

УДК 577.21

КАК СМЕСТИТЬ РАВНОВЕСИЕ РЕПАРАЦИИ РАЗРЫВОВ ДНК В ПОЛЬЗУ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

© 2024 г. О. А. Аверина^{a, b, c}, С. А. Кузнецова^{a, *}, О. А. Пермяков^{a, c}, П. В. Сергиев^{a, b, c}^aИнститут функциональной геномики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия^bНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия^cХимический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 15.11.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 28.01.2024 г.

Появление технологии CRISPR/Cas направленного редактирования генома позволило с высокой эффективностью проводить генно-инженерные манипуляции с эукариотическими геномами. Один из ключевых этапов этой технологии – целенаправленная индукция сайт-специфических расщеплений (разрывов) ДНК. Репарация этих разрывов проходит по одному из двух путей: негомологичного соединения концов или гомологичной рекомбинации. Выбор пути репарации обусловлен архитектурой участков в месте разрыва ДНК, образующихся в результате резекции концов, и зависит от фазы клеточного цикла. Негомологичное соединение концов – основной путь репарации двухцепочечных разрывов ДНК в клетках млекопитающих – включает неспецифическую реакцию лигирования, точность которой зависит от структуры концов разрыва, а результатом могут быть различные вставки или делеции в целевом участке генома. Встраивание в геном нужной последовательности проходит по пути гомологичной рекомбинации, для реализации которого необходима матрица с участками гомологии по обеим сторонам от двухцепочечного разрыва. Введение генетической конструкции в заданное место генома является важной, но на данный момент сложной и трудозатратной задачей. Вместе с тем, выбор пути репарации может иметь принципиальное значение для фундаментальных исследований функции генов и создания трансгенных животных, моделирующих заболевания человека, с целью разработки методов их терапии. В настоящем обзоре предпринята попытка объединить и структурировать информацию о подходах к увеличению эффективности репарации ДНК с участием гомологичной рекомбинации. Перечислены наиболее эффективные стратегии, позволяющие сдвинуть равновесие в сторону гомологичной рекомбинации, такие как использование ингибиторов негомологичного соединения концов, регуляция ключевых факторов гомологичной рекомбинации, контроль клеточного цикла, статуса хроматина, конструирование матриц для гомологичной рекомбинации.

Ключевые слова: редактирование генома, технология CRISPR/Cas, нуклеазы, системы репарации, гомологичная рекомбинация

DOI: 10.31857/S0026898424040029, EDN: INFKTE

ВВЕДЕНИЕ

Новые стратегии и подходы к направленному редактированию генома, разработанные за последние десятилетия, активно используются

для решения различных задач фундаментальной биологии, биотехнологии, медицины и сельского хозяйства. Появление геномного редактирования позволило изучать функциональную роль генов млекопитающих, создавать животные модели

Сокращения: CRISPR – короткие палиндромные повторы, разделенные уникальными последовательностями-спейсерами (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats); CRISPR/Cas-ассоциированная нуклеаза; PAM – смежный протоспейсерный мотив (Protospacer Adjacent Motif); PFS – последовательность нуклеотидов, фланкирующая протоспейсер (Protospacer Flanking Sequence); NHEJ – негомологичное соединение концов (Nonhomologous DNA End Joining); MMEJ – соединение концов ДНК на основе микрогомологии (Microhomology-Mediated End Joining); HDR – гомологичная

рекомбинация (Homology Directed Recombination); rPHK – гидовая РНК (sgRNA – single-guide RNA), tracrPHK – транс-активирующая РНК (trans-activating RNA); crPHK – направляющая РНК (crisprRNA); ОЦР – одноцепочечные разрывы; ДЦР – двухцепочечные разрывы; RuvC – каталитический домен нуклеазы Cas9, вносящий одноцепочечный разрыв в целевой участок ДНК (протоспейсер); HNH – каталитический домен нуклеазы Cas9, вносящий одноцепочечный разрыв в целевой участок ДНК и связывающийся со спейсером crPHK; аминокислотные остатки – а.к. (при цифре).

генетических заболеваний человека и разрабатывать подходы к их диагностике и лечению, усовершенствовать значимые для сельского хозяйства виды растений. Конструирование генетических редакторов, позволяющих избирательно активировать, модифицировать или выключать целевые гены-мишени, в том числе ассоциированные с патологическими процессами и генетическими заболеваниями, является одним из приоритетных направлений развития генетических технологий. Знание принципов создания генетических редакторов, обладающих высокой эффективностью, точностью редактирования, безопасностью и доступностью для широкого круга исследователей, позволит ученым успешно решать задачи высокоточного редактирования генома растений, животных и человека. В настоящем обзоре суммированы сведения об усовершенствовании и разработке новых высокоточных геномных редакторов CRISPR/Cas с повышенной эффективностью гомологичной рекомбинации (HDR), что позволит вводить целевые генетические конструкции в заданные участки генома.

ЭНДОНУКЛЕАЗНАЯ СИСТЕМА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS

Изначально CRISPR/Cas — это система адаптивного иммунитета архей и бактерий, нацеленная на чужеродные генетические элементы вторгшихся фагов. Система CRISPR/Cas включает геномные локусы CRISPR, состоящие из коротких палиндромных повторов, разделенных уникальными последовательностями-спейсерами, встроенными в геном в ходе адаптивного иммунного ответа, и белков Cas, кодируемых фланкирующими локусы генами. Белки Cas обеспечивают реализацию молекулярного механизма адаптивного иммунитета, который можно разделить на три стадии: адаптации — встраивания в CRISPR-кассету новых спейсеров; процессинга, во время которого происходит транскрипция CRISPR-массива в пре-crPНК (предшественник crPНК) и ее специфичный гидролиз с образованием зрелых crPНК; интерференции — распознавания целевой нуклеиновой кислоты и ее разрушения. На стадии интерференции белки Cas эффекторного комплекса, сформированного с участием CRISPR-ПНК (crPНК), расщепляют ДНК или РНК атакующих фагов, содержащих участок, комплементарный последовательности спейсера, и тем самым дезактивируют их. Специфичность в отношении целевого участка нуклеиновой кислоты фагов достигается за счет малых некодирующих РНК, известных как направляющие, или гидовые РНК (гРНК), которые составляют клеточную память о прошлых инфекциях. гРНК представляет собой молекулу РНК, которая содержит переменную спейсерную последовательность, направляющую Cas в гомологичную целевую область

протоспейсера в геноме инфекционных элементов. гРНК может содержать два сегмента: сегмент нацеливания ДНК (crPНК) и сегмент, связывающий белок (tracrPНК).

Этот механизм лег в основу системы редактирования генома CRISPR/Cas для изучения функций генов, создания мутантных клеточных линий и животных, методов диагностики и терапии различных заболеваний.

CRISPR-системы подразделяют на два класса в зависимости от архитектуры их эффекторных комплексов, в каждом из которых выделяют по три типа (табл. 1) [1]:

- в системах первого класса несколько белковых единиц образуют эффекторный комплекс с crPНК для распознавания и расщепления целевой последовательности;
- системы второго класса состоят из односубъединичных эффекторных нуклеаз с разнообразными функциональными свойствами.

Белки Cas играют важнейшую роль на всех этапах работы этой защитной системы. Они обладают различными функциональными свойствами и ферментативной активностью. Так, белки Cas1 и Cas2, задействованные в большинстве систем CRISPR/Cas на этапе адаптации, формируют комплекс, где белки Cas1 функционируют как металлизависимые оцДНК/дцДНК-эндонуклеазы, которые вырезают фрагмент из вирусной ДНК и вносят разрывы в локус CRISPR, а также как интегразы, которые встраивают новый спейсер в бактериальный геном. Белки Cas2 обладают рибонуклеазной (PНКазы, специфичная к U-богатым участкам) или дезоксирибонуклеазной (дцДНКазы) активностью в зависимости от системы, к которой принадлежат, и играют структурную роль. Белок Csn системы CRISPR/Cas класса 2 (тип 2) участвует во встраивании новых спейсеров. Белки Cas3—Cas10, Cas12 и Cas13 являются компонентами эффекторного комплекса и участвуют в интерференции. Так, белки Cas3' содержат хеликазный домен и обладают хеликазной активностью, благодаря чему расплетают двойную спираль ДНК-мишени, а также имеют нуклеазный домен (HD-домен), который разрезает оцДНК-мишень. Белки Cas3'' — это металлизависимые дцДНК-эндонуклеазы, а белки Cas4 — нуклеазы с трехцистеиновым C-концевым кластером, обладающие 5'-экзонуклеазной активностью (оцДНКазы). Рибонуклеазы Cas5 и Cas6 участвуют в процессинге пре-crPНК, Cas7 участвует в связывании crPНК, а Cas8 — в узнавании PAM. Нуклеазы Cas9 (дцДНК-эндонуклеазы) и Cas12 (оцДНК/дцДНК-эндонуклеазы) участвуют в разрезании ДНК-мишени, а Cas13 расщепляют оцPНК. Cas10 содержат Palm-домен (PНК-распознающий домен) и обладают ДНКазной активностью.

Таблица 1. Классификация и организация системы CRISPR/Cas

Класс	Тип	Подтип	Белки Cas	Организация оперонов для типа Cas в зависимости от вида бактерий и архей
Класс 1	Тип 1	I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F, I-U	Cas1, Cas2, Cas3', Cas3'', Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8	I-A: <i>Archaeoglobus fulgidus</i> I-B: <i>Clostridium kluyveri</i> I-C: <i>Bacillus halodurans</i> I-D: <i>Cyanothece</i> sp. I-E: <i>Escherichia coli</i> K12 I-F: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> I-U: <i>Geobacter sulfurreducens</i>
	Тип 3	III-A, III-B, III-C, III-D	Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7, Cas9, Cas10	III-A: <i>Staphylococcus epidermidis</i> III-B: <i>Pyrococcus furiosus</i> III-C: <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> III-D: <i>Synechocystis</i> sp.
	Тип 4		Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7	IV: <i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix
Класс 2	Тип 2	II-A, II-B, II-C	Cas1, Cas2, Cas4, Cas9, Csn	II-A: <i>Streptococcus pyogenes</i> II-B: <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris II-C: <i>Neisseria lactamica</i> 020-06
	Тип 5	V-A, V-B, V-C, V-D, V-E	Cas1, Cas2, Cas4, Cas12	V-A: <i>Francisella</i> cf. <i>novicida</i> Fx1 V-B: <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> V-C: <i>Oleiphilus</i> sp. V-D: <i>Bacterium</i> CG09_39_24 V-E: <i>Deltaproteobacteria bacterium</i>
	Тип 6	VI-A, VI-C, VI-B1, VI-B2	Cas1, Cas2, Cas13	VI-A: <i>Leptotrichia shahii</i> VI-C: <i>Fusobacterium prefoetens</i> VI-B1: <i>Prevotella buccae</i> VI-B2: <i>Bergeyella zoohelcum</i>

Для создания мутантных животных наиболее широко используется система CRISPR/Cas9 второго класса подтипа II-A *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), поскольку она относительно просто устроена и хорошо изучена [2]. Для адресации Cas9 на целевой участок генома в некоторых исследованиях используют гРНК с отдельными компонентами сгРНК и тасгРНК. Этот вариант хорош, когда необходимо одновременно использовать множество различных сгРНК, сочетаемых с одной тасгРНК. Для единичного разрезания более удобно использовать единую гидовую РНК (егРНК), где специально разработанная короткая последовательность сгРНК связана линкерной петлей (тетрапетля) с каркасной последовательностью тасгРНК (рис. 1) [3]. В итоге егРНК стала наиболее популярным форматом направляющих РНК, поэтому термины егРНК и гРНК часто применяют в сообществе CRISPR в одном и том же значении.

Для более эффективного использования и повышения стабильности по отношению к нуклеазной деградации сгРНК и тасгРНК модифицируют, включая в их структуру неприродные фрагменты. Так, в обзоре Филипповой и соавт. подробно описаны стратегии создания искусственных гРНК, содержащих модифицированный углеводородный остов, нативные структурные мотивы и метки

для визуализации. Описаны различные подходы к улучшению функции синтетической гРНК [4]. Отмечается, что химические модификации компонентов гРНК могут повышать ее устойчивость к гидролизу, изменять термодинамическую стабильность комплексов РНК-белок и РНК-ДНК, снижать иммуногенный и цитотоксический эффекты. В целом, можно проводить широкомаштабные химические модификации, изменяя около 70% нуклеотидов, при этом избегая модификации 2'-ОН и фосфатных групп в егРНК, которые взаимодействуют с белком Cas9. Продемонстрировано, что химически модифицированные направляющие РНК сохраняют в среднем высокую специфичность [5, 6]. При этом неудачный дизайн сгРНК может привести к более низкой специфичности и более высокому проценту нецелевых мутаций. Так, например, удаление с 5'-конца сгРНК 2–3 нуклеотидов значительно снижает количество нецелевых мутаций при сохранении эффективности, но если егРНК укоротить до 16 нуклеотидов или менее, то ее активность резко падает, как и при удалении с 3'-конца или добавлении на 5'-конец динуклеотида GG [7]. Для конструирования оптимальной структуры сгРНК используют различные вычислительные инструменты, такие как CRISPR-P 2.0, E-CRISP и CasFinder [8]. Таким образом, оптимальный дизайн направляющей РНК

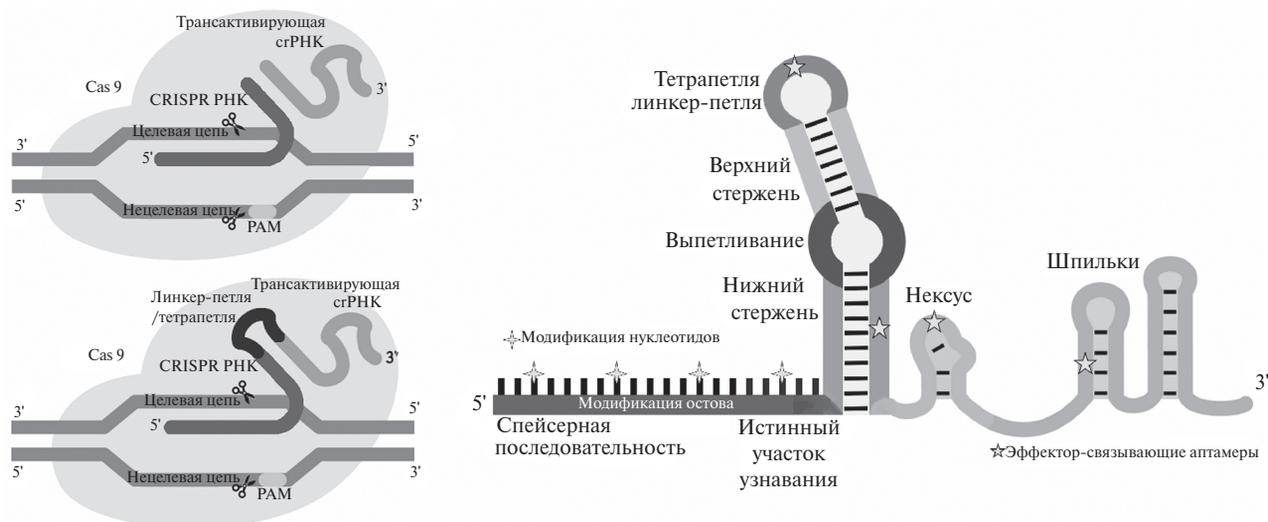


Рис. 1. Варианты гидовой РНК.

является ключом к CRISPR/Cas-опосредованному точному редактированию генома.

Впервые систему CRISPR/Cas9 применили в 2013 году для локального редактирования генома в клетках млекопитающих. В настоящее время с использованием CRISPR/Cas9 создают животные модели с точечными мутациями в геноме, вставками или делециями нескольких нуклеотидов без добавления иных генетических элементов вблизи места редактирования, например, маркеров для селекции клеток по чувствительности к препарату в культуральной среде и рекомбинантных элементов, таких как loxP- или FRT-сайты [9]. Внедрение системы CRISPR/Cas9 позволило получать мутантных мышей на генетическом фоне, недоступном для редактирования генома с использованием более ранних подходов, например, иммунодефицитной линии NOD/Scid-ILgamma (NSG) [10]. Также CRISPR/Cas9 была адаптирована для биаллельного редактирования в разных локусах и создания мышей с мутациями в двух генах [11–14]. Прямое сравнение системы редактирования генома CRISPR/Cas с предыдущими платформами, такими как ZFN (введение двухцепочечных разрывов (ДЦР) в ДНК с помощью нуклеаз с мотивом цинковых пальцев), TALEN (введение разрывов с использованием нуклеаз TALE (transcription activator-like effector nucleases)) (рис. 2) и методами направленной модификации генома с помощью эмбриональных стволовых клеток (ES), ясно показывает, что CRISPR/Cas обладает рядом преимуществ, таких как более высокая эффективность, простота использования, относительно низкая стоимость, компактность и ряд других [9].

Высокая эффективность SpCas9 позволила идентифицировать потенциально важные гены с помощью полногеномного функционального скрининга. Так, используя лентивирусные гРНК

для генерации большого количества клеток с нокаутом, после проведения положительной и отрицательной селекции можно идентифицировать важные гены и мишени для лекарственных средств [15–17].

Метод SpCas9 проявил себя мощным и универсальным инструментом генной инженерии, совершившим революцию в биологических и биомедицинских исследованиях, однако он имеет ряд ограничений. Так, иногда могут образовываться нежелательные ДЦР в нецелевом геномном локусе [18]. Специфичность расщепления ДНК определяется структурой Cas9, комплементарностью гРНК к ДНК и наличием последовательности PAM, прилегающей к целевой последовательности (рис. 3). Однако в процессе гибридизации возможно несовпадение нуклеотидов между гРНК и ДНК [19] или ограничения в доступности и распознавании сайтов PAM, так как SpCas9 может узнавать последовательности PAM, отличные от 5'-NGG-3'. Эффективность расщепления в этом случае становится значительно ниже (как, например, в случае 5'-NAG-3') [20]. Другим фактором может стать количество ошибок при спаривании оснований, когда при возникновении двух и более ошибок активность эндонуклеазы падает [21]. После возникновения незапланированных ДЦР могут появиться случайные мутации, обусловленные запуском подверженного ошибкам пути репарации ДНК – негомлогичного соединения концов (NHEJ) [22]. Эти нежелательные нецелевые ДЦР также могут привести к аномалиям хромосомного масштаба [23]. Так, при работе с Cas9 непреднамеренно возникали крупные делеции (тысячи пар нуклеотидов), нацеленные на различные локусы в разных хромосомах, которые вызывают большую интерстициальную “потерю гетерозиготности” [24–26]. Самое опасное, что такие непредвиденные большие делеции трудно обнаружить

с помощью классических методов скрининга. Описаны случаи обнаружения делеции в 5.2 т.п.н. с помощью количественной ПЦР и флуоресцентной гибридизации *in situ* [25] и от 100 п.н. до 9.5 т.п.н. – с помощью ПЦР длинных фрагментов [27].

К недостаткам SpCas9 относится его большой размер, что ограничивает выбор вирусных векторов для доставки. Так, емкость аденоассоциированных вирусов (ААВ) равна приблизительно 4.7 т.п.н., тогда как SpCas9 вместе с гРНК занимает около 4.2 т.п.н. [28]. Клиническое применение технологии сдерживается ее иммуногенностью, отсутствием безопасной и эффективной системы доставки, нецелевыми разрезами и этическими проблемами [29].

Для решения обозначенных проблем разработаны усовершенствованные системы и технологии.

Во-первых, сконструирована серия высокоточных вариантов SpCas9 (eSpCas9 1.0 & 1.1,

SpCas9-HF1, HypaCas9, Sniper-Cas9, SpG-HF1, SpRY-HF1, HiFi-iSpyMac), а также вариантов, способных распознавать широкий спектр последовательностей PAM (SpCas9-EQR/VQR/VRER/VRQR/NRRH/NRCH/NRTH, xCas9 [30]). Во-вторых, в качестве альтернативы SpCas9 можно использовать нуклеазы Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) и *Campylobacter jejuni* (CjCas9), которые имеют пониженную нецелевую нуклеазную активность, поскольку распознают более длинные последовательности PAM, 5'-NNGRRT-3' и 5'-NNNRYAC-3', соответственно [31, 32], или варианты Cas10 и Cas14, которым вообще не требуется последовательность PAM [33]. Мутантный вариант *Acidaminococcus* sp. *BV3L6* Cas12a (AsCas12a) – E174R/S542R/K548R распознает различные PAM, включая 5'-TTYN-3', 5'-VTTV-3' и 5'-TRTV-3', а другие мутанты AsCas12a – RR и RVR, распознают TYCV и 5'-TATV-3' PAM соответственно [34]. Кроме того, мутации G532R/K595R были

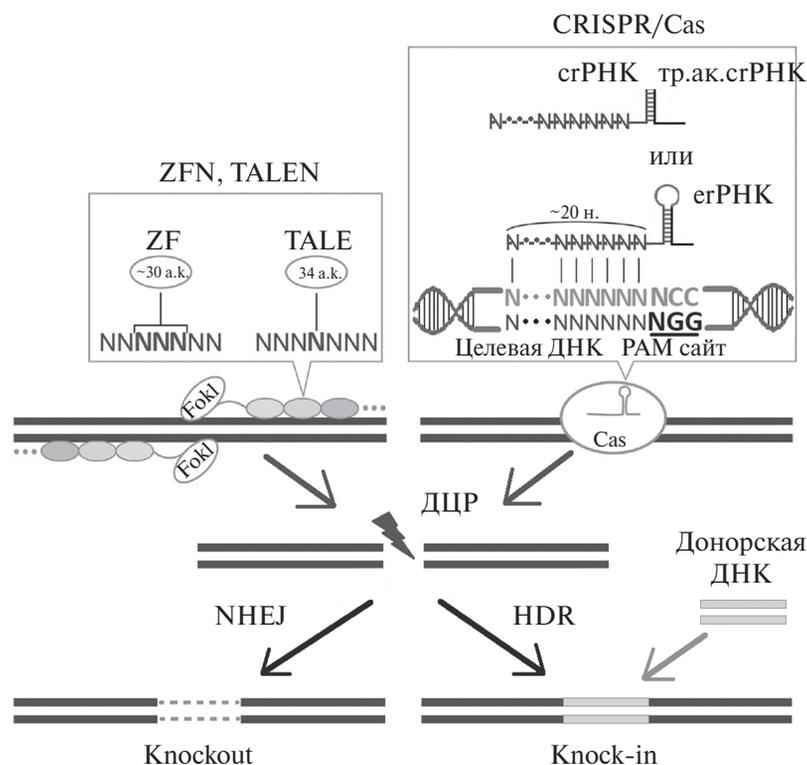


Рис. 2. Технологии редактирования генома ZFN, TALEN, CRISPR/Cas. ZFN – сайт-специфическое расщепление ДНК химерной ZF-нуклеазой, сконструированной на основе ДНК-связывающего домена типа “цинковых пальцев” (30 а.к., взаимодействующих с триплетом нуклеотидов в ДНК) и каталитического домена эндонуклеазы рестрикции FokI. TALEN – расщепление ДНК химерной нуклеазой TALE, сконструированной путем присоединения к ДНК-узнающим белкам TALE каталитического домена эндонуклеазы FokI; один мономер ДНК-связывающего домена TALEN (34 а.к.) узнает один нуклеотид целевой последовательности ДНК. CRISPR/Cas – узнавание целевой последовательности ДНК происходит с помощью гРНК, состоящей из направляющей и транскрибирующей РНК (либо с помощью егРНК, в которой направляющая и транскрибирующая РНК связаны линкером), а расщепление – нуклеазой Cas. PAM – короткий NGG-мотив, необходимый для связывания Cas и внесения разрывов в ДНК. Репарация ДНК проходит по одному из двух путей: негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинации (HDR) с участием донорной ДНК-матрицы. В результате репарации разрывов в ДНК происходит нокаут определенного гена (Knockout) или встраивание в геном целевой генетической конструкции (Knock-in). тр.ак.срPHK – транскрибирующая срPHK.

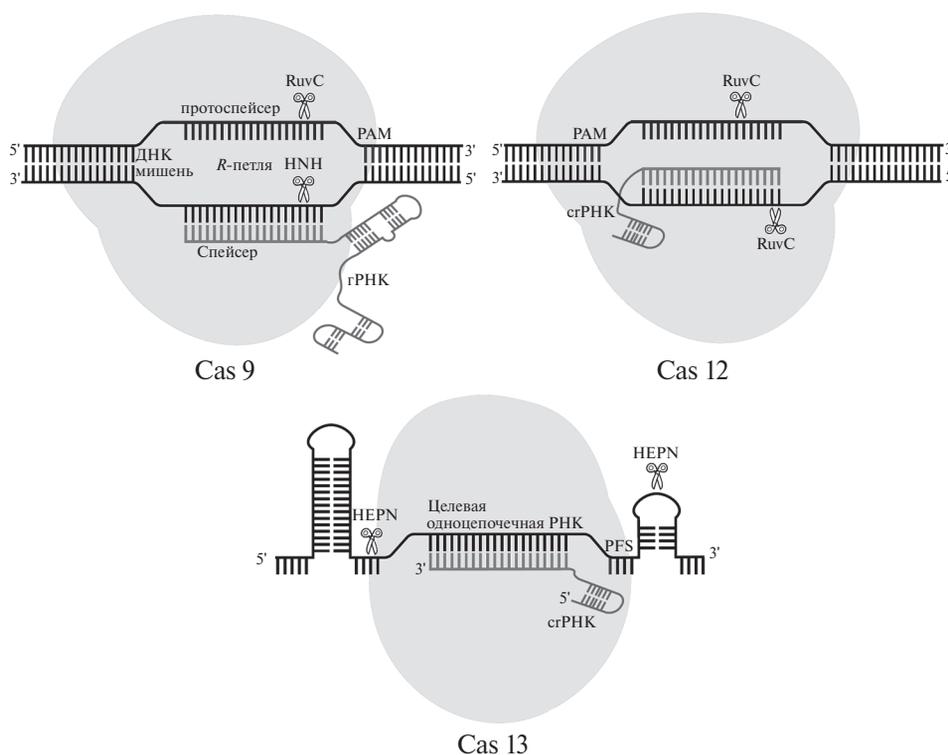


Рис. 3. Организация систем CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas12 и CRISPR/Cas13. Стрелками обозначены места одноцепочечных разрывов ДНК каталитическими доменами RuvC и HNH (Cas9 и Cas12) и места разрыва РНК белком HEPN (Cas13).

введены в *Lachnospiraceae bacterium* ND Cas12a (LbCas12a) для создания варианта LbCas12a-RR, который распознает 5'-TGYCV-3' PAM, расширяя область нацеливания [35]. В-третьих, во избежание появления хромосомных транслокаций, нецелевых и неконтролируемых мутаций, образующихся в результате ДЦР (см. выше), разработаны дополнительные инструменты редактирования генов, в которых не происходит образования ДЦР. Так, инактивация одного из нуклеазных доменов Cas9 (как расщепляющего цепь, на которую направлена гРНК, так и расщепляющего нецелевую цепь ДНК), приводит к образованию нуклеазы Cas9 (nCas9), осуществляющей только одноцепочечный разрыв (ОЦР) ДНК [3, 36]. Инактивация обоих нуклеазных доменов приводит к образованию каталитически полностью неактивной формы Cas9 (dead Cas9, или dCas9) [37]. Белки nCas9 и dCas9 составляют строительные блоки редакторов в усовершенствованных технологиях редактирования CRISPR/Cas: редактирования оснований и праймированного редактирования. В последующих поколениях генетических редакторов белок dCas9 был объединен с белками-регуляторами транскрипции или ферментами, модифицирующими хроматин, чтобы регулировать только уровень транскрипции без необратимого изменения генома. Это привело к созданию систем интерференции (CRISPRi) и активации (CRISPRa). Так, в системах CRISPRi

репрессор KRAB (Krüppel-associated box), объединенный с dCas9, взаимодействует с комплексами, образующими гетерохроматин. Эти комплексы могут индуцировать метилирование и деацетилирование гистонов и, как следствие, ингибирование связывания РНК-полимераз с энхансерными или промоторными областями и инактивацию транскрипции [38]. Напротив, системы CRISPRa активируют транскрипцию с помощью доменов активации VP16 или более эффективных *in vivo* VP64 и VP192 путем взаимодействия с TATA-связывающим белком, транскрипционным фактором TFIIB и гистон-ацетилазой SAGA [39, 40]. Технологии CRISPRi и CRISPRa представляют интерес для проведения генетического скрининга, иммунотерапии опухолей и перепрограммирования плюрипотентных стволовых клеток [41–43].

Получить устойчивую наследуемую модификацию метилирования ДНК, подавляющую транскрипцию генов, можно с помощью временной экспрессии эпигенетического редактора CRISPROff, созданного путем слияния dCas9 с KRAB и ДНК-(цитозин-5)-метилтрансферазой 3A (DNMT3A). Ранее было показано, что комплекс dCas9-DNMT3A может индуцировать сайт-специфическое метилирование CpG, приводящее к сайленсингу транскрипции. CRISPROff может найти применение в скрининге

генома, клеточной инженерии, подавлении энхансеров и генетическом механизме эпигенетической модификации [44].

Уменьшить нецелевые эффекты CRISPR/Cas9 можно также путем снижения чрезмерной и длительной экспрессии этой системы. С этой целью используют механизм, защищающий фаги от CRISPR/Cas-опосредованного иммунитета бактерий, а именно, белки Aсг, нацеленные на нуклеазы Cas. В общей сложности идентифицировано 44 белка Aсг для CRISPR/Cas типа I, II и V, но не для подтипа II-V и типа VI [45]. Известны три механизма Aсг-опосредованного ингибирования: подавление связывания Cas9 с ДНК, воздействие на связывание Cas9 с гРНК и блокирование активности Cas9 [46, 47]. В настоящее время для снижения нецелевых эффектов используют только AсгIIA2 и AсгIIA4. Конкурируя с сайтом PAM и/или другими участками ДНК за Cas9, белки Aсг блокируют расщепляющую активность Cas9, предотвращая чрезмерную и длительную активацию CRISPR/Cas9, и уменьшают таким образом нецелевые эффекты [48].

Решить проблемы, связанные с большим размером нуклеазы SpCas9, можно, используя ее ортологи меньшего размера, которые легче упаковать в вирусные векторы. Однако в этом случае необходимо учитывать архитектуру нуклеаз, разнообразие необходимых последовательностей PAM и относительную эффективность редактирования. Так, белки CjCas9 размером 2.95 т.п.н., SaCas9 (3.16 т.п.н.), CasX/Cas12e (2.94 т.п.н.), Cas14 (2.85 т.п.н.), Cas13d (2.79 т.п.н.) и даже более крупный белок Cas12a размером 3.6–3.9 т.п.н. можно упаковать в аденоассоциированные вирусные векторы [49–52].

Значительные успехи в применении системы CRISPR/Cas9 дали толчок к изучению других систем CRISPR/Cas для достижения потенциально более высокой эффективности редактирования и новых приложений.

К наиболее хорошо изученным, после Cas9, относятся белки Cas12 и Cas13 (рис. 3). Cas12 представляет собой эффекторный белок класса 2 типа V. У этого белка отсутствует каталитический домен HNH, вместо него для индукции расположенных в шахматном порядке “ступенчатых” разрывов с липкими концами за пределами сайта PAM используется домен RuvC-подобной нуклеазы, тогда как Cas9 имеет оба домена и создает разрывы с тупыми концами в области PAM. Показано, что Cas12 успешно распознает дцДНК (Cas12a/Cpf1) и может расщеплять оцДНК (Cas12f/Cas14). Кроме того, Cas12 регулируется единственной относительно компактной сгРНК и не нуждается в tracrРНК. Cas12 удобно использовать для мультиплексного редактирования, поскольку она обладает активностью РНКазы III (катализирующий процессинг пре-сгРНК в зрелые сгРНК), что

позволяет получать множество сгРНК из единого предшественника. В отличие от Cas9, нуклеаза Cas12 может расщеплять целевую последовательность (цис-расщепление), а также активировать свою способность расщеплять нецелевые последовательности (транс- или коллатеральное расщепление) [53]. Благодаря транс-расщепляющей активности, Cas12 можно использовать для обнаружения нуклеиновых кислот [54]. Белок Cas12 был перепрофилирован в нацеленный на ДНК-эндонуклеазу CRISPR трансрепортер (DETECTR), способный обнаруживать присутствие оцДНК. Эта технология применима для детекции ДНК-вирусов в клинических образцах [53]. Известно множество вариантов семейства Cas12: Cas12a (Cpf1), Cas12b, Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12f (Cas14), Cas12j (CasF), Cas12h, Cas12i и Cas12c [33]. Эффективность наиболее известного из них, Cas12a, сравнима с эффективностью SpCas9, однако широкого применения в клетках млекопитающих этот вариант не нашел, в основном из-за строгой потребности в последовательности смежного мотива протоспейсера TTTV (PAM). Напротив, его ортолог Mb3Cas12a (*Moraxella bovoculi* AAX11_00205) может эффективно редактировать геном мыши (последовательность TTV PAM). Более того, использование Mb3Cas12a, меченого мономерным стрептавидином, в сочетании с биотинилированной донорной ДНК-матрицей для HDR приводит в 40% случаев к рождению мышей F0 с нужной отредактированной последовательностью [55]. Недавно при реконструкции эволюции эндонуклеаз Cas9 и Cas12 как в прокариотических, так и в эукариотических клетках обнаружили семейство кодируемых транспозонами РНК-управляемых систем, названных OMEGA. Хотя эти программируемые нуклеазы, включая IscB, IsrB и TnpB, имеют большие перспективы для нацеливания и редактирования генома, их активность и биологическая значимость до сих пор не полностью охарактеризованы [56].

Cas13 представляет собой белок класса II и типа VI. Члены семейства CRISPR/Cas13 работают как двухкомпонентные системы, в которых сгРНК без участия tracrРНК образует комплекс с белком Cas13, состоящим из двух нуклеотидсвязывающих доменов HEPN. Каждый из этих доменов содержит сайт расщепления РНК. Для Cas13, также как для Cas9 и Cas12, требуются фланкирующие последовательности протоспейсеров (PFS), которые действуют аналогично PAM Cas9 и, следовательно, необходимы для расщепления РНК. Недавно обнаружили, что PFS нужны не для всех систем типа VI–Cas13 (например, для Cas13d (930 а.к.)), что обеспечивает большую гибкость для нацеливания и расщепления любой последовательности нуклеиновых кислот. Кроме того, Cas13 – единственная известная прокариотическая система CRISPR/Cas, нацеленная на одиночную РНК,

т.е. нуклеаза Cas13, обладая уникальной двойной РНКазной активностью, способна катализировать HEPN-независимый процессинг пре-сгРНК в зрелую сгРНК и производить HEPN-зависимое расщепление РНК [33, 51]. Cas13 также можно перепрофилировать в редактор оснований РНК. Так, каталитически неактивный ортолог Cas13 из *Prevotella* sp. (dPspCas13b) был объединен с дезаминазой ADAR2 для разработки редактора REPAIR, который может преобразовать А→I в РНК. В процессе транскрипции и сплайсинга инозин читается как гуанин, поэтому инструмент REPAIR может восстанавливать патогенные мутации G→A. Впоследствии получили систему RESCUE, которая не только сохраняет исходную активность дезаминазы А→I, но также осуществляет переход С→U. Эффективность редактирования и специфичность редакторов оснований РНК пока невысоки, поэтому необходимы дальнейшие исследования [57, 58]. Как уже упоминалось, существуют различные варианты Cas13 (Cas13a (1250 а.к.), Cas13b (1150 а.к.), Cas13d (930 а.к.)), одним из самых перспективных из которых считается Cas13d (CasRx). Cas13d имеет ряд преимуществ, особенно при работе с млекопитающими, в том числе:

1. небольшой размер, подходящий для упаковки в вирусные векторы;
2. низкая нейротоксичность;
3. двойная нуклеазная активность;
4. для расщепления РНК не требуется фланкирующая последовательность протоспейсера;
5. значимо низкая нецелевая активность, более высокая эффективность и специфичность в расщеплении целевой РНК.

Характеристики Cas13d делают его важным кандидатом для пространственно-временной инженерии транскриптома, обнаружения нуклеиновых кислот, мультиплексной регуляции генов, посттранскрипционного сайленсинга генов, альтернативного сплайсинга, отслеживания и эпигенетической регуляции РНК [51].

РАЗРЫВЫ ДНК

Клеточная ДНК постоянно подвергается многочисленным спонтанным повреждениям (до 10^5 на клетку ежедневно), потенциально нарушающим стабильность генома, провоцирующим хромосомные перестройки, дестабилизирующим структуру и функции генов и приводящим к развитию патологических состояний [59–61]. Известны различные виды повреждений ДНК, включая модификации гетероциклических оснований и углеводородного остова, разрыв N-гликозидных связей, образование ковалентных связей между цепями ДНК, а также между ДНК и белками (например, гистонами). Наиболее радикальными среди них

являются ДЦР. В этом случае оба конца ДНК оказываются топологически разделенными, что может вызвать изменения кариотипа. Разрывы ДНК занимают центральное место в важнейших биологических процессах, включая мейоз [62] и V(D)J-рекомбинацию, при которой гены, кодирующие компоненты антител, рекомбинируют с образованием огромного разнообразия конечных продуктов [63]. Целенаправленная индукция сайт-специфических расщеплений ДНК стала краеугольным камнем технологий редактирования генома. Так, нуклеазы Cas вносят различные разрывы, например, Cas9 может производить ДЦР с тупыми концами, Cas12a (Cpf1) – с ‘липкими’, а pCas9 вносит парные или одиночные ОЦР [64].

В свою очередь, клетки развили способность восстанавливать повреждения ДНК, инициируя сложный сигнальный ответ, который модулирует клеточный цикл, изменяет хроматиновое окружение и рекрутирует факторы репарации [64]. Считается, что оба варианта разрывов ДНК репарируются с использованием различных путей, хотя на практике граница между восстановлением ОЦР и ДЦР размыта, так как ОЦР могут превращаться в ДЦР, например, в результате прохождения репликативной вилки или когда два соседних ОЦР спонтанно образуют ДЦР с липкими концами [65].

Клетки млекопитающих используют два основных механизма репарации разрывов ДНК: NHEJ и репарацию с помощью HDR. Восстановление ДЦР на протяжении всего клеточного цикла происходит преимущественно путем NHEJ. Этот путь может приводить к мутациям, чаще всего к небольшим вставкам и/или делециям (InDel) размером 1–4 п.н. Однако при наличии гомологичной матрицы в виде сестринской хроматиды или искусственно добавленных донорных ДНК-матриц в поздней S-фазе и в фазе G2 запускается путь HDR. HDR может пойти по нескольким направлениям в зависимости от типа и размера матричной ДНК. Так, в присутствии донорной дцДНК-матрицы со средними плечами гомологии >200 п.н. репарация может осуществляться путем одноцепочечного отжига по прямым повторам (SSA, single strand annealing). При более длинных плечах (≥ 400 п.н.) восстановление пойдет по пути HDR, а если плечи гомологии равны примерно 30 н. и используется донорная оцДНК-матрица, то выбирается путь синтеззависимого отжига цепей (SDSA, synthesis-dependent strand annealing). Донорная дцДНК-матрица без плеч гомологии может быть встроена в место ДЦР ДНК путем гомологичной независимой целевой интеграции – этот путь обозначен как NITI (Homology-Independent Targeted Integration). Альтернативным путем репарации является путь микрогомологичного соединения концов (MMEJ), который имеет сходство как с NHEJ, так и с HDR. Подобно NHEJ,

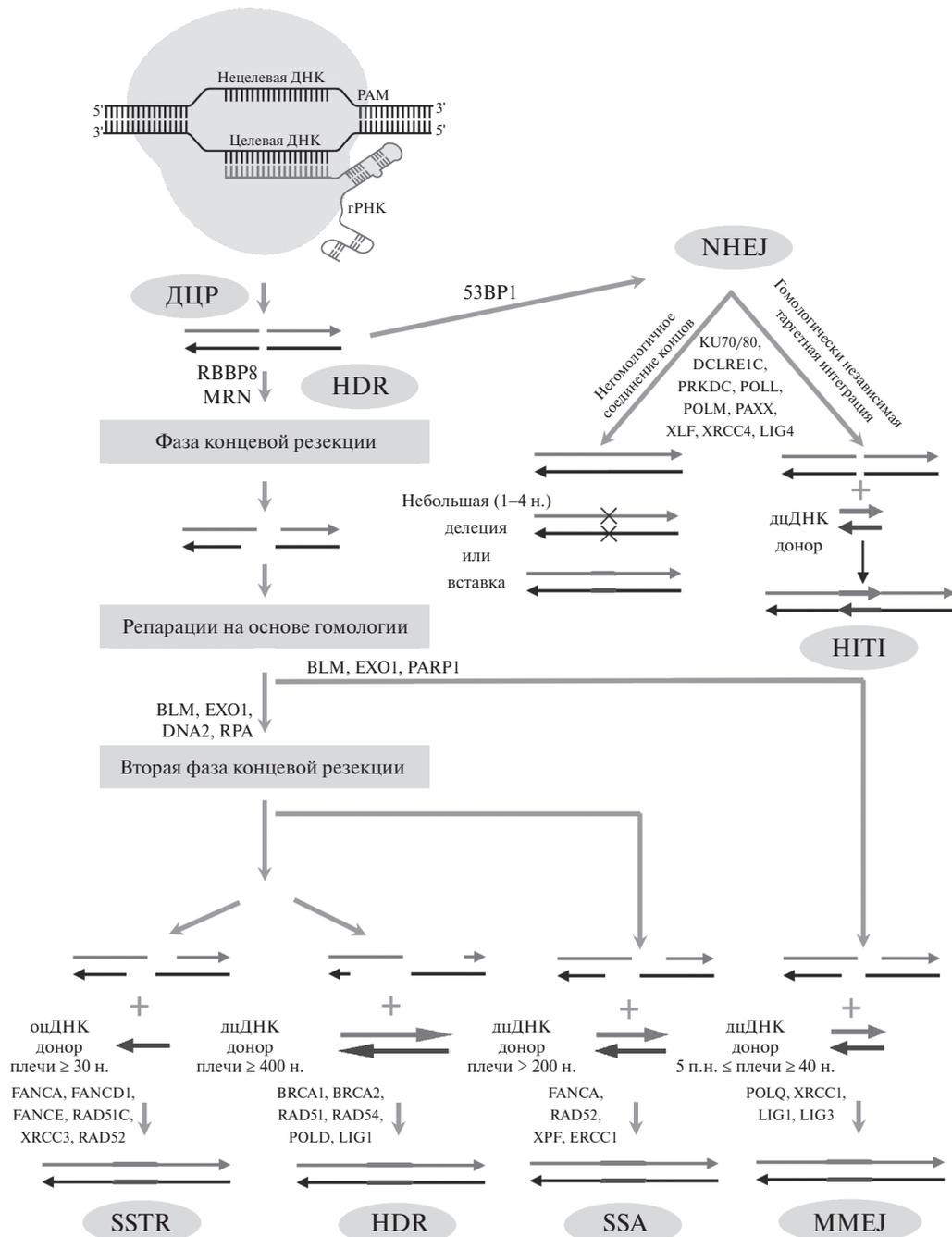


Рис. 4. Репарация разрывов ДНК. Приведены пути репарации HDR, NHEJ, MMEJ, проходящие с участием белковых факторов и ферментов нуклеинового обмена (указаны рядом со стрелками, указывающими направление пути репарации), и соответствующие донорные ДНК-матрицы.

MMEJ активен в большинстве стадий клеточного цикла, однако, как и HDR, нуждается в первоначальной резекции концов ДЦР, при этом используются чрезвычайно короткие плечи гомологии – 5–40 п.н. (рис. 4) [66].

Понимание детерминант, которые направляют восстановление Cas-индуцированного разрезания ДНК по определенному пути репарации, имеет решающее значение для прогнозирования

и контроля результата редактирования генома; на эффективность этого процесса влияет также регуляция ключевых факторов конкурирующих путей репарации ДНК.

ИНГИБИТОРЫ NHEJ

Выбор пути репарации ДЦР ДНК может иметь принципиальное значение при создании

трансенных животных. Пути NHEJ и HDR — это конкурирующие пути репарации Cas9-индуцируемых ДЦР. При этом NHEJ является основным путем восстановления ДЦР в клетках млекопитающих, поскольку HDR зависит от фаз клеточного цикла и наличия эндогенных матриц. Если необходимо только нарушить функцию гена, “сбив” рамку считывания, то путь NHEJ считается оптимальным, однако, если требуется внести точные правки в целевые участки гена, то необходимо задействовать путь HDR. В этом случае нужно искусственно сместить баланс в сторону HDR. Самым очевидным решением становится подавление пути NHEJ. Известно несколько регуляторов ключевых факторов NHEJ. Сравним их эффективность, достоинства и недостатки.

В основе пути NHEJ лежит механизм прямого лигирования разъединенных концов ДНК независимо от степени гомологии между нуклеотидными последовательностями. На данном этапе подавить NHEJ можно с помощью регуляции каскада (комплекса) хроматинсвязывающего белка 53BP1 с белками-эффекторами RIF1, Шелдин и CST, участвующими в репарации ДЦР (53BP1–PTIP/RIF1–Шелдин–CST). Этот комплекс ингибирует резекцию концов ДНК в фазе G1 клеточного цикла (рис. 5). Ключевым фактором каскада является белок 53BP1; вычленив его из процесса репарации, можно подавить NHEJ-путь. Существуют два подхода к контролю 53BP1. Один из них заключается в подавлении его рекрутирования в ДЦР. Так, E3 убиквитин-протеин-лигаза RAD18 связывает

убиквитинированный гистон H2AK15Ub с большей аффинностью, чем белок 53BP1, тем самым ингибируя рекрутирование 53BP1 в ДЦР. Аналогичным образом белок DN1S, доминантно-негативный мутант 53BP1, конкурирует с эндогенным 53BP1 или вытесняет его, уменьшая привлечение эффекторов NHEJ [67–69]. Другой подход предполагает удаление 53BP1 из участка ДЦР, например, полиубиквитинированием 53BP1, опосредованным убиквитинлигазой E3 SPOP [70].

На следующем этапе пути NHEJ гетеродимеры белка Ku70/Ku80 (ДНК-связывающий компонент ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК, Ku) распознают концы ДЦР и связываются с ними, защищая свободные концы ДНК в месте разрыва и предотвращая резекцию 5'-конца. Комплекс Ku70/Ku80 рекрутирует и активирует ДНК-зависимую каталитическую субъединицу, активность которой необходима для реализации пути NHEJ. Несмотря на решающую роль субъединиц Ku на ранних этапах пути NHEJ, разработано ограниченное количество ингибиторов Ku70/80, а их эффективность дает неоднозначные результаты. Так, использование Ku-специфической малой интерферирующей РНК (siРНК) подавляло Ku70/Ku80 и в 2 раза увеличивало CRISPR/Cas9-опосредованную эффективность HDR в фибробластах свиной [71]. Многообещающие результаты получены с использованием низкомолекулярных ингибиторов Ku70/80. Показано, что использование арилалкиловых эфиров производных арилпиразолон-карбоновой кислоты уменьшало связывание Ku до

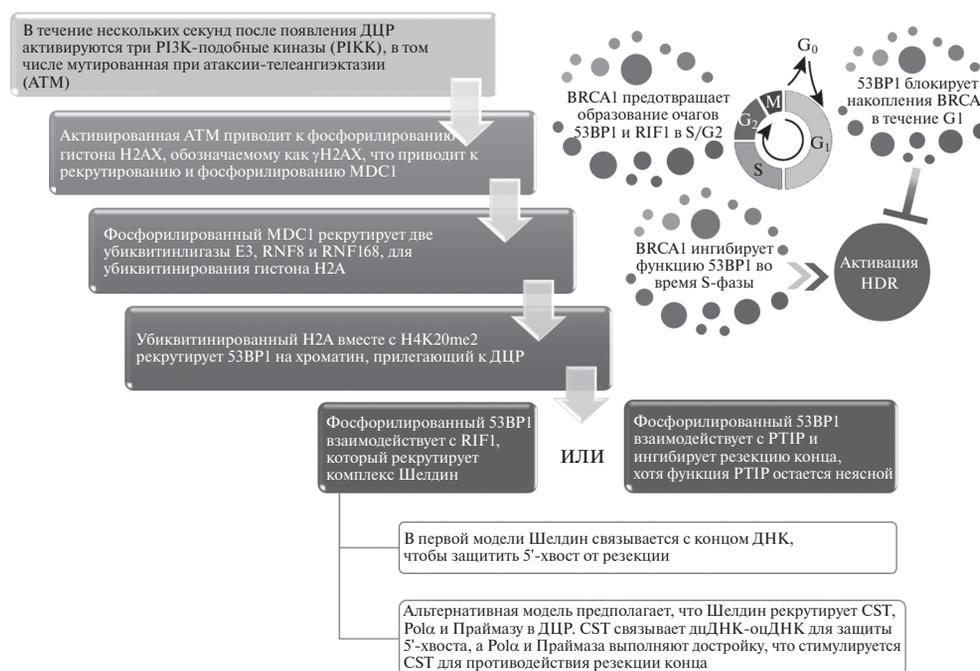


Рис. 5. Схема активации каскада 53BP1-PTIP-RIF1-Шелдин-CST. Стрелками обозначена последовательность этапов активации, в прямоугольных вставках приведено их описание. Вверху справа приведены сведения о роли белка BRCA1, вовлеченного в процесс HDR, на разных фазах клеточного цикла.

50% [72], а замена сложноэфирной связи на амидную приводила к четырехкратному увеличению способности подавлять связывание Ku-ДНК. В результате дальнейших модификаций этих соединений создан отдельный класс ингибиторов Ku-DBi – высокоэффективных и специфичных ингибиторов связывания Ku-ДНК, которые напрямую взаимодействовали с Ku и подавляли NHEJ [73]. Ингибирование Ku70 и Ku80 с помощью CRISPR значительно повышало эффективность HDR [74]. Так, активация системы CRISPRi (CRISPR interference) приводила к увеличению эффективности HDR в 1.85 раза при ингибировании Ku70 и в 1.58 раза в случае Ku80 [75]. Вместе с тем, в некоторых исследованиях показано, что подавление Ku не влияет на эффективность HDR [76], а также может приводить к снижению эффективности обеих путей репарации ДНК [77].

Интересно отметить, что ингибирование Ku не всегда может сместить равновесие в сторону HDR. Например, в качестве ингибитора гетеродимеров Ku70/Ku80 предложено низкомолекулярное соединение L – STL127705, идентифицированное с помощью скрининга библиотеки *in silico* [78]. Хотя нет отчетов о проверке влияния непосредственно этого ингибитора на эффективность HDR, изучение его 4-фторфенильного аналога STL127685 не влияло на снижение эффективности пути NHEJ или увеличение эффективности HDR [79].

Низкомолекулярные ингибиторы комплекса Ku70/Ku80 устраняют до 90% активности холофермента ДНК-ПК, содержащего помимо ДНК-связывающего комплекса Ku70/Ku80 еще и каталитическую субъединицу [72]. Каталитическая субъединица ДНК-ПК отвечает за распознавание ДЦР, фосфорилирование компонента X семейства гистонов H2A (H2AX) и рекрутирование/активацию механизма репарации для индукции пути NHEJ [80]. Обработка клеток HEK293T ингибиторами ДНК-ПК NU7441 (или KU57788) и KU-0060648 приводила к двукратному увеличению эффективности HDR [81], в эмбрионах рыбок *Danio rerio* соединение NU7441 увеличивало эффективность HDR в 13.4 раза [82]. Эти данные согласуются с результатами, полученными на плюрипотентных стволовых клетках, где еще один ингибитор ДНК-ПК, NU7026, повышал эффективность интеграции донорных олигонуклеотидов примерно в 1.6 раза [79]. Более мощным ингибитором ДНК-ПК считается M3814, его активность вызывает увеличение HDR в 4 раза и позволяет проводить редактирование нескольких локусов одновременно [83]. Комбинация нескольких ингибиторов может иметь синергический эффект. Например, ингибитор M3814 в сочетании с трихостатином А в 3 раза снижал эффективность NHEJ [84], а в сочетании с линеаризацией донорной плазмиды и транзиентного нокдауна ДНК-полимеразы θ (метод ViPoD) почти

полностью подавлял NHEJ/ММЕJ и обеспечивал создание биаллельных knock-in в эмбриональных стволовых клетках мышей [13].

ДНК-ПК фосфорилирует множество субстратов, включая Artemis, XRCC4, ДНК-лигазу IV и XLF, что способствует удержанию концов ДЦР ДНК и облегчает рекрутирование ферментов процессинга и лигирования.

Использование ингибиторов ДНК-лигазы IV, играющей важную роль в лигировании концов ДЦР в процессе NHEJ, крайне актуально для подавления этого пути и смещения равновесия в сторону HDR. Наиболее хорошо охарактеризованным ингибитором ДНК-лигазы IV является низкомолекулярное производное дигидроптерина – соединение SCR7, механизм действия которого подробно рассмотрен в работах [85, 86]. Отмечено, что совместная инъекция компонентов CRISPR/Cas9 и SCR7 в зиготы повышает эффективность HDR-опосредованного инсерционного мутагеназа, что приводит к появлению мышей со вставками в нескольких локусах. Применение SCR7 смещает баланс в сторону HDR в 10 раз в эмбрионах мышей и на 46% у крыс, а также в широком диапазоне клеточных линий, включая клетки рака легкого, молочной железы, толстой кишки, меланомы, и первичные фибробласты. В случае вставок длинных фрагментов ДНК использование SCR7 повышает результативность до 13 раз, а с короткими вставками – до 19 раз [76]. Комбинация SCR7 с другими факторами может значительно повысить эффективность пути HDR, например, при использовании Rad52 до 40% [87], а при совместной инъекции с компонентами CRISPR/Cas9 в зиготы можно получить вставки в нескольких локусах [88]. Показано, что применение SCR7 увеличивает результативность стратегии повышения эффективности HDR до 30 раз [89]. Однако вопрос о роли SCR7 в повышении эффективности HDR за счет снижения эффективности NHEJ остается спорным. В целом, активность SCR7, по-видимому, является ткане- и организмспецифичной. Об этом свидетельствуют сообщения о слабом влиянии SCR7 на подавление NHEJ или усиление HDR в локусах ROSA26-like (RLL) генома кролика [90], MALAT1 клеток HEK293T [91], pROSA26 в эмбриональных фибробластах свиньи [92], при обработке линии эмбриональных стволовых клеток H1 [93], клеток U2OS DR-GFP [94], HSPC [95] и линии клеток миелогенного лейкоза K562 [96], при создании CRISPR/Cas12a-опосредованного нокаута в плюрипотентных стволовых клетках человека [97], а также в эмбрионах *D. rerio* [82]. Представлены и модифицированные варианты SCR7. Так, более стабильная циклическая форма SCR7 может быть дополнительно окислена до SCR7-пиразина с сохранением способности подавлять NHEJ [98]. Показано, что SCR7-пиразин увеличивает эффективность

генетического редактирования на 50% в клетках MCF7 [99], но в создании нокаута в *Xenopus* это соединение было менее эффективным [100], что также свидетельствует о ткане- и видоспецифичности SCR7. Другая модификация SCR7, идентифицированная как SCR130, индуцирует апоптоз и обладает противоопухолевой активностью [101]. Блокировать активность ДНК-лигазы IV можно также путем shПНК-опосредованного (shПНК – образующая шпилечные структуры малая РНК) сайленсинга генов и совместной экспрессии системы Cas9 и белков E1B55K и E4orf6 аденовируса 4 вплоть до повышения эффективности HDR до 8 раз и практически полного подавления NHEJ в клеточных линиях человека и мыши [74].

Когда концы ДЦР невозможно напрямую лигировать с помощью комплексов XLF-XRCC4 и ДНК-лигазы IV (например, из-за выступающих фрагментов нескольких нуклеотидов), такие нуклеазы, как Artemis, полинуклеотидкиназа-3'-фосфатаза (PNKP) и ДНК-полимеразы (Pol μ и Pol λ) могут модифицировать места разрывов оцДНК-дцДНК с образованием совместимых тупых концов [85, 102].

Если не задействовать описанные механизмы подавления NHEJ, то на заключительном этапе этого пути лигирование выполняет комплекс XRCC4-ДНК-лигаза IV-XLF. Основания ДНК случайным образом добавляются и удаляются ДНК-полимеразами и нуклеазами, что приводит к образованию вставок, небольших по сравнению с исходной геномной матрицей, которая составляет основу подверженного ошибкам редактирования на основе NHEJ.

Повысить эффективность направленного редактирования генома можно не только с помощью ингибирования NHEJ, но и путем прямой активации HDR. Последнее может быть более безопасным для клеток, так как не приводит к их гибели из-за нерепарируемых разрывов ДНК.

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЮЧЕВЫХ ФАКТОРОВ ПУТИ HDR

Репарация ДНК по пути HDR протекает значительно медленнее, чем по пути NHEJ. Этот процесс продолжается в течение 7 ч и более и приводит к резекции не менее 10^3 нуклеотидов с 5'-конца от места разрыва с образованием 3'-выступающего конца ДНК. Концевая резекция – это важная часть механизмов MMEJ и HDR. Наличие участка оцДНК необходимо для гибридизации с комплементарной последовательностью матрицы для HDR, чтобы при удлинении этого конца ДНК-полимеразой можно было точно восстановить последовательность, утраченную, возможно, в месте разрыва.

Большинство вариантов пути HDR, таких как канонический путь, путь синтеззависимого отжига

цепей (SDSA), путь индуцированного разрыва репликации (BIR) и одноцепочечного отжига по прямым повторам (SSA), протекают при наличии матрицы, и ДНК-трансфераза RAD51 опосредует поиск донорной ДНК-матрицы в процессе HDR. Так, сборка нуклеопротеиновых филаментов RAD51-оцДНК необходима для реализации путей HDR, SDSA и некоторых BIR, но путь SSA не зависит от RAD51 [103].

Недавно было показано, что компоненты пути анемии Фанкони (Fanconi Anemia, FA) – пути репарации межцепочечных сшивок в ДНК, участвуют и в репарации ДЦР ДНК. Анемия Фанкони – генетическое заболевание, вызываемое мутациями в генах, регулирующих зависимое от репликации удаление межцепочечных сшивок ДНК, характеризуется недостаточностью костного мозга и предрасположенностью к раку. Сигнальный путь FA координирует сложный механизм, в котором задействованы элементы трех классических путей репарации ДНК: HDR, эксцизионной репарации нуклеотидов и транслезионного синтеза ДНК. Для этого в пути FA используется уникальный ядерно-белковый комплекс, который убиквитинирует белки FANCD2 и FANCI, приводя к образованию структур репарации ДНК. В сигнальном пути FA задействованы 19 белков – от FANCA до FANCT, а также множество ассоциированных белков. Считают, что HDR является одним из этапов пути FA, в котором реализуется SSTR-путь рекомбинации с использованием олигонуклеотидных оцДНК-матриц (Single-Stranded Templated Repair). Белки FA – FANCD1 (BRCA2), FANCR (RAD51) и FANCD2, участвуют в инициации репарации ДЦР ДНК по механизму HDR. Изучение взаимодействия между FA и путями репарации ДЦР приводит к появлению все большего числа доказательств того, что FA не только участвует в репарации межцепочечных поперечных сшивок дцДНК, но также играет роль в ДЦР-опосредованном редактировании генома [104].

Как уже отмечено, основным шагом, который определяет выбор HDR в качестве пути репарации ДЦР, является 5'-3'-резекция конца ДНК с образованием 3'-выступающего одноцепочечного фрагмента. Этот процесс инициируется белковым комплексом MRN (MRX у дрожжей), состоящим из белков MRE11, RAD50 и NBS1, который имеет решающее значение для короткой концевой резекции [105]. Одной из стратегий, применяемых для смещения равновесия репарации разрывов ДНК в сторону HDR, стала разработка химерной конструкции Cas9 для привлечения комплекса MRN к участку ДЦР. В этой системе белок SpCas9 слит с доменом из 126 а.к. щелочной нуклеазы HSV-1 (UL12), который и рекрутирует комплекс MRN [106].

Неоднозначная ситуация наблюдается и с участием в выборе пути репарации ДНК белка PARP1, представителя семейства поли(ADP-рибозо)полимераз, участвующего в репарации повреждений ДНК и ремоделировании хроматина. С одной стороны, этот белок может способствовать привлечению комплекса MRN, что стимулирует пути MMEJ, SSA или HDR [107], однако PARP1 быстро рекрутируется в новые ДЦР и может ингибировать резекию и привлекать Ku-комплекс, способствуя реализации пути NHEJ [108].

Установлено, что фосфорилированный фактор резекии CtIP и комплекс BRCA1-BARD1 стимулируют процесс резекии с помощью MRN, в ходе которого субединица MRN NBS1 генерирует короткие выступающие концы [109, 110]. На данном этапе сместить равновесие в пользу HDR можно, используя нуклеазу Cas9, гибридованную с HE, N-концевым фрагментом CtIP, за счет рекрутирования эндогенного CtIP в месте расщепления. Этот эффект показан на клеточных линиях человека, iPSC-клетках и зиготах крыс. Его результативность зависела от сrПНК и варьировала в зависимости от локуса [111].

Короткие одноцепочечные фрагменты, генерируемые MRN, служат местом связывания таких ферментов, как экзонуклеаза 1 (EXO1), хеликаза Блума (BLM) и нуклеаза DNA2 [112]. EXO1 генерирует длинные 3'-одноцепочечные последовательности ДНК за счет своей процессирующей 5'-экзонуклеазной активности. Стимулировать резекию с помощью EXO1 может гетеротримерный комплекс SOSS1, связывающий оцДНК [113]. Сам комплекс MRN также рекрутирует и усиливает процессивность EXO1, а хеликаза BLM увеличивает средство EXO1 к местам разрыва ДНК [112]. Отмечено, что репликативный белок A (RPA) может как стимулировать, так и ингибировать активность EXO1 в зависимости от того, фосфорилирован он или нет [114]. Комплекс BLM/DNA2 обладает как 5'-, так и 3'-эндонуклеазной активностью: хеликаза BLM разделяет нити ДНК, позволяя нуклеазе DNA2 расщеплять оцДНК [112]. Хеликазная активность BLM увеличивается при взаимодействии с фактором резекии CtIP, который усиливает также DNA2-опосредованное расщепление ДНК [115]. RPA ингибирует 3'-эндонуклеазную активность DNA2, одновременно стимулируя ее 5'-эндонуклеазную активность, чтобы обеспечить 5'-3'-направление резекии [114]. Как уже упоминалось, регуляторный механизм 53BP1-PTIP/RIF1-Шелдин-CST ингибирует дальнюю резекию концов (Long Range Resection), причем хроматинсвязывающий белок 53BP1 блокирует привлечение белка BRCA1 к ДЦР во время G1-фазы, в то время как белок BRCA1 предотвращает образование очагов 53BP1 и RIF1 в ДЦР во время фазы S/G2 [116]. Антагонистические отношения между

BRCA1-BARD1 (BARD1 – белок, ассоциированный с BRCA1, BRCA1-associated RING domain protein 1) и 53BP1 могут быть связаны с двумя состояниями посттрансляционной модификации гистонов H2A и H4: убиквитинированием лизина-15 гистона H2A и метилированием лизина-20 гистона H4, что влияет на выбор пути репарации ДЦР [117]. Также RAD18, а именно его улучшенный вариант e18, подавляя локализацию 53BP1 в ДЦР, стимулирует CRISPR-опосредованную HDR, тем самым повышая эффективность точного редактирования генома [118].

Поскольку образующиеся одноцепочечные фрагменты ДНК очень нестабильны, они связываются с белком RPA, который защищает оцДНК от нуклеазной деградации и предотвращает образование вторичных структур. С помощью “посредников” рекомбинации, таких как белки BRCA1, BRCA2, а также партнера BRCA2 – белка PALB2, RPA вытесняется белком RAD51, который затем образует протяженные спиральные нуклеопротеиновые филаменты на оцДНК путем блокирования гидролиза АТФ. RPA представляет собой барьер для сборки филаментов RAD51. В G2/S-фазе циклин-зависимая киназа 1 (CDK1) фосфорилирует RAD51, что усиливает способность RAD51 конкурировать с RPA за оцДНК [119]. Установлено, что небольшая молекула RS-1, идентифицированная в результате скрининга библиотеки из 10 000 соединений, может усиливать ДНК-связывающую активность RAD51, что в несколько раз увеличивает эффективность Cas9-опосредованной HDR в клетках HEK293A, плюрипотентных стволовых клетках человека, в эмбрионах кроликов и *D. rerio*. После формирования нуклеопротеинового филамента RAD51-оцДНК происходит поиск комплементарной ДНК-матрицы для HDR. Инвазия 3'-выступающего конца ДНК в матрицу приводит к образованию D-петли, за которым следует удлинение 3'-выступающего конца ДНК с помощью ДНК-полимеразы δ . Способствовать инвазии ДНК может сверхэкспрессия дрожжевого RAD52 (γ RAD52), но не его человеческого аналога, HDRAD52. Показано, что применение слитого белка γ RAD52-Cas9 приводит к увеличению эффективности HDR в клетках разных организмов. Предполагается, что после образования D-петли процесс репарации может пойти тремя путями, в зависимости от того, образуются одна или две структуры Холлидея. Затем действует группа ферментов, называемых резольвазами, которые завершают процесс репарации и восстанавливают хромосому до ее неповрежденного состояния [68].

Скрининг около 4000 малых молекул выявил две небольшие молекулы, L755507 и брефельдин А, способных повысить эффективность HDR. Так, использование соединения L755507, агониста β 3-адренергических рецепторов, приводило к увеличению

эффективности вставки GFP в 3 раза по сравнению с контрольными клетками. Применение брефельдина А, ингибитора внутриклеточного транспорта белка из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, также приводило к повышению эффективности встраивания в 2 раза [120].

Следует отметить, что активность некоторых ключевых факторов, участвующих в HDR в клетках дрожжей и млекопитающих, регулируется с помощью высококонсервативного белка SUMO (небольшой белок примерно из 100 а.к.), способного регулировать активность того белка, к которому он присоединяется [121]. Как правило, сумоилирование положительно воздействует на концевую резекцию. Например, SUMO оказывает сильное влияние на функционирование CtIP [122] и способствует стабильности белка EXO1 в клетках млекопитающих [123]. Следовательно, можно предположить, что сумоилирование этих ключевых факторов может обеспечить более высокую эффективность HDR.

Из-за неравномерного распределения активности NHEJ и HDR по клеточному циклу, когда NHEJ активен на протяжении всего цикла, а HDR ограничена лишь поздней фазой G2 и S, когда происходит репликация ДНК перед делением клетки, ингибиторы клеточного цикла используют для повышения эффективности HDR, останавливая или задерживая клетки-мишени в фазах S или G2.

КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Поскольку репарация разрывов в ДНК по пути HDR ограничена фазами S и G2 клеточного цикла, синхронизация клеток в этих фазах с помощью химических соединений может значительно повысить ее эффективность. Такими соединениями стали блокаторы G1/S: афидиколин, гидроксимочевина, мимозин и тимидин, повышающие вероятность восстановления ДНК по пути HDR в неонатальных фибробластах [124]. Нокодазол и АВТ-751 останавливают клетки в фазе G2/M, ингибируя полимеризацию микротрубочек. Нокодазол способствует увеличению эффективности HDR в 1.38 раза в клетках HEK293T [124], а АВТ-751 увеличивает в 6 раз эффективность редактирования генома в линиях стволовых клеток человека [93]. Некоторые блокаторы M/G1 не всегда показывают высокие результаты в стимуляции HDR, как например, ловастатин в неонатальных фибробластах [124]. Недавно было показано, что низкомолекулярное соединение XL413, ингибитор киназы CDC7, участвующей в инициации репликации ДНК, замедляет S-фазу, удлиняя фазы S/G2/M, и увеличивает эффективность HDR до 3.5 раз [96]. Тиазольное производное хинона, соединение RO-3306, может временно останавливать переход от фазы G2 к фазе M путем ингибирования функции циклин-зависимой киназы (CDK1), увеличивая количество

клеток в фазах S и G2 [125]. Соединение RO-3306, ингибитор CDK1, применяемое в сочетании с белком Cas9, нуклеазная активность которого снижена в фазе G1, может улучшить соотношение путей HDR/NHEJ в 20 раз в пользу HDR [126]. Вместе с тем, эффекты блокаторов клеточного цикла зависят от типа клеток-мишеней и могут иметь ограничения для использования *in vivo* из-за потенциальной токсичности. Зависимая от фазы клеточного цикла экспрессия Cas9 может быть дополнительным подходом к синхронизации образования ДЦР с фазами клеточного цикла. Стратегия контроля экспрессии Cas9 в фазах S и G2 основана на создании комплекса Cas9-hGem (Cas9-геминин). Слияние первых 110 а.к. геминина с Cas9 приводит к протеолитической деструкции такого гибридного белка, вызванной APC/CDH1-опосредованным убиквитинированием в поздних фазах M и G1, и в итоге увеличивает эффективность HDR до 87% в клетках HEK293T [91]. Эффективность этого подхода подтверждена на плюрипотентных стволовых клетках человека и фибробластах свиньи, что делает его многообещающим инструментом для повышения эффективности HDR [127, 128]. Кроме того, существуют не прямые методы замедления клеточного цикла. Так, например, инкубация эмбрионов *D. rerio* на льду увеличивает результативность HDR в 1.5 раза [82].

СТАТУС ХРОМАТИНА

Статус хроматина, его компоненты и структура значительно влияют на выбор пути репарации ДЦР, однако детальные механизмы этого процесса остаются неясными. Система CRISPR-Cas функционирует в различных хромосомных контекстах, таких как эухроматин или гетерохроматин.

Фундаментальной единицей хроматина является нуклеосома, состоящая из двух копий каждого корового гистона (H3, H4, H2A и H2B), обернутых 147 парами оснований ДНК. Неструктурированные концевые области коровых гистонов подвергаются множеству различных посттрансляционных модификаций, среди которых наиболее хорошо изучены фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и убиквитинирование. Посттрансляционные модификации гистонов, а также метилирование ДНК помогают сформировать эухроматин и гетерохроматин. Эухроматин соответствует открытому состоянию хроматина, он связан с активной транскрипцией и обогащен метилированными (например, H3K4me3, H3K36me3) и ацетилированными гистонами. Напротив, гетерохроматин более компактен, менее доступен для аппарата транскрипции и обогащен репрессивными гистоновыми посттрансляционными модификациями и, таким образом, транскрипционно неактивен. Гетерохроматин разделяют на факультативный, конститутивный и центромерный. Последний включает

вариант гистона H3, СЕНР-А, который эпигенетически определяет расположение центромер и перемежается с активными гистоновыми посттрансляционными модификациями H3K4me3, H3K36me3, но лишен репрессивного H3K9me3, характерного для конститутивного гетерохроматина [129, 130].

Установлено, что триметилирование остатка лизина-36 гистона H3 (H3K36me3) играет критическую роль в репарации ДНК по пути HDR в эухроматине [130]. Триметилированный гистон H3K36me3 обнаружен также в участках, которые репарируются по пути NHEJ [131]. Установлено, что содержание аналогичного гистона, содержащего диметилированный лизин-36 (H3K36me2), снижено в ДЦР, которые репарируются по пути HDR, и характерно для ДЦР, которые репарируются по пути NHEJ [130]. Модифицированный гистон H3, содержащий диметилированный остаток лизина-4 (H3K4me2) в центромерах, способствует репарации по пути HDR в фазе G1 клеточного цикла [132], триметилирование лизина-9 гистона H3 (H3K9me3) также способствует восстановлению разрывов в ДНК по пути HDR и уменьшает эффективность репарации по пути NHEJ.

В среднем для гетерохроматина более характерны пути репарации HDR и MMEJ. Так, использование системы KRAV (Körper-associated box), которая рекрутирует компоненты ремоделирования хроматина и нуклеосом, создавая локальные гетерохроматиновые области в геноме, в конечном счете приводит к смещению баланса от NHEJ к HDR [133, 134]. Показано подобное смещение равновесия и от NHEJ к MMEJ [129]. Такое распределение выглядит логичным, так как NHEJ по умолчанию (особенно на этапе G1) более активен, чем MMEJ или HDR и, следовательно, в эухроматине может реализоваться в основном NHEJ. В то же время ремоделирование участка разрыва ДНК в гетерохроматине может быть медленным, что дает время для активации MMEJ и HDR. Использование ингибиторов гистоновых деацетилаз HDAC1 или HDAC2, которые поддерживают компактную природу гетерохроматина, показало значительное увеличение скорости как NHEJ, так и HDR – примерно в 2–3 раза [135]. Так, применение трихостатина А, ингибитора HDAC класса I/II, увеличивало примерно в 2.2 раза эффективность редактирования генов в экспрессирующих pCas9 клетках, а применение вальпроевой кислоты, также ингибитора HDAC класса I/II, в сочетании со сверхэкспрессией RAD51 значительно повысило эффективность биаллельной HDR в клетках ES/iPS человека [136]. Следует отметить, что в более раннем исследовании не зафиксировано очевидных различий в соотношении HDR/NHEJ в различных состояниях хроматина [137].

Таким образом, выбор пути репарации ДЦР контролируется статусом метилирования H3K36,

а посттрансляционные модификации H3K4me2 и H3K9me3 способствуют реализации HDR [138]. На сегодняшний день вопрос о точном механизме того, как структуры хроматина влияют на выбор пути репарации Cas9-опосредованного ДЦР, остается открытым. В отношении репарации опосредованных Cas9 разрывов ДНК существует обобщенное мнение, что структура хроматина влияет на активность Cas9 как *in vivo*, так и *in vitro*, при этом гетерохроматин препятствует CRISPR-Cas-опосредованному редактированию генома [139].

ДНК-МАТРИЦЫ ДЛЯ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Выбор правильного варианта ДНК-матрицы для репарации по пути HDR может значительно повлиять на результативность редактирования генома. Существуют три основных варианта донорных матриц: дцДНК, оцДНК, а также линейная оцДНК аденоассоциированного вируса.

Матрицы дцДНК удобно получать, они имеют низкую стоимость и поэтому широко используются. HDR с использованием в качестве доноров дцДНК менее эффективна, чем с оцДНК-матрицами, однако дцДНК позволяет создавать вставки больших фрагментов (до 7.1 т.п.н.) [66]. Плечи гомологии, необходимые для дцДНК-матриц, обычно относительно длинные (0.5–2 т.п.н.), но успешно используются и плечи гомологии <100 п.н. [140]. Размер плеча является ограничивающим фактором, поскольку эффективность knock-in HDR с введением в целевое место генома заданной последовательности) положительно коррелирует с длиной плеча гомологии дцДНК и отрицательно коррелирует с размером вставки [76].

Матрицы оцДНК имеют короткие плечи гомологии (70–100 нуклеотидов), их легко синтезировать с введением различных модификаций для повышения эффективности трансформации и стабильности *in vivo*. Общий уменьшенный размер оцДНК делает ее более подходящей для точечного редактирования со стратегией короткой вставки (<100 нуклеотидов) вместо целых генов [66].

Один из вариантов оцДНК – короткий одноцепочечный олигонуклеотид (оцОНК) длиной около 200 нуклеотидов. оцОНК содержит плечо гомологии ≥30 нуклеотидов как на 5'-, так и на 3'-конце, где более длинное плечо гомологии может повысить эффективность редактирования, но при этом проявляет более выраженную цитотоксичность. Ограниченная длина оцОНК не позволяет делать крупные вставки, хотя использование нескольких оцОНК с перекрывающимися областями увеличивает возможность вставок крупных фрагментов ДНК [66]. Повышение результативности редактирования при использовании оцОНК достигнуто путем фосфориоатной модификации, которая стабилизировала

матрицу за счет уменьшения вне- и внутриклеточной деградации нуклеазами и увеличивала ее способность проникать через плазматическую мембрану клетки-мишени [141]. В настоящее время оцОНК стали рутинным инструментом редактирования как *in vitro*, так и *in vivo*, особенно в экспериментах по изменению нескольких генов [142].

Для расширения использования оцОНК разработана система Easi-CRISPR, в которой в качестве донорных матриц используется длинная оцДНК [143], которая позволяет получать вставки более крупных фрагментов, чем оцОНК, заменять гены в выбранных местах генома и получать условные аллели. Как и в случае оцОНК, расстояние между участком целевой модификации и сайтом Cas-расщепления должно быть как можно меньше. Средняя длина такой ДНК составляет 0.2–2 т.п.н. (максимальная длина 5 т.п.н., после чего ДНК склонны к спонтанному разрывам). При этом используется короткое плечо гомологии, обычно 55–329 нуклеотидов на каждом конце. Длинная оцДНК обладает рядом недостатков: она более токсична, чем оцОНК, а ее получение дороже и сложнее, кроме того, репарация с помощью длинной оцДНК приводит к большей частоте ошибок, чем в случае дцДНК [66, 119].

В дополнение к оцОНК и длинным оцДНК в качестве матриц для HDR используется линейная оцДНК аденоассоциированного вируса (ААВ), упакованная в капсид после удаления всех вирусных генов. Сообщается, что оцДНК-ААВ-матрица обладает высокой эффективностью точечных мутаций и вставок больших фрагментов ДНК,

поскольку вирус обладает естественной способностью стимулировать HDR [144, 145]. В целом, длина плеча гомологии оцДНК-ААВ-матрицы составляет 400–800 нуклеотидов. Средняя длина вставки при использовании оцДНК-ААВ матрицы составляет 771–3300 нуклеотидов и не может превышать 3800. Однако с помощью CRISPR-Cas в HSPC и Т-клетки можно вставить ДНК длиной 5700 оснований [146].

HDR с использованием донорной дцДНК-матрицы проходит в основном по пути HDR, тогда как при использовании оцДНК матрицы репарация проходит по пути одноцепочечного отжига (SSA) и синтез-зависимого отжига цепи (SDSA) [103]. Однако донорные дцДНК-матрицы как плазмидные, так и линейные, задействованы в системах репарации HMEJ, Tild и PITCh в качестве альтернативы HDR. В качестве донорных ДНК-матриц в HMEJ использовали суперскрученные плазмиды, несущие сайты-мишени синтетической гРНК, и два плеча гомологии (600–900 п.н.) [147], которые в стратегии Tild были заменены линейными дцДНК с двумя плечами гомологии по 800 п.н. [148]. При этом оба типа донорных ДНК-матриц могли эффективно и точно встраивать экзогенную ДНК в сайт-мишень. В системе PITCh также используются сверхскрученные плазмиды, несущие сайты-мишени синтетической гРНК, но с микрогомологичными последовательностями в качестве плеч гомологии (5–25 п.н.). В итоге донорная последовательность встраивалась в геном по MMEJ-пути [149], что позволило работать системе во время G1/ранних S-фаз клеточного цикла в отличие от HDR. В целом

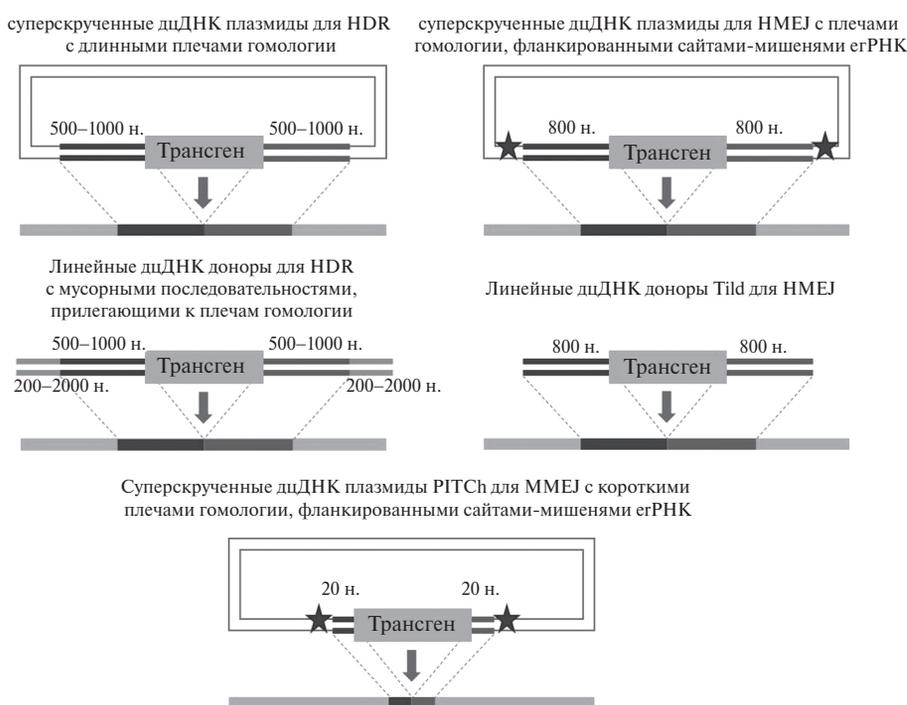


Рис. 6. Схемы гомологичной репарации (HDR) ДЦР ДНК с использованием в качестве донорных матриц дцДНК.

разработка этих стратегий позволила в разы увеличить эффективность HDR в следующем порядке Tild > HMEJ > PITCh ≥ HDR, где разрыв между Tild и HDR достигал шести порядков (рис. 6) [148].

Также показано, что встроить донорную последовательность можно и с использованием пути NHEJ. В этом случае ДЦР вводятся как в целевой геном, так и в донорную матрицу. Сначала донорную плазмиду линеаризуют и разрезают (при этом донорная матрица с двойным разрезом менее эффективна, чем с единичным, так как в первом случае образуются два фрагмента ДНК, конкурирующих за геномную интеграцию), а затем напрямую лигируют с концами разрезанной геномной ДНК по пути NHEJ. NHEJ эффективно повторно лигирует концы ДНК без ошибок и не требует областей гомологии для точной вставки. Однако донорная матрица может быть вставлена в любой ориентации относительно концов разорванной геномной ДНК, и нецелевые ДЦР также могут привести к непреднамеренной вставке в случайные участки генома. Чтобы обойти эту проблему, в донорную плазмиду вводили короткую гомологичную последовательность – “приманку”. Оказалось, что вставка не зависит от гомологии между локусом-мишенью и “приманкой” в донорной плазмиде [150, 151]. Аналогичный результат можно получить с использованием белка Cas12a (Cpf1), который в отличие от Cas9 генерирует ДЦР с липкими концами, потенциально способствующими точному редактированию генома [152]. Недавно обнаружено, что матрица репарации короткой дцДНК, содержащая липкий конец, соответствующий одному из концов Cpf1-опосредованного ДЦР, и гомологичное плечо, разделяющее гомологию с геномной областью, примыкающей к другому концу ДЦР, обеспечивает точную репарацию и вводит желаемую нуклеотидную замену. Эта стратегия задействует механизмы как HDR, так и MMEJ, и названа HDR с помощью лигирования [153].

Таким образом, оптимальные результаты редактирования могут быть получены путем выбора подходящей донорной ДНК-матрицы в соответствии с экспериментальными требованиями. Однако важны также формат предоставления матрицы донорной ДНК, ее доступность и концентрация в ядре. Обычно матрица добавляется в виде очищенной или “голой” ДНК, но в нормальной клеточной среде спираль ДНК обернута вокруг кластера белков – гистонов. Показано, что сконструированные ДНК-матрицы в форме, имитирующей хроматин, наряду со сниженной цитотоксичностью демонстрируют в 2.3–7.4 раза более высокую эффективность HDR по сравнению с развернутой ДНК [154]. Для сближения компонентов CRISPR с донорной ДНК-матрицей внутри клеток разработано несколько систем. Во-первых, модульная стратегия РНК-аптамер-стрептавидин (S1mplex), состоящая из еРНК, дополненной

стрептавидинсвязывающим РНК-аптамером, самого стрептавидина и белка Cas, созданная для формирования комплекса рибонуклеопротеинов CRISPR-Cas9 с биотинилированной донорной оцДНК-матрицей (bio-оцДНК) [155]. Во-вторых, получен вариант Cas9, слитый с авидином через гибкий линкер и соединенный мостиком с модифицированной биотином оцДНК (bio-оцДНК) для увеличения сродства [156], а также с использованием SNAP-метки сконструирован комплекс рибонуклеопротеинов CRISPR-Cas9 и bio-оцДНК [157].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюция развития технологии CRISPR/Cas привела к получению гибкой, простой в использовании молекулярной платформы для редактирования генома различных организмов. За последние годы разработаны разнообразные стратегии CRISPR-опосредованного редактирования генома, включая новые эффективные подходы к редактированию генома CRISPR-Cas9 с повышенной эффективностью HDR для встраивания в геномы протяженных фрагментов ДНК. Это позволяет добиться значительных достижений в фундаментальных и биомедицинских исследованиях и расширяет понимание биологии живых организмов и патогенетических основ болезней человека.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 21-64-00006) и частично профинансирована из бюджета Института функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных с использованием человека и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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., Siksny V., Terns M.P., Venclovas Č., White M.F., Yakunin A.F., Yan W., Koonin E.V. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 67–83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
2. Liu Z., Dong H., Cui Y., Cong L., Zhang D. (2020) Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microb. Cell Fact.* **19**, 1–14. doi: 10.1186/s12934-020-01431-z
3. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**, 816–821. doi: 10.1126/science.1225829

4. Filippova J., Matveeva A., Zhuravlev E., Stepanov G. (2019) Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. *Biochimie*. **167**, 49–60. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.003
5. Hendel A., Bak R.O., Clark J.T., Kennedy A.B., Ryan D.E., Roy S., Steinfeld I., Lunstad B.D., Kaiser R.J., Wilkens A.B., Bacchetta R., Tsalenko A., Dellinger D., Bruhn L., Porteus M.H. (2015) Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 985–989. doi: 10.1038/nbt.3290
6. Yin H., Song C.Q., Suresh S., Wu Q., Walsh S., Rhym L.H., Mintzer E., Bolukbasi M.F., Zhu L.J., Kauffman K., Mou H., Oberholzer A., Ding J., Kwan S.Y., Bogorad R.L., Zatsepin T., Koteliensky V., Wolfe S.A., Xue W., Langer R., Anderson D.G. (2017) Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1179–1187. doi: 10.1038/nbt.4005
7. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808
8. Liu G., Zhang Y., Zhang T. (2020) Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 35–44. doi: 10.1016/j.csbj.2019.11.006
9. Gurumurthy C.B., Lloyd K.C.K. (2019) Generating mouse models for biomedical research: technological advances. *Dis. Model. Mechan.* **12**, dmm029462. doi:10.1242/dmm.029462
10. Li F., Cowley D.O., Banner D., Holle E., Zhang L., Su L. (2014) Efficient genetic manipulation of the NOD-Rag1-/-IL2RgammaC-null mouse by combining *in vitro* fertilization and CRISPR/Cas9 technology. *Sci. Rep.* **4**, 5290. doi: 10.1038/srep05290
11. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. **153**, 910–918. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025
12. Sunagawa G.A., Sumiyama K., Ukai-Tadenuma M., Perrin D., Fujishima H., Ukai H., Nishimura O., Shi S., Ohno R.I., Narumi R., Shimizu Y., Tone D., Ode K.L., Kuraku S., Ueda H.R. (2016) Mammalian reverse genetics without crossing reveals Nr3a as a short-sleeper gene. *Cell Rep.* **14**, 662–677. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.052
13. Arai D., Nakao Y. (2021) Efficient biallelic knock-in in mouse embryonic stem cells by *in vivo*-linearization of donor and transient inhibition of DNA polymerase θ /DNA-PK. *Sci Rep.* **11**, 18132. doi:10.1038/s41598-021-97579-8
14. Li X., Sun B., Qian H., Ma J., Paolino M., Zhang Z. (2022) A high-efficiency and versatile CRISPR/Cas9-mediated HDR-based biallelic editing system. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. **23**, 141–152. doi: 10.1631/jzus.B2100196
15. Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E., Shi X., Scott D.A., Mikkelsen T., Heckl D., Ebert B.L., Root D.E., Doench J.G., Zhang F. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. **343**, 84–87. doi: 10.1126/science.1247005
16. Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S. (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. **343**, 80–84. doi: 10.1126/science.1246981
17. Zhou Y., Zhu S., Cai C., Yuan P., Li C., Huang Y., Wei W. (2014) High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*. **509**, 487–491. doi: 10.1038/nature13166
18. Lino C.A., Harper J.C., Carney J.P., Timlin J.A. (2018) Delivering crispr: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* **25**, 1234–1257. doi: 10.1080/10717544.2018.1474964
19. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. **351**, 84–88. doi: 10.1126/science.aad5227
20. Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**, 184–191. doi: 10.1038/nbt.3437
21. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832. doi: 10.1038/nbt.2647
22. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. **339**, 819–823. doi: 10.1126/science.1231143
23. Turchiano G., Andrieux G., Klermund J., Blattner G., Penucci V., El Gaz M., Monaco G., Poddar S., Mussolino C., Cornu T.I., Boerries M., Cathomen T. (2021) Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq. *Cell Stem Cell*. **28**, 1136–1147.e5. doi: 10.1016/j.stem.2021.02.002
24. Parikh B.A., Beckman D.L., Patel S.J., White J.M., Yokoyama W.M. (2015) Detailed phenotypic and molecular analyses of genetically modified mice generated by CRISPR-Cas9-mediated editing. *PLoS One*. **10**, e0116484. doi: 10.1371/journal.pone.0116484
25. Traxler E.A., Yao Y., Wang Y.D., Woodard K.J., Kurita R., Nakamura Y., Hughes J.R., Hardison R.C., Blobel G.A., Li C., Weiss M.J. (2016) A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat. Med.* **22**, 987–990. doi: 10.1038/nm.4170
26. Cullot G., Boutin J., Toutain J., Prat F., Pennamen P., Rooryck C., Teichmann M., Rousseau E., Lamrissi-Garcia I., Guyonnet-Duperat V., Bibeyran A., Lalanne M., Prouzet-Mauléon V., Turcq B., Ged C., Blouin J.M., Richard E., Dabernat S., Moreau-Gaudry F., Bedel A. (2019) CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chDromosomal truncations. *Nat. Commun.* **10**, 1136. doi: 10.1038/s41467-019-09006-2
27. Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large

- deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* **36**, 765–771.
doi: 10.1038/nbt.4192
28. Xu C.L., Ruan M.Z.C., Mahajan V.B., Tsang S.H. (2019) Viral delivery systems for CRISPR. *Viruses.* **11**, 28.
doi: 10.3390/v11010028
 29. Charlesworth C.T., Deshpande P.S., Dever D.P., Camarena J., Lemgart V.T., Cromer M.K., Vakulskas C.A., Collingwood M.A., Zhang L., Bode N.M., Behlke M.A., Dejene B., Cieniewicz B., Romano R., Lesch B.J., Gomez-Ospina N., Mantri S., Pavel-Dinu M., Weinberg K.I., Porteus M.H. (2019) Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat. Med.* **25**, 249–254.
doi: 10.1038/s41591-018-0326-x
 30. Song M., Koo T. (2021) Recent advances in CRISPR technologies for genome editing. *Arch. Pharm. Res.* **44**, 537–552.
doi: 10.1007/s12272-021-01336-4
 31. 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.
doi: 10.1126/science.aba8853
 32. Wang Y., Wang B., Xie H., Ren Q., Liu X., Li F., Lv X., He X., Cheng C., Deng R., Li J., Zhao J., Song Z., Gu F. (2019) Efficient human genome editing using SaCas9 ribonucleoprotein complexes. *Biotechnol. J.* **14**, e1800689.
doi: 10.1002/biot.201800689
 33. Görücü Yılmaz S. (2021) Genome editing technologies: CRISPR, LEAPER, RESTORE, ARCUT, SATI, and RESCUE. *EXCLI J.* **20**, 19–45.
doi: 10.17179/excli2020-3070
 34. 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.
doi: 10.1038/s41587-018-0011-0
 35. Li S., Zhang X., Wang W., Guo X., Wu Z., Du W., Zhao Y., Xia L. (2018) Expanding the scope of CRISPR/Cpf1-mediated genome editing in rice. *Mol. Plant.* **11**, 995–998.
doi: 10.1016/j.molp.2018.03.009
 36. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 2579–2586.
doi: 10.1073/pnas.1208507109
 37. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* **152**, 1173–1183.
doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
 38. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. (2013) XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* **154**, 442–451.
doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044
 39. Maeder M.L., Linder S.J., Cascio V.M., Fu Y., Ho Q.H., Joung J.K. (2013) CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods.* **10**, 977–979.
doi: 10.1038/nmeth.2598
 40. Balboa D., Weltner J., Euroola S., Trokovic R., Wartiovaara K., Otonkoski T. (2015) Conditionally stabilized dCas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation. *Stem Cell Rep.* **5**, 448–459.
doi: 10.1016/j.stemcr.2015.08.001
 41. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J.E., Chen Y., Whitehead E.H., Guimaraes C., Panning B., Ploegh H.L., Bassik M.C., Qi L.S., Kampmann M., Weissman J.S. (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell.* **159**, 647–661.
doi: 10.1016/j.cell.2014.09.029
 42. Wang G., Chow R.D., Bai Z., Zhu L., Errami Y., Dai X., Dong M.B., Ye L., Zhang X., Renauer P.A., Park J.J., Shen L., Ye H., Fuchs C.S., Chen S. (2019) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR a elicits potent antitumor immunity. *Nat. Immunol.* **20**, 1494–1505.
doi: 10.1038/s41590-019-0500-4
 43. Liu P., Chen M., Liu Y., Qi L.S., Ding S. (2018) CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell.* **22**, 252–261.e4.
doi: 10.1016/j.stem.2017.12.001
 44. Nuñez J.K., Chen J., Pommier G.C., Cogan J.Z., Replogle J.M., Adriaens C., Ramadoss G.N., Shi Q., Hung K.L., Samelson A.J., Pogson A.N., Kim J.Y.S., Chung A., Leonetti M.D., Chang H.Y., Kampmann M., Bernstein B.E., Hovestadt V., Gilbert L.A., Weissman J.S. (2021) Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell.* **184**, 2503–2519.e17.
doi: 10.1016/j.cell.2021.03.025
 45. Zhang F., Song G., Tian Y. (2019) Anti-CRISPRs: The natural inhibitors for CRISPR-Cas systems. *Animal Model Exp. Med.* **2**, 69–75.
doi: 10.1002/ame2.12069
 46. Malone L.M., Birkholz N., Fineran P.C. (2021) Conquering CRISPR: how phages overcome bacterial adaptive immunity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **68**, 30–36.
doi: 10.1016/j.copbio.2020.09.008
 47. Harrington L.B., Doxzen K.W., Ma E., Liu J.J., Knott G.J., Edraki A., Garcia B., Amrani N., Chen J.S., Cofsky J.C., Kranzusch P.J., Sontheimer E.J., Davidson A.R., Maxwell K.L., Doudna J.A. (2017) A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-Cas9. *Cell.* **170**, 1224–1233.e15.
doi: 10.1016/j.cell.2017.07.037
 48. Liu L., Yin M., Wang M., Wang Y. (2019) Phage AcrIIA2 DNA mimicry: structural basis of the CRISPR and anti-CRISPR arms race. *Mol. Cell.* **73**, 611–620.e3.
doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.011
 49. Jo D.H., Koo T., Cho C.S., Kim J.H., Kim J.S., Kim J.H. (2019) Long-term effects of *in vivo* genome editing in the mouse retina using *Campylobacter jejuni* Cas9 expressed via adeno-associated virus. *Mol. Therapy.* **27**, 130–136.
doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.009
 50. Harrington L.B., Burstein D., Chen J.S., Paez-Espino D., Ma E., Witte I.P., Cofsky J.C., Kyrpides N.C., Banfield J.F., Doudna J.A. (2018) Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science.* **362**, 839–842.
doi: 10.1126/science.aav4294
 51. Gupta R., Ghosh A., Chakravarti R., Singh R., Ravichandiran V., Swarnakar S., Ghosh D. (2022) Cas13d: a new molecular scissor for transcriptome engineering. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 866800.
doi: 10.3389/fcell.2022.866800

52. Koo T., Park S.W., Jo D.H., Kim D., Kim J.H., Cho H.Y., Kim J., Kim J.H., Kim J.S. (2018) CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. *Nat. Commun.* **9**, 1855. doi:10.1038/s41467-018-04175-y
53. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. **360**, 436–439. doi: 10.1126/science.aar6245
54. Leung R.K., Cheng Q.X., Wu Z.L., Khan G., Liu Y., Xia H.Y., Wang J. (2022) CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection systems. *Methods*. **203**, 276–281. doi: 10.1016/j.ymeth.2021.02.018
55. Wang Z., Wang Y., Wang S., Gorzalski A.J., McSwiggin H., Yu T., Castaneda-Garcia K., Prince B., Wang H., Zheng H., Yan W. (2020) Efficient genome editing by CRISPR-Mb-3Cas12a in mice. *J. Cell Sci.* **133**, jcs240705. doi: 10.1242/jcs.240705
56. Altae-Tran H., Kannan S., Demircioglu F.E., Oshiro R., Nety S.P., McKay L.J., Dlakić M., Inskoop W.P., Makarova K.S., Macrae R.K., Koonin E.V., Zhang F. (2021) The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science*. **374**, 57–65. doi: 10.1126/science.abj6856
57. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. **358**, 1019–1027. doi: 10.1126/science.aaq0180
58. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Franklin B., Koob J., Kellner M.J., Ladha A., Joung J., Kirchgatterer P., Cox D.B.T., Zhang F. (2019) A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*. **365**, 382–386. doi: 10.1126/science.aax7063
59. Hoeijmakers J.H.J. (2009) DNA damage, aging, and cancer. *NEJM*. **361**, 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
60. Lieber M.R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131
61. Sirbu B.M., Cortez D. (2013) DNA damage response: tHdR levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012724. doi: 10.1101/cshperspect.a012724
62. Baudat F., Imai Y., De Massy B. (2013) Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 794–806. doi: 10.1038/nrg3573
63. Schatz D.G., Ji Y. (2011) Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 251–263. doi: 10.1038/nri2941
64. van de Kooij B., van Attikum H. (2021) Genomic reporter constructs to monitor pathway-specific repair of DNA double-strand breaks. *Front Genet.* **12**, 809832. doi: 10.3389/fgene.2021.809832
65. Cannan W.J., Pederson D.S. (2016) Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. *J. Cell Physiol.* **231**, 3–14. doi: 10.1002/jcp.25048
66. Zhang X., Li T., Ou J., Huang J., Liang P. (2022) Homology-based repair induced by CRISPR-Cas nucleases in mammalian embryo genome editing. *Protein Cell*. **13**, 316–335. doi: 10.1007/s13238-021-00838-7
67. Denes C.E., Cole A.J., Aksoy Y.A., Li G., Neely G.G., Hesselton D. (2021) Approaches to enhance precise CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8571. doi: 10.3390/ijms22168571
68. Yang H., Ren S., Yu S., Pan H., Li T., Ge S., Zhang J., Xia N. (2020) Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6461. doi: 10.3390/ijms21186461
69. Sun W., Liu H., Yin W., Qiao J., Zhao X., Liu Y. (2022) Strategies for enhancing the homology-directed repair efficiency of CRISPR-Cas systems. *CRISPR J.* **5**, 7–18. doi: 10.1089/crispr.2021.0039
70. Ma J., Zhou Y., Pan P., Yu H., Wang Z., Li L.L., Wang B., Yan Y., Pan Y., Ye Q., Liu T., Feng X., Xu S., Wang K., Wang X., Jian Y., Ma B., Fan Y., Gao Y., Huang H., Li L. (2023) TRABID overexpression enables synthetic lethality to PARP inhibitor via prolonging 53BP1 retention at double-strand breaks. *Nat. Commun.* **14**, 1810. doi: 10.1038/s41467-023-37499-5
71. Li G., Liu D., Zhang X., Quan R., Zhong C., Mo J., Huang Y., Wang H., Ruan X., Xu Z., Zheng E., Gu T., Hong L., Li Z., Wu Z., Yang H. (2018) Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **99**, 154–160. doi: 10.1016/j.biocel.2018.04.011
72. Pawelczak K.S., Gavande N.S., VanderVere-Carozza P.S., Turchi J.J. (2018) Modulating DNA repair pathways to improve precision genome engineering. *ACS Chem. Biol.* **13**, 389–396. doi: 10.1021/acscchembio.7b00777
73. Gavande N.S., VanderVere-Carozza P.S., Pawelczak K.S., Mendoza-Munoz P., Vernon T.L., Hanakahi L.A., Summerlin M., Dynlacht J.R., Farmer A.H., Sears C.R., Nasrallah N.A., Garrett J., Turchi J.J. (2020) Discovery and development of novel DNA-PK inhibitors by targeting the unique Ku-DNA interaction. *Nucl. Acids Res.* **48**, 11536–11550. doi: 10.1093/nar/gkaa934
74. Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. (2015) Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 543–548. doi: 10.1038/nbt.3198
75. Li G., Quan R., Wang H., Ruan X., Mo J., Zhong C., Yang H., Li Z., Gu T., Liu D., Wu Z., Cai G., Zhang X. (2019) Inhibition of KU70 and KU80 by CRISPR interference, not NgAgo interference, increases the efficiency of homologous recombination in pig fetal fibroblasts. *J. Integr. Agric.* **18**, 438–448. doi: 10.1016/S2095-3119(18)62150-1
76. Shy B.R., MacDougall M.S., Clarke R., Merrill B.J. (2016) Co-incident insertion enables high efficiency genome engineering in mouse embryonic stem cells. *Nucl. Acids Res.* **44**, 7997–8010. doi: 10.1093/nar/gkw685
77. Yu W., Li L., Wang G., Zhang W., Xu J., Liang A. (2018) KU70 inhibition impairs both non-homologous end joining and homologous recombination DNA damage repair

- tHDRough SHP-1 induced dephosphorylation of SIRT1 in adult T-cell leukemia-lymphoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **49**, 2111–2123.
doi: 10.1159/000493815
78. Weterings E., Gallegos A.C., Dominick L.N., Cooke L.S., Bartels T.N., Vagner J., Matsunaga T.O., Mahadevan D. (2016) A novel small molecule inhibitor of the DNA repair protein Ku70/80. *DNA Repair.* **43**, 98–106.
doi: 10.1016/j.dnarep.2016.03.014
79. Riesenbergs S., Maricic T. (2018) Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **9**, 2164.
doi: 10.1038/s41467-018-04609-7
80. Mohiuddin I.S., Kang M.H. (2019) DNA-PK as an emerging therapeutic target in cancer. *Front Oncol.* **9**, 635.
doi: 10.3389/fonc.2019.00635
81. Robert F., Barbeau M., Éthier S., Dostie J., Pelletier J. (2015) Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med.* **7**, 93.
doi: 10.1186/s13073-015-0215-6
82. Aksoy Y.A., Nguyen D.T., Chow S., Chung R.S., Guillemin G.J., Cole N.J., Hesselson D. (2019) Chemical reprogramming enhances homology-directed genome editing in zebrafish embryos. *Commun. Biol.* **2**, 198.
doi: 10.1038/s42003-019-0444-0
83. Riesenbergs S., Chintalapati M., Macac D., Kanis P., Maricic T., Pääbo S. (2019) Simultaneous precise editing of multiple genes in human cells. *Nucl. Acids Res.* **47**, e116.
doi: 10.1093/nar/gkz669
84. Fu Y.W., Dai X.Y., Wang W.T., Yang Z.X., Zhao J.J., Zhang J.P., Wen W., Zhang F., Oberg K.C., Zhang L., Cheng T., Zhang X.B. (2021) Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucl. Acids Res.* **49**, 969–985.
doi: 10.1093/nar/gkaa1251
85. Ray U., Raghavan S.C. (2020) Modulation of DNA double-strand break repair as a strategy to improve precise genome editing. *Oncogene.* **39**, 6393–6405.
doi: 10.1038/s41388-020-01445-2
86. Ray U., Vartak S.V., Raghavan S.C. (2020) NHEJ inhibitor SCR7 and its different forms: Promising CRISPR tools for genome engineering. *Gene.* **763**, 144997.
doi: 10.1016/j.gene.2020.144997
87. Shao S., Ren C., Liu Z., Bai Y., Chen Z., Wei Z., Wang X., Zhang Z., Xu K. (2017) Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **92**, 43–52.
doi: 10.1016/j.biocel.2017.09.012
88. Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. (2015) Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* **33**, 538–542.
doi: 10.1038/nbt.3190
89. Aird E.J., Lovendahl K.N., St Martin A., Harris R.S., Gordon W.R. (2018) Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency tHDRough covalent tethering of DNA repair template. *Commun. Biol.* **1**, 54.
doi: 10.1038/s42003-018-0054-2
90. Song J., Yang D., Xu J., Zhu T., Chen Y.E., Zhang J. (2016) RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat. Commun.* **7**, 10548.
doi: 10.1038/ncomms10548
91. Gutschner T., Haemmerle M., Genovese G., Draetta G.F., Chin L. (2016) Post-translational regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair. *Cell Rep.* **14**, 1555–1566.
doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.019
92. Xie Z., Pang D., Wang K., Li M., Guo N., Yuan H., Li J., Zou X., Jiao H., Ouyang H., Li Z., Tang X. (2017) Optimization of a CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategy at the porcine Rosa26 locus in porcine foetal fibroblasts. *Sci. Rep.* **7**, 3036.
doi: 10.1038/s41598-017-02785-y
93. Yang D., Scavuzzo M.A., Chmielowiec J., Sharp R., Bajic A., Borowiak M. (2016) Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci. Rep.* **6**, 21264.
doi: 10.1038/srep21264
94. Canny M.D., Moatti N., Wan L.C.K., Fradet-Turcotte A., Krasner D., Mateos-Gomez P.A., Zimmermann M., Orthwein A., Juang Y.C., Zhang W., Noordermeer S.M., Seclen E., Wilson M.D., Vorobyov A., Munro M., Ernst A., Ng T.F., Cho T., Cannon P.M., Sidhu S.S., Durocher D. (2018) Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* **36**, 95–102.
doi: 10.1038/nbt.4021
95. Jayavaradhan R., Pillis D.M., Malik P.A. (2019) Versatile tool for the quantification of CRISPR/Cas9-induced genome editing events in human hematopoietic cell lines and hematopoietic stem/progenitor cells. *J. Mol. Biol.* **431**, 102–110.
doi: 10.1016/j.jmb.2018.05.005
96. Wienert B., Nguyen D.N., Guenther A., Feng S.J., Locke M.N., Wyman S.K., Shin J., Kazane K.R., Gregory G.L., Carter M.A.M., Wright F., Conklin B.R., Marson A., Richardson C.D., Corn J.E. (2020) Timed inhibition of CDC7 increases CRISPR-Cas9 mediated templated repair. *Nat. Commun.* **11**, 2109.
doi: 10.1038/s41467-020-15845-1
97. Ma X., Chen X., Jin Y., Ge W., Wang W., Kong L., Ji J., Guo X., Huang, J., Feng X.H., Fu J., Zhu S. (2018) Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **9**, 1303.
doi: 10.1038/s41467-018-03760-5
98. Vartak S.V., Swarup H.A., Gopalakrishnan V., Gopinatha V.K., Ropars V., Nambiar M., John F., Kothanahally S.K.S., Kumari R., Kumari N., Ray U., Radha G., Dinesh D., Pandey M., Ananda H., Karki S.S., Srivastava M., Charbonnier J.B., Choudhary B., Mantelingu K., Raghavan S.C. (2018) Autocyclized and oxidized forms of SCR7 induce cancer cell death by inhibiting nonhomologous DNA end joining in a ligase IV dependent manner. *FEBS J.* **285**, 3959–3976.
doi: 10.1111/febs.14661
99. Killian T., Dickopf S., Haas A.K., Kirstenpfad C., Mayer K., Brinkmann U. (2017) Disruption of diphthamide synthesis genes and resulting toxin resistance as a robust technology for quantifying and optimizing CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Sci. Rep.* **7**, 15480.
doi: 10.1038/s41598-017-15206-x

100. Aslan Y., Tadjuidje E., Zorn A.M., Cha S.W. (2017) High-efficiency non-mosaic CRISPR-mediated knock-in and In-Del mutation in F0 *Xenopus*. *Development*. **144**, 2852–2858. doi: 10.1242/dev.152967
101. Ray U., Raul S.K., Gopinatha V.K., Ghosh D., Rangappa K.S., Mantelingu K., Raghavan S.C. (2020) Identification and characterization of novel SCR7-based small-molecule inhibitor of DNA end-joining, SCR130 and its relevance in cancer therapeutics. *Mol. Carcinog.* **59**, 618–628. doi: 10.1002/mc.23186
102. Scully R., Panday A., Elango R., Willis N.A. (2019) DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **20**, 698–714. doi: 10.1038/s41580-019-0152-0
103. Yeh C.D., Richardson C.D., Corn J.E. (2019) Advances in genome editing tHDRough control of DNA repair pathways. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1468–1478. doi: 10.1038/s41556-019-0425-z
104. Richardson C.D., Kazane K.R., Feng S.J., Zelin E., Bray N.L., Schäfer A.J., Floor S.N., Corn J.E. (2018) CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nat. Genet.* **50**, 1132–1139. doi: 10.1038/s41588-018-0174-0
105. Syed A., Tainer J.A. (2018) The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 263–294. doi: 10.1146/annurev-biochem-062917-012415
106. Reuven N., Adler J., Broennimann K., Myers N., Shaul Y. (2019) Recruitment of DNA repair MRN complex by intrinsically disordered protein domain fused to Cas9 improves efficiency of CRISPR-mediated genome editing. *Biomolecules*. **9**, 584. doi: 10.3390/biom9100584
107. Lee K.J., Saha J., Sun J., Fattah K.R., Wang S.C., Jakob B., Chi L., Wang S.Y., Taucher-Scholz G., Davis A.J., Chen D.J. (2015) Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. *Nucl. Acids Res.* **44**, 1732–1745. doi: 10.1093/nar/gkv1499
108. Caron M.C., Sharma A.K., O’Sullivan J., Myler L.R., Ferreira M.T., Rodrigue A., Coulombe Y., Ethier C., Gagné J.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Finkelstein I.J., Hendzel M.J., Poirier G.G., Masson J.Y. (2019) Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nat. Commun.* **10**, 2954. doi: 10.1038/s41467-019-10741-9
109. Huertas P., Jackason S.P. (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* **284**, 9558–9565. doi: 10.1074/jbc.M808906200
110. Anand R., Ranjha L., Cannavo E., Cejka P. (2016) Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection. *Mol. Cell.* **64**, 940–950. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.017
111. Charpentier M., Khedher A.H.Y., Menoret S., Brion A., Lamribet K., Dardillac E., Boix C., Perrouault L., Tesson L., Geny S., De Cian A., Itier J.M., Anegon I., Lopez B., Giovannangeli C., Concordet J.P. (2018) CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat. Commun.* **9**, 1–11. doi: 10.1038/s41467-018-03475-7
112. Nimonkar A.V., Genschel J., Kinoshita E., Polaczek P., Campbell J.L., Wyman C., Modrich P., Kowalczykowski S.C. (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* **25**, 350–362. doi: 10.1101/gad.2003811
113. Myler L.R., Gallardo I.F., Zhou Y., Gong F., Yang S.H., Wold M.S., Miller K.M., Paull T.T., Finkelstein I.J. (2016) Single-molecule imaging reveals the mechanism of Exo1 regulation by single-stranded DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, E1170–9. doi: 10.1073/pnas.1516674113
114. Symington L.S. (2016) Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 195–212. doi: 10.3109/10409238.2016.1172552
115. Daley J.M., Jimenez-Sainz J., Wang W., Miller A.S., Xue X., Nguyen K.A., Jensen R.B., Sung P. (2017) Enhancement of BLM-DNA2-mediated long-range DNA end resection by CtIP. *Cell Rep.* **21**, 324–332. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.048
116. Tarsounas M., Sung P. (2020) The antitumorigenic roles of BRCA1-BARD1 in DNA repair and replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 284–299. doi: 10.1038/s41580-020-0218-z
117. Becker J.R., Bonnet C., Clifford G., Groth A., Wilson M.D., Chapman J.R. (2020) BARD1 links histone H2A lysine-15 ubiquitination to initiation of BRCA1-dependent homologous recombination. *bioRxiv. Cold Spring Harb. Lab.* doi: https://doi.org/10.1101/2020.06.01.127951
118. Nambiar T.S., Billon P., Diedenhofen G., Hayward S.B., Tagliatela A., Cai K., Huang J.W., Leuzzi G., Cuella-Martin R., Palacios A., Gupta A., Egli D., Ciccia A. (2019) Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant. *Nat. Commun.* **10**, 3395. doi: 10.1038/s41467-019-11105-z
119. Xue C., Greene E.C. (2021) DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Trends Genet.* **37**, 639–656. doi: 10.1016/j.tig.2021.02.008
120. Yu C., Liu Y., Ma T., Liu K., Xu S., Zhang Y., Liu H., La Russa M., Xie M., Ding S., Qi L.S. (2015) Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* **16**, 142–147. doi: 10.1016/j.stem.2015.01.003
121. Dhingra N., Zhao X. (2019) Intricate SUMO-based control of the homologous recombination machinery. *Genes Dev.* **33**, 1346–1354. doi: 10.1101/gad.328534.119
122. Soria-Bretones I., Cepeda-García C., Checa-Rodríguez C., Heyer V., Reina-San-Martin B., Soutoglou E., Huertas P. (2017) DNA end resection requires constitutive sumoylation of CtIP by CBX4. *Nat. Commun.* **8**, 113. doi: 10.1038/s41467-017-00183-6
123. Bologna S., Altmannova V., Valtorta E., Koenig C., Liberali P., Gentili C., Anrather D., Ammerer G., Pelkmans L., Krejci L., Ferrari S. (2015) Sumoylation regulates EXO1 stability and processing of DNA damage. *Cell Cycle.* **14**, 2439–2450. doi: 10.1080/15384101.2015.1060381

124. Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*. **3**, e04766. doi: 10.7554/eLife.04766
125. Vassilev L.T. (2006) Cell cycle synchronisation at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell Cycle*. **5**, 2555–2556. doi: 10.4161/cc.5.22.3463
126. Lomova A., Clark D.N., Campo-Fernandez B., Flores-Björström C., Kaufman M.L., Fitz-Gibbon S., Wang X., Miyahira E.Y., Brown D., DeWitt M.A., Corn J.E., Hollis R.P., Romero Z., Kohn D.B. (2019) Improving gene editing outcomes in human hematopoietic stem and progenitor cells by temporal control of DNA repair. *Stem Cells*. **37**, 284–294. doi: 10.1002/stem.2935
127. Gerlach M., Kraft T., Brenner B., Petersen B., Niemann H., Montag J. (2018) Efficient knock-in of a point mutation in porcine fibroblasts using the CRISPR/Cas9-GMNN fusion gene. *Genes*. **9**, 296. doi: 10.3390/genes9060296
128. Howden S.E., McColl B., Glaser A., Vadolas J., Petrou S., Little M.H., Elefanti A.G., Stanley E.G. (2016) A Cas9 variant for efficient generation of InDel-free knockin or gene-corrected human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **7**, 508–517. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.001
129. Schep R., Brinkman E.K., Leemans C., Vergara X., van der Weide R.H., Morris B., van Schaik T., Manzo S.G., Peric-Hupkes D., van den Berg J., Beijersbergen R.L., Medema R.H., van Steensel B. (2021) Impact of chromatin context on Cas9-induced DNA double-strand break repair pathway balance. *Mol. Cell*. **81**, 2216–2230.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2021.03.032
130. Chen Z., Tyler J.K. (2022) The chromatin landscape channels DNA double-strand breaks to distinct repair pathways. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 909696. doi: 10.3389/fcell.2022.909696
131. Clouaire T., Rocher V., Lashgari A., Arnould C., Aguirrebengoa M., Biernacka A., Skrzypczak M., Aymard F., Fongang B., Dojer N., Iacovoni J.S., Rowicka M., Ginalski K., Côté J., Legube G. (2018) Comprehensive mapping of histone modifications at DNA double-strand breaks deciphers repair pathway chromatin signatures. *Mol. Cell*. **72**, 250–262.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.020
132. Yilmaz D., Furst A., Meaburn K., Lezaja A., Wen Y., Altmeyer M., Reina-San-Martin B., Soutoglou E. (2021) Activation of homologous recombination in G1 preserves centromeric integrity. *Nature*. **600**, 748–753. doi: 10.1038/s41586-021-04200-z
133. Chen X., Rinsma M., Janssen J.M., Liu J., Maggio I., Gonçalves M.A. (2016) Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools. *Nucl. Acids Res.* **44**, 6482–6492. doi: 10.1093/nar/gkw524
134. Janssen J.M., Chen X., Liu J., Gonçalves M.A.F.V. (2019) The chromatin structure of CRISPR-Cas9 target DNA controls the balance between mutagenic and homology-directed gene-editing events. *Mol. Ther. Nucl. Acids*. **16**, 141–154. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.009
135. Liu B., Chen S., Rose A., Chen D., Cao F., Zwinderman M., Kiemel D., Aïssi M., Dekker F.J., Haisma H.J. (2020) Inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 enhances CRISPR/Cas9 genome editing. *Nucl. Acids Res.* **48**, 517–532. doi: 10.1093/nar/gkx1136
136. Takayama K., Igai K., Hagihara Y., Hashimoto R., Hanawa M., Sakuma T., Tachibana M., Sakurai F., Yamamoto T., Mizuguchi H. (2017) Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucl. Acids Res.* **45**, 5198–5207. doi: 10.1093/nar/gkx130
137. Knight S.C., Xie L., Deng W., Guglielmi B., Witkowsky L.B., Bosanac L., Zhang E.T., El Beheiry M., Masson J.B., Dahan M., Liu Z., Doudna J.A., Tjian R. (2015) Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*. **350**, 823–826. doi: 10.1126/science.aac6572
138. Caron P., Pobega E., Polo S.E. (2021) DNA double-strand break repair: all roads lead to heterochromatin marks. *Front. Genet.* **12**, 730696. doi: 10.3389/fgene.2021.730696
139. Chechik L., Martin O., Soutoglou E. (2020) Genome editing fidelity in the context of DNA sequence and chromatin structure. *Front. Cell. Dev. Biol.* **8**, 319. doi: 10.3389/fcell.2020.00319
140. Song F., Stieger K. (2017) Optimizing the DNA donor template for homology-directed repair of double-strand breaks. *Mol. Ther. Nucl. Acids*. **7**, 53–60. doi: 10.1016/j.omtn.2017.02.006
141. Renaud J.B., Boix C., Charpentier M., De Cian A., Cochennec J., Duvernois-Berthet E., Perrouault L., Tesson L., Edouard J., Thinard R., Cherif Y., Menoret S., Fontanière S., de Croz N., Fraichard A., Sohm F., Anegón I., Concordet J.P., Giovannangeli C. (2016) Improved genome editing efficiency and flexibility using modified oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 nucleases. *Cell Rep.* **14**, 2263–2272. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.018
142. Lim D., Sreekanth V., Cox K.J., Law B.K., Wagner B.K., Karp J.M., Choudhary A. (2020) Engineering designer beta cells with a CRISPR-Cas9 conjugation platform. *Nat. Commun.* **11**, 4043. doi: 10.1038/s41467-020-17725-0
143. Shola D.T.N., Yang C., Han C., Norinsky R., Peraza R.D. (2021) Generation of mouse model (KI and CKO) via Easi-CRISPR. *Methods Mol. Biol.* **2224**, 1–27. doi: 10.1007/978-1-0716-1008-4_1
144. Yoon Y., Wang D., Tai P.W.L., Riley J., Gao G., Rivera-Pérez J.A. (2018) Streamlined *ex vivo* and *in vivo* genome editing in mouse embryos using recombinant adeno-associated viruses. *Nat. Commun.* **9**, 412. doi: 10.1038/s41467-017-02706-7
145. Chen S., Sun S., Moonen D., Lee C., Lee A.Y., Schaffer D.V., He L. (2019) CRISPR-READI: efficient generation of knockin mice by CRISPR RNP electroporation and AAV donor infection. *Cell Rep.* **27**, 3780–3789.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.103
146. Bak R.O., Porteus M.H. (2017) CRISPR-mediated integration of large gene cassettes using AAV donor vectors. *Cell Rep.* **20**, 750–756. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.064
147. Yao X., Wang X., Hu X., Liu Z., Liu J., Zhou H., Shen X., Wei Y., Huang Z., Ying W., Wang Y., Nie Y.H., Zhang C.C., Li S., Cheng L., Wang Q., Wu Y., Huang P., Sun Q., Shi L., Yang H. (2017) Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* **27**, 801–814. doi: 10.1038/cr.2017.76
148. Yao X., Zhang M., Wang X., Ying W., Hu X., Dai P., Meng F., Shi L., Sun Y., Yao N., Zhong W., Li Y., Wu K.,

- Li W., Chen Z.J., Yang H. (2018) Tild-CRISPR allows for efficient and precise gene knock-in in mouse and human cells. *Dev. Cell.* **45**, 526–536.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2018.04.021
149. Sakuma T., Nakade S., Sakane Y., Suzuki K.T., Yamamoto T. (2016) MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat. Protoc.* **11**, 118–133. doi: 10.1038/nprot.2015.140
150. Artegiani B., Hendriks D., Beumer J., Kok R., Zheng X., Joore I., Chuva de Sousa Lopes S., van Zon J., Tans S., Clevers H. (2020) Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR–Cas9 precision genome editing. *Nat. Cell Biol.* **22**, 321–331. doi: 10.1038/s41556-020-0472-5
151. Lau C.H., Tin C., Suh Y. (2020) CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction. *Fac. Rev.* **9**, 20. doi: 10.12703/r/9-20
152. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* **163**, 759–771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038
153. Zhao Z., Shang P., Sage F., Geijsen N. (2022) Ligation-assisted homologous recombination enables precise genome editing by deploying both MMEJ and HDR. *Nucl. Acids Res.* **50**, e62. doi: 10.1093/nar/gkac118
154. Cruz-Becerra G., Kadonaga J.T. Enhancement of homology-directed repair with chromatin donor templates in cells. *Elife.* 2020 Apr 28;9:e55780. doi: 10.7554/eLife.55780
155. Carlson-Stevermer J., Abdeen A.A., Kohlenberg L., Goeland M., Molugu K., Lou M., Saha K. (2017) Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat. Commun.* **8**, 1711. doi: 10.1038/s41467-017-01875-9
156. Ma M., Zhuang F., Hu X., Wang B., Wen X.Z., Ji J.F., Xi J.J. (2017) Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxed alleles using the Cas9-avidin/biotin-donor DNA system. *Cell Res.* **27**, 578–581. doi: 10.1038/cr.2017.29
157. Savic N., Ringnalda F.C., Lindsay H., Berk C., Bargsten K., Li Y., Neri D., Robinson M.D., Ciaudo C., Hall J., Jinek M., Schwank G. (2018) Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. *Elife.* **7**, e33761. doi: 10.7554/eLife.33761

How To Shift The Equilibrium Of Dna Break Repair In Favor Of Homology Recombination

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

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

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

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

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

With the practical implementation of the CRISPR/Cas technology for targeted genome editing, it has become possible to carry out genetic engineering manipulations with eukaryotic genomes with high efficiency. One of the key stages of this technology is the targeted induction of site-specific DNA cleavages (breaks). The cell repairs these breaks via one of two pathways: nonhomologous end joining or homologous recombination. The choice of DNA repair pathway is determined by the architecture of the sites at the DNA break area formed as a result of terminal resection and depends on the phases of the cell cycle. Nonhomologous end joining is the main pathway for repair of double-stranded DNA breaks in mammalian cells. It involves a nonspecific ligation reaction, the accuracy of which depends on the structure of the ends of the break, and can result in various insertions or deletions in the target region of the genome. Integration of the desired sequence into the genome occurs along the path of homologous recombination, the implementation of which requires a matrix with homology regions on both sides of the double-strand break. The introduction of a genetic construct into a given location in the genome is an important, but currently complex and labor-intensive task. At the same time, for fundamental studies of gene function and the creation of animal models of human diseases, the choice of the repair pathway can be of fundamental importance. This review is an attempt to combine and structure all known information on approaches to increasing the efficiency of DNA repair involving homologous recombination. The article lists the most effective strategies to shift the balance towards homologous repair, such as the use of inhibitors of the non-homologous end joining mechanism, regulation of key factors of homologous recombination, control of the cell cycle, chromatin status, construction of templates for homologous recombination.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas technology, nucleases, repair systems, homologous recombination