

АГЛЯДЫ
SURVEYS

УДК 579.252.2

Поступила в редакцию 07.07.2017

Received 07.07.2017

А. Н. Хархаль, Л. П. Титов*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь***ИММУННАЯ СИСТЕМА ПРОКАРИОТ:
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ПРИМЕНЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИИ**

Аннотация. Система CRISPR/Cas за короткие сроки завоевала популярность среди ученых различных областей медицинских, биологических и химических наук. Данная система, кассета которой состоит из кодирующих Cas-белки генов лидерной последовательности, спейсеров и палиндромов, используется для защиты собственного генома от чужеродного генетического материала прокариоты. Cas-белки являются ключевым звеном, без которых эта система не способна выполнять свои функции. При взаимодействии с чужеродной ДНК система CRISPR/Cas проходит три этапа: иммунизацию, экспрессию и интерференцию. Иммунизация происходит при первичном контакте клетки с чужеродной ДНК с запоминанием информации об инвазивном агенте. При повторной встрече отмечается образование белкового комплекса и разрушение чужеродной ДНК. Различия в механизме процесса зависят от класса и типа системы CRISPR/Cas. Различают 2 класса системы CRISPR/Cas, которые разделены на 5 типов и 16 подтипов. Для поиска CRISPR у бактерий используются биоинформационные методы, разработаны специализированные программы. В связи с высокой эффективностью работы и простотой сборки отдельных компонентов в лабораторных условиях CRISPR/Cas стали применять для решения широкого круга задач в микробиологии, генетике, молекулярной эпидемиологии, геномной инженерии, прикладной медицине и фармакологии для редактирования геномов, контроля экспрессии генов, лечения и моделирования патологических процессов, типирования микроорганизмов, определения филогенетических отношений между ними и др. Для редактирования генома эукариот хорошо зарекомендовала себя система CRISPR/Cas9 *N. meningitidis*. Однако эксперименты в области редактирования человеческого генома сопряжены с биоэтическими проблемами.

Ключевые слова: система CRISPR/Cas, иммунизация, экспрессия, интерференция, редактирование генома

Для цитирования: Хархаль, А. Н. Иммунная система прокариот: молекулярные механизмы, применение в микробиологии / А. Н. Хархаль, Л. П. Титов // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 3. – С. 121–128.

A. N. Kharkhal, L. P. Titov*Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus***PROCARIOTIC IMMUNE SYSTEM: MOLECULAR MECHANISMS, APPLICATION IN MICROBIOLOGY**

Abstract. During a short time, the CRISPR/Cas system has gained popularity among scientists in various fields of medicine, biology, and chemistry. Prokaryotes use the CRISPR/Cas system to protect their own genome from foreign genetic material, the cassette of which consists of Cas-protein coding genes, leader sequence, spacers and palindromes. Cas-proteins are the main thing without which the CRISPR/Cas system cannot work. While interacting with foreign DNA, the CRISPR/Cas system passes 3 stages: immunization, expression, and interference. Immunization takes place during the first bacterial contact with foreign DNA collecting information about an invasive agent. The next meeting reveals the protein complex creation and the foreign DNA destruction. The differences in the mechanisms of action depend on the system class and type. There are 2 classes of the CRISPR/Cas system separating into 5 types and 16 subtypes. Bioinformation methods are used to find the CRISPR/Cas system in a bacterial cell. Due to the high efficiency and the easy individual component assembly, scientists quickly learned how to benefit from the CRISPR/Cas system, applying it for a wide range of tasks. The CRISPR/Cas system is used in microbiology, genetics, molecular epidemiology, gene engineering, applied medicine, and pharmacology for genome editing, gene expression control, pathological process treatment and modeling, microorganism typing, determination of phylogenetic relationships of microorganisms and so on. The CRISPR/Cas system of *N. meningitidis* can successfully edit eucariotic genome. But experiments with human genome are connected with biomedical ethics.

Keywords: CRISPR/Cas system, immunization, expression, interference, genome editing

For citation: Kharkhal A. N., Titov L. P. Procariotic immune system: molecular mechanisms, application in microbiology. *Vesti Natsyynal'най akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 3, pp. 121–128 (in Russian).

Введение. Мир микробов разнообразен вследствие необычайно высокой изменчивости и дивергенции предковых форм. Эволюция генома бактерий – биологический процесс, посредством которого содержащаяся в клетке генетическая информация изменяется во времени либо под воздействием факторов окружающей среды, включая бактериофаги и ДНК других микроорганизмов. В этом процессе участвует множество механизмов: точечные мутации, генетические перестройки (инверсии, транслокации, делеции, дупликации), интеграция плазмид, транспозонов и прочего чужеродного генетического материала [1, 2].

В процессе эволюции прокариоты создали уникальную защитную систему против проникновения извне в геном чужеродного генетического материала. В 1987 г. группа японских ученых, исследуя геном *Escherichia coli*, обнаружила повторяющиеся участки ДНК, разделенные неповторяющимися последовательностями, но не придали этому значения [3]. Затем в 1993 г. испанский исследователь обнаружил подобные участки в геноме археи *Haloferax mediterranei*, а в 2000 г. они были выявлены еще у 20 видов микроорганизмов. Эта система, называемая CRISPR-Cas (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), представляет собой участок генома микроорганизмов, состоящий из многочисленных повторов. Через 2 года нидерландские ученые обнаружили гены, кодирующие белки Cas, связанные с системой CRISPR [4]. Классификация систем CRISPR, а также предположительный механизм их работы были предложены в 2006 г. [5]. Отношение системы CRISPR к адаптивному иммунитету прокариот, а также ключевая роль Cas-белков были экспериментально доказаны в 2007 г. Изучение механизмов действия углублялось, и в 2008 г. была показана способность данной системы осуществлять ДНК-интерференцию [6].

Благодаря открытиям, касающимся строения и функций системы CRISPR-Cas, уже в 2012 г. стало возможным впервые экспериментально апробировать первую искусственную систему CRISPR II, а в 2013 г. была показана успешность ее применения как в клетках бактерий *in vitro*, так и в клетках эукариот [6]. В 2015 г. группа китайских ученых опубликовала результаты своих исследований по редактированию генома эмбрионов человека, однако точность редактирования была крайне низкой. Редактирование генома человека сопряжено с определенными биоэтическими проблемами, и подобный эксперимент вызвал неоднозначную реакцию в обществе. Тем не менее, исследования по редактированию человеческого генома не были остановлены, и в 2016 г. группа ученых из США сообщила, что им удалось повысить точность редактирования [7]. Эксперименты по совершенствованию методов редактирования геномов продолжаются.

Таким образом, механизмы адаптивного иммунитета на уровне генома характерны не только для эукариот. Имеются также доказательства, свидетельствующие о причастности системы CRISPR к другим биологическим процессам.

Характеристика системы CRISPR-Cas. В строении системы CRISPR бактерий при общем сходстве имеются некоторые различия (рис. 1) [6, 8, 9]. Число локусов CRISPR варьируется от 1 (*M. tuberculosis*, *N. meningitidis*) до 20 (*M. jannaschii*), а количество повторов внутри локуса может быть от 2 до 124 [4, 10].

Cas-гены. Системы CRISPR включают *cas*-гены, кодирующие Cas-белки. Каждый класс CRISPR содержит свой набор *cas*-генов, расположенных с двух сторон CRISPR-локуса. Последовательность расположения *cas*-генов зависит от вида микроорганизма, однако у многих из них они расположены в следующем порядке: *cas3–cas4–cas1–cas2* [4, 11]. Гены *cas1* и *cas2* имеются во всех системах, в то время как *cas3/cas7*, *cas9* и *cas10* характерны для систем I, II и III типов соответственно [12]. Cas-белки относятся к различным семействам, но, как правило, содержат домены с полимеразной, хеликазной и нуклеазной активностью. Гены, кодирующие Cas-белки, подразделяются на обязательные, присутствие которых в геноме указывает на наличие системы CRISPR, и дополнительные, которые могут быть найдены в некоторых из них [13].

Без участия Cas-белков система CRISPR не может выполнять функции адаптивного иммунитета. В табл. 1 представлены характеристики некоторых Cas-белков [9, 14]. Установлено, что последние принимают участие в процессах интерференции (т. е. защите генома от чужеродной генетической информации) и формировании новых спейсеров. Помимо адаптивного иммунитета эти белки участвуют и в других процессах [9, 14, 15]: а) регуляции экспрессии генов посредством разрушения мРНК; б) регуляции генов группового поведения; в) изменении вирулентности за счет модификации поверхностных структур (Cas9); г) ремоделировании генома; д) репарации ДНК (Cas1); е) апоптозе клетки при фаговой инфекции (Cas1 и Cas2) [4, 8, 16].



Рис. 1. Схема строения системы CRISPR [9]

Fig. 1. Scheme of constructing the CRISPR/Cas system [9]

Лидерная последовательность – последовательность нуклеотидов длиной до 550 п. н., содержащая богатые АТ участки. Она граничит с CRISPR на 5'-конце и принимает участие во встраивании фрагментов ДНК в геном в виде новых спейсеров. Служит в качестве промотора для транскрипции CRISPR [9].

Таблица 1. Cas-белки и их функции
Table 1. Cas-proteins and their functions

| Белок | Функциональная характеристика |
|-------|--|
| Cas1 | Металлозависимая эндонуклеаза ДНК, универсальный маркер CRISPR-Cas-системы; участвует в захвате и встраивании новых спейсеров |
| Cas2 | Специфическая эндорибонуклеаза; проявляет ДНКазную и РНКазную активность |
| Cas3 | Есть во всех CRISPR-Cas-системах I типа; содержит 7 функциональных доменов, среди которых хеликазный SF2 и нуклеазный HD; вводит разрывы в ДНК-мишени, инициируя деградацию |
| Cas4 | recB-подобная нуклеаза; участвует в захвате и встраивании новых спейсеров |
| Cas5 | Семейство RAMP-белков (PAMP – pathogen-associated molecular patterns) |
| Cas6 | Семейство RAMP-белков; металлозависимая эндорибонуклеаза; участвует в образовании сгРНК |
| Cas7 | Участвует во встраивании новых спейсеров |
| Cas8 | Участвует в интерференции |
| Cas9 | Есть во всех CRISPR-Cas-системах II типа; содержит HNH и RuvC – эндонуклеазные домены, участвует в процессинге и накоплении сгРНК, в процессе интерференции; есть аналоги, расщепляющие молекулы РНК |
| Cas10 | Есть во всех CRISPR-Cas-системах III типа; содержит Palm-домен (РНК-распознающий домен), обладает ДНКазной активностью, участвует в интерференции |

Спейсеры – уникальные фрагменты чужеродной ДНК длиной 27–72 п. н., приобретаемые в результате иммунизации. Иммунизация бактерий представляет собой копирование и вставку чужеродных генетических элементов в кассету CRISPR. В одной кассете число таких повторов различается и зависит от вида чужеродных агентов, с которыми контактировала клетка. Последовательности спейсеров обычно гомологичны ДНК бактериофагов, плазмид и других внехромосомных факторов наследственности. Встраивание в геном новых спейсеров осуществляется со стороны лидерной последовательности. В результате они располагаются в хронологической последовательности [14, 20]. Спейсеры интегрированы с геномом клетки и передаются по наследству (вертикально). Во избежание чрезмерного увеличения генома у бактерий интеграция новых спейсеров сочетается с делецией избыточных генов [8, 11].

Палиндромы представляют собой короткие (до 40 нуклеотидов) прямые повторы, разделяющие спейсеры. Они обеспечивают возможность формирования вторичной структуры зрелой сгРНК.

Молекулярные механизмы функционирования CRISPR-Cas системы. Молекулярный механизм защиты генома системой CRISPR-Cas от чужеродной генетической информации состоит из следующих этапов [8, 9, 14–16]: иммунизации, экспрессии CRISPR (формирование зрелых сгРНК), интерференции (узнавание и деструкция чужеродной ДНК либо РНК).

Ответная реакция бактериальной клетки на проникновение извне чужеродной информации зависит от того, встречалась ли она с данной чужеродной ДНК или РНК ранее, либо же это первое взаимодействие. Отмечено, что при повторной встрече бактерии с одним и тем же фагом клетки могут встраивать различные отличающиеся последовательности генома данного фага. В результате популяция клеток становится более защищенной и способна эффективней бороться с фагами даже при условии возникновения в них мутаций [17].

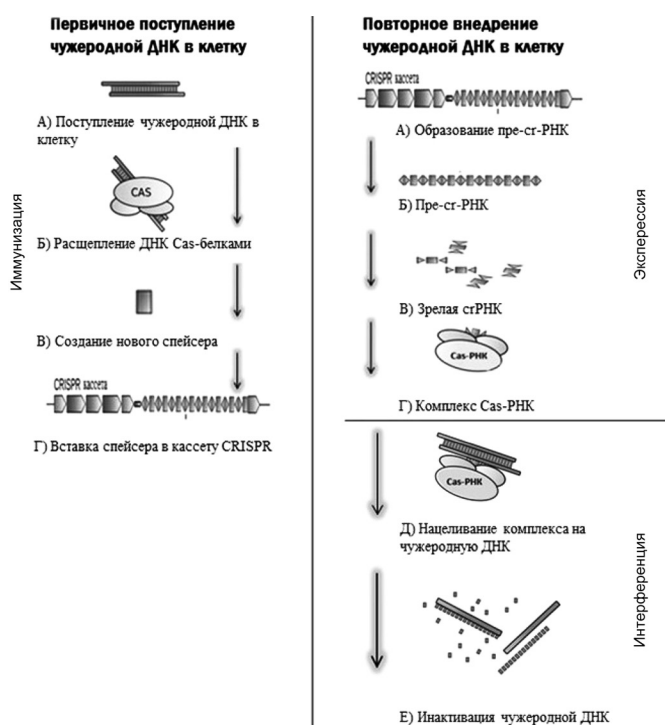


Рис. 2. Схематичное функционирование системы CRISPR-Cas: иммунизация (взаимодействие вирусной ДНК с Cas-белками, создание нового спейсера, встраивание в кассету), экспрессия (транскрипция кассеты, создание процессированной РНК, встраивание в комплекс с Cas-белками), интерференция (нацеливание и инактивация вирусной ДНК)

Fig. 2. Schematic functioning of the CRISPR/Cas system: immunization (interaction of viral DNA with Cas-proteins, making of a new spacer, insertion into the cassette), expression (cassette transcription, insertion of processed RNA, insertion into the Cas-protein complex), interference (targeting and inactivation of viral DNA)

При повторной встрече бактерии с известной чужеродной ДНК (РНК) начинается образование сгРНК из пре-сгРНК. Затем зрелые сгРНК встраиваются в каскадный комплекс, состоящий из Cas-белков, и инициируется CRISPR-интерференция. Механизм интерференции и состав каскадного комплекса зависят от класса и типа системы CRISPR-Cas [5, 9, 14, 18].

Классы и типы систем CRISPR-Cas. Существует 2 класса систем CRISPR-Cas, подразделяющихся на 5 типов и 16 подтипов. К классу 1 относятся типы I, III и IV, а к классу 2 – типы II и V [19, 20]. Тип VI, относящийся к классу 2, был предсказан методами биоинформационного анализа. Механизм его действия изучается [9, 14, 19, 20].

Для предотвращения аутоиммунной агрессии, т. е. реагирования системы CRISPR-Cas в отношении мишеней собственного генома, бактерия имеет возможность различать инородный генетический элемент от компонентов собственного генома. У одних систем это происходит за счет распознавания особой последовательности PAM (protospacer adjacent motif), предшествующей протоспейсеру. В других системах она обусловлена комплементарностью сгРНКtag и последовательности CRISPR [8, 11]. Регуляция активности системы CRISPR-Cas осуществляется посредством белка Aсг, который связывается с Cas3-сгРНК через домены Cas3, ингибируя транскрипцию ДНК [21, 22].

Класс 1, тип I характеризуется наличием белка Cas3, проявляющим как нуклеазную, так и хеликазную активность за счет доменов HD и SF2 соответственно. Действие данной системы начинается с созревания сгРНК из пре-сгРНК. Далее формируется каскадный комплекс, включающий Cas3-белок и сгРНК. Cas3 вносит разрывы в молекулу ДНК, что приводит к ее деградации [14, 20]. Белок Cse1, распознающий мотив PAM, тормозит деградацию ДНК и защищает геном от аутоиммунной агрессии [23]. Система CRISPR-Cas I типа обнаружена у таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycococcus xanthus*, *Pectobacterium atrosepticum* [6, 9, 24].

Класс 1, тип III ассоциируются с белком Cas10, содержащим Palm-домен, аналогичный РНК-распознающим доменам полимераз. Cas10, работая в паре либо с белком Csm (подтип IIIA), либо с белком Cmr (подтип IIIB), отвечает за ДНКазную активность комплекса интерференции, в то время как белки Csm и Cmr проявляют рибонуклеазную активность. Таким образом, комплекс интерференции системы CRISPR-Cas III типа обладает активностью как в отношении РНК, так и в отношении ДНК.

Созревание сгРНК происходит следующим образом: не входящая в состав комплекса интерференции рибонуклеаза Cas6 разрезает последовательности CRISPR на спейсеры, фланкируемые с обеих сторон. Так формируется сгРНКtag, который представляет собой 8 нуклеотидов 5'-фланкирующего конца. Далее в зависимости от подтипа сгРНК включается в комплексы с белками Csm или Cmr, где и происходит дополнительный процессинг со стороны 3'-конца [11]. Защита генома от аутоиммунной агрессии основана на комплементарности сгРНКtag и последовательности CRISPR. Если комплементарность полная, то процесс интерференции не запускается. Бактерии *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus furiosus*, *Marinomonas mediterranea* содержат CRISPR-Cas систему III типа [6, 13].

Класс 1, тип IV. В данной системе имеется ген *csf1*, ассоциированный с генами *cas5* и *cas7*. Но так как у этих генов нет связи с CRISPR, то, вероятнее всего, их функции не связаны с адаптивным иммунитетом [14].

Класс 2, тип II. В комплексе интерференции данного типа содержится белок Cas9, имеющий эндонуклеазные домены HNH и RuvC, сгРНК и tracrPНК, комплементарной CRISPR-повторам. Формирование зрелой сгРНК из пре-сгРНК происходит при участии tracrPНК и РНКазы III. Далее комплекс интерференции, включающий сгРНК, tracrPНК и Cas9, распознает последовательность PAM в ДНК-мишени, формирует R-петлю и вводит разрывы в цепи ДНК, завершая таким образом процесс деградации [7, 14, 25, 26]. Подобно системе класса 1 типа I, защиту против аутоиммунной агрессии осуществляет белок Cse1, распознающий предшествующий протоспейсеру мотив PAM [23]. Система CRISPR-Cas II типа выявлена у следующих бактерий: *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Campylobacter jejuni*, *Francisella novicida*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* [24, 25].

Класс 2, тип V содержит белок Cpf1, схожий с белками Cas9 наличием RuvC-нуклеазного домена и отличается отсутствием HNH-нуклеазного домена. В некоторых случаях для созревания сгРНК не нужны РНКазы III и tracrPНК, в связи с чем можно предположить, что белок Cpf1 сам катализирует процесс созревания сгРНК. Далее процесс интерференции и защита генома от аутоиммунной агрессии происходят по аналогии с характерными для типа II класса 2 [23, 25, 26].

Методы анализа системы CRISPR-Cas в геноме бактерий. Исследование систем CRISPR-Cas осуществляется при помощи биоинформационных программ, основанных на математических методах компьютерного анализа последовательностей нуклеотидов.

MacSyFinder (Macromolecular System Finder) – программа для моделирования свойств молекулярных систем, их компонентов, эволюционных связей с другими организмами. Программа позволяет анализировать

данные как полногеномного секвенирования бактерий, так и данные метагеномных образцов. MacSyFinder рассматривает три типа компонентов: обязательные (mandatory), идентифицируемые во всех системах CRISPR, дополнительные (accessory) – компоненты, которые могут иметь значение для сборки и функционирования системы, но не могут быть идентифицированы в связи с быстрой эволюцией), и некоторые специфические фрагменты, условно обозначаемые (в зависимости от целей и задач эксперимента) как запрещенные (forbidden).

Для работы MacSyFinder требуются дополнительные программные обеспечения Hmmer и makeblastdb для поиска точной гомологии последовательностей. В качестве языка программирования используется Python. Программа MacSyView позволяет визуализировать данные, полученные в MacSyFinder. Расшифровка CRISPR-кассет осуществляется при помощи онлайн-приложения «CRISPR: a CRISPR Interactive database» на Gen Quest Bioinformatics Platform [12]. Программа MacSyFinder имеется в свободном доступе на сайте <https://github.com/gem-pasteur/macsyfinder>. Она совместима с любыми платформами, поддерживающими Python, Hmmer и makeblastdb.

Для просмотра полученных результатов анализа используется приложение MacSyView, которое доступно по ссылке <https://github.com/gem-pasteur/macsyview>.

CRISPRFinder – программа для идентификации систем CRISPR-Cas в геноме бактерий. Программа использует язык программирования Perl и работает с файлами в формате fasta, содержащими последовательности ДНК до 67 Мб. Возможные места нахождения CRISPR определяются наличием максимального количества повторов. Программа доступна по следующей ссылке: <http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php> [24].

Применение системы CRISPR-Cas в биологии и медицине. Системы CRISPR-Cas инвазивных бактерий *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus* и *Neisseria meningitidis* были адаптированы для использования в биоинженерных целях. Чтобы системы работали, белок Cas9 и sgPНК (синтетическая PНК, включающая в себя crPНК и tracrPНК) должны быть введены в клетки и экспрессированы. Направление Cas9 к сайту-мишени осуществляется за счет аналога протоспейсера sgPНК (20 нуклеотидов на ее 5'-конце). Сайт-мишень должен находиться непосредственно на 5'-конце мотива PAM [7, 22, 27]. Таким образом, для разрезания ДНК *in vitro* необходимы следующие компоненты: белок Cas9, пре-crPНК и tracrPНК, PНКазы III. Cas9 осуществляет как процессинг пре-crPНК, так и CRISPR-интерференцию. Белок реагирует на мотив PAM. Последовательности PAM, которые распознаются белками Cas9 в бактериальных системах CRISPR/Cas, представлены в табл. 2 [27, 28]. Система Nme является более точной, так как последовательность PAM длиннее, следовательно, специфичность повышается за счет снижения количества нецелевых сайтов-мишеней. Различия в активности систем Nme и Spy могут быть также связаны с размером белков Cas9. Это может влиять на такие моменты, как доступ к сайту-мишени, стабильность связывания, раскручивание и разрезание ДНК [26, 28].

Т а б л и ц а 2. Бактериальные системы CRISPR/Cas9 стрептококков и нейссерий

T a b l e 2. Bacterial CRISPR/Cas9 systems of streptococci and neisseria

| Система CRISPR/Cas | Микроорганизм | PAM-мотив |
|--------------------|-----------------------------------|--|
| Spy | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 5'-NGG-3' реже 5'-NAG-3' |
| Nme | <i>Neisseria meningitidis</i> | 5'-NNNNGATT-3' 5'-NNNNGCTT-3' 5'-NNNNGTTT-3' |
| Sth | <i>Streptococcus thermophiles</i> | 5'-NNAGAAW-3' |

Следующим обязательным компонентом системы является crPНК и tracrPНК, которые могут быть сшиты в единую sgPНК. Задача sgPНК – найти мотив PAM. CRISPR-Cas система может работать как с одной sgPНК, так и с двумя – crPНК и tracrPНК [15, 26]. Присутствие PНКазы III обязательно для системы Nme при редактировании бактериального генома, в то время как для работы с эукариотическими клетками PНКазы III не обязательна в связи с наличием собственных PНКаз клетки [29].

Заключение. Таким образом, в процессе эволюции прокариоты сформировали механизм защиты против внедрения чужеродного генетического материала путем формирования адаптивного иммунитета не только у контактировавшей с чужеродной ДНК (PНК) клеткой, но и у потомков иммунизированной клетки в последующих поколениях. В микробиологии и молекулярной эпидемиологии системы CRISPR-Cas могут использоваться для типирования штаммов микроорганизмов, выявления их происхождения и географического распространения, филогенетических отношений между ними, получения новой информации о микробиоме человека [9].

Систему CRISPR-Cas также можно применять для активации и репрессии транскрипции генов с целью изучения транскрипционных сетей, изменения топологии ДНК, изучения модификаций хроматина, регуляции экспрессии генов, селекции клеток [27, 29, 30].

В медицине методы, основанные на системах CRISPR-Cas, могут применяться для лечения наследственных [31, 32], аллергических [33], иммунологических, онкологических [34] и прочих заболеваний [35], а также вирусных и прионных инфекций [11], выполнения фундаментальных исследований (например,

в опытах на экспериментальных животных при моделировании заболеваний человека) [36], в скрининге лекарственных препаратов и пр. [29, 37].

Применение систем CRISPR-Cas в биотехнологии позволяет модифицировать метаболические пути микроорганизмов и таким образом создавать технологически значимые штаммы, новые трансгенные виды [38] и организмы с важными сельскохозяйственными характеристиками [39, 40].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Титов, Л. П. Классификация, номенклатура и эволюция значимых для медицины бактерий / Л. П. Титов // Мед. журн. – 2006. – № 1. – С. 13–18.
2. Эволюция мира микробов и ее медицинское значение / Л. П. Титов [и др.] // Здоровоохранение. – 2002. – № 8. – С. 30–35.
3. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase sozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product / Y. Ishino [et al.] // J. of Bacteriol. – 1987. – Vol. 169, N 12. – P. 5429–5433.
4. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes / R. Jansen [et al.] // Mol. Microbiol. – 2002. – Vol. 43, N 6. – P. 1565–1575.
5. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action / K. S. Makarova [et al.] // Biology Direct. – 2006. – Vol. 1. – P. 7.
6. Sontheimer, E. J. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution / E. J. Sontheimer, R. Barrangou // Human Gene Therapy. – 2015. – Vol. 26, N 7. – P. 413–424.
7. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity / I. M. Slaymaker [et al.] // Science. – 2016. – Vol. 351 (6268). – P. 84–88.
8. Barrangou, R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond / R. Barrangou // Curr. Opin. in Immunol. – 2015. – Vol. 32. – P. 36–41.
9. Шашникова, А. В. Структура и функциональная роль CRISPR-системы бактерий / А. В. Шашникова, А. А. Горяев, Н. И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 2 (108). – С. 49–52.
10. Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects / J. M. Peters [et al.] // Curr. Opin. in Microbiol. – 2015. – Vol. 27. – P. 121–126.
11. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex / C. R. Hale [et al.] // Cell. – 2009. – Vol. 139, N 5. – P. 945–956.
12. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems / S. S. Abby [et al.] // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 10. – P. 1–9.
13. Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/Cas систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* / А. Ю. Борисенко [и др.] // Сибир. мед. журн. (Иркутск). – 2015. – Т. 133, № 2. – С. 71–74.
14. Savitskaya, E. E. Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology / E. E. Savitskaya, O. S. Musharova, K. V. Severinov // Biochemistry. – 2016. – Vol. 81, N 7. – P. 653–661.
15. Lee, C. The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 System enables specific genome editing in mammalian cells / C. Lee, T. Cradick, G. Bao // Mol. Therapy. – 2016. – Vol. 24, N 3. – P. 645–654.
16. Barrangou, R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines / R. Barrangou // Genome Biol. – 2015. – Vol. 16. – P. 247–257.
17. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system / S. van Houte [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 532 (7599). – P. 385–388.
18. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9 / M. R. O’Connell [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 516 (7530). – P. 263–266.
19. Makarova, K. S. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova, E. V. Koonin // Methods in Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1311. – P. 47–75.
20. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova [et al.] // Nature Reviews: Microbiology. – 2015. – Vol. 13, N 11. – P. 722–736.
21. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins / J. Bondy-Denomy [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 526 (7571). – P. 136–139.
22. Hilton, I. B. Genetic engineering: Chemical control for CRISPR editing / I. B. Hilton, C. A. Gersbach // Nature Chem. Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 2–3.
23. Sashital, D. G. Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system / D. G. Sashital, B. Wiedenheft, J. A. Doudna // Cell. – 2012. – Vol. 46. – P. 606–615.
24. Sangal, V. Novel configurations of type I and II CRISPR-Cas systems in *Corynebacterium diphtheriae* / V. Sangal, P. C. Fineran, P. A. Hoskisson // Microbiology. – 2013. – Vol. 159. – P. 2118–2126.
25. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems / K. Chylinski [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2014. – Vol. 42, N 10. – P. 6091–6105.
26. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems / I. Fonfara [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2014. – Vol. 42, N 4. – P. 2577–2590.
27. Васильева, Е. А. Применение системы направленного геномного редактирования CRISPR/Cas к плюрипотентным стволовым клеткам / Е. А. Васильева, Д. Мелино, Н. А. Барлев // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 1. – С. 19–30.
28. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis* / Z. Hou [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – Vol. 110. – P. 15644–15649.
29. Merrett, S. Site-specific genome engineering in human pluripotent stem cells / S. Merrett, U. Martin // Intern. J. of Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17 (1000). – P. 1–11.

30. Samson, J. E. The CRISPR-Cas immune system and genetic transfers: reaching an equilibrium / J. E. Samson, A. H. Magadan, S. Moineau // *Microbiol. Spectrum*. – 2015. – Vol. 3, N 1. – P. 209–218.
31. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells / A. G. Bassuk [et al.] // *Sci. Reports*. – 2016. – Vol. 6.
32. Naïve induced pluripotent stem cells generated from β -thalassemia fibroblasts allow efficient gene correction with CRISPR/Cas9 / Y. Yang [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 5, N 1. – P. 8–19.
33. Goodman, M. A. CRISPR/Cas9 in allergic and immunologic diseases / M. A. Goodman, P. Malik, M. E. Rothenberg // *Expert Rev. of Clin. Immunol.* – 2016. – P. 1–5.
34. The application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in cancer research / D. Wang [et al.] // *Yi Chuan*. – 2016. – Vol. 38, N 1. – P. 1–8.
35. Li, Y. The potential application and challenge of powerful CRISPR/Cas9 system in cardiovascular research / Y. Li, Y. H. Song, B. Liu, X. Y. Yu // *Intern. J. of Cardiol.* – 2016. – Vol. 9. – P. 191–193.
36. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids / B. S. Freedman [et al.] // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1–13.
37. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype / H. Yin [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32, N 6. – P. 551–553.
38. Niemann, H. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation / H. Niemann, B. Petersen // *Transgenic Res.* – 2016. – P. 1–14.
39. Schiml, S. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas / S. Schiml, H. Puchta // *Plant Methods*. – 2016. – Vol. 12, N 8. – P. 1–9.
40. Schwartz, M. L. SapTrap, a toolkit for high-throughput CRISPR/Cas9 gene modification in *Caenorhabditis elegans* / M. L. Schwarz, E. M. Jorgensen // *Genetics*. – 2016. – Vol. 202, N 4. – P. 1277–1288.

References

1. Titov L. P. Classification, nomenclature and evolution medically significant bacteria. *Meditsinskii zhurnal* [Medical Journal], 2006, pp. 13–19. (in Russian).
2. Titov L. P., Votyakov V. I., Kozhemiakin A. K., Mosina L. I. Bacterial evolution and its medical value. *Zdravoohranenie* [Health Care], 2002, no. 8, pp. 30–35. (in Russian).
3. 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. *Journal of Bacteriology*, 1987, vol. 169, no. 12, pp. 5429–5433.
4. Jansen R., Embden J. D., Gaastra W., Schouls L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, vol. 43, no. 6, pp. 1565–1575.
5. Makarova K. S., Grishin N. V., Shabalina S. A., Wolf Y. I., Koonin E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 2006, vol. 1, p. 7.
6. Sontheimer E. J., Barrangou R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. *Human Gene Therapy*, 2015, vol. 26, no. 7, pp. 413–424. doi: 10.1089/hum.2015.091.
7. Slaymaker I. M., Gao L., Zetsche B., Scott D. A., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, vol. 351 (6268), pp. 84–88. doi: 10.1126/science.aad5227.
8. Barrangou R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 2015, vol. 32, pp. 36–41. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.008.
9. Shashnikova A. V., Gorjaev A. A., Smirnova N. I. Structure and functional role of bacterial CRISPR system. *Problemy osobo opasnykh infektsii* [Problems of Especially Dangerous Infections], 2011, no. 2 (108), pp. 49–52. (in Russian).
10. Peters J. M., Silvis M. R., Zhao D., Hawkins J. S., Gross C. A., Qi L. S. Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, vol. 27, pp. 121–126.
11. Hale C. R., Zhao P., Olson S., Duff M. O., Graveley B. R., Wells L., Terns R. M., Terns M. P. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, vol. 139, no. 5, pp. 945–956.
12. Abby S. S., Neron B., Menager H., Touchon M., Rocha E. P. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 10, pp. 1–9.
13. Borisenko A. Iu., Dzhioev Iu. P., Paramonov A. I., Bukin Iu. S., Stepanenko L. A., Kolbaseeva O. V., Zlobin I. V. The use of bioinformatics software methods for search CRISPR/Cas systems in genomes of the strains of *Staphylococcus aureus*. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk)* [Siberian Medical Journal (Irkutsk)], 2015, vol. 133, no. 2, pp. 71–74. (in Russian).
14. Savitskaya E. E., Musharova O. S., Severinov K. V. Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology. *Biochemistry*, 2016, vol. 81, no. 7, pp. 653–661.
15. Lee C., Cradick T., Bao G. The Neisseria meningitidis CRISPR-Cas9 System Enables Specific Genome Editing in Mammalian Cells. *Molecular Therapy*, 2016, vol. 24, no. 3, pp. 645–654.
16. Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biology*, 2015, vol. 16, pp. 247–257.
17. Van Houte S., Ekroth A. K., Broniewski, Chabas H., Ashby B., Bondy-Denomy J., Gandon S., Boots M., Paterson S., Buckling A., Westra E. R. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. *Nature*, 2016, vol. 532 (7599), pp. 385–388. doi: 10.1038/nature17436.
18. O'Connell M. R., Oakes B. L., Sternberg S. H., East-Seletsky A., Kaplan M., Doudna J. A. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, vol. 516, no. 7530, pp. 263–266.
19. Makarova K. S., Koonin E. V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology*, 2015, vol. 1311, pp. 47–75.

20. Makarova K. S., Wolf Y. I., Alkhnbashi O. S., Costa F., Shah S. A., Saunders S. J., Barrangou R., Brouns S. J., Charpentier E., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J., Terns R. M., Terns M. P., White M. F., Yakunin A. F., Garrett R. A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E. V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews: Microbiology*, 2015, vol. 13, no. 11, pp. 722–736.
21. Bondy-Denomy J., Garcia B., Strum S., Du M., Rollins M. F., Hidalgo-Reyes Y., Wiedenheft B., Maxwell K. L., Davidson A. R. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, 2015, vol. 526 (7571), pp. 136–139.
22. Hilton I. B., Gersbach C. A. Genetic engineering: Chemical control for CRISPR editing. *Nature Chemical Biology*, 2017, vol. 13, pp. 2–3.
23. Sashital D. G., Wiedenheft B., Doudna J. A. Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Cell*, 2012, vol. 46, pp. 606–615.
24. Sangal V., Fineran P. C., Hoskisson P. A. Novel configurations of type I and II CRISPR-Cas systems in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology*, 2013, no. 159, pp. 2118–2126.
25. Chylinski K., Makarova K. S., Charpentier E., Koonin E. V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 10, pp. 6091–6105.
26. Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K., Makarova K. S., Lřcrivain A. L., Bzdrenga J., Koonin E. V., Charpentier E. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 4, pp. 2577–2590.
27. Vasil'eva E. A., Melino D., Barlev N. A. CRISPR/Cas system for genome editing in pluripotent stem cells. *Tsitologiya* [Cytology], 2015, vol. 57, no. 1, pp. 19–30. (in Russian).
28. Hou Z., Zhang Y., Propson N. E., Howden S. E., Chu L. F., Sontheimer E. J., Sontheimer B., Thomson J. A. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, no. 110, pp. 15644–15649.
29. Merkt S., Martin U. Site-specific genome engineering in human pluripotent stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17 (1000), pp. 1–11.
30. Samson J. E., Magadan A. H., Moineau S. The CRISPR-Cas immune system and genetic transfers: reaching an equilibrium. *Microbiology Spectrum*, 2015, vol. 3, no. 1, pp. 209–218.
31. Bassuk A. G., Zheng A., Li Y., Tsang S. H., Mahajan V. B. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, p. 19969. doi:10.1038/srep19969.
32. Yang Y., Zhang X., Yi L., Hou Z., Chen J., Kou X., Zhao Y., Wang H., Sun X. F., Jiang C., Wang Y., Gao S. Naïve induced pluripotent stem cells generated from β -thalassaemia fibroblasts allow efficient gene correction with CRISPR/Cas9. *Stem Cells Translational Medicine*, 2016, vol. 5, no. 1, pp. 8–19.
33. Goodman M. A., Malik P., Rothenberg M. E. CRISPR/Cas9 in allergic and immunologic diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2016, pp. 1–5.
34. Wang D., Ma Ning, Hui Yang, Gao Xu. The application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in cancer research. *Yi Chuan*, 2016, vol. 38, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.16288/j. ycz.15–252.
35. Li Y., Song Y. H., Liu B., Yu X. Y. The potential application and challenge of powerful CRISPR/Cas9 system in cardiovascular research. *International Journal of Cardiology*, 2016, vol. 9, pp. 191–193.
36. Freedman B. S., Brooks C. R., Lam A. Q., Fu H., Morizane R., Agrawal V., Saad A. F., Li M. K., Hughes M. R., Werff R. V., Peters D. T., Lu J., Baccei A., Siedlecki A. M., Valerius M. T., Musunuru K., McNagny K. M., Steinman T., Zhou J., Lerou P. H., Bonventre J. V. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications*, 2015, vol. 6, pp. 1–13. doi: 10.1038/ncomms9715.
37. Yin H., Xue W., Chen S., Bogorad R. L., Benedetti E., Grompe M., Kotliansky V., Sharp P. A., Jacks T., Anderson D. G. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, 2014, vol. 32, no. 6, pp. 551–553. doi: 10.1038/nbt.2884.
38. Niemann H., Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Research*, 2016, pp. 1–14.
39. Schiml S., Puchta H. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 2016, vol. 12, no. 8, pp. 1–9.
40. Schwartz M. L., Jorgensen E. M. SapTrap, a toolkit for high-throughput CRISPR/Cas9 gene modification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2016, vol. 202, no. 4, pp. 1277–1288. doi: 10.1534/genetics.115.184275.

Информация об авторах

Хархаль Анна Николаевна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna-madlen69@yandex.ru.

Титов Леонид Петрович – член-корреспондент, иностранный член РАМН, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonidtitov@tut.by.

Information about the authors

Anna N. Kharkhal – Junior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna-madlen69@yandex.ru.

Leonid P. Titov – Corresponding Member, Foreign Member of the RAMS, D. Sc. (Med.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonidtitov@tut.by.