

ФОТОРЕГУЛИРУЕМЫЕ НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

© 2024 г. Л.В. Саковина*, **, Е.С. Горленко*, **, Д.С. Новопашина*, **, #

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
просп. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

**Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия

#E-mail: danov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 17.01.2024 г.

После доработки 17.01.2024 г.

Принята к публикации 21.02.2024 г.

Повышение эффективности и точности систем геномного редактирования является актуальной задачей современной молекулярной биологии и генетической инженерии. Особый интерес вызывает создание регулируемых систем CRISPR/Cas, активностью которых можно управлять с использованием различных физико-химических стимулов, таких как облучение светом, изменение pH, температура, изменение концентраций определенных веществ и др. Многообещающим направлением в этой области является разработка подходов к регуляции активности на уровне направляющей РНК за счет введения фоточувствительных модификаций в структуру и последовательность направляющей РНК, а также вспомогательных олигонуклеотидов. Данный обзор посвящен анализу работ в области создания фоточувствительных направляющих РНК и их использования в системах редактирования генома CRISPR.

Ключевые слова: регулируемые системы CRISPR/Cas9, УФ-облучение, направляющая РНК, фоторасщепляемый линкер, фотоблокирующие олигонуклеотиды.

DOI: 10.31857/S0006302924030012, EDN: OGPSDR

Создание контролируемых молекулярно-биологических систем, в том числе систем геномного редактирования, является перспективным подходом к получению регулируемых в пространстве и времени инструментов, которые могут быть использованы в различных областях клеточной и молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии, агробиологии и биоорганической химии.

В настоящее время синтетические олигонуклеотиды широко применяются в молекулярной биологии и биохимии для регуляции таких фундаментальных биологических процессов, как транскрипция и трансляция. Фотоблокированные молекулы ДНК и РНК, содержащие в своей цепи фоточувствительные блокирующие группы или фоторасщепляемые линкеры, могут применяться для фоторегуляции экспрессии генов. Такой подход, основанный на использовании

фотолабильных групп, позволяет исследователям проводить эксперименты с высоким пространственно-временным разрешением, так как исключена возможность проявления биологической активности олигонуклеотида до момента облучения. Эта стратегия была успешно использована для контролируемой регуляции экспрессии генов с помощью фотоблокированных антисмысловых олигонуклеотидов [1], малых интерферирующих РНК [2, 3], микроРНК [4] и анти-микроРНК [5], для контролируемого редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas (CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) — регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов) [6, 7], а также в других областях молекулярной биологии и биохимии [8].

Открытие систем иммунитета бактерий, а именно CRISPR-систем, позволило создать уникальный инструмент геномного редактирования. В частности, система CRISPR/Cas9 в настоящее время является мощным инструментом редактирования генов *in vivo* [9–11]. Всего два компонента системы, нуклеаза Cas9 и единая направляющая РНК (sgРНК), формируют эффекторный

Сокращения: CRISPR — регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), sgРНК — объединенная направляющая рибонуклеиновая кислота (single guide RNA), crРНК — CRISPR РНК, tracrРНК — транс-активирующая CRISPR РНК (trans-activating CRISPR RNA), УФ — ультрафиолетовый.

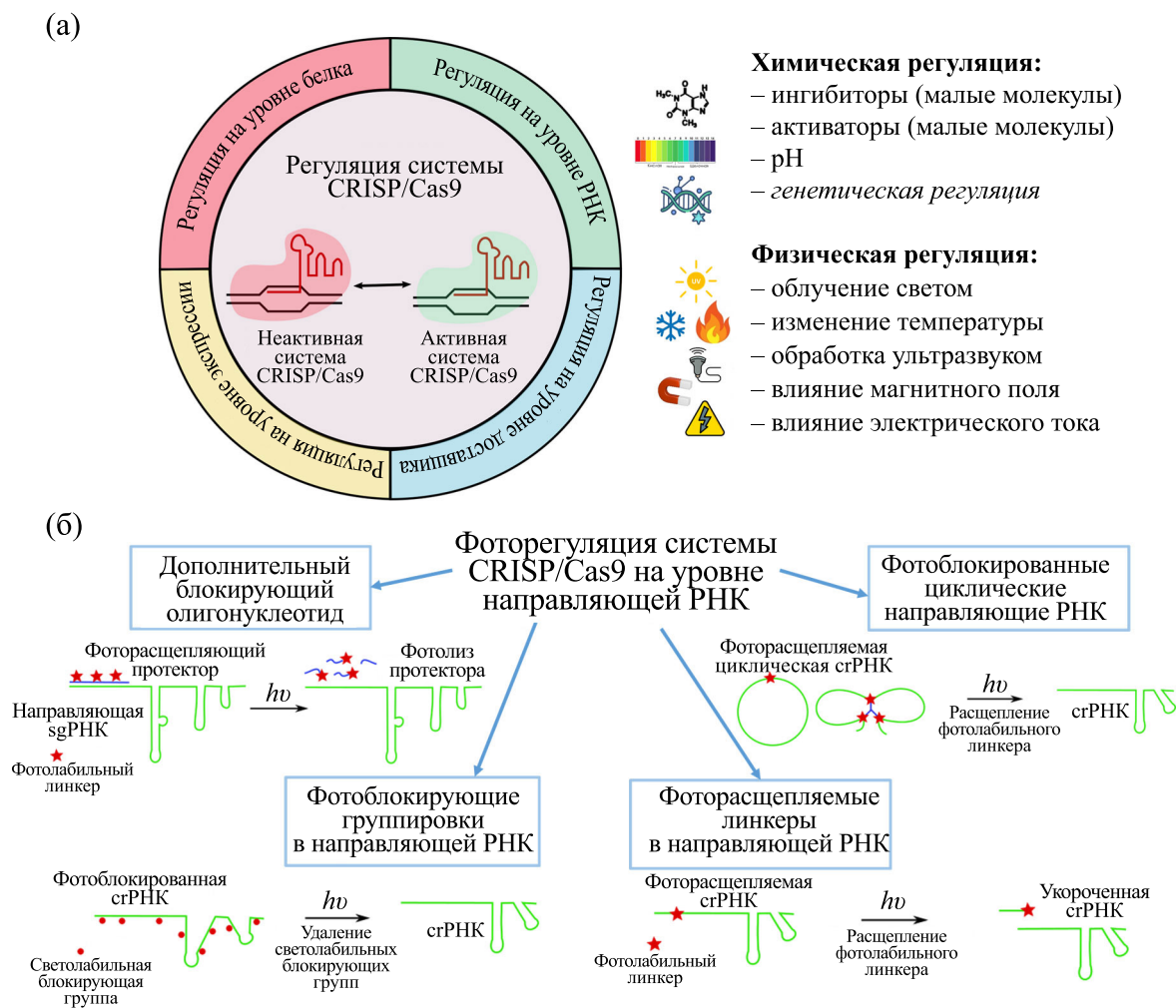


Рис. 1. (а) – Подходы к регуляции систем CRISPR/Cas9. (б) – Варианты фоторегуляции системы CRISPR/Cas9 на уровне направляющей РНК.

комплекс и вносят двуцепочечные разрывы в определенные последовательности ДНК. В другом варианте используется пара направляющих РНК, CRISPR-РНК и *транс*-активирующая РНК (сгРНК/*trac*сРНК), в комплексе с нуклеазой Cas9. Разработка подходов к контролируемому включению и выключению системы CRISPR/Cas9 является одной из актуальных задач синтетической биологии, молекулярной биологии, биоорганической химии и генетической инженерии [12].

В настоящее время созданы платформы CRISPR, регулируемые физическими стимулами: облучением, магнитным полем, температурным или ультразвуковым воздействием [13, 14]. Воздействие физическими факторами на такие системы позволяет контролировать активность, структуру, функции, транспорт, экспрессию и выведение компонентов CRISPR/Cas9-систем из организма (рис. 1а).

Фотоконтролируемые элементы могут быть введены в состав белковой компоненты системы, в направляющую РНК или доставляющий агент. Необходимо отметить, что большинство работ по созданию фоторегулируемых систем геномного редактирования в настоящее время выполнено на системе CRISPR/Cas9 и существует лишь несколько работ по созданию других типов фоторегулируемых систем геномного редактирования [15].

В литературе описаны подходы с использованием фотоактивируемой CRISPR-системы, в которой белок Cas9 конъюгирован с другими фоточувствительными биомолекулами [7, 16, 17] или содержит фотомодифицированный аминокислотный остаток [18, 19]. Активно разрабатываются и используются фотоактивируемые системы геномного редактирования, регулируемые на уровне доставщиков [20–22].

Достаточно большое количество работ посвящено созданию фоторегулируемых систем CRISPR/Cas9, в которых используются подходы к регуляции на уровне направляющих РНК. Данный обзор посвящен именно таким регулируемым системам геномного редактирования.

ПОДХОДЫ К ФОТОРЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ CRISPR/Cas9 НА УРОВНЕ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК

В настоящее время в области создания фоторегулируемых направляющих РНК для систем CRISPR можно выделить четыре основных направления: 1) использование дополнительных блокирующих олигонуклеотидов, облучение которых приводит к их разрушению и активации направляющей РНК; 2) введение фотоблокирующих группировок в состав направляющих РНК для активации РНК путем облучения; 3) введение фоторасщепляемых линкеров в состав направляющих РНК, позволяющих разрушить направляющую РНК облучением и дезактивировать систему; 4) создание кольцевых или замкнутых направляющих РНК, которые не активны до облучения, а после облучения линейризуются и способны выполнять свои функции в составе CRISPR-систем (рис. 16).

Кроме этих четырех вариантов существует еще несколько единичных работ, где используются отличные от представленных на рисунке подходы к фоторегуляции системы CRISPR/Cas9.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ БЛОКИРУЮЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК

Исторически первым подходом к фоторегуляции системы CRISPR был подход с использованием дополнительных блокирующих олигонуклеотидов (протекторов), которые связываются со спейсером направляющей РНК и блокируют его взаимодействие с ДНК-мишенью. Такой подход более прост в реализации в сравнении с химическим синтезом достаточно протяженных фотомодифицированных направляющих РНК длиной от 42 нуклеотидов (в случае crРНК) и до 102–120 нуклеотидов (в случае sgРНК). В состав блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов в ходе химического синтеза вводили фоторасщепляемые линкеры, способные при облучении ультрафиолетовым светом разрушать фосфодиэфирную связь и приводить к гидролизу олигонуклеотида в заданном положении. Впервые такой подход был предложен и апробирован в работе [6]. Авторы работы использовали комплементарные sgРНК олигодезоксирибонуклеотиды, которые содержали в себе один или несколько фоторасщепляемых

линкеров на основе (1-(2-нитрофенил)-пропандиола) (рис. 2а).

Блокирующие олигонуклеотиды связываются с sgРНК, образуя комплементарный дуплекс, не позволяющий sgРНК сформировать комплекс с ДНК-мишенью и инициировать работу CRISPR/Cas9 системы. При воздействии двухпятисекундного облучения ($\lambda = 365$ нм) блокирующий олигодезоксирибонуклеотид гидролизуетсся с образованием коротких олигомеров, обладающих меньшим сродством к sgРНК. Авторы назвали свой подход CRISPR-плюс (рис. 2в). После облучения направляющая РНК к ДНК гена EGFP высвобождается, связывается с мишенью и запускает работу CRISPR-системы, в результате происходит подавление синтеза EGFP и уменьшение флуоресценции белка в клетках.

Аналогичный подход был впоследствии использован и в работе российских авторов, также использовавших фоторасщепляемые блокирующие РНК для фотоактивации системы CRISPR/Cas9 [23]. В этой работе авторы использовали аналогичный фоторасщепляемый линкер, но уже на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (рис. 2б). В модельной системе продемонстрирована возможность фотоактивации систем CRISPR/Cas9, содержащих как sgРНК, так и пару направляющих РНК crРНК/tracrРНК.

Использование фоторасщепляемого блокирующего олигонуклеотида, содержащего остаток пирена на 3'-конце, позволило авторам работы [24] иммобилизовать направляющую РНК на поверхности углеродных наночастиц (углеродные нанотрубки, парамагнитные железные наночастицы в углеродной оболочке) (рис. 2г).

До облучения направляющая crРНК иммобилизована на поверхности углеродных наночастиц, в результате облучения происходит гидролиз блокирующего олигодезоксирибонуклеотида и высвобождение направляющей РНК. Авторы работы продемонстрировали возможность высвобождения направляющей РНК с поверхности углеродных наночастиц под действием ультрафиолетового (УФ) облучения, в результате которого происходила активация системы CRISPR/Cas9 и гидролиз ДНК-мишени.

Использование одностенных углеродных нанотрубок и парамагнитных железных наночастиц в углеродной оболочке может оказаться перспективным подходом к доставке компонентов системы геномного редактирования в клетки.

В работе [25] описано использование дополнительного фоторасщепляемого олигонуклеотида для введения компонентов CRISPR/Cas9 в систему доставки на основе ДНК-нанокольца. Для закрепления комплексов sgРНК/Cas9 в структуре ДНК-нанокольца в последовательность sgРНК добавляли олигонуклеотидный фрагмент, ком-

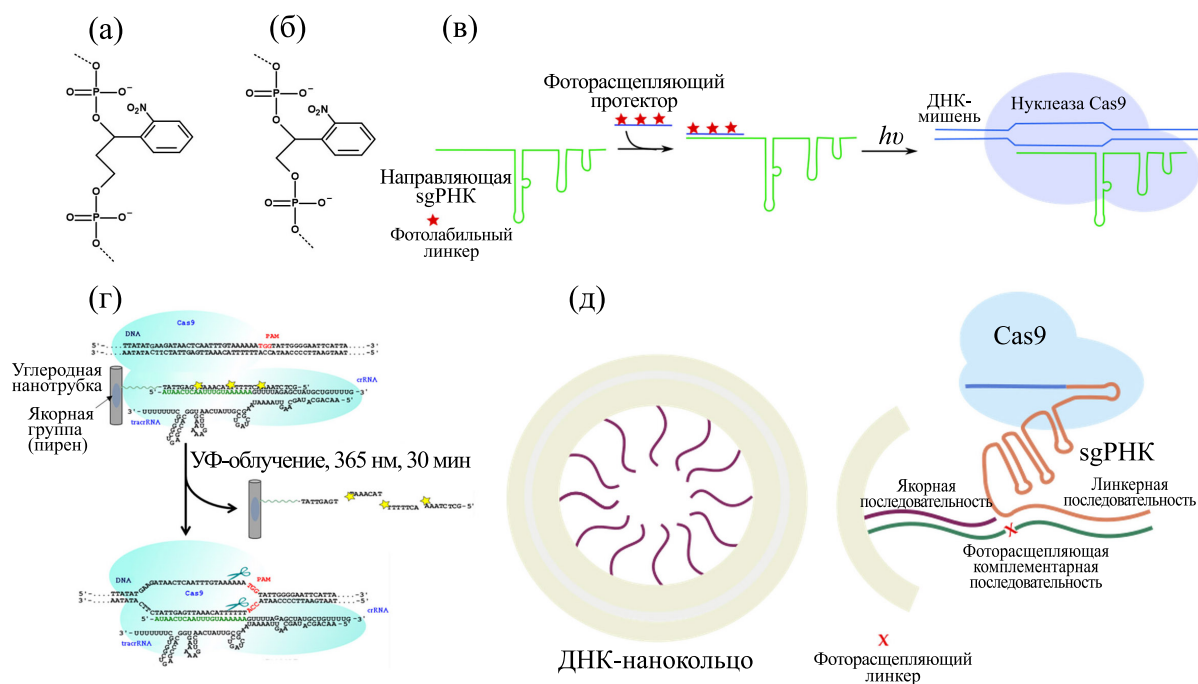


Рис. 2. (а) — Структура фоторасщепляемого линкера на основе 1-(2-нитрофенил)-пропандиола. (б) — Структура фоторасщепляемого линкера на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. (в) — Концепция CRISPR-плюс. (г) — Фоторегулируемое высвобождение направляющей sgРНК с поверхности углеродных нанотрубок и активация системы CRISPR/Cas9. (д) — Система CRISPR/Cas9, заключенная внутри ДНК-нанокольца. Структура фоторасщепляемого линкера X представлена на панели (а).

плементарный дополнительный фоторасщепляемому олигонуклеотиду (рис. 2д).

Этот дополнительный олигонуклеотид содержит фрагмент, комплементарный sgРНК и ДНК-«якорю» (якорная последовательность) в составе ДНК-нанокольца. В состав нанокольца вводили 12 ДНК-«якорей». При облучении дополнительный олигонуклеотид, связывающий sgРНК и ДНК-«якорь» в составе нанокольца, разрушался и комплекс sgРНК/Cas9 высвобождался.

Другим вариантом регуляции системы CRISPR/Cas9 является использование дополнительного фотоблокированного олигонуклеотида, который может взаимодействовать с sgРНК только после облучения и удаления блокирующих группировок (рис. 3). В качестве фотоблокирующих групп в составе олигонуклеотида использовали 6-нитропироперил оксиметильные группировки, введенные по остаткам тимидина (рис. 3в).

Этот подход был предложен в работе [26] в двух вариантах: для активации и для инактивации системы CRISPR/Cas9. В случае активации в состав sgРНК на 3'-конец добавляли олигонуклеотидный фрагмент, комплементарно взаимодействующий со спейсером и дополнительным олигонуклеотидом (рис. 3а). Для возможности инак-

вации системы на 5'-конец sgРНК добавляли олигонуклеотидный участок для взаимодействия с дополнительным олигонуклеотидом (рис. 3б). Дополнительные олигонуклеотиды конструировали таким образом, чтобы они могли разрушать в первом случае внутримолекулярный комплекс sgРНК, а во втором случае — дуплекс между спейсером sgРНК и протоспейсером в ДНК-мишени.

Подход к фоторегуляции с использованием фоторасщепляемых блокирующих олигонуклеотидов был адаптирован к системе CRISPR/Cas12a, которая отличается более короткой направляющей РНК и нуклеазой [15, 27]. Интересной особенностью РНК-направляемой ДНКазы Cas12a является ее способность после узнавания и гидролиза целевой ДНК-мишени (*цис*-расщепление) гидролизировать любые одноцепочечные ДНК независимо от их последовательности (*транс*-расщепление) [28, 29]. Дженнифер Даудной с коллегами был предложен подход к детекции вируса папилломы в клинических образцах с использованием Cas12a нуклеазы, действие которой основано на этой необычной способности нуклеазы. Такой подход был назван DETECTR (DNA Endonuclease-Target CRISPR Trans Reporter) [30].

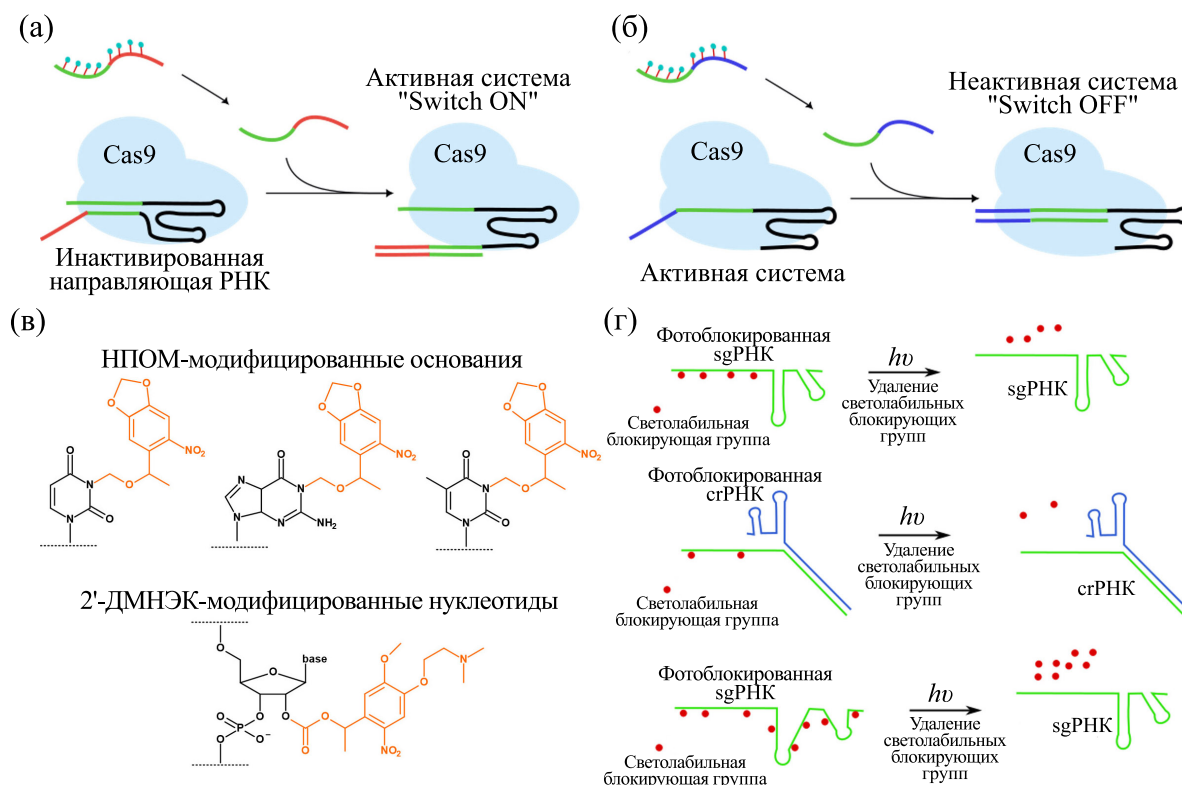


Рис. 3. Подходы к включению/выключению направляющей РНК с использованием фотоактивируемого замещения цепи для функционального контроля системы CRISPR/Cas9: (а) — активация системы, (б) — инактивация системы. (в) — Структуры фотоблокированных азотистых оснований урацила, тимина и гуанина с фотоотщепляющимися 6-нитропиперонилоксиметильными (НПОМ) группировками и нуклеотида, содержащего в 2'-положении 1-(4-(2-диметиламино)этокс)5-метокси-2-нитрофенил)этилкарбонильную (ДМНЭК) группу. (г) — Схематическое изображение вариантов активации направляющих РНК в результате облучения.

В работах [15, 27] описана разработка и использование такой системы детекции с возможностью оптической активации. Такой подход позволяет увеличить специфичность работы системы DETECTR.

ФОТОБЛОКИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

В других вариантах фоторегуляции работы системы CRISPR/Cas9 используют модифицированные sgRNA или crRNA, содержащие фотоблокирующие группировки в различных положениях олигорибонуклеотидной цепи. В литературе представлены варианты sgRNA и crRNA, содержащие фотоотщепляемые блокирующие группировки в гетероциклических основаниях, по 2'-положению рибозы или по межнуклеотидным фосфатным группам [12]. Такие фотоблокированные направляющие РНК не активны вплоть до облучения УФ-светом и удаления фотоблокирующих групп.

Например, в работе [31] авторы вводили фотоотщепляемые 6-нитропиперонилоксиметильные

группировки в N3-положение уридина и в N1-положение гуанозина в области спейсера (рис. 3в). Олигорибонуклеотиды получали твердофазным фосфитамидным методом синтеза. После действия УФ-излучения происходило отщепление блокирующих группировок и восстановление активности комплекса Cas9:sgRNA, что приводило к гидролизу ДНК-мишени в клетках зародышей рыб *Danio rerio*. Активность системы геномного редактирования регистрировали с использованием репортерной системы с участием гена флуоресцентного белка EGFP. При активации системы CRISPR/Cas9 наблюдали уменьшение флуоресценции белка в клетках.

Аналогичные результаты были получены в работе [32], где авторы также использовали фотоблокирующие группировки, введенные по гетероциклическому основанию в ходе твердофазного фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов в составе модифицированных фосфитамидов (рис. 3г). Работу проводили на нескольких линиях клеток и на эмбрионах рыбок *Danio rerio*.

В работе [33] авторы модифицировали направляющую sgRNA по 2'-положению рибозы не

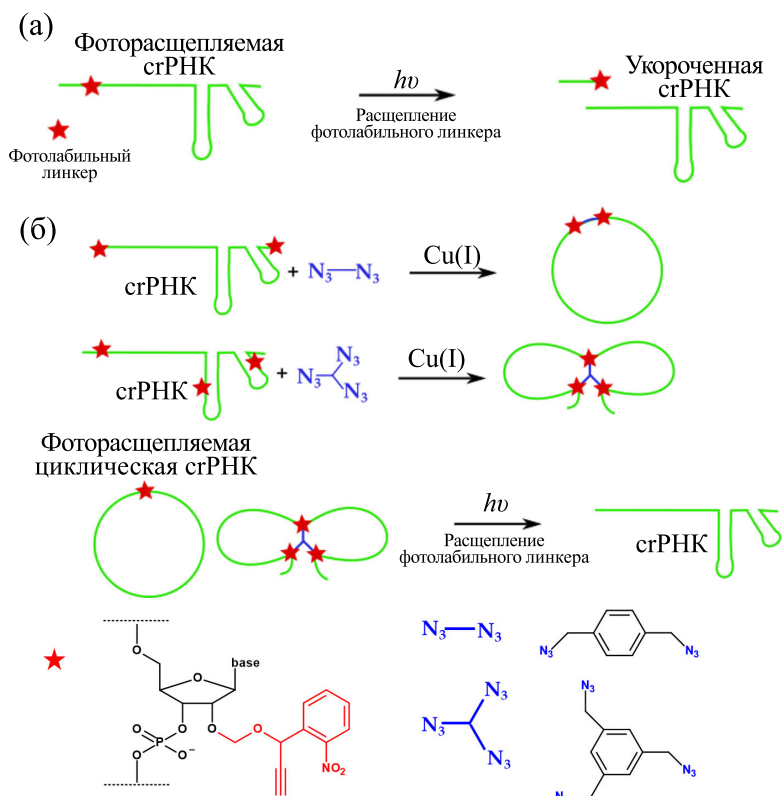


Рис. 4. (а) — Система CRISPR/Cas9, содержащая фоторасщепляемый линкер и способная «выключаться» под действием света. (б) — Схематическое изображение моно- и бициклических направляющих РНК и структура модификаций, использованных для их получения.

только в участке, отвечающем за связывание с ДНК-мишенью, но и в остальной части молекулы (рис. 3г). Модификацию проводили пост-синтетически, обрабатывая sgРНК активированным производным 1-(4-(2-диметиламино)этокси)5-метокси-2-нитрофенил)этанола. Модификация проходила статистически по всем доступным 2'-гидроксильным группам. Продемонстрирована возможность использования предложенной стратегии в системах с нуклеазой Cas9 и Cas13a.

ФОТОРАСЩЕПЛЯЕМЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

Введение фоторасщепляемых линкеров непосредственно в состав направляющей РНК позволяет разрушить эту направляющую РНК путем облучения в необходимый момент времени и тем самым прекратить работу системы геномного редактирования. Так, в работах [34, 35] авторы вводили фоторасщепляемый линкер в состав направляющей сгРНК в область спейсера, что позволило им эффективно отключать систему в определенный момент времени (рис. 4а).

Введение двух фоторасщепляемых линкеров в состав направляющей сгРНК позволяет более эффективно «выключать» систему редактирования генома путем УФ-облучения [36]. Возможности такой регуляции продемонстрированы на модельных плаزمидях, содержащих ген EGFP.

В работе [37] авторы работы в ходе твердофазного фосфитамидного синтеза вводили два фоторасщепляемых линкера в область взаимодействия sgРНК с нуклеазой Cas9 (положения 57 и 74). При облучении такой фоторасщепляемой sgРНК наблюдали образование трех фрагментов РНК. Возможность инактивации системы CRISPR/Cas9, содержащей эту фоторасщепляемую sgРНК, была продемонстрирована в клетках HEK293 и U2OS.

ФОТОБЛОКИРОВАННЫЕ ЦИКЛИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

Интересным подходом к созданию фотоактивируемых направляющих РНК является получение циклических фоторасщепляемых направляющих РНК, которые при действии света способны линейаризоваться и образовывать комплекс с нуклеазой Cas9 и ДНК-мишенью. Подход к син-

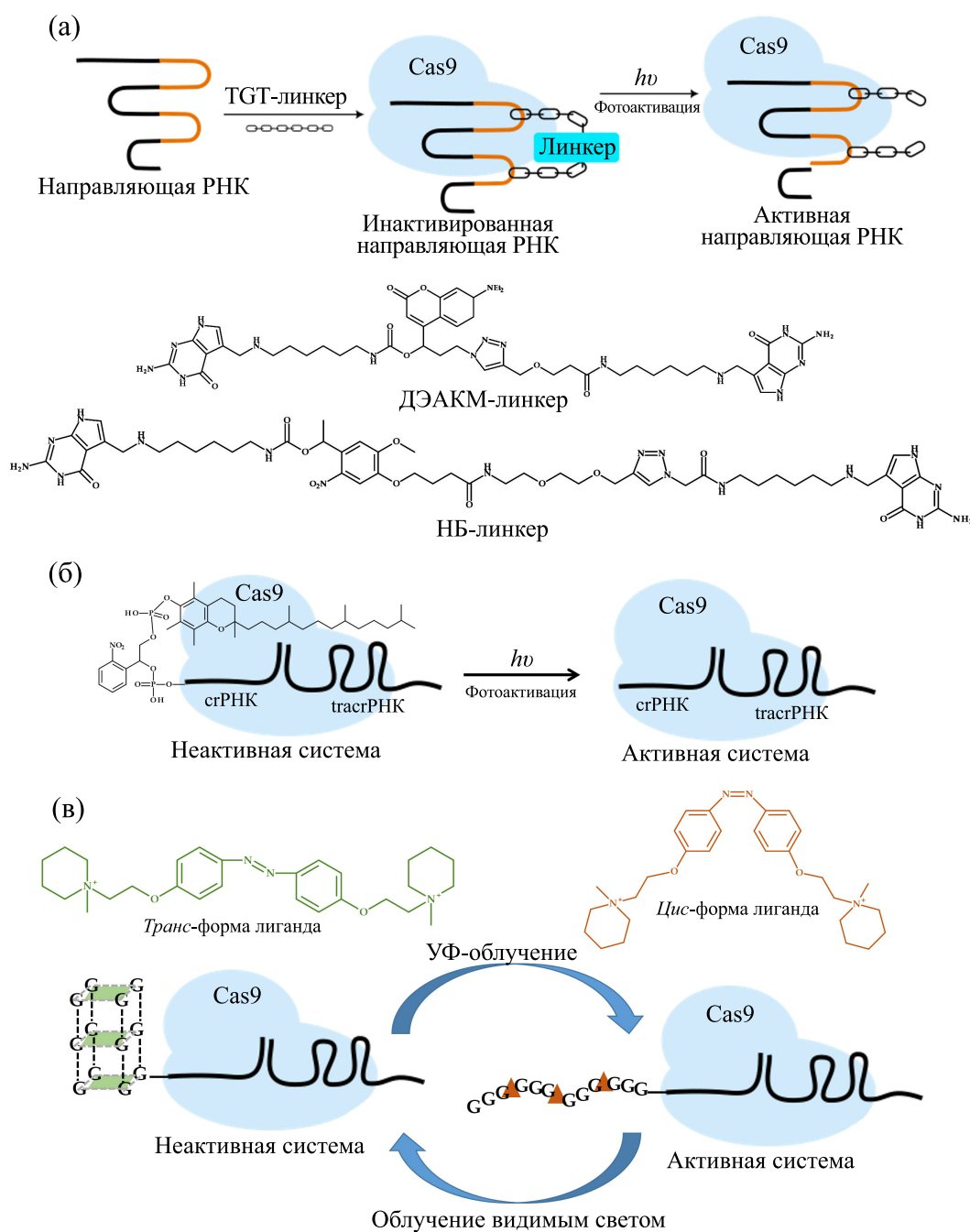


Рис. 5. (а) — Принцип получения и использования фоторасщепляемых циклических направляющих РНК с использованием тРНК-гуанинтрансгликозилазы (TGT) и специально сконструированных фоточувствительных линкеров, содержащих [7-(диэтиламино)кумарин-4-ил]-метильный (ДЭАКМ) линкер (фоторасщепляется при облучении светом с длиной волны 405–456 нм) или линкер на основе нитробензола (НБ) (фоторасщепляется при облучении светом с длиной волны 356–390 нм). (б) — Фотоактивация системы CRISPR/Cas9, содержащей 5'-модифицированную токоферолом crRNA. (в) — Регуляция направляющей РНК, содержащей последовательность, способную формировать квадруплекс, в присутствии лиганда и при облучении светом определенной длины волны.

тезу таких направляющих РНК предложен в работах [38–40] (рис. 46). Для синтеза использовали модифицированные алкильными группами РНК и би- или трифункциональный азид, позволяющий проводить циклизацию таких РНК.

Для циклизации направляющих РНК может быть использован и ферментативный подход с использованием бактериальной тРНК-гуанинтрансгликозилазы (TGT), описанный в работе [41] (рис. 5а). Авторы работы разработали лин-

керы, обеспечивающие сайт-специфическое ферментативное связывание двух выбранных остатков гуанина в последовательности направляющей РНК. Наиболее удачным оказался вариант, когда два сшиваемых гуанина были расположены в петлях шпильчатых структур sgРНК. Такая внутримолекулярная циклизация нарушает функциональную активность РНК, а возможность фоторасщепления введенного линкера позволяет восстановить функции РНК путем облучения. В состав линкеров вводили производные кумарина или нитробензола, которые вызывают фоторасщепление линкера при облучении в разном диапазоне длин волн: 405–456 или 356–390 нм соответственно. Таким образом, эти варианты фотоактивируемых систем CRISPR/Cas9 можно использовать для мультиплексной активации систем геномного редактирования в клетках.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ СИСТЕМ CRISPR/Cas9

Интересным вариантом фотоблокированной направляющей РНК является РНК, содержащая на 5'-конце объемную гидрофобную молекулу, введенную через фоторасщепляемый линкер. Наличие определенных объемных молекул, например, токоферола, на 5'-конце направляющей РНК блокирует их активность [42]. Облучение такой РНК УФ-светом позволяет разрушить фоторасщепляемый линкер и высвободить направляющую РНК. Ранее такой подход был использован для создания фотоблокированных малых интерферирующих РНК [43–45], а затем был удачно применен и к системе CRISPR/Cas9. Авторы работы [43] предложили sgРНК, к 5'-концу которой через фотолabile линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола была присоединена молекула токоферола для временного блокирования тройного рибонуклеопротеидного комплекса Cas9:crРНК:tracrРНК и улучшения проникновения направляющей РНК в определенные типы клеток (рис. 5б). Молекулу токоферола вместе с фотолabile линкером удаляли путем УФ-облучения. Эффективность данного подхода продемонстрирована как *in vitro* с использованием модельных ДНК-дуплексов, так и *in vivo* для воздействия на ДНК гена фактора роста клеток эндотелия сосудов (VEGFA-A – Vascular Endothelial Growth Factor A) в клетках HEK293T.

В работе [46] на 5'-конец направляющей РНК вводили дополнительную последовательность, способную формировать квадруплекс.

Присутствие квадруплекса ингибировало действие нуклеазы Cas9. Использование лиганда, об-

ратимо изменяющего свою структуру под действием облучения ультрафиолетовым или видимым светом, позволило влиять на стабильность квадруплекса и, соответственно, на активность системы (рис. 5в). Интересно, что добавление G-квадруплекса на 3'-конец sgRNA не влияло на эффективность редактирования мишени и повышало время жизни направляющей РНК в 5 раз [47, 48].

Таким образом, создание CRISPR/Cas9-систем с улучшенными характеристиками, а именно с длительным временем жизни в клетках и организмах, высокой эффективностью и специфичностью действия, а также с возможностью регуляции активности – является актуальным направлением в области геномного редактирования. Многообещающим подходом для решения этой задачи является использование модифицированных направляющих РНК в составе CRISPR/Cas9 систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность чл.-корр. РАН, д.б.н. Д.О. Жаркову (ИХБФМ СО РАН) за инициацию работ по созданию и использованию фоторасщепляемых направляющих РНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Обзор написан при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00294), а также за счет базового бюджетного финансирования в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (2021–2024 гг., проект № 121031300042-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang X. and Dmochowski I. J. Controlling RNA digestion by RNase H with a light-activated DNA hairpin. *Angew. Chemie. Int. Ed.*, **45** (21), 3523–3526 (2006). DOI: 10.1002/anie.200600954
2. Matsushita-Ishiodori Y. and Ohtsuki T. Photoinduced RNA interference. *Acc. Chem. Res.*, **45** (7), 1039–1047 (2012). DOI: 10.1021/ar200227n
3. Ахметова Е. А., Ким Д. В., Доме А. С., Мещанинова М. И. и Новопашина Д. С. Новый подход к синтезу фотоблокированных малых интерферирующих РНК для активируемой светом РНК-интерференции. *Биоорг. химия*, **48** (5), 580–588 (2022). DOI: 10.31857/S0132342322050037
4. Shen Y., Li Z., Wang G., and Ma N. Photocaged nanoparticle sensor for sensitive microRNA imaging in living cancer cells with temporal control. *ACS Sensors*,

- 3 (2), 494–503 (2018). DOI: 10.1021/acssensors.7b00922
5. Griepenburg J. C., Ruble B. K., and Dmochowski I. J. Caged oligonucleotides for bidirectional photomodulation of let-7 miRNA in zebrafish embryos. *Bioorg. Med. Chem.*, **21** (20), 6198–6204 (2013). DOI: 10.1016/j.bmc.2013.04.082
6. Jain P. K., Ramanan V., Schepers A. G., Dalvie N. S., Panda A., Fleming H. E., and Bhatia S. N. Development of light-activated CRISPR using guide RNAs with photocleavable protectors. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **55** (40), 12440–12444 (2016). DOI: 10.1002/anie.201606123
7. Nuñez J. K., Harrington L. B., and Doudna J. A. Chemical and biophysical modulation of Cas9 for tunable genome engineering. *ACS Chem. Biol.*, **11** (3), 681–688 (2016). DOI: 10.1021/acscchembio.5b01019
8. O'Hagan M. P., Duan Z., Huang F., Laps S., Dong J., Xia F., and Willner I. Photocleavable ortho-nitrobenzyl-protected DNA architectures and their applications. *Chem. Rev.*, **123** (10), 6839–6887 (2023). DOI: 10.1021/acs.chemrev.3c00016
9. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337** (6096), 816–812 (2012). DOI: 10.1126/science.1225829
10. Wang J. Y., Pausch P., and Doudna J. A. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes. *Nat. Rev. Microbiol.*, **20** (11), 641–656 (2022). DOI: 10.1038/s41579-022-00739-4
11. Makarova K. S., Wolf Y. I., Iranzo J., Shmakov S. A., Alkhnbashi O. S., Brouns S. J. J., Charpentier E., Cheng D., Haft D. H., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J. M., Scott D., Shah S. A., Siksnyš V., Terns M. P., Venclovas C., White M. F., Yakunin A. F., Yan W., Zhang F., Garrett R. A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., and Koonin E. V. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, **18** (2), 67–83 (2020). DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
12. Brown W., Zhou W., and Deiters A. Regulating CRISPR/Cas9 function through conditional guide RNA control. *ChemBioChem*, **22** (1), 63–72 (2021). DOI: 10.1002/cbic.202000423
13. Galizi R. and Jaramillo A. Engineering CRISPR guide RNA riboswitches for in vivo applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **55**, 103–113 (2019). DOI: 10.1016/j.copbio.2018.08.007
14. Zhuo C., Zhang J., Lee J.-H., Jiao J., Cheng D., Liu L., Kim H.-W., Tao Y., and Li M. Spatiotemporal control of CRISPR/Cas9 gene editing. *Signal. Transduct. Target Ther.*, **6** (1), 238 (2021). DOI: 10.1038/s41392-021-00645-w
15. Chen Y., Xu X., Wang J., Zhang Y., Zeng W., Liu Y., and Zhang X. Photoactivatable CRISPR/Cas12a strategy for one-pot DETECTR molecular diagnosis. *Anal. Chem.*, **94** (27), 9724–9731 (2022). DOI: 10.1021/acs.analchem.2c01193
16. Nihongaki Y., Yamamoto S., Kawano F., Suzuki H., and Sato M. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem. Biol.*, **22** (2), 169–174 (2015). DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.12.011
17. Manna D., Maji B., Gangopadhyay S. A., Cox K. J., Zhou Q., Law B. K., Mazitschek R., and Choudhary A. A singular system with precise dosing and spatiotemporal control of CRISPR-Cas9. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58** (19), 6285–6289 (2019). DOI: 10.1002/anie.201900788
18. Hemphill J., Borchardt E. K., Brown K., Asokan A., and Deiters A. Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing. *J. Am. Chem. Soc.*, **137** (17), 5642–5645 (2015). DOI: 10.1021/ja512664v
19. Zhou W. and Deiters A. Conditional control of CRISPR/Cas9 function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55** (18), 5394–5399 (2016). DOI: 10.1002/anie.201511441
20. Lyu Y., He S., Li J., Jiang Y., Sun H., Miao Y., and Pu K. A photolabile semiconducting polymer nanotransducer for near-infrared regulation of CRISPR/Cas9 gene editing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58** (50), 18197–18201 (2019). DOI: 10.1002/anie.201909264
21. Chen X., Chen Y., Xin H., Wan T., and Ping Y. Near-infrared optogenetic engineering of photothermal nanoCRISPR for programmable genome editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117** (5), 2395–2405 (2020). DOI: 10.1073/pnas.1912220117
22. Peng H., Le C., Wu J., Li X.-F., Zhang H., and Le X.-C. A genome-editing nanomachine constructed with a clustered regularly interspaced short palindromic repeats system and activated by near-infrared illumination. *ACS Nano*, **14** (3), 2817–2826 (2020). DOI: 10.1021/acsnano.9b05276
23. Ахметова Е. А., Голышев В. М., Вохтанцев И. П., Мещанинова М. И., Веняминова А. Г. и Новопашина Д. С. Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9. *Биоорг. химия*, **47** (2), 276–286 (2021). DOI: 10.31857/S0132342321020020
24. Semikolenova O. A., Sakovina L., Akhmetova E., Kim D., Vokhtantsev I., Golyshev V., Vorobyeva M., Novopashin S., and Novopashina D. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 system based on crRNA reversibly immobilized on carbon nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 10919 (2021). DOI: 10.3390/ijms222010919
25. Abe K., Sugiyama H., and Endo M. Construction of an optically controllable CRISPR-Cas9 system using a DNA origami nanostructure. *Chem. Commun.*, **57** (45), 5594–5596 (2021). DOI: 10.1039/d1cc00876e
26. Wang Y., Wu C. Q., Zhang Q. L., Shao M., Liu Y., Wang L.-L., Wang Z.-Y., Du J., and Xu L. Switching on/off of guide RNA by photoinduced strand displacement for functional control of CRISPR/Cas9. *CCS Chemistry*, **6** (5), 1338–1351 (2024). DOI: 10.31635/ccschem.023.202303379
27. Hu M., Qiu Z., Bi Z., Tian T., Jiang Y., and Zhou X. Photocontrolled crRNA activation enables robust CRISPR-Cas12a diagnostics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, **119** (26), e2202034119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2202034119
28. Aman R., Mahas A., and Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synth. Biol.*, **9** (6), 1226–1233 (2020). DOI: 10.1021/acssynbio.9b00507
29. Wang Y., Yang T., Liu G., Xie L., Guo J., and Xiong W. Application of CRISPR/Cas12a in the rapid detection of pathogens. *Clin. Chim. Acta*, **548**, 117520 (2023). DOI: 10.1016/j.cca.2023.117520
30. Chen J. S., Ma E. B., Harrington L. B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J. M., and Doudna J. A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, **360** (6387), 436–439 (2018). DOI: 10.1126/science.aar6245
31. Zhou W., Brown W., Bardhan A., Delaney M., Ilk A. S., Rauen R. R., Kahn S. I., Tsang M., and Deiters A. Spatiotemporal control of CRISPR/Cas9 function in cells and zebrafish using light-activated guide RNA. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **59** (23), 8998–9003 (2020). DOI: 10.1002/anie.201914575
32. Moroz-Omori E. V., Satyapertiwi D., Ramel M.-C., Høgset H., Sunyovszki I. K., Liu Z., Wojciechowski J. P., Zhang Y., Grigsby C. L., Brito L., Bugeon L., Dallman M. J., and Stevens M. M. Photoswitchable gRNAs for spatiotemporally controlled CRISPR-Cas-based genomic regulation. *ACS Cent. Sci.*, **6** (5), 695–703 (2020). DOI: 10.1021/acscentsci.9b01093
33. Wang S., Wei L., Wang J.-Q., Ji H., Xiong W., Liu J., Yin P., Tian T., and Zhou X. Light-driven activation of RNA-guided nucleic acid cleavage. *ACS Chem. Biol.*, **15** (6), 1455–1463 (2020). DOI: 10.1021/acscchembio.0c00105
34. Zou R.S., Liu Y., Wu B., and Ha T. Cas9 deactivation with photocleavable guide RNAs. *Mol. Cell.*, **81** (7), 1553–1565 (2021). DOI: 10.1016/j.molcel.2021.02.007
35. Zou R.S., Liu Y., and Ha T. CRISPR deactivation in mammalian cells using photocleavable guide RNAs. *STAR Protoc.*, **2** (4), 100909 (2021). DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100909
36. Новопашина Д. С., Ахметова Е. А., Мещанинова М. И., Вохтанцев И. П., Жарков Д. О. и Венямина А. Г. Модифицированная направляющая РНК, обладающая способностью инактивировать систему редактирования генома CRISPR/Cas9 и способ ее получения. Патент РФ 2765159 от 26.08.2020.
37. Carlson-Stevermer J., Kelso R., Kadina A., Joshi S., Rossi N., Walker J., Stoner R., and Maures T. CRISPRoff enables spatio-temporal control of CRISPR editing. *Nat. Commun.*, **11** (1), 5041 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-18853-3
38. Sun Y.-J., Chen W.-D., Liu J., Li J.-J., Zhang Y., Cai W.-Q., Liu L., Tang X.-J., Hou J., Wang M., and Cheng L. A conformational restriction strategy for the control of CRISPR/Cas gene editing with photoactivatable guide RNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **62** (5), e202212413 (2023). DOI: 10.1002/anie.202212413
39. Müller P., Seyfried P., Frühauf A., and Heckel A. Phosphodiester photo-tethers for the (multi-)cyclic conformational caging of oligonucleotides. *Methods Enzymol.*, **624**, 89–111 (2019). DOI: 10.1016/bs.mie.2019.04.019
40. Seyfried P., Eiden L., Grebenovsky N., Mayer G., and Heckel A. Photo-tethers for the (multi-)cyclic, conformational caging of long oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56** (1), 359–363 (2017). DOI: 10.1002/anie.201610025
41. Zhang D., Liu L., Jin S., Tota E., Li Z., Piao X., Zhang X., Fu X.-D., and Devaraj N. K. Site-specific and enzymatic cross-linking of sgRNA enables wavelength-selectable photoactivated control of CRISPR gene editing. *J. Am. Chem. Soc.*, **144** (10), 4487–4495 (2022). DOI: 10.1021/jacs.1c12166
42. Zhang Y., Ling X., Su X., Zhang S., Wang J., Zhang P., Feng W., Zhu Y. Y., Liu T. and Tang X. Optical control of a CRISPR/Cas9 system for gene editing by using photolabile crRNA. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **59** (47), 20895–20899 (2020). DOI: 10.1002/anie.202009890
43. Yang J., Chen C., and Tang X. Cholesterol-modified caged siRNAs for photoregulating exogenous and endogenous gene expression. *Bioconjug. Chem.*, **29** (4), 1010–1015 (2018). DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00080
44. Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., and Tang X. Photochemical regulation of gene expression using caged siRNAs with single terminal vitamin E modification. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **55** (6), 2152–2156 (2016). DOI: 10.1002/anie.201510921
45. Yu L., Jing N., Yang Z., Zhang L., and Tang X. Caged siRNAs with single folic acid modification of antisense RNA for photomodulation of exogenous and endogenous gene expression in cells. *Org. Biomol. Chem.*, **16** (38), 7029–7035 (2018). DOI: 10.1039/c8ob01952e
46. Deng H., Xu H., Wang Y., Jia R., Ma X., Feng Y., and Chen H. G-quadruplex-based CRISPR photoswitch for spatiotemporal control of genomic modulation. *Nucl. Acids Res.*, **51** (8), 4064–4077 (2023). DOI: 10.1093/nar/gkad178.
47. Filippova J., Matveeva A., Zhuravlev E., and Stepanov G. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. *Biochimie*, **167**, 49–60 (2019). DOI: 10.1016/j.biochi.2019.09.003
48. Nahar S., Sehgal P., Azhar M., Rai M., Singh A., Sivasubbu S., Chakraborty D., and Maiti S. A G-quadruplex motif at the 3' end of sgRNAs improves CRISPR-Cas9 based genome editing efficiency. *Chem. Commun.*, **54** (19), 2377–2380 (2018). DOI: 10.1039/c7cc08893k

CRISPR/Cas System Photocontrolled at the Guide RNA Level

L.V. Sakovina^{*, **}, E.S. Gorlenko^{*, **}, and D.S. Novopashina^{*, **}

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

Improving the efficiency and precision of gene editing systems is of utmost importance for modern molecular biology and genetic engineering. Of particular interest is the design of controlled CRISPR/Cas9 systems, the activity of which could be regulated using different physico-chemical stimuli such as light irradiation, pH change, temperature, change of molecule concentration and so forth. A promising direction in this area is the development of approaches to control activity at the level of guide RNA through photosensitive modifications to the structure and sequence of guide RNA, and additional oligonucleotides. This review is devoted to the analysis of publications on design of photosensitive guide RNAs and their applications in genome editing systems using CRISPR.

Keywords: regulated CRISPR/Cas9 system, UV-irradiation, guide RNA, photocleavable linker, photocaged oligonucleotides