

УДК 631.523.13

Редактирование генома растений путем направленной замены азотистых оснований (Обзор)

© 2018 Н.Е. ЗЛОБИН^{1,*}, М.В. ЛЕБЕДЕВА¹, В.В. ТАРАНОВ¹, П.Н. ХАРЧЕНКО¹, А.В. БАБАКОВ¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Тимирязевская 42, Москва, 127550

*e-mail: stresslab@yandex.ru

Поступила 01.11.2018 г.

После доработки 19.11.2018 г.

Принята в печать 15.12.2018 г.

Рассмотрены современные методы редактирования генома растений, основанные на точечной замене азотистых оснований в ДНК с использованием модифицированной технологии CRISPR/Cas9. В первой части описаны общие принципы конструирования редакторов оснований (base editors), позволяющих эффективно осуществлять направленные замены азотистых оснований С–Т и А–G в геномной ДНК. Разобраны варианты решения наиболее актуальных проблем: выбор целевого основания из нескольких одинаковых оснований, способы снижения количества нежелательных мутаций в целевом сайте, точное наведение редактора оснований на целевую последовательность в геномной ДНК и др. Во второй части обобщен опыт применения современных генетических редакторов для направленной замены азотистых оснований в геномной ДНК растений, описаны особенности работы с растительными организмами по сравнению с животными. Обсуждаются перспективы дальнейшего развития подходов направленной модификации геномной ДНК растений.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, адениндеаминаза, геномное редактирование, растения, цитидиндеаминаза.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-59-68

CRISPR/Cas9 – наиболее распространенная технология редактирования генома растений. В наиболее простом варианте эта технология используется для создания растений с нокаут-мутациями в определенных генах, а также с делециями участков геномной ДНК [1]. Более сложный вариант CRISPR/Cas9 позволяет осуществлять замену целевых участков геномной ДНК и встраивание экзогенных последовательностей в геном. Для этого, помимо Cas-белка и sgРНК, требуется наличие экзогенной «донорной» ДНК, содержащей гомологичные последовательности с целевым участком геномной ДНК. Недостатком этого подхода является низкая частота редактирования, которая объясняется сложностью доставки достаточного количества экзогенной ДНК в растительные клетки и малой эффективностью гомологичной рекомбинации в соматических клетках растений [2, 3].

В последние два года развивается новая модификация технологии CRISPR/Cas9, которая позволяет вместо внесения двуцепочечных разрывов осуществлять направленную замену отдельных оснований в геномной ДНК. Этот подход основан на применении химерных белков – редакторов оснований (от английского «base editor»), состоящих из модифицированного Cas-белка, не способного вносить в ДНК двуцепочечные разрывы, и ковалентно соединенного с ним фермента, который модифицирует определенное азотистое основание в геномной ДНК таким образом, что происходит замена одного нуклеотида на другой [4]. Так как модифицирующий нуклеотиды фермент присоединен к Cas-белку, его активность распространяется только на целевые нуклеотиды, находящиеся в сайте специфичного связывания Cas-белка с геномной ДНК, который в свою очередь определяется последовательностью sgRNA

Список сокращений: BER – система эксцизионной репарации урацила (base excision repair); PAM – нуклеотидная последовательность, прилегающая к протоспейсеру, single-guide RNA (sgRNA) – наводящая РНК; UGI – ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы; UNG – урацил-ДНК-гликозилаза, ключевой фермент эксцизионной репарации урацила.

(single-guide RNA). Таким образом, достигается высокая специфичность внесения точечных нуклеотидных замен в геномную ДНК.

В разработанных к настоящему времени редакторах оснований в качестве модифицирующих нуклеотиды ферментов используются цитидиндеаминазы и адениндеаминазы [5]. Цитидиндеаминазы превращают цитозин в урацил, адениндеаминазы – аденин в инозин. При последующей репарации этих измененных оснований в геномной ДНК возникают замены С–Т или А–Г, соответственно. Поскольку эти ферменты деаминируют основания в одноцепочечной ДНК (оцДНК), их активность проявляется только в отношении короткого участка оцДНК, образующейся при связывании комплекса Cas-белка и sgRNA с целевой последовательностью в геномной ДНК. Этот участок, расположенный в той же цепи ДНК, что и последовательность PAM (от *protospacer adjacent motif*), называется «окном редактирования». Расстояние от PAM до окна редактирования может быть различным для разных редакторов оснований [5].

Направленная замена оснований, так же, как и исходный вариант технологии CRISPR/Cas9, вносящий в ДНК двуцепочечные разрывы, требует функционирования в клетке всего двух компонентов – модифицированного Cas-белка и sgRNA, присутствия донорной ДНК не требуется. Благодаря этому, направленная замена оснований с помощью редакторов оснований потенциально является не менее эффективным подходом, чем внесение в геномную ДНК индел-мутаций посредством обычной системы CRISPR/Cas9. При этом, замена отдельных оснований – более «тонкий» способ воздействия на геномную ДНК, и соответственно на фенотип организма, чем выключение генов или удаление участков генома. Однако, использование модифицированной системы CRISPR/Cas9 для направленной замены оснований сопряжено с рядом специфических трудностей, которые отсутствуют при работе с исходным вариантом CRISPR/Cas9. Основными из них являются точное наведение редактора оснований на целевое основание в ДНК, образование нежелательных мутаций в сайте редактирования и выборочное редактирование близкорасположенных оснований. Для решения этих проблем предложены различные подходы.

Точное наведение редактора оснований на целевую последовательность в геноме

Для целевой модификации основания требуется подвести комплекс из редактора оснований и sgRNA к нуклеотиду-мишени таким обра-

зом, чтобы этот нуклеотид оказался в окне редактирования [6, 7]. Поскольку сайт взаимодействия Cas-белка с геномной ДНК должен быть фланкирован последовательностью PAM (обычно 3–5 нуклеотидов), необходимость наличия PAM на определенном расстоянии от целевого цитозина ограничивает выбор целевых цитозинов, которые могут быть заменены с помощью определенного редактора оснований в геномной ДНК.

Решением этой проблемы является применение разных Cas-белков, имеющих различные PAM, в составе редакторов оснований [8]. Cas-белки могут иметь как естественное происхождение, так и быть модифицированными таким образом, чтобы изменились их требования к PAM [9, 10]. К настоящему моменту создано множество вариантов редакторов оснований на основе цитидин- и адениндеаминаз, содержащих различные Cas-белки и, соответственно взаимодействующих с различными PAM [5].

Еще одним фактором, ограничивающим количество целевых оснований в геномной ДНК, является зависимость эффективности деаминаз от нуклеотидов, окружающих целевое основание («нуклеотидного контекста»). Например, некоторые редакторы оснований эффективно деаминируют цитозин в мотивах «СТ», в то время как цитозин в мотивах «ГС» для них практически недоступен, но может с высокой эффективностью модифицироваться другими вариантами редакторов [11]. Предпочтительный нуклеотидный контекст различается для разных цитидин- и адениндеаминаз, поэтому для редактирования целевого основания необходимо подбирать редактор оснований с вариантом деаминазы, которая достаточно эффективно деаминирует нуклеотиды в том контексте, в котором находится целевое основание [12, 13].

Редактирование близко расположенных оснований

В том случае, если в окне редактирования находится сразу несколько оснований, которые могут являться субстратом для входящей в состав редактора деаминазы, все они могут подвергаться замене со сравнимой эффективностью. Поскольку мишенью обычно является только одно из них, неразборчивость редакторов оснований способствует внесению в геномную ДНК нежелательных замен. Кроме того, эти замены иногда могут происходить и за пределами окна редактирования [6].

Наиболее эффективной стратегией уменьшения размера окна редактирования оказалось введение в деаминазы аминокислотных замен, снижающих каталитическую активность этих ферментов.

Благодаря сниженной таким образом процессивности деаминазы в составе редактора оснований размер окна редактирования может быть существенно сужен (до 1–2 нуклеотидов) [8].

Кроме того, для увеличения специфичности редактирования может использоваться упоминавшееся выше свойство деаминаз более эффективно модифицировать основания в определенном нуклеотидном контексте. Если нуклеотидный контекст для расположенных рядом оснований отличается (что вероятно), можно подобрать редактор оснований с таким вариантом деаминазы, который будет эффективно редактировать только один из находящихся в окне редактирования одинаковых нуклеотидов, находящихся в окне редактирования [12].

Снижение количества нежелательных мутаций в целевом сайте

Для различных редакторов оснований, содержащих цитидиндеаминазы, то есть предназначенных для внесения замен С–Т, показана способность вносить в целевой локус и другие типы мутаций. Это могут быть как замены цитозина на гуанин или аденин вместо тимина, так и индел-мутации, частота внесения которых в некоторых случаях сопоставима с таковой для целевых замен [6, 7]. Возникновение всех этих нежелательных типов мутаций определяется функционированием системы эксцизионной репарации урацила BER (Base Excision Repair). Для противодействия BER в состав редакторов оснований был включен дополнительный белок UGI – ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы (UNG), ключевого фермента эксцизионной репарации урацила. Присутствие UGI существенно снизило частоту образования всех типов нежелательных мутаций, а также повышало эффективность внесения целевых замен С–Т [6, 7, 11].

Для редакторов оснований на основе аденин-деаминаз образование нежелательных мутаций практически не происходит, что, вероятно, связано с относительно низкой активностью эксцизионной репарации инозина в клетках [5].

Редакторы оснований для внесения направленных замен С–Т в геномную ДНК растений

Первыми инструментами направленного введения замен С–Т (G–A в комплементарной цепи ДНК) в геномную ДНК эукариот на основе технологии CRISPR/Cas9 были редакторы оснований семейства BE, разработанные для редактирования генома в клетках млекопитающих [6]. Наиболее эффектив-

ным из них был BE3 (рис. 1а). Он состоит из белка SpCas9 из бактерии *Streptococcus pyogenes*, к N-концу которого была присоединена цитидиндеаминаза rAPOBEC1 из *Rattus norvegicus*, а к C-концу – белок UGI. При этом использовался модифицированный вариант nSpCas9(D10A), вносящий разрыв в одну из цепей ДНК. Применение nCas9, по сравнению с полностью каталитически неактивным dCas9 (от «catalytically dead»), который способен только связываться с целевым участком в геномной ДНК, существенно повышало эффективность введения в геномную ДНК нуклеотидных замен [6].

Большинство исследований по применению BE3 для редактирования геномной ДНК растений было проведено на рисе [14–16]. Редактирование генома осуществлялось посредством создания трансгенных растений риса, несущих вставку генов, кодирующих BE3 и соответствующую sgРНК. В качестве мишеней использовались гены, продукты которых вовлечены в биосинтез крахмала, пигментов, защиту от патогенов, формирование архитектоники растений риса. Трансгенные растения риса, экспрессирующие BE3, создавались с помощью агробактериальной трансформации. Во всех работах ген BE3 находился под контролем промотора Ubi-1 из *Zea mays*. При изучении этих трансгенных растений было установлено, что BE3 вносит в геномную ДНК направленные нуклеотидные замены на расстоянии 10–20 нуклеотидов в 3'-направлении от последовательности PAM. Редактированию подвергались как единичные, так и множественные цитозины в окне редактирования, замены могли находиться в гомозиготном, гетерозиготном и биаллельном состояниях. При этом, могли происходить как замены С–Т, так и замены С–G и (реже всего) С–A, а также индел-мутации [14, 15]. Эффективность внесения замен различалась в зависимости от положения целевых цитозинов, повышаясь от периферии окна редактирования к центру. Эффективность внесения целевых замен С–Т (от 0 до более чем 40%), ширина окна редактирования и частота редактирования в нем множественных цитозинов, а также частота появления нецелевых замен и индел-мутаций существенно варьировали в разных работах, а также в зависимости от целевых локусов [14–16].

BE3 использовался для направленного внесения замен в геномную ДНК не только риса, но и других растений, например однодольных – мягкой пшеницы и кукурузы [16]. В этих работах использовались генетические векторы, содержащие ген BE3 с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в однодольных

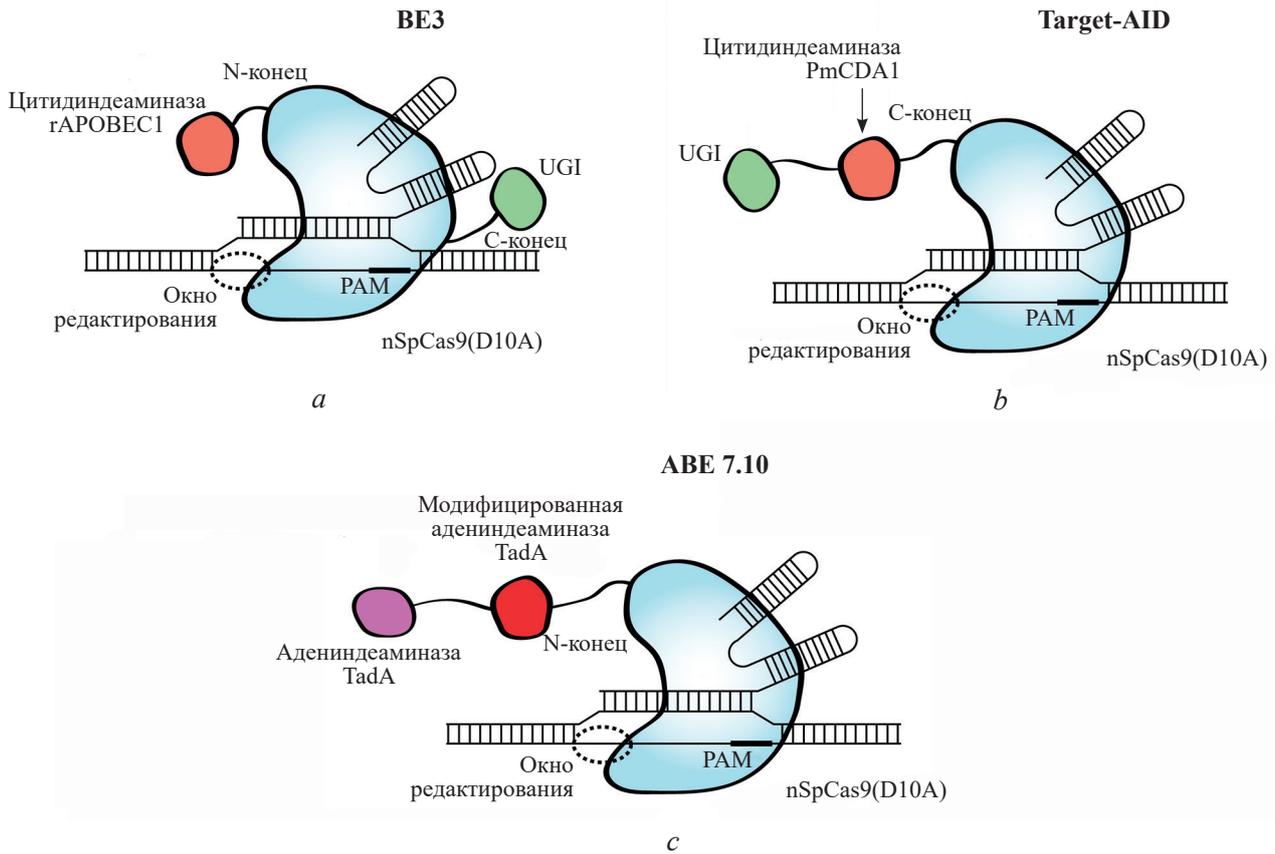


Рис.1. Схематическое устройство редакторов оснований ДНК (BE3, Target-AID, ABE 7.10), обеспечивающих замену нуклеотида С на Т (a, b) и нуклеотида А на G (c). rAPOBEC1 – цитидиндеаминаза из *Rattus norvegicus*, UGI – ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы, nSpCas9(D10A) – фермент, вносящий разрыв в одну из цепей ДНК, PmCDA1 – цитидиндеаминаза из *Petromyzon marinus*, TadA – адениндеаминаза из *Esheria coli*

Fig. 1. A schematic drawing of base editors (BE3, Target-AID, ABE 7.10) for C-T (a, b) and A-G (c) replacements in the genomic DNA. rAPOBEC1 – cytidine deaminase from *Rattus norvegicus*, UGI – Uracil Glycosylase Inhibitor, nSpCas9(D10A) – nickase variant of Cas9 from *Streptococcus pyogenes*, PmCDA1 – cytidine deaminase from *Petromyzon marinus*, TadA – adenine deaminase from *Esheria coli*

растениях, под контролем промотора Ubi-1 *Z. mays*. Встраивание вектора в геномную ДНК кукурузы осуществлялось посредством агробактериальной трансформации. Из 209 трансгенных растений два содержали гомозиготную замену С–Т в целевом сайте в положении –14 от PAM, и еще 19 содержали такую же замену в гетерозиготном состоянии. При этом, другие цитозины, находящиеся в окне редактирования, замене не подвергались, что может быть связано с их нахождением в мотивах «GC» или «CC» и, соответственно, низкой активностью APOBEC-1 в их отношении. Кроме того, в целевых сайтах не было обнаружено индел-мутаций или замен цитозина на аденин или гуанин [16]. Растения мягкой пшеницы с отредактированным геномом были получены без встраивания рекомбинантной ДНК в геном [16]. Генетический вектор, кодирующий BE3

и sgРНК, был с помощью биобаллистики доставлен в клетки незрелых зародышей пшеницы [17], после чего из них были регенерированы растения пшеницы в отсутствие каких-либо селективных факторов, определяющих преимущественное выживание трансгенных растений. Среди растений-регенерантов два растения содержали замены С–Т в целевом локусе; одно из них содержало единственную замену С–Т, второе – три замены С–Т в положениях –12...–18 от PAM. Индел-мутаций, а также нецелевых замен цитозина на аденин или гуанин также обнаружено не было. При этом, в геноме этих растений не было обнаружено вставок рекомбинантной ДНК. Это говорит о том, что редактирование генома произошло благодаря транзientной экспрессии BE3 и sgRNAs генетического вектора, использовавшегося для биобаллистики [16].

ВЕЗ применялся для редактирования генома двудольных растений – арабидопсиса и арбуза [18, 19]. Мишенью являлся ген ацетолактатсинтазы ALS, аминокислотные замены в котором способны придать растению устойчивость к гербицидам. С использованием агробактериальной трансформации были созданы трансгенные растения, экспрессирующие ВЕЗ. В этих растениях были обнаружены целевые точечные замены С–Т, в то время как индел-мутации и замены С–G и С–А обнаружены не были. Несмотря на то, что в поколении T1 не удалось создать растения, несущие целевые замены в гомозиготном состоянии, такие растения были отобраны в T2. При этом, в некоторых из растений T2 не содержалось вставок рекомбинантной ДНК, кодирующей ВЕЗ и sgРНК, которые выщепились из генома при получении семенного поколения T2 [18, 19].

Таким образом, редактор оснований ВЕЗ показал себя достаточно эффективным и универсальным средством для направленного внесения замен С–Т в геномную ДНК растений. В ряде работ исходный ВЕЗ был подвергнут различным модификациям с целью изменения его активности. Например, для редактирования генома риса из состава ВЕЗ был исключен UGI [20], так как UGI, постоянно экспрессирующийся в растительной клетке в составе редактора оснований, может неблагоприятным образом сказаться на эффективности клеточной репарации, как это было продемонстрировано для свободного UGI [21]. Были созданы трансгенные растения риса, экспрессирующие редактор оснований и sgRNA к одному из двух генов – *nrt1.1b* и *slr1*, которые регулируют поглощение азота и высоту растения, соответственно. По гену *nrt1.1b* из 37 трансгенных линий удалось отобрать лишь одно химерное растение, содержащее замену целевого цитозина на гуанин вместо тимина. Напротив, по локусу *slr1* из 45 трансгенных растений было отобрано шесть с целевой заменой С–Т, хотя и не в гомозиготном состоянии. Поскольку эта замена является доминантной мутацией, содержащие ее растения демонстрировали ожидаемое изменение фенотипа – карликовость [20].

В другой работе на рисе nSpCas9 в ВЕЗ был заменен на nSpCas9(VQR), который взаимодействует с последовательностью PAM NGA вместо NGG [15]. Созданный таким образом редактор оснований использовался для внесения в ген *pi-ta* однонуклеотидной замены С–Т, которая придает рису устойчивость к пирикуляриозу. Эта замена не могла быть внесена с помощью ВЕЗ из-за отсутствия мотива NGG на требуемом расстоянии от целевого основания. Из 11 трансгенных линий, экспрес-

сирующих редактор оснований и sgRNA, в двух было обнаружено наличие целевой нуклеотидной замены, что подтверждает функциональность модифицированного ВЕЗ с измененным Cas-белком. Работоспособность ВЕЗ с nSpCas9(VQR) для редактирования геномной ДНК растений была продемонстрирована и в другом исследовании на рисе [22]. В этой работе другой вариант ВЕЗ с модифицированным белком nSaCas9(KKH) из *Staphylococcus aureus* (PAM NNNRRT) оказался не способен вносить направленные замены в геномную ДНК. Возможным объяснением является то, что эффективность данного варианта редактора оснований исследовалась по отношению к единственному целевому локусу, и неэффективное редактирование могло определяться нуклеотидной последовательностью конкретной sgRNA.

Еще одним компонентом ВЕЗ, который подвергался модификации при создании инструментов для редактирования генома растений, была цитидиндеаминаза. Как уже упоминалось ранее, использовавшаяся в ВЕЗ гAPOBEC1 обладает слабой активностью в отношении цитозинов, расположенных в мотивах «GC». При замене в ВЕЗ гAPOBEC-1 на модифицированную цитидиндеаминазу AID *Homo sapiens* (AIDx) удалось добиться эффективного введения замен С–Т в мотивах «GC» в каллусах и растениях риса по нескольким целевым сайтам в геномной ДНК [23]. Для редактирования генома риса, мягкой пшеницы и картофеля применялся еще один модифицированный вариант ВЕЗ, содержащий цитидиндеаминазу APOBEC-3A *H. sapiens* [24]. Созданный редактор оснований характеризовался, во-первых, многократно расширенным окном редактирования (вплоть до положения –8 от PAM), и, во-вторых, высокой эффективностью внесения замен С–Т при отсутствии иных типов замен и индел-мутаций.

Большинство разработанных к настоящему моменту редакторов оснований созданы путем модификации ВЕЗ. Однако, помимо редакторов семейства VE, практически одновременно с ними был разработан также другой вариант системы для направленного внесения замен С–Т в геномную ДНК эукариот – Target-AID (рис. 1b) [7]. Этот редактор также состоит из nSpCas9, цитидиндеаминазы, деаминирующей цитозина в одноцепочечной ДНК, и UGI. Основное различие по сравнению с ВЕЗ заключается в том, что в Target-AID использовалась цитидиндеаминаза PmCDA1 из *Petromyza marinus*, и присоединялась она к С-концу nSpCas9 вместо N-конца. Для редактирования генома растений применялся модифицированный вариант Target-AID,

не содержащий UGI [25]. Было показано, что с помощью этого редактора оснований, как и с помощью ВЕЗ, можно вводить замены С–Т в геномную ДНК однодольных (рис) и двудольных (томат) растений, в том числе по нескольким локусам одновременно.

Несмотря на менее активное применение, редакторы оснований семейства Target-AID имеют некоторые преимущества перед ВЕЗ и могут оказаться ценным дополнением к инструментарию для редактирования генома растений.

1. Окно редактирования Target-AID несколько сдвинуто в 3'-направлении от РАМ по сравнению с ВЕЗ; аналогичное наблюдение было сделано и в животных клетках [7, 11]. Таким образом, Target-AID повышает количество возможных цитозин-мишеней в геномной ДНК растений;

2. Target-AID проявил способность эффективно деаминировать цитозины в мотивах «GC», в отношении которых ВЕЗ неэффективен;

3. Эффективность Target-AID выше при 25 °С, чем при 37 °С, что вероятно вызвано выбором цитидиндеаминазы PmCDA1 из морского животного [7]. Это является преимуществом, поскольку трансформация и регенерация растений обычно производятся при температурах, близких к комнатной [7].

Редакторы оснований для внесения направленных замен А–G в геномную ДНК растений

Редакторы оснований семейств ВЕ и Target-AID предназначены для введения в геномную ДНК замен С–Т (G–A) в комплементарной цепи. Инструмент для введения в геномную ДНК эукариот замен А–G (T–C в комплементарной цепи) был создан путем присоединения к N-концу белка nSpCas9 двух молекул адениндеаминазы TadA из *Escherichia coli*, в естественных условиях деаминирующей аденин в антикодоновой петле одной из tРНК (рис. 1с) [26]. При этом в адениндеаминазу, непосредственно прикрепленную к nSpCas9, был внесен ряд аминокислотных замен, придающих этому ферменту способность деаминировать аденины в одноцепочечной ДНК. В пионерской работе Guadelli et al. был создан набор редакторов оснований (семейство «ABE») для введения замен А–G в геномную ДНК млекопитающих, которые отличались друг от друга такими характеристиками, как ширина и расположение окна редактирования, а также предпочтением нуклеотидному контексту, в котором находится целевой аденин [26].

Наибольшую эффективность для редактирования генома растений продемонстрировал вариант редактора, названный ABE 7.10 [27]. Впервые

он был применен на рисе [28]. Ген, кодирующий ABE 7.10 с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в млекопитающих, был помещен под контроль промотора гена Ubi-1 из *Z. mays*. В качестве мишеней были выбраны несколько генов, продукты которых вовлечены в формирование архитектуры растения. В трансгенных растениях риса, экспрессирующих ABE 7.10, были обнаружены замены А–G в положениях –11...–16 от РАМ. Замены были как одиночными, так и множественными, и находились в различном состоянии – гомозиготном, гетерозиготном, химерном. Эффективность введения замен составила 4,8–26% для различных локусов. Индел-мутаций, а также замен аденинов на какие-либо другие нуклеотиды обнаружено не было, что согласуется с результатами, полученными при использовании ABE 7.10 в клетках млекопитающих [26, 28].

ABE 7.10 также применялся для редактирования генома двудольных растений. В протопластах арабидопсиса и рапса оптимизированный для экспрессии в растениях ABE 7.10 вводил замены А–G на расстоянии 13–17 нуклеотидов от РАМ [27]. При этом, наиболее эффективно деаминировались аденины, перед которыми находился тимин, что соответствует нуклеотидным предпочтениям адениндеаминазы TadA. В этой же работе были созданы трансгенные растения арабидопсиса, несущие ген ABE 7.10 под контролем различных промоторов. В поколении T1 удалось создать только химерные растения, содержащие как редактированные аллели, так и аллели дикого типа, при этом степень химерности различалась в зависимости от типа промотора. В поколении T2 были отобраны растения с целевыми заменами в гомозиготном состоянии [27].

Как и другие редакторы оснований, ABE 7.10 подвергали различным модификациям. Замена в ABE 7.10 белка SpCas9 на SaCas9 позволила создать редактор, взаимодействующий с РАМ NNGRRT [28]. Новый редактор оснований отличался высокой эффективностью, а также расширенным и сдвинутым ближе к РАМ окном редактирования по сравнению с ABE 7.10 (положения –7...–16 от РАМ). Также были созданы варианты ABE 7.10, содержащие nCas9(VQR) (РАМ NGA), nCas9(VRER) (РАМ NGCG) и nCas9(SaKKH) (РАМ NNNRRT). Эффективность всех вышеперечисленных редакторов оснований была продемонстрирована на растениях риса [22].

Присоединение трех сигналов ядерной локализации NLS к С-концу ABE 7.10 и введение модификаций в последовательность sgRNA

существенно повысили эффективность направленного введения замен А–G в геномную ДНК риса и пшеницы [29, 30].

Особенности применения модифицированной технологии CRISPR/Cas9 для направленной замены азотистых оснований в геномной ДНК растений

Основные особенности функционирования редакторов оснований, выявленные при редактировании генома животных, были подтверждены и на растениях. Установлена зависимость расположения и ширины окна редактирования от типа редактора оснований, а также варианта Cas9. Например, окно редактирования Target-AID было сдвинуто в 3'-направлении от PAM по сравнению с окном редактирования BE3 [14, 25]. Также наблюдается некоторое расширение окна редактирования при замене в составе редактора SpCas9 на SaCas9 [28].

Было показано, что эффективность редакторов в замене конкретных оснований зависит от окружающего их нуклеотидного контекста. Например, наиболее эффективное внесение замен С–T с помощью BE3 происходило в мотивах «ТС» [16, 20].

Помимо целевых мутаций С–T, использование редакторов оснований на основе цитидиндеаминаз в некоторых случаях приводило к замене цитозина на другие нуклеотиды, чаще всего на гуанин [23]. Редакторы на основе адениндеаминаз не приводили к возникновению нецелевых мутаций [27–30].

При использовании редакторов оснований отмечено, помимо замен нуклеотидов, образование индел-мутаций. При этом, частота детектируемых индел-мутаций варьировала от 0 до 10%. Наличие UGI существенно снижало частоту возникновения индел-мутаций [23].

Отличие редактирования генома растений от генома животных заключало главным образом не в самих редакторах, а в способе их применения. На животных клетках редактирование генома осуществлялось посредством транзientного присутствия редактора оснований и sgRNA в ядре. Доставка этих компонентов в ядро могла осуществляться, например с помощью плазмидных векторов для транзientной экспрессии либо в составе рибонуклеопротеидных частиц, состоящих из редактора оснований и sgRNA [5]. Подобный подход применялся и на растениях. Например, были созданы растения картофеля с заменами С–T в гене GBSS путем трансфекции протопластов плазмидной ДНК с последующей

регенерацией из них растений с отредактированным геномом [24]. Редактирование генома мягкой пшеницы также удалось осуществить путем транзientной экспрессии редактора оснований и sgRNA с плазмидных генетических векторов, а также с помощью рибонуклеопротеидных комплексов [16, 24]. В последнем случае химерный белок nSpCas9(D10A)+APOBEC3A был получен в очищенном виде, преассоциирован с транскрибируемыми *in vitro* sgRNA и доставлен в ткани пшеницы при помощи биобаллистики [24].

Перечисленные подходы, однако, не лишены недостатков. Например, регенерация растений из трансфицированных протопластов является длительной и трудоемкой процедурой, малоэффективной для многих видов растений и разных генотипов внутри одного вида [31]. При регенерации растений из тканей, подвергнутых биобаллистике, вероятность обнаружения среди растений-регенерантов образцов с отредактированным геномом невелика, поскольку отсутствует какой-либо фактор, обеспечивающий преимущественную регенерацию из клеток, в которых произошло редактирование целевых аллелей. По этой же причине высока вероятность появления химерных растений, состоящих из смеси клеток с отредактированным геномом и клеток дикого типа.

В большинстве работ для редактирования растительного генома применялась экспрессия редактора и sgRNA с генов, которые были встроены в геномную ДНК растения, а не присутствовали транзientно в растительных клетках. Экспрессия этих генов в трансгенном растении приводит к редактированию целевых последовательностей ДНК в отдельных клетках и, в конечном счете, получению растения с отредактированным геномом. Поскольку редактирование в разных клетках осуществляется независимо друг от друга, при использовании такого подхода так же велика вероятность возникновения химерных растений, в которых целевые последовательности в геноме отредактированы различным образом в разных клетках. При этом, желательным обычно является только один вариант модификации генома, который должен присутствовать во всех клетках растения. Кроме того, многие наиболее часто применяемые в геномной инженерии растений конститутивные промоторы могут обеспечивать слабый уровень экспрессии в меристематических и генеративных тканях растений [32], что приводит к слабой передаче отредактированных аллелей потомству, поскольку редактирование в соматических тканях происходит гораздо активнее. Эта проблема проявляется

особенно ярко при редактировании генома *Arabidopsis thaliana* из-за особенностей трансформации этого растения [33, 34]. Для того чтобы избежать указанных недостатков, для экспрессии редакторов оснований в растениях применялись промотеры, обеспечивающие высокий уровень экспрессии на ранних стадиях развития растения [18, 27, 35]. Использование этих промоторов позволило повысить эффективность внесения целевых замен, а также их передачи потомству.

Перспективы применения редакторов оснований

К настоящему моменту создан набор разнообразных редакторов оснований, способных достаточно эффективно решать широкий круг экспериментальных задач, требующих введения однонуклеотидных замен в геномную ДНК. Сам подход редактирования отдельных нуклеотидов с помощью модифицированной технологии CRISPR/Cas9 продемонстрировал свою эффективность для редактирования генома в различных организмах, в том числе в растениях [4, 5].

Вероятно, внесение в геномную ДНК однонуклеотидных замен редакторами оснований в ближайшее время вытеснит подходы, основанные на гомологичной рекомбинации. Однако некоторые экспериментальные задачи в настоящий момент могут быть решены только с помощью последних [3], например, замена участков геномной ДНК, встраивание экзогенных последовательностей в геном, а также внесение нуклеотидных замен, для которых к настоящему моменту не разработано эффективных редакторов оснований. Предлагаются различные способы повышения универсальности и эффективности редактирования генома как с помощью направленной замены оснований, так и посредством подходов, вовлекающих гомологичную рекомбинацию [4, 5, 36, 37]. В 2017 г. был опубликован интересный подход, позволяющий в некоторой степени совместить вышеперечисленные преимущества редактирования посредством гомологичной рекомбинации с простотой и эффективностью применения редакторов оснований, для которых не требуется доставка в клетку донорной ДНК [38]. В этом исследовании осуществлялось введение однонуклеотидных замен и вставка небольших экзогенных последовательностей в геном растений риса. При этом, матрицей для гомологичной рекомбинации служили не донорные последовательности ДНК, а удлиненная с 3'-конца молекула sgRNA, содержащая участки гомологии с целевой последова-

тельностью в геномной ДНК [38]. Чтобы установить, может ли предложенный подход быть использован для высокоэффективного редактирования генома на различных объектах, необходимы дальнейшие исследования.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-29-08024, КПНИ «Картофелеводство» (Развитие селекции и семеноводства картофеля) и грантом Президента РФ № МК-5735.2018.11.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2017, 21(1), 104–111.
2. Hilscher J., Bürstmayr H., Stoger E. Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding. *Biotechnology J.*, 2017, 12(1), 1–14. doi: 10.1002/biot.201600173
3. Sun Y., Li J., Xia L. Precise genome modification via sequence-specific nucleases-mediated gene targeting for crop improvement. *Frontiers Plant Sci.*, 2016, 7(1928). doi: 10.3389/fpls.2016.01928
4. Hess G.T., Tycko J., Yao D., Bassic M.C. Methods and applications of CRISPR-Mediated base editing in eukaryotic genomes. *Molecular Cell*, 2017, 68(1), 26–43. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.029
5. Rees H.A., Liu D.R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat. Rev. Genet.*, 2018, 19(12), 770–788. doi: 10.1038/s41576-018-0059-1
6. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603), 420–424. doi: 10.1038/nature17946
7. Nishida K., Arazoe T., Yachie N., et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305), 1248. doi: 10.1126/science.aaf8729
8. Kim Y. B., Komor A. C., Levy J. M., et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(4), 371–376. doi: 10.1038/nbt.3803
9. Murovec J., Pirc Z., Yang B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. *Plant Biotechnol. J.*, 2017, 15(8), 917–926. doi: 10.1111/pbi.12736
10. Cebrian-Serrano A., Davies B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mammalian Genome*, 2017, 28(7–8), 247–261. doi: 10.1007/s00335-017-9697-4

11. Komor A. C., Zhao K. T., Packer M. S., et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C: G-to-T: A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances*, 2017, 3(8), eaao4774. doi: 10.1126/sciadv.aao4774
12. Gehrke J. M., Cervantes O., Clement M. K., et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10), 977–982. doi: 10.1038/nbt.4199
13. Kohli R. M., Maul R. W., Guminski A. F., et al. Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification. *J. Biological Chemistry*, 2010, 285(52), 40956–40964. doi: 10.1074/jbc.M110.177402
14. Li J., Sun Y., Du J., et al. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*, 2017, 10(3), 526–529. doi: 10.1016/j.molp.2016.12.001
15. Ren B., Yan F., Kuang Y., et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for efficient targeted base editing to induce genetic variations in rice. *Science China Life*, 2017, 60(5), 516–519. doi: 10.1007/s11427-016-0406-x
16. Zong Y., Wang Y., Li C., et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9- cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(2), 438–440. doi:10.1038/nbt.3811
17. Gaponenko A. K., Mishutkina Y. V., Timoshenko A. A., Shulga O. A. Genetic transformation of wheat: state of the art. *Rus. J. Genet.*, 2018, 54(3), 267–283. doi: 10.1134/S1022795418030043
18. Chen Y., Wang Z., Ni H., et al. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*. *Science China Life*, 2017, 60(5), 520–523. doi: 10.1007/s11427-017-9021-5
19. Tian S., Jiang L., Cui X., et al. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Reports*, 2018, 37(9), 1353–1356. doi: 10.1007/s00299-018-2299-0
20. Lu Y., Zhu J.K. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*, 2017, 10(3), 523–525. doi: 10.1016/j.molp.2016.11.013
21. Noia J. Di., Neuberger M.S. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*, 2002, 419(6902), 43–48. doi: 10.1038/nature00981
22. Hua K., Tao X., Zhu J.K. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16(7), 1–6. doi: 10.1111/pbi.12993
23. Ren B., Yan F., Kuang Y., et al. Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-Guided hyperactive hAID mutant. *Molecular Plant*, 2018, 11(4), 623–626. doi: 10.1016/j.molp.2018.01.005
24. Zong Y., Song Q., Li C., et al. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC 3A. *Nature Biotechnol.*, 2018, 36(10), 950–953. doi: 10.1038/nbt.4261
25. Shimatani Z., Kashojiya S., Takayama M., et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnol.*, 2017, 35(3), 441–443. doi: 10.1038/nbt.3833
26. Gaudelli N. M., Komor A. C., Rees H. A., et al. Programmable base editing of A–T to G–C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681), 464–471. doi: 10.1038/nature24644
27. Kang B.C., Yun J.Y., Kim S.T., et al. Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nature Plants*, 2018, 4(9), 427–431. doi: 10.1038/s41477-018-0178-x
28. Hua K., Tao X., Yuan F., et al. Precise A–T to G–C base editing in the rice genome. *Molecular Plant*, 2018, 11(4), 627–630. doi: 10.1016/j.molp.2018.02.007
29. Li C., Zong Y., Wang Y., et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol.*, 2018, 19(1), 59–68. doi: 10.1186/s13059-018-1443-z
30. Li H., Qin R., Liu X., et al. CRISPR/Cas9-mediated adenine base editing in the rice genome. *Rice Sci.*, 2019, 26(1), 2–6.
31. Haberland G.T., Cohen B.A., Reichert N.A., et al. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related solanum species. *Plant Science*, 1985, 39(1), 67–74. doi: 10.1016/0168-9452(85)90194-3
32. Sunilkumar G., Mohr L.A., Lopata-Finch E., et al. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol. Biol.*, 2002, 50(3), 463–474. doi: 10.1023/A:101983212
33. Wang Z.P., Xing H.L., Dong L., et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biology*, 2015, 16(1), 144–155. doi: 10.1186/s13059-015-0715-0
34. Yan L., Wei S., Wu Y., et al. High-Efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant*, 2015, 8(12), 1820–1823. doi: 10.1016/j.molp.2015.10.004
35. Xue C., Zhang H., Lin Q., et al. Manipulating mRNA splicing by base editing in plants. *Sci. China Life Sci.*, 2018, 61(9), doi: 10.1007/s11427-018-9392-7
36. Guha T., Edgell D. Applications of alternative nucleases in the age of CRISPR/Cas9. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18(12), 2565. doi:10.3390/ijms18122565
37. Gajula K.S. Designing an elusive C–G→G–C CRISPR base editor. *Trends in Biochem. Science*, 2018, in press. doi: 10.1016/j.tibs.2018.10.004
38. Butt H., Eid A., Ali Z., et al. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Using a Chimeric Single-Guide RNA Molecule. *Frontiers Plant Sci.*, 2017, 8(1441). doi: 10.3389/fpls.2017.01441

Plant genome editing by targeted nucleotide substitution

N.E. ZLOBIN^{1,*}, M.V. LEBEDEVA¹, V.V. TARANOV¹, P.N. KHARCHENKO¹, and A.V. BABAKOV¹

¹*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, 127550*

**e-mail*: stresslab@yandex.ru

Received November 01, 2018

Revised November 19, 2018

Accepted December 15, 2018

This review considers current methods of plant genome editing, based on a targeted substitution of bases in DNA using modified CRISPR/Cas9 system. In the first part of the review main principles of designing base editors for C–T and A–G targeted substitutions are described. Suggested solutions of the most actual challenges (reducing of the number of unwanted mutations in the targeted sites, precise targeting of the base editors on the target sequences in the genomic DNA) are provided. The second part of the review summarizes experience of using current base editors on plant genome editing in comparison with animal genome editing. Prospects for further development of precise modification of plant genomes are discussed.

Key words: CRISPR/Cas9, adenine deaminase, genome editing, plants, cytidine deaminase

Acknowledgements – This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research under Grant number 17-29-08024, and also by the State Task «Development of potato breeding and seed production» and RF president Grant number MK-5735.2018.11.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-59-68