивировать каталитическую активность RuvC или HNH домена, в таком варианте Cas9 может вносить только однонилевой разрыв [8]. Для образования двунилевого разрыва необходима пара CRISPR/Cas9 никаз. При этом вероятность нецелевых эффектов снижается до минимально возможных значений [23]. Подобная стратегия аналогична использованию искусственных нуклеаз ZFN (Zn-finger nuclease) и TALEN (Transcription activator-like effector nucleases), которые функционируют в качестве гетеродимеров, то есть вносят двунилевой разрыв в молекулу ДНК только в паре. Альтернативным вариантом является полная инактивация нуклеазной активности Cas9 – dCas9 («dead» Cas9). При этом двунилевой разрыв образуются в результате димеризации нуклеазных доменов *FokI*, объединенных с парой dCas9 [24].

2. Изменение длины sgRNA и регуляция экспрессии Cas9. Показано, что использование укороченных на два-три нуклеотида с 5'-конца sgRNA позволят снизить нецелевую активность Cas9, но не оказывает влияния на эффективность разрезания ДНК мишени [25]. Кроме того, на специфичность работы системы влияет и концентрация самого белка Cas9. Высокие концентрации повышают вероятность нецелевых эффектов [26], низкие – уменьшают, однако при этом уменьшается эффективность разрезания ДНК мишени [27]. Продолжительность экспрессии Cas9, по всей вероятности, также является важным фактором возникновения нецелевой активности [28].

3. Использование искусственных систем редактирования генома, основанных на естественных CRISPR/Cas системах других бактерий, отличающихся последовательностью PAM, длиной sgRNA и другими характеристиками от CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes* [29, 30]. Относительно недавно была открыта новая система CRISPR/Cpf1 [31]. Отличительной особенностью данной системы является то, что образовавшиеся в результате ее работы двунилевые разрывы имеют «липкие» концы. Благодаря этому облегчается задача редактирования генома с помощью репарации по механизму негомологичного соединения концов, что особенно актуально для геномной инженерии терминально дифференцированных видов клеток.

#### *Преимущества перед другими системами редактирования генома*

Система CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ перед другими технологиями редактирования генома, такими как ZFN и TALEN. Важнейшим из них является то, что за узнавание целевой нуклеотидной последовательности в ней отвечает небольшой участок молекулы РНК – sgRNA, комплементарный двадцати нуклеотидам ДНК мишени. В то время как искусственные нуклеазы ZFN и TALEN используют белковые домены, каждый из которых узнает соответствующий нуклеотид [11]. Поэтому время и трудозатраты на создание системы CRISPR/Cas9, необходимой для решения конкретной исследовательской задачи, значительно меньше, чем у ее конкурентов. Кроме того, эффективность редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9, как правило,

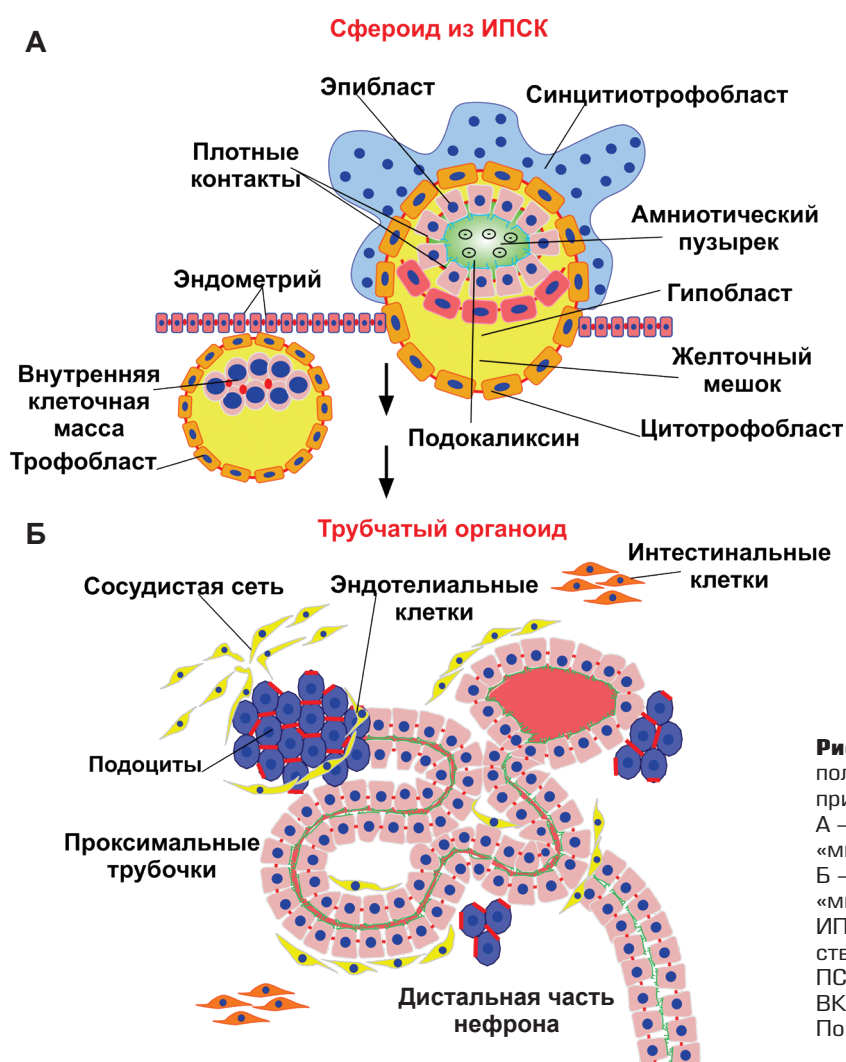
значительно выше, чем при использовании ZFN и TALEN. Во многом это обусловлено тем, что ZFN и TALEN функционируют в качестве гетеродимеров, то есть вносят двунилевой разрыв в молекулу ДНК только в паре, а CRISPR/Cas9 функционирует как нуклеаза, разрезая сразу обе цепи ДНК мишени. В ряде работ была показана высокая нецелевая активность системы CRISPR/Cas9 [27], однако последние модификации данной технологии позволяют свести нецелевые эффекты к минимуму при использовании как *in vitro* [18, 32], так и *in vivo* [33, 34].

#### **Использование системы CRISPR/Cas9 для создания клеточных моделей наследственных заболеваний человека**

С помощью CRISPR/Cas9 можно получить клеточные модельные системы различных наследственных заболеваний человека. Данный подход особенно актуален для заболеваний, которые редко встречаются в человеческой популяции [2]. Получение пациент-специфичных моделей в данном случае затруднено. Дальнейшее развитие технологии CRISPR/Cas9 делает ее использование все более предпочтительным для создания клеточных моделей распространенных наследственных болезней [1].

#### *Использование системы CRISPR/Cas9 для создания клеточной модели поликистозной болезни почек*

Поликистозная болезнь почек является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний человека. Генетической причиной аутосомно-рецессивной формы данного заболевания являются мутации в гене *PKHD1*, аутосомно-доминантной – мутации в генах *PKD1* и *PKD2*. Б.С. Фридман с соавт. (2015) нокаутировали гены *PKD1* и *PKD2* в ПСК человека с помощью системы CRISPR/Cas9 [1]. Фенотипические изменения в клетках с мутациями были показаны с использованием технологии 3D-культивирования. Эпителиальные структуры почки, получаемые при 3D культивировании показаны на рис. 1. Образование просвета «мини-органоида» (А) происходит в несколько этапов. Сначала необходимость поляризованных плотных контактов между ПСК на стадии ВКМ приводит к случайному образованию агрегатов. Затем на стадии эпибласта ПСК, поляризованные непрерывными плотными контактами, организуются в одноклеточный эпителий. Накопление подокаликсина на апикальной мембране приводит к накоплению отрицательного заряда, который запускает перераспределение клеток с образованием внутреннего просвета. Плотные контакты обеспечивают прохождение небольших молекул, но не пропускают макромолекулы (показаны красным), которые накапливаются в межклеточном пространстве. Проксимальный каналец «мини-органоида» почки (Б) образован простым цилиндрическим эпителием, который связывает лектин *Lotus tetragonolobus* (показан зеленым) – белок, являющийся характерным маркером проксимальных каналцев почки, на своей апикальной поверхности. Окружающие подоцитоподобные клетки экспрессируют высокий уровень подокаликсина и формируют менее организованную структуру на конце каналца. Эндотелиальные клетки тесно взаимодействуют как с проксимальным каналцем, так и со структурами, образованными подоцитами.



**Рис. 1.** Модели эпителиальных структур почки, получаемых из ПСК человека при 3D культивировании: А – модель образования просвета «мини-органоида» из ПСК; Б – строение проксимального канальца «мини-органоида» почки. ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ВКМ – внутренняя клеточная масса. По [1] с изм.

С помощью данной технологии сфероиды из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) направленно дифференцировали в «мини-органойды» почки, причем дифференцировку ИПСК с нокаутными генами проводили одновременно «side-by-side» с изогенным контролем. В результате было показано, что в культурах с нокаутом *PKD1* и *PKD2*, наряду с трубчатыми органоидами, формируются крупные, полупрозрачные, кистоподобные структуры. Последние были прикреплены к подлежащему матриксу, но свободно перемещались в ответ на вибрацию. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что эпителий, выстилающий кисту, окружает внутренние отсеки, лишенные клеток. Таким образом, с помощью системы CRISPR/Cas9 была получена клеточная модель поликистозной болезни почек. Кроме того, в данной работе авторы нокаутировали ген *PODXL*, который активно экспрессируется и в эпибласте, и в подоцитах. В результате было показано, что экспрессия *PODXL* не является обязательной для поддержания плюрипотентного состояния клеток, но необходима для формирования внутренних полостей сфероиды из эпибласта, а также для формирования правильных контактов между подоцитоподобными клетками. Описанные методы могут использоваться для получения клеточных структур разнообразных тканей с различным генетическим фоном и исследования молекулярных изменений, происходящих при развитии патологии. В долгосрочной перспективе, данная

система может послужить основой для воссоздания целого органа.

#### Использование системы CRISPR/Cas9 для создания клеточной модели расстройств аутистического спектра

К генетическим факторам риска развития расстройств аутистического спектра (РАС) относятся мутации в более чем тысяче генов [35]. Одним из генов-кандидатов является ген *CHD8*, который кодирует АТФ-зависимый фактор ремоделинга хроматина. Ранее было показано, что нокаут *CHD8* приводит к изменению транскрипции генов, являющихся факторами риска для РАС, к потенциальным нарушениям генных сетей, участвующих в развитии нервной системы [36, 37]. Основываясь на этих данных, П. Вонг с соавт. (2015) использовали систему CRISPR/Cas9 для нокаута одной из двух копий гена *CHD8* в ИПСК, полученных от здорового донора [2]. Такая гетерозигота лучше воспроизводит ситуацию, наблюдаемую у пациентов с РАС, а также позволяет изучать долгосрочные эффекты нокаута *CHD8* при нейральной дифференцировке *in vitro*. В результате исследования транскрипционных профилей нейральных производных ИПСК с редактированным геномом было показано нарушение экспрессии многих генов. В том числе генов, ответственных за формирование внеклеточного матрикса, нейральную дифференцировку и развитие мышечной системы. Показано

изменение транскрипции таких генов, как *HMG2* и *FAT3*, связанных с определением размера головы и объема головного мозга. Таким образом, была установлена возможная взаимосвязь между мутациями в гене *CHD8* и развитием макроцефалии. Также было показано, что *CHD8* участвует в регуляции экспрессии не только генов, ассоциированных с развитием РАС, но и генов, ассоциированных с шизофренией и другими нейropsychическими расстройствами. Это такие гены, как *TCF4*, *NRXN1*, *EHMT1*, *SATB2*. Таким образом, данные, полученные в этой работе, вместе с данными аналогичных исследований нейральных производных ИПСК, полученных от разных пациентов с мутациями *CHD8*, позволяют расширить наши представления о причинах и молекулярных механизмах развития РАС и других нейropsychических заболеваний.

### **Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций, являющихся причинами развития наследственных заболеваний**

В зависимости от типа и локализации мутации в геноме, возможны различные варианты коррекции (табл.).

1. Метод «knockin». Наиболее перспективным способом является интеграция полноценной копии поврежденного участка гена в «safe harbor» локусы, например, локус *AAVS1*. При этом транскрипция встройки не нарушает нормальный гомеостаз. Подобная коррекция ранее была показана с использованием технологии ZFN [38, 39]. В некоторых случаях, напротив, необходимо достичь транскрипционного «молчания» гена. Так, для инактивации одной из копий 21 хромосомы при синдроме Дауна возможна интеграция гена *XIST* в локус *DYRC1A* [12].

2. Создание хромосомных перестроек, таких как крупные делеции, дупликации, инверсии при внесении одновременно нескольких двунитевых разрывов ДНК [40, 41].

3. Восстановление рамки считывания при внесении небольших инсерций или делеций, которые

образуются после репарации двунитевых разрывов по механизму негомологичного соединения концов, либо с помощью репарации, опосредованной микрогомологией [18]. При этом в некоторых случаях данный метод срабатывает за счет пропуска транскрипции поврежденного экзона.

4. Использование донорных конструкций, содержащих селекционную кассету, с последующим вырезанием трансгенов с помощью *riggy*-Cas транспозазы [42].

5. Использование олигонуклеотидов в качестве донорных молекул для гомологичной рекомбинации. Низкая частота гомологичной рекомбинации при данном способе коррекции может быть повышена с помощью модификаций концов олигонуклеотидов, добавления ингибиторов репарации двунитевых разрывов по механизму негомологичного соединения концов, использования Cas9 *nickase* [11].

### *Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции мутации, вызывающей синдром ломкой X-хромосомы*

Синдром ломкой X-хромосомы является одной из наиболее частых причин наследственной умственной отсталости и расстройств аутистического спектра, встречается среди людей с частотой 1:3600, и обусловлен подавлением транскрипции гена *FMR1*, расположенном на X-хромосоме [43, 44]. Транскрипционное «молчание» гена *FMR1* вызвано экспансией тринуклеотидных повторов CGG, локализованных в 5'-нетранслируемой области (НТО) этого гена, и гиперметилированием этого локуса [45, 46]. В норме количество повторов CGG не превышает 54–60, когда же оно повышается до 60–200 – это состояние предмутации. Наличие более 200 копий повторов – полная мутация [47]. Подавление транскрипции *FMR1*, вызванное гиперметилированием промотора, также было обнаружено в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) [48], ИПСК [45] и дифференцированных производных этих клеток – нейронах, полученных от больных синдромом ломкой X-хромосомы. Кроме того, было показано, что деметилирующий агент

**Таблица.** Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций, вызывающих различные наследственные заболевания

<b>Заболевание</b>	<b>Ген</b>	<b>Способ коррекции</b>	<b>Ссылка</b>
Синдром ломкой X-хромосомы	FMR1	Внесение делеций	[50]
Муковисцидоз	CFTR	Гомологичная рекомбинация	[42, 54]
Комбинированный иммунодефицит	JAK3	Гомологичная рекомбинация	[32]
Миодистрофия Дюшенна	DMD	Внесение делеций, гомологичная рекомбинация	[18, 40]
Поясноконечностная мышечная дистрофия (дисферлинопатия, саркогликанопатия)	DYSF, SGCA	Гомологичная рекомбинация	[74]
Анемия Фанкони	FANCC	Гомологичная рекомбинация	[75]
Гемофилия А	F8	Обратная инверсия	[41]
Гемоглобинопатии	HBB	Гомологичная рекомбинация	[60, 64–67]
Хронический гранулематоз	CYBB	Гомологичная рекомбинация	[76]
Наследственные формы глухоты	MYO15A	Гомологичная рекомбинация	[17]
X-сцепленная пигментная дистрофия сетчатки	RPGR	Гомологичная рекомбинация	[77]

5-азоцитидин способен индуцировать реактивацию экспрессии *FMR1* за счет частичного деметилирования промотора данного гена [49].

Активация транскрипции *FMR1* при удалении части повторов CGG с помощью системы CRISPR/Cas9 была показана в работе С. Пак с соавт. (2015) [50] (рис. 2). В качестве мишени для системы CRISPR/Cas9 был выбран участок гена *FMR1*, находящийся непосредственно перед областью тринуклеотидных повторов CGG, то есть 5'-фланкирующий район. В результате были отобраны клоны ЭСК и ИПСК здорового контроля (исходное количество триплетов CGG 8-9), у которых был делетирован район тринуклеотидных повторов (делеция размером 90 пн), и клоны ЭСК и ИПСК (исходное количество триплетов CGG 450 и 200, соответственно), у которых также образовалась делеция данного района. В отредактированных клогах ИПСК и нейральных производных этих клеток наблюдалось деметилирование CpG островков промоторной области гена, а также преобразование закрытой структуры хроматина в открытую. Активация экспрессии гена *FMR1* показана как на уровне РНК, так и на уровне белка. Таким образом, при удалении тринуклеотидных повторов CGG в 5'-НТО гена *FMR1* с помощью системы CRISPR/Cas9 область промотора подвергается деметилированию, приобретает метки активного хроматина, тем самым обеспечивая активацию транскрипции *FMR1*.

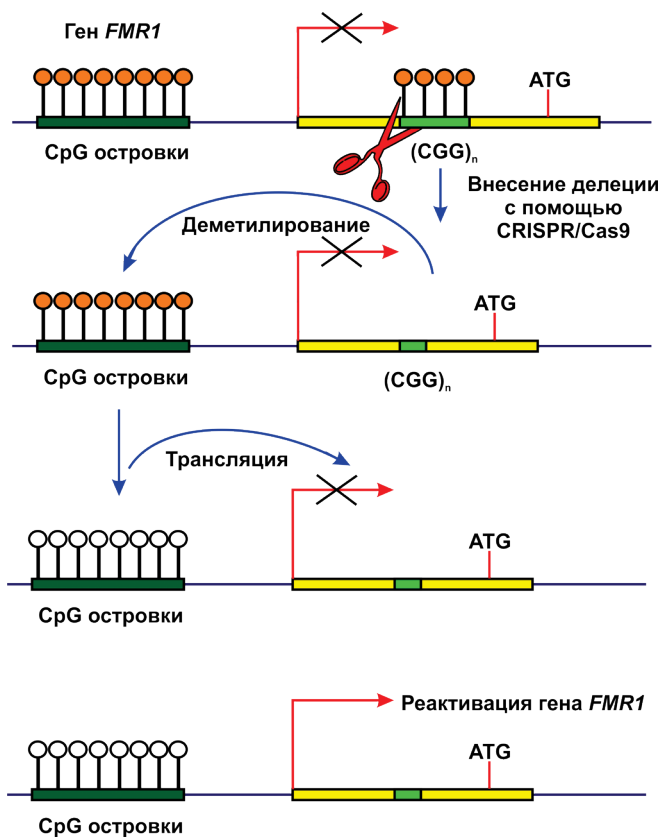
Поскольку синдром ломкой X-хромосомы является далеко не единственным заболеванием, вызванным экспансией тринуклеотидных повторов, при котором наблюдается снижение экспрессии поврежденного гена, то велика вероятность обнаружения

аналогичного эффекта при редактировании геномов больных такими болезнями, как, например, атаксия Фридрейха.

*Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций, вызывающих муковисцидоз*

Одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний человека является муковисцидоз или кистозный фиброз легких. Генетической причиной муковисцидоза являются различные мутации в гене *CFTR*, продукт которого является трансмембранным белком, располагающимся на поверхности большинства эпителиальных клеток и функционирующим как цАМФ-зависимый хлорный канал [51–53]. От пациентов, имеющих одну из самых распространенных мутаций – гомозиготную делецию F5008 в гене *CFTR*, были получены ИПСК [42]. С помощью системы CRISPR/Cas9 и донорной плазмиды, имеющей нормальную последовательность гена *CFTR* и селективный маркер, данная мутация была исправлена, а из ИПСК с исправленным генотипом были получены зрелые эпителиальные клетки дыхательных путей, демонстрирующие нормальную экспрессию и функционирование *CFTR*. Селекционная кассета при встройке в геном обеспечивала устойчивость к пуromицину, что позволило эффективно отбирать клоны, в которых произошла рекомбинация, а наличие сайтов распознавания для *riggyVas*-транспозазы способствовало полному вырезанию кассеты при запуске экспрессии данного фермента. Дополнительный раунд клональной селекции с использованием ганцикловира, к которому были восприимчивы клоны, экспрессирующие тимидинкиназу (ТК), обеспечил избавление от клеток, в которых не произошла транспозиция. Полное вырезание кассеты GFP-Puro-TK и отсутствие случайной интеграции в геном было показано с помощью высокопроизводительного секвенирования. Таким образом, использование данной селекционной системы в сочетании с CRISPR/Cas9 может стать основой для разработки генотерапевтических подходов для лечения муковисцидоза.

Интересный подход был использован для коррекции мутаций в локусе *CFTR* с помощью системы CRISPR/Cas9 в культивируемых интестинальных стволовых клетках (стволовые клетки кишечного эпителия), полученных от больных муковисцидозом [54]. При этом была разработана технология получения из этих клеток «органоедов в миниатюре». Они представляют собой функциональные многоклеточные образования, содержащие *Lgr5*<sup>+</sup> стволовые клетки, клетки Пеннета, бокаловидные и энтероэндокринные клетки, расположенные в своих нишах так же, как они располагаются в структурах тонкой кишки. Аналогичная технология с некоторыми вариациями была применена с целью получения «органоедов в миниатюре», воспроизводящих структуры толстой кишки, желудка, печени и поджелудочной железы [55–57]. Непременным условием роста в культуре *Lgr5*<sup>+</sup> стволовых клеток является постоянная стимуляция Wnt-пути добавлением R-спондина – лиганда *Lgr5*. С помощью системы CRISPR/Cas9 был произведен нокаут негативных регуляторов Wnt-пути – *APC*, *RNF3* и *Znrf3*. В результате были получены клетки, способные к самообновлению и пролиферации в отсутствие R-спондина. В *Lgr5*<sup>+</sup>



**Рис. 2.** Схема эксперимента по коррекции мутации в гене *FMR1*, вызывающей синдром ломкой X-хромосомы, с помощью системы CRISPR/Cas9. По [50] с изм.

стволовых клетках, полученных от больных муковисцидозом, имеющих делецию F5008 в гене *CFTR*, с помощью системы CRISPR/Cas9 и донорной плазмиды, имеющей нормальную последовательность гена *CFTR*, данная мутация была исправлена. При этом селекционная кассета, обеспечивающая устойчивость к пурамицину, интегрировалась в область интрона. Таким образом, была показана возможность получения функциональных многоклеточных органоидов тонкого кишечника с исправленным геномом, аутогенных по отношению к донору, которые могут быть введены обратно в организм больного. Такой подход открывает большие перспективы для клеточной терапии не только муковисцидоза, но и других наследственных заболеваний.

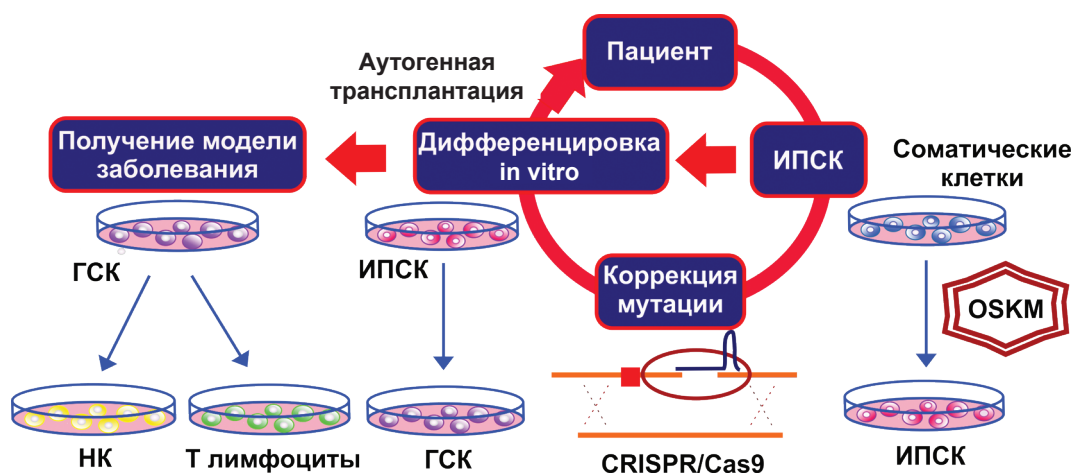
*Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции мутации, вызывающей комбинированный иммунодефицит*

Одной из генетических причин развития тяжелого комбинированного иммунодефицита являются мутации в гене *JAK3*, который кодирует киназу семейства Janus. При этом в циркуляции отсутствуют Т-лимфоциты и натуральные киллеры (НК), а популяция В лимфоцитов представлена полностью. С использованием пациент-специфичных *JAK3*-дефицитных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, было показано ранняя блокировка развития Т-лимфоцитов при дифференцировке *in vitro* [32]. С помощью системы CRISPR/Cas9 и донорной конструкции мутация С>Т в 14 экзоне гена *JAK3* была исправлена, а из клеток с исправленным генотипом были получены прогениторы Т-лимфоцитов. Восстановление IL-7/*JAK3* сигнального пути обеспечило формирование из данных прогениторных клеток естественных киллеров и дифференцированных Т-лимфоцитов. Полногеномное секвенирование клонов ИПСК с исправленным генотипом не выявило никаких нецелевых эффектов в более чем 1450 сайтах потенциальной нецелевой активности CRISPR/Cas9. Таким образом, в данной работе описан перспективный метод коррекции наследственных иммунодефицитных состояний у человека (рис. 3).

*Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции миодистрофии Дюшенна*

Миодистрофия Дюшенна — тяжелое X-сцепленное наследственное заболевание, вызванное в т. ч. мутациями по типу сдвига рамки считывания в гене одного из важнейших белков скелетной мышечной ткани — дистрофина. К наиболее распространенным мутациям относятся внутренние делеции в 44-55 экзонах данного гена. Система редактирования генома CRISPR/Cas9 — перспективный метод генетической коррекции мутаций в гене дистрофина, который уже с успехом применяется в экспериментах *in vitro* [18, 40]. Так, в работе D.G. Ousterout с соавт. (2015) впервые была показана возможность коррекции гена дистрофина путем удаления 51 экзона, а также всех десяти экзонов (45-55) с помощью двух систем CRISPR/Cas9 в миобластах пациентов, страдающих этим видом миодистрофии [40]. Общей размер большой делеции составил около 336 т.п.н. При этом экспрессия функционального белка в полученных миобластах была подтверждена в экспериментах *in vivo*. Миобласты с исправленным генотипом трансплантировали в мышечную ткань иммунодефицитных мышей, и через 4 нед. на криосрезах наблюдали экспрессию спектрина и дистрофина человека. Для некоторых из используемых в данном эксперименте генетических конструкций была показана нецелевая активность. Поэтому следующей задачей, которую необходимо решить исследователям для дальнейшего совершенствования данного генотерапевтического подхода, является повышение специфичности связывания используемых систем CRISPR/Cas9 с конкретным локусом гена дистрофина.

В работе Х. Ли с соавт. (2015) использовались три различных стратегии для коррекции гена дистрофина в ИПСК пациентов с миодистрофией Дюшенна с помощью TALEN и CRISPR/Cas9 [18]. Первая — внесение двунитевых разрывов ДНК в область расположения 3'-сайта сплайсинга в 44 интроне, что обеспечивает вырезание дефектного 45 экзона из пре-мРНК. Вторая — внесение двунитевых разрывов ДНК в область экзона для восстановления рамки считывания. Третья — встройка полноценной копии



**Рис. 3.** Использование системы CRISPR/Cas9 для изучения и коррекции комбинированного иммунодефицита: ГСК — гемопоэтические стволовые клетки; ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НК — натуральные киллеры; OSKM — OCT3/4, SOX2, KLF4, MYC. По [32] с изм.

44 экзона. Если первые две стратегии основаны на внесении небольших инсерций и делеций, являющихся результатом негомологичного соединения концов разорванных нитей ДНК, то последняя стратегия основана на гомологичной рекомбинации. Все три метода обеспечили восстановление экспрессии функционального дистрофина в мышечных производных ИПСК. Однако только третий вариант обеспечил синтез полноразмерного белка. Во многом благодаря тщательному подбору уникальных мишеней для действия TALEN и CRISPR/Cas9, не было обнаружено никакой нецелевой активности в геноме полученных клонов ИПСК. Таким образом, данный подход может стать основой для разработки методов генотерапии данного заболевания *ex vivo*.

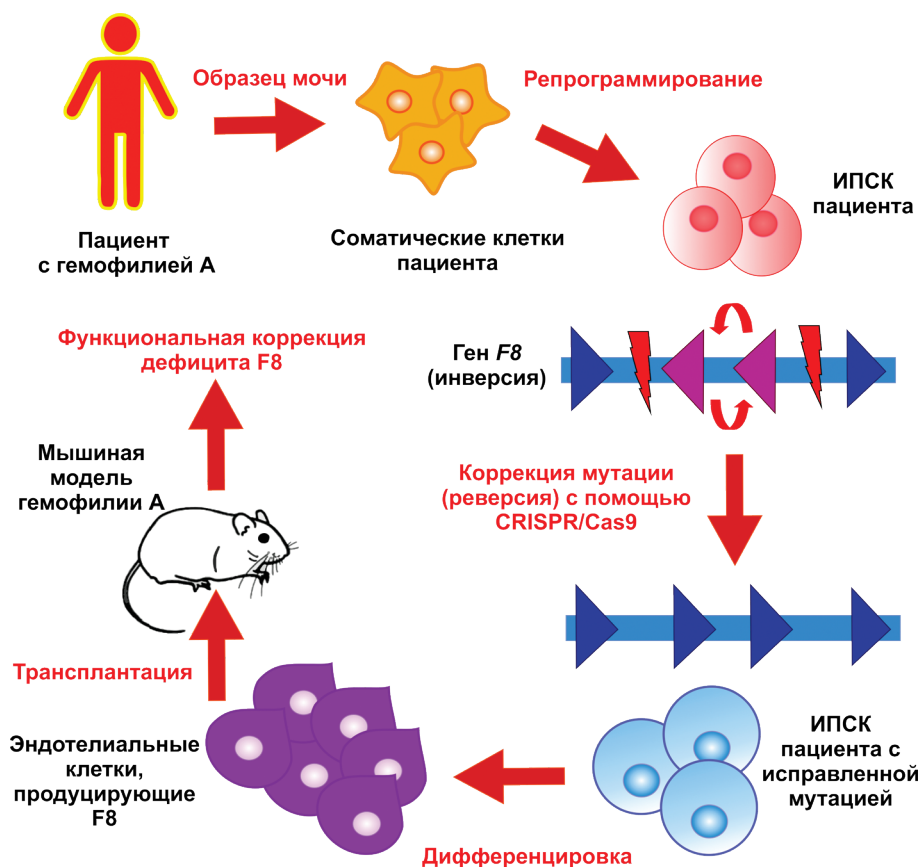
*Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции гемофилии А*

Гемофилия А представляет собой заболевание, обусловленное мутациями в гене *F8*, который кодирует восьмой фактор свертывания крови. Причем около 50% всех случаев данного заболевания вызваны двумя большими инверсиями, в которые вовлечены первый интрон и его гомолог, а также двадцать второй интрон и его гомолог в гене *F8*. Размер инверсий составляет порядка 140 т.п.н. и 600 т.п.н. соответственно. Данные хромосомные перестройки возникают в результате ошибочной репарации двуниевых разрывов ДНК посредством неаллельной гомологичной рекомбинации. С помощью системы CRISPR/Cas9 в пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клетках была произведена обратная инверсия [41]. Схема данного эксперимента представлена на рис. 4. При этом результаты полногеномного секвенирования и таргет-

ного высокопроизводительного секвенирования не выявили какой-либо нецелевой активности у использованных конструкций. ИПСК с исправленным генотипом были дифференцированы в эндотелиальные клетки, которые экспрессировали функциональный ген *F8*. Кроме того, данные клетки были способны к частичному восполнению дефицита восьмого фактора свертывания крови в мышечной модели гемофилии. Три из девяти мышей, которым были трансплантированы клетки человека с исправленным генотипом, оставались живы еще двое суток после купирования времени жизни с 65 до 111 мин. Таким образом, данный подход открывает широкие перспективы для потенциального терапевтического применения, и может быть использован также для коррекции хромосомных перестроек, возникающих при разнообразных злокачественных новообразованиях.

*Использование системы CRISPR/Cas9 для коррекции гемоглобинопатий*

Гемоглобинопатии — это наследственные заболевания крови, вызванные мутациями в генах одной из цепей гемоглобина. Выделяют качественные гемоглобинопатии (изменения аминокислотной последовательности цепей глобина) и количественные гемоглобинопатии или талассемии (снижение образования цепей глобина без изменения их структуры). При этом наиболее распространенным заболеванием, относящимся к первой группе, является серповидно-клеточная анемия, при которой у пациента имеется миссенс-мутация в гене, кодирующем β-цепь гемоглобина. Для коррекции данной мутации в гене *HBB* ранее были использованы ZFN и TALEN [46, 58, 59]. При этом донорная конструкция



**Рис. 4.** Схема эксперимента по исправлению мутации в гене *F8*. По [41] с изм.

включала селекционную кассету, для отбора клонов, в которых произошли редкие события гомологичной рекомбинации. Однако использованный подход показал довольно низкий выход целевых событий даже после селекции антибиотиком, а самое главное в дифференцированных гематопоэтических производных ИПСК не было обнаружено экспрессии нормального  $\beta$ -глобина [46, 58]. Поэтому К. Хуанг с соавт. (2015) произвели коррекцию мутации, вызывающей серповидно-клеточную анемию, в ИПСК с помощью системы CRISPR/Cas9 [60]. Около 40% полученных после селекции ИПСК имели исправленный генотип, при этом селекционная кассета удалялась с помощью Cre/loxP системы. Зрелые безъядерные эритроциты, полученные из ИПСК с исправленным геномом, экспрессировали до 85% полноценного  $\beta$ -глобина, однако уровень нормальной формы гемоглобина по-прежнему оставался довольно низким по сравнению с фетальной формой гемоглобина (примерно в 10 раз ниже).

Одним из наиболее распространенных заболеваний, относящихся ко второй группе, является  $\beta$ -талассемия, при которой часто встречаются точковые мутации и небольшие делеции в гене *HBB*. Наследственная природа данного заболевания делает практически невозможным какое-либо медикаментозное лечение, поэтому более перспективным является разработка генотерапевтических методов. Один из возможных методов — лентивирусная доставка нормальной копии гена *HBB* — был использован для лечения пациента с HBE1- $\beta$ -талассемией, после чего у данного пациента отмечались положительные изменения, а главное, пропала необходимость в постоянном переливании крови [61]. Однако случайная интеграция лентивирусов в геном представляет потенциальную опасность для пациентов, получивших подобную терапию, как было показано в ряде случаев [62, 63]. Коррекция мутаций с помощью системы CRISPR/Cas9 в ИПСК больных  $\beta$ -талассемией с последующей трансплантацией аутогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) с исправленным генотипом является гораздо более предпочтительным методом. Многочисленные работы по исправлению мутаций в гене *HBB* в ИПСК пациентов с  $\beta$ -талассемией дают весьма обнадеживающие результаты [64–67]. При этом наряду с использованием донорных конструкций без селекционных маркеров [66], применяются селекционные кассеты, фланкированные loxP-сайтами [65], а также сайтами для piggyBac-транспозазы [64, 67]. Последний способ является наиболее предпочтительным, поскольку обеспечивает не только эффек-

тивный отбор клонов ИПСК, в которых произошла встройка донорной конструкции, но и полное удаление селекционной кассеты. Вырезание «без следов» является безусловным преимуществом piggyBac системы над Cre/loxP системой, при использовании которой в геноме остаются единичные loxP-сайты. Особое внимание в данных работах уделено оценке нецелевой активности системы CRISPR/Cas9, поскольку расположенные на той же хромосоме гены *HBE*, *HBG2*, *HBG1*, *HBD* имеют гомологичные участки с геном *HBB*. Дальнейшие усилия исследователей должны быть направлены на получение функциональных гемопоэтических предшественников из ИПСК с исправленным геном *HBB* для проведения доклинических испытаний.

### Заключение

На сегодняшний день технология CRISPR/Cas9 активно используется не только для экспериментального нокаута отдельных генов, внесения точечных или более крупных мутаций [68], создания хромосомных перестроек [41], но и для активации транскрипции [69], а также генного нокаута в масштабах целого генома [70]. Благодаря высокой эффективности и специфичности работы, данная система обладает значительным потенциалом как в области изучения роли определенных генов и генных сетей в развитии наследственных заболеваний, так и их участия в патогенезе болезней с наследственной предрасположенностью и генетических болезней соматических клеток. Использование CRISPR/Cas9 *in vitro* для коррекции мутаций, являющихся причиной развития различных моногенных заболеваний, закладывает основы для разработки подходов генной терапии наследственных болезней как *ex vivo*, так и *in vivo* [68]. В настоящее время система CRISPR/Cas9 также широко применяется для разработки методов лечения латентных вирусных инфекций, таких как ВИЧ-1 [71], гепатит В [72] и С [73]. Для того, чтобы в будущем данный метод мог стать базовым генотерапевтическим подходом, необходимо дальнейшее усовершенствование способов доставки генетических конструкций, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/Cas9, увеличение уровня событий рекомбинации в пределах целевого гена, сведение нецелевой активности к минимуму.

### Благодарности

Работа поддержана РФФИ (грант № 16-34-00762-мол\_а).

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Freedman B.S., Brooks C.R., Lam A.Q. et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat. Commun.* 2015; 6: 8715.
2. Wang P., Lin M., Pedrosa E. et al. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in neurodevelopment. *Mol. Autism.* 2015; 6: 55.
3. Zhang J., Lian Q., Zhu G. et al. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 2011; 8(1): 31-45.
4. Yung S.K., Tilgner K., Ledran M.H. et al. Brief report: human pluripotent stem cell models of fanconi anemia deficiency reveal an important role for fanconi anemia proteins in cellular reprogramming and survival of hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2013; 31(5): 1022-9.

5. Tse H.F., Ho J.C., Choi S.W. et al. Patient-specific induced-pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes recapitulate the pathogenic phenotypes of dilated cardiomyopathy due to a novel DES mutation identified by whole exome sequencing. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(7): 1395-403.
6. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315(5819): 1709-12.
7. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(6): 467-77.
8. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
9. Cong L., Ran F.A., Cox D. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.

10. Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346(6213): 1258096.
11. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., et al. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae* 2014; 6(3): 19-40.
12. Jiang W., Bikard D., Cox D. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(3): 233-9.
13. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D. et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014; 156(5): 935-49.
14. Fu Y., Foden J.A., Khayter C. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9): 822-6.
15. Pellagatti A., Dolatshad H., Valletta S. et al. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. *Arch. Toxicol.* 2015; 89(7): 1023-34.
16. Smith C., Gore A., Yan W. et al. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell* 2014; 15(1): 12-3.
17. Chen J.R., Tang Z.H., Zheng J. et al. Effects of genetic correction on the differentiation of hair cell-like cells from iPSCs with MYO15A mutation. *Cell Death Differ.* 2016; doi: 10.1038/cdd.2016.16.
18. Li H.L., Fujimoto N., Sasakawa N. et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 2015; 4(1): 143-54.
19. Ding Q., Regan S.N., Xia Y. et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 2013; 12(4): 393-4.
20. Maggio I., Holkers M., Liu J. et al. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci. Rep.* 2014; 4: 5105.
21. Li D., Qiu Z., Shao Y. et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(8): 681-3.
22. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157(6): 1262-78.
23. Shen B., Zhang W., Zhang J., et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods* 2014; 11(4): 399-402.
24. Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(6): 577-82.
25. Fu Y., Sander J.D., Reyon D. et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32(3): 279-84.
26. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P. et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9): 839-43.
27. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9): 827-32.
28. Mali P., Esvelt K.M., Church G.M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods* 2013; 10(10): 957-63.
29. Zhang Y., Rajan R., Seifert H.S., et al. DNase H Activity of *Neisseria meningitidis* Cas9. *Mol Cell.* 2015; 60(2): 242-55.
30. Friedland A.E., Baral R., Singhal P. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol.* 2015; 16: 257.
31. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayeh O.O. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015; 163(3): 759-71.
32. Chang C.W., Lai Y.S., Westin E. et al. Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell Rep.* 2015; 12(10): 1668-77.
33. Mianne J., Chessum L., Kumar S. et al. Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair. *Genome Med.* 2016; 8(1): 16.
34. Wang X., Cao C., Huang J. et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2016; 6: 20620.
35. De Rubeis S., Buxbaum J.D. Genetics and genomics of autism spectrum disorder: embracing complexity. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24(R1): R24-31.
36. Neale B.M., Kou Y., Liu L. et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 2012; 485(7397): 242-5.
37. O'Roak B.J., Vives L., Girirajan S. et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 2012; 485(7397): 246-50.
38. Chang C.J., Bouhassira E.E. Zinc-finger nuclease-mediated correction of alpha-thalassemia in iPSC cells. *Blood* 2012; 120(19): 3906-14.
39. Rio P., Banos R., Lombardo A. et al. Targeted gene therapy and cell reprogramming in Fanconi anemia. *EMBO Mol. Med.* 2014; 6(6): 835-48.
40. Ousterout D.G., Kabadi A.M., Thakore P.I. et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6244.
41. Park C.Y., Kim D.H., Son J.S. et al. Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 213-20.
42. Firth A.L., Menon T., Parker G.S. et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep.* 2015; 12(9): 1385-90.
43. Penagarikano O., Mulle J.G., Warren S.T. The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007; 8: 109-29.
44. Crawford D.C., Acuna J.M., Sherman S.L. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet. Med.* 2001; 3(5): 359-71.
45. Urbach A., Bar-Nur O., Daley G.Q. et al. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(5): 407-11.
46. Avitzour M., Mor-Shaked H., Yanovsky-Dagan S. et al. FMR1 epigenetic silencing commonly occurs in undifferentiated fragile X-affected embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 2014; 3(5): 699-706.
47. Pearson C.E., Nichol Edamura K., Cleary J.D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6(10): 729-42.
48. Eiges R., Urbach A., Malcov M. et al. Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 2007; 1(5): 568-77.
49. Bar-Nur O., Caspi I., Benvenisty N. Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives. *J. Mol. Cell Biol.* 2012; 4(3): 180-3.
50. Park C.Y., Halevy T., Lee D.R. et al. Reversion of FMR1 Methylation and Silencing by Editing the Triplet Repeats in Fragile X iPSC-Derived Neurons. *Cell Rep.* 2015; 13(2): 234-41.
51. Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245(4922): 1059-65.
52. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245(4922): 1066-73.
53. Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245(4922): 1073-80.
54. Schwank G., Koo B.K., Sasselli V. et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 653-8.
55. Huch M., Bonfanti P., Boj S.F. et al. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J.* 2013; 32(20): 2708-21.
56. Huch M., Dorrell C., Boj S.F. et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013; 494(7436): 247-50.
57. Barker N., Huch M., Kujala P. et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 25-36.
58. Zou J., Mali P., Huang X. et al. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPSC cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 2011; 118(17): 4599-608.
59. Sun N., Zhao H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. *Biotechnol. Bioeng.* 2014; 111(5): 1048-53.
60. Huang X., Wang Y., Yan W. et al. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem Cells* 2015; 33(5): 1470-9.
61. Cavazzana-Calvo M., Payen E., Negre O. et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010; 467(7313): 318-22.
62. Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M. et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302(5644): 415-9.
63. Woods N.B., Bottero V., Schmidt M. et al. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 2006; 440(7088): 1123.
64. Xu P., Tong Y., Liu X.Z. et al. Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2-654 (C > T) mutation in beta-thalassaemia-derived iPSCs. *Sci. Rep.* 2015; 5: 12065.
65. Song B., Fan Y., He W. et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassaemia induced

pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Dev.* 2015; 24(9): 1053-65.

66. Yang Y., Zhang X., Yi L. et al. Naive Induced Pluripotent Stem Cells Generated From beta-Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. *Stem Cells Transl. Med.* 2016; 5(1): 8-19.

67. Xie F., Ye L., Chang J.C. et al. Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* 2014; 24(9): 1526-33.

68. Hotta A., Yamanaka S. From Genomics to Gene Therapy: Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Annu. Rev. Genet.* 2015; 49: 47-70.

69. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E. et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015; 517(7536): 583-8.

70. Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M. et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014; 343(6166): 80-4.

71. Li C., Guan X., Du T. et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(8): 2381-93.

72. Kennedy E.M., Bassit L.C., Mueller H. et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* 2015; 476: 196-205.

73. Price A.A., Sampson T.R., Ratner H.K. et al. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *PNAS USA* 2015; 112(19): 6164-9.

74. Turan S., Farruggio A.P., Srifa W. et al. Precise correction of disease mutations in induced pluripotent stem cells derived from patients with limb girdle muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 2016; doi: 10.1038/mt.2016.40.

75. Osborn M.J., Gabriel R., Webber B.R. et al. Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. *Hum. Gene Ther.* 2015; 26(2): 114-26.

76. Flynn R., Grundmann A., Renz P. et al. CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPSCs. *Exp. Hematol.* 2015; 43(10): 838-48 e3.

77. Bassuk A.G., Zheng A., Li Y. et al. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci. Rep.* 2016; 6: 19969.

*Поступила: 07.03.2016*