

УДК 577.21

## МЕТОДЫ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ И ПРОГРАММЫ ДИЗАЙНА ГИДОВЫХ РНК

© 2024 г. Е. В. Михайлова<sup>а</sup>, \*, Б. Р. Кулуев<sup>а</sup>, Г. А. Геращенко<sup>а</sup>, Д. А. Чемерис<sup>а</sup>,  
Р. Р. Гарафутдинов<sup>а</sup>, А. Р. Кулуев<sup>а</sup>, Ан. Х. Баймиев<sup>а</sup>, Ал. Х. Баймиев<sup>а</sup>, А. В. Чемерис<sup>а</sup>

<sup>а</sup> *Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра  
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия*

\*e-mail: mikhele@list.ru

Поступила в редакцию 18.04.2023 г.

После доработки 22.05.2023 г.

Принята к публикации 09.06.2023 г.

Технология CRISPR/Cas активно применяется для редактирования геномов различных организмов уже 10 лет. Этот метод, позволяющий вносить двухцепочечный разрыв в нужный участок ДНК, произвел революцию в биоинженерии. Разработан также метод редактирования азотистых оснований (Base Editing, BE), в котором мутантная нуклеаза Cas (никаза), сшитая с дезаминазами и некоторыми другими ферментами, вносит в ДНК только одноцепочечные разрывы. С помощью этого метода можно производить замены, используя транзиции A→G и C→T и только один тип трансверсий C→G. Чуть более трех лет назад появился еще один вариант CRISPR/Cas – праймированное редактирование (прайм-редактирование, или Prime Editing). В отличие от BE, никаза здесь сшита с обратной транскриптазой, способной строить новую цепь по матрице *peg*РНК (*prime editing guide*) – удлиненной гидовой РНК с дополнительной последовательностью на 3'-конце. Прайм-редактирование позволяет вносить в эту последовательность нужные мутации, а также любые замены и индели азотистых оснований без использования специальной донорной ДНК. В представленном обзоре кратко рассмотрены варианты прайм-редактирования с акцентом на редактирование геномов растений. Определенное внимание уделено программам дизайна *peg*РНК, а также эффективности редактирования. Появление различных вариантов прайм-редактирования обусловлено потенциальными возможностями высокоточного внесения разноплановых изменений (с довольно низкой частотой нецелевых мутаций) в геномы различных организмов. Относительно невысокая эффективность прайм-редактирования заставляет исследователей предлагать все новые его варианты. Можно надеяться, что дальнейшее развитие технологии прайм-редактирования позволит настолько улучшить этот метод, что он займет достойное место в арсенале методов направленного воздействия на геномы любых организмов.

**Ключевые слова:** CRISPR, прайм-редактирование, *pCas9*, гидовые РНК, *peg*РНК, *ng*РНК, *web*-приложение

**DOI:** 10.31857/S0026898424010023, **EDN:** OHRIQW

### ВВЕДЕНИЕ

Метод CRISPR/Cas редактирования геномов – один из самых бурно развивающихся методов биоинженерии. Одна из важнейших особенностей этого метода состоит во внесении в целевой участок ДНК двухцепочечных разрывов, что повышает успешность процесса рекомбинации, но может приводить и к возник-

новению разных типов мутаций [1]. В настоящее время продолжается активное совершенствование системы для повышения ее точности и эффективности [2]. Важное значение для практического применения геномного редактирования имеет возможность внесения направленных мутаций, в том числе определенных нуклеотидных замен, инсерций и делеций. Сначала

Сокращения: PE – прайм-редактирование (Prime Editing); HA – гомологичное плечо (Homologous Arm); PAM – прилежащий к протоспейсеру мотив (Protospacer adjacent motif); RTT – матрица для обратной транскриптазы (Reverse Transcriptase Template); PBS – сайт связывания праймера (Primer Binding Site); РНП – рибонуклеопротеидный комплекс (ribonucleoprotein complex); *peg*РНК – гидовая РНК для прайм-редактирования (*prime editing guide RNA*); *sgRNA* – единая гидовая РНК (*single guide RNA*); *ngRNA* – единая РНК для внесения ников (*nicking sgRNA*).

был предложен метод редактирования (замены) отдельных азотистых оснований без внесения двухцепочечных разрывов, получивший название редактирование оснований (Base Editing, BE). Этот метод основан на использовании мутантной нуклеазы Cas (никазы), которая вносит одноцепочечный разрыв в ДНК. В зависимости от того, какой нуклеотид предполагается изменить, возможно редактирование азотистых оснований аденинового (ABE) или цитозинового (CBE) типа. К никазе nCas9 в этих случаях пришивают дополнительные ферменты – цитидиндезаминазу вместе с ингибитором урацил-ДНК-гликозилазы или аденозиндезаминазу. Применительно к растениям эта технология подробно рассмотрена в обзоре [3].

Довольно перспективным вариантом геномного CRISPR/Cas-редактирования является прайм-редактирование (Prime Editing, PE), разработанное в лаборатории D.R. Liu [4]. PE имеет преимущества перед редактированием отдельных нуклеотидов, поскольку способен прицельно изменить определенный нуклеотид, тогда как при редактировании оснований возможны ошибки, особенно если в целевом участке находятся несколько одинаковых азотистых оснований или гомополимерный тракт. К тому же с помощью BE можно вносить замены путем транзаций A↔G и C↔T и только одного типа трансверсий C→G, а PE позволяет осуществлять все 12 возможных замен азотистых оснований. Кроме того, с помощью PE можно заменить сразу несколько нуклеотидов подряд, а также внести инсерцию или делецию без использования специальной донорной ДНК. PE позволяет осуществлять нокаут гена более направленно и эффективно, максимально исключая непредсказуемые мутации, возникающие при обычном CRISPR/Cas-редактировании с двухцепочечными разрывами. В начале своего развития технология PE была малоэффективной отчасти из-за отсутствия двухцепочечных разрывов, однако ее удалось усовершенствовать, в том числе добавив еще одну Cas-никазу, расщепляющую дополнительно нередигированную цепь ДНК после репарации редактированной [4].

Несмотря на то что метод PE появился совсем недавно, разработано уже значительное число его модификаций, и нет никаких сомнений в дальнейшем его развитии, что отчасти объясняется необходимостью повышения эффективности. Этот недостаток PE отмечен, в том числе в статье, посвященной 10-летию CRISPR/Cas-технологии и ее перспективам [5]. В PE задействованы Cas9-никаза, обратная транскриптаза и удлиненная гидовая РНК, поэтому все варианты улучшения данного метода предполагают различные модификации этих трех основных компонентов как по отдельности, так и в комплексе.

Прайм-редактированию, в том числе растительных геномов, посвящены несколько обзоров [6–16]. Появились и подробные протоколы проведения такого редактирования [17], в том числе на растительных объектах [18], а также важные усовершенствования, которые необходимо рассмотреть дополнительно. Существует множество программ для дизайна гидовых РНК (sgРНК, single guide), используемых в классическом CRISPR/Cas-редактировании [19–21]. Однако для PE их пока не так много, что связано не только с новизной метода, но и с более сложной структурой *pegРНК*, которая содержит в себе донорную последовательность.

В данном обзоре основной акцент сделан на PE растительных геномов, первые результаты которого появились уже весной 2020 г. [22], и с тех пор их количество неуклонно растет [23–25]. При этом внимание уделено и различным модификациям PE, предложенным для животных, включая клетки человека, поскольку через некоторое время многие из них наверняка будут адаптированы и к геномам растений.

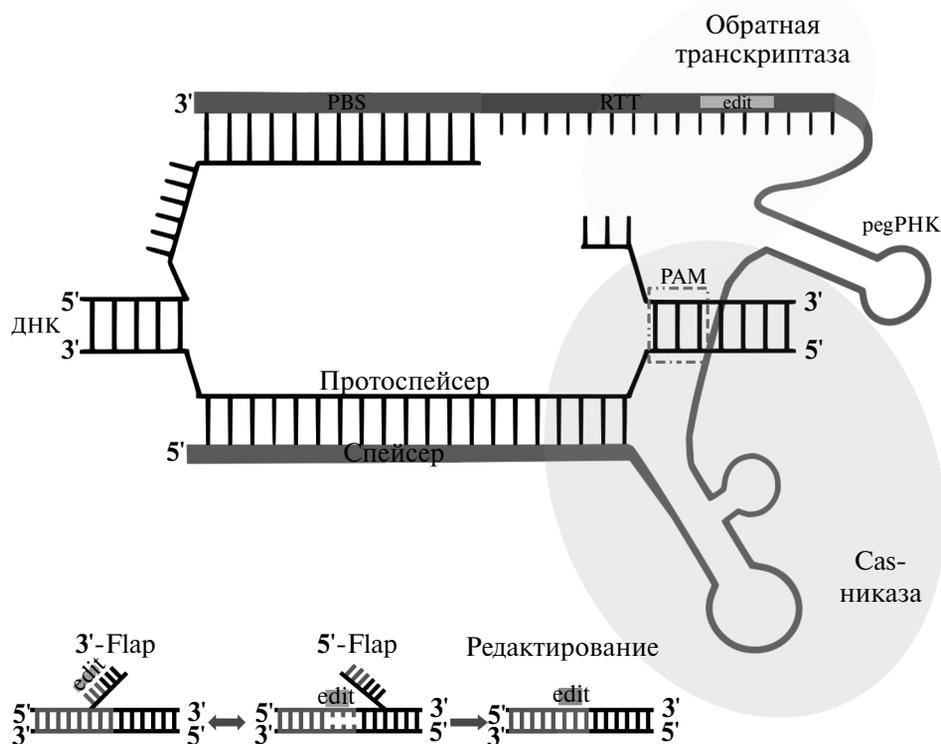
#### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ – PE1, PE2, PE3

В 2019 г. было опубликовано описание сразу нескольких вариантов нового метода PE [4]. Все эти варианты основаны на использовании химерного белка, состоящего из никазы nCas9 (H840A), сшитой с обратной транскриптазой вируса лейкоза мышей Молони (M-MLV). При этом оба белка несли сигналы ядерной локализации (Nuclear Localization Signal, NLS) вируса SV40. Никаза nCas9 – это производное нуклеазы Cas9 дикого типа, узнающей прилежащий к протоспейсеру мотив PAM (Protospacer Adjacent Motif), участок NGG бактерии *Streptococcus pyogenes*. У никазы nCas9 нарушен домен HNH, тогда как домен RuvC остается каталитически активным, что определяет формирование этим ферментом только одноцепочечного разрыва. Химерный белок позволяет применять видоизмененную (удлиненную) гидовую РНК, так называемую *pegРНК*, несущую на 3'-конце дополнительную последовательность, состоящую из нескольких зон, одна из которых – PBS (сайт связывания праймера, Primer Binding Site) – служит местом отжига праймера – фрагмента редактируемого участка ДНК со свободным 3'-концом, образующимся при никировании мишени nCas9 и расплетании цепей под действием этого фермента. Другая зона *pegРНК* – RTT (Reverse Transcriptase Template) – представляет собой матрицу с намеченными изменениями нуклеотидных последовательностей для ее копирования обратной транскриптазой. Кроме того, в состав RTT входит участок HA (Homologous Arm), го-

мологичный ДНК-мишени за пределами места непосредственного редактирования, служащий для облегчения интеграции внесенных изменений в исходную последовательность ДНК. В результате такого РЕ образуются два типа цепей ДНК с так называемыми лоскутами (Flap). При этом один из них (3'-Flap) несет отредактированную последовательность, тогда как 5'-Flap представляет собой неизмененную исходную ДНК. В результате репарационных процессов в самой клетке происходит восстановление цельных последовательностей ДНК как подвергнутых редактированию, так и исходных, что, к сожалению, заметно снижает эффективность РЕ. Однако существует мнение, что 5'-Flap более подвержен воздействию структурно-специфичных эндонуклеаз и 5'-экзонуклеаз самой клетки. Описанный процесс схематично изображен на рис. 1. Нужно еще заметить, что вносить изменения в участок PAM желательно таким образом, чтобы исключить его дальнейшее узнавание никазой Cas9 и тем самым остановить возможное продолжение (повторного) редактирования.

В варианте РЕ1, оказавшемся востребованным практически лишь на этапе отработки технологии РЕ *in vitro*, использовали обратную транскриптазу M-MLV дикого типа с неоптимальными характеристиками, поэтому для улучшения этого фермента [4] использовали мута-

генез и отобрали пентамутант (D200N/L603W/T330P/T306K/W313F), который сшили с никазой nCas9. Вариант РЕ на их основе, названный РЕ2, превзошел предшественника РЕ1 в 1.6–5.1 раза на разных мишенях. Помимо улучшения свойств фермента M-MLV, проведена и оптимизация *reg*РНК в части протяженности PBS и GC-состава дополнительной последовательности – от 40 до 60%. Усовершенствование РЕ продолжилось, в результате чего был разработан вариант РЕ3 с подвариантом РЕ3b. Принципиальное отличие РЕ3 и РЕ3b от РЕ2 и РЕ1 состояло в участии второй никазы nCas9, вносящей дополнительный одноцепочечный разрыв, что заметно повысило эффективность получения желаемых мутаций. В РЕ3 *ng*РНК (*nicking sg*РНК) вносила дополнительный разрыв в ту же цепь на расстоянии 14–116 нуклеотидов от разрыва, полученного с помощью *reg*РНК, что повысило эффективность редактирования в 1.5–4.2 раза по сравнению с РЕ2. Подвариант РЕ3b, в свою очередь, оказался эффективнее РЕ3 в 13 раз благодаря тому, что дополнительный разрыв находился на неотредактированной цепи. С этой целью *ng*РНК к Cas9-никазе нацеливали на уже отредактированную последовательность. В целом в ходе этой пионерной работы [4] получены 19 вставок с наибольшим размером 44 п.н., 23 делеции с максимальным размером 80 п.н., 119 точечных мутаций, включая 83 тран-



**Рис. 1.** Схематичное изображение процесса прайм-редактирования геномной ДНК. НА – гомологичное плечо; RTT – матрица для обратной транскриптазы; edit – участок, содержащий мутации, который планируется внести в геном; PBS – сайт связывания праймера (другие пояснения в тексте).

сверсии, а также еще ряд изменений в геномах человека и мыши (в культурах клеток) без образования двухцепочечных разрывов.

Варианты PE, а также эффективность внесения изменений сравнивали во многих публикациях, однако численные показатели в большей степени зависят от выбранных мест редактирования, а также от используемого оборудования, методов и квалификации экспериментатора.

### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ – PE4, PE5, PEmax

Под руководством D.R. Liu разработаны усовершенствованные варианты PE – PE4, PE5 и PEmax [26]. В ходе PE возникают участки с неполным спариванием, которые репарируются присущими клеткам механизмами, что снижает эффективность внесения целевых изменений. Одним из решений этой проблемы стало ингибирование данного процесса с помощью специфического доминантно-негативного белка MLH1dn человека, состоящего из 756 аминокислотных остатков. Ген этого белка транзientно экспрессировался с отдельной плазмиды. Таким образом, вариант PE2 превратился в PE4 (PE2+MLH1dn), а PE3 – в PE5 (PE3+MLH1dn), использование которых привело к повышению эффективности редактирования в несколько раз и одновременно уменьшило количество нежелательных инделей. Варианты PEmax (PE2|PE3|PE4|PE5)max получены в результате внесения двух дополнительных мутаций в SpCas9-никазу, а также добавления еще одного NLS (с-Мус) на С-конец химерного белка. Размещение NLS (с-Мус) на N-конец этого белка привело к получению варианта PE\* [27].

Помимо этого, в PEmax предлагалось использовать защищенную от действия РНКаз гидродную РНК, названную epegРНК (engineered). Это улучшение позволило провести 191 редактирование 20 локусов в семи типах клеток млекопитающих. Причем в одном из случаев достигнуто 72-кратное улучшение по сравнению с PE2 [26]. Изучая влияние клеточных систем репарации неспаренных азотистых оснований на PE, обнаружили, что эффективность внесения целевых изменений в нуклеотидные последовательности в культурах клеток с несколькими нарушенными генами репарации могла увеличиваться вплоть до 17 раз [28].

### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ С НАТИВНОЙ CAS-НУКЛЕАЗОЙ – PEA1-NUC, PE-CAS9, PEn

В описанных вариантах PE в качестве основного фермента использовали никазу nCas9, делающую одноцепочечные разрывы в ДНК.

Позже стали применять комплекс обратная транскриптаза дикого типа – нуклеаза Cas9 с полноценными функционально активными доменами RuvC и HNH, обеспечивающими формирование двухцепочечных разрывов. Этот подход получил название PEA1-Nuc (all-in-one prime editing nuclease) [29], особенностью которого следует считать расположение на одной плазмиде всех элементов, необходимых для PE, включая дополнительную ngРНК и селективный маркер (ген устойчивости к пуромицину или *GFP*). В этом исследовании эффективность редактирования некоторых культур клеток человека достигала 95%, а инъекции компонентов редактирования в зиготы мышей приводили к корректным модификациям в 100% случаев.

Подобный химерный комплекс, состоящий из нуклеазы Cas9 и обратной транскриптазы M-MLV (PE-Cas9), использовали также в качестве вспомогательного, поскольку на его основе провели PE с парными pegРНК (более подробно описано в разделе о парном PE) [30].

Также описаны две стратегии PE с полноценной нуклеазой [31]. Первая подразумевала гомологичную репарацию (Homology-Directed Repair, HDR), основанную на гомологичных участках в мишени и в РТТ. Вторая – негомологичную репарацию (Non-Homologous End Joining, NHEJ), приводящую к большему количеству случайных инделей. Метод с использованием полноценной нуклеазы как с HDR, так и с NHEJ получил название PEn (Prime Editor nuclease). Показано, что инсерция небольших фрагментов ДНК происходила с большей эффективностью, чем в варианте PE2 с теми же pegРНК. К тому же в данной работе используемые для редактирования клетки человека обрабатывали ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы, что также повысило специфичность редактирования. Позже вариант PEn был улучшен путем использования убиквитинированных белков, действующих как ингибиторы NHEJ, что заметно повысило эффективность редактирования [32]. Этот подход получил название uPEn (ubiquitin).

### МОДИФИКАЦИИ pegРНК

Поскольку длина pegРНК больше, чем у sgРНК, и часть ее молекулы при формировании РНП-комплексов не экранируется Cas-белком, то она в большей степени, чем обычная sgРНК, подвержена разрушению РНКазами, поэтому необходимо защищать свободный 3'-конец pegРНК. Например, обеспечить защиту pegРНК можно с помощью расположенного на 3'-конце стабильного структурированного мотива (псевдоузла). Такая pegРНК получила

обозначение *ereg* (engineered) [33]. В качестве псевдоузлов были выбраны аптамер *evorgeQ<sub>1</sub>*, имеющий относительную небольшую длину (42 нуклеотида), а также последовательность *mpknot* вируса M-MLV. Использование *mpknot* позволило не только обеспечить защиту от нуклеаз, но и могло способствовать повышенной активности обратной транскриптазы этого вируса в составе химерного белка при PE. Изучение влияния *ereg*РНК на эффективность PE генома риса показало, что вариант PPE3-*evorgeQ<sub>1</sub>* заметно улучшил введение замен нуклеотидов в целый ряд мишеней, тогда как вариант PPE3-*mpknot* проявил себя несколько хуже, но обеспечил преимущество перед обычной *reg*РНК в немодифицированной системе PPE3 [34].

Размещение на 3'-конце *reg*РНК довольно протяженного структурированного мотива (*xg*РНК), устойчивого к вирусной экзонуклеазе, привело к созданию *xg-reg*РНК и подхода *xg*PE. Использование *xg-reg*РНК в несколько раз увеличило эффективность получения коротких инделей [35]. Получена также *reg*РНК, названная MS2*reg*R [36], содержащая на 3'-конце довольно протяженный аптамер MS2 со стабильной вторичной структурой. Такая гидовая РНК способствовала значительному улучшению PE ряда локусов в протопластах риса. Недавно было показано, что использование транскрипционного фактора Р65 в дополнение к MS2 повысило эффективность систем PE3 и PE5 [37].

Внесение в участок RTT *reg*РНК единичных мутаций, не приводящих к аминокислотным заменам, заметно повысило эффективность нескольких вариантов PE. Новая форма гидовой РНК получила название *sreg*РНК, а варианты редактирования – *sPE3* и *sPE5* [38]. Описаны также варианты *aPE3* и *aPE5*, в которых использовали *areg*РНК (altered). Структура *areg*РНК отличалась тем, что в малой шпильке константной части за счет двух замен образовалась дополнительная GC-пара, упрочившая третичную структуру молекулы, что оказало положительное воздействие на эффективность PE [38].

Расположение на 3'-конце *reg*РНК G-квадруплексной структуры (17–18 нуклеотидов – G<sub>3</sub>N<sub>1-3</sub>G<sub>3</sub>N<sub>1-3</sub>G<sub>3</sub>N<sub>1-3</sub>G<sub>3</sub>) показало ее пригодность для защиты гидовой РНК. Этот вариант PE получил название G-PE [39].

Во избежание циклизации *reg*РНК за счет гомологии части спейсерной последовательности и PBS-участка предложено дополнительно удлинять *reg*РНК, добавляя на ее 3'-конец 20 нуклеотидов, отвечающих за связывание со специфической нуклеазой Csy4 [40]. Эта нуклеаза может выполнять и другие полезные функции. Так, для варианта PE3, в котором требуется так-

же обычная гидовая *sg*РНК, *reg*РНК и *ng*РНК экспрессировались полицистронно и расщеплялись РНКазой Csy4, ген которой располагался в конструкции, кодирующей химерный белок из никазы и обратной транскриптазы. При этом отмечена возможность трудностей с доставкой к месту редактирования необходимых компонентов, но в целом этот подход, названный *ePE* (enhanced), позволил несколько повысить эффективность PE [40].

Предложена также *reg*РНК, разделенная на две части – на обычную *ng*РНК и на так называемую *pet*РНК (prime editing template), представляющую собой объединение PBS- и RTT-участков *reg*РНК с аптамерной шпильчатой структурой. Причем *pet*РНК имеет как линейную, так и кольцевую форму, повышающую ее устойчивость к действию нуклеаз, генерируемую с помощью специальных рибозимов [41].

Нежелательными в *reg*РНК являются участки из четырех и более остатков урацила подряд, поскольку они приводят к терминации цепи, транскрибируемой РНК-полимеразой III, промотор которой обычно используют в генно-инженерных конструкциях при геномном редактировании методом CRISPR/Cas. Чтобы обойти это ограничение, предложено пользоваться промоторами РНК-полимеразы II [42]. Этот подход к PE получил название *pPE3*. Следует заметить, что если синтезировать *reg*РНК химическим путем, то проблем с подобными последовательностями не возникает.

#### ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ – *pPE2*, *ePE*, *PE-P3*, *ENPPE2*, *O-PE*

В первой работе по PE растений [22] была проведена оптимизация кодонов гена химерного фермента и использован убиквитиновый промотор *Ubi-1*. Это позволило провести редактирование геномов пшеницы и риса, причем в последнем случае удалось достичь регенерации 21.8% трансформантов. Разработан вариант *pPE2* для растений [43], в котором использовали оптимизированную для улучшенной экспрессии в растениях пентамутантную обратную транскриптазу M-MLV, шитую с никазой *nCas9* через 33-аминокислотный линкер. С помощью *pPE2*, доставляемого в каллус риса с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, удалось успешно отредактировать несколько последовательностей. В отдельных случаях эффективность редактирования превышала 30%, но при этом отмечалась сильная зависимость от выбранной мишени. В варианте *pPE3/pPE3b* в ту же генно-инженерную конструкцию под другим промотором был добавлен фрагмент ДНК, кодирующий дополнительную *ng*РНК. Однако в отличие от животных

клеток это не привело к повышению эффективности редактирования [43]. Сообщалось также о разработке нескольких версий прайм-редактирования растений риса, обозначенных PPE3/PPE3b-V01/V02, использующих оптимизацию кодонов для трансляции [25].

Вскоре был предложен способ РЕ ДНК риса с использованием инактивированного домена RTT M-MLV, ответственного за активность РНКазы H, способной разрушить цепь РНК в гетеродуплексах *peg*РНК с протоспейсером [44]. Метод получил название ePPE (engineered Plant Prime Editor), в ходе разработки которого в РНКазу H ввели мутацию D524N, а также удалили весь домен, отвечающий за данную активность этого фермента. Для соединения *nCas9* (H840A) никазы с измененной обратной транскриптазой M-MLV ( $\Delta$ RNase H) использовали линкер из 32 аминокислотных остатков вирусного белка нуклеокапсида с шаперонной активностью. Испытание этих конструкций в РЕ протопластов риса выявило превосходство последнего варианта и в целом преимущество ePPE над обычным РЕ (1.8–3.4 раза). При этом не отмечено увеличения частоты нецелевого редактирования.

Практически одновременно возможность снижения потенциального вреда домена РНКазы H при РЕ изучали на животных [45]. Удаление этого домена позволило уменьшить размер весьма крупной химеры белков *nCas9* и M-MLV, кодирующая часть в которых составляет около 6.35 т.п.н., что приводит к определенным проблемам при доставке генно-инженерной конструкции к месту редактирования, что, впрочем, не столь существенно при работе с растениями. Укорочение фермента M-MLV привело к созданию белков из 497, 474, 418 и 362 аминокислотных остатков, но лишь первый из них оказался приемлемым для РЕ, названного компактным — *compact* РЕ. Укороченный химерный ферментный комплекс, доставляемый с помощью аденовирусного вектора (максимальная емкость которого составляет 4.8 т.п.н.) в клетки печени мыши, использовали при РЕ в формате РЕ3. Этот комплекс позволяет получать как делеции, так и вставки.

Несколько позднее удалили фрагмент ДНК длиной 471 п.н., кодирующий домен РНКазы H, после чего обратная транскриптаза M-MLV была подвергнута дальнейшему укорочению. В результате кодирующая часть гена этого фермента уменьшилась на 621 п.н., что позволило успешно доставить его в клетки печени мыши с использованием аденовирусного вектора [46].

В первом и во всех последующих вариантах РЕ в химерном ферментном комплексе обрат-

ная транскриптаза M-MLV следовала за никазой *nCas9*, но возможно и иное их расположение [47]. При этом на примере редактирования трансгенных растений риса, протопластов кукурузы, а также клеток человека в отдельных случаях отмечено двух-трехкратное преимущество такой конструкции, содержащей участок RTT с множественными заменами, перед конструкциями с единичной заменой. Подобное редактирование названо Prime Editor-Plant version 3 (PE-P3).

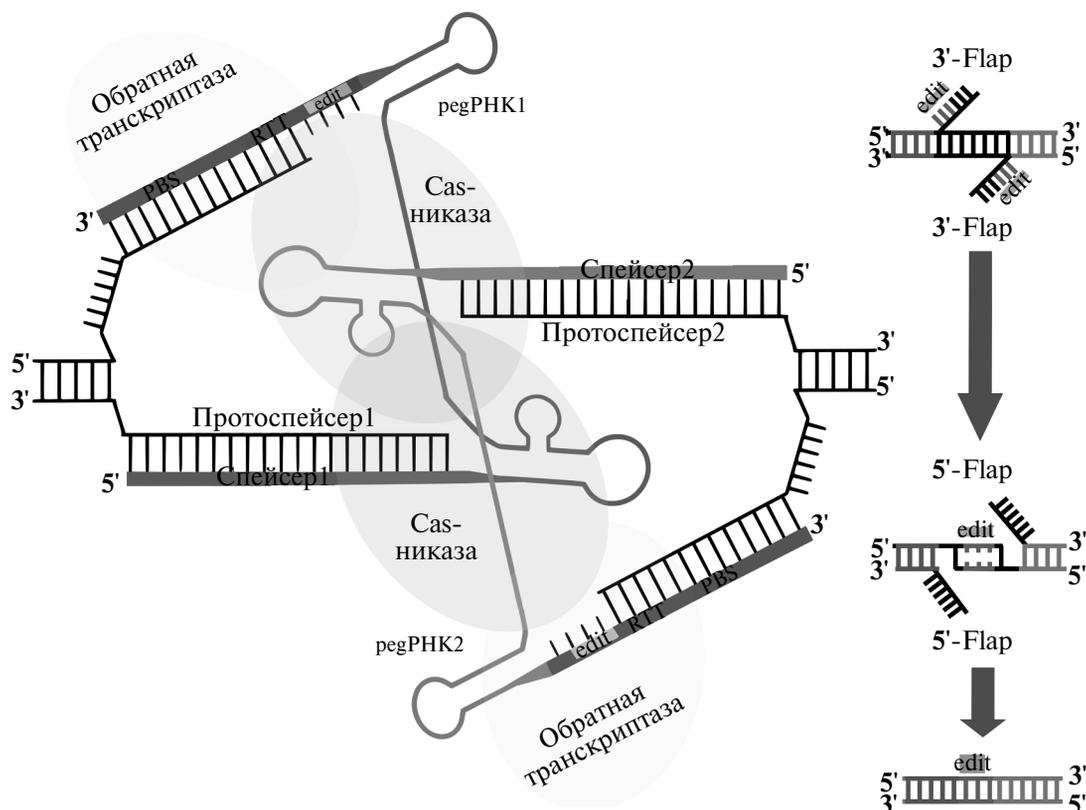
С использованием модифицированных гидовых РНК (*peg*РНК-*evopreQ<sub>1</sub>* и *peg*РНК-*mpknot*), а также композитного промотора создана целая группа векторов, обеспечивших 64 и 77% точных мутаций в отдельных локусах эмбрионного каллуса риса. Подход получил название *enPPE2* (enhanced plant) [48]. В другой работе при РЕ *A. thaliana* перебор различных промоторов и других компонентов привел к созданию варианта O-PE (optimized-prime editor) [49].

#### ПАРНОЕ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ — HOPE, PRIME-DEL, PEDAR, GRAND, WT-PE, TWINPE, BI-PE, PETI

Практически одновременно и независимо друг от друга несколько исследовательских групп начали разработку сшитых с обратной транскриптазой *Cas9*-никаз с соответствующими им парными *peg*РНК (рис. 2).

В парном РЕ одновременно используются две *peg*РНК, вносящие бреши в разные цепи ДНК. Это приводит к формированию каждой RTT 3'-Flap, комплементарных друг другу, что заметно увеличивает вероятность возникновения целевых мутаций. Благодаря такому подходу появляется возможность получить делеции и инсерции увеличенного размера.

Так, опубликованы данные о применении двух *nCas9*-никаз в методе, получившем название HOPE (homologous 3'-extension mediated prime editor) [50], особенностью которого можно считать нацеливание гидовых РНК на разные цепи ДНК, из-за чего они были названы S-*peg*РНК и AS-*peg*РНК (sense и antisense соответственно). К этим РНК подобраны участки S-PAM и AS-PAM соответственно. Также в RTT отсутствовали HA-последовательности, которые в этих двух *peg*РНК заменены последовательностями, комплементарными друг другу, что приводило к образованию двух 3'-Flap, готовых спариваться между собой. Это заметно повышало эффективность РЕ при получении делеций и инсерций по сравнению с вариантами РЕ2 и РЕ3.



**Рис. 2.** Схематичное изображение процесса парного прайм-редактирования геномной ДНК с использованием двух никаз. — гомологичное плечо; RTT — матрица для обратной транскриптазы; edit — участок последовательности, содержащий мутации, которые планируется внести в геном; PBS — сайт связывания праймера (другие пояснения в тексте).

Описано также парное PE, названное PRIME-Del [51] и ориентированное в первую очередь на получение протяженных делеций, одна из которых превышала 10 т.п.н. (10204 п.н.), и с эффективностью 1% локализовалась в локусе HPRT1 культуры клеток человека. Внесение делеции 546 п.н. в ген зеленого флуоресцентного белка, внедренного до этого в геномную ДНК человека, оказалось заметно более успешным. Помимо этих и ряда более коротких делеций, метод парного PE PRIME-Del позволил вносить в геном также небольшие инсерции (менее 100 п.н.).

Разработан схожий метод PEDAR (Deletion And Repair) — модификация PE-Cas9, особенность которого состоит в использовании полноценной нуклеазы Cas9 вместо никазы и второй *pegPHK* [30]. Отмечена более высокая эффективность PEDAR, но при этом увеличилось и количество нежелательных мутаций, что неудивительно, учитывая возникновение двухцепочечных разрывов. Возможности этого метода продемонстрированы с помощью делеций длиной 991 п.н. и более протяженных, примерно 8 и 10 т.п.н., а также инсерций 44 и 60 п.н.,

несущих сайты узнавания эндонуклеазы I-SceI и рекомбиназы Cre/LoxP соответственно.

Предложен еще один метод парного PE GRAND (genome editing by RTTs partially aligned to each other but nonhomologous to target sequences within duo *pegPHK*) [52]. В нем также отказались от HA-последовательностей, а для повышения эффективности внесения изменений в редактируемый геном в RTT интегрировали участки, комплементарные друг другу. Такой подход позволил вводить инсерции длиной 150 и 250 п.н. с эффективностью 63 и 28% соответственно. Внедрение вставок длиной свыше 400 п.н. происходило с низкой частотой, тем не менее удалось вставить около 1 т.п.н.

Описано использование нуклеазы Cas9 дикого типа вместе с парными *pegPHK*, а метод PE на ее основе получил название WT-PE (Wild Type) [53]. Существуют варианты этого метода — C1-WT-PE и C2-WT-PE (Class 1 и Class 2), отличающиеся, соответственно, наличием и отсутствием HA-последовательностей в RTT. Помимо относительно небольших делеций (несколько сотен пар нуклеотидов), с помощью данного метода удалось осуществить межхромом-

сомную транслокацию в клетках человека, размер которой составил около 16.8 млн.п.н.

В 2022 г. основоположники PE описали новый вариант, названный twinPE и ряд его модификаций, одна из которых не содержит НА-последовательности, но образующиеся при этом 3'-Flap у парных никак комплементарны друг другу, что способствует возникновению протяженных делеций. Например, из гена *DMD*, ответственного за возникновение миотонической дистрофии Дюшенна, было удалено 780 п.н. с эффективностью 28% при частоте случайных инделей 5.1%. Метод twinPE позволяет осуществлять не только делеции, но и вставки длиной около 100 п.н. В одной из вставок находились attB- и attP-сайты рекомбиназы *Vxb1*, с помощью которой в геномы затем удалось вставить фрагмент ДНК протяженностью 5.6 т.п.н. с эффективностью, варьирующей от 1.4 до 6.8%. С использованием этих сайтов и рекомбиназы в одностадийном эксперименте осуществили инверсию фрагмента ДНК длиной около 40 т.п.н. с частотой 2% [54].

В дальнейшем эта группа методов PE пополнилась вариантами Bi-PE 2 и 3 (Bi-direction) с парными *regP*НК [55]. В отличие от Bi-PE-2, при Bi-PE-3 в RTT дополнительно внедряли участок НА, длина которого менялась от 8 до 50 нуклеотидов. Однако особой разницы во влиянии длины НА на эффективность делеций не обнаружено. С помощью Bi-PE-3 из гена *HEK3* человека удалили 831 п.н., а также ввели инсерции длиной до 100 п.н., включая вставку парных сайтов системы *Cre/LoxP*, позволяющих затем внедрять протяженные фрагменты ДНК.

Парные *regP*НК использовали еще в одной работе с использованием PE2 [56]. Предложенный подход был назван PETI (Translocation and Inversion), с его помощью наряду с модельным экспериментом, в котором беспромоторный ген зеленого флуоресцентного белка поместили под действующий промотор, в клетках человека получили транслокации и инверсии протяженных участков ряда генов, связанных с онкологическими заболеваниями.

Интересно, что парные *regP*НК, разрезающие противоположные цепи ДНК, использовали для повышения эффективности PE и назвали этот подход Dual *regRNA* strategy [57]. Это исследование заслуживает особого внимания, поскольку его объектом служили растения риса, хотя обычно наука о растениях несколько “отстает” в вопросах применения передовых технологий. Однако в этой работе редактирование генома риса с помощью парных *regP*НК было выполнено с целью введения точечных мутаций, а также получения коротких одно-, двух-

нуклеотидных инделей. При этом эффективность редактирования возросла в 2.9–17.4 раза по сравнению с обычным PE2. При этом соотношение побочных продуктов редактирования было не больше, чем при использовании одной *regP*НК. Эта работа примечательна еще тем, что обстоятельно определяли оптимальную температуру плавления PBS, которая оказалась равной 30°C. Дизайн *regP*НК разрабатывали с использованием специализированной программы *PlantPegDesigner*, которая будет подробно рассмотрена в соответствующем разделе. Следует отметить, что авторы [57] не ставили задачи индуцировать инсерции или делеции протяженных фрагментов ДНК, как в других работах по парному PE.

В целом описанные варианты PE с использованием парных *regP*НК имеют определенные преимущества для создания инделей. В частности, удастся получить более протяженные индели, чем, например, с помощью вариантов PE2 и PE3. Во многом это возможно благодаря двум одноцепочечным разрывам на противоположных цепях ДНК (при использовании Cas-никаз), которые до определенной степени можно приравнять к двухцепочечным разрывам, в значительной степени способствующим процессам рекомбинации.

## ПРОЧИЕ ВАРИАНТЫ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЯ

Используемая в PE никаза *nCas9* узнает PAM-участок NGG, что может ограничивать ее применение на AT-богатых последовательностях. При этом у разных видов бактерий найдено множество Cas-нуклеаз, распознающих другие виды PAM. Эти никазы весьма широко используются в классических вариантах CRISPR/Cas-редактирования. Помимо природных Cas-нуклеаз созданы их генно-инженерные мутантные формы, узнающие еще более широкий спектр PAM. Однако необходимо признать, что оптимально иметь фермент, не зависящий от PAM-участка, который нацеливается на нужное место редактирования лишь протоспейсерной последовательностью. И работы в этом направлении ведутся [58]. Такими ферментами, почти нетребовательными к наличию PAM-участков, можно считать мутантные Cas-нуклеазы SpG и SpRY, где R = A или G, а Y = C или T. При конструировании SpG-нуклеазы произведено шесть замен аминокислот в Cas9, а для получения второй нуклеазы к этим шести заменам добавили еще пять. Разумеется, не могло не возникнуть идеи воспользоваться ферментами, подобными Cas9, для PE. В одной из работ [59] в данные нуклеазы ввели мутации N840A, чтобы превратить их в никазы. Затем

уже на их основе были разработаны варианты PE, названные PE2-VQR, PE2-VRQR (с PAM участками NGA), PE2-VRER (PAM – NGCG), PE2-NG, PE2-SpG, PE2-SpRY, позволившие получить более 50 мутаций в клетках HEK293T человека. Недавно для PE успешно использовали нуклеазу FnCas9 из бактерии *Francisella novicida*, узнающую традиционную PAM-последовательность NGG – в нуклеазу FnCas9 внесли мутацию H969A и получили из нее никазу [60]. Ранее никазу nSaCas9 (N580A) применили в PE ряда генов риса, однако надежд на улучшение процесса внесения изменений она не оправдала [61].

Что касается альтернативы обратной транскриптазе M-MLV, то сообщается об испытании девяти подобных ретровирусных ферментов, из которых лишь фермент XMRV (xenotropic murine-leukemia-virus-related virus) показал некоторую пригодность для PE, приблизительно в 3 раза уступив пентамутанту M-MLV [46]. Однако ниже будет рассмотрено более кардинальное решение применения в PE обратной транскриптазы как индивидуального фермента, не сшитого с Cas.

Так, стало известно о возможности использования в PE несшитых никазы nCas9 и обратной транскриптазы M-MLV, что позволило задействовать два аденовирусных вектора, один из которых нес ген никазы nCas9, а второй – ген обратной транскриптазы вместе с участками, кодирующими regPНК и ngPНК [41]. Этот подход получил название разделенного PE (split-PE, sPE). Гидродинамическая инъекция этих компонентов в клетки печени мышей позволила получить намеченные мутации с сопоставимым числом нецелевых мутаций, характерным для варианта PE3 [41].

Описано разделение никазы nCas9 и обратной транскриптазы M-MLV, причем обратная транскриптаза была укорочена почти на треть и потеряла PНКазную (PНКазы H) активность [62]. Эффективность PE клеток человека с помощью PE2 и split-PE2 была сопоставимой.

Еще до начала использования несшитых ферментов nCas9 и M-MLV в ряде работ применили временное разделение этих ферментов с их последующим восстановлением с помощью интеиновых систем. Такие манипуляции были направлены главным образом на облегчение доставки к месту редактирования необходимых компонентов, в том числе с помощью аденовирусного вектора, емкость которого ограничена 4.8 т.п.н., тогда как химерный ферментативный комплекс имеет заметно больший размер. Так, на основе интеина *Rhodothermus marinus* сконструированы четыре варианта разделения этих

ферментов, один из которых оказался наиболее удачным. С его помощью проведено PE путем плазмидной трансфекции клеток человека методом электропорации и инъекции этих клеток в сетчатку глаза мышей *in vivo* [63]. Метод называли dual-AAV split-PE. Предложен также вариант PE с временным разделением химерного фермента и его дальнейшим восстановлением, но с использованием интеиновой системы *Nostoc punctiforme* [27]. Несколько позже, также с помощью интеиновой системы *N. punctiforme*, nCas9 и M-MLV разделили, затем доставили к месту редактирования и повторно объединили. У M-MLV при этом был удален домен размером около 0.6 т.п.н., кодирующий PНКазу H, что несколько уменьшило размер обратной транскриптазы. Химерный фермент, названный PE2<sup>ΔRnH</sup> [64], успешно использовали для PE генома клеток печени мыши путем инъекции плазмидных конструкций в вену в условиях *in vivo*.

Улучшить PE можно, встраивая ДНК-связывающий домен через линкеры из 16 и 33 аминокислот между никазой Cas9 и обратной транскриптазой M-MLV [65]. Этот подход назван hyperPE2, сокращенно huPE2. Однако при PE генома риса этот подход, названный phyPE2 (plant), неожиданно оказался менее эффективным, чем стандартный PE2.

Улучшить эффективность PE попытались, добавив на N-конец химерного белка nCas9/M-MLV пептид из 85 аминокислотных остатков [66]. С этой целью создана библиотека из 12000 пептидов, из которых выбрали наиболее перспективные, способствующие повышению эффективности трансляции в клетке. В соответствии с обозначением одного из двух наиболее подходящих пептидов такой вариант PE назван IN-PE2.

Обнаружено, что некоторые химические ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACi – Histone Deacetylase inhibitors) повышают эффективность получения инделей методом PE, но не однонуклеотидных замен [67]. Показано [68], что применение хроматин-модулирующих пептидов (CMP – Chromatin-modulating peptides) улучшает доступность места редактирования, что легло в основу подходов CMP-PE-V1 и CMP-PE-V2, отличающихся локализацией нуклеосомных доменов HN1 и H1G в составе слитого химерного белка. В этой же работе предпринята попытка сделать хроматин более доступным, связав с участком ДНК недалеко от места PE так называемую dsPНК (dead), не приводящую к возникновению разрывов цепей из-за ее особой структуры, как это показано ранее [69]. Здесь можно также заметить, что подобного эффекта большей доступности

ДНК удалось добиться с помощью каталитически неактивной нуклеазы dCas9, расплетающей цепи ДНК неподалеку от целевого сайта при условии использования для него другой нуклеазы Cas, не конкурирующей за dsgРНК [70]. Теоретически это можно применить и для РЕ, причем со значительным эффектом.

Для РЕ гена супероксиддисмутазы в культуре клеток человека предложено использовать транспозонную систему piggyBac, позволяющую удалять сделавшую свое дело конструкцию. Такой подход получил название РВ-РЕ (piggyBac) [71]. Можно отметить, что этот транспозон уже использовали в CRISPR/Cas9-редактировании генома риса для доставки трансгенов [72]. Можно предположить, что РВ-РЕ найдет применение в РЕ растительных объектов.

Практически все вышеописанные методы предполагали доставку компонентов к местам редактирования с помощью генно-инженерных конструкций как встраиваемых в геномы редактируемых объектов, так и экспрессирующихся транзитивно. Иной подход заключается в доставке тем или иным способом в ядро клетки готовых РНП, формируемых *in vitro* из гидовых РНК и подходящих Cas-нуклеаз. Подход имеет определенные преимущества, чему ранее мы уделили значительное внимание при рассмотрении классического CRISPR/Cas-редактирования растительных объектов [73, 74]. Что касается прайм-редактирования с использованием готовых РНП, то такие варианты для растений пока не описаны, имеются лишь единичные публикации, в которых сообщается о применении этой технологии. Так, в эксперименте на эмбрионах полосатого данио *Danio rerio* сформированный и доставленный к месту РЕ РНП, содержащий в составе химерного фермента обратную транскриптазу, позволил успешно индуцировать делеции (5 и 10 п.н.) и инсерции (от 3 до 18 п.н.) с эффективностью более 33 и 18% соответственно [75]. В этой же статье при работе с культурой клеток человека G заменили на C, получили инсерцию 3 п.н. и делецию 5 п.н. с эффективностью около 6, 15 и 21% соответственно. При этом отмечено возникновение нецелевых мутаций при использовании вариантов РЕ2 и РЕ3. Необходимо отметить, что в этих экспериментах 5'- и 3'-концы regРНК и ngРНК несли стабилизирующие модификации. Еще в одной работе [41], описывающей РЕ в варианте sРЕ с отдельными никазой nCas9 и обратной транскриптазой М-MLV, компоненты редактирования (РНП или соответствующих мРНК) в клетки человека доставляли с помощью электропорации. Были опробованы несколько вариантов: использовали мРНК никазы nCas9 и обратной транскриптазы М-MLV (sРЕ), а также единую мРНК химерного фермента (РЕ2) вместе с regРНК и ngРНК.

В случае доставки РНП обратная транскриптаза не входила в его состав, а котрансфицировалась в виде отдельного белка, несущего NLS данного фермента. При этом эффективность внесения целевых мутаций этими способами различалась незначительно при сопоставимом проценте нецелевых инделей.

Из-за относительно низкой эффективности РЕ в целом этот метод, несмотря на его потенциал, пока не имеет широкого распространения. При этом стоит задача повысить успешность редактирования, в том числе путем обогащения пула клеток, в которых произошло целевое РЕ. Так, предложено использовать редактирование модельного гена, которое будет приводить к изменению фенотипа. В такой ген намеренно вносятся мутации, которые будут исправлены при успешном редактировании. В качестве репортерного гена использовали расположенный на плазмиде транзитивно экспрессирующийся дефектный *GFP*, который восстанавливали введением обратных мутаций с помощью РЕ [76]. Клетки, в которых ожидалась более высокая вероятность целевого РЕ, отбирали по интенсивности флуоресценции *GFP*. Авторы назвали свой метод PEAR (Prime Editor Activity Reporter). Несколько отличающийся способ обогащения отредактированных последовательностей получил название fluoPEER (fluorescent Prime Editing Enrichment Reporter) [77]. В способе fluoPEER между генами двух флуоресцентных белков *GFP* и *mCherry* на плазмиде располагался фрагмент геномной ДНК длиной 45–100 п.н., который требовалось отредактировать. При успешном редактировании возникало свечение второго белка *mCherry*, что свидетельствовало о нужном изменении клонированного участка, а значит, и в самой геномной ДНК возникла, вероятно, аналогичная целевая мутация. Сортировка клеток с помощью проточной цитофлуориметрии выявила трехкратное обогащение отредактированными клетками. Суррогатным модельным маркером служил ген  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, обеспечивающей устойчивость к сердечному гликозиду убаину [78]. Редактирование подобных плазмид позволяет достаточно быстро оценить эффективность новых модификаций системы РЕ-CRISPR и перспективы их использования в редактировании геномной ДНК.

В некоторых работах метод РЕ использовали с иными целями, нежели улучшение характеристик организма. Так, с помощью РЕ в геном культуры клеток человека вставляли короткие участки ДНК с случайными последовательностями [79]. С этой целью конструировали regРНК, несущие PBS длиной 13 нуклеотидов, далее следовал участок RTT с НА-последовательностью из 10 нуклеотидов, между которыми помещалась случайная последовательность из 5 (10)

нуклеотидов, образующая множество комбинаций перестановок азотистых оснований ( $4^5$  или  $4^{10}$ ), которые в итоге внедрялись в разные места генома. Этот метод, получивший название Random-PE, может использоваться в разных целях, в частности для баркодирования.

Предложен также метод регистрации событий, последовательно происходящих в геноме, получивший название DNA Typewriter. Он заключается в записи на некой условной ленте ДНК (DNA Tape) тандемно расположенных спейсеров, из которых активен только первый, а остальные укорочены, но активируются поочередно после внедрения предыдущего, что приводит к возникновению PAM-участка NGG [80].

### КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЯ

Существует большое количество программ дизайна гидовых РНК для разных вариантов геномного редактирования CRISPR/Cas [19–21], тогда как для регРНК таких программ значительно меньше. Их описание следует начать с web-приложения PE-Designer (<http://www.rgenome.net/pe-designer/>) [81], которое входит в большой пакет прикладных программ CRISPR GEN Tools (<http://www.rgenome.net/>). Для выбора подходящих мест редактирования в референсной последовательности длиной до 1000 п.н. предлагается выбрать тип никазы, включая мутантные формы из довольно большого перечня (SpCas9, VREr SpCas9, VQR SpCas9, SpRY Cas9, NG-Cas9 или xCas9 3.7, iSpyMac Cas9, SpRY Cas9, SpRY Cas9), которые различаются узнаваемыми PAM-участками. Необходимо ввести в соответствующее окно ожидаемую после PE последовательность, также длиной до 1000 п.н. Требуется выбрать геном из большого списка, подразделенного на следующие группы – Vertebrates, Non-reference Vertebrates, Insects, Plants, Others. Для выбора доступно более 200 видов растений, приведенных не в алфавитном порядке. Впрочем, есть возможность добавить отсутствующий геном, отправив соответствующий запрос разработчикам программы. После этого остается указать длину спейсерной последовательности в диапазоне от 5 до 25 нуклеотидов и запустить процесс поиска. На web-странице PE-Designer со ссылкой на публикацию Anzalone и соавт. [4] присутствует напоминание обо всех возможных 12 транзициях и трансверсиях, а также инсерциях и делециях длиной до 44 и 80 нуклеотидов, которые могут образоваться в результате PE. По завершении поиска программа выдает таблицу с перечнем предлагаемых вариантов. При выборе одного из вариантов появляется фрагмент нуклеотидной

последовательности целевого участка с рекомендуемыми регРНК, выделенными красным цветом, тогда как возможные нгРНК отображаются синим цветом. Сопровождает эту программу еще одна – PE-Analyzer, служащая для анализа данных NGS на предмет выявления нецелевых мутаций, но о ней речь пойдет дальше.

Иной подход к подбору регРНК предложен в web-приложении<sup>1</sup> pegFinder (<http://pegfinder.sidichenlab.org/>) [82]. Программа может работать с последовательностями длиной до 500 нуклеотидов, из которых исходная ДНК занимает лишь 300, поскольку рекомендуется по краям целевого участка включать по 100 фланкирующих нуклеотидов. Аналогичные рекомендации действуют и при вводе желаемого результата редактирования. Далее предлагается выбрать, будет ли это вариант PE3/PE3b, и указать места расположения нгРНК на расстоянии 40–150 нуклеотидов от предполагаемого участка редактирования. Затем необходимо выбрать основной фермент из трех возможных – Cas9-NGG, Cas9-NG, Cas9-SpRY. Разрешается опционально в отдельное окно вводить гидовую РНК, заранее подобранную с помощью подходящих программ дизайна [19–21]. Имеются у pegFinder и другие опции. В итоге генерируется таблица с подобранными регРНК и sgРНК, а также соответствующими олигонуклеотидами для клонирования.

Еще одна программа дизайна регРНК – PrimeDesign [83]. Эту программу можно как установить на компьютер пользователя (<https://github.com/pinellolab/PrimeDesign>), так и использовать в качестве web-приложения (<https://drugthatgene.pinellolab.partners.org/>). Сначала требуется ввести исходную последовательность с одновременным указанием планируемых изменений в виде замен нуклеотидов, инсерций и делеций в любой комбинации. Далее указывают длины участков PBS и RTT и расстояние до мест расщепления, вызываемых регРНК и нгРНК (до 100 нуклеотидов между ними). Имеется еще ряд параметров, которые может задавать экспериментатор. После завершения подбора формируется таблица с рекомендуемыми последовательностями гидовых РНК и информацией о том, сохраняется ли после редактирования PAM-участок. На сайте представлена короткая версия, демонстрирующая весь ход дизайна.

Web-ресурс pegIT (<https://pegit.giehmlab.dk/>) [84] для дизайна регРНК требует сначала выбрать тот или иной геном из небольшого списка, в котором есть три растения (рис, мягкая пше-

<sup>1</sup> pegFinder также выложена на сайте <https://github.com/rdchow/pegfinder>

ница и кукуруза), после чего в другом окне появляется возможность указать название гена или его идентификационный номер. Затем можно выбрать подходящую нишу из перечня (SpCas9, CjCas9, SaCas9, SaCas9KKH, SpCas9NG). Предлагается еще несколько доступных опций для дизайна *peg*РНК, по результатам которого выдается файл с нуклеотидной последовательностью и указанием ожидаемых изменений.

Довольно широкие возможности дизайна *peg*РНК вместе с *ng*РНК предоставляет программа PnB Designer, доступная как для установки на компьютер пользователя (<https://github.com/SebastianSiegner/PnB-Designer>), так и в виде web-приложения (<https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/>) [85]. PnB Designer позволяет выбрать геном из нескольких представленных на сайте (человек, мышь, *D. rerio*, рис, *A. thaliana*, виноград) или использовать вариант 'None of the above'. Далее требуется выбрать тип поиска (для одного образца или для множественных), после чего ввести редактируемую последовательность(и) или геномные координаты и указать тип намечаемых изменений (замена, инсерция, делеция). Необходимо указать длины участков PBS и RTT. Поиск подходящих гидовых РНК ведется по обоим цепям ДНК. При выдаче результатов программа рассчитывает в том числе значение '*peg*RNA score', показывающее степень надежности и эффективности внесения желаемых мутаций. Однако разработчики указывают, что относиться к этому показателю нужно с осторожностью.

Единственная программа, ориентированная непосредственно на дизайн *peg*РНК для РЕ растительных объектов, — PlantPegDesigner version 1.0, реализованная в виде web-ресурса (<http://www.plantgenomeediting.net/>), а также доступная для установки на компьютер пользователя (<https://github.com/JinShuai001/PlantPegDesigner>) [57]. Для дизайна *peg*РНК необходимо ввести через буфер обмена нуклеотидную последовательность, в которой намечаемые изменения указывают в круглых скобках по типу (G/A), (-/T), (CGAT/-) для замен, инсерций и делеций соответственно. Причем по краям целевой последовательности рекомендуется добавлять по 50 фланкирующих нуклеотидов. Также можно загрузить fasta-файл с нужной последовательностью. Далее необходимо определиться с РАМ-участком (NGG, NG или другой вариант), выбрать длину спейсера и его GC-состав, а также характеристики PBS и RTT. Главное отличие PlantPegDesigner от подобных программ состоит в возможности выбора одиночной или парных *peg*РНК. В заключение необходимо выбрать подходящий вектор из предназначенных для агробактериальной трансформации, или для трансформации протопластов, или для

бомбардировки золотыми частицами. В зависимости от выбранного вектора программой будут сгенерированы олигонуклеотидные последовательности для клонирования. При этом PlantPegDesigner позволяет вести одновременно дизайн до 50 *peg*РНК, а по согласованию с разработчиками — даже большего количества. Программа выдает результат в виде таблицы, содержащей информацию о подобранном спейсере, PBS, RTT, включая их GC-состав, температуры, рекомендуемые для РЕ, а также последовательности для клонирования.

Существует еще целый ряд программ, позволяющих осуществлять дизайн *peg*РНК, характеризующихся меньшим функционалом или не имеющих web-приложений. Среди них Easy-Prime (<http://easy-prime.cc/>) [86], DeepPE (<http://deepcrispr.info/DeepPE/>), PETAL (<https://gt-scan.csiro.au/petal/submit>) [29], Prime Editing Design Tool (<https://primeedit.nygenome.org/>), Prime-Del (<https://primedel.uc.r.appspot.com/>), multicrispr [87], PINE-CONE (<https://github.com/xiaowanglab/PINE-CONE>) [88], PRIDICT (<https://pridict.it>) [89].

Поскольку *peg*РНК несет на 3'-конце дополнительный участок, который не должен формировать нежелательную вторичную структуру с остальной частью РНК, необходимо проводить дополнительный скрининг подобранных PBS и RTT. Для этого разработана компьютерная программа *peg*LIT (<https://peglit.liugroup.us/>), с помощью которой можно подбирать подходящие дополнительные последовательности, исключающие их интерференцию с *peg*РНК [33].

Крайне важно после завершения редактирования убедиться в том, что целевые изменения внесены, а нецелевые не возникли. Для этого применяется полногеномное секвенирование вместе со специальными программами, одна из которых упомянута выше — PE-Analyzer (<http://www.rgenome.net/pe-analyzer/>) [81]. Web-приложение этой программы позволяет вводить данные секвенирования, выбрав его тип, в виде файлов fastq или gzipped fastq, референсную последовательность, последовательность спейсера *peg*РНК, информацию о намечавшихся мутациях и ряд других параметров. Результаты классифицируются как исходные последовательности, замены, инсерции и делеции и выдаются в виде таблицы. С этой целью создана также программа TAPE-seq (TAgmentation of Prime Editor sequencing) [90], доступная для установки на компьютер пользователя с ресурса github ([https://github.com/PhyzenInc/TAPE-seq\\_flanking\\_depth](https://github.com/PhyzenInc/TAPE-seq_flanking_depth)).

## ПРАЙМ-РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

При описании различных вариантов РЕ выше упомянуты отдельные результаты, полученные при редактировании геномов растений, и необходимо их некоторое обобщение. Однако с учетом обзорной статьи [8] по РЕ геномов четырех видов растений (рис, пшеница, кукуруза, томат), в которой проведен подробный анализ используемых на тот момент технологий трансформации, типа мутаций, эффективности их получения и сопутствующей информации, стоит остановиться лишь на самых последних данных. В большинстве работ по РЕ генов растений объектом служит рис, эта тенденция сохраняется, но при этом расширяется спектр мишеней для редактирования. Так, в одной работе [91] мишенью в геноме риса был ген *waxy*, ответственный за биосинтез амилозы. В этой работе, ставящей целью определить преимущества того или иного варианта РЕ, лучшими оказались РЕ2 и РЕ3: при использовании на одинаковых мишенях вариант РЕ2 заметно превосходил РЕ3 — до 67% точного редактирования против 17%. Впрочем, подобный эффект характерен и для многих ранее проведенных экспериментов.

С применением методов РЕ3max и РЕ5max и соответствующих *regPНК* в ген *EPSPS* (5-енолпирувоилшикимат-3-фосфатсинтаза) риса (протопласты) были внесены мутации T173I, A174V и R177S, обеспечивающие устойчивость растений к глифосату [92], а также получены растения кукурузы с устойчивостью к глифосату, а также к другим гербицидам, обусловленной мутациями в генах ацетолактатсинтазы (*ALS*) и ацетил-СоА-карбоксилазы (*ACCase*) [93]. С помощью варианта *ePPE* РЕ созданы мутантные растения риса, устойчивые к гербицидам (сульфонилмочевине и имидазолину) [44]. Кроме того, в этой же работе в растениях риса с трансгеном *GFP* заменили кодон *SAC* (*His*) на *TAC* (*Tyr*) в положении 66, что привело к конверсии зеленого белка *GFP* в голубой (*BFP*) [44].

С помощью варианта *PPE* РЕ внесли изменения в геномы табака *Nicotiana benthamiana*, риса и *A. thaliana*. Мишени выбирали с таким расчетом, чтобы последствия подобного редактирования были видны невооруженным глазом [94]. Еще большее число видов растений — рис, нут, арахис и коровий горох — использовали в модельных экспериментах по восстановлению мутантного *GFP* в протопластах с помощью парного РЕ, что, по-видимому, служит шагом к применению этого метода в селекционных программах для бобовых [95].

При РЕ такого модельного объекта, как мох *Physcomitrium patens* [96], в качестве мишени

был выбран ген аденин-фосфорибозилтрансферазы, превращающей аденин в аденозинмонофосфат (*AMP*) и способный конвертировать 2-фтораденин в токсичное для мха соединение 2-фтор-*AMP*. Токсическое действие этого гена можно предотвратить введением терминирующего кодона *TGA* вместо кодона в положении 100 (*AGG*). В этой же работе модификация гена ацетолактатсинтазы придавала картофелю устойчивость к гербициду хлорсульфону. Причем в обоих случаях вариант РЕ2 оказался лучше, чем РЕ3, что в целом можно считать характерным для растительных объектов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пожалуй, ни для одного метода молекулярной биологии, кроме разве что ПЦР, за столь короткое время не предложено такого же многообразия вариаций, как для РЕ. Одно перечисление аббревиатур названий модификаций метода с расшифровкой может занять несколько строк. Главной причиной этому служит потенциальная возможность высокоточного внесения разноплановых изменений в геномы различных организмов, включая растения. Несомненным преимуществом РЕ является низкая частота нецелевых мутаций, к сожалению, частично нивелируемая невысокой эффективностью данного процесса, что заставляет совершенствовать метод.

Эффективность РЕ во многом зависит как от редактируемого организма, так и от выбранной мишени. Хотя *regPНК* можно конструировать с помощью компьютерных программ, рассчитанных на дизайн *sgPНК*, важное значение имеют специализированные *web-ресурсы* и программы РЕ. Они предназначены для целенаправленного подбора *regPНК* с учетом данных о полных геномах многих видов растений, животных, человека и других организмов и позволяют улучшить процесс редактирования, максимально обходясь без нецелевых мутаций. *RegPНК* имеет такое важное отличие от *sgPНК*, как удлиненный 3'-конец, не защищенный молекулой *Cas9*-никазы (нуклеазы), поэтому целый ряд работ направлен на то, чтобы исключить разрушение этого конца *regPНК*. *PНК*азы с использованием дополнительных последовательностей и мутаций в константных частях *regPНК*, упрочняющих вторичную структуру этих молекул, вплоть до их циклизации и превращения в так называемую *petPНК*.

Серьезным недостатком РЕ является возможное восстановление отредактированных последовательностей. Чтобы снизить эту вероятность, предложено использовать белки, ингибирующие процессы репарации в живой клетке.

Эффективность введения целевых мутаций была повышена благодаря использованию дополнительных Cas9-никаз, делающих другие разрывы на той же цепи, в том числе в области уже отредактированной последовательности. Также практиковалось введение двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных действием полноценных Cas9-нуклеаз с двумя функциональными доменами.

Цели повышения эффективности внесения целевых мутаций служит также парное PE, для которого предложено несколько отличающихся вариантов. Для увеличения количества доступных протоспейсеров помимо классической SpCas9-никазы предложено использовать как ее мутанты, так и аналоги из других микроорганизмов, узнающие иные PAM-участки.

Что касается еще одного компонента PE, а именно обратной транскриптазы M-MLV, то в большинстве работ используется пентамутант этого фермента. В него вводили и дополнительные мутации, в том числе с целью оптимизации кодонов для лучшей трансляции в конкретных организмах. Помимо этого, из M-MLV удаляли активность РНКазы Н, что, с одной стороны, позволяло не опасаться разрушения цепей РНК в гетеродуплексах, а с другой — обеспечивало заметное укорочение данного белка, что облегчало его доставку к месту редактирования. Наконец, описано использование отдельной доставки Cas9-никазы и обратной транскриптазы M-MLV и их соединения в клетке в единое целое с помощью интеино-вых систем, что заметно упрощало их доставку. В PE используются также РНП-комплексы и отдельные молекулы мРНК.

Для лучшей локализации в клеточном ядре Cas9-никазы и обратной транскриптазы предложено использовать дополнительные NLS.

Можно надеяться, что дальнейшее развитие технологий PE, в том числе направленных на получение целевых инделей увеличенного размера, позволит настолько улучшить метод, что со временем он займет достойное место в арсенале методов направленного воздействия на геномы любых организмов и окажет положительное влияние на такие сферы человеческой деятельности, как аграрный сектор, промышленные биотехнологии, где те или иные живые организмы играют ключевую роль. При этом нельзя не отметить, что помимо PE и классического редактирования с одной полноценной нуклеазой, а также редактирования отдельных азотистых оснований, разрабатываются и иные подходы к внесению целевых изменений в геномы разных организмов. Например, неплохой потенциал имеет использование программиру-

емых нуклеаз из семейства прокариотических белков-аргонавтов [97].

Исследование Михайловой Е.В., Кулуева Б.Р. поддержано грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.), работа Геращенко Г.А., Кулуева А.Р., Баймиева Ан.Х., Баймиева Ал.Х., Чемериса А.В. выполнена в рамках государственных заданий № 122041400162-3 и № 122030200143-8.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shen H., Strunks G.D., Klemann B.J., Hooykaas P.J., de Pater S. (2017) CRISPR/Cas9-induced double-strand break repair in Arabidopsis nonhomologous end-joining mutants. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 7(1), 193–202.
2. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2017) Эволюция методов редактирования геномов. *Biomics*. 9(3), 245–270.
3. Злобин Н.Е., Лебедева М.В., Таранов В.В., Харченко П.Н., Бабаков А.В. (2018) Редактирование генома растений путем направленной замены азотистых оснований (обзор). *Биотехнология*. 34(6), 59–68.
4. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 576(7785), 149–157.
5. Wang J.Y., Doudna J.A. (2023) CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*. 379(6629), eadd8643.
6. Abdullah, Jiang Z., Hong X., Zhang S., Yao R., Xiao Y. (2020) CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants. *Synthetic Systems Biotechnol.* 5(4), 277–292.
7. Anzalone A.V., Koblan L.W., Liu D.R. (2020) Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.* 38(7), 824–844.
8. Hao L., Pu X., Song J. (2021) Introduction of mutations in plants with prime editing. *Methods*. 194, 83–93.
9. Hassan M.M., Zhang Y., Yuan G., De K., Chen J.-G., Muchero W., Tuskan G.A., Qi Y., Yang X. (2021) Construct design for CRISPR/Cas-based genome editing in plants. *Trends Plant Sci.* 26(11), 1133–1152.

10. Hassan M.M., Yuan G., Liu Y., Alam M., Eckert C.A., Tuskan G.A., Golz J.F., Yang X. (2022) Precision genome editing in plants using gene targeting and prime editing: existing and emerging strategies. *Biotechnol. J.* **17**(10), 2100673.
11. Molla K.A., Sretenovic S., Bansal K.C., Qi Y. (2021) Precise plant genome editing using base editors and prime editors. *Nat. Plants.* **7**(9), 1166–1187.
12. Ochoa-Sanchez A., Perez-Sanchez G., Torres-Ledesma A.M., Valdez J.P.R., Rinaldi G., Moguel B.B., Molina-Aguilar C. (2021) Prime editing, a novel genome-editing tool that may surpass conventional CRISPR-Cas9. *Re:GEN Open.* **1**(1), 75–82. <https://doi.org/10.1089/regen.2021.0016>
13. Chen P.J., Liu D.R. (2023) Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nat. Rev. Genet.* **24**(3), 161–177.
14. Hillary V.E., Ceasar S.A. (2022) Prime editing in plants and mammalian cells: mechanism, achievements, limitations, and future prospects. *BioEssays.* **44**(9), 2200032.
15. Li J., Zhang C., He Y., Li S., Yan L., Li Y., Zhu Z., Xia L. (2023) Plant base editing and prime editing: the current status and future perspectives. *J. Integr. Plant. Biol.* **65**(2), 444–467. doi: 10.1111/jipb.13425
16. Lu C., Kuang J., Shao T., Xie S., Li M., Zhu L., Zhu L. (2022) Prime editing: an all-rounder for genome editing. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(17), 9862.
17. Doman J.L., Sousa A.A., Randolph P.B., Chen P.J., Liu D.R. (2022) Designing and executing prime editing experiments in mammalian cells. *Nat. Protoc.* **17**(11), 2431–2468.
18. Jin S., Lin Q., Gao Q., Gao C. (2022) Optimized prime editing in monocot plants using PlantPegDesigner and engineered plant prime editors (ePPEs). *Nat. Protoc.* **18**(3), 831–853.
19. Герашенков Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х., Губайдуллин М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2020) Дизайн РНК-гидов для CRISPR/Cas редактирования геномов растений. *Молекуляр. биология.* **54**(1), 29–50.
20. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. (2018) Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdisciplinary Sci.* **10**, 455–465.
21. Li C., Chu W., Gill R.A., Sang S., Shi Y., Hu X., Yang Y., Zaman Q.U., Zhang B. (2023) Computational tools and resources for CRISPR/Cas genome editing. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **21**(1), 108–126.
22. Lin Q., Zong Y., Xue C., Wang S., Jin S., Zhu Z., Wang Y., Anzalone A.V., Raguram A., Doman J.L., Liu D.R., Gao C. (2020) Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotechnol.* **38**(5), 582–585.
23. Butt H., Rao G.S., Sedeek K., Aman R., Kamel R., Mahfouz M. (2020) Engineering herbicide resistance via prime editing in rice. *Plant Biotechnol. J.* **18**(12), 2370–2372.
24. Li H., Li J., Chen J., Yan L., Xia L. (2020) Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol. Plant.* **13**(5), 671–674.
25. Tang X., Sretenovic S., Ren Q., Jia X., Li M., Fan T., Yin D., Xiang S., Guo Y., Liu L., Zheng X., Qi Y., Zhang Y. (2020) Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. *Mol. Plant.* **13**(5), 667–670.
26. Chen P.J., Hussmann J.A., Yan J., Knipping F., Ravisankar P., Chen P.-F., Chen C., Nelson J.W., Newby G.A., Sahin M., Osborn M.J., Weissman J.S., Adamson B., Liu D.R. (2021) Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell.* **184**(22), 5635–5652.e29.
27. Liu P., Liang S.-Q., Zheng C., Mintzer E., Zhao Y.G., Ponniselvan K., Mir A., Sontheimer E.J., Gao G., Flotte T.R., Wolfe S.A., Xue W. (2021) Improved prime editors enable pathogenic allele correction and cancer modelling in adult mice. *Nat. Commun.* **12**(1), 2121.
28. Ferreira da Silva J., Oliveira G.P., Arasa-Verge E.A., Kagiou C., Moreton A., Timelhale G., Jiricny J., Loizou J.I. (2022) Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair. *Nat. Commun.* **13**(1), 760.
29. Adikusuma F., Lushington C., Arudkumar J., Godahewa G.I., Chey Y.C.J., Gierus L., Piltz S., Geiger A., Jain Y., Reti D., Wilson L.O.W., Bauer D.C., Thomas P.Q. (2021) Optimized nickase- and nuclease-based prime editing in human and mouse cells. *Nucl. Acids Res.* **49**(18), 10785–10795.
30. Jiang T., Zhang X.-O., Weng Z., Xue W. (2022) Deletion and replacement of long genomic sequences using prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**(2), 227–234.
31. Peterka M., Akrap N., Li S., Wimberger S., Hsieh P.-P., Degtev D., Bestas B., Barr J., van de Plassche S., Mendoza-Garcia P., Šviković S., Sienski G., Firth M., Maresca M. (2022) Harnessing DSB repair to promote efficient homology-dependent and -independent prime editing. *Nat. Commun.* **13**(1), 1240.
32. Li X., Zhang G., Huang S., Liu Y., Tang J., Zhong M., Wang X., Sun W., Yao Y., Ji Q., Wang X., Liu J., Zhu S., Huang X. (2023) Development of a versatile nuclease prime editor with upgraded precision. *Nat. Commun.* **14**(1), 305.
33. Nelson J.W., Randolph P.B., Shen S.P., Everette K.A., Chen P.J., Anzalone A.V., An M., Newby G.A., Chen J.C., Hsu A., Liu D.R. (2022) Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* **40**(3), 402–410.
34. Zou J., Meng X., Liu Q., Shang M., Wang K., Li J., Yu H., Wang C. (2022) Improving the efficiency of prime editing with epegRNAs and high-temperature treatment in rice. *Sci. China Life Sci.* **65**(11), 2328–2331.
35. Zhang G., Liu Y., Huang S., Qu S., Cheng D., Yao Y., Ji Q., Wang X., Huang X., Liu J. (2022) Enhancement of prime editing via xrRNA motif-joined pegRNA. *Nat. Commun.* **13**(1), 1856.
36. Chai Y., Jiang Y., Wang J., Qiao D., Zhang Y., Xin C., Zhou Y., Wang X.-C., Chen Q.-J. (2021) MS2

- RNA aptamer enhances prime editing in rice. *bioRxiv*. 2021-10. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.20.465209v1.full.pdf>
37. Chen R., Cao Y., Liu Y., Zhao D., Li J., Cheng Z., Bi C., Zhang X. (2023) Enhancement of a prime editing system via optimal recruitment of the pioneer transcription factor P65. *Nat. Commun.* **14**(1), 257.
  38. Li X., Zhou L., Gao B.-Q., Li G., Wang X., Wang Y., Chen J. (2022) Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure. *Nat. Commun.* **13**(1), 1669.
  39. Li X., Wang X., Sun W., Huang S., Zhong M., Yao Y., Ji Q., Huang X. (2022) Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes. *J. Mol. Cell. Biol.* **14**(4), mjac022.
  40. Liu Y., Yang G., Huang S., Li X., Wang X., Li G., Chi T., Chen Y., Huang X., Wang X. (2021) Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA. *Cell Res.* **31**(10), 1134–1136.
  41. Liu B., Dong X., Cheng H., Zheng C., Chen Z., Rodríguez T.C., Liang S.-Q., Xue W., Sontheimer E.J. (2022) A split prime editor with untethered reverse transcriptase and circular RNA template. *Nat. Biotechnol.* **40**(9), 1388–1393.
  42. Huang S., Zhang Z., Tao W., Liu Y., Li X., Wang X., Harati J., Wang P.-Y., Huang X., Lin C.-P. (2022) Broadening prime editing toolkits using RNA-Pol-II-driven engineered pegRNA. *Mol. Ther.* **30**(9), 2923–2932.
  43. Xu R., Li J., Liu X., Shan T., Qin R., Wei P. (2020) Development of plant prime-editing systems for precise genome editing. *Plant Commun.* **1**(3), 100043.
  44. Zong Y., Liu Y., Xue C., Li B., Li X., Wang Y., Li J., Liu G., Huang X., Cao X., Gao C. (2022) An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nat. Biotechnol.* **40**(9), 1394–1402.
  45. Zheng C., Liang S.Q., Liu B., Liu P., Kwan S.Y., Wolfe S.A., Xue W.A. (2022) Flexible split prime editor using truncated reverse transcriptase improves dual-AAV delivery in mouse liver. *Mol. Ther.* **30**(3), 1343–1351.
  46. Gao Z., Ravendran S., Mikkelsen N.S., Haldrup J., Cai H., Ding X., Paludan S.R., Thomsen M.K., Mikkelsen J.G., Bak R.O. (2022) A truncated reverse transcriptase enhances prime editing by split AAV vectors. *Mol. Ther.* **30**(9), 2942–2951.
  47. Xu W., Yang Y., Yang B., Krueger C.J., Xiao Q., Zhao S., Zhang L., Kang G., Wang F., Yi H., Ren W., Li L., He X., Zhang C., Zhang B., Zhao J., Yang J. (2022) A design optimized prime editor with expanded scope and capability in plants. *Nat. Plants.* **8**(1), 45–52.
  48. Li J., Chen L., Liang J., Xu R., Jiang Y., Li Y., Ding J., Li M., Qin R., Wei P. (2022) Development of a highly efficient prime editor 2 system in plants. *Genome Biol.* **23**(1), 161.
  49. Jiang Z., Abdullah, Zhang S., Jiang Y., Liu R., Xiao Y. (2022) Development and optimization of CRISPR prime editing system in photoautotrophic cells. *Molecules.* **27**(6), 1758.
  50. Zhuang Y., Liu J., Wu H., Zhu Q., Yan Y., Meng H., Chen P.R., Yi C. (2022) Increasing the efficiency and precision of prime editing with guide RNA pairs. *Nat. Chem. Biol.* **18**(1), 29–37.
  51. Choi J., Chen W., Suiter C.C., Lee C., Chardon F.M., Yang W., Leith A., Daza R.M., Martin B., Shendure J. (2022) Precise genomic deletions using paired prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**(2), 218–226.
  52. Wang J., He Z., Wang G., Zhang R., Duan J., Gao P., Lei X., Qiu H., Zhang C., Zhang Y., Yin H. (2022) Efficient targeted insertion of large DNA fragments without DNA donors. *Nat. Methods.* **19**(3), 331–340.
  53. Tao R., Wang Y., Hu Y., Jiao Y., Zhou L., Jiang L., Li L., He X., Li M., Yu Y., Chen Q., Yao S. (2022) WT-PE: prime editing with nuclease wild-type Cas9 enables versatile large-scale genome editing. *Sig. Transduct. Target Ther.* **7**(1), 108.
  54. Anzalone A.V., Gao X.D., Podracky C.J., Nelson A.T., Koblan L.W., Raguram A., Levy J.M., Mercer J.A.M., Liu D.R. (2022) Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. *Nat. Biotechnol.* **40**(5), 731–740.
  55. Tao R., Wang Y., Jiao Y., Hu Y., Li L., Jiang L., Zhou L., Qu J., Chen Q., Yao S. (2022) Bi-PE: bi-directional priming improves CRISPR/Cas9 prime editing in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* **50**(11), 6423–6434.
  56. Kweon J., Hwang H.-Y., Ryu H., Jang A.-H., Kim D., Kim Y. (2023) Targeted genomic translocations and inversions generated using a paired prime editing strategy. *Mol. Ther.* **31**(1), 249–259.
  57. Lin Q., Jin S., Zong Y., Yu H., Zhu Z., Liu G., Kou L., Wang Y., Qiu J.-L., Li J., Gao C. (2021) High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants. *Nat. Biotechnol.* **39**(8), 923–927.
  58. Collias D., Beisel C.L. (2021) CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nat. Commun.* **12**(1), 555.
  59. Kweon J., Yoon J.-K., Jang A.-H., Shin H.R., See J.-E., Jang G., Kim J.-I., Kim Y. (2021) Engineered prime editors with PAM flexibility. *Mol. Ther.* **29**(6), 2001–2007.
  60. Oh Y., Lee W., Hur J.K., Song W.J., Lee Y., Kim H., Gwon L.W., Kim Y.-H., Park Y.-H., Kim C.H., Lim K.-S., Song B.-S., Huh J.-W., Kim S.-U., Jun B.-H., Jung C., Lee S.H. (2022) Expansion of the prime editing modality with Cas9 from *Francisella novicida*. *Genome Biol.* **23**(1), 92.
  61. Hua K., Jiang Y., Tao X., Zhu J. (2020) Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol. J.* **18**(11), 2167–2169.
  62. Grünwald J., Miller B.R., Szalay R.N., Cabeciras P.K., Woodilla C.J., Holtz E.J.B., Petri K., Joung J.K. (2022) Engineered CRISPR prime editors with compact, untethered reverse transcriptases. *Nat. Biotechnol.* **41**, 337–343.
  63. Zhi S., Chen Y., Wu G., Wen J., Wu J., Liu Q., Li Y., Kang R., Hu S., Wang J., Liang P., Huang J. (2022)

- Dual-AAV delivering split prime editor system for *in vivo* genome editing. *Mol. Ther.* **30**(1), 283–294.
64. Böck D., Rothgangl T., Villiger L., Schmidheini L., Matsushita M., Mathis N., Ioannidi E., Rimann N., Grisch-Chan H.M., Kreutzer S., Kontarakis Z., Kopf M., Thöny B., Schwank G. (2022) *In vivo* prime editing of a metabolic liver disease in mice. *Sci. Transl. Med.* **14**(636), eabl9238.
  65. Song M., Lim J.M., Min S., Oh J.-S., Kim D.Y., Woo J.-S., Nishimasu H., Cho S.-R., Yoon S., Kim H.H. (2021) Generation of a more efficient prime editor 2 by addition of the Rad51 DNA-binding domain. *Nat. Commun.* **12**(1), 5617.
  66. Velimirovic M., Zanetti L.C., Shen M.W., Fife J.D., Lin L., Cha M., Akinci E., Barnum D., Yu T., Sherwood R.I. (2022) Peptide fusion improves prime editing efficiency. *Nat. Commun.* **13**(1), 3512.
  67. Liu N., Zhou L., Lin G., Hu Y., Jiao Y., Wang Y., Liu J., Yang S., Yao S. (2022) HDAC inhibitors improve CRISPR-Cas9 mediated prime editing and base editing. *Mol. Ther.—Nucl. Acids.* **29**, 36–46.
  68. Park S.-J., Jeong T.Y., Shin S.K., Yoon D.E., Lim S.-Y., Kim S.P., Choi J., Lee H., Hong J.-I., Ahn J., Seong J.K., Kim K. (2021) Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor. *Genome Biol.* **22**(1), 170.
  69. Dahlman J.E., Abudayyeh O.O., Joung J., Gootenberg J.S., Zhang F., Konermann S. (2015) Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. *Nat. Biotechnol.* **33**(11), 1159–1161.
  70. Liu G., Yin K., Zhang Q., Gao C., Qiu J.L. (2019) Modulating chromatin accessibility by transactivation and targeting proximal dsgRNAs enhances Cas9 editing efficiency *in vivo*. *Genome Biol.* **20**, 145.
  71. Eggenschwiler R., Gschwendtberger T., Felski C., Jahn C., Langer F., Sternecker J., Hermann A., Lühmann J., Steinemann D., Haase A., Martin U., Petri S., Cantz T. (2021) A selectable all-in-one CRISPR prime editing piggyBac transposon allows for highly efficient gene editing in human cell lines. *Sci. Rep.* **11**(1), 22154.
  72. Nishizawa-Yokoi A., Toki S. (2021) A piggyBac-mediated transgenesis system for the temporary expression of CRISPR/Cas9 in rice. *Plant Biotechnol. J.* **19**(7), 1386–1395.
  73. Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Герашенков Г.А., Рожнова Н.А., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Баймиев А.Х., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. (2019) Доставка CRISPR/CAS-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов. *Физиология растений.* **66**(5), 339–353.
  74. Михайлова Е.В., Хуснутдинов Э.А., Чемерис А.В., Кулуев Б.Р. (2022) Доступный арсенал для CRISPR/Cas геномного редактирования растений. *Физиология растений.* **69**(1), 38–53.
  75. Petri K., Zhang W., Ma J., Schmidts A., Lee H., Horng J.E., Kim D.Y., Kurt I.C., Clement K., Hsu J.Y., Pinello L., Maus M.V., Joung J.K., Yeh J.-R.J. (2022) CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells. *Nat. Biotechnol.* **40**(2), 189–193.
  76. Simon D.A., Tálas A., Kulcsár P.I., Biczók Z., Krausz S.L., Várady G., Welker E. (2022) PEAR, a flexible fluorescent reporter for the identification and enrichment of successfully prime edited cells. *eLife.* **11**, e69504.
  77. Schene I.F., Joore I.P., Baijens J.H.L., Stevelink R., Kok G., Shehata S., Ilcken E.F., Nieuwenhuis E.C.M., Bolhuis D.P., van Rees R.C.M., Spelier S.A., van der Doef H.P.J., Beekman J.M., Houwen R.H.J., Nieuwenhuis E.E.S., Fuchs S.A. (2022) Mutation-specific reporter for optimization and enrichment of prime editing. *Nat. Commun.* **13**(1), 1028.
  78. Levesque S., Mayorga D., Fiset J.-P., Goupil C., Düringer A., Loiseau A., Bouchard E., Agudelo D., Doyon Y. (2022) Marker-free co-selection for successive rounds of prime editing in human cells. *Nat. Commun.* **13**(1), 5909.
  79. Jiao Y., Zhou L., Tao R., Wang Y., Hu Y., Jiang L., Li L., Yao S. (2021) Random-PE: an efficient integration of random sequences into mammalian genome by prime editing. *Mol. Biomed.* **2**(1), 36.
  80. Choi J., Chen W., Minkina A., Chardon F.M., Suiter C.C., Regalado S.G., Domcke S., Hamazaki N., Lee C., Martin B., Daza R.M., Shendure J. (2022) A time-resolved, multi-symbol molecular recorder via sequential genome editing. *Nature.* **608**(7921), 98–107.
  81. Hwang G.H., Jeong Y.K., Habib O., Hong S.A., Lim K., Kim J.S., Bae S. (2021) PE-Designer and PE-Analyzer: web-based design and analysis tools for CRISPR prime editing. *Nucl. Acids Res.* **49**(W1), W499–W504.
  82. Chow R.D., Chen J.S., Shen J., Chen S. (2020) A web tool for the design of prime-editing guide RNAs. *Nat. Biomed. Eng.* **5**(2), 190–194.
  83. Hsu J.Y., Grünwald J., Szalay R., Shih J., Anzalone A.V., Lam K.C., Shen M.W., Petri K., Liu D.R., Joung J.K., Pinello L. (2021) PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs. *Nat. Commun.* **12**(1), 1034.
  84. Anderson M.V., Haldrup J., Thomsen E.A., Wolff J.H., Mikkelsen J.G. (2021) pegIT – a web-based design tool for prime editing. *Nucl. Acids Res.* **49**(W1), W505–W509.
  85. Siegner S.M., Karasu M.E., Schröder M.S., Kontarakis Z., Corn J.E. (2021) PnB Designer: a web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants. *BMC Bioinformatics.* **22**(1), 101.
  86. Li Y., Chen J., Tsai S.Q., Cheng Y. (2021) Easy-Prime: a machine learning-based prime editor design tool. *Genome Biol.* **22**(1), 235.
  87. Bhagwat A.M., Graumann J., Wiegandt R., Bentsen M., Welker J., Kuenne C., Preussner J., Braun T., Looso M. (2020) multicrispr: gRNA design for prime editing and parallel targeting of thousands of targets. *Life Sci. Alliance.* **3**(11), e202000757.

88. Standage-Beier K., Tekel S.J., Brafman D.A., Wang X. (2021) Prime editing guide RNA design automation using PINE-CONE. *ACS Synth. Biol.* **10**(2), 422–427.
89. Mathis N., Allam A., Kissling L., Marquart K.F., Schmidheini L., Solari C., Balázs Z., Krauthammer M., Schwank G. (2023) Predicting prime editing efficiency and product purity by deep learning. *Nat. Biotechnol.* **41**, 1151–1159.
90. Kwon J., Kim M., Bae S., Jo A., Kim Y., Lee J.K. (2022) TAPE-seq is a cell-based method for predicting genome-wide off-target effects of prime editor. *Nat. Commun.* **13**(1), 7975.
91. Li Z., Ma R., Liu D., Wang M., Zhu T., Deng Y. (2022) A straightforward plant prime editing system enabled highly efficient precise editing of rice *Waxy* gene. *Plant Sci.* **323**, 111400.
92. Jiang Y.-Y., Chai Y.-P., Lu M.-H., Han X.-L., Lin Q., Zhang Y., Zhang Q., Zhou Y., Wang X.-C., Gao C., Chen Q.-J. (2020) Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two *ALS* genes in maize. *Genome Biol.* **21**(1), 257.
93. Qiao D., Wang J., Lu M., Xin C., Chai Y., Jiang Y., Sun W., Cao Z., Guo S., Wang X., Chen Q. (2023) Optimized prime editing efficiently generates heritable mutations in maize. *J. Integr. Plant Biol.* **65**(4), 900–906.
94. Wang L., Kaya H.B., Zhang N., Rai R., Willmann M.R., Carpenter S.C.D., Read A.C., Martin F., Fei Z., Leach J.E., Martin G.B., Bogdanove A.J. (2021) Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants. *Front. Genome Ed.* **3**, 617553.
95. Biswas S., Bridgeland A., Irum S., Thomson M.J., Septiningsih E.M. (2022) Optimization of prime editing in rice, peanut, chickpea, and cowpea protoplasts by restoration of GFP activity. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(17), 9809.
96. Perroud P.-F., Guyon-Debast A., Veillet F., Kermarrec M.-P., Chauvin L., Chauvin J.-E., Gallois J.-L., Nogué F. (2022) Prime editing in the model plant *Physcomitrium patens* and its potential in the tetraploid potato. *Plant Sci.* **316**, 111162.
97. Кропочева Е.В., Лисицкая Л.А., Агапов А.А., Мусабилов А.А., Кульбачинский А.В., Есюнина Д.М. (2022) Прокариотические белки-аргонавты как инструмент биотехнологии. *Молекуляр. биология.* **56**(6), 915–936.

## Prime-Editing Methods and pegRNA Design Programs

E. V. Mikhaylova<sup>1</sup>\*, B. R. Kuluev<sup>1</sup>, G. A. Gerashchenkov<sup>1</sup>, D. A. Chemeris<sup>1</sup>,  
R. R. Garafutdinov<sup>1</sup>, A. R. Kuluev<sup>1</sup>, An. K. Baymiev<sup>1</sup>, Al. K. Baymiev<sup>1</sup>,  
and A. V. Chemeris<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Science, Ufa, 450054 Russia

\*e-mail: mikhele@list.ru

It has been 10 years since CRISPR/Cas technology was applied to edit the genomes of various organisms. Its ability to produce a double-strand break in a DNA region specified by the researcher started a revolution in bioengineering. Later, the Base Editing (BE) method was developed. BE is performed via the formation of single-strand breaks by the mutant form of Cas nuclease (nickase), cross-linked with deaminases and other enzymes. It can be used to promote A→G and C→T transitions, and a C→G transversion. Just over three years ago, a new Prime Editing (PE) variant of CRISPR/Cas was invented. Unlike BE, in PE the nickase is fused with reverse transcriptase, capable of building a new DNA chain using the pegRNA template. The pegRNA consists of an elongated guide RNA with an extra sequence at the 3'-end. Prime editing makes it possible to insert the desired mutations into this extra sequence and to carry out any substitutions and indels of bases without the use of special donor DNA. To date, a number of PE variants have been proposed, and they are briefly considered in this review with an emphasis on prime editing of plant genomes. Some attention is also paid to pegRNA design programs, as well as evaluation of the efficiency of the editing. Such a variety of PE techniques is due to the opportunities of high-precision introduction of desired changes with a rather low frequency of off-target mutations in the genomes of various organisms. The relatively low efficiency of prime editing inspire researchers to offer new approaches. There is hope that further development of the technology will improve PE enough to take its rightful place among the genome targeting methods, suitable for any organisms, and will have a positive impact on the agricultural sector, industrial biotechnologies, and medicine.

**Keywords:** CRISPR, prime editing, PE, nCas9, nick, guide RNA, pegRNA, ngRNA, computer program, online tool