

СОВРЕМЕННЫЕ ЗНАНИЯ О РЕДАКТИРОВАНИИ ОСНОВАНИЙ И ПРАЙМИРОВАННОМ РЕДАКТИРОВАНИИ

© 2024 г. О. А. Аверина^{а, б, с}, С. А. Кузнецова^{а, *}, О. А. Пермяков^{а, с}, П. В. Сергиев^{а, б, с}

^аИнститут функциональной геномики, Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^бНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^сХимический факультет, Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: svetlana@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 27.11.2023 г.

После доработки 05.01.2024 г.

Принята к публикации 09.01.2024 г.

Современные технологии генной инженерии, такие как редакторы оснований и праймированное редактирование, зарекомендовали себя как эффективные и надежные инструменты редактирования геномов, которые не требуют внесения двухцепочечных разрывов в молекулу ДНК и наличия донорских матриц. Появившись относительно недавно, эти технологии получили быстрое признание благодаря своей точности, простоте и возможностям мультиплексирования. В представленном обзоре суммированы новые данные об этих технологиях, их архитектуре и методах конструирования редакторов, специфичности, эффективности, универсальности. Обсуждаются преимущества, недостатки и перспективы использования редакторов в фундаментальных и прикладных исследованиях. Сведения, приведенные в обзоре, могут быть востребованы для планирования исследований по геномному редактированию и анализа их результатов в ходе решения различных задач фундаментальной биологии, биотехнологии, медицины и сельского хозяйства.

Ключевые слова: CRISPR/Cas-технология, редактирование оснований, нуклеозиддезаминазы, праймированное редактирование, обратная транскриптаза, системы репарации

DOI: 10.31857/S0026898424040013, EDN: INFPUZ

ВВЕДЕНИЕ

Геномное редактирование CRISPR/Cas — одна из наиболее востребованных технологий направленного изменения генома и эпигенома млекопитающих. Благодаря своей простоте, доступности,

точности, высокой эффективности и огромному потенциалу, эта технология активно используется для решения различных задач фундаментальной биологии, биотехнологии, медицины и сельского хозяйства. С помощью геномного редактирования

Сокращения: ABE — редактор оснований A→G; BE — редактор оснований (Base Editor); BER — эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair); Cas — CRISPR-ассоциированная нуклеаза; CBE — редактор оснований C→T; CGBE — редактор оснований C→G; CRISPR — короткие палиндромные повторы, разделенные уникальными последовательностями-спейсерами; crPHK — направляющая РНК (crispr RNA); dCas — мутантная форма нуклеазы Cas, лишенная ферментативной активности в обоих каталитических доменах (dead или deactivated); DdCBE — редактор для замены пары C•G на T•A в дцДНК; EXO1 — экзонуклеаза 1; FEN1 — флп-специфичная эндонуклеаза 1; флп — отделенный от основной цепи ДНК “болтающийся/свисающий” олигонуклеотид; HDR — гомологичная рекомбинация (Homologous Recombination); HNH — каталитический домен нуклеазы Cas9, вносящий одноцепочечный разрыв в целевой участок ДНК и связывающийся со спейсером crPHK; MLH1dn — белок-репрессор MMR-репарации;

M—MLV RT — обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони; MMR — репарация неспаренных нуклеотидов (Mismatch Repair); nCas — мутантная форма нуклеазы Cas, способная разрезать только одну из цепей ДНК (nickase); NHEJ — негомологичное соединение концов ДНК (Nonhomologous DNA End Joining); NLS — последовательность ядерной локализации; PAM — смежный протоспейсерный мотив (Protospacer Adjacent Motif); PE — праймированное редактирование (Prime Editing); PFS — последовательность нуклеотидов, фланкирующая протоспейсер (Protospacer Flanking Sequence); RT — обратная транскриптаза; RuvC — каталитический домен нуклеазы Cas9, вносящий одноцепочечный разрыв в целевой участок ДНК (протоспейсер); tracrPHK — транс-активирующая РНК (trans-activating RNA); UGI — ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы; UNG — урацил-ДНК-гликозилаза; rPHK — гидовая РНК (sgRNA — single-guide RNA); ДЦР — двухцепочечные разрывы.

можно изучать функции генов млекопитающих, создавать модели генетических заболеваний и разрабатывать подходы к их коррекции, улучшать значимые для сельского хозяйства виды. Вместе с тем, технология CRISPR/Cas не лишена таких недостатков, как относительно высокая вероятность образования нецелевых мутаций, зависимость эффективности редактирования целевых участков от геномного контекста и структуры хроматина, низкая эффективность гомологичной рекомбинации (HDR) и доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки. Одним из ключевых этапов CRISPR/Cas является целенаправленная индукция сайт-специфических двухцепочечных разрывов (ДЦР) в ДНК, что приводит к серьезным повреждениям клетки. ДЦР могут быть причиной потери сегментов хромосом и хромосомных перестроек, вызывать гибель клеток или возникновение злокачественных новообразований. Для повышения эффективности и безопасности редактирования разрабатываются новые усовершенствованные версии CRISPR/Cas. Так, в последние годы появились альтернативные версии редактирования геномов, которые не требуют введения ДЦР. К ним относятся новые стратегии редактирования оснований и праймированного редактирования, получившие быстрое признание благодаря своей точности, простоте и возможностям мультиплексирования. Эти подходы основаны на применении химерных белков, состоящих из модифицированного белка Cas, не способного вносить ДЦР в ДНК, и ковалентно связанных с ним ферментов — нуклеозиддезаминазы (редактирование оснований) или обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони (M-MLV RT) (праймированное редактирование). В этих технологиях не используются синтетические экзогенные донорные молекулы ДНК и дополнительные экзогенные/эндогенные белковые факторы. В настоящем обзоре обобщены современные знания о редактировании оснований и праймированном редактировании: описаны общие принципы конструирования редакторов, суммированы сведения об их архитектуре, специфичности, эффективности, универсальности. Обсуждаются преимущества, недостатки и перспективы использования этих редакторов в фундаментальных и прикладных исследованиях.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ОСНОВАНИЙ

Редактирование оснований — это способ прямого изменения последовательности нуклеотидов целевого участка генома. Редактирование проводится путем дезаминирования гетероциклического основания в ДНК без введения ДЦР, HDR, в отсутствие донорской матрицы и дополнительных экзогенных/эндогенных белковых факторов. Основными составляющими единицами редакторов оснований (ВЕ) являются нуклеозиддезаминаза,

каталитически неактивная Cas-нуклеаза и РНК, направляющая комплекс к целевому локусу для преобразования пар оснований. Точечные мутации могут быть внесены как в ДНК, так и в транскрипты РНК. В последнем случае происходит прямое редактирование патогенных транскриптов без изменения генетической информации. Поскольку редактирование РНК носит временный характер, в геномной ДНК не возникнут побочные продукты или нежелательные мутации, которые могут быть переданы дочерним клеткам во время митоза. Такой подход перспективен для лечения заболеваний, не имеющих генетического происхождения, и имитации генетических вариантов, которые обеспечивают преимущества для организма [1].

ТРАНСВЕРСИЯ ЦИТИДИНА В ТИМИДИН

Первыми редакторами оснований стали ВЕ, обеспечивающие направленное введение замен С→Т, поскольку природные цитидиндезаминазы, входящие в суперсемейство APOBEC/AID, способны на уровне РНК или ДНК дезаминировать С до U, имеющего такие же комплементарные свойства, как и Т. Первыми охарактеризованными членами этого суперсемейства стали белки APOBEC1 и AID. Белок APOBEC1 является каталитической субъединицей ферментного комплекса, редактирующего мРНК аполипопротеина В. Фермент AID играет ключевую роль в соматическом гипермутационном процессе и рекомбинации генов иммуноглобулинов в В-клетках при переключении классов антител. Также в суперсемейство входит группа цитидиндезаминаз APOBEC3 *Homo sapiens* (hA3), которые инактивируют геномы патогенных ретровирусов, таких как вирус иммунодефицита человека, с помощью случайных мутаций [2–4]. Цитидиндезаминазы суперсемейства APOBEC/AID сильно различаются по активности дезаминирования и предпочтениям в отношении нуклеотидного окружения мишени. Например, APOBEC1 *Rattus norvegicus* (rAPO1) выбирает ближайших соседей в следующем порядке: TC>CC>AC>GC [5]. Все семь дезаминаз группы hA3, несмотря на их структурное сходство, сильно различаются активностью дезаминирования и предпочтениями в отношении ДНК-субстрата [6–11]. На базе цитидиндезаминаз суперсемейства APOBEC/AID почти одновременно были разработаны три разных ВЕ, которые параллельно прошли схожие пути совершенствования. Первые ВЕ были сконструированы на основе природной rAPO1 и названы редакторами цитидиновых оснований (СВЕ) [5]. На основе ферментов, дезаминирующих ДНК, разработаны редакторы Target-AID и TAM. В Target-AID задействован ортолог AID — цитидиндезаминаза *Petromyzon marinus* CDA1 (PmCDA1), объединенная с N-концом каталитической субъединицы dCas или nCas (d/nCas), ингибитором урацил-ДНК-гликозилазы (UGI)

и гРНК [12]. Редактор TAM сконструирован с использованием цитидиндезаминазы AID, гибризированной с d/nCas и гРНК, а также при участии UGI [13]. Все три BE обладают не только высокой эффективностью, но и такими формами индивидуальной специфичности, как температурная чувствительность, размер окна активности, предпочтение нуклеотидной последовательности протоспекера. Эти различия предполагают, что разные редакторы должны дополнять друг друга и обеспечивать возможность выбора [14].

Рассмотрим механизм функционирования первого редактора – CBE [5]. CBE первого поколения получен путем гибридизации цитидиндезаминазы гAPO1 с N-концом неактивной нуклеазы dCas9, содержащей мутации, препятствующие образованию ДЦР в ДНК [5]. CBE1 дезаминирует С до U, который затем заменяется на Т (рис. 1). Однако в технологии CBE1 есть нюанс, снижающий

эффективность редактирования – это работа урацил-ДНК-гликозилазы (UNG). В нормальных условиях эксцизионная репарация оснований (BER) является первичным ответом клетки на несоответствие пары G • U, который инициируется вырезанием U с помощью UNG для предотвращения накопления мутаций в результате спонтанного окислительного дезаминирования С [15]. В процессе редактирования оснований промежуточная пара G • U может репарироваться клеточной системой BER с образованием исходной пары G • С. Поэтому, чтобы защитить урацил, входящий в некомплементарную пару G • U, от удаления с помощью UNG, CBE1 модифицировали, присоединив 83-аминокислотный UGI к С-концу комплекса гAPO1-dCas9 [5] (рис. 1). UGI включены также в Target-AID и TAM [12, 13]. В этой новой версии CBE2 урацил не удаляется путем BER с участием UNG, что существенно повышает эффективность

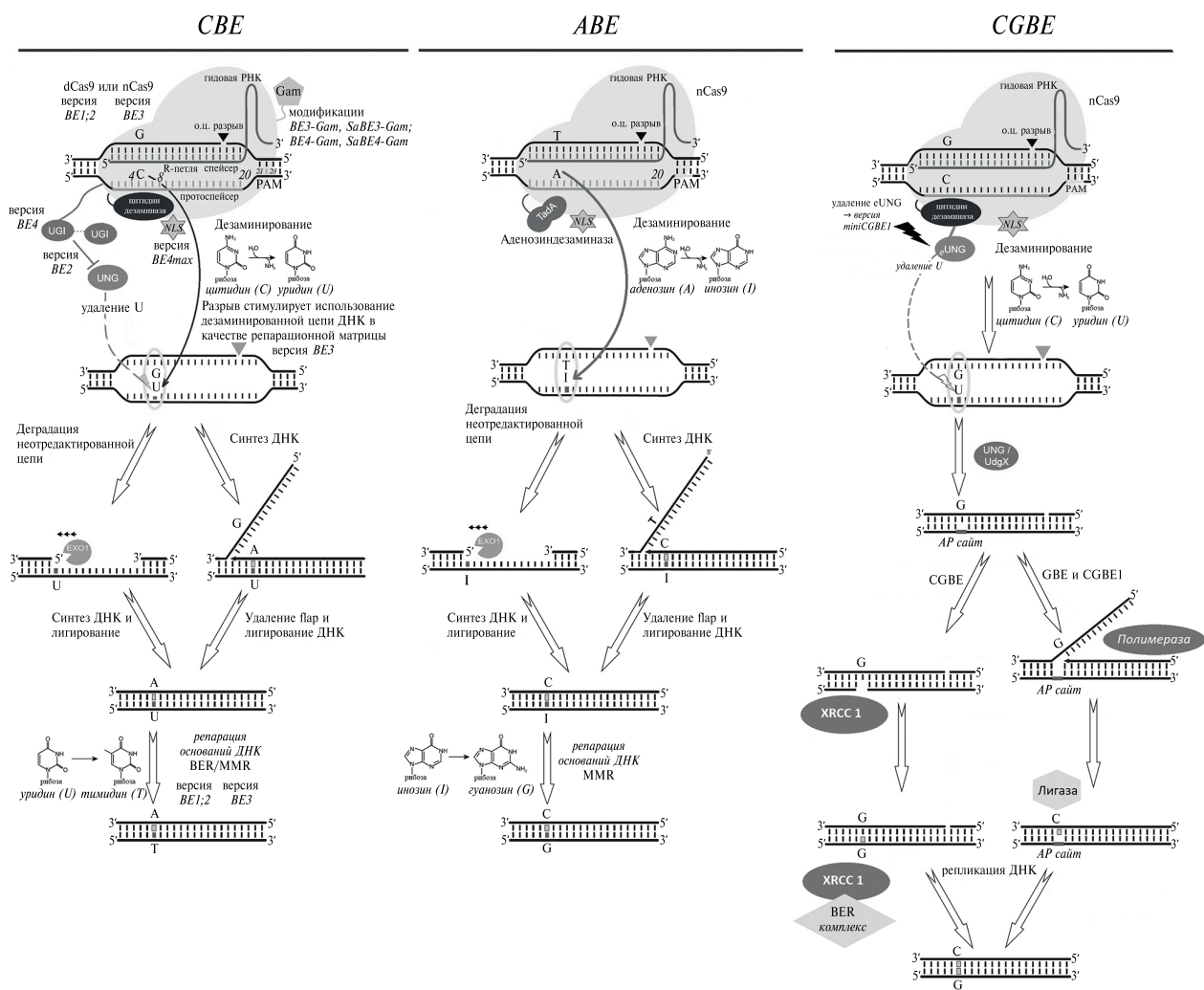


Рис. 1. Схематичное изображение функционирования CBE, осуществляющих трансверсию цитидина в тимидин (C→T); ABE, осуществляющих трансверсию аденозина в гуанозин (A→G); CGBE, осуществляющих трансверсию цитидина в гуанозин (C→G).

редактирования С→Т. Для дальнейшего повышения эффективности редактирования разработана версия СВЕ3, в которой вместо неактивной нуклеазы dCas9 используется nCas9 (альтернативное название D10A) [5]. В этом случае разрыв происходит в паре G•U недезаминированной (G-содержащей) цепи ДНК. Разрыв стимулирует использование дезаминированной (U-содержащей) цепи в качестве матрицы для репарации с переходом в промежуточное состояние с парой A•U, которая в итоге преобразуется в A•T [16]. Эта модификация, а также присоединение второго домена UGI (модификация СВЕ4) и белка Gam бактериофага Mu, который, как известно, защищает концы ДЦР от деградации, дополнительно повысило эффективность редактирования С (рис. 1) [17]. Дальнейшее усовершенствование ВЕ осуществлено в версии СВЕ4max путем модификации последовательности ядерной локализации (NLS) и оптимизации кодонов [18].

Доступный для дезаминазы участок оцДНК-мишени в пределах протоспейсера R-петли, называемый “окном редактирования/активности”, остается критичным звеном целевого редактирования оснований. Классическое окно составляет примерно 5 из 20 п.н. всего протоспейсера. Это означает, что для дезаминирования доступен только С, локализованный между позициями 4 и 8, при этом РАМ соответствует положениям с 21 по 23 (рис. 1) [5]. Расширение окна активности считается одним из направлений повышения эффективности редактирования. При этом, если в окне активности или в непосредственном окружении присутствуют несколько нуклеотидов-мишеней, то они могут подвергнуться сопутствующей нежелательной трансверсии. В связи с этим необходимо учитывать оба направления корректировки размера окна активности и выбирать оптимальный в зависимости от последовательности протоспейсера в каждом эксперименте. На окно активности может влиять ряд факторов, например, рядом с целевой последовательностью должен находиться подходящий РАМ. Так, ВЕ, в которых задействованы d/nCas9 *Streptococcus pyogenes* (d/nSpCas9), ограничены редактированием геномных локусов, содержащих NGG РАМ. Для расширения возможностей редактирования разработаны ВЕ, содержащие ортологи d/nCas9, распознающие РАМ, отличные от NGG, окно активности которых смещается или расширяется до целевых оснований. В противном случае эти основания становятся недоступными из-за отсутствия оптимального РАМ. Варианты ВЕ, созданные на основе разных ортологов SpCas9, подробно рассмотрены [14, 19], сопоставлены их активности и размеры окон редактирования. Важно отметить, что у редактора оснований *Staphylococcus aureus* окно редактирования шире, чем у *S. pyogenes*, а именно позиции 3–12, что позволяет редактировать основания, расположенные

ближе к РАМ [20–27]. Интересный вариант Cas9 с циклической перестановкой (Cas9-CP) изменяет локализацию домена нуклеозиддезаминазы по отношению к R-петле и таким образом может обеспечить более эффективное преобразование оснований в более широком окне редактирования [28]. ВЕ с участием Cas12a (Cpf1) распознает TTTV РАМ для трансверсии С в расширенном до 6 п.н. окне редактирования [29]. Напротив, ВЕ, включающий миниатюрный вариант Cas12f (CasMINI), имеет очень узкое окно, всего из 2 п.н. [30]. А использование оптимизированной версии nCas12a *Acidaminococcus sp.* демонстрирует улучшенную трансверсию С→Т [31].

Другим подходом к уменьшению зависимости ВЕ от структуры РАМ стало создание нуклеазы SpRY – структурно модифицированного варианта SpCas9. С помощью ВЕ, несущих в своей структуре SpRY, стало возможным воздействовать на гены, ранее недоступные для редактирования [32]. Однако такая “релаксация” РАМ снижает специфичность и способствует нецелевому редактированию оснований ДНК. В таких случаях можно предусмотреть возникновение “опечаток” редактирования и принять ряд мер по нивелированию проблемы. Рассмотрены два типа нецелевых эффектов ВЕ: независимые и зависимые от гРНК [33]. Зависимое от гРНК нецелевое редактирование происходит, когда комплекс ВЕ направляется гРНК к последовательностям ДНК, схожим с протоспейсером. Хотя зависимое от гРНК нецелевое редактирование оснований происходит относительно редко, идентификация этих “опечаток” крайне важна. Для оценки потенциальных нецелевых эффектов ВЕ используют полногеномное секвенирование и методы GUIDE-seq [34], Digenome-seq [35] и EndoV-seq [36]. Нивелировать эту проблему можно с помощью тщательного дизайна гРНК с использованием высокоточных вариантов Cas и РНП-комплексов для доставки ВЕ в клетки. Возникновение случайных нецелевых мутаций также не зависит от гРНК, особенно при высоком уровне экспрессии комплекса редактирования, и наблюдается существенно реже при использовании дезаминаз AmAPOBEC1, PpAPOBEC1, RrA3F, SsAPOBEC3B [37] и YE1 [38]. Сильное влияние на уровень нецелевого редактирования оказывает специфика гибридизации дезаминазы с белком Cas [39]. Так, при соединении с Cas через N-конец опечатки редактирования возникают чаще, чем при встраивании редактирующих ферментов в центральную зону (середину) nCas9 (такой вариант конструкции называют СЕ “Cas Embedding”) [40]. Логично, что ВЕ с более узкими окнами активности демонстрируют более низкий уровень нецелевого редактирования всего генома, потому что для редактирования как в целевых, так и в нецелевых сайтах доступно меньше нуклеотидов [38], хотя такой подход часто приводит к компромиссу между

эффективностью и точностью редактирования. Как и в случае гРНК-зависимых опечаток BE, снизить независимое от гРНК нецелевое редактирование можно, используя для доставки в клетку РНП или мРНК, что ограничивает экспрессию BE по времени, уменьшая нецелевое редактирование [37].

На расположение и ширину окна активности, точность и специфичность редактирования могут влиять различные варианты дезаминазы [11]. Например, классическая дезаминаза гAPO1 в составе CBE3 имеет окно активности из 5 п.н. (позиции 4–8 протоспейсера) [5], но изменения аминокислотных остатков гAPO1, участвующих в катализе и связывании ДНК, могут привести к сужению окна редактирования. Так, внесение мутаций W90Y или W90F в гAPO1 может снижать гидрофобность ее активного центра и, соответственно, внутреннее сродство к ДНК. Такие замены уменьшают неспецифическое дезаминирование и сокращают окно редактирования до 3 п.н., сохраняя при этом высокий уровень целевого дезаминирования. Оба варианта мутаций (R126E и R132E) в гAPO1 влияют на доступность оцДНК, сужают окно активности до 3 п.н., но снижают эффективность BE. Показано, что комбинация мутаций W90Y и R126E в гAPO1 (эта мутантная гAPO1 названа YE1, или YE), W90Y и R132E (YE2), R126E и R132E (EE) приводит к сужению окна активности до 2 п.н. при изменении эффективности редактирования в ряду дезаминаз в следующем порядке: гAPO1 $\approx$ YE1 > YE2 $\approx$ EE. При этом, если пойти дальше и ввести в гAPO1 тройную мутацию, объединив W90Y или W90F с R132E и R126E (мутант YEE), окно активности не только сократится до 2 п.н., но область редактирования сконцентрируется на С-6 протоспейсера, если в положении 5 также будет С. В связи с этим упоминается, что у BE, в состав которого входит YEE, окно сужается до 1 п.н. В этой ситуации точность BE сильно повышается, но эффективность при этом резко падает [20]. Анализ BE по соотношению “размер окна активности/эффективность редактирования” показал, что именно мутация R132E в дезаминазе ответственна за снижение эффективности, поэтому исследовали и альтернативные варианты мутаций в гAPO1. Так, гAPO1 с мутацией Y120F, расположенной вблизи активного центра гAPO1 и имеющей решающее значение для контакта с С-мишенью, показала высокую эффективность, что подтолкнуло к созданию тройного мутанта гAPO1, аналогичного YEE. В итоге эффективность BE, в состав которого вошла гAPO1 с мутациями W90Y, Y120F и R126E, оказалась сопоставимой с BE4 при сужении окна активности до 3 п.н. [41].

Напротив, использование цитидиндезаминазы hA3A расширяет, по разным данным, окно редактирования от 9 (позиции 3–11 протоспейсера) [42] до 12 п.н. (позиции 2–13 протоспейсера)

и улучшает превращение С→Т в метилированных областях генома [9]. Включение оцДНК-связывающего домена белка RAD51 между nCas9 и hA3A расширяет окно редактирования до 13 п.н. (позиции 3–15 (~17) протоспейсера) [42]. Одновременное включение нескольких доменов дезаминазы в BE увеличивает доступность нуклеотидов ДНК-мишени в R-петле, расширяя тем самым окно редактирования. Представителем этой технологии является система “BE-PLUS”, которая включает комплекс nCas9, SunTag, scFv-APOBEC-UGI-GB1, гРНК, где SunTag – полипептидный мотив, содержащий 10 копий эпитопа GCN4. С SunTag специфически взаимодействует одноцепочечный вариативный фрагмент scFv. Таким образом, действующий BE собирается при помощи указанного взаимодействия и содержит гРНК, nCas9 и 10 молекул гибридного белка scFv-APOBEC-UGI-GB1. При этом для предотвращения агрегации этой белковой конструкции используется домен GB1 G-белка *Streptococcus* [43]. В свою очередь, аминокислотная замена N57G, привела к повышению точности редактирования hA3A. Цитидиндезаминаза eA3A вошла в состав BE третьего поколения (BE3). eA3A-BE3 показывает специфичность высокоточного даже по сравнению с описанными BE суженного окна редактирования С в мотиве TCR (R = А или G) [10]. Вместе с тем проблемой остается высокоточное редактирование С в других мотивах, в частности, в целевых сайтах, содержащих несколько остатков С. Решением этой проблемы стала модернизация цитидиндезаминазы *H. sapiens* APOBEC3G (hA3G) и создание на базе BE4max редактора eA3G-BE с контекстной специфичностью CC. Цитидиндезаминаза hA3G содержит С-концевой каталитический домен и второй псевдокаталитический домен на N-конце, который сохраняет ту же пространственную укладку, но не обладает каталитической активностью. В улучшенную версию hA3G встроены С-концевой каталитический домен (CTD, C-terminal domain), что приводит к образованию hA3G-CTD (eA3G), который преимущественно дезаминирует С в соответствии с иерархией CCC>CCC>CC. Эффективность и точность eA3G-BE показана на клетках человека и эмбрионах кролика, что указывает на возможность использования этого редактора в терапии генетических заболеваний и создании животных моделей с измененным геномом для фундаментальных и доклинических исследований [44].

Сузить окно редактирования можно также с использованием цитидиндезаминазы PmCDA1. Target-AID позволяет сузить окно активности до 4 п.н. (позиции 16–19 протоспейсера) [12]. Кроме того, можно сузить окно редактирования и путем укорачивания дезаминазы PmCDA1 с С-конца, что приводит к возможности выборочного редактирования С в положениях 15 или 16 протоспейсера [45]. Укорачивание PmCDA1 не только

с С-конца, но и с N-конца способствует снижению ее сродства к ДНК, сводя тем самым к минимуму неспецифическое дезаминирование С. Одновременное усечение N- и С-концов приводит к уменьшению количества участков с “открытыми” гидрофобными остатками, что делает поверхность дезаминазы более “гладкой”, а внесение мутаций W122E и W139Q в эти гидрофобные остатки значительно повышает активность модернизированной цитидиндезаминазы (tCDA1EQ). В tCDA1EQ был удален UGI, в присутствии которого увеличивалась скорость мутаций. Поскольку tCDA1EQ имеет низкое сродство к ДНК и менее стабильна, чем исходная PmCDA1, архитектура ее присоединения к nCas9 может влиять на редактирующую активность. Для минимизации данной проблемы tCDA1EQ можно не только соединить с N-концом nCas9, но и встроить в середину этого белка. Действительно, tCDA1EQ, присоединенная к N-концу nCas9, показала нестабильную эффективность редактирования, тогда как версия, встроенная внутри nCas9, имела стабильно высокую эффективность, сравнимую с Target-AID. Структура “tCDA1EQ-N-конец nCas9” была названа AID-2S, где 2S означает “Small & Specific” (маленький и специфичный), а встроенная в nCas9 — AID-3S, где 3S это “Small & Specific & Superior” (маленький, специфичный и улучшенный). Показано, что AID-2S имеет более узкую область редактирования, тогда как у AID-3S окно активности сдвинуто в сторону последовательности PAM по сравнению с исходным Target-AID. Эффективность AID-2S и AID-3S находилась на уровне Target-AID, YE1 и YE2, при этом нецелевые эффекты были значительно снижены [46].

Использование улучшенной цитидиндезаминазы AID в составе BE четвертого поколения, eAID-BE4max, обеспечивает окно редактирования из 11 п.н. и редактирование С в контексте GC [47], а использование нескольких eгРНК (последовательности сгРНК, связанные линкерной петлей с каркасной последовательностью tracrРНК), позволяет еще больше расширить окно редактирования [13].

Окно редактирования может быть изменено также путем изменения ориентации доменов в составе BE и/или свойств связывающего их линкера [11]:

- В целом, дезаминазы, присоединенные к N-концу d/nCas9, имеют более широкие окна редактирования, чем присоединенные к С-концу, поскольку эта ориентация обеспечивает, вероятно, более легкий доступ к оцДНК внутри R-петли [48, 49]. В структурах, где дезаминаза встроена в середину nCas, размер окна редактирования будет варьировать в зависимости от положения дезаминазы в белке [28, 39]. Предполагается, что, уменьшение расстояния между дезаминазой и белком Cas9 приводит к более точному позиционированию дезаминазы на последовательности-мишенях [45, 48].

- Модификация линкера между дезаминазой и белком Cas путем укорачивания линкера и/или изменения его свойств, например увеличения жесткости, приводит к сужению окна активности при сохранении высокой эффективности редактирования [11, 48]. Однако укороченный линкер не влияет существенно на окно редактирования [10, 20].

С целью внесения случайных мутаций в заранее выбранные участки генома разработана стратегия, использующая CRISPR-направляемые ДНК-полимеразы. ДНК-полимеразы способны создавать все 12 замен, а также делеции. Так, ДНК-полимеразы, транслирующие одноцепочечный разрыв ДНК, способны инициировать синтез на одноцепочечном разрыве дцДНК, замещая расположенные по ходу репликации нуклеотиды, т.е. в сторону 3'-конца, а их flap-эндонуклеазный домен впоследствии разрушает смещенные нуклеотиды, оставляя лигируемый одноцепочечный разрыв. ДНК-полимеразы, транслирующие одноцепочечный разрыв ДНК, участвуют в конструировании новых BE. Показано, что введение в nCas9 трех мутаций (K848A, K1003A и R1060A), способствующих диссоциации комплекса nCas9 с ДНК после разрыва целевого локуса, увеличивает частоту целевых мутаций. Усовершенствованная версия nCas9 названа enCas9. В итоге гибридизация enCas9 с N-концом ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* (PolI), несущей мутации D424A, I709N и A759R (PolI3M), привела к созданию enCas9-PolI3M, названной EvolvR. По сравнению с использованием направленного мутагенеза на основе dCas9-AIDx, где окно редактирования заключено в пределах 5 п.н., EvolvR способна непрерывно диверсифицировать все нуклеотиды в пределах настраиваемой длины окна, до 350 п.н., в определяемых локусах. Следовательно, nCas9-PolI3M генерирует более широкий спектр замещающих мутаций, чем dCas9-AIDx, что применимо для крупномасштабных генетических скрининговых исследований [50, 51].

Эффективность направленного мутагенеза дополнительно повышается при использовании CRISPR-X. В CRISPR-X неактивная нуклеаза dCas9 и цитидиндезаминаза AID взаимодействуют посредством MS2-шпилек и MS2-связывающих белков. Две шпильки MS2, входящие в состав eгРНК, рекрутируют два MS2-связывающих белка, которые соединены с AID, лишенной С-конца (Δ AID). Использование MS2- Δ AID ограничивает локализацию AID в ядре и улучшает эффективность мутагенеза по сравнению с полноразмерным AID. Более того, гиперактивный вариант AID с усиленной активностью соматической гипермутации увеличивал скорость мутагенеза до $\sim 1/1000$ оснований. Экспериментально показана возможность использования CRISPR-X в направленной эволюции GFP в усиленный

GFP с более высокой интенсивностью излучения (eGFP), а также для идентификации вариантов генов, устойчивых к бортезомибу [52]. Кроме того, CRISPR-X использовали для получения моноклональных антител человека с повышенной аффинностью к антигену в клетках HEK293 [53].

В качестве альтернативного подхода к увеличению точности редактирования можно рассматривать систему нековалентного привлечения цитидиндезаминазы к конкретной геномной С-мишени. Этот подход предполагает отход от классического ковалентного взаимодействия деаминазы с Cas9, которое неразрывно связывает события деаминирования С как на целевых участках генома, так и на близлежащих нежелательных мишенях. Напротив, нековалентное связывание должно способствовать разделению событий редактирования на целевом сайте и рядом с ним, тем самым повышая вероятность точных мутаций с заменой одного основания. Ключевыми игроками этой системы становятся белки, которые связывают деаминазу, не блокируя активный сайт от взаимодействия с С-мишенью. Эти белки, связанные с комплексом Cas9n/гРНК, используются для привлечения коэкспрессируемого фермента АРОВЕС для редактирования. По ассоциации с физическим процессом магнетизма эта технология была названа “магнитным редактором” (MagnEdit) [54].

ТРАНСВЕРСИЯ АДЕНОЗИНА В ГУАНОЗИН

Альтернативным подходом в разработке ВЕ стало использование деаминаз А. Редактор основания А (ABE) включает nCas, аденозиндезаминазу, гРНК и функционирует подобно СВЕЗ. Комплекс ABE связывается с ДНК-мишенью, после чего аденозиндезаминаза катализирует превращение А→I, создавая из Т•А пару Т•I, которая путем репарации неспаренных оснований (MMR) последовательно превращается в С•I и затем в С•G. Отсутствие природной ДНК-аденозиндезаминазы для нацеливания и перехода А→G привело к созданию из тРНК-аденозиндезаминазы *E. coli* (TadA^{wt}), мутантного варианта TadA*, способного эффективно деаминировать около 53% остатков А в ДНК (рис. 1). Создано несколько поколений ABE, которые различаются вводимыми в гомодимер TadA мутациями [55]. Среди них выделяют наиболее эффективные ABE6.3, ABE7.8, ABE7.9 с окнами редактирования 3 п.н. (позиции 8–10 протоспейсера) и ABE7.10 с окном редактирования из 4 п.н. (позиции 4–7 протоспейсера). ABE7.10 состоит из гетеродимера TadA*-TadA^{wt}, она обеспечивает высокоэффективное редактирование А в линиях клеток мышей [56] и человека [55]. Активность ABE7.10 была дополнительно повышена путем модификации NLS и оптимизации кодонов до версии ABEmax [18]. Стратегии изменения окна

активности ABE развивались таким же путем, как и в СВЕ. Окно редактирования в зависимости от поставленной экспериментальной задачи можно сузить, вводя, например, мутацию F148A в домен TadA [57], или расширить, используя Cas9-CP [28], а также SpRY [32]. Подход с заменой классического SpCas9 ортологами позволил осуществлять трансверсию А→С в геномных сайтах, содержащих *ne-NGG* PAM [22, 58]. Например, для создания ABE, действующих на сайты, содержащие NNNRRT и NGA PAM, соответственно, nSpCas9 был заменен на nSaKKH или nSpCas9-VQR в ABE7.10 и ABEmax. При этом Sa-ABEmax и SaKKH-ABEmax имеют большое окно редактирования (позиции 4–14 протоспейсера), хотя эффективность редактирования невысока [28, 59]. Использование xCas9 (вариант SpCas9), созданного для работы с широким спектром последовательностей PAM [26], в ABE7.10 и ABEmax позволило распознавать широкий спектр последовательностей *ne-NGG* PAM, включая NR, NG, GAA и GAT [28]. Однако в отличие от усовершенствованных версий СВЕ, ABE, содержащие ортологи SpCas9, имели более низкую эффективность редактирования оснований, чем канонический ABE, потому что белок TadA был изначально усовершенствован и представлен в виде гибрида с SpCas9. В следующей версии ABE8 гетеродимер TadA*-TadA^{wt} не содержит TadA^{wt}, а TadA* дополнен восемью новыми мутациями, что позволило улучшить кинетику деаминирования. Удаление TadA^{wt} не влияет на активность редактирования ABE8 и указывает на то, что новые аденозиндезаминазы TadA-8e и TadA-8s могут эффективно работать как мономеры [34, 60]. Так, эффективность ABE8 с TadA-8e была выше, чем у ABE7.10 при сочетании деаминазы не только с SpCas9, но и с SpnCas9-NG, SaCas9, SaCas9-KKH, LbCas12a, enAsCas12a, а окно активности было шире (позиции 3–10 протоспейсера) [60]. ABE8 с TadA-8s также показал высокую эффективность редактирования в сочетании с SaCas9 и SpCas9-NG [34]. Менее эффективной по сравнению с TadA-8, но не менее интересной является новая версия аденозиндезаминазы, в которую добавили мутации V82G и A56G, а также удалили TadA^{wt} из гетеродимера. Смысл этой двойной мутации заключается в том, что замена V82G (версия miniABE) нивелирует неспецифическое сродство к РНК-субстратам [61], представляющее проблему как для ABE, так и СВЕ, которые могут индуцировать независимое от гРНК редактирование оснований РНК в масштабах всего транскриптома [62]. Однако мутация V82G также снижает сродство TadA к ДНК-субстратам, что в результате отрицательно влияет на эффективность редактирования. Поэтому для увеличения сродства к ДНК-мишени в miniABE добавили вторую мутацию A56G. Полученная TadA-A56G&V82G эффективно редактировала ДНК-мишени и характеризовалась сниженной нецелевой активностью

дезаминирования РНК [63]. Дополнительно с модификациями АВЕ можно ознакомиться в работе Jeong Y. K. и соавт. [14].

ТРАНСВЕРСИЯ ЦИТИДИНА В ГУАНОЗИН

Следующей ступенью в развитии технологии ВЕ стала трансверсия С→G. Сначала был получен GBE, состоящий из nCas9, цитидиндезаминазы и UNG. После дезаминирования и образования остатка дезоксиуридина UNG вырезает урацил, что приводит к появлению AP-сайта. В то же самое время nCas9 вносит одноцепочечный разрыв, создавая предпосылки для удлинения 3'-конца разрыва с использованием в качестве матрицы цепи ДНК, содержащей AP-сайт. В трансверсии С→G в клетках млекопитающих участвует gAPO1. Система gAPOBES-nCas9-UNG показала высокую специфичность редактирования в шестой позиции протоспейсера, эффективность которой составила 5.3–53.0% [64]. Параллельно на основе платформы BE4max был разработан BE С→G [65]. На первом этапе из BE4max удалили две UGI и получили BE4maxΔUGI, что привело к увеличению

количества трансверсий С→G; при этом также наблюдалось наиболее эффективное редактирование в шестом положении протоспейсера [65]. В качестве цитидиндезаминазы была выбрана gAPO1 с мутацией R33A и сниженной нецелевой активностью редактирования РНК и ДНК [62]. Добавление к N-концу BE4maxΔUGI ортолога UNG из *E. coli* (eUNG) привело к формированию BE4max(R33A)ΔUGI, названной CGBE1 (рис. 1). Однако BE CGBE1, несмотря на высокую эффективность целевого редактирования С→G, оказался довольно громоздким, поэтому пришлось его значительно уменьшить, удалив домен eUNG, что привело к умеренному снижению эффективности и получению нового редактора miniCGBE1 [65].

Кроме UNG-опосредованной трансверсии С→G [64, 65], где количество переходов С•G→G•С прямо зависит от генерации AP-сайтов, разработан новый редактор CGBE, основанный на манипулировании репарацией ДНК после создания AP-сайта. Так, при создании AP-сайта в Cas9-индуцированной R-петле клеточный фермент UNG замещается эндонуклеазой APE1, после чего белок XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1),

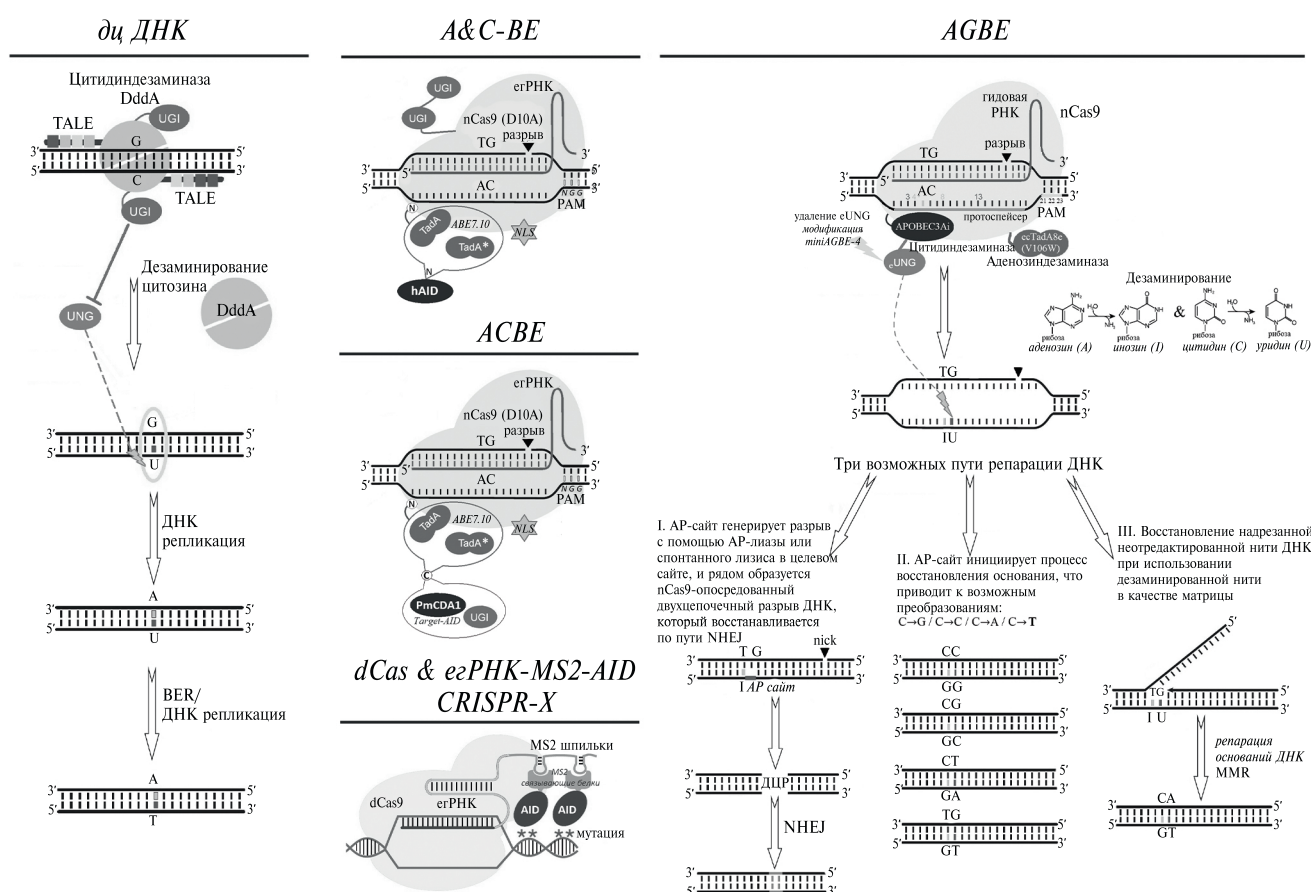


Рис. 2. Схематическое изображение редактирования оснований в дцДНК; синхронной трансверсии A→G и C→T в одном целевом сайте (A&C-BE, ACBE); одновременного введения четырех типов трансверсий: C→G, C→T, C→A, A→G, а также InDel на одной и той же цепи ДНК в сайтах-мишенях (AGBE).

участвующий в эксцизионной репарации ДНК, рекрутирует такие компоненты BER, как ДНК-полимераза β (Pol β) и ДНК-лигазы, для заполнения бреши G. Последующая репарация ДНК преобразует пару G • G в G • C (рис. 1) [66]. Каждый редактор описывается как высокоэффективный и обладающий широким потенциалом применения в научных и терапевтических целях. Для предсказания эффективности той или иной модификации BE, частоты редактирования C • G → G • C и определения его оптимальных стратегий разработаны модели машинного обучения CGBE-Hive [67].

Недавно стало возможным редактирование оснований в контексте дцДНК, ранее недоступное из-за специфичной к оцДНК активности цитидин- и аденозиндезаминаз. Показано, что DddA — токсин, секретируемый бактериями *Burkholderia cenocepacia* для индукции репликативного стресса ДНК [68] и нестабильности генома у других бактерий, проявляет цитидиндезаминазную активность в отношении дцДНК [69]. Для замены C • G → T • A в дцДНК как клеточных линий, так и мышей, сконструирован редактор DdCBE: токсичный домен DddA был разделен на две нетоксичные части, которые соединили с UGI и ДНК-связывающими активаторами транскрипции TALE, что позволило восстановить функциональный домен цитидиндезаминазы (рис. 2) [70, 71]. Этот BE может работать не только с яДНК, но и с мтДНК, что предоставляет большие возможности для изучения митохондриальных заболеваний, поскольку более 90% патогенных мутаций мтДНК являются точечными [72]. Следует отметить, что известные BE, управляемые РНК, не подходят для редактирования мтДНК, поскольку гРНК не могут быть доставлены в митохондрии [73]. Для расширения возможностей подобных систем разработан BE TALEd, превращающий A в G в мтДНК. Отличие редактора TALEd от DdCBE заключается в использовании нетоксичного полноразмерного варианта DddA с мутацией E1347A в активном сайте дезоксиаденозиндезаминазы, полученной из TadA и слитой с TALE [74].

В принципе, используя описанные режимы BE, можно осуществить многоэтапное редактирование. Например, C в паре C • G может быть первоначально превращена в U с помощью CBE (U • G), а U • G, в свою очередь, в T • A с помощью механизмов репликации и репарации клеточной ДНК. В качестве альтернативы C • G можно превратить в G • C с помощью CGBE с последующим опосредованным CBE переходом G • C → A • T. Затем с использованием этой стратегии целевой C можно превратить в T (CBE), G (CGBE) или A (CGBE + CBE). Точно так же A можно преобразовать в G (ABE), C (ABE + CGBE) или T (ABE + CGBE + CBE). Тем не менее, многоэтапное редактирование трудно провести с высокой эффективностью и специфичностью

из-за ряда ограничений, таких как окно высокой дезаминазной активности, расположенное в определенном положении относительно РАМ. Кроме того, на результат и эффективность редактирования может влиять контекст последовательности целевого локуса, а наличие нескольких редактируемых азотистых оснований в окне активности, а иногда и за его пределами, может быть причиной нежелательных мутаций [64, 75–77]. Несмотря на широкий спектр BE с различными характеристиками и свойствами, в том числе обладающих высокой эффективностью и специфичностью, совместная трансфекция редакторов разных оснований дает низкий коэффициент совместной трансверсии A → G и C → T. Скорее всего, это связано с конкуренцией разных BE за целевой сайт [78].

СИНХРОННЫЕ ТРАНСВЕРСИИ НЕСКОЛЬКИХ ОСНОВАНИЙ

В 2020 году опубликован ряд BE для синхронного введения замен A → G и C → T в одном и том же целевом сайте. Путем гибридизации цитидиндезаминазы и адениндезаминазы вместе с nCas9 и гРНК были сконструированы двойные BE как для растений, так и для млекопитающих:

1. STEME (saturated targeted endogenous mutagenesis editors) в протопластах риса одновременно редактирует C и A в одном и том же сайте-мишени с эффективностью 15.10% [79].

2. SPACE создан на платформах miniABEmax-V82G (A → G) и Target-AID (C → T) с добавлением двух UGI [80].

3. Target-ACEmax объединяет цитидиндезаминазу PmCDA1 и аденозиндезаминазу TadA для эффективного синхронного редактирования A → G и C → T в клетках HEK293T [81].

4. A&C-BEmax сконструирован из цитидиндезаминазы hAID, соединенной с N-концом ABE7.10. Комплекс ABE7.10-N-hAIDmax содержит NLS, что увеличивает активность двухкомпонентного редактирования в большей степени за счет повышения активности CBE, чем ABE. Версия A&C-BEmax дополнена двумя копиями UGI (рис. 2). Коэффициент одновременной трансверсии A и C при совместной трансфекции CBE и ABE7.10 с шестью егРНК был в большинстве случаев существенно ниже, чем при использовании A&C-BEmax. A&C-BEmax даже рассматривают в качестве возможного терапевтического агента [78].

5. ACBE объединяет возможности редакторов Target-AID и ABE7.10 (рис. 2). В ACBE цитидиндезаминаза PmCDA1 и UGI в составе Target-AID соединены через C-конец с ABE7.10, который присоединен к nCas9 через N-конец, при этом NLS находится в N- и C-концевых участках. Особенностью ACBE считают одновременное введение точечных

мутаций А→G и С→T в соматические клетки млекопитающих для получения с трансгенных животных и коррекции генетических заболеваний человека [82].

6. ABE сконструирован на платформах CGBE и ABE для одновременного введения четырех типов трансверсий С→G, С→T, С→A, A→G, а также InDel в сайтах-мишенях на одной и той же цепи ДНК (рис. 2). В максимально эффективной и компактной версии miniABE-4 eUNG удалена, CGBE содержит мутантную цитидиндезаминазу APOBEC3Ai, а ABE — высокоэффективную мономерную аденозиндезаминазу eCtadA8e(V106W) [83].

Интересным направлением, расширяющим диапазон применения BE, стало введение преждевременного стоп-кодона в середину гена-мишени с целью дестабилизации его экспрессии. Два независимых подхода (CRISPR-STOP и iSTOP) показывают, что BE3 может превращать кодоны CAA, CAG, CGA и/или TGG в стоп-кодоны TAA, TAG и TGA в целевых генах [84, 85]. Вносить мутации в стартовый кодон ATG может также редактор ABEmax. Эта стратегия, названная i-Silence, включает трансверсию ATG в GTG/ACG, подавляя тем самым экспрессию целевого гена. В отличие от CRISPR-STOP и iSTOP дестабилизация генов с помощью i-Silence не приводит к образованию укороченных вариантов белка, поскольку блокируется начало трансляции [86]. Еще одна система, CRISPR-pass, превращает преждевременный стоп-кодон в кодоны глутамин (CAA или CAG) или аргинин (CGA), обеспечивая продолжение трансляции [87]. BE способны также вызывать программируемый пропуск экзонов путем мутации оснований ДНК-мишени в акцепторных сайтах сплайсинга. Система CRISPR-SKIP в акцепторных сайтах сплайсинга осуществляет трансформацию G, которым заканчивается большинство интронов, в A через редактирование C в комплементарной цепи целевого сайта. В результате соответствующие экзоны не включаются в зрелые транскрипты, тогда как другие экзоны экспрессируются нормально [88].

ПРАЙМИРОВАННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ

На основе технологии редактирования оснований и CRISPR/Cas9 разработана молекулярная платформа праймированного редактирования генома (PE), применение которой позволяет выполнять все 12 возможных преобразований, вставок и делеций от основания к основанию. В отличие от HDR, PE не зависит от ДЦР ДНК или синтетических экзогенных донорных молекул ДНК для замены целевых геномных последовательностей. Более того, PE расширяет возможности редактирования генома, позволяя, теоретически, исправить до 89% мутаций более чем в 75 000 генетических заболеваний человека, о которых сообщается

в ClinVar [89, 90]. Метод PE более универсален, чем HDR, так как способен вносить точечные мутации не только в пределах 10 п.н. от места разрыва, но и на больших (> 30 п.н.) расстояниях [91]. Хотя эффективность редактирования PE и BE еще не сравнима, но этот подход непрерывно модернизируется и при определенных условиях его эффективность может превышать 50% [91–93]. Технология PE может применяться в фундаментальных и прикладных исследованиях не только на клеточных культурах [89] и мелких лабораторных животных [94], но и на моделях органоидных культур [95], *Danio rerio* [96], *Drosophila melanogaster* [97], кроликах [98], а также растениях [93, 99, 100].

Редакторы PE сконструированы путем слияния M—MLV RT с С-концом pCas9. В этой технологии используется специфическая 3'-удлиненная egРНК, содержащая PBS и RT-матрицу (pegРНК). Общий принцип работы PE заключается в том, что система, направляемая pegРНК, связывается с ДНК-мишенью, pCas9 создает разрыв в цепи ДНК, содержащей РАМ. Созданный таким образом одноцепочечный участок ДНК со свободным 3'-концом связывается с PBS на pegРНК. Далее RT связывается с 3'-концом экспонированной цепи ДНК-мишени и выполняет обратную транскрипцию участка pegРНК, после чего нередатируемый выступающий 5'-флар на цепи, содержащей РАМ, разрушается клеточными эндонуклеазами. Наконец, происходит лигирование и репарация ДНК с образованием нужной последовательности (рис. 3) [89]. Более высокая специфичность редакторов PE по сравнению с классическим методом CRISPR/Cas9 может быть обусловлена тремя последовательными гибридизациями: между ДНК-мишенью и спейсером в молекуле pegРНК (гРНК, содержащей PBS и RT-матрицу), между ДНК-мишенью и PBS в молекуле pegРНК и между ДНК-мишенью и редактируемым участком флар-ДНК [92].

Разработаны три основные версии PE. Редактор первого поколения (PE1) получен путем слияния С-конца pCas9 (H840A) с M—MLV RT, при участии pegРНК его эффективность составила 0.7–5.5% при использовании точечных трансверсий [89]. Во второй версии (PE2) в M—MLV RT для увеличения активности при более высоких температурах были внесены три мутации (D200N, L603W и T330P), а также две дополнительные мутации (T306K и W313F) для усиления связывания с комплексом pegРНК. В итоге вариант PE2 оказался в 1.6–5.1 раза эффективнее PE1 [92]. PE3 разработан для устранения неопределенности в редактировании 5'-флар, который спаривается с немодифицированной цепью ДНК. С этой целью применяются дополнительные гРНК, которая с помощью pCas9 вносит разрыв в нередатируемую цепь ДНК, используя эндогенный путь восстановления несоответствия для сохранения информации об

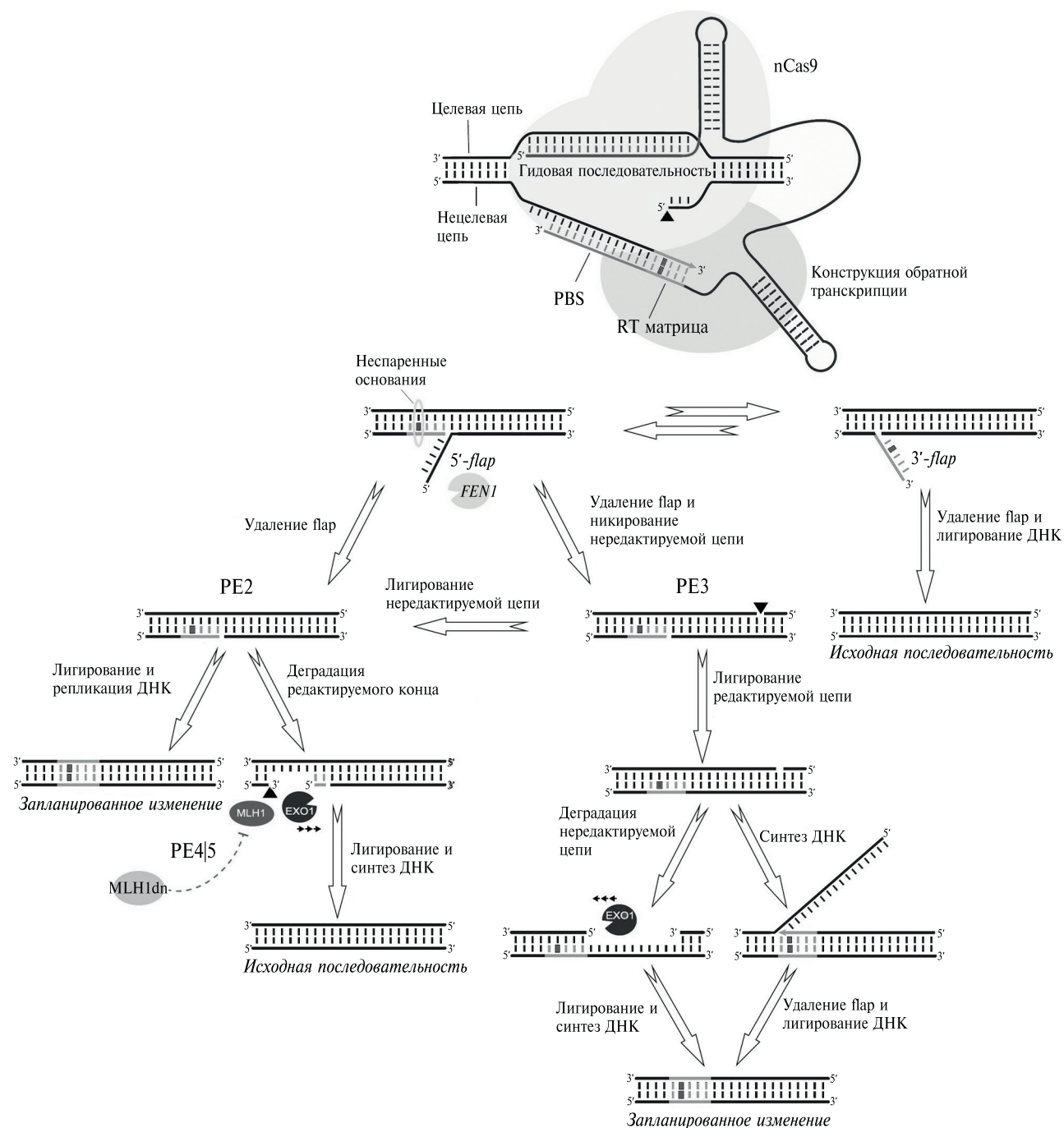


Рис. 3. Схематичное изображение функционирования основных модификаций PE.

отредактированной цепи. Благодаря этому подходу можно с эффективностью 33% получить все 12 комбинаций оснований. Количество нецелевых эффектов и нежелательных мутаций при этом становится ниже, чем при использовании CRISPR/Cas9 (рис. 3) [16]. Развитие PE следующих поколений основано на подавлении MMR-пути [101]. Предложены более эффективные системы, где редактирование осуществляется на фоне временной

экспрессии белка-репрессора MMR (MLH1dn). На основе PE2 и PE3 сконструированы редакторы с подавленной активностью MMR, названные PE4 и PE5 соответственно. Кроме того, редакторы второго–пятого поколений были модернизированы до версии PEmax за счет использования кодон-оптимизированной RT человека, линкера из 34 аминокислотных остатков, двухкомпонентной последовательности NLS SV40, которая увеличивает

соотношение ядерной и цитоплазматической концентраций белка, дополнительной С-концевой последовательности (с-Мус NLS), включающей остатки Pro320-Asp328, что позволяет осуществлять транспорт в ядро, а также за счет включения в SpCas9 мутаций R221K и N394K, улучшающих ее активность. В клетках с MMR эта новая система превзошла по эффективности редактирования классический PE2 в 2.8 раза, а в клетках с дефицитом MMR в 1.2 раза [101, 102].

В оценке эффективности технологии PE существуют некоторые расхождения [101, 103–106]. В настоящее время основными ограничениями PE считаются его крупный размер, зависимость от целевых сайтов и типов клеток, более сложный дизайн гРНК. В стремлении усовершенствовать систему разработаны различные модификации PE, в которых в той или иной степени были устранены многие из ограничений. Например, эффективность PE2 повысили, добавив на N-конец пептиды IGFpm1 и NFATC2IPp1, связанные с репарацией ДНК (модификация IN-PE2) [107], или ДНК-связывающий домен Rad51 (модификация hyPE2) [108].

Расширение диапазона редактирования PE зависит в основном от белка Cas, который распознает последовательность PAM. PE первых трех поколений сконструированы на основе SpCas9, распознающей NGG-последовательности PAM, которые встречаются в среднем 1 раз в каждых 16 случайно выбранных геномных локусах, что сильно ограничивает диапазон мишеней для редактирования [89]. Использование таких вариантов SpCas9, как NG, SpG, SpRY, VQR, VRQR и VRER, после введения мутации H840A в PE второго поколения привело к следующим результатам [109]:

- модификации PE2-NG, PE2-SpG и PE2-SpRY позволяют редактировать сайты рядом с PAM NGN;
- оба варианта PE2-VQR и PE2-VRQR активны в пяти из семи сайтов NGA PAM;
- PE2-VRER предпочитает NGCG другим последовательностям PAM;
- PE2-SpG имеет самую высокую активность в сайтах NGA/C/T;
- PE2-SpRY функционирует независимо от вариаций последовательности PAM (активен в 43 из 58 сайтов), хотя и со сниженной активностью.

Модификация regРНК и ее компонентов тоже способствует повышению эффективности PE. Так показано, что увеличение длины PBS позволяет повысить активность regРНК с 3.29% для 9-нуклеотидного PBS до 16.6% для 13-нуклеотидного [109]. Добавление в RT-матрицу синонимичных мутаций, т.е. мутаций, при которых изменение нуклеотидной последовательности гена не приводит к изменению аминокислотной последовательности белка,

формирует версию spegРНК, которая увеличивает эффективность PE в разы [110]. Классическая regРНК циклизуется во время отжига, поскольку PBS на ее 3'-конце комплементарен части спейсера на 5'-конце, а это препятствует работе редакторов PE. Предотвратить этот феномен можно, защитив 3'-конец шпильчатой структурой, полученной путем присоединения сайта узнавания рибонуклеазы Csy4 из 20 п.н. Гибридизация Csy4-T2A с nCas9 и комплексом RT на базе PE третьего поколения привела к созданию более эффективной версии ePE [111]. Также 3'-конец regРНК нуждается в защите от экзонуклеазной дегградации, которая может привести к потере PBS и, как следствие, снизить эффективность редактирования PE. Для решения этой проблемы решили добавить к 3'-концу псевдоузел, представляющий собой модифицированный аптамер evoreQ1. Этот аптамер, состоящий из 42 п.н., относится к классу природных РНК минимального размера с четко определенной третичной структурой. regРНК с псевдоузлом на 3'-конце (eregРНК) дополнительно усовершенствовали, вставив 8-нуклеотидный линкер между 3'-концом PBS и evoreQ1, чтобы уменьшить влияние аптамера на функцию regРНК [106]. Защитить regРНК от 3'-деградации можно и присоединив к 3'-концу мотив, устойчивый к вирусной экзорибонуклеазе (версия хгРНК) [112]. Сходным образом работает и технология добавления на 3'-конец G-квадруплекса hTR (теломеразная РНК человека) [113]. Другой подход к увеличению стабильности regРНК с целью повышения эффективности PE состоит во включении С•G или замены других пар оснований на С•G в шпильке гРНК. Этот вариант гРНК назван aregРНК [110]. Расширить спектр применений PE можно с использованием сразу двух regРНК. В сочетании с сайт-специфичной рекомбиназой PE с двумя regРНК (twinPE) способна реализовать целевую интеграцию ДНК-плазмид размером более 5000 п.н. и инверсию последовательностей из 40 т.п.н. в клетках человека [114].

Таким образом, следует отметить, что технологии PE и BE произвели революцию в области редактирования генома. Вместе с тем, нерешенными остаются такие проблемы, как повышение эффективности и специфичности редактирования, оптимизация методов доставки и устранение нецелевых эффектов. Ранее мы показали, что несмотря на значительный прогресс PE2, оптимальной технологией целевого редактирования генома мышей остается egРНК-направленное расщепление ДНК-мишени Cas9 с последующей гомологичной рекомбинацией с использованием оцДНК-матрицы [104]. Однако попытки модернизации технологий PE и BE не стоят на месте и ведутся параллельно. Предложена новая стратегия DAP “Drive-And-Process” мультиплексного редактирования оснований до 31 локуса и мультиплексного праймированного редактирования до трех локусов.

DAR существенно снизила нецелевое редактирование и была адаптирована для доставки с помощью векторов на основе аденоассоциированного вируса и лентивируса для одновременного редактирования нескольких локусов [115]. Технологии РЕ и ВЕ широко обсуждаются в сфере генной терапии и, несмотря на обеспокоенность по поводу возможной генотоксичности [116], результаты доклинических испытаний формируют мнение, что однажды РЕ и ВЕ будут использоваться для лечения генетических заболеваний [117].

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 21-64-00006).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Reardon S. (2020) Step aside CRISPR, RNA editing is taking off. *Nature*. **578**, 24–27.
- Лада А.Г., Фрам-Крик К., Козьмин С.Г., Майоров В.И., Карпова Т.С., Рогозин И.Б., Павлов Ю.И. (2011) Мутаторные эффекты и мутационная специфичность редактирующих дезаминаз. *Биохимия*. **76**(1), 157–175.
- Kohli R.M., Maul R.W., Guminski A.F., McClure R.L., Gajula K.S., Saribasak H., McMahon M.A., Siliciano R.F., Gearhart P.J., Stivers J.T. (2010) Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification. *J. Biol. Chem.* **285**, 40956–40964.
- Conticello S.G. (2008) The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* **9**, 229.
- Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. **533**, 420–424.
- Hou S., Lee J.M., Myint W., Matsuo H., Kurt Yilmaz N., Schiffer C.A. (2021) Structural basis of substrate specificity in human cytidine deaminase family APOBEC3s. *J. Biol. Chem.* **297**, 100909.
- Ziegler S.J., Liu C., Landau M., Buzovetsky O., Desimie B.A., Zhao Q., Sasaki T., Burdick R.C., Pathak V.K., Anderson K.S., Xiong Y. (2018) Insights into DNA substrate selection by APOBEC3G from structural, biochemical, and functional studies. *PLoS One*. **13**, e0195048.
- Lee S., Ding N., Sun Y., Yuan T., Li J., Yuan Q., Liu L., Yang J., Wang Q., Kolomeisky A.B., Hilton I.B., Zuo E., Gao X. (2020) Single C-to-T substitution using engineered APOBEC3G-nCas9 base editors with minimum genome- and transcriptome-wide off-target effects. *Sci. Adv.* **6**, eab1773.
- Wang X., Li J., Wang Y., Yang B., Wei J., Wu J., Wang R., Huang X., Chen J., Yang L. (2018) Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion. *Nat. Biotechnol.* **36**, 946–949.
- Gehrke J.M., Cervantes O., Clement M.K., Wu Y., Zeng J., Bauer D.E., Pinello L., Joung J.K. (2018) An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.* **36**, 977–982.
- Tan J., Forner J., Karcher D., Bock R. (2022) DNA base editing in nuclear and organellar genomes. *Trends Genet.* **38**, 1147–1169.
- Nishida K., Arazoe T., Yachie N., Banno S., Kakimoto M., Tabata M., Mochizuki M., Miyabe A., Araki M., Hara K.Y., Shimatani Z., Kondo A. (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*. **353**, aaf8729.
- Ma Y., Zhang J., Yin W., Zhang Z., Song Y., Chang X. (2016) Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat. Methods*. **13**, 1029–1035.
- Jeong Y.K., Song B., Bae S. (2020) Current status and challenges of DNA base editing tools. *Mol. Ther.* **28**, 1938–1952.
- Pearl L.H. (2000) Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mut. Res.* **460**, 165–181.
- Nambiar T.S., Baudrier L., Billon P., Ciccio A. (2022) CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. *Mol. Cell*. **82**, 348–388.
- Komor A.C., Zhao K.T., Packer M.S., Gaudelli N.M., Waterbury A.L., Koblan L.W., Kim Y.B., Badran A.H., Liu D.R. (2017) Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C: G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci. Adv.* **3**, eaao4774.
- Koblan L.W., Doman J.L., Wilson C., Levy J.M., Tay T., Newby G.A., Maianti J.P., Raguram A., Liu D.R. (2018) Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat. Biotechnol.* **36**, 843–846.
- Yu S.Y., Birkenshaw A., Thomson T., Carlaw T., Zhang L.H., Ross C.J.D. (2022) Increasing the targeting scope of CRISPR base editing system beyond NGG. *CRISPR J.* **5**, 187–202.
- Kim Y.B., Komor A.C., Levy J.M., Packer M.S., Zhao K.T., Liu D.R. (2017) Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat. Biotechnol.* **35**, 371–376.
- Nishimasu H., Shi X., Ishiguro S., Gao L., Hirano S., Okazaki S., Noda T., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Mori H., Oura S., Holmes B., Tanaka M., Seki M., Hirano H., Aburatani H., Ishitani R., Ikawa M., Yachie N., Zhang F., Nureki O. (2018) Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*. **361**, 1259–1262.
- Miller S.M., Wang T., Randolph P.B., Arbab M., Shen M.W., Huang T.P., Matuszek Z., Newby G.A., Rees H.A., Liu D.R. (2020) Continuous evolution of Sp-Cas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nat. Biotechnol.* **38**, 471–481.
- Kleistiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K. (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. **523**, 481–485.
- Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. (2015) In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. **520**, 186–191.

25. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Topkar V.V., Zheng Z., Joung J.K. (2015) Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1293–1298.
26. Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. **556**, 57–63.
27. Liu Z., Shan H., Chen S., Chen M., Song Y., Lai L., Li Z. (2019) Efficient base editing with expanded targeting scope using an engineered Spy-mac Cas9 variant. *Cell Discov.* **5**, 58.
28. Huang T.P., Zhao K.T., Miller S.M., Gaudelli N.M., Oakes B.L., Fellmann C., Savage D.F., Liu D.R. (2019) Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat. Biotechnol.* **37**, 626–631.
29. Li X., Wang Y., Liu Y., Yang B., Wang X., Wei J., Lu Z., Zhang Y., Wu J., Huang X., Yang L., Chen J. (2018) Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **36**, 324–327.
30. Xu X., Chemparathy A., Zeng L., Kempton H.R., Shang S., Nakamura M., Qi L.S. (2021) Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing. *Mol. Cell*. **81**, 4333–4345.e4.
31. Kleinstiver B.P., Sousa A.A., Walton R.T., Tak Y.E., Hsu J.Y., Clement K., Welch M.M., Horng J.E., Malagon-Lopez J., Scarfò I., Maus M.V., Pinello L., Aryee M.J., Joung J.K. (2019) Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nat. Biotechnol.* **37**, 276–282.
32. Walton R.T., Christie K.A., Whittaker M.N., Kleinstiver B.P. (2020) Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*. **368**, 290–296.
33. Rees H.A., Wilson C., Doman J.L., Liu D.R. (2019) Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Sci. Adv.* **5**, eaax5717.
34. Gaudelli N.M., Lam D.K., Rees H.A., Solá-Esteves N.M., Barrera L.A., Born D.A., Edwards A., Gehrke J.M., Lee S.J., Liquori A.J., Murray R., Packer M.S., Rinaldi C., Slaymaker I.M., Yen J., Young L.E., Ciaramella G. (2020) Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat. Biotechnol.* **38**, 892–900.
35. Kim D., Lim K., Kim S.T., Yoon S.H., Kim K., Ryu S.M., Kim J.S. (2017) Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. *Nat. Biotechnol.* **35**, 475–480.
36. Liang P., Xie X., Zhi S., Sun H., Zhang X., Chen Y., Chen Y., Xiong Y., Ma W., Liu D., Huang J., Songyang, Z. (2019) Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq. *Nat. Commun.* **10**, 67.
37. Yu Y., Leete T.C., Born D.A., Young L., Barrera L.A., Lee S.J., Rees H.A., Ciaramella G., Gaudelli N.M. (2020) Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity. *Nat. Commun.* **11**, 2052.
38. Doman J.L., Raguram A., Newby G.A., Liu D.R. (2020) Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat. Biotechnol.* **38**, 620–628.
39. Chu S.H., Packer M., Rees H., Lam D., Yu Y., Marshall J., Cheng L.I., Lam D., Olins J., Ran F.A., Liquori A., Gantzer B., Decker J., Born D., Barrera L., Hartigan A., Gaudelli N., Ciaramella G., Slaymaker I.M. (2021) Rationally designed base editors for precise editing of the sickle cell disease mutation. *CRISPR J.* **4**, 169–177.
40. Liu Y., Zhou C., Huang S., Dang L., Wei Y., He J., Zhou Y., Mao S., Tao W., Zhang Y., Yang H., Huang X., Chi T. (2020) A Cas-embedding strategy for minimizing off-target effects of DNA base editors. *Nat. Commun.* **11**, 6073.
41. Liu Z., Chen S., Shan H., Jia Y., Chen M., Song Y., Lai L., Li Z. (2020) Efficient base editing with high precision in rabbits using YFE-BE4max. *Cell Death Dis.* **11**, 36.
42. Zhang X., Chen L., Zhu B., Wang L., Chen C., Hong M., Huang Y., Li H., Han H., Cai B., Yu W., Yin S., Yang L., Yang Z., Liu M., Zhang Y., Mao Z., Wu Y., Liu M., Li D. (2020) Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain. *Nat. Cell Biol.* **22**, 740–750.
43. Jiang W., Feng S., Huang S., Yu W., Li G., Yang G., Liu Y., Zhang Y., Zhang L., Hou Y., Chen J., Chen J., Huang X. (2018) BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Res.* **28**, 855–861.
44. Liu Z., Chen S., Shan H., Jia Y., Chen M., Song Y., Lai L., Li Z. (2020) Precise base editing with CC context-specificity using engineered human APOBEC3G-nCas9 fusions. *BMC Biol.* **18**, 111.
45. Tan J., Zhang F., Karcher D., Bock R. (2020) Expanding the genome-targeting scope and the site selectivity of high-precision base editors. *Nat. Commun.* **11**, 629.
46. Li A., Mitsunobu H., Yoshioka S., Suzuki T., Kondo A., Nishida K. (2022) Cytosine base editing systems with minimized off-target effect and molecular size. *Nat. Commun.* **13**, 4531.
47. Liu Z., Shan H., Chen S., Chen M., Zhang Q., Lai L., Li Z. (2019) Improved base editor for efficient editing in GC contexts in rabbits with an optimized AID-Cas9 fusion. *FASEB J.* **33**, 9210–9219.
48. Tan J., Zhang F., Karcher D., Bock R. (2019) Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nat. Commun.* **10**, 439.
49. Cheng T.L., Li S., Yuan B., Wang X., Zhou W., Qiu Z. (2019) Expanding C-T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. *Nat. Commun.* **10**, 3612.
50. Halperin S.O., Tou C.J., Wong E.B., Modavi C., Schaffer D.V., Dueber J.E. (2018) CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window. *Nature*. **560**, 248–252.
51. Tou C.J., Schaffer D.V., Dueber J.E. (2020) Targeted diversification in the *S. cerevisiae* genome with CRISPR-guided DNA polymerase I. *ACS Synth. Biol.* **9**, 1911–1916.
52. Hess G.T., Frésard L., Han K., Lee C.H., Li A., Cimprich K.A., Montgomery S.B., Bassik M.C. (2016) Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat. Methods*. **13**, 1036–1042.
53. Devilder M.C., Moyon M., Gautreau-Rolland L., Navet B., Perroteau J., Delbos F., Gesnel M.C., Breathnach R., Saulquin X. (2019) *Ex vivo* evolution of human antibodies by CRISPR-X: from a naive B cell repertoire to affinity matured antibodies. *BMC Biotechnol.* **19**, 14.
54. McCann J.L., Salamango D.J., Law E.K., Brown W.L., Harris R.S. (2020) MagnEdit-interacting factors that recruit

- DNA-editing enzymes to single base targets. *Life Sci. Alliance*. **3**, e201900606.
55. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. (2017) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. **551**, 464–471.
 56. Ryu S.M., Koo T., Kim K., Lim K., Baek G., Kim S.T., Kim H.S., Kim D.E., Lee H., Chung E., Kim J.S. (2018) Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Biotechnol.* **36**, 536–539.
 57. Zhou C., Sun Y., Yan R., Liu Y., Zuo E., Gu C., Han L., Wei Y., Hu X., Zeng R., Li Y., Zhou H., Guo F., Yang H. (2019) Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature*. **571**, 275–278.
 58. Chatterjee P., Jakimo N., Jacobson J.M. (2018) Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. *Sci. Adv.* **4**, eaau0766.
 59. Yang L., Zhang X., Wang L., Yin S., Zhu B., Xie L., Duan Q., Hu H., Zheng R., Wei Y., Peng L., Han H., Zhang J., Qiu W., Geng H., Siwko S., Zhang X., Liu M., Li D. (2018) Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of Tada deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell*. **9**, 814–819.
 60. Richter M.F., Zhao K.T., Eton E., Lapinaite A., Newby G.A., Thuronyi B.W., Wilson C., Koblan L.W., Zeng J., Bauer D.E., Doudna J.A., Liu D.R. (2020) Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat. Biotechnol.* **38**, 883–891.
 61. Grünewald J., Zhou R., Iyer S., Lareau C.A., Garcia S.P., Aryee M.J., Joung J.K. (2019) CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1041–1048.
 62. Grünewald J., Zhou R., Garcia S.P., Iyer S., Lareau C.A., Aryee M.J., Joung J.K. (2019) Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*. **569**, 433–437.
 63. Xu L., Zhang C., Li H., Wang P., Gao Y., Mokadam N.A., Ma J., Arnold W.D., Han R. (2021) Efficient precise *in vivo* base editing in adult dystrophic mice. *Nat. Commun.* **12**, 3719.
 64. Zhao D., Li J., Li S., Xin X., Hu M., Price M.A., Rossier S.J., Bi C., Zhang X. (2021) Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat. Biotechnol.* **39**, 35–40.
 65. Kurt I.C., Zhou R., Iyer S., Garcia S.P., Miller B.R., Langner L.M., Grünewald J., Joung J.K. (2021) CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat. Biotechnol.* **39**, 41–46.
 66. Chen L., Park J.E., Paa P., Rajakumar P.D., Prekop H.T., Chew Y.T., Manivannan S.N., Chew W.L. (2021) Programmable C: G to G: C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins. *Nat. Commun.* **12**, 1384.
 67. Koblan L.W., Arbab M., Shen M.W., Hussmann J.A., Anzalone A.V., Doman J.L., Newby G.A., Yang D., Mok B., Rempel J.M., Xu A., Sisley T.A., Weissman J.S., Adamson B., Liu D.R. (2021) Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning. *Nat. Biotechnol.* **39**, 1414–1425.
 68. Zeman M.K., Cimprich K.A. (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 2–9.
 69. de Moraes M.H., Hsu F., Huang D., Bosch D.E., Zeng J., Radey M.C., Simon N., Ledvina H.E., Frick J.P., Wiggins P.A., Peterson S.B., Mougous J.D. (2021) An interbacterial DNA deaminase toxin directly mutagenizes surviving target populations. *eLife*. **10**, e62967.
 70. Mok B.Y., de Moraes M.H., Zeng J., Bosch D.E., Kotrys A.V., Raguram A., Hsu F., Radey M.C., Peterson S.B., Mootha V.K., Mougous J.D., Liu D.R. (2020) A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*. **583**, 631–637.
 71. Guo J., Chen X., Liu Z., Sun H., Zhou Y., Dai Y., Ma Y., He L., Qian X., Wang J., Zhang J., Zhu Y., Zhang J., Shen B., Zhou F. (2021) DdCBE mediates efficient and inheritable modifications in mouse mitochondrial genome. *Mol. Ther. Nucl. Acids*. **27**, 73–80.
 72. Schon E.A., DiMauro S., Hirano M. (2012) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 878–890.
 73. Gammage P.A., Moraes C.T., Minczuk M. (2018) Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized. *Trends Genet.* **34**, 101–110.
 74. Cho S.I., Lee S., Mok Y.G., Lim K., Lee J., Lee J.M., Chung E., Kim J.S. (2022) Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*. **185**, 1764–1776.e12.
 75. Fu J., Li Q., Liu X., Tu T., Lv X., Yin X., Lv J., Song Z., Qu J., Zhang J., Li J., Gu F. (2021) Human cell based directed evolution of adenine base editors with improved efficiency. *Nat. Commun.* **12**, 5897.
 76. Jeong Y.K., Lee S., Hwang G.H., Hong S.A., Park S.E., Kim J.S., Woo J.S., Bae S. (2021) Adenine base editor engineering reduces editing of bystander cytosines. *Nat. Biotechnol.* **39**, 1426–1433.
 77. Wang L., Xue W., Zhang H., Gao R., Qiu H., Wei J., Zhou L., Lei Y.N., Wu X., Li X., Liu C., Wu J., Chen Q., Ma H., Huang X., Cai C., Zhang Y., Yang B., Yin H., Yang L., Chen J. (2021) Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations. *Nat. Cell Biol.* **23**, 552–563.
 78. Zhang X., Zhu B., Chen L., Xie L., Yu W., Wang Y., Li L., Yin S., Yang L., Hu H., Han H., Li Y., Wang L., Chen G., Ma X., Geng H., Huang W., Pang X., Yang Z., Wu Y., Siwko S., Kurita R., Nakamura Y., Yang L., Liu M., Li D. (2020) Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells. *Nat. Biotechnol.* **38**, 856–860.
 79. Li C., Zhang R., Meng X., Chen S., Zong Y., Lu C., Qiu J.L., Chen Y.H., Li J., Gao C. (2020) Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. *Nat. Biotechnol.* **38**, 875–882.
 80. Grünewald J., Zhou R., Lareau C.A., Garcia S.P., Iyer S., Miller B.R., Langner L.M., Hsu J.Y., Aryee M.J., Joung J.K. (2020) A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. *Nat. Biotechnol.* **38**, 861–864.
 81. Sakata R.C., Ishiguro S., Mori H., Tanaka M., Tatsuno K., Ueda H., Yamamoto S., Seki M., Masuyama N., Nishida K., Nishimasu H., Arakawa K., Kondo A., Nureki O., Tomita M., Aburatani H., Yachie N. (2020) Base editors for

- simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations. *Nat. Biotechnol.* **38**, 865–869.
82. Xie J., Huang X., Wang X., Gou S., Liang Y., Chen F., Li N., Ouyang Z., Zhang Q., Ge W., Jin Q., Shi H., Zhuang Z., Zhao X., Lian M., Wang J., Ye Y., Quan L., Wu H., Wang K., Lai L. (2020) ACBE, a new base editor for simultaneous C-to-T and A-to-G substitutions in mammalian systems. *BMC Biol.* **18**, 131.
83. Liang Y., Xie J., Zhang Q., Wang X., Gou S., Lin L., Chen T., Ge W., Zhuang Z., Lian M., Chen F., Li N., Ouyang Z., Lai C., Liu X., Li L., Ye Y., Wu H., Wang K., Lai L. (2022) AGBE: a dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE for creating a saturated mutant population with multiple editing patterns. *Nucl. Acids Res.* **50**, 5384–5399.
84. Kescu C., Parlak M., Tufan T., Yang J., Szlachta K., Wei X., Mammadov R., Adli M. (2017) CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nat. Methods.* **14**, 710–712.
85. Billon P., Bryant E.E., Joseph S.A., Nambiar T.S., Hayward S.B., Rothstein, R., Ciccio A. (2017) CRISPR-mediated base editing enables efficient disruption of eukaryotic genes through induction of STOP codons. *Mol. Cell.* **67**, 1068–1079.e4.
86. Wang X., Liu Z., Li G., Dang L., Huang S., He L., Ma Y., Li C., Liu M., Yang G., Huang X., Zhou F., Ma X. (2020) Efficient gene silencing by adenine base editor-mediated start codon mutation. *Mol. Ther.* **28**, 431–440.
87. Lee C., Hyun Jo D., Hwang G.H., Yu J., Kim J.H., Park S.E., Kim J.S., Kim J.H., Bae S. (2019) CRISPR-Pass: gene rescue of nonsense mutations using adenine base editors. *Mol. Ther.* **27**, 1364–1371.
88. Gapinske M., Luu A., Winter J., Woods W.S., Kostan K.A., Shiva N., Song J.S., Perez-Pinera P. (2018) CRISPR-SKIP: programmable gene splicing with single base editors. *Genome Biol.* **19**, 107.
89. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* **576**, 149–157.
90. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M., Brown G., Chao C., Chitipiralla S., Gu B., Hart J., Hoffman D., Hoover J., Jang W., Katz K., Ovetsky M., Riley G., Sethi A., Tully R., Villamarin-Salomon R., Rubinstein W., Maglott D.R. (2016) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucl. Acids Res.* **44**, D862–D868.
91. Anzalone A.V., Koblan L.W., Liu D.R. (2020) Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.* **38**, 824–844.
92. Marzec M., Braszewska-Zalewska A., Hensel G. (2020) Prime editing: a new way for genome editing. *Trends Cell Biol.* **30**, 257–259.
93. Jiang Y.Y., Chai Y.P., Lu M.H., Han X.L., Lin Q., Zhang Y., Zhang Q., Zhou Y., Wang X.C., Gao C., Chen Q.J. (2020) Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two *ALS* genes in maize. *Genome Biol.* **21**, 257.
94. Jang H., Jo D.H., Cho C.S., Shin J.H., Seo J.H., Yu G., Gopalappa R., Kim D., Cho S.R., Kim J.H., Kim H.H. (2022) Application of prime editing to the correction of mutations and phenotypes in adult mice with liver and eye diseases. *Nat. Biomed. Eng.* **6**, 181–194.
95. Schene I.F., Joore I.P., Oka R., Mokry M., van Vugt A.H.M., van Boxtel R., van der Doef H.P.J., van der Laan L.J.W., Verstegen M.M.A., van Hasselt P.M., Nieuwenhuis E.E.S., Fuchs S.A. (2020) Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. *Nat. Commun.* **11**, 5352.
96. Petri K., Zhang W., Ma J., Schmidts A., Lee H., Horng J.E., Kim D.Y., Kurt I.C., Clement K., Hsu J.Y., Pinello L., Maus M.V., Joung J.K., Yeh J.J. (2022) CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells. *Nat. Biotechnol.* **40**, 189–193.
97. Bosch J.A., Birchak G., Perrimon N. (2021) Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**, e2021996118.
98. Qian Y., Zhao D., Sui T., Chen M., Liu Z., Liu H., Zhang T., Chen S., Lai L., Li Z. (2021) Efficient and precise generation of Tay-Sachs disease model in rabbit by prime editing system. *Cell Discov.* **7**, 50.
99. Lin Q., Zong Y., Xue C., Wang S., Jin S., Zhu Z., Wang Y., Anzalone A.V., Raguram A., Doman J.L., Liu D.R., Gao C. (2020) Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotechnol.* **38**, 582–585.
100. Lu Y., Tian Y., Shen R., Yao Q., Zhong D., Zhang X., Zhu J.K. (2021) Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnol.* **19**, 415–417.
101. Ferreira da Silva J., Oliveira G.P., Arasa-Verge E.A., Kagiou C., Moretton A., Timelthaler G., Jiricny J., Loizou J.I. (2022) Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair. *Nat. Commun.* **13**, 760.
102. Chen P.J., Hussmann J.A., Yan J., Knipping F., Ravisanekar P., Chen P.F., Chen C., Nelson J.W., Newby G.A., Sahin M., Osborn M.J., Weissman J.S., Adamson B., Liu D.R. (2021) Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell.* **184**, 5635–5652.e29.
103. Aida T., Wilde J.J., Yang L., Hou Y., Li M., Xu D., Lin J., Qi P., Lu Z., Feng G. (2020) Prime editing primarily induces undesired outcomes in mice. *bioRxiv.* 08.06.239723.
104. Averina O.A., Permyakov O.A., Grigorieva O.O., Starshin A.S., Mazur A.M., Prokhortchouk E.B., Dontsova O.A., Sergiev P.V. (2021) Comparative analysis of genome editors efficiency on a model of mice zygotes microinjection. *J. Mol. Sci.* **22**, 10221.
105. Park S.J., Jeong T.Y., Shin S.K., Yoon D.E., Lim S.Y., Kim S.P., Choi J., Lee H., Hong J.I., Ahn J., Seong J.K., Kim K. (2021) Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor. *Genome Biol.* **22**, 170.
106. Nelson J.W., Randolph P.B., Shen S.P., Everette K.A., Chen P.J., Anzalone A.V., An M., Newby G.A., Chen J.C., Hsu A., Liu D.R. (2022) Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* **40**, 402–410.
107. Velimirovic M., Zanetti L.C., Shen M.W., Fife J.D., Lin L., Cha M., Akinci E., Barnum D., Yu T., Sherwood R.I. (2022) Peptide fusion improves prime editing efficiency. *Nat. Commun.* **13**, 3512.
108. Song M., Lim J.M., Min S., Oh J.S., Kim D.Y., Woo J.S., Nishimasu H., Cho S.R., Yoon S., Kim H.H. (2021) Generation of a more efficient prime editor 2 by addition of the Rad51 DNA-binding domain. *Nat. Commun.* **12**, 5617.
109. Kweon J., Yoon J.K., Jang A.H., Shin H.R., See J.E., Jang G., Kim J.I., Kim Y. (2021) Engineered prime editors with PAM flexibility. *Mol. Ther.* **29**, 2001–2007.

110. Li X., Zhou L., Gao B.Q., Li G., Wang X., Wang Y., Wei J., Han W., Wang Z., Li J., Gao R., Zhu J., Xu W., Wu J., Yang B., Sun X., Yang L., Chen J. (2022) Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure. *Nat. Commun.* **13**, 1669.
111. Liu Y., Yang G., Huang S., Li X., Wang X., Li G., Chi T., Chen Y., Huang X., Wang X. (2021) Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA. *Cell Res.* **31**, 1134–1136.
112. Zhang G., Liu Y., Huang S., Qu S., Cheng D., Yao Y., Ji Q., Wang X., Huang X., Liu J. (2022) Enhancement of prime editing via xrRNA motif-joined pegRNA. *Nat. Commun.* **13**, 1856.
113. Li X., Wang X., Sun W., Huang S., Zhong M., Yao Y., Ji Q., Huang X. (2022) Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes. *J. Mol. Cell. Biol.* **14**, mjac022.
114. Anzalone A.V., Gao X.D., Podracky C.J., Nelson A.T., Koblan L.W., Raguram A., Levy J.M., Mercer J.A.M., Liu D.R. (2022) Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**, 731–740.
115. Yuan Q., Gao X. (2022) Multiplex base- and prime-editing with drive-and-process CRISPR arrays. *Nat. Commun.* **13**, 2771.
116. Fiumara M., Ferrari S., Omer-Javed A., Beretta S., Albano L., Canarutto D., Varesi A., Gaddoni C., Brombin C., Cugnata F., Zonari E., Naldini M.M., Barcella M., Gentner B., Merelli I., Naldini L. (2023) Genotoxic effects of base and prime editing in human hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* Sep 7. doi: 10.1038/s41587-023-01915-4. Epub ahead of print. Erratum in: *Nat. Biotechnol.* 2024 Jan 25; PMID: 37679541.
117. Testa L.C., Musunuru K. (2023) Base editing and prime editing: potential therapeutic options for rare and common diseases. *BioDrugs: Clin. Immunotherapy, Biopharm. Gene Therapy.* **37**, 453–462.

Current Knowledge of Base Editing and Prime Editing

O.A. Averina^{1, 2, 3}, S.A. Kuznetsova^{1, *}, O.A. Permyakov^{1, 3}, P.V. Sergiev^{1, 2, 3}

¹*Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

³*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: svetlana@belozersky.msu.ru

Modern genetic engineering technologies, such as base editing (BE) and prime editing (PE), have proven to be effective and reliable genome editing tools that do not require the introduction of double-strand breaks in DNA and the presence of donor templates. Relatively new, they quickly gained recognition for their accuracy, simplicity and multiplexing capabilities. This review summarizes new literature on these technologies: architecture and methods for creating editors, specificity, efficiency and versatility. The advantages, disadvantages and prospects for using these editors in basic and applied research are discussed. The information presented in the review may be useful for planning genome editing studies and for analyzing their results when solving various problems in fundamental biology, biotechnology, medicine and agriculture.

Keywords: CRISPR/Cas technology, base editing, nucleoside deaminases, prime editing, reverse transcriptase, repair systems