

ГЕНЕТИКА, ПРОТЕОМИКА И МЕТАБОЛОМИКА GENETICS, PROTEOMICS AND METABOLOMICS

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ CRISPR-Cas9 В ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Зиганшин А.М.¹,
Мулюков А.Р.¹,
Омаров М.А.¹,
Мудров В.А.²,
Халитова Р.Ш.¹

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский
государственный медицинский
университет» Минздрава России
(450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3, Россия)

² ФГБОУ ВО «Читинская государственная
медицинская академия»
Минздрава России (672000, г. Чита,
ул. Горького, 39а, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Зиганшин Айдар Миндиярович,
e-mail: zigaidar@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Цель данной статьи – провести анализ возможности применения генетических механизмов технологии CRISPR-Cas9 в профилактике и лечении некоторых вирусных заболеваний.

Материалы и методы. Поиск публикаций проводился в российской и зарубежной литературе в следующих поисковых системах: РИНЦ, Cyberleninka, eLibrary, PubMed, библиотека Cochrane и др. Проведён обзор отечественных и международных научных работ по теме исследования с использованием поисковых ключевых слов: CRISPR, геновая инженерия, редактирование генома, Cas9, sgRNA.

Результаты. Проведён обзор использования метода CRISPR-Cas9 («генетических ножниц») в качестве генной терапии некоторых вирусных заболеваний, раскрыты его основные преимущества и недостатки. Анализ данных научных исследований в сфере генетических методов исследования за последнее десятилетие раскрывает основные аспекты технологии CRISPR-Cas9, современную классификацию и перспективы применения данной технологии в клинической практике с целью терапии и профилактики вирусных заболеваний человека. Рассматриваются возможности создания более многофункциональной и стабильной версии технологии CRISPR-Cas9. Особое внимание уделяется технологическим сложностям и препятствиям, которые встанут перед учёными при внедрении данной системы для целевого применения в клинической медицине.

Заключение. Открытие «генетических ножниц» произвело революцию во всей медицине. Перед медицинским сообществом открылись широкие возможности для создания новых методов лечения множества вирусных заболеваний и создания условий для ранней профилактики. В перспективе при внедрении данной технологии в клиническую практику станет возможной терапия нозологий, ранее не отвечавших на проводимую терапию и считавшихся неизлечимыми.

Ключевые слова: CRISPR, геновая инженерия, редактирование генома, Cas9, sgRNA, вирусные заболевания, инфекции

Статья поступила: 04.06.2022
Статья принята: 12.01.2023
Статья опубликована: 02.03.2023

Для цитирования: Зиганшин А.М., Мулюков А.Р., Омаров М.А., Мудров В.А., Халитова Р.Ш. Перспективы применения системы CRISPR-Cas9 в лечении вирусных заболеваний человека. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(1): 40-50. doi: 10.29413/ABS.2023-8.1.5

PROSPECTS FOR USING CRISPR-Cas9 SYSTEM IN THE TREATMENT OF HUMAN VIRAL DISEASES

Ziganshin A.M. ¹,
Mulyukov A.R. ¹,
Omarov M.A. ¹,
Mudrov V.A. ²,
Khalitova R.Sh. ¹

¹ Bashkir State Medical University
(Lenina str. 3, Ufa 450008,
Russian Federation)

² Chita State Medical Academy
(Gorkogo str. 39A, Chita 672000,
Russian Federation)

Corresponding author:
Aydar M. Ziganshin,
e-mail: zigaidar@yandex.ru

ABSTRACT

The aim. To analyze the possibility of using the genetic mechanisms of CRISPR-Cas9 technology in the prevention and treatment of certain viral diseases.

Materials and methods. The search for publications was carried out in Russian and foreign literature using the following search engines: RSCI, Cyberleninka, eLibrary, PubMed, Cochrane Library, etc. A review of domestic and international scientific papers on the research topic was carried out using search keywords: CRISPR, genetic engineering, genome editing, Cas9, sgRNA.

Results. A review of using CRISPR-Cas9 method ("genetic scissors") as a gene therapy for some viral diseases was carried out, and its main advantages and disadvantages were revealed. An analysis of the data of scientific studies on genetic research methods over the past decade discovers the main aspects of CRISPR-Cas9 technology, modern classification and prospects for using this technology in clinical practice for the treatment and prevention of human viral diseases. The possibilities of creating a more versatile and stable version of the CRISPR-Cas9 technology are considered. Particular attention is paid to the technological difficulties and obstacles that scientists face when implementing this system for targeted use in clinical medicine.

Conclusion. One of the rapidly developing areas in science giving promising prospects for modern healthcare is genetic engineering, especially in cases where scientific developments are applied in clinical practice. The discovery of "genetic scissors" technology has revolutionized all medicine. Wide opportunities for developing new treatment methods for many viral diseases and creating conditions for their early prevention opened up for the medical community. In the future, with the introduction of this technology into clinical practice, it will become possible to treat diseases that have not previously responded to ongoing therapy and were considered incurable.

Key words: CRISPR, genetic engineering, genome editing, Cas9, sgRNA, viral diseases, infections

Received: 04.06.2022
Accepted: 12.01.2023
Published: 02.03.2023

For citation: Ziganshin A.M., Mulyukov A.R., Omarov M.A., Mudrov V.A., Khalitova R.Sh. Prospects for using CRISPR-Cas9 system in the treatment of human viral diseases. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(1): 40-50. doi: 10.29413/ABS.2023-8.1.5

РАЗДЕЛ 1. ВВЕДЕНИЕ

Вирусная инфекция представляет значительную опасность для здоровья человека, свидетельством чего является значительная заболеваемость и смертность от COVID-19 [1]. Особенно опасны вирусные инфекции, развитие которых происходит в хронической форме, характеризующаясь периодами обострения и элиминации вируса, обеспечивая пожизненную персистенцию вируса. Существующие в настоящее время в мире противовирусные препараты не обладают высокой специфичностью и эффективностью, что не позволяет преодолеть биологические барьеры для ликвидации вирусного очага. При этом стоит отметить ответную приспособительную способность вирусов к применяемым методам лечения. Несмотря на усовершенствование инвазивных свойств препаратов для преодоления биологических барьеров, развитие заболевания имеет длительное течение, нередко приводящее к гибели реципиента, что показательно для семейств Retroviridae, Herpesviridae и Polyomaviridae [2]. Несмотря на то, что различные виды вирусов имеют разные пути доступа к центральной нервной системе (ЦНС), вирусные инфекции отличаются от других микроорганизмов тем обстоятельством, что в начальной стадии они персистируют на периферии и таким образом получают доступ к структурам ЦНС. Это происходит либо путём непосредственного заражения нервных окончаний, либо опосредованно, компонентами системы кровообращения, транспортирующими вирус, преодолевая гематоэнцефалический барьер в ЦНС. Данные условия требуют разработки более эффективных методов лечения, которым может стать технология «генетических ножниц» [3].

Развитие современных технологий редактирования генома человека дало возможность с помощью генной инженерии открыть большие перспективы в лечении ряда заболеваний, которые ранее являлись неизлечимыми. Впервые структуры CRISPR (регулярно расположенные группами короткие палиндромные повторы, clustered regularly interspaced short palindromic repeats) были обнаружены в геноме *Escherichia coli* в 1987 г. Спустя годы стало известно, что данные последовательности способны накапливаться в результате вторжения подвижных генетических элементов (MGE, mobile genome express): бактериофагов, плазмидов и транспозонов, – в прокариотическую клетку, что составило основу адаптивного и наследуемого иммунитета у бактерий и археев. Археи являются одноклеточными микроорганизмами, не имеющими ядра, а также каких-либо мембранных органелл, и представляют собой домен живых организмов.

К. Макаровой и соавт. (2006) был раскрыт молекулярный механизм данного процесса на примере молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus*; тогда стали подразделять систему CRISPR-Cas на три вида в зависимости от вида белков Cas и механизма, опосредованного его эффекторами. CRISPR-Cas9 в настоящее время применяется в генной инженерии и относится ко II типу в классификации систем CRISPR-Cas [4]. В результате от-

крытия этой технологии стоимость генной инженерии снизилась на 99 %. Сложно передать, насколько CRISPR революционна, но она имеет огромный потенциал, способный навсегда изменить диагностику и терапию многочисленных заболеваний человечества. Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Дудна (2020) получили Нобелевскую премию в области химии за развитие метода редактирования генома – технологию CRISPR-Cas9 [2, 3].

Регулярно расположенные группами короткие палиндромные повторы, локусы (CRISPR) представляют собой прямые повторы коротких нуклеотидных цепей, отличные друг от друга спейсерами – структурными участками ДНК чужеродного генома. В цепи собственного генома клетки хозяина перед рядом повторов локусов, после структур, кодирующих белки Cas, располагается лидерная последовательность, содержащая промотор. Промотор представляет собой последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемую РНК-полимеразой как стартовую площадку для начала транскрипции. Данные структурные элементы определяют способность бактерий распознавать чужеродные агенты, выделяя участки их генома, вырабатывая генетическую память, что в дальнейшем определяет способность осуществлять внутриклеточный иммунный ответ, отвечающий деградацией чужеродных нуклеиновых кислот в случае его повторного проникновения [5–7].

Механизмы иммунного ответа CRISPR-Cas основаны на трёх последовательных этапах: адаптации, экспрессии и интерференции. Вторжение в клетку инородной ДНК инициирует первый этап адаптации, на котором происходит пополнение банка генетической памяти с целью адаптации иммунитета. Реакция белков Cas1-Cas2 в большинстве систем CRISPR-Cas осуществляется в комплексе с мотивом, смежным с протоспейсером (PAM, protospacer adjacent motif), и двуцепочечной ДНК (dsDNA, double-stranded DNA) фагов и плазмид, высвобождая протопространитель в результате двух двуцепочечных разрывов (DSB, double-strand break) [8]. Комплекс двух димеров Cas1, выполняющих каталитическую функцию, и одного димера Cas2, выполняющего структурную функцию, действует подобно интегразе.

Важным участником генерации спейсера выступает мультибелковый комплекс RecBCD в роли хеликазы и нуклеазы, осуществляющий преференциальность выборки, расщепляя dsDNA, вызывая деградацию чужеродного генома вплоть до достижения горячей точки (Chi sites), поскольку приобретение MGE характеризуется необходимостью дифференцировки чужеродных и собственных генетических структур с целью избегания аутоагрессии [9]. Интеграция деградированного фрагмента dsDNA MGE, действующего подобно механизму вирусных интеграз и транспозаз, формирует прокладку из нуклеиновых кислот чужеродного ДНК в массивной структуре CRISPR. Процесс интеграции прокладки в массив CRISPR происходит в результате ряда реакций.

Фактор интеграционного хозяина (IHF, integration host factor) осуществляет U-образную деформацию ДНК хозяина, распознаёт границы лидер-повтора, целевое место, 5'-фосфат проксимального повтора лидера, к ко-

тому по механизму нуклеофильной атаки прикрепляется 3'ОН протопространителя. Следующим шагом является слияние 3'ОН другой протопространительной нити с противоположным концом первого повтора, результатом чего является палиндромная структура мотива в повторе CRISPR, служащая якорем для комплекса Cas1-Cas2, и определение положения второго сайта интеграции [10]. Стоит упомянуть приобретение грунтованной прокладки, характеризующееся усиленным поглощением за счёт взаимодополняемости ранее интегрированными MGE, что служит контрстратегией против фаговых мутантов. Однако основной механизм данного явления до конца не изучен [7].

На стадии экспрессии происходит экспрессия генов *Cas* и транскрипция массива повторов и спейсеров CRISPR в длинный предшественник РНК CRISPR (*pre-crRNA*). Белки *Cas* и вспомогательные факторы превращают *pre-crRNA* в короткую зрелую *crRNA*, способную направлять *Cas* на последовательности-мишени для их распознавания и разрушения. Повороты CRISPR преимущественно являются палиндромами, в результате чего формируются шпильки *pre-crRNA*, которые затем распознаются *Cas*. *Pre-crRNA* разрезается на сегменты *crRNA*, содержащие уникальные последовательности, комплементарные структуре чужеродной цели.

Отмечаются различия в частоте транскрипции одних спейсеров в локусе от других, что объясняется наличием промоторных элементов в последовательности повторов. Данное явление определяет стратегическую выгоду в скорости транскрипции определённых спейсеров, осуществляющих защиту от ретроспективно актуальных инвазивных элементов, обеспечивая быструю и эффективную оборону в стрессовых ситуациях. Этап интерференции представляет собой комплексное действие белковых комплексов *crRNA* и *Cas*, распознающих и деградирующих структуры чужеродных нуклеиновых кислот [5, 6, 11]. Каждый из представленных этапов внутриклеточной иммунологической защиты имеет свои особенности в зависимости от типа системы CRISPR-Cas [7].

РАЗДЕЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛАССОВ И ТИПОВ CRISPR-Cas

Всё разнообразие в системе CRISPR-Cas принято дифференцировать на два класса: класс 1 – I, III и IV типы; класс 2 – II, V и VI типы [12].

Обновлённая классификация систем класса 1 CRISPR-Cas

Класс 1 (I, III и IV типы) представлен многосубъединичным эффекторным комплексом *crRNA*. I тип подразделяется на шесть подтипов: I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F. В большинстве систем I типа *pre-crRNA* обрабатываются рибонуклеазы (RNase) семейства Cas6 (Cas5d в подтипе I-C). Cas6 остаётся привязанным к повторяющемуся фрагменту 3' конца *crRNA* после обработки. Впоследствии каскад собирается в спиралевидную форму морского конька. *CrRNA* является неотъемлемой частью каска-

да, связанной вдоль магистрали и ограниченной Cas5e на 5' конце. Спиральная структура представлена шестью связанными белками Cas7e, которые принимают конформацию с выступающими доменами, ответственными за надёжное соединение субъединиц. Начиная с последнего нуклеотида 5-дюймовой последовательности, выступающие структуры субъединиц изгибают *crRNA* на каждом шестом нуклеотиде.

Пять нуклеотидов выстроены вдоль центрального домена для обеспечения эффективного соединения оснований *crRNA* с целевой ДНК. Cas11e и Cas8e определяются как малые и большие субъединицы каскада соответственно. Распознавание PAM в двуцепочечной ДНК-мишени опосредуется большой субъединицей, инициирующей локальное расщепление цепей ДНК и связывание *crRNA* с нитью протопространителя. Решающие в протопространсерном связывании каскадного комплекса – первые восемь PAM-проксимальных нуклеотидов *crRNA*, за исключением шестого, не связывающегося с целью. В результате связывания нецелевой нити с двумя субъединицами Cas11e происходит образование и стабилизация структуры R-петли, сопровождающиеся существенными конформационными изменениями малыми и большими субъединицами, что позволяет вербовать нуклеазу Cas3, вызывая структурные изменения в белке, активирующие его АТФ-зависимую активность геликазы.

В результате Cas3 транслоцируется и последовательно деградирует нецелевую нить ДНК в 3'-5' направлении, оставляя одноцепочечный разрыв ДНК (*ssDNA*) в 200–300 нуклеотидов (nt). Однако данные фрагменты могут быть промежуточными продуктами деградации, так как представленная частичная деградация *ssDNA* может приводить к полному уничтожению чужеродного агента. Считается, что полная деградация ДНК-мишени опосредуется нуклеазами хозяев либо мощной, каскадно-независимой активностью нуклеазы *ssDNA* Cas3, которая до настоящего времени наблюдалась лишь *in vitro* [7].

На сегодня любопытным для исследования представляется факт, что при наличии идентичной структуры CRISPR-Cas и механизме участия Cas3 существует несколько отличительных особенностей в механизме интерференции подтипов I типа. Подтипы I-A и I-E являются единственными системами, содержащими отдельный ген, кодирующий малую субъединицу. В других подтипах её геном функционально заменяется Cas8. Кроме этого, минимальная каскадная архитектура наблюдается в типе I-C, в котором отсутствует гомолог Cas6 и тип I-Fv (вариант типа I-F), где большие и малые субъединицы отсутствуют и функционально заменяются эффекторными белками Cas5fv и Cas7fv.

Интересная вариация общей формы каскада была обнаружена в типе I-F, в котором основа комплекса наблюдения (*Csu*) имеет короткий спиральный шаг и почти образует замкнутое кольцо. В совокупности результаты многочисленных исследований свидетельствуют о значительной генетической и функциональной пластичности в сохранении общей архитектуры и модуля связывания и обработки РНК (Cas6 и/или Cas5), магистрали (Cas7), распознавания PAM и стабилизации R-петли [3].

Системы типа III CRISPR-Cas используют каскадно-подобные комплексы, называемые Csm для III-A и Cmr для III-B, которые структурно демонстрируют высокое сходство с эффекторными комплексами типа I. Однако в отличие от других описанных интерференционных механизмов, системы типа III нацелены как на РНК, так и на субстраты ДНК. Расщепление ДНК в системе типа III зависит от транскрипции целевой последовательности. Csm и Cmr собираются вдоль зрелой crRNA, которая связана Cas5 (Csm4/Cmr3) на 5' повторяющемся конце.

Основа комплекса представлена белками семейства Cas7 (Csm3 и Csm5 – для типа III-A, Cmr4, Cmr6 и Cmr1 – для типа III-B), в то время как Cas11 (Csm2/Cmr5) и Cas10 являются малыми и большими субъединицами соответственно. Расщепление мишени инициируется связыванием эффекторного комплекса типа III с формирующимся целевым транскриптом, зависимым от образа crRNA. Субъединицы Cas7 (Csm3/Cmr4) расщепляют одноцепочечные РНК (ssRNA) на каждом шестом нуклеотиде. Деление ДНК осуществляется доменом субъединицы Cas10, что требует транскрипции мишени в обеих системах типа III. РНК, принадлежащие к семействам Csm6 или связанным с ним семействам Csx1, часто связаны с системами CRISPR-Cas типа III.

Как Csm6, так и Csx1 неспецифически разрушают чужеродные транскрипты и выполняют вспомогательные функции во время интерференции типа III, даже если они не являются частью эффекторного комплекса [12]. Субъединица Cas10 комплекса Csm, по актуальным данным, не только опосредует расщепление ДНК-мишени, но и преобразует АТФ в циклические аденилаты, действующие как вторичные активаторы Csm6 RNase. Производство Cas10 связано с комплексом Csm и целевой РНК и представляет собой регуляторный механизм, вызывающий существенные стратегические помехи в процессах развития чужеродного агента [9].

Система CRISPR-Cas класса 2 (типы II, V и VI)

В системах типа II применяется эффекторный белок Cas9 – двойная РНК-эндонуклеаза ДНК, необходимая для интерференции и иммунитета в системах типа II. Дифференцировка в А-, В- и С-подтипах системы типа II основана на размерах генов Cas9 и наличии типоспецифических генов. Помимо crRNA, Cas9 требует трансактивирующей crRNA (tracrRNA), небольшой РНК, которая несёт взаимодополняемость с повторяющимися областями crRNA. После того как Cas9 был связан со зрелой двойной РНК (tracrRNA:crRNA) или инженерной однонаправленной РНК (sgRNA), разработанной для инженерных приложений генома, Cas9 идентифицирует целевую ДНК путём распознавания PAM и последующей базовой пары направляющей РНК с ДНК.

Если цель проявляет достаточную взаимодополняемость с направляющей РНК, Cas9 осуществляет двухцепочечный разрыв на 3 пары нуклеотидов (bp) в проксимальном направлении по течению от PAM. Cas9 представляет собой створчатую структуру с центральным локусом, вмещающим дуплекс crRNA:DNA. Доля

α-спирального распознавания (REC) и нуклеазная доля (NUC) соединены неупорядоченным линкером и высококонсервативной богатой аргинином мостовой спиралью, образующей несколько контактов с crRNA. Доля NUC содержит консервативные нуклеазные домены HNH и RuvC и переменный С-концевой домен, который взаимодействует с PAM.

Исследование молекулярных структур показало, что активность Cas9 регулируется посредством присоединения направляющей РНК, что вызывает изменение конформации белка в направлении развития компетентности для связывания с ДНК и распознавания PAM. Комплекс наблюдения, связанный с направляющей РНК, сканирует ДНК и после распознавания комплементарных структур PAM в нецелевой нити индуцирует расщепление ДНК, чтобы позволить направляющей РНК исследовать взаимодополняемость последовательности от 10 до 12 nt в PAM-проксимальной области целевой нити.

Сопряжение оснований между направляющей РНК и целевой ДНК и дополнительные конформационные изменения в Cas9 способствуют дальнейшему вторжению направляющей РНК за пределы последовательности доменов, тем самым стабилизируя структуру R-петли. Конформационная активация домена HNH связана с перестановками петель компоновщика между доменами HNH и RuvC. Эта аллостерическая связь между нуклеазными доменами приводит к согласованному расщеплению целевой нити доменом HNH и нецелевой нити доменом RuvC [12, 13].

Тип V CRISPR-Cas делится на подтипы V-A, V-B и V-C, характеризующиеся эффекторными белками Cas12a (ранее называвшимися Cpf1), Cas12b (C2c1) и Cas12c (C2c3). Учёные выяснили, что филогенетически данные белки произошли независимо от различных транспозонно-ассоциированных нуклеаз семейства TnpV, что проявляется в низком сходстве аминокислотного состава данных белков друг с другом и с Cas9 [7].

Относительно Cas9 и Cas12b, эффекторный белок V-A типа CRISPR-Cas Cas12a не требует tracrRNA для активации. После распознавания PAM для активации эффекторных белков достаточно пары оснований между crRNA и целевой ДНК; как следствие Cas12a и Cas12b расщепляют обе нити ДНК, что приводит к ступенчатым двухцепочечным разрывам с 5- и 7-nt дистальными свесами к PAM соответственно. В отличие от систем типа II, использующих различные структуры PAM, расположенные на нецелевой нити, белки Cas12 распознают PAM обеих нитей ДНК. Важно, что Cas12b не имеет домена распознавания PAM, такого как Cas9 или Cas12a, кроме того, Cas12a и Cas12b требуют продолжительности и последовательности примерно 18 nt, что позволяет считать их перспективными альтернативами Cas9 в вопросе редактирования генома.

При этом в Cas12a происходит расщепление обеих нитей ДНК в одном каталитическом сайте домена RuvC. Обе нити ДНК здесь располагаются в одном и том же каталитическом кармане RuvC, поэтому целевая нить ДНК расщепляется именно данным доменом. Детали каталитических процессов расщепления требуют дальнейше-

го изучения, однако достоверно известно, что Cas12a и Cas12b используют аналогичные механизмы в процессе иммунологической защиты клетки хозяина [9, 13].

Тип VI

Данные, полученные в актуальных исследованиях, позволили провести идентификацию систем типа VI, структурной особенностью которых является содержание двух мотивов RxxxxH. Они характерны исключительно для нуклеотидных доменов высших эукариот (HEPN, higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain). HEPN-содержащий эффекторный белок Cas13, в отличие от других эффекторов класса 2, способен расщеплять ssRNA. Активация Cas13 осуществляется за счёт целевых ssRNA, что дополняется crRNA, результатом чего является деградация не только целевой ssRNA, но и сопутствующих ssRNA, аналогично ферментам Csm6 и Csx1 в системах типа III, однако для функционирования Cas13 не требуется tracrRNA. Cas13a выполняет периферический перенос несоответствий в комплексе crRNA:target ssRNA, но требует центральной последовательности доменов для активности RNase. Cas13a и Cas13b комплексно обрабатывают повторяющиеся области pre-crRNA, но биохимические и структурные исследования показывают различные активные сайты для деградации РНК-активированной РНК и обработки pre-crRNA Cas13a.

При связывании с pre-crRNA Cas13a претерпевает конформационные изменения, стабилизирующие crRNA и облегчающие связывание цели. Связывание целевой ssRNA повышает активность RNase Cas13a, вызывая дальнейшие конформационные изменения, которые морфологически приводят каталитические сайты доменов HEPN в непосредственную близость. В отличие от внутренних активных сайтов других эффекторов класса 2, два HEPN-домена Cas13a образуют составной активный сайт на внешней поверхности фермента [9, 12].

CRISPR-Cas9 представляет собой перспективную технологию редактирования генома, однако существует ряд ограничений и проблем, требующих решения перед его клиническим применением. Одним из самых больших препятствий является эффективность доставки, поскольку CRISPR-Cas9 предполагает внутриклеточный механизм действия. Компоненты CRISPR-Cas9 могут быть доставлены в различных формах: в виде мРНК небольшого размера, имеющих удобную упаковку, или в виде плазмидной ДНК, кодирующей белок Cas9 [8]. Другими преимуществами доставки мРНК являются высокоактивное редактирование генов и контроль за объёмом доставки в клетки. Плазмиды же обладают ограничениями в размере и нецелевом эффекте, но имеют преимущество, обладая стабильностью и гибкостью в проектировании.

Существуют вирусные и невирусные методы доставки материала, такие как электропорация, микроинъекция и липидные наночастицы, но их терапевтическое применение ограничено из-за их относительно низкой эффективности доставки [8]. Наиболее часто используемыми для доставки вирусными векторами в терапевтическом подходе являются аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус и лентивирус из-за их широко-

го диапазона специфичности серотипов и относительно низкой иммуногенности [14]. Ограничение ёмкости упаковки является основной проблемой для доставки CRISPR-Cas9, опосредованной AAV. Одним из решений этого ограничения является использование небольшой версии Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9), которая имеет ту же эффективность редактирования генов, что и SpCas9, но меньший размер. Другой альтернативой является применение двойных AAV для доставки отдельно Cas9-кодирующей ДНК и crRNA [4, 15].

Другой проблемой, требующей решения, является потенциальный нецелевой эффект, вызывающий патогенную мутацию генов и хромосомные транслокации. С целью повышения специфичности экспериментально модулировали систему CRISPR-Cas9, поместив ген Cas9 под контроль минимального промотора ВИЧ-1, опосредованного транскрипционным активатором (Tat, transactivator of transcription), что позволяет избежать излишней экспрессии Cas9. В этом случае Cas9 рибонуклеопротеин Cas9/gRNA (Cas9 RNP) деградирует после редактирования целевой ДНК, что ведёт к максимальному целевому и минимальному нецелевому эффектам. Тем не менее, было доказано, что применение RNP в некоторых видах клеток может вызвать врождённые иммунные реакции, что приводит к цитотоксичности в клетках. Химический синтез и применение фосфатной crRNA для удаления её 5'-ppp может ингибировать врождённые иммунные реакции и цитотоксичность [16].

Дополнительно учёные столкнулись с проблемой механизма негомологичного соединения концов (NHEJ, non-homologous end joining), генерации устойчивых мутантных вирусов, способных противостоять Cas9/sgRNA, вызывая репарацию ДНК в клетках-хозяина. Были предложены различные стратегии для предотвращения развития вирусной устойчивости, такие как использование мультиплексных гидовых РНК (gRNA) для целевого действия на несколько сайтов в геноме с целью снижения генерации жизнеспособного escape-мутанта. Противоположной альтернативной стратегией является комбинированный подход использования терапии CRISPR-Cas9 с противовирусными препаратами и молекулами РНК-интерференции или короткой шпильки РНК. С целью ингибирования путей репарации ДНК NHEJ возможно использование новых Cas9-подобных нуклеаз, таких как Cpf1, которые расщепляют дистальный целевой сайт от PAM с целью снижения его связывания с gRNA. Проводились исследования, показавшие, что таргетинг на некодирующую интергенную последовательность связан с вирусной интерференционной активностью, которая значительно ограничивает создание вирусного эвакuationного мутанта [16].

РАЗДЕЛ 3. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-Cas9 ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Первые эксперименты в лечении ВИЧ-1/СПИД проводились с использованием CRISPR-Cas9 для подавле-

ния экспрессии генов ВИЧ-1, ориентируясь на длинные терминальные повторы (LTR, long terminal repeats). Целевыми сайтами были кластеры связывания NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), расположенные в U3-области последовательностей LTR-и R-областей TAR (trains acting responsive), что привело к эффективному ингибированию транскрипции и репликации генома вируса ВИЧ-1. Иным аспектом является возможность расщепления генома вируса CRISPR-Cas9 Cas9/gRNA с целью инактивации экспрессии вирусных генов и ограничения репликации вируса в скрыто инфицированной линии Т-клеток, промоноцитической клеточной линии и микроглиальной клеточной линии с небольшой генотоксичностью [17–19].

Имеются данные о мутационной ликвидации провируса ВИЧ-1 воздействием crRNA на последовательность LTR и основные гены репликации вируса и инактивации целевого сайта мутацией. Несколько исследований подтвердили, что CRISPR-Cas9 может деградировать неинтегрированный ВИЧ-1, а также опосредованным NHEJ репарировать ДНК, что приведёт к сокращению интегрированного провируса ВИЧ-1 [4, 20]. Обрезание провирусной ДНК ВИЧ-1 продемонстрировало эффективность нарушения провируса ВИЧ-1 с помощью AAV в сочетании с мультиплексными sgRNAs и SaCas9. Квадруплекс sgRNA/SaCas9 AAV-DJ/8, внутривенно вводимый мышам Tg26, может расщеплять провирусную ДНК ВИЧ-1 и значительно уменьшить его репликацию. После внутривенной инъекции sgRNA/SaCas9 AAV-DJ/8 в тканях костного мозга/печени и тимуса (BLT), инфицированных ВИЧ-1, расщепление провируса было обнаружено в головном мозге, толстой кишке, селезёнке, сердце и лёгких. Первое успешное применение иссечения и устранения провирусной ДНК ВИЧ-1 SaCas9/gRNA *in vivo*, поставляемой AAV, заложило основу для разработки клинических испытаний на людях [21–23].

Инактивация корцепторов CCR5 и CXCR4 по технологии CRISPR-Cas9 дала возможность применения CRISPR-Cas9 для блокирования инвазии ВИЧ-1 путём редактирования рецепторов мишеней для ВИЧ-1 – CD4 и корцепторов CCR5 или CXCR4 (нарушение CD4 является нецелесообразным). Использование данного метода дало наиболее обнадеживающие результаты, поскольку трансплантация CCR5 Δ 32 не получила широкого применения. CRISPR-Cas9 в данном случае обеспечивает целевые площадки с простым дизайном и плазмидной конструкцией. Данный метод даёт огромный потенциал в диагностике нарушений экспрессии CCR5 и CXCR4, что было доказано в эксперименте на клетках 293T эмбриональной почки человека (HEK) путём трансфекции Cas9 и sgRNA и индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (iPSC). CCR5-модифицированные iPSC обычно могут дифференцироваться на моноциты/макрофаги, устойчивые к инфекции ВИЧ-1 [24].

На сегодня доказано сохранение функциональных свойств CXCR4-дефицитных Т-клеток человека в модели мыши, а также возможность использования рекомбинантной технологии CRISPR-Cas9 и транспортной системы piggyBac для создания мутантной CXCR4 P191A

с функцией ингибирования инфекции ВИЧ-1 и без дефицита функции CXCR4, что даёт возможность редактирования CRISPR-Cas9 CXCR4 в зрелых посттимиических CD4⁺ Т-клетках человека с целью терапии ВИЧ-1/СПИД [25, 26].

Альтернативной стратегией реактивации факторов защиты клеток хозяина при инфекции ВИЧ-1 является активация факторов рестрикции, экспрессия которых ингибирована в инфицированных ВИЧ-1 клетках. Доказана эффективность применения двух sgRNA в процессе Cas9-опосредованного индуцирования экспрессии факторов ограничения APOBEC3G (A3G) и APOBFC3B (A3B). Однако исследования по применению технологии CRISPR-Cas9 для активации клеточных факторов-хозяев для подавления ВИЧ-1 инфекции ограничены. При этом недавно обнаруженные факторы ограничения, такие как serine incorporator five (SERINC5), человеческий центр заглушения (HUSH), состоящий из TASOR, MPP8 и перифилина и капсид-связывающего фактора для циклической иммунной активации GMP-AMP (сGAS) в макрофагах и дендритных клетках, NONO, могут стать новыми целями рассмотрения в вопросе применения данного метода [26, 27].

Нейротропный полиомавирус человека JC (JCV) является возбудителем прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (PML), встречающейся у пациентов с ВИЧ-1/СПИД и пациентов, проходящих иммуномодулирующее лечение аутоиммунных расстройств. Сероэпидемиологические исследования показали, что инфекция JCV широко распространена среди 80 % населения Земли, что обусловлено постоянной бессимптомной персистенцией, и проявляется она при иммунодефицитных состояниях. Геном JCV представлен круговой двухцепочечной ДНК, кодирующей последовательности раннего вирусного Т-антигена, определяющего вирулентность и обеспечивающего репликации новых вирусных частиц. ДНК вируса обнаруживается лишь в нейроглиальных клетках здорового мозга. Безуспешность применяемых в настоящее время вариантов лечения требует разработки альтернативного подхода. Имеются данные о применении CRISPR-Cas9 для инактивации участка генома, кодирующего Т-антиген, путём мутации Cas9- и gRNA-опосредованной N-концевой области Т-антигена, ведущей к нарушению его экспрессии [28, 29].

Одной из распространённых заболеваний является хроническая инфекция **вируса гепатита В** (HBV, hepatitis B virus), которая является основной причиной цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. После инфицирования вирусный геном транспортируется в ядро клетки для преобразования в высокостабильную ковалентно-замкнутую круговую ДНК (cccDNA, covalently closed circular DNA) [30, 31]. В качестве нового подхода к терапии хронического HBV можно использовать CRISPR-Cas9 для инактивации cccDNA *in vitro* и *in vivo*. Мутации генома HBV, опосредованные CRISPR-Cas9, приводят к значительному снижению уровня белков HepG2, HepG2.2.15, HepG2-H1.3 и Huh-7. Актуальные исследования показали способность системы CRISPR-Cas9 ликвидировать интегрированный cccDNA вируса. Также была

продемонстрирована потенциальная возможность противоопухолевого применения CRISPR-Cas9 путём целевой мутации гена *HbsAg*, ведущей к подавлению опухолевой прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы [32].

Важную роль в исследовании занимает семейство вирусов герпеса, которое также характеризуется хронической первичной персистенцией инфекции и реактивацией при определённых физиологических условиях. Современные нуклеотидные препараты лишь ингибируют ДНК-полимеразу, что неперспективно относительно применения CRISPR-Cas9, целенаправленно нарушающего вирусный геном [33].

Вирус простого герпеса типа 1 (HSV-1), имея dsDNA строение генома, также является потенциальной целевой мишенью для CRISPR-Cas9 в вопросе аброгации инфекции эпителия и фибробластных клеток. Также в случае HSV-1 стратегически выгодным является вирусный механизм задержки ранней продукции вирусных частиц в период латентной персистенции, так как существует возможность возникновения эвакуационных инсерционно-делеционных вирусных мутантов (InDel, insertions deletions). Данная методика требует дальнейшего исследования, ведь имеется потенциал применения CRISPR-Cas9 с использованием gRNA для первичной профилактики таких состояний, как вирусно-индуцированная слепота, связанная с HSV-1, вирусный энцефалит и язва полости рта, болезнь Альцгеймера, множественный склероз и эпилепсия [34].

Вирус Эпштейна – Барр (EBV, Epstein – Barr virus) представляет собой γ -вирус герпеса, который с момента его открытия в 1964 г. и до наших дней не получил клинически одобренной терапии. Опосредованно малыми интерферирующими РНК (siRNA, small interfering RNA) нарушениями основного гена *EBV, EBNA1* был достигнут анти-EBV эффект, но не ликвидация генома вируса из клетки хозяина. Сегодня проводятся исследования целевого действия Т-клеток на опухолевый антиген EBV. Однако с целью инактивации генома γ -вируса герпеса из инфицированных клеток применим подход, основанный на CRISPR-Cas9; имеющийся экспериментальный опыт даёт весьма обнадеживающие результаты и описывается в докладах ряда исследователей [33, 35].

Цитомегаловирус человека (HCMV, human cytomegalovirus) – это dsDNA β -вирус, который, подобно другим герпесвирусам по механизму вирусной задержки, поддерживает вирусный геном в инфицированных клетках без производства вирионов. Результаты экспериментов, проводимых над HCMV с применением мультиплексного подхода CRISPR-Cas9-gRNA для ограничения продуктивной инфекции CMV в клеточных линиях человека, привели к развитию escape-мутанта, но в то же время продемонстрировали успешное ингибирование репликации HCMV с целевым действием CRISPR-Cas9 на основные вирусные гены, такие как *UL122/123* [33, 36].

Особый интерес представляют вирусы папилломы человека, представляющие собой неболочечные небольшие dsDNA-вирусы. Заражение происходит через кожные или слизистые эпителиальные клетки, генитальные ткани и верхние дыхательные пути. Высокоонкоген-

ные штаммы HPV представляют 95 % причин развития рака анального канала, 70 % причин развития рака ротоглотки, 60 % причин развития рака влагалища, а также являются основной причиной развития рака шейки матки, связанного с высокой смертностью [37].

Существующие в настоящее время вакцины предотвращают заражение вирусом, но не обеспечивают защиту инфицированных, а также значительно ограничены в спектре генотипов HPV, не обладающих перекрёстным эффектом. Методика применения CRISPR-Cas9 в комбинации с текущим доступным противораковым препаратом может стать эффективным лечением в онкологии, особенно в случаях, связанных с HR-HPV. Эксперименты с внутриопухолевым введением CRISPR-Cas9, опосредованного E6 и E7 HPV, приводили к развитию инактивирующих мутаций InDel, что связано с индукцией белков p53 или pRb, и способны приводить к остановке клеточного цикла вплоть до гибели клеток. Использование CRISPR-Cas9, нацеленной на онкогены E6 и E7 HPV16 в сочетании с Cisplatin *in vitro* и *in vivo*, может послужить в качестве эффективной терапии рака шейки матки у женщин [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, система CRISPR-Cas9 обладает огромным потенциалом для применения в генной инженерии человека как *in vivo*, так и *in vitro*, однако существуют определённые вопросы, связанные с внедрением данной технологии в клиническую практику. Одной из основных проблем является нецелевой эффект системы, что обуславливает возникновение побочных мутаций. Ряд факторов, таких как уровень выражения Cas9, целевая последовательность и методы количественной оценки, определяют скорость расщепления нецелевого уровня Cas9.

Вероятно, эти мутации возникают в результате случайного разрыва и репарации ДНК, но механизмы репарации, мутации и рекомбинации вирусной ДНК в клетке-хозяине после расщепления CRISPR-Cas9 ещё только предстоит изучить. В некоторых случаях нецелевые мутации могут проявляться с большей частотой, чем необходимая целевая последовательная мутация, но механизм данного феномена на данном этапе остаётся непонятным, поэтому необходимы дальнейшие более углублённые исследования в данной области.

В будущем исследования должны быть сосредоточены на разработке нового надёжного и более целевого метода для повышения специфичности и направленности технологии CRISPR-Cas9. Для успешного применения системы CRISPR-Cas в генной терапии новая стратегия исследований также должна быть сосредоточена на улучшении частоты и эффективности сайт-специфической нуклеазы, особенно при редактировании генома. Немаловажная роль в успешном применении данной технологии принадлежит доставке компонентов CRISPR-Cas9 в клетки-мишени. Используемая сейчас система доставки не является конкретной и вы-

сокоэффективной, особенно в сфере биобезопасности, поэтому предстоит разработка безопасных и эффективных методов доставки.

Другая проблема учёных – это NHEJ, приводящее к генерации устойчивых мутантных вирусов, способных противостоять Cas9/sgRNA, вызывая при этом репарацию ДНК в клетках-хозяина. Такие ограничения использования технологии редактирования генома открывают возможности для новых исследований, поэтому применение CRISPR-Cas9 в клинической практике нуждается в существенном улучшении метода, результатом которого может стать развитие перспективного направления для терапии широкого ряда заболеваний.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиганшин А.М., Мулюков А.Р. Механизмы иммунопатологии сепсиса вирусной этиологии при COVID-19. *Сибирское медицинское обозрение*. 2021; (6): 35-43. doi: 10.20333/25000136-2021-6-35-43
2. Bellizzi A, Ahye N, Jalagadugula G, Wollebo HS. A broad application of CRISPR Cas9 in infectious diseases of central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2019; 14(4): 578-594. doi: 10.1007/s11481-019-09878-7
3. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J Bacteriol*. 2018; 200(7): e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17
4. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. 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. *Biol Direct*. 2006; 1:7. doi: 10.1186/1745-6150-1-7
5. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnol*. 2016; 34(9): 933-941. doi: 10.1038/nbt.3659
6. Bollen Y, Post J, Koo BK, Snippet HJG. How to create state-of-the-art genetic model systems: Strategies for optimal CRISPR-mediated genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46(13): 6435-6454. doi: 10.1093/nar/gky571
7. Zhuo C, Zhang J, Lee JH, Jiao J, Cheng D, Liu L, et al. Spatiotemporal control of CRISPR/Cas9 gene editing. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6(1): 238. doi: 10.1038/s41392-021-00645-w
8. Chen S, Lee B, Lee AY, Modzelewski AJ, He L. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J Biol Chem*. 2016; 291(28): 14457-14467. doi: 10.1074/jbc.M116.733154
9. Tong S, Moyo B, Lee CM, Leong K, Bao G. Engineered materials for in vivo delivery of genome-editing machinery. *Nat Rev Mater*. 2019; 4: 726-737. doi: 10.1038/s41578-019-0145-9
10. D'Agostino Y, D'Aniello S. Molecular basis, applications and challenges of CRISPR/Cas9: A continuously evolving tool for genome editing. *Brief Funct Genomics*. 2017; 16(4): 211-216. doi: 10.1093/bfgp/elw038
11. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnol*. 2015; 33(5): 543-548. doi: 10.1038/nbt.3198
12. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020; 18(2): 67-83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
13. Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*. 2017; 550(7676): 407-410. doi: 10.1038/nature24268
14. Crystal RG. Adenovirus: The first effective *in vivo* gene delivery vector. *Hum Gene Ther*. 2014; 25(1): 3-11. doi: 10.1089/hum.2013.2527
15. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature Med*. 2019; 25(2): 249-254. doi: 10.1038/s41591-018-0326-x
16. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013; 31(9): 822-826. doi: 10.1038/nbt.2623
17. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 2014; 384(9939): 258-271. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60164-1
18. Bialek JK, Dunay GA, Voges M, Schäfer C, Spohn M, Stucka R, et al. Targeted HIV-1 latency reversal using CRISPR/Cas9-derived transcriptional activator systems. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0158294. doi: 10.1371/journal.pone.0158294
19. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*. 2013; 3: 2510. doi: 10.1038/srep02510
20. Darcis G, Das AT, Berkhout B. Tackling HIV persistence: Pharmacological versus CRISPR-based shock strategies. *Viruses*. 2018; 10(4): 157. doi: 10.3390/v10040157
21. Dash PK, Kaminski R, Bella R, Su H, Mathews S, Ahooyi TM, et al. Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected humanized mice. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 2753. doi: 10.1038/s41467-019-10366-y
22. Bella R, Kaminski R, Mancuso P, Young WB, Chen C, Sariyer R, et al. Removal of HIV DNA by CRISPR from patient blood engrafts in humanized mice. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018; 12: 275-282. doi: 10.1016/j.omtn.2018.05.021
23. Cheng R, Peng J, Yan Y, Cao P, Wang J, Qiu C, et al. Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS Lett*. 2014; 588(21): 3954-3958. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.008
24. Herrera-Carrillo E, Berkhout B. Attacking HIV-1 RNA versus DNA by sequence-specific approaches: RNAi versus CRISPR-Cas. *Biochem Soc Trans*. 2016; 44(5): 1355-1365. doi: 10.1042/BST20160060
25. Badia R, Ballana E, Castellví M, García-Vidal E, Pujantell M, Clotet B, et al. CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir. *Nature Communications*. 2018; 9(1): 2739. doi: 10.1038/s41467-018-05157-w
26. Dufour C, Claudel A, Joubarne N, Merindol N, Maisonneuve T, Masroori N, et al. Editing of the human TRIM5 gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1. *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191709. doi: 10.1371/journal.pone.0191709

27. Bogerd HP, Kornepati AV, Marshall JB, Kennedy EM, Culen BR. Specific induction of endogenous viral restriction factors using CRISPR/Cas-derived transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(52): E7249–E7256. doi: 10.1073/pnas.1516305112
28. Chou YY, Krupp A, Kaynor C, Gaudin R, Ma M, Cahir-McFarland E, et al. Inhibition of JCPyV infection mediated by targeted viral genome editing using CRISPR/Cas9. *Sci Rep*. 2016; 6: 36921. doi: 10.1038/srep36921
29. Wollebo HS, Bellizzi A, Kaminski R, Hu W, White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 system as an agent for eliminating polyomavirus JC infection. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0136046. doi: 10.1371/journal.pone.0136046
30. Bloom K, Maepa MB, Ely A, Arbutnot P. Gene therapy for chronic HBV – Can we eliminate cccDNA? *Genes (Basel)*. 2018; 9(4): 207. doi: 10.3390/genes9040207
31. Chang J, Guo JT. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure. *Antiviral Res*. 2015; 121: 152–159. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.07.006
32. Dong C, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res*. 2015; 118: 110–117. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015
33. Chen YC, Sheng J, Trang P, Liu F. Potential application of the CRISPR/Cas9 system against herpesvirus infections. *Viruses*. 2018; 10(6): 291. doi: 10.3390/v10060291
34. Itzhaki RF. Corroboration of a major role for herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2018; 10: 324. doi: 10.3389/fnagi.2018.00324
35. Cohen JI, Fauci AS, Varmus H, Nabel GJ. Epstein – Barr virus: An important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med*. 2011; 3(107): 107fs7. doi: 10.1126/scitranslmed.3002878
36. Gergen J, Coulon F, Creneguy A, Elain-Duret N, Gutierrez A, Pinkenburg O, et al. Multiplex CRISPR/Cas9 system impairs HCMV replication by excising an essential viral gene. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0192602. doi: 10.1371/journal.pone.0192602
37. Gravitt PE. Evidence and impact of human papillomavirus latency. *Open Virol J*. 2012; 6: 198–203. doi: 10.2174/1874357901206010198
38. Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int*. 2014; 6: 612823. doi: 10.1155/2014/612823
4. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. 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. *Biol Direct*. 2006; 1: 7. doi: 10.1186/1745-6150-1-7
5. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnol*. 2016; 34(9): 933–941. doi: 10.1038/nbt.3659
6. Bollen Y, Post J, Koo BK, Snippert HJG. How to create state-of-the-art genetic model systems: Strategies for optimal CRISPR-mediated genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46(13): 6435–6454. doi: 10.1093/nar/gky571
7. Zhuo C, Zhang J, Lee JH, Jiao J, Cheng D, Liu L, et al. Spatiotemporal control of CRISPR/Cas9 gene editing. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6(1): 238. doi: 10.1038/s41392-021-00645-w
8. Chen S, Lee B, Lee AY, Modzelewski AJ, He L. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J Biol Chem*. 2016; 291(28): 14457–14467. doi: 10.1074/jbc.M116.733154
9. Tong S, Moyo B, Lee CM, Leong K, Bao G. Engineered materials for in vivo delivery of genome-editing machinery. *Nat Rev Mater*. 2019; 4: 726–737. doi: 10.1038/s41578-019-0145-9
10. D'Agostino Y, D'Aniello S. Molecular basis, applications and challenges of CRISPR/Cas9: A continuously evolving tool for genome editing. *Brief Funct Genomics*. 2017; 16(4): 211–216. doi: 10.1093/bfgp/elw038
11. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnol*. 2015; 33(5): 543–548. doi: 10.1038/nbt.3198
12. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020; 18(2): 67–83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
13. Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*. 2017; 550(7676): 407–410. doi: 10.1038/nature24268
14. Crystal RG. Adenovirus: The first effective *in vivo* gene delivery vector. *Hum Gene Ther*. 2014; 25(1): 3–11. doi: 10.1089/hum.2013.2527
15. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature Med*. 2019; 25(2): 249–254. doi: 10.1038/s41591-018-0326-x
16. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2013; 31(9): 822–826. doi: 10.1038/nbt.2623
17. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 2014; 384(9939): 258–271. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60164-1
18. Bialek JK, Dunay GA, Voges M, Schäfer C, Spohn M, Stucka R, et al. Targeted HIV-1 latency reversal using CRISPR/Cas9-derived transcriptional activator systems. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0158294. doi: 10.1371/journal.pone.0158294
19. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*. 2013; 3: 2510. doi: 10.1038/srep02510

REFERENCES

1. Ziganshin AM, Mulykov AR. Immunopathological mechanisms in sepsis of viral etiology in COVID-19. *Siberian Medical Review*. 2021; (6): 35–43. (In Russ.). doi: 10.20333/25000136-2021-6-35-43

2. Bellizzi A, Ahye N, Jalagadugula G, Wollebo HS. A broad application of CRISPR Cas9 in infectious diseases of central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2019; 14(4): 578–594. doi: 10.1007/s11481-019-09878-7

3. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J Bacteriol*. 2018; 200(7): e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17

20. Darcis G, Das AT, Berkhout B. Tackling HIV persistence: Pharmacological versus CRISPR-based shock strategies. *Viruses*. 2018; 10(4): 157. doi: 10.3390/v10040157
21. Dash PK, Kaminski R, Bella R, Su H, Mathews S, Ahooyi TM, et al. Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected humanized mice. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 2753. doi: 10.1038/s41467-019-10366-y
22. Bella R, Kaminski R, Mancuso P, Young WB, Chen C, Sarier R, et al. Removal of HIV DNA by CRISPR from patient blood engrafts in humanized mice. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018; 12: 275-282. doi: 10.1016/j.omtn.2018.05.021
23. Cheng R, Peng J, Yan Y, Cao P, Wang J, Qiu C, et al. Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS Lett*. 2014; 588(21): 3954-3958. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.008
24. Herrera-Carrillo E, Berkhout B. Attacking HIV-1 RNA versus DNA by sequence-specific approaches: RNAi versus CRISPR-Cas. *Biochem Soc Trans*. 2016; 44(5): 1355-1365. doi: 10.1042/BST20160060
25. Badia R, Ballana E, Castellví M, García-Vidal E, Pujantell M, Clotet B, et al. CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir. *Nature Communications*. 2018; 9(1): 2739. doi: 10.1038/s41467-018-05157-w
26. Dufour C, Claudel A, Joubarne N, Merindol N, Maisonneuve T, Masroori N, et al. Editing of the human TRIM5 gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1. *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191709. doi: 10.1371/journal.pone.0191709
27. Bogerd HP, Kornepati AV, Marshall JB, Kennedy EM, Cullen BR. Specific induction of endogenous viral restriction factors using CRISPR/Cas-derived transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(52): E7249-E7256. doi: 10.1073/pnas.1516305112
28. Chou YY, Krupp A, Kaynor C, Gaudin R, Ma M, Cahir-McFarland E, et al. Inhibition of JCPyV infection mediated by targeted viral genome editing using CRISPR/Cas9. *Sci Rep*. 2016; 6: 36921. doi: 10.1038/srep36921
29. Wollebo HS, Bellizzi A, Kaminski R, Hu W, White MK, Khalili K. CRISPR/Cas9 system as an agent for eliminating polyomavirus JC infection. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0136046. doi: 10.1371/journal.pone.0136046
30. Bloom K, Maepa MB, Ely A, Arbutnot P. Gene therapy for chronic HBV – Can we eliminate cccDNA? *Genes (Basel)*. 2018; 9(4): 207. doi: 10.3390/genes9040207
31. Chang J, Guo JT. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure. *Antiviral Res*. 2015; 121: 152-159. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.07.006
32. Dong C, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res*. 2015; 118: 110-117. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015
33. Chen YC, Sheng J, Trang P, Liu F. Potential application of the CRISPR/Cas9 system against herpesvirus infections. *Viruses*. 2018; 10(6): 291. doi: 10.3390/v10060291
34. Itzhaki RF. Corroboration of a major role for herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2018; 10: 324. doi: 10.3389/fnagi.2018.00324
35. Cohen JI, Fauci AS, Varmus H, Nabel GJ. Epstein – Barr virus: An important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med*. 2011; 3(107): 107fs7. doi: 10.1126/scitranslmed.3002878
36. Gergen J, Coulon F, Creneguy A, Elain-Duret N, Gutierrez A, Pinkenburg O, et al. Multiplex CRISPR/Cas9 system impairs HCMV replication by excising an essential viral gene. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0192602. doi: 10.1371/journal.pone.0192602
37. Gravitt PE. Evidence and impact of human papillomavirus latency. *Open Virol J*. 2012; 6: 198-203. doi: 10.2174/1874357901206010198
38. Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int*. 2014; 6: 612823. doi: 10.1155/2014/612823

Сведения об авторах

Зиганшин Айдар Миндиярович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом ИДПО, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: zigaidar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5474-1080>

Мулюков Айрат Рамильевич – студент, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: mulykov.165@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7490-3710>

Омаров Магомед Абдурахманович – студент, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: mmaaggaa_omarov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1061-3006>

Мудров Виктор Андреевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии лечебного и стоматологического факультетов, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, e-mail: mudrov_viktor@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5961-5400>

Халитова Регина Шамильевна – аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом ИДПО, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: regina_badranova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2629-2051>

Information about the authors

Aydar M. Ziganshin – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology with the course of the Institute of Advanced Professional Education, Bashkir State Medical University, e-mail: zigaidar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5474-1080>

Airat R. Mulykov – Student, Bashkir State Medical University, e-mail: mulykov.165@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7490-3710>

Magomed A. Omarov – Student, Bashkir State Medical University, e-mail: mmaaggaa_omarov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1061-3006>

Viktor A. Mudrov – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Faculties of Medicine and Dentistry, Chita State Medical Academy, e-mail: mudrov_viktor@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5961-5400>

Regina Sh. Khalitova – Postgraduate at the Department of Obstetrics and Gynecology with the course of the Institute of Advanced Professional Education, Bashkir State Medical University, e-mail: regina_badranova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2629-2051>